ISTITUTO ZOOPROFILATTICO SPERIMENTALE
DELLA LOMBARDIA E DELL'EMILIA ROMAGNA
"BRUNO UBERTINI"
(ENTE SANITARIO DI DIRITTO PUBBLICO)

Sede Legale: Via Bianchi, 9 – 25124 Brescia - ITALIA
Tel. +3903022901 – Fax +390302425251 – Email info@izsler.it
C.F. - P.IVA 00284840170
N. REA CCIAA di Brescia 88834

1 **Premessa** **2**

2 **Farmaci con potenzialità d'abuso** **3**

2.1 *Accertamento del potenziale di induzione di abuso* *3*

2.2 Fasi della ricerca, sviluppo e controllo delle sostanze previste dalla norma. *5*

2.3 Conclusioni *11*

3 **Gli Xenotrapianti** **15**

3.1 Generalità *15*

3.1.1 Il Contesto 15

3.1.2 Aspetti immunologici 16

3.1.3 Strategie innovative 18

3.1.4 Rischio infettivo 18

3.1.5 Terapie immunosoppressive 19

3.1.6 Potenziali applicazioni dello xenotrapianto 19

3.2 Osservazioni conclusive *23*

ISTITUTO ZOOPROFILATTICO SPERIMENTALE
DELLA LOMBARDIA E DELL'EMILIA ROMAGNA
"BRUNO UBERTINI"
(ENTE SANITARIO DI DIRITTO PUBBLICO)

Sede Legale: Via Bianchi, 9 – 25124 Brescia - ITALIA
Tel. +3903022901 – Fax +390302425251 – Email info@izsler.it
C.F. - P.IVA 00284840170
N. REA CCIAA di Brescia 88834

RELAZIONE SUL RICORSO ALLA SPERIMENTAZIONE ANIMALE PER LE SOSTANZE D'ABUSO E XENOTRAPIANTO

1 Premessa

Il presente documento è stato predisposto come aggiornamento a quanto già inviato nel corso dell'anno 2016. Il riferimento normativo è rappresentato dal DLGS 26/2014 art. 42. comma 2 e consegue alla valutazione e monitoraggio dei metodi alternativi all'utilizzo di animali per le disposizioni di cui all'art. 5 comma 2 d) – *Non possono essere autorizzate le procedure per xenotrapianti* - e art.5 comma 2 e) - *Non possono essere autorizzate le procedure per le ricerche sulle sostanze d'abuso*.

La relazione è stata predisposta grazie alla collaborazione scientifica dei seguenti esperti nelle rispettive materie di interesse:

Prof. Cristiano Chiamulera. Dipartimento di Diagnostica e Sanità Pubblica. Settore scientifico disciplinare: Farmacologia. Università di Verona.

Prof. Gaetano Di Chiara. Dipartimento di Scienze Biomediche. Università di Cagliari

Prof. Cesare Galli, DVM, PhD, Avantea e Fondazione Avantea Onlus, Cremona

Dr. Emanule Cozzi, MD, PhD. Dipartimento di medicina Trasfusionale. Unità di Immunologia dei Trapianti. Università di Padova

Prof. Giuseppe Remuzzi, Direttore Istituto Mario Negri

Dr. Giuliano Grignaschi, DVM, Responsabile del Benessere Animale Direzione servizi per la ricerca Università degli Studi di Milano

2 Farmaci con potenzialità d'abuso

2.1 Accertamento del potenziale di induzione di abuso.

Come già evidenziato nella precedente relazione, è necessario effettuare alcune precisazioni prodromiche al fine di rendere maggiormente chiaro cosa si intende per sostanze d'abuso e come vengono studiate.

Il riferimento regolatorio per la verifica delle sostanze oggetto della presente relazione, è rappresentato dalla lista approvata da Food and Drug Administration (FDA) condivisa da EMEA nel 2013 e sintetizzata nella tabella n°1.

Inoltre, sul sito del Ministero della Salute alla voce "Tabelle stupefacenti e psicotrope" sono disponibili le tabelle aggiornate relative ai medicinali a base di sostanze attive stupefacenti e psicotrope di corrente impiego terapeutico ad uso umano o veterinario. In sintesi, esse si suddividono in quattro differenti tipologie:

N° 1:

- Oppio e derivati oppiacei (morfina, eroina, metadone ecc.)
- Foglie di Coca e derivati
- Amfetamina e derivati amfetaminici (ecstasy e designer drugs)
- Allucinogeni (dietilammide dell'acido lisergico – LSD, mescalina, psilocibina, fenclidina, ketamina ecc.)

N° 2:

- Cannabis

N°3:

- Barbiturici

N° 4:

- Benzodiazepine

Da ultimo, è disponibile una tabella in cui vengono riportati i medicinali contenenti sostanze attive ad attività farmacologica.

Queste ultime si suddividono in quattro gruppi indicati con le lettere alfabetiche (A, B, C, D) e comprendono:

A. Medicinali a base di morfina e sostanze analgesiche oppiacee
B. Medicinali di origine vegetale a base di Cannabis
C. Barbiturici
D. Benzodiazepine (diazepam, flunitrazepam, lorazepam)

Ogni nuovo composto chimico/sostanza farmacologicamente attiva che attraversa la barriera emato-encefalica, indipendentemente dal fatto che il sistema nervoso centrale (SNC) possa costituire la sede dell'azione terapeutica, deve essere sottoposto ad una serie di accertamenti consistenti in differenti passaggi.

Questi rappresentano le basi da cui partire per ottenere delle sostanza idonee ad essere impiegate come farmaci; nello specifico, si possono definire tre fasi di valutazione:

1. fase preliminare di screening che comprende test *in vitro*
2. indagini precliniche da svolgersi in modelli animali
3. trials clinici da condursi in pazienti umani successivamente all'ottenimento di solide evidenze sperimentali in modelli animali.

Entrambe le indagini *in vivo* hanno il fine di accertare la potenziale induzione d'abuso, tolleranza e/o dipendenza fisica della sostanza/farmaco in oggetto.

La "Food and Drug Administration – FDA" è l'ente governativo statunitense che si occupa della regolamentazione dei prodotti alimentari e farmaceutici inclusi vaccini, dispositivi medici, emoderivati e tutti gli altri prodotti impiegati a salvaguardia della salute pubblica. In questo contesto, viene fornita la definizione di sostanza d'abuso, **come un'ampia gamma di prodotti/sostanze/farmaci che, in linea generale, agiscono sul SNC, risultano provviste di caratteristiche farmacologiche sovrapponibili a quelle possedute da altre sostanze note essere causa di potenziale dipendenza (*abuse potential*), e possono essere associate a vari effetti sulla psiche (sedazione, euforia, cambiamento dell'umore)**.

Nel contesto europeo, l'Agenzia Europea dei Medicinali – EMA, coinvolta nella valutazione dei medicinali, propone la seguente definizione: le sostanze d'abuso come **quelle sostanze in grado di indurre una sindrome da dipendenza le cui caratteristiche rientrano nella "*International Statistical Classification of Diseases and Related Health Problems*", revisione 10 (ICD-10)**. La sopracitata sindrome si contraddistingue per una serie di atteggiamenti comportamentali, cognitivi e fisiologici conseguenti all'uso/assunzione ripetuta di sostanze/farmaci, di cui il soggetto non può evitare l'impiego (desiderio incontrollato o applicazione terapeutica/farmacologica) nonostante gli effetti dannosi e gravi derivanti dalla sua assunzione.

2.2 Fasi della ricerca, sviluppo e controllo delle sostanze previste dalla norma.

Il ricorso alla sperimentazione animale è perseguito per tre diversi ambiti operativi:

1) ricerca di base;
2) ricerca traslazionale;
3) adempimenti di tipo regolatorio.

Ricerca di base

Gli studi di nuovi farmaci e sostanze d'abuso condotti negli animali da laboratorio e nei primati non antropomorfi hanno contribuito ad acquisire informazioni relative alle basi biologiche della esigenza nell'uomo di assumere una sostanza. A questo riguardo appare fondamentale sottolineare come le basi della farmacodipendenza siano comuni ad altre forme di dipendenza, come quella da cibo e/o varie dipendenze di tipo non farmacologico (per es. gioco d'azzardo patologico).

Ricerca traslazionale

Utilizza il modello animale per lo studio e lo sviluppo di nuovi farmaci e/o di nuovi interventi psico-comportamentali (per es., interventi che facilitano l'estinzione del comportamento di assunzione di farmaci), fra i quali si riconoscono quelli che in un approccio integrato siano finalizzati all'intervento terapeutico farmacologico e psicoterapico dei pazienti sofferenti di un disturbo da uso di sostanze (DUS; come da definizione del Manuale Diagnostico e Statistico dei Disturbi Psichiatrici, ed. 5; DSM-5, American Psychiatry Association 2013) legali e/o illecite (alcool, tabacco, droghe), così come anche da cibo e altre dipendenze non farmacologiche (per es. gioco d'azzardo patologico).

Adempimenti di tipo regolatorio

L'approvazione e la conseguente immissione in commercio di nuovi farmaci è subordinata alla valutazione di parametri finalizzati ad accertare innocuità ed efficacia delle sostanze attive, oltre che alla determinazione della potenziale induzione della dipendenza alla sostanza stessa nel soggetto trattato/esposto.

Nelle linee guida dell'EMA vengono indicate le principali classi di principi attivi, fra i quali si riconoscono: oppiacei, stimolanti del SNC, sedativi, ansiolitici ed altre tipologie di farmaci. Una particolare attenzione è rivolta a categorie farmacologiche innovative per le quali non sono disponibili standard di riferimento (diagramma allegato).

Per tutte le classi di sostanze attive, come pure per le nuove tipologie di prodotti, l'eventuale immissione in commercio deve essere obbligatoriamente preceduta dal perseguimento di un percorso

finalizzato ad evidenziarne le caratteristiche intrinseche. In particolare, il suddetto percorso si concretizza in tre differenti fasi.

La prima fase consta di una serie di indagini condotte mediante test di laboratorio volti ad acquisire informazioni dettagliate relativamente ai diversi parametri di riferimento.

Da questo punto di vista, è importante indicare che queste prime fasi vengono condotte a scopo di screening per individuare le sostanze effettivamente promettenti da sottoporre ai successivi passaggi necessari per ottemperare alle richieste del regolatorio.

A tale scopo è, altresì, opportuno indicare che le metodiche applicate sono eseguite *in vitro*, pertanto questo approccio può essere individuato nell'ambito del principio delle 3Rs come una procedura di riduzione del numero degli animali impiegati in sperimentazione.

Fase I: indagini di laboratorio

1) identificazione della struttura chimica;
2) accertamento del meccanismo di azione;
3) valutazione del profilo farmacodinamico e farmacocinetico;
4) esecuzione di indagini tossicologiche.

Una volta che i suddetti parametri siano stati accertati e i risultati emersi ritenuti promettenti, si rende necessario proseguire l'attività con ulteriori valutazioni finalizzate ad evidenziare il potenziale rischio correlato alla induzione della dipendenza da parte della sostanza/farmaco in esame.

Anche a questo livello le indagini debbono essere condotte con tecnologie di laboratorio secondo quanto indicato di seguito.

FASE II A: indagini di laboratorio

1) caratterizzazione dei legami ai recettori di organi e tessuti bersaglio;
2) identificazione dei siti di azione farmacologica;
3) accertamento della presenza di metaboliti attivi a livello cerebrale e caratterizzazione degli stessi;
4) valutazione dell'azione della sostanza in esame sui sistemi di neurotrasmettitori.

A questo punto, nel caso in cui queste prime fasi abbiano evidenziato sostanze promettenti dal punto di vista terapeutico, è necessario predisporre le analisi precliniche in modello animale (fase operativa II B), in quanto è imprescindibile valutare gli effetti che le sostanze esercitano sul comportamento e la capacità di indurre dipendenza farmacologica da parte delle sostanze/farmaci in oggetto.

La valutazione relativa alla farmacocinetica e farmacodinamica delle sostanze in fase di studio consentono di raccogliere i dati conseguenti alla esposizione per via sistemica alla sostanza e/o ai suoi metaboliti.

Inoltre, al fine di redigere un protocollo sperimentale corretto è importante identificare la specie target idonea allo svolgimento delle prove e la concentrazione soglia da utilizzare nello studio. Entrambi questi aspetti sono dei parametri fondamentali per l'accertamento del potenziale d'abuso.

La scelta della specie e della dose soglia consentono non solo una corretta esecuzione dell'esperimento, ma anche lo sviluppo di una ricerca che consenta di ridurre al minimo indispensabile il numero degli animali impiegati e di mirare lo studio in modo tale da non renderne necessaria la ripetizione in caso di risultati dubbi.

Questa valutazione si rende necessaria sia per la corretta applicazione del principio delle 3Rs sia per una raccolta dei dati che consenta una valutazione corretta della sicurezza e dell'efficacia della sostanza in esame.

FASE II B: indagini precliniche nel modello animale

I modelli animali comunemente utilizzati si identificano in primati non umani e in varie specie di roditori, i quali sono sottoposti a valutazioni comportamentali conseguenti alla somministrazione della sostanza in esame a diverse dosi.

Le metodologie adottate, sono generalmente basate sull'auto-somministrazione o sulla scelta preferenziale di un ambiente condizionato alle proprietà gratificanti della sostanza studiata.

Il soggetto sottoposto a valutazione clinica, può reagire con un'auto-somministrazione della sostanza studiata, in quanto la sua assunzione induce uno stato emozionale favorevole.

Tale comportamento si ritiene essere indice di potenziale d'abuso/dipendenza di una specifica sostanza anche nell'uomo.

E' stato accertato che per determinate classi di sostanze con caratteristiche farmacologiche ben definite, quali stimolanti (cocaina, anfetamine ed altri), oppioidi (analgesici e anestetici) e depressivi (sedativi, benzodiazepine ed altri) il modello animale nei mammiferi quali ratti e topi è predittivo del potenziale di induzione dipendenza/abuso nell'uomo.

Viceversa, l'assenza di un comportamento di auto-somministrazione di una determinata sostanza non consente di escludere che la stessa possieda potenziale d'abuso, in quanto alcune classi di sostanze non rivestono alcun interesse per l'animale che non è incentivato ad assumerle.

Inoltre, il modello animale non può essere applicato per lo studio di alcune classi di sostanze (per es: allucinogeni e cannabinoidi) le cui caratteristiche (per es: la solubilità ridotta) non consentono di ottenere risultati riproducibili ed attendibili.

I test condotti nel modello animale svolgono un ruolo chiave in quanto consentono di definire come le nuove sostanze possano influenzare lo stato psico-fisico del soggetto e, conseguentemente, il suo comportamento. Inoltre, i risultati conseguiti nelle indagini condotte su nuovi prodotti permettono di effettuare un confronto con quelli ottenuti nella valutazione di sostanze con caratteristiche chimiche e farmacologiche similari.

Le indagini pre-cliniche permettono non solo di determinare la potenziale capacità che una sostanza possa indurre dipendenza (potenziale d'abuso) conseguentemente ad un processo di adattamento neurologico, ma anche di valutare gli effetti sullo stato psico-fisico provocati dalla cessazione della sua assunzione/somministrazione. Infatti, l'interruzione dell'assunzione/somministrazione di una sostanza/farmaco può evolvere in una sintomatologia grave e debilitante di tipo psicologico/psichico/farmacologico comunemente indicata come "sindrome da astinenza".

La sindrome da astinenza può anche essere indotta da farmaci utilizzati per approcci terapeutici di tipo cronico e, quindi, prolungati nel tempo; le ricadute conseguenti alla interruzione della loro assunzione sono molto frequenti. Un esempio significativo a questo riguardo è rappresentato dagli analgesici oppiodi, i quali sono ampiamente utilizzati nella terapia anti-dolorifica, ma sono ritenuti responsabili di causare dipendenza.

Il modello animale ha contribuito significativamente anche allo studio dei meccanismi neuro-farmacologici correlati alle ricadute conseguenti alla interruzione della assunzione/somministrazione di una farmaco/sostanza.

Gli esiti conseguiti nella fase pre-clinica sono quindi fondamentali nella caratterizzazione del potenziale di abuso dei farmaci ed anche nella valutazione della sindrome da astinenza.

Nel caso in cui le sostanze oggetto della fase pre-clinica siano ritenute idonee, il passaggio successivo è rappresentato dall'indagine *in vivo* nell'uomo.

FASE III: trials clinici

Lo stadio finale della sperimentazione sulle sostanze aventi potenziale d'abuso consiste nell'applicazione del prodotto in esame in pazienti umani e nel *follow-up* prolungato dei soggetti trattati.

Di seguito sono presentati alcuni farmaci attualmente utilizzati in terapia nei pazienti affetti da farmacodipendenza che hanno concluso l'iter indicato

Tabella n° 1. Farmaci approvati per il trattamento dei disturbi da uso di sostanze da parte della Food and Drug Administration (in ordine cronologico di approvazione). Approvato da EMEA (European Medicines Agency) nel 2013. Tratta e modificata da: Chiamulera C. Adattamento della risposta alle sostanze e tossicodipendenza. In: Farmacologia generale e molecolare. A cura di: Clementi F, Fumagalli G., UTET, Milano, 2012. Pp. 75-84.

Farmaco	Indicazione clinica
Disulfiram	Alcolismo
Metadone	Sostituzione oppioide nel trattamento dell'astinenza
Sostitutivi a base di nicotina	Riduzione sintomi di astinenza da tabacco
Naltrexone e nalmefene	Riduzione consumo di alcol e prevenzione della ricaduta
Bupropione	Azione anti-craving e prevenzione della ricaduta nei fumatori
Buprenorfina	Sostituzione oppioide nel trattamento dell'astinenza
Acamprosato	Prevenzione della ricaduta negli alcolisti
Vareniclina	Prevenzione della ricaduta nei fumatori.

1.1. Ricerca di base sulle nuove sostanze psicoattive

Il meccanismo d'azione delle sostanze psicoattive rappresenta, a tutt'oggi, un argomento molto complesso nelle differenti fasi di studio. Infatti, è necessaria una valutazione dei principi attivi su diversi fronti anatomo/fisiologici e comportamentali, i quali, nel loro complesso possono essere a loro volta elaborati mediante l'integrazione di diversi approcci: molecolari, cellulari e comportamentali.

Il punto cardine nella valutazione delle sostanze d'abuso è proprio l'induzione della dipendenza che le stesse possono determinare nei soggetti che ne fanno un uso cronico; tale fenomeno non è legato al solo effetto farmacologico, ma anche all'associazione di questo con atteggiamenti comportamentali e stimoli ambientali che si associano alle proprietà introcettive della sostanza.

Questi ultimi effetti non possono essere simulati e/o studiati con metodiche *in vitro*, in quanto non è possibile, attualmente, fornire dei modelli predittivi che siano in grado di fornire i medesimi risultati ottenuti con l'impiego dello studio *in vivo*.

Un esempio in tal senso è rappresentato dall'assunzione di morfina nella terapia del dolore, la semplice evidenza che la morfina si lega ad uno specifico recettore coinvolto nei fenomeni di analgesia non è sufficiente a spiegare lo svilupparsi di farmacodipendenza da oppiacei (ovvero, chi riceve morfina come farmaco per il trattamento del dolore, non diventa automaticamente dipendente da essa).

Lo studio pluridecennale dei modelli comportamentali che utilizzano gli animali, hanno una validità scientificamente riconosciuta e che si basa su tre tipi di approccio:

- *Face validity*, che consente di mimare la condizione clinica, i sintomi e la fenomenologia di quanto si evidenzia nell'essere umano che soffre di farmacodipendenza
- *Construct validity,* valutazione dei meccanismi fisiopatologici alla base dei processi psico-comportamentali.
- *Predictivity validity,* possibilità di indagare la probabilità di potenziali effetti terapeutici/tossici di un nuovo farmaco

Come sopra accennato, l'aspetto cruciale che rende il modello animale ancora il sistema di studio fondamentale e non sostituibile per la valutazione delle sostanze d'abuso, è proprio la necessità di valutare quei meccanismi neurobiologici che sono alla base dell'instaurarsi della dipendenza da questo tipo di sostanze. Le stesse, infatti, agiscono sui meccanismi cerebrali che sono preposti alla mediazione dei fisiologici ed ancestrali processi motivazionali di ricerca e soddisfazione dei bisogni primari (alimentazione, riproduzione, etc), andando a modificarli in modo più o meno importante.

In questo senso, l'impiego dell'animale consente di ricreare le condizioni fisiologiche e di modificare le stesse in senso patologico ad opera delle sostanze d'abuso. Tale passaggio rappresenta esattamente quanto avviene nell'uomo che sviluppa farmacodipendenza.

L'unica alternativa all'uso dei modelli animali attualmente disponibile è la sperimentazione nel volontario sano, oppure in soggetti utilizzatori di sostanze psicoattive. Nonostante, questo approccio possa essere necessario nello studio di nuovi interventi terapeutici di disassuefazione, oppure nella valutazione delle potenzialità d'abuso di farmaci in sviluppo, appaiono evidenti i quesiti etici relativi alla possibilità di effettuare sperimentazione di base ed identificare nuove sostanze psicoattive (provenienti per es. da sequestri), di cui sono ignoti gli effetti farmacologici e soprattutto quelli tossicologici.

Come già evidenziato nella precedente relazione ed anche nella presente, è importante evidenziare che, nell'ambito della ricerca, è già stato compiuto un importante progresso nel senso del principio delle 3Rs. Infatti, l'utilizzo di metodiche *in vitro* nelle fasi iniziali della sperimentazione, come indicato al paragrafo 1.2, consente di ridurre in modo importante l'utilizzo degli animali e di confinare la parte relativa alla sperimentazione *in vivo* solo nella fase finale del trial clinico.

Inoltre, la possibilità di integrare i dati provenienti dalle metodiche *in vitro* e quelle *in vivo*, consente di avere una migliore e completa valutazione del meccanismo d'azione del farmaco in tutta la sua complessità.

2.3 Conclusioni

In conclusione a quanto riportato nella presente relazione, si evince che, attualmente, non sia possibile eliminare il modello animale nello studio delle sostanze d'abuso, sia per quanto riguarda le nuove tipologie di sostanze per cui non è previsto alcun impiego terapeutico (droghe), sia per quelle da destinarsi a terapie farmacologiche.

La possibilità data dalle nuove tecnologie *in vitro* applicate alle scienze biomediche, consente di compiere valutazioni di screening fondamentali per non impiegare in modo inutile animali a scopo di ricerca. L'approccio *in vivo* confinato alla sola fase finale della ricerca, consente un percorso solido e che garantisce sicurezza ed efficacia nell'impiego dei principi attivi. Da ultimo, è importante sottolineare come anche l'aspetto inerente l'allestimento delle prove *in vivo*, sia pensata in modo tale da ridurre al minimo il numero degli animali impiegati senza andare a scapito dell'attendibilità e validità dei risultati ottenuti durante il trial clinico.

Pertanto, **alla data odierna la completa sostituzione del modello animale nello studio delle proprietà d'abuso dei farmaci non è realizzabile in quanto non esistono metodi alternativi in**

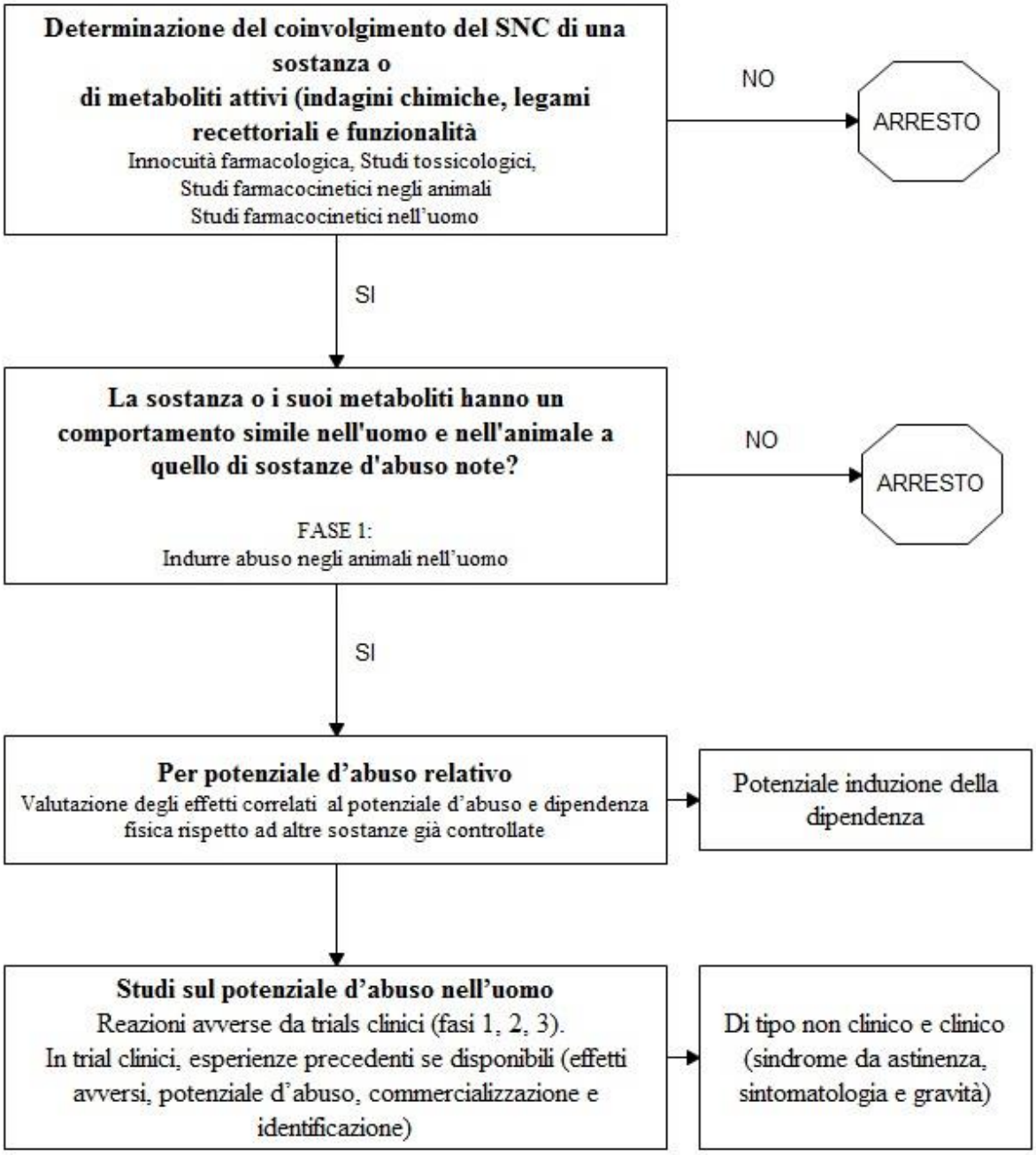
grado di valutare gli effetti comportamentali e neurobiologici/psicologici indotti dall'assunzione/somministrazione di una sostanza. Attualmente, la complessità biologica caratteristica dell'essere vivente, ed in particolare dei mammiferi, riveste ancora un ruolo chiave e non può essere sostituita con alcun modello alternativo di altra natura.

E' importante sottolineare che si sta valutando la possibilità di impiegare, come richiesto dalla normativa vigente, organismi viventi a sviluppo evolutivo inferiore rispetto ai mammiferi e rappresentato da zebra-fish (*Danio rerio*). Tuttavia, questo potenziale sistema alternativo non ha ancora un'applicazione reale come sostituto nell'impiego di mammiferi, quali ratti e topi, come modelli predittivi del potenziali d'abuso dei farmaci nell'uomo.

Si sottolinea comunque la necessità di standardizzare le metodologie perseguite dagli addetti dei vari Centri e la identificazione di processi di indagine semplificati trasferibili all'uomo (*Markou et al.,* 2008).

Per concludere, è importante sottolineare come la sperimentazione animale abbia permesso e continua a permettere una maggiore conoscenza della tossicodipendenza, la quale rappresenta un disturbo psico-comportamentale dagli enormi costi sanitari e socio-economici. La sperimentazione animale ha permesso quindi di aumentare le probabilità di migliorare il quadro clinico e la qualità di vita delle persone affette da disturbo da uso di sostanze, ed ha generato le conoscenze per modificare gli stili di vita in funzione di prevenzione della transizione da un uso ricreativo di sostanze all'abuso compulsivo.

Figura n° 1. Flusso operativo relativo alla determinazione del potenziale d'abuso di una nuova sostanza (Calderon S., Giarola A., Heal D. 2015)



Referenze bibliografiche

Calderon S et al. Regulatory framework and guidance to the evaluation of the abuse liability of drugs in the United States and Europe. In: Non clinical assessment of abuse potential for new pharmaceuticals. Compton T.G. (ed) Academic Press. 2015, 245-268

Chiamulera C., Auber A. Memoria degli effetti delle sostanze: neurobiologia e processi. Medicina delle Dipendenze (Italian Journal of the Addictions), III:12, 7-11, 2013.

Chiamulera C., Hinnenthal I., Auber A., Cibin M., Reconsolidation of maladaptive memories as a therapeutic target: preclinical data and clinical approaches. Front Psychiatry. 2014 Aug 19;5:107. doi: 10.3389/fpsyt.2014.00107.

Ferdowsian H.R. Ethical and scientific considerations regarding animal testing and research. PlosOne. 2011, DOI 10:1371

Li Y, Chen T, Miao X, Yi X, Wang X, Zhao H, Lee SM, Zheng Y. Zebrafish: A promising in vivo model for assessing the delivery of natural products, fluorescence dyes and drugs across the blood-brain barrier. Pharmacol Res. 2017 Nov;125(Pt B):246-257

Lynch W.L. et al. Animal models of susbstance abuse and addition:implications for science, animal welfare and society. Comp. Med. 2010, 60:177-188

Markou a et al. Contribution of animal models and preclinical human studies to medication development for nicotine dependence. Animal and Transaltional models for CNS drug discovery. Vol 3: Reward deficit disorders. McArthur R. and Borsini F (eds), Academic Press 2008

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

Sardela VF, Anselmo CS, Nunes IKDC, Carneiro GRA, Dos Santos GRC, de Carvalho AR, Labanca BJ, Silva Oliveira D, Ribeiro WD, de Araujo ALD, Padilha MC, de Lima CKF, de Sousa VP, de Aquino Neto FR, Gualberto Pereira HM. Zebrafish (Danio rerio) water tank model for the investigation of drug metabolism: Progress, outlook, and challenges. Drug Test Anal. 2018 Nov;10(11-12):1657-1669.

Venniro M et al. Animal models of drug relapse and craving: from drug priming-induced reinstatement to incubation of craving after voluntary abstinence, Chapter 2 Progress in Brain Research, Vol 224, ISSN 0079-6123

Yardley M.M. et al. Medications development for the treatment of alcohol use disorder: insights into the predictive value of animal and human laboratory models. Addiction Biology. Addiction Biology. 2016, DOI 10.1111/adb.12349

Guideline on the non clinical investigation of the dependence potential of medicinal products EMEA/CHMP/SWP/94227/2004

Guidance for Industry. Assessment of abuse potential of drugs. U.S. Department of Health and Human Services Food and Drug Administration. Center for drug evaluation and Research (CDER). 2010

Yoganantharjah P, Gibert Y The Use of the Zebrafish Model to Aid in Drug Discovery and Target Validation. Curr Top Med Chem. 2017;17(18):2041-2055.

3 Gli Xenotrapianti

3.1 Generalità

3.1.1 Il Contesto

Il trapianto d'organo rappresenta un importante successo della medicina moderna, ma le sue applicazioni, nonostante le elevate potenzialità di successo, sono limitate a causa dell'insufficiente disponibilità di organi rispetto alle richieste (Boksa et al., 2015). Questa disparità tra disponibilità e domanda (donatore/ricevente) porta, in alcuni casi, all'impiego di organi da donatori subottimali (quali ad esempio donatori ipertesi o con ridotta tolleranza al glucosio). Inoltre questa condizione spesso pone dei rischi in termini di biosicurezza in quanto lo stato sanitario del donatore può, in alcuni casi, non essere noto o difficilmente determinabile. Al fine di supplire a tale carenza è da tempo oggetto di studio il possibile ricorso ad organi ottenuti da specie animali (xenotrapianto). Per permettere la futura applicazione clinica di un programma di xenotrapianto in pazienti in attesa di trapianto d'organo, gli studi condotti finora in ambito sperimentale si sono focalizzati su tre tematiche principali, di seguito riportate:

1. messa a punto di tecnologie di "genome editing" volte all'impiego di animali donatori "ingegnerizzati" con caratteristiche tali per cui i loro organi, una volta trapiantati, non vadano incontro alla reazione di rigetto attivata dal sistema immune del ricevente.
2. rischio di infezioni con l'obiettivo di ridurre l'eventuale trasmissione di agenti zoonotici facendo ricorso ad animali allevati in condizioni ambientali controllate e sottoponendo i donatori ad accurate indagini per accertarne le condizioni sanitarie.
3. studio di nuove strategie immunosoppressive in grado di prevenire o controllare la risposta immunologica nei confronti degli organi di animali trapiantati.

Di seguito vengono brevemente presi in esame i fattori che hanno rappresentato finora i principali ostacoli allo xenotrapianto, i risultati conseguiti nei numerosi studi condotti dai ricercatori nel mondo che hanno consentito di superare parzialmente o, in alcuni casi, completamente i limiti iniziali, e le incompatibilità ancora esistenti che necessitano di ulteriori indagini.

La principale specie identificata quale donatore di organi nello xenotrapianto è il suino; viceversa, la specie fino ad oggi utilizzata quale ricevente nei modelli preclinici di xenotrapianto è stata il primate non umano. A questo proposito, alla luce di una sempre crescente difficoltà nell'utilizzare primati non umani nella sperimentazione preclinica, sono in fase di messa a punto modelli di xenotrapianto che utilizzano, come alternativa ai primati, suini portatori di mutazioni genetiche indotte che li rendono immunologicamente più simili all'uomo. In particolare, con il *genome editing* recentemente

è stato possibile ottenere linee di suini KO per il gene *GGTA1* (alpha 1,3 galactosyltransferase), il gene *CMAH* (cytidine monophosphate-N-acetylneuraminic acid hydroxylase) ed il gene *B4GALNT2* (beta-1,4-N-acetyl-galactosaminyl transferase 2) e *B4GALNT2L.* Queste nuove linee genetiche di suini sono ora utilizzate per le ricerche immunologiche sullo xenotrapianto.

Tale aspetto è ancora più rilevante per lo studio dello xenoantigene Neu5Gc (acido neuroaminoglicolico) identificato più recentemente, che risulta essere molto immunogeno nell'uomo (Scobie et al., 2013), ma che non è espresso nel primate rendendo il modello suino-primate inutile per gli studi preclinici volti a valutare la rilevanza di questo xenoantigene nell'uomo.

3.1.2 *Aspetti immunologici*

(Boksa et al., 2015)

Con l'impiego di organi prelevati da suini convenzionali, i principali aspetti sfavorevoli allo xenotrapianto sono ascrivibili al rigetto iperacuto, al rigetto vascolare acuto, all'attivazione del processo di coagulazione, all'azione citotossica mediata da cellule Natural Killer (NK) ed al rigetto sostenuto dall'intervento di macrofagi. Di seguito vengono sinteticamente riportate le azioni attuate dai diversi gruppi di ricerca finalizzate ad eliminare gli aspetti sfavorevoli citati.

a) Rigetto iperacuto

E' principalmente attribuibile all'espressione dell'antigene *Galα1,3Gal* presente nei glicolipidi e glicoproteine delle cellule di suino. La prevenzione del rigetto iperacuto è stata perseguita con due diverse strategie:

1. inattivazione del gene che codifica per l'enzima α1,3 Galactosiltransferasi negli organi del donatore. Con questo approccio, negli studi più recenti nessuno degli organi trapiantati è stato perso a causa del rigetto iperacuto. Ad esempio, in alcuni casi la sopravvivenza e la funzionalità dello xenotrapianto di cuore è stata superiore ai 500 giorni e il fallimento del trapianto stesso è ascrivibile ad eventi non correlati al rigetto iperacuto.
2. creazione di suini transgenici che esprimano proteine regolatrici del complemento (principalmente CD46, CD59 e CD55), in grado di proteggere l'organo trapiantato dal danno mediato dall'attivazione dei vari fattori del complemento del ricevente.

Entrambe le strategie sono state utilizzate anche congiuntamente con successo per inibire il rigetto iperacuto.

b) Rigetto vascolare acuto o "rigetto ritardato"

Il rigetto vascolare acuto, più ritardato rispetto al precedente, è conseguente all'intervento di anticorpi neoformati, di monociti e cellule NK, e all'attivazione delle cellule endoteliali con deposito di piastrine e fibrina, e da ultimo comporta la perdita dell'organo trapiantato.

Questa forma di rigetto è particolarmente resistente alle terapie immunosoppressive convenzionali. Tuttavia, grazie all'impiego di organi ottenuti da animali ingegnerizzati di ultima generazione associati a nuovi approcci immunosoppressivi (che inibiscono la via di attivazione CD40-CD154), risultati recenti hanno permesso di evidenziare un prolungamento considerevole della sopravvivenza di uno xenotrapianto, che in diversi animali ha permesso una sopravvivenza superiore ad un anno, in assenza di rigetto vascolare acuto (Mohiuddin et al., 2016).

c) Barriera della coagulazione

Gli organi di animali transgenici trapiantati sono oggetto di processi trombotici che contribuiscono al rigetto. In particolare, si osservano depositi di fibrina e aggregazione di piastrine con formazione di trombi nei vasi dell'organo trapiantato.

Lo sviluppo di animali geneticamente modificati volti a ridurre l'incompatibilità immunologica e ad inibire l'attivazione dei processi trombotici grazie all'espressione di hTM (trombomodulina umana), associati all'impiego di inibitori della via di attivazione CD40-CD154, hanno risolto in buona parte il problema rappresentato dalla barriera della coagulazione nel trapianto di cuore in trapianto eterotopico (Mohiuddin et al., 2016) e ortotopico (Langin et al., 2018)

d) Citotossicità sostenuta da cellule Natural Killer (NK)

A questo riguardo le ricerche sono ancora in corso e hanno l'obiettivo di inibire l'azione citotossica diretta delle cellule NK. Infatti, studi *in vitro* hanno documentato che le cellule endoteliali di suino, in quanto mancanti del complesso maggiore di istocompatibilità (MHC I), vengono lisate direttamente dalle cellule NK umane.

e) I macrofagi ed il loro ruolo nel rigetto

Essi intervengono principalmente nel rigetto acuto vascolare e cellulare. In quest'ultimo caso, il macrofago gioca un ruolo determinante nell'attivazione di linfociti T, presentando al linfocita gli antigeni dell'organo trapiantato. Anche per questo aspetto è probabile che la creazione recente di suini transgenici che esprimono l'antigene umano CD47, noto essere un inibitore della fagocitosi, contribuirà a superare l'ostacolo del trapianto da suino a primate non umano.

3.1.3 Strategie innovative

Più recentemente, grazie alle tecnologie avanzate quali "CRISPR/Cas9" (Yang L *et al*., 2014; Kiani *et al*., 2015) è possibile eliminare coppie di uno o più geni da un embrione di suino in tempi rapidi e ottenere suini privi degli antigeni maggiormente responsabili della reazione di rigetto o altri eventi indesiderati quando un organo viene trapiantato nel ricevente primate non umano. In futuro si auspica che con tale tecnologia combinata a tecniche di ingegneria genetica in grado di introdurre geni immunosoppressori, si possa eliminare il ricorso alle terapie immunosoppressive che ad oggi devono essere necessariamente utilizzate

3.1.4 Rischio infettivo

(Hawthorne et al.; Niu et al., 2017; Yang et al., 2015)

Gli animali utilizzati quali donatori di organi devono essere sottoposti ad un accurato accertamento sanitario per valutare l'eventuale presenza, anche in forma silente/persistente, di agenti patogeni. A questo riguardo, sino ad oggi il principale problema era rappresentato dai retrovirus endogeni (porcine endogenous retroviruses - PERVs) i quali, alla stessa stregua di tutti i *Retrovirus*, sono integrati nel genoma cellulare. Essi sono in grado di infettare cellule umane, ma solamente nei sistemi *in vitro*. Attualmente non esistono evidenze di infezioni da PERVs e da altri virus quali *Citomegalovirus*, *Circovirus* tipo 2, virus linfotropici del suino in primati non umani (e pure nell'uomo nel caso dello xenotrapianto di isole pancreatiche del maiale) anche studiati a distanza di parecchi anni dallo xenotrapianto. Tuttavia, il potenziale rischio zoonotico, anche se ad oggi non dimostrato, è stato una dei principali ostacoli all'applicazione clinica dello xenotrapianto. Inoltre, la necessità di sottoporre i pazienti a terapie immunosoppressive che potrebbero facilitare la replicazione di patogeni eventualmente presenti nell'organo trapiantato costituisce un aspetto che richiede particolare attenzione.

La tecnologia CRISPR-Cas9 "RNA-*guided nuclease system*" citata è stata utilizzata anche per inattivare 62 geni della regione "pol" codificanti per i PERVs in una linea cellulare di rene di suino con conseguente riduzione di 1.000 volte della trasmissione *in vitro* dell'infezione dei PERVs a cellule umane.

Nonostante i progressi raggiunti e le osservazioni relative all'assenza di patologie cliniche attribuibili all'attivazione di PERVs in primati umani e non umani sottoposti a xenotrapianti, le Autorità regolatorie nord americane (Food and Drug Administration – FDA) (Reardon, 2015) consentono il ricorso allo xenotrapianto soltanto per i soggetti le cui condizioni di vita sono talmente gravi da non consentire altre alternative.

3.1.5 Terapie immunosoppressive

(Boksa et al., 2015)

Le terapie anti rigetto sono sempre somministrate in tutte le forme di trapianto d'organo da uomo a uomo (allotrapianto), e sono anche regolarmente adottate nei modelli sperimentali utilizzati per lo xenotrapianto.

Le terapie utilizzate hanno azioni diverse. Si riconoscono principalmente terapie che inibiscono la risposta anticorpale (linfociti B) e la risposta dei linfociti T, alle quali si aggiungono per un breve periodo iniziale farmaci anticoagulanti. I farmaci utilizzati non sono privi di effetti collaterali, ma risultano indispensabili per evitare il rigetto dell'organo dopo il trapianto.

3.1.6 Potenziali applicazioni dello xenotrapianto

(Ekser et al., 2015; Ekser et al., 2017)

Rene (Iwase and Kobayashi, 2015; Kim et al., 2019; Kim et al., 2017)

Lo xenotrapianto di rene di suino è quello maggiormente utilizzato nei modelli sperimentali, in ragione delle caratteristiche anatomiche e fisiologiche in buona parte sovrapponibili a quelle dell'uomo. Rappresenta il 68% degli organi di suino trapiantati nei primati non umani. I trapianti di rene eseguiti finora nei primati non umani hanno dimostrato di essere in grado di mantenere l'omeostasi dei volumi circolanti, il bilancio elettrolitico e l'osmolarità plasmatica e urinaria nei riceventi (Cowan et al., 2014; Soin et al., 2001).

Le recenti innovazioni relative alla creazione di suini transgenici in grado di ridurre le risposte immunologiche, l'attivazione del processo della coagulazione e della risposta infiammatoria, in associazione alla terapia immunosoppressiva ad azione anticoagulante/antiinfiammatoria, suggeriscono la potenziale applicazione in trials clinici dello xenotrapianto di rene. E' importante sottolineare che le migliori sopravvivenze riportate ad oggi in letteratura indicano che il rene di maiale è in grado di mantenere in vita un primate nefrectomizzato per una durata di tempo superiore ad un anno (499 giorni, (Kim et al., 2017)).

Cuore (Langin et al., 2018; Mohiuddin et al., 2015; Mohiuddin et al., 2014)

Il cuore del suino è molto simile, a quello dell'uomo sotto il profilo anatomico e fisiologico. Le ricerche condotte nei primati non umani trapiantati con organi di suino non hanno evidenziato alterazioni funzionali significative imputabili alle principali differenze fra le due specie quali ad esempio la differente postura esistente fra il suino ed i primati e le caratteristiche anatomiche del nodo atrio-ventricolare (Ibrahim et al., 2006; Mohiuddin et al., 2014).

E' stato dimostrato che il successo di un trapianto di cuore di suino in primati non umani è principalmente correlato alle caratteristiche genetiche del donatore (suini che esprimono un pannello di geni umani) e all'impiego della terapia immunosoppressiva (ad esempio con anticorpi diretti contro il segnale di costimolazione CD40) (Mohiuddin et al., 2015; Mohiuddin et al., 2016).

E' importante sottolineare che le migliori sopravvivenze riportate ad oggi in letteratura indicano che in un primate un cuore di suino ingegnerizzato eterotopico può funzionare per più di 900 giorni; inoltre, uno xenotrapianto di cuore ortotopico è in grado di mantenere in vita un primate non umano per una durata di tempo superiore a 6 mesi.

Fegato (Ekser et al., 2010; Shah et al., 2017)

Il fegato del suino è costituto da 3 lobi e si differenzia pertanto sotto il profilo anatomico da quello umano. Le funzioni sono molteplici e, nel suino, alcuni enzimi sono sintetizzati in concentrazioni superiori rispetto a quelle dell'uomo (fosfatasi alcalina, lattato deidrogenasi e gamma glutamiltransferasi).

Nonostante queste differenze, il fegato di suino si è dimostrato in grado di svolgere le proprie funzioni e di mantenere un profilo normale di coagulazione nel primate non umano sottoposto a xenotrapianto (Ekser et al., 2010). E' importante sottolineare che le migliori sopravvivenze riportate ad oggi in letteratura indicano che il fegato di suino è in grado di mantenere in vita un primate per una durata di tempo pari ad un mese (Shah et al., 2017).

Polmone (Burdorf et al., 2018)

Le esperienze relative allo xenotrapianto di polmone sono ancora limitate. Ciononostante, gli studi preclinici dimostrano che xenotrapianti di polmone nei primati non umani sono in grado di fornire una adeguata ossigenazione e scambio della CO_2. La postura umana, diversa da quella a quattro zampe del suino non sembra presentare inconvenienti sulle funzioni fisiologiche dell'organo trapiantato. Ad oggi, la sopravvivenza dello xenotrapianto di polmone rimane inferiore a 2 settimane (Burdorf et al., 2018)

Isole pancreatiche (Park et al., 2015; Thompson et al., 2011; van der Windt et al., 2012)

L'insulina suina si differenzia da quella umana in un solo aminoacido e per tale ragione è stata utilizzata per anni nella terapia di pazienti diabetici. E' pertanto assodato che le isole pancreatiche del suino producono un'insulina che è perfettamente in grado di mantenere un livello glicemico normale nei pazienti affetti da diabete. D'altra parte il trapianto allogenico (da uomo a uomo) di isole pancreatiche e la loro sopravvivenza sono condizionati dalla disponibilità di terapie anti-rigetto efficaci, e dalla necessità di dover ricorrere a più donatori deceduti non diabetici per singolo trapianto. Per ovviare a tale limite il ricorso a isole pancreatiche da suini donatori geneticamente modificati

(hCD46, GTKO) in associazione a terapie immunosoppressive efficaci ha consentito il loro impiego in trials clinici, finora con esiti incoraggianti.

Cellule neuronali (Aron Badin et al., 2016)

Il trapianto come terapia per malattie di tipo neurodegenerativo ha un'importanza strategica in ragione della loro elevata incidenza e della gravità delle manifestazioni cliniche da esse indotte. Tuttavia, l'impianto per via intra-cerebrale di cellule allogeniche ha mostrato un'efficacia limitata a causa dell'attivazione del sistema immunitario del ricevente nei confronti degli antigeni del donatore.

Di particolare interesse è stato lo studio di impianti di cellule neuronali prelevate da suini normali o geneticamente modificati in un modello di Parkinson in primati non umani. La modificazione genetica consisteva nell'indurre nelle cellule neuronali un'elevata espressione di CTLA4-Ig, una molecola immunosoppressiva. Gli animali trapiantati erano stati sottoposti anche a immunosoppressione sistemica volta ad inibire la reazione di rigetto. I risultati hanno evidenziato che l'associazione dell'immunosoppressione sistemica e locale con CTLA4-Ig consentiva il prolungamento della sopravvivenza delle cellule di suino trapiantate in primati non umani con malattia di Parkinson.

I risultati conseguiti hanno evidenziato la capacità dei neuroblasti di suino di differenziare in neuroni maturi dopaminergici attivi e in grado di correggere le alterazioni tipiche del morbo di Parkinson, con recupero della funzionalità motoria, osservazione confermata anche dalle indagini istologiche e dai reperti di "PET i*maging*".

Valvole cardiache (Manji et al., 2015; Zhang et al., 2018)

Per correggere alcune disfunzioni cardiache a volte è necessario la sostituzione di una delle valvole cardiache. Le nuove valvole possono essere di tre diverse tipologie.

1) Meccaniche
2) Biologiche
3) Prodotti di ingegneria tissutale

Le valvole meccaniche, sono costituite da materiali sintetici, sono resistenti e hanno una durata superiore rispetto a quella degli altri due tipi, ma necessitano di una costante terapia anticoagulante non compatibile con tutti i pazienti, soprattutto per quelli più anziani.

Le valvole biologiche sono di origine animale (suino, bovino, equino) e possono essere composte dalle valvole stesse (suino) o dal pericardio (bovino e suino).

Le valvole di suino sono molto simili sotto il profilo anatomico a quelle dell'uomo. Esse vengono sottoposte a trattamenti finalizzati ad inibire la reazione dell'ospite. Un esempio è rappresentato dalla fissazione in glutaraldeide. Attualmente, il ricorso ad animali transgenici quali donatori (Naso et al.,

2017; Perota et al., 2019) potrebbe ridurre significativamente l'attivazione del processo di rigetto. Le valvole hanno una durata media di circa 15 anni e poi devono essere sostituite. Il principale vantaggio è ascrivibile alla terapia anticoagulante, che può essere effettuata in misura limitata nei pazienti che non presentano patologie di particolare gravità.
Le valvole derivanti da pericardio sono provviste di caratteristiche fisiche tali da ritenerle particolarmente utili. Esse possono essere sottoposte a processi di sterilizzazione che consentono la rimozione di eventuali agenti di infezione e, inoltre, l'eliminazione degli antigeni di superficie che evita la risposta immunologica dell'ospite e quindi il rigetto. Sono inoltre provviste di elevata flessibilità e la loro sopravvivenza è prolungata evitando la necessità di un'eventuale sostituzione. Per queste ragioni il ricevente non deve essere sottoposto ad alcuna terapia immunosoppressiva.

Da ultimo, esistono dei prodotti costruiti mediante bioingegneria che si basano sulla coltivazione *in vitro* di cellule autologhe stratificate su supporti idonei (scaffold) con la creazione di una struttura tri-dimensionale. Nel sistema *in vitro* vengono simulati stimoli meccanici con l'obiettivo di condizionare il tessuto e prepararlo allo stress fisiologico che si verifica *in vivo*. Questa tipologia di valvole è ancora in fase sperimentale e non è stata utilizzata in trial clinici.

3.2 Osservazioni conclusive

(Ekser et al., 2015; Meier et al., 2018)

Il trapianto d'organo è una terapia salvavita per molti pazienti con insufficienza cardiaca, epatica, o respiratoria terminale, e, nel caso di pazienti con insufficienza renale terminale, l'obiettivo è di evitare o limitare nel tempo il ricorso al trattamento dialitico sostitutivo (molto più costoso del trapianto per il Sistema Sanitario Nazionale). Grazie alle nuove tecnologie chirurgiche, alle conoscenze sempre più approfondite dei meccanismi immunologici e non-immunologici di rigetto, e alla disponibilità di farmaci immunosoppressori con rischio-beneficio accettabile, ma non ottimale, è stato possibile prolungare la sopravvivenza dell'organo trapiantato anche per più di 15-20 anni nel trapianto allogenico (da uomo a uomo) a cui si fa ricorso oggi in clinica.

Nonostante i successi conseguiti, il principale ostacolo all'impiego del trapianto è rappresentato dall'enorme divario esistente fra i pazienti in attesa di un trapianto e gli organi disponibili. Alla fine del 2018 negli Stati Uniti oltre 113.000 erano i pazienti in lista di trapianto in attesa di un donatore; nello stesso anno i trapianti sono stati 36.529 e i donatori solo 17.554 (Organ Procurement and Transplantation Network (OPT) (Figura 1). E' stato inoltre accertato che circa 30 persone muoiono ogni giorno in quanto non hanno potuto essere sottoposte ad un trapianto d'organo in tempo utile.

L'Organizzazione Mondiale della Sanità (WHO) ha segnalato oltre 114.000 trapianti d'organo eseguiti annualmente nel mondo, numero che però è inferiore al 10% delle richieste.

Nella maggior parte dei casi gli organi provengono da donatori deceduti, ma, nel caso del trapianto di rene e, in misura minore, del fegato, si può anche fare ricorso a donatori viventi. Purtroppo, questa pratica può, talvolta, generare casi di traffico illecito di organi che è perseguito penalmente in tutti i Paesi.

In questo contesto, il ricorso allo xenotrapianto,- trapianto di organi di specie diverse da quella del ricevente - rappresenterebbe un approccio importante per salvare milioni di vite umane.
Dagli inizi della sperimentazione in modelli animali, numerosi sono stati i progressi nel prolungare la sopravvivenza dello xenotrapianto mediante la creazione di animali geneticamente modificati e con l'adozione di nuovi farmaci immunosoppressivi. (Figura 2).

I ricercatori sono fiduciosi che le barriere immunologiche e biologiche ancora esistenti potranno, a breve essere superate. Serviranno ancora studi per questo, oltre che per valutare in dettaglio gli aspetti funzionali degli organi trapianti ora nel modello primate non umano e in futuro anche nell'uomo.

E' importante sottolineare che, anche in questo caso, come per le sostanze d'abuso, proprio il progresso scientifico e la maggiore consapevolezza etica da parte dei ricercatori, ha consentito,

mediante un miglior approccio nel disegno sperimentale ad ottimizzare l'utilizzo degli animali e a compiere valutazioni preliminari mediante metodiche *in vitro* prima di passare al modello animale. Pertanto, se, da una parte, al momento non esistono metodi alternativi a tale tipo di sperimentazione, dall'altra è stato possibile ridurre il numero degli animali impiegati applicando, in questo modo, il principio delle 3Rs anche in questo campo scientifico.

Figura 1. Situazione attuale del programma di trapianto d'organo negli Stati Uniti

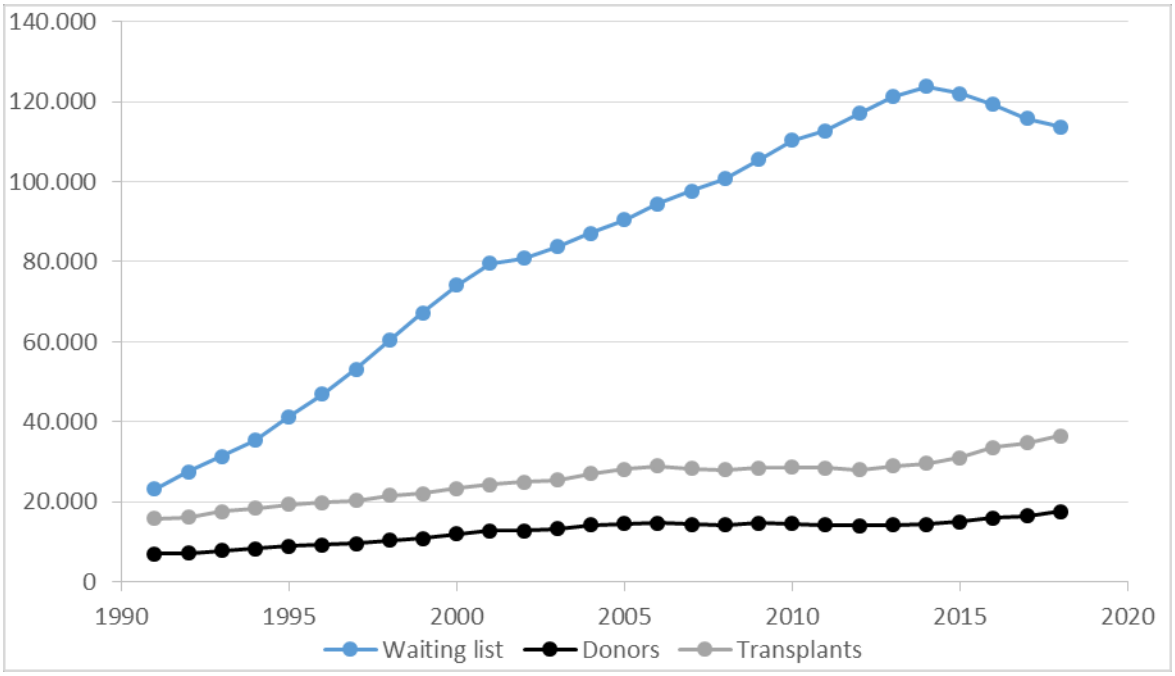
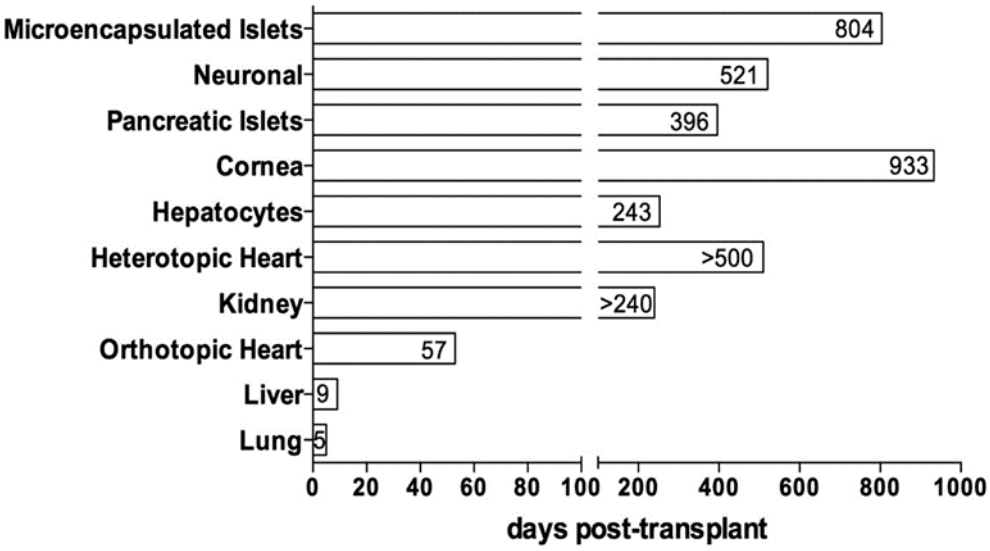


Figura 2. Sopravvivenza di organi di suino trapiantati in primati non umani (Ekser B *et al*., 2015). Nel caso del cuore ortotopico Langin et al (2018) riporta una sopravvivenza di 195 giorni



Referenze bibliografiche

Aron Badin, R., Vadori, M., Vanhove, B., Nerriere-Daguin, V., Naveilhan, P., Neveu, I., Jan, C., Leveque, X., Venturi, E., Mermillod, P., et al. (2016). Cell Therapy for Parkinson's Disease: A Translational Approach to Assess the Role of Local and Systemic Immunosuppression. American journal of transplantation : official journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons 16, 2016-2029.

Boksa, M., Zeyland, J., Slomski, R., and Lipinski, D. (2015). Immune modulation in xenotransplantation. Archivum immunologiae et therapiae experimentalis 63, 181-192.

Burdorf, L., Azimzadeh, A.M., and Pierson, R.N., 3rd (2018). Progress and challenges in lung xenotransplantation: an update. Current opinion in organ transplantation 23, 621-627.

Cowan, P.J., Cooper, D.K., and d'Apice, A.J. (2014). Kidney xenotransplantation. Kidney international 85, 265-275.

Ekser, B., Cooper, D.K.C., and Tector, A.J. (2015). The need for xenotransplantation as a source of organs and cells for clinical transplantation. Int J Surg 23, 199-204.

Ekser, B., Li, P., and Cooper, D.K.C. (2017). Xenotransplantation: past, present, and future. Current opinion in organ transplantation 22, 513-521.

Ekser, B., Long, C., Echeverri, G.J., Hara, H., Ezzelarab, M., Lin, C.C., de Vera, M.E., Wagner, R., Klein, E., Wolf, R.F., et al. (2010). Impact of thrombocytopenia on survival of baboons with genetically modified pig liver transplants: clinical relevance. American journal of transplantation : official journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons 10, 273-285.

Hawthorne, W.J., Cowan, P.J., Buhler, L.H., Yi, S., Bottino, R., Pierson, R.N., 3rd, Ahn, C., Azimzadeh, A., Cozzi, E., Gianello, P., et al. Third WHO Global Consultation on Regulatory Requirements for Xenotransplantation Clinical Trials, Changsha, Hunan, China December 12-14, 2018: "The 2018 Changsha Communique" The 10-Year Anniversary of The International Consultation on Xenotransplantation.

Ibrahim, Z., Busch, J., Awwad, M., Wagner, R., Wells, K., and Cooper, D.K. (2006). Selected physiologic compatibilities and incompatibilities between human and porcine organ systems. Xenotransplantation 13, 488-499.

Iwase, H., and Kobayashi, T. (2015). Current status of pig kidney xenotransplantation. Int J Surg 23, 229-233.

Kim, S.C., Mathews, D.V., Breeden, C.P., Higginbotham, L.B., Ladowski, J., Martens, G., Stephenson, A., Farris, A.B., Strobert, E.A., Jenkins, J., et al. (2019). Long-term survival of pig-to-rhesus macaque renal xenografts is dependent on CD4 T cell depletion. American journal of transplantation : official journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons.

Kim, S.C., Wakwe, W., Higginbotham, L.B., Mathews, D.V., Breeden, C.P., Stephenson, A.C., Jenkins, J., Strobert, E., Price, K., Price, L., et al. (2017). Fc-Silent Anti-CD154 Domain Antibody Effectively Prevents Nonhuman Primate Renal Allograft Rejection. American journal of transplantation : official journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons 17, 1182-1192.

Langin, M., Mayr, T., Reichart, B., Michel, S., Buchholz, S., Guethoff, S., Dashkevich, A., Baehr, A., Egerer, S., Bauer, A., et al. (2018). Consistent success in life-supporting porcine cardiac xenotransplantation. Nature 564, 430-433.

Manji, R.A., Lee, W., and Cooper, D.K.C. (2015). Xenograft bioprosthetic heart valves: Past, present and future. Int J Surg 23, 280-284.

Meier, R.P.H., Muller, Y.D., Balaphas, A., Morel, P., Pascual, M., Seebach, J.D., and Buhler, L.H. (2018). Xenotransplantation: back to the future? Transpl Int 31, 465-477.

Mohiuddin, M.M., Reichart, B., Byrne, G.W., and McGregor, C.G. (2015). Current status of pig heart xenotransplantation. Int J Surg 23, 234-239.

Mohiuddin, M.M., Singh, A.K., Corcoran, P.C., Hoyt, R.F., Thomas, M.L., 3rd, Ayares, D., and Horvath, K.A. (2014). Genetically engineered pigs and target-specific immunomodulation provide significant graft survival and hope for clinical cardiac xenotransplantation. J Thorac Cardiovasc Surg 148, 1106-1113; discussion 1113-1104.

Mohiuddin, M.M., Singh, A.K., Corcoran, P.C., Thomas Iii, M.L., Clark, T., Lewis, B.G., Hoyt, R.F., Eckhaus, M., Pierson Iii, R.N., Belli, A.J., et al. (2016). Chimeric 2C10R4 anti-CD40 antibody therapy is critical for long-term survival of GTKO.hCD46.hTBM pig-to-primate cardiac xenograft. Nature communications 7, 11138.

Naso, F., Stefanelli, U., Buratto, E., Lazzari, G., Perota, A., Galli, C., and Gandaglia, A. (2017). Alpha-Gal Inactivated Heart Valve Bioprostheses Exhibit an Anti-Calcification Propensity Similar to Knockout Tissues<sup/>. Tissue engineering Part A 23, 1181-1195.

Niu, D., Wei, H.J., Lin, L., George, H., Wang, T., Lee, I.H., Zhao, H.Y., Wang, Y., Kan, Y., Shrock, E., et al. (2017). Inactivation of porcine endogenous retrovirus in pigs using CRISPR-Cas9. Science 357, 1303-1307.

Park, C.G., Bottino, R., and Hawthorne, W.J. (2015). Current status of islet xenotransplantation. Int J Surg 23, 261-266.

Perota, A., Lagutina, I., Duchi, R., Zanfrini, E., Lazzari, G., Judor, J.P., Conchon, S., Bach, J.M., Bottio, T., Gerosa, G., et al. (2019). Generation of cattle knockout for galactose-alpha1,3-galactose and N-glycolylneuraminic acid antigens. Xenotransplantation, e12524.

Reardon, S. (2015). New life for pig-to-human transplants. Nature 527, 152-154.

Scobie, L., Padler-Karavani, V., Le Bas-Bernardet, S., Crossan, C., Blaha, J., Matouskova, M., Hector, R.D., Cozzi, E., Vanhove, B., Charreau, B., et al. (2013). Long-term IgG response to porcine Neu5Gc antigens without transmission of PERV in burn patients treated with porcine skin xenografts. Journal of immunology 191, 2907-2915.

Shah, J.A., Patel, M.S., Elias, N., Navarro-Alvarez, N., Rosales, I., Wilkinson, R.A., Louras, N.J., Hertl, M., Fishman, J.A., Colvin, R.B., et al. (2017). Prolonged Survival Following Pig-to-Primate Liver Xenotransplantation Utilizing Exogenous Coagulation Factors and Costimulation Blockade. American journal of transplantation : official journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons 17, 2178-2185.

Soin, B., Smith, K.G., Zaidi, A., Cozzi, E., Bradley, J.R., Ostlie, D.J., Lockhart, A., White, D.J., and Friend, P.J. (2001). Physiological aspects of pig-to-primate renal xenotransplantation. Kidney international 60, 1592-1597.

Thompson, P., Badell, I.R., Lowe, M., Cano, J., Song, M., Leopardi, F., Avila, J., Ruhil, R., Strobert, E., Korbutt, G., et al. (2011). Islet xenotransplantation using gal-deficient neonatal donors improves engraftment and function. American journal of transplantation : official journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons 11, 2593-2602.

van der Windt, D.J., Bottino, R., Kumar, G., Wijkstrom, M., Hara, H., Ezzelarab, M., Ekser, B., Phelps, C., Murase, N., Casu, A., et al. (2012). Clinical islet xenotransplantation: how close are we? Diabetes 61, 3046-3055.

Yang, L., Guell, M., Niu, D., George, H., Lesha, E., Grishin, D., Aach, J., Shrock, E., Xu, W., Poci, J., et al. (2015). Genome-wide inactivation of porcine endogenous retroviruses (PERVs). Science 350, 1101-1104.

Zhang, R., Wang, Y., Chen, L., Wang, R., Li, C., Li, X., Fang, B., Ren, X., Ruan, M., Liu, J., et al. (2018). Reducing immunoreactivity of porcine bioprosthetic heart valves by genetically-deleting three major glycan antigens, GGTA1/beta4GalNT2/CMAH. Acta biomaterialia 72, 196-205.

Brescia, 01 Luglio 2019

Il Responsabile del Centro di Referenza Nazionale, Benessere e Cura degli Animali da Laboratorio

Dr.ssa Silvia Dotti

Documento prodotto in originale informatico e firmato digitalmente ai sensi del "Codice dell'Amministrazione Digitale" (D.L.vo n.82/2005)