



**UNIVERSITÀ
DEGLI STUDI
DI PADOVA**



**DIPARTIMENTO DI INGEGNERIA DELL'INFORMAZIONE
CORSO DI LAUREA IN INGEGNERIA BIOMEDICA**

**“ANALISI DELLE ALTERNATIVE ALLA SPERIMENTAZIONE SU
MODELLO ANIMALE: TEST IN VITRO E IN SILICO”**

Relatore: Prof. Andrea Bagno

Laureanda: Chiara Morandi

ANNO ACCADEMICO 2022 – 2023

Data di laurea 19/07/2023

Indice

Abstract

Introduzione

Capitolo 1: Analisi e applicazione dei modelli in vitro e degli organismi più semplici

1.1 Colture cellulari su tessuti e biomateriali

1.2 Microrganismi e invertebrati

1.2.1 *Saccharomyces cerevisiae*

1.2.2 *Drosophila melanogaster*

1.3 Organi 3D

1.3.1 Modello cardiaco

1.3.2 Polmone espantato

Capitolo 2: Descrizione dei dispositivi microfluidici per test farmacologici

2.1 Organi su chip singoli

2.1.1 OOC di cuore

2.1.2 OOC di polmone

2.1.3 OOC tumorali

2.2 Sistema multiorgano su chip

2.2.1 4OC di intestino, fegato, pelle e reni

Capitolo 3: Nuove frontiere dell'IA e del software per ridurre la sperimentazione in vivo

3.1 Modelli QSAR

3.1.1 Integrazione con read-across

3.1.2 Ensemble

Conclusioni

Bibliografia

Abstract

Il presente elaborato affronta le problematiche della sperimentazione animale, partendo dalla regola delle 3R sviluppata da William Russel e Rex Burch fino alle ultime frontiere della modellazione *in silico*.

Le colture cellulari 2D sono un primo esempio di modello *in vitro*, capace di sostituire parzialmente il modello animale attraverso cellule coltivate in un ambiente controllato per studiare la tossicità di alcuni farmaci. Inoltre, per sviluppare alternative che mostrino proprietà biologiche simili a quelle umane, sono stati impiegati microrganismi e invertebrati per la sperimentazione clinica. Tra questi vengono citati il *Saccharomyces cerevisiae*, ovvero il lievito di birra, e la *Drosophila melanogaster*, ovvero il moscerino della frutta, molto utili nello studio di malattie neurodegenerative come l'Alzheimer.

Successivamente le colture cellulari 3D hanno permesso di sviluppare modelli più elaborati in grado di rappresentare meglio la complessità del tessuto umano.

Un'altra alternativa sono i dispositivi microfluidici a singolo organo o multiorgano, capaci di combinare modelli *in vitro* attraverso colture cellulari umane in sistemi progettati per simulare i segnali cellulari della fisiologia umana. Nel secondo capitolo vengono approfonditi i modelli singoli di OOC cardiaco, polmonare e tumorale e un modello multiorgano di intestino, fegato, pelle e reni. Infine, nell'ultimo capitolo vengono esposte le nuove frontiere dell'intelligenza artificiale e dei software di simulazione dei modelli *in vivo*. I modelli QSAR, caratterizzati dal fatto di essere completamente virtuali e privi dell'uso di materiale biologico, sono modelli matematici che permettono lo studio delle funzionalità di una sostanza bersaglio per poi, tramite complessi algoritmi di predizione, ricavare il comportamento di composti simili.

Introduzione

Nell'ultimo secolo il frequente ricorso al modello animale ha permesso di aumentare gli studi per comprendere, diagnosticare e curare le malattie dell'uomo: è infatti grazie allo studio su modello animale di molti processi fisiopatologici che è stato possibile arrivare alla produzione di vaccini e farmaci per la cura di malattie come il cancro, l'ipertensione e il diabete. D'altra parte, i processi fisiologici che invece mancano di modelli animali di riferimento sono i più difficili da analizzare, come avviene, per esempio, nel caso della psiche [1].

Le motivazioni per le quali i modelli animali risultano molto importanti, per taluni aspetti insostituibili, in ambito medico sono legate alla necessità di studiare e sviluppare farmaci su organismi biologicamente simili all'uomo [2], che siano soggetti a malattie analoghe a quelle umane. D'altra parte, l'ampia scelta di modelli animali permette di rispondere anche alla necessità di studiare somiglianze e differenze tra i diversi sistemi.

Per esempio, i roditori sono modelli animali ampiamente utilizzati grazie al loro ciclo di vita ridotto [2] che consente di ottenere risultati in breve tempo, permettendo di studiare l'evoluzione di una malattia e lo sviluppo di un trattamento terapeutico durante l'intera vita del singolo individuo, compreso l'invecchiamento e la trasmissione alle generazioni future [1].

La sperimentazione su modelli animali è oggi lo standard per la ricerca medica e farmacologica ed è necessaria prima di poter passare alla sperimentazione umana [3,4]. D'altra parte, va precisato che circa l'80% delle potenziali terapie non supera i test clinici nonostante l'efficacia negli studi preclinici [5]. Le cause di questi fallimenti sono da ricercarsi sia nella mancanza di adeguata qualità sperimentale negli studi *in vivo* [6] che nelle differenze anatomiche, immunologiche e patologiche con l'uomo. Ad esempio, i modelli di topo vengono utilizzati nella ricerca dermatologica nonostante solo il 30% dei geni associati alla pelle dei roditori si sovrapponga ai geni della pelle umana [7]; inoltre i topi non sviluppano naturalmente malattie come la dermatite atopica, molto comune nell'uomo, richiedendo l'induzione artificiale della stessa al fine di ricercare terapie specifiche [8], mettendo quindi in dubbio il valore traslazionale e di riproducibilità di questi modelli preclinici.

L'elevato costo di sviluppo dei farmaci, legato all'alta percentuale di fallimenti nella fase clinica, va ad aggiungersi alla crescente preoccupazione da parte della popolazione e della comunità scientifica, per le condizioni di vita e la possibile sofferenza che questi esseri viventi possono provare durante la fase di ricerca. Già nel 1959 William Russel e Rex Burch pubblicarono una guida per ridurre al massimo il dolore degli animali [9]. La regola delle 3R oggi fa parte della direttiva 2010/63/UE del Parlamento europeo per la protezione degli animali

ai fini scientifici ed è diventata un punto fondamentale da cui partire per strutturare una ricerca medica portando alla nascita di comitati come l'OCSE (Organizzazione per la cooperazione e lo sviluppo economico) che devono di volta in volta autorizzare lo studio su modello animale secondo quanto stabilito dalle norme vigenti.

I tre punti su cui si basa questo modello sono:

1. ridurre (reduction): consiste nel diminuire il numero di animali utilizzati. Questo può avvenire, secondo la direttiva 2010/63/UE, attraverso una condivisione degli organi e dei tessuti degli animali in modo da sfruttarli al massimo senza eliminare le parti non inerenti ad una specifica ricerca. In aggiunta a queste indicazioni, ulteriori attività come gli esperimenti pilota, una più accurata programmazione del protocollo sperimentale e la biotelemetria [10], possono evitare di aumentare il numero di individui pur assicurando robustezza statistica ai risultati ottenuti;
2. rifinire (refinement): si tratta di ampliare o modificare l'ambiente della gabbia rendendolo più confortevole e rivedere le procedure sperimentali con lo scopo di diminuire il dolore e il disagio, permettono non solo di migliorare le condizioni di vita degli animali ma anche di accrescere la qualità della ricerca [11]. Esistono numerose linee guida disponibili che possono aiutare i ricercatori a pianificare correttamente i protocolli sperimentali come, ad esempio, PREPARE [12];
3. rimpiazzare (replacement): alla luce delle difficoltà riscontrate nella sperimentazione animale, la ricerca scientifica deve essere indotta all'utilizzo, quando possibile, di materiali/esseri non senzienti. I metodi alternativi si suddividono prevalentemente in: modelli *in vitro* ovvero colture cellulari 2D o 3D di tessuti biologici; il ricorso a organismi più semplici tra i quali invertebrati o microrganismi; biosistemi su chip e modelli *in silico*, che possono essere utilizzati per prevedere le interazioni o gli effetti tossici di un farmaco.

La presente tesi ha lo scopo di analizzare nel dettaglio i metodi atti alla sostituzione dei modelli animali.

Capitolo 1: Analisi e applicazione dei modelli *in vitro* degli organismi più semplici

I primi studi relativi alle colture cellulari risalgono alla fine del 1800 quando lo zoologo tedesco Wilhelm Roux riuscì a conservare in soluzione salina porzioni di tessuto embrionale di pollo per alcuni giorni. Negli anni successivi, grazie allo sviluppo di questa tecnica, venne messa in coltura la prima linea cellulare stabilizzata di origine tumorale, la linea di HeLa (dal nome della paziente, Henrietta Lacks). Nel 1951, infatti, le cellule di HeLa furono le prime cellule umane capaci di moltiplicarsi *in vitro* senza andare incontro a senescenza e morte. Inoltre, sono state utilizzate anche per lo sviluppo del vaccino contro la poliomielite [13].

In questo capitolo verranno trattate le varie tipologie di modello *in vitro* che possono sostituire completamente o parzialmente il modello animale.

1.1 Colture cellulari su tessuti e biomateriali

Le colture cellulari consistono in cellule isolate dal loro ambiente naturale che sono stimolate nella crescita in un sistema sterile ed artificiale che permette di studiarne le funzioni in maniera controllata e separata dal contesto ambientale. Le cellule possono crescere per adesione su un supporto che le caratterizza morfologicamente come una struttura composta da lunghi prolungamenti (fibroblastoidi) oppure da cellule poligonali (epitelioidi), in alternativa possono crescere in sospensione, tali sono le cellule del sistema immunitario che hanno una forma prevalentemente sferica (Figura 1.1) [13].



Figura 1.1: Colture cellulari primarie derivate da liquido follicolare da ovaio umano: (A) rappresenta 2 tipologie di cellule con morfologia allungata fibroblastoide, (B) rappresenta tipologie di cellule con aspetto epiteliale. Alcune cellule invece presentano un ampio corpo cellulare sferico (C).

Tra le tipologie di colture cellulari esistenti, le colture primarie sono composte da cellule che derivano direttamente dall'espianto di tessuto o di organo e mantengono molte delle caratteristiche funzionali *in vivo*. Queste cellule sono in grado di duplicarsi solo per un numero

limitato di cicli, tendono ad essere più variabili in quanto cambiano a seconda del soggetto di prelievo e necessitano di una coltura più delicata (Figura 1.2).

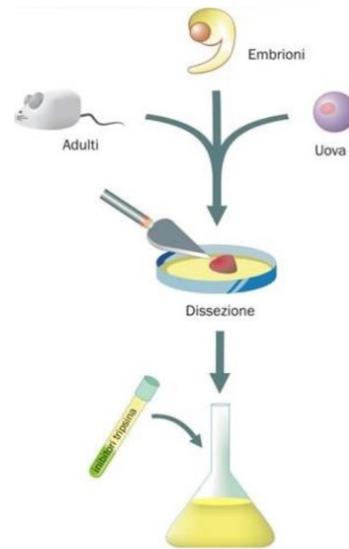


Figura 1.2: rappresentazione delle varie fasi di coltura primaria. 1 prelievo delle cellule da campione, 2 dissezione meccanica, 3 trattamento con un enzima che elimini i contatti tra le cellule e inibitore per bloccare la digestione enzimatica.

Le cellule delle colture immortalizzate proliferano per un numero illimitato di passaggi legati solamente alla presenza di metaboliti, spesso acquisiscono caratteristiche (morfologiche o fisiologiche) diverse dalle cellule *in vivo*, sono facilmente standardizzabili e rintracciabili nelle biobanche (che recuperano, mantengono e vendono materiale biologico utile alla ricerca). La linea cellulare delle colture immortalizzate si ottiene da una coltura primaria che viene stabilizzata mediante agenti chimici o virali [13].

Le linee cellulari clonali invece derivano da una singola cellula che ne produce una popolazione omogenea per mitosi. Infine, le co-culture hanno lo scopo di aumentare la complessità del modello *in vitro* creando un sistema nel quale sono presenti due tipologie differenti di cellule.

Uno degli approcci più recenti alle colture cellulari è legato all'utilizzo di biomateriali, sostanze non viventi utilizzate nella fabbricazione di un dispositivo che ha in qualche modo un'interfaccia con un tessuto vivente. La realizzazione dei biomateriali è resa possibile tramite i sistemi di bioprinting [14] che, attraverso l'impiego di hardware e software, progettano strutture 2D/3D per la produzione di tessuto ingegnerizzato da poter impiegare direttamente sull'uomo o, nel caso in esame, per la ricerca.

In generale le colture cellulari rappresentano uno strumento fondamentale per lo screening di potenziali farmaci o molecole per verificarne la tossicità, l'efficacia e la bioattività, nonché per analizzare l'interazione cellula-cellula [15].

Uno dei vantaggi principali dell'utilizzo delle colture cellulari, oltre alla riduzione dell'utilizzo di animali, è legato alla facilità con cui è possibile controllare il sistema in cui avviene lo studio. Infatti, l'utilizzo di una cappa a flusso laminare permette di creare un ambiente pulito tramite la filtrazione dell'aria, mentre un incubatore da laboratorio consente di mantenere costanti condizioni fisiche prestabilite come: temperatura, CO₂, tensione di ossigeno e umidità. Essendo quindi necessario ricreare al meglio le condizioni fisiologiche in cui le cellule si trovano normalmente *in vivo*, vengono utilizzati: antibiotici e antimicotici, per prevenire contaminazioni batteriche all'interno del sistema; mezzi di coltura standardizzati in modo tale da permettere di replicare facilmente un esperimento senza introdurre eccessive variabili e da ultimo l'FBS (siero fetale bovino) che, attraverso molecole bioattive e fattori di crescita, stimola la duplicazione cellulare. Esistono però mezzi serum - free che utilizzano fattori di crescita sintetici anche se con risultati inferiori [13].

La base di questi mezzi di coltura è la soluzione salina isotonica che può essere arricchita con elementi fondamentali per la vita delle cellule, capaci di una determinata funzione, come i sali inorganici che si occupano di controllare la pressione osmotica e il bilancio degli elettroliti o gli amminoacidi utili per la sintesi proteica. Generalmente, a seconda del tipo di cellule e di coltura si sceglie il terreno più adatto per favorirne la crescita [13]. D'altra parte, l'utilizzo di sieri e fattori di crescita aumenta il costo dei materiali e per quanto la ricerca si concentri sul ricreare un sistema quanto più simile a quello fisiologico, la condizione delle colture cellulari è comunque semplificata rispetto all'organismo completo, determinando potenzialmente la perdita di funzioni specifiche del tessuto con la conseguenza di ottenere risultati parziali che necessitano di una integrazione tramite test *in vivo*.

Risulta in questo caso ancora più importante concentrare la ricerca sul concetto di complementarità per sfruttare al massimo la condivisione tra i modelli *in vitro* e i modelli *in vivo*.

1.2 Microrganismi e invertebrati

Negli ultimi anni la necessità di adeguate alternative a mammiferi e vertebrati per i test preclinici, ha portato ad un crescente interesse per varietà minori che mostrino proprietà biologiche e parentela genetica in comune con i vertebrati superiori [15]. Tra queste alternative vengono considerati gli embrioni di *Danio rerio* (*zebra fish*) [16] sia per il loro breve ciclo di vita e l'elevata fecondità, che ne favoriscono l'utilizzo come modello per diversi processi biologici, che per via della loro caratteristica trasparente che ne semplifica l'utilizzo in una vasta gamma di studi di anatomia interna [15]. I microrganismi, come l'*Escherichia coli*, sono

molto versatili grazie ai loro sistemi genetici ben caratterizzati. Diversamente gli invertebrati non hanno un sistema di organi completamente sviluppato e per questo sono limitati nel confronto dello sviluppo delle malattie nel corpo umano; nonostante ciò, il loro breve ciclo di vita, le dimensioni ridotte e il limitato costo di gestione rispetto agli animali complessi li rende molto convenienti per singoli esperimenti di breve durata [17]. Gli invertebrati, per queste ragioni, sono stati ampiamente utilizzati per studiare malattie come il morbo di Parkinson o la cicatrizzazione delle ferite. [18].

Vengono approfonditi due casi clinici rispettivamente legati ad un microrganismo come il *Saccharomyces cerevisiae* e l'invertebrato *Drosophila melanogaster*.

1.2.1 *Saccharomyces cerevisiae*

Il lievito di birra (Figura 1.3) è il modello più utilizzato ed importante per la ricerca genetica. L'intero genoma di questo fungo è stato sequenziato nel 1996. Esso è costituito da 6000 geni di piccole dimensioni e densità relativamente elevata, suddivisi in 12 paia di megabasi di DNA su 16 cromosomi lineari nel nucleo [19]. I lieviti possono essere coltivati in coltura liquida o solida con tempi di generazione molto breve, circa 90 minuti, quindi, grandi popolazioni di lieviti possono essere coltivate e analizzate in poco tempo. Questo fattore è molto importante quando si studiano fenomeni rari come le mutazioni genetiche. Altre caratteristiche che rendono *S. cerevisiae* così importante sono sicuramente il suo ciclo di vita semplice ma anche i numerosi organelli legati alla membrana come: il nucleo, il perossisoma e i mitocondri che imitano le funzioni delle cellule dei mammiferi [19].

Un tema importante è legato alla possibilità di studiare la ricombinazione omologa, ovvero un processo per cui un filamento di DNA rotto si serve di un modello di DNA omologo come substrato per la ricostruzione e riparazione dei danni.

Questo processo può essere molto utile per gli scienziati per la mappatura genetica [19]. Dal punto di vista medico invece il lievito di birra è utile per comprendere aspetti fondamentali delle malattie neurodegenerative come l'Alzheimer o la malattia di Huntington, attraverso lo studio delle proteine endogene o eterologhe che stanno alla base di queste malattie [20].

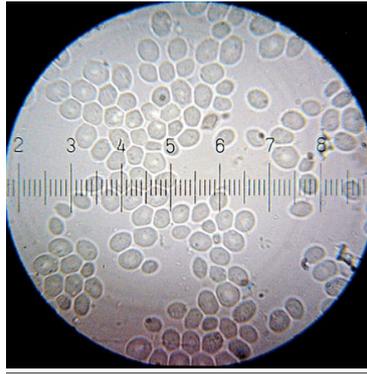


Figura 1.3: *Saccharomyces cerevisiae*

1.2.2 *Drosophila melanogaster*

Il moscerino della frutta è uno degli invertebrati più utilizzati nella ricerca, il suo genoma è stato il primo ad essere completamente sequenziato tra i grandi organismi complessi e si codifica in 14.000 geni strutturati su quattro cromosomi. Inoltre, quasi il 75% dei geni coinvolti nelle malattie umane ha un omologo funzionale nel moscerino *D. melanogaster* [21].

Il moscerino ha un ciclo di vita molto rapido, infatti una sola coppia fertile può produrre centinaia di figli geneticamente identici in 10-12 giorni a differenza, per esempio, dei comuni roditori che impiegano 3-4 mesi per produrre pochi esemplari [22].

Ogni stadio dello sviluppo del moscerino (Figura 1.4) ha una sua possibile applicazione; è quindi possibile parlare di un organismo modello multiplo. Per prima cosa l'embrione viene utilizzato per studiare la determinazione del destino delle cellule e lo sviluppo neuronale; la larva invece può essere applicata per esaminare i processi e i comportamenti fisiologici; infine, nella fase adulta il moscerino è un organismo molto complesso dotato di strutture che svolgono le funzioni di cuore, polmoni, intestino, ecc similmente a quelle dei mammiferi. Per esempio, il cervello del moscerino adulto con più di 100.000 neuroni può mediare alcuni comportamenti complessi come la navigazione in volo, l'apprendimento, la memoria e il sonno. Per questo motivo la risposta dei moscerini a molti farmaci per il sistema nervoso centrale è simile a quella dell'uomo [22], permettendo di studiare e confrontare gli sviluppi delle malattie neurodegenerative causate dalla progressiva perdita di neuroni specifici.

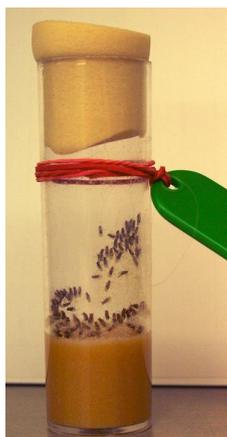


Figura 1.4: Allevamento di *Drosophila melanogaster*

1.3 Organi 3D

I modelli basati sull'uomo (Figura 1.4) costituiscono un'alternativa ai modelli animali per gli studi di base e preclinici [3]. L'obiettivo primario della ricerca biomedica è quello di trasporre il lavoro preclinico in clinico e per farlo servono modelli ben caratterizzati e paragonabili all'omeostasi umana.

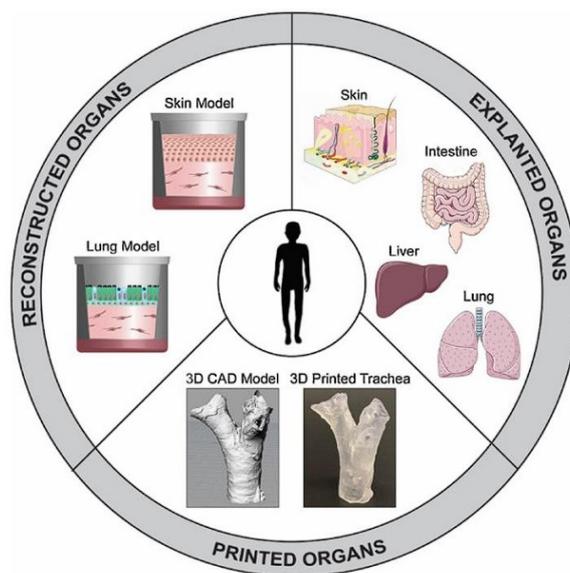


Figura 1.4 Panoramica sui diversi approcci ai modelli di organo 3D

Le colture cellulari 3D e i modelli organo tipici *in vitro* rappresentano meglio la complessità del tessuto reale rispetto alle simulazioni *in vivo* e alle colture cellulari 2D [23]. Un primo approccio ai modelli di organi 3D è la loro ricostruzione attraverso la semina cellulare sequenziale in colture cellulari o scaffold 3D. Negli anni sono stati realizzati modelli di quasi tutti gli organi del corpo umano. Tra questi i modelli più avanzati sono l'osso e la cartilagine

[24], strutture equivalenti del tessuto cartilagineo sono realizzate in idrogel e potrebbero fornire una soluzione per sostituire la cartilagine danneggiata [24].

Gli epiteli, come la pelle [25], non sono in grado di risanarsi completamente in caso di ferite cutanee ampie e profonde dovute ad ustioni o tagli. La ricerca in questo ambito si è concentrata nel perseguire la realizzazione di sostituti tessutali equivalenti alla pelle intera, che ne permettano una ricostruzione completa e possano essere impiegati in test di tossicità in ambito cosmetico e farmacologico. Per quanto riguarda i modelli più complessi come il cervello, le colture 3D sono nelle prime fasi di sviluppo [3]. I modelli di ricostruzione 3D si basano su linee cellulari e colture primarie per via del loro basso costo e alta disponibilità. Per questa ragione, sebbene questi modelli siano utili per le verifiche di tossicità dei farmaci, non sono sufficienti per la realizzazione di modelli più complessi che simulino l'organismo umano; in questo contesto le cellule staminali e le iPSC (cellule staminali pluripotenti indotte) giocheranno un ruolo fondamentale nella ricerca.

Un altro approccio ai modelli di organo 3D è la loro ricostruzione tramite biostampa 3D. Quest'ultima rappresenta un processo adattivo che utilizza: 1) cellule vive e idrogel non tossico, che producono un ambiente extracellulare in grado di sostenere l'adesione e la proliferazione cellulare dopo la stampa; 2) biomateriali e 3) biomolecole attive, per realizzare il bioinchiostro necessario alla produzione di strutture che presentino le caratteristiche analoghe a quelle dei tessuti umani [3]. Il processo di stampa prevede una fase preparatoria nella quale vengono applicate tecniche di imaging 3D per definire le dimensioni del tessuto da realizzare per poi mandare in stampa il modello digitale. Per gli organi più semplici, come orecchie e trachea, vengono utilizzati scaffold disegnati in CAD e stampati in 3D che vanno a formare l'organo, mentre per organi più complessi, come il fegato [26], occorre stampare contemporaneamente tessuti e scaffold 3D. I modelli biostampati necessitano di un certo tempo di maturazione, il quale dipende dai bioink utilizzati, per diventare quanto più biomimetici e funzionali possibili: per questo motivo e per le difficoltà nello stampare più tipologie di cellule questa tecnologia è ancora in evoluzione e deve superare dei limiti per poter essere maggiormente impiegata.

Infine, l'ultimo dei modelli di organi 3D è legato all'espianto degli organi. Questo tipo di modello è particolarmente interessante quando si vogliono effettuare studi che richiedono l'interezza anatomica e funzionale dell'organo con lo scopo di studiare solamente fenomeni locali che non dipendono dalla sua interazione con altri sistemi o apparati. Questo è legato al motivo che gli organi espianati se perfusi mantengono comunque i legami tra le diverse cellule che li compongono. Tuttavia, le disponibilità di materiale umano sono molto limitate e costose in quanto gli esperimenti su organi espianati richiedono apparecchiature molto complesse. Una

delle possibili soluzioni è legata all'utilizzo di piccoli pezzi di tessuto o sezioni di organo che sono più semplici da mantenere *ex vivo* anche per indagini prolungate e riescono comunque a riflettere il comportamento delle unità funzionali complesse.

1.3.1 Modello cardiaco

Una delle cause dell'insufficienza cardiaca è la cardiotossicità legata dall'uso di farmaci come antibiotici. [23] Gli attuali modelli *in vitro* 2D non sono un ottimo mezzo di studio in quanto non replicano a pieno la fisiologia delle cellule, inoltre le variazioni interspecie rendono difficile trasportare i dati *in vitro* sull'uomo.

I modelli cardiaci 3D mostrano invece una struttura e una funzionalità migliorate [23]. Per prima cosa è necessario considerare la composizione delle cellule *in vivo*; nello specifico il tessuto miocardico è costituito per il 30% da cardiomiociti e per il 70% da cellule non miocitarie. Alla luce di questa struttura, i modelli 3D che combinano queste tipologie di cellule possono essere alla base della produzione di un modello di cuore ingegnerizzato realizzato tramite stampa 3D che consente il monitoraggio *in vitro* della cardiotossicità indotta da farmaci. Uno degli esempi del caso è proprio il cuore creato attraverso la tecnologia della stampa 3D bioibrida con una piattaforma di sensori tessutali che consentono il monitoraggio in tempo reale della cardiotossicità indotta, realizzato da un team di ricercatori della POSTECH e del Georgia Institute of Technology.[27]

1.3.2 Polmone espantato

Il trapianto di polmone è divenuto nel tempo lo standard di cura impiegato per pazienti con patologie avanzate; tuttavia, la limitata disponibilità di polmoni, causata dalle malattie che possono colpire il donatore o l'organo, comportano una mortalità in lista d'attesa di circa il 40% dei pazienti che necessitano di trapianto. In tale circostanza può verificarsi la disfunzione primaria, risultato di una lesione che può avvenire dal momento della morte cerebrale alla riperfusione polmonare post trapianto o durante la conservazione ischemica fredda dell'organo. Un'altra delle cause di fallimento nel trapianto è legata all'edema polmonare causato da un eccesso di liquidi nei polmoni.

Negli ultimi anni le ricerche su polmoni respinti hanno posto il focus sulla possibilità di ricondizionarli tramite perfusione polmonare *ex vivo* [28]. In tale ambito gli studi si sono concentrati per verificare se le cellule staminali mesenchimali umane (hMSC) per via endovenosa possono essere utilizzate per ripristinare la clearance del fluido alveolare. Nello specifico i polmoni perfusi con albumina al 5% e ossigenati con pressione positiva continua

delle vie aeree, che hanno ricevuto hMSC, hanno ripristinato l'AFC [29]. Il risultato ottenuto suggerisce che questa terapia potrebbe essere efficace per ridurre l'incidenza dell'edema polmonare che è una delle cause più frequenti di fallimento in caso di trapianto.

Capitolo 2: Descrizione dei dispositivi microfluidici per test farmacologici

Gli studi che si basano sulle colture cellulari per determinare il comportamento di un organo sono robusti e precisi ma hanno un potere predittivo limitato, non potendo confrontare i risultati ottenuti durante la sperimentazione con le effettive funzioni dell'organo, mentre i modelli animali (*in vivo*) replicano le caratteristiche dell'organo o del multiorgano ma sono imperfetti a causa delle differenze tra la fisiologia animale e quella umana. I dispositivi microfluidici cercano di combinare entrambi i modelli, attraverso la coltura *in vitro* di cellule umane in sistemi 3D progettate per simulare i segnali cellulari ed extracellulari molecolari, strutturali e fisici che si possono individuare negli omologhi *in vivo* di un dato sistema di organi [30].

2.1 Organi su chip singoli

L'obiettivo degli organi su chip (OOC) non è quello di realizzare un intero organo vivente ma piuttosto di stabilire un'unità funzionante in grado di replicare alcuni aspetti della fisiologia umana in modo diretto e controllato. Per farlo è necessario sia un periodo di maturazione del sistema, per rendere rilevanti i dati misurati, che incorporare forze fisiche: idrodinamiche [31], meccaniche [32] ed elettriche [33] per attivare le funzionalità specifiche dell'organo.

Quando si progetta un OOC è necessario determinare l'insieme delle caratteristiche funzionali dell'organo da modellare in relazione ad una specifica domanda di studio, con lo scopo di definire il livello di complessità del dispositivo e i materiali necessari per realizzarlo. Le tipologie di cellule umane che possono essere impiegate dipendono dalla disponibilità e dalla capacità di quest'ultime di formare tessuti. Per esempio, le cellule primarie sono difficili da ottenere per la maggior parte degli organi umani ma, sono fenotipicamente mature e funzionali, mentre le linee cellulari immortalizzate sono più semplici da coltivare ed espandere ma presentano differenze morfologiche con l'organo che devono rappresentare. Le cellule staminali pluripotenti indotte (iPSC) potrebbero essere una fonte ideale e illimitata per gli OOC poiché possono derivare da un campione di tessuto, sono specifiche del paziente e sono in grado di espandersi e differenziarsi in più linee [34]. L'uso di una singola linea di iPSC è vantaggioso per analizzare il modo in cui i farmaci influenzano gli individui e i comportamenti delle mutazioni genetiche nello sviluppo di farmaci specifici. Tuttavia, la realizzazione di protocolli per la differenziazione e la maturazione delle iPSC è ancora in fase di studio.

Il microambiente OOC può essere progettato per fornire segnali elettrici oppure ottici, segnali biochimici od ormonali, tramite metodi ingegneristici volti a convertire *in vitro* i segnali caratteristici *in vivo* di un tessuto o di un organo. Il materiale di fabbricazione più utilizzato è il

polidimetilsilossano (PDMS) grazie alla sua biocompatibilità, facilità d'uso per la microfabbricazione, trasparenza ottica e facile sterilizzazione; queste qualità compensano il significativo assorbimento non selettivo di molecole idrofobiche, tra cui l'ossigeno e molti farmaci [35].

Di seguito vengono presentati gli OOC di cuore, polmone e del microambiente legato al tumore.

2.1.1 OOC di cuore

Il cuore pompa il sangue attraverso la contrazione in risposta a segnali elettrici eccitatori del sistema cardiaco. Le fibre muscolari cardiache possono essere considerate l'unità funzionale minima del muscolo, se in grado di contrarsi e generare forza in risposta a segnali elettrici depolarizzanti [30]. Lo sviluppo di OOC cardiaci nasce con lo scopo di simulare le funzionalità del nodo senoatriale attraverso la stimolazione elettrica, per poter realizzare dispositivi microfluidici in grado di leggere la frequenza del battito cardiaco, la soglia di eccitazione, la velocità massima e la contrattilità dell'organo. Inoltre, questi dispositivi possono essere impiegati per studiare la tossicità cardiovascolare che rappresenta un grande problema per il fallimento dei farmaci sperimentali; non può essere studiata su modelli animali perché essi presentano una frequenza cardiaca differente rispetto agli umani, rendendoli un modello limitato per studiare il prolungamento dell'intervallo QT che varia proprio a seconda della frequenza cardiaca.

Per questa tipologia di OOC vengono utilizzate iPSC e cellule di supporto (fibroblasti e cellule endoteliali) che vengono stimulate elettricamente e meccanicamente in modo da consentire risposte ai farmaci fisiologicamente rilevanti [30].

Un esempio, è il biowire cardiaco OOC costituito da cardiomiociti umani in gel di collagene all'interno di un pozzetto microfabbricato e sottoposto a stimolazione elettrica, con progressivo aumento della frequenza, che analizza il comportamento dei biofilari di cardiomiociti stimolati e la variazione dell'intervallo QT (Figura 2.1) [36].

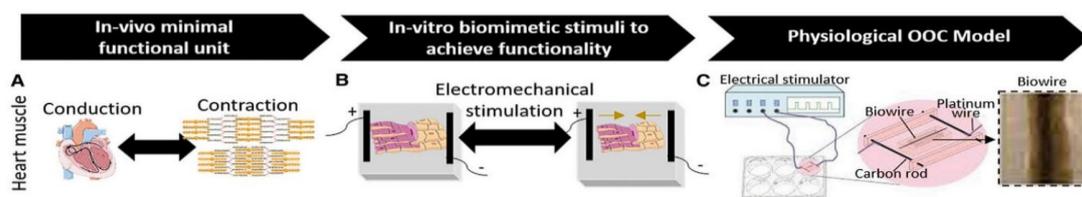


Figura 2.1 Progettazione di una OOC del muscolo cardiaco: A) unità funzionale minima, B) stimolazione elettrica *in vitro* per ottenere la contrazione e C) biowire cardiaco con stimolazione elettrica.

2.1.2 OOC di polmone

Uno dei principali ostacoli nell'identificazione di nuove tossine nell'ambiente è legato alla mancanza di modelli sperimentali che possano sostituire gli studi, costosi ed impegnativi, sugli animali. In particolare, i sistemi esistenti non sono in grado né di ricreare l'interfaccia tessuto-tessuto tra l'endotelio vascolare e i tessuti parenchimali (dove avviene il trasporto di: fluidi, sostanze nutritive e altri regolatori) né consentono l'applicazione di forze meccaniche o dinamiche che possano simulare, ad esempio, il movimento respiratorio dei polmoni [37].

Il modello Lung-on-a-chip (Figura 2.2) riproduce le principali proprietà funzionali, strutturali e meccaniche dell'interfaccia alveolo-capillare umana, unità fondamentale del polmone vivente. Il sistema è costituito da due microcanali ravvicinati separati da una membrana flessibile, porosa e sottile in PDMS, che è stata seminata con: da un lato da cellule epiteliali alveolari umane poste all'aria e, dall'altro, da cellule endoteliali esposte a perfusione vascolare. Una volta che le cellule sono cresciute, viene introdotta aria nel compartimento epiteliale per creare l'interfaccia aria-liquido ed imitare il rivestimento dello spazio aereo alveolare. Inoltre, le configurazioni dei canali permettono di manipolare il flusso di fluido nel microdispositivo e quindi controllare la consegna di cellule e sostanze nutritive ad endotelio ed epitelio in modo indipendente. La membrana viene incorporata in un chip contenente due camere, applicando e rimuovendo il vuoto in queste camere è possibile controllare e simulare il movimento respiratorio del polmone, che si espande e si rilassa ciclicamente riempiendo d'aria le regioni respiratorie per massimizzare la superficie disponibile allo scambio di gas [38].

Sono però presenti delle differenze tra l'OOC e la barriera alveolo-capillare umana *in vivo* tra cui: lo spessore, la mancanza di macrofagi alveolari, le alterazioni nel flusso d'aria e le cellule utilizzate che potrebbero non riprodurre fedelmente tutte le risposte delle cellule native.

Nonostante ciò, dagli studi di tossicologia è emerso che la tensione meccanica generata da questi dispositivi microfluidici accentua le risposte tossiche e infiammatorie del polmone ad alcune nano particelle. In tal modo questi modelli costituiscono una nuova frontiera sia per gli studi sulle colture cellulari che una alternativa a basso costo ai modelli animali per lo screening di farmaci [30].

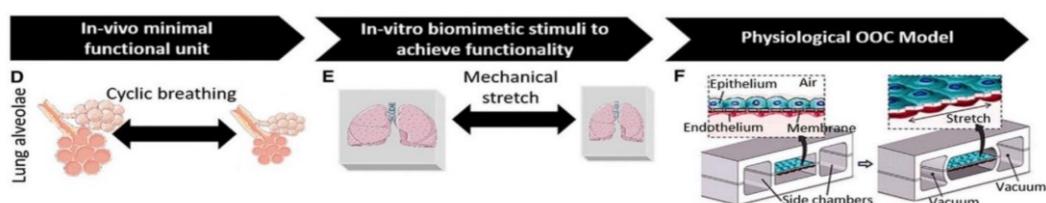


Figura 2.2: Progettazione di un OOC polmonare: D) Alveolo come unità fondamentale per il ciclo respiratorio, E) Allungamento meccanico *in vitro* e F) esempio di OOC polmonare.

2.1.3 OOC tumorali

Lo sviluppo di farmaci antitumorali è un processo lungo e costoso. Infatti, nonostante molti farmaci mostrino risultati preclinici promettenti, meno del 7% di essi viene approvato per la sperimentazione clinica [39]. Quando le cellule tumorali vengono poste *in vitro*, a causa dello spostamento dal loro ambiente nativo, tendono a perdere il fenotipo tumorale. I modelli animali, in particolare quelli di topo, hanno rappresentato uno strumento prezioso per lo sviluppo di farmaci antitumorali, grazie allo studio dei geni e dei fenotipi della malattia. Tuttavia, non è semplice tradurre le scoperte legate ai modelli *in vivo* sull'uomo. Una possibile soluzione potrebbe essere legata allo sviluppo di modelli microfluidici di tumore, che ricreino la complessità del microambiente in cui si forma il cancro (nicchia ossea per il sarcoma o le metastasi del cancro al seno) per poter studiare, con risultati maggiormente rilevanti, l'insorgenza e la progressione del tumore [39].

Nel caso del sarcoma osseo, i carichi meccanici sono impattanti nell'analisi della sensibilità ai farmaci antitumorali. Per questo la ricerca si orienta verso la realizzazione di un modello bioingegneristico di questo tumore. Un esempio è il modello microfluido del sarcoma di Ewing (Figura 2.3), (il secondo tumore più frequente negli adolescenti). Per realizzare questo modello le cellule tumorali sono state seminate in una impalcatura porosa, creata da una soluzione di collagene e acido ialuronico con la tecnica di liofilizzazione e coltivate per 48 ore, in modo da favorire l'adesione cellulare. Il modello tumorale è stato poi collocato in un bioreattore, ideato per sottoporre la coltura a carico dinamico di compressione applicato ciclicamente [39]. Lo studio su questo modello è stato in grado di spiegare meccanicamente la mancanza di miglioramento nella risposta clinica ad alcuni farmaci. Pertanto, gli OOC tumorali possono fornire informazioni sui collegamenti tra i fattori meccanici e lo sviluppo della resistenza ai medicinali [30].

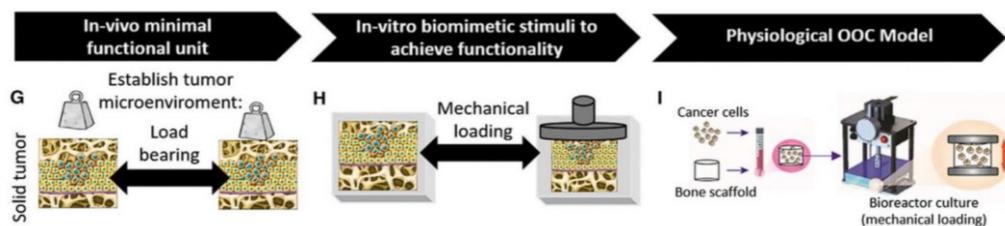


Figura 2.3: Progettazione di un OOC di tumore osseo: G) microambiente tumorale, H) applicazione del carico critico *in vitro* e I) OOC di tumore costituito da cellule tumorali del sarcoma di Ewing.

2.2 Sistema multiorgano su chip

Il collegamento di organi su chip singoli, attraverso la microfluidica, aiuta i ricercatori ad imitare il ruolo *in vivo* della perfusione vascolare e consente di ricreare, all'interno della coltura, alcuni aspetti dell'omeostasi per analizzare nel modo più simile a quello umano il metabolismo dei farmaci.

I metodi per integrare più OOC sono (Figura 2.4):

- 1) la coltura statica che si basa sulla connessione dovuta alla vicinanza fisica tra gli organi. In questo caso il trasporto e la comunicazione cellula-cellula sono facilitati dalla coltura degli organi nello stesso pozzetto [40];
- 2) la perfusione a ciclo singolo che è di tipo unidirezionale, realizzabile attraverso la vascolarizzazione che collega più camere d'organo e consente di modellare il trasporto del farmaco quando entra nel sistema vascolare e si sposta da una camera all'altra. Questo metodo consente di far maturare gli organi separatamente tramite stimoli specifici per poi combinarli insieme, attraverso il sistema OOC multiorgano. Tuttavia, il flusso ad una direzione consente la comunicazione solo agli organi posti a valle, eliminando il feedback dell'ambiente circolatorio umano [41];
- 3) il ricircolo sviluppa il modello di perfusione a ciclo unico. Questo prevede un flusso monodirezionale legato alla gravità a cui l'aggiunta di una micropompa consente il ritorno del flusso;
- 4) gli organi possono essere collegati tra loro, attraverso la circolazione vascolare e allocarsi in scompartimenti separati l'uno dall'altro da barriere selettive (membrane con endotelio che consentono il trasporto di molecole che mantengono la separazione tra gli organi e la circolazione vascolare). Questa configurazione imita al meglio il sistema *in vivo* e supporta i singoli sistemi di organi per la massima funzionalità e maturazione [30].

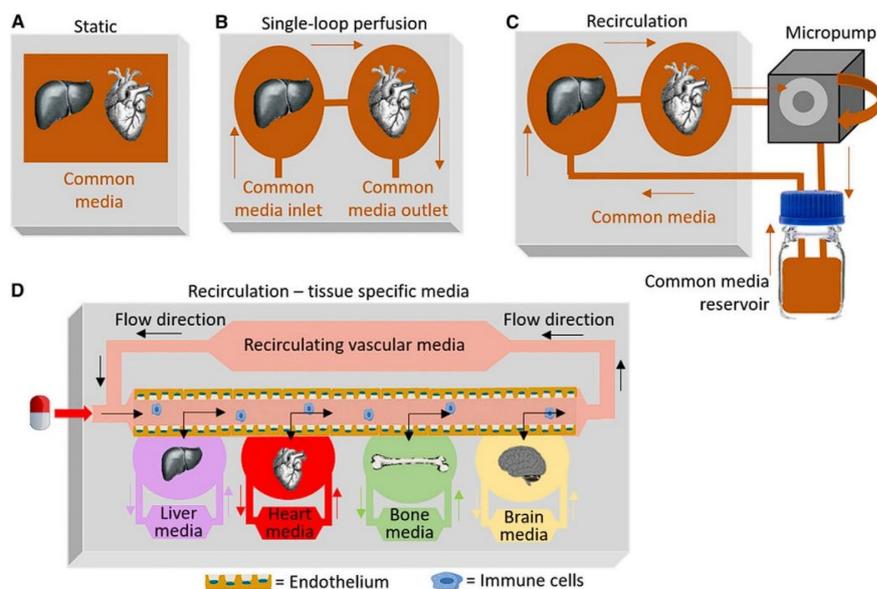


Figura 2.4: Integrazione di più OOC: A) coltura statica, B) perfusione a ciclo singolo, C) ricircolo di un mezzo comune in grado di supportare tutti i sistemi di organi e D) singoli OOC collegati da una barriera selettiva e messi in comunicazione attraverso il ricircolo.

In generale poiché gli OOC possono essere utilizzati per studiare i meccanismi e le interazioni degli organi umani, questi possono fornire modelli più realistici delle malattie [42]. Inoltre, considerate le vaste possibilità di personalizzazione dei dispositivi, gli OOC rispondono alle esigenze di varie tipologie di farmaci rispetto ai modelli animali, riducendo non solo i costi di sviluppo del metodo ma anche il numero di farmaci che, dopo aver superato la fase di sperimentazione preclinica sugli animali, falliscono le prove sull'uomo [43].

2.2.1 4OC di intestino, fegato, pelle e reni

L'assorbimento sistemico, il metabolismo dei farmaci da parte dell'intestino tenue e del fegato nonché l'escrezione da parte dei reni sono processi determinanti per l'efficacia e la sicurezza di candidati terapeutici. Tuttavia, queste fasi mancano della possibilità di essere testate *in vitro*. Una delle possibili soluzioni è il 4OC, un dispositivo microfluidico che mantiene le funzioni di 4 organi contemporaneamente: intestino tenue, fegato, pelle e rene (Figura 2.5).

Il sistema, che consiste in un processo di co-cultura per 28 giorni degli organi, è stato realizzato su scala di microsistema standardizzato ed è composto da: un modello di barriera intestinale umana ricostruita in coltura cellulare 3D, una biopsia cutanea che si occupa dell'assorbimento di sostanze orali e dermiche, un equivalente epatico 3D che consente il metabolismo delle sostanze e un compartimento del tubulo prossimale del rene che supporta l'escrezione [44]. Il flusso che interconnette i compartimenti di coltura attraverso i canali microfluidici è assicurato da una micropompa peristaltica su chip con controllo software per facilitare la regolazione

sull'andamento orario ed antiorario del flusso. Inoltre, il dispositivo permette di controllare la frequenza di avanzamento e la pressione del flusso in modo da poterlo adattare alle esigenze fisiologiche dei vari organi equivalenti presenti. Infine, un secondo circuito si occupa del drenaggio del fluido secreto attraverso lo strato di cellule epiteliali del rene [44].

Sono poche le aziende farmaceutiche che testano le caratteristiche dell'ADME (assorbimento, distribuzione, metabolismo ed eliminazione) nelle prime fasi della scoperta e dello sviluppo di un farmaco. Questo è legato alla mancanza di modelli *in vitro* che possano prevedere con precisione l'interazione dei metaboliti tra colture di organi [44]. Il 4OC e i possibili sviluppi di questi dispositivi possono quindi rivelarsi un punto di partenza per migliorare la ricerca farmaceutica.



Figura 2.5: Vista 3D del dispositivo 4OC: i numeri rappresentano i quattro compartimenti di coltura 1) intestino, 2) fegato, 3) pelle e 4) rene.

Capitolo 3: Nuove frontiere dell'IA e del software per ridurre la sperimentazione in vivo

Negli ultimi anni il mondo dell'intelligenza artificiale ha svolto notevoli progressi. Le tecnologie associate ai computer rappresentano, attualmente, una nuova strategia di sperimentazione alternativa al modello animale. I modelli *in silico* e i programmi software consentono di progettare nuovi farmaci mentre le simulazioni generate al computer vengono utilizzate per prevedere i vari effetti biologici o tossici di una sostanza chimica o di un potenziale medicinale, senza avvalersi di un candidato animale [18]. Ad esempio, per individuare il sito di legame del recettore di un farmaco si utilizza la sperimentazione animale. Il software CADD (Computer aided drug design) viene impiegato per prevedere il sito di legame del recettore per una specifica molecola del farmaco evitando di testare *in vivo* sostanze chimiche indesiderate che non hanno attività biologica. È quindi possibile, attraverso questi programmi software, creare un farmaco su misura per uno specifico sito di legame ed eseguire i test sugli animali solo nella fase finale, per ottenere risultati di conferma [45].

Un altro esempio è il modello VirtualLiver [1], uno strumento *in silico* che si occupa di prevedere la tossicità dei farmaci per il fegato, essendo il metabolismo epatico umano diverso da quello animale; l'epatotossicità è un rischio quando si eseguono test su possibili farmaci.

Inoltre, attraverso i modelli computerizzati, è possibile prevedere potenziali applicazioni alternative per i farmaci attualmente approvati per uno specifico approccio medico [46].

Infine, un altro dei vantaggi legati ai modelli *in silico* è la possibilità di condividere ed interpretare facilmente i dati scoperti, fornendo interi database di dati scientifici utilizzabili in molteplici studi. In questo caso, l'SBML (system biology markup language) è la piattaforma software aperta più ampiamente accettata e utilizzata per l'archiviazione e lo scambio di modelli [1].

3.1 Modelli QSAR

Negli ultimi anni, la disponibilità di ottimi database di caratteristiche ed effetti chimici, algoritmi di data mining e la crescente potenza di calcolo dei sistemi informatici, hanno portato alla realizzazione di strumenti e sistemi di calcolo più versatili ed affidabili per la valutazione della tossicità dei farmaci. I modelli *in silico* QSAR (quantitative structure-activity relationship), sono relazioni matematiche che collegano la struttura chimica dei composti in esame con l'attività biologica e l'assorbimento dei farmaci in modo quantitativo utilizzando

approcci statistici; perciò, offrono un metodo alternativo ai modelli animali per stimare la tossicità di un farmaco in assenza di dati sperimentali. La scelta dei modelli QSAR per uno studio scientifico è legata alla necessità sia di individuare i modelli più coerenti con la sostanza chimica bersaglio¹ che di selezionare modelli con approcci e/o conoscenze differenti tra loro per aumentare l'affidabilità dei risultati del progetto.

È possibile distinguere tre tipologie di QSAR a seconda di quanto lo studio rientri nel dominio di applicabilità² AD (applicability domain):

- 1) modelli con dominio di applicabilità AD non valutato: questi rappresentano modelli più semplici che forniscono un valore legato solamente alla proprietà/effetto ma non consentono di verificare se la sostanza chimica bersaglio si trova all'interno del dominio dei modelli [47]. Per valutare l'applicabilità di questi è possibile fare riferimento ad un insieme generale di composti chimici oppure verificarne la somiglianza rispetto all'insieme di sostanze chimiche previste dal database [48];
- 2) modelli per i quali l'AD è poco valutato: in questo caso le regole per definire l'AD sono fornite dal modello stesso ma possono essere applicate solo manualmente. Ad esempio: il software EPISuite indica che i risultati del modello sono validi se la sostanza chimica bersaglio presenta caratteristiche che rientrano in un certo intervallo e se il numero di frammenti chimici non supera un determinato valore. I calcoli per individuare i range di validità sono da eseguire a mano per ciascuna sostanza [48];
- 3) modelli per i quali AD è valutato e descritto: questi modelli non forniscono solo la previsione richiesta ma anche una descrizione dettagliata di controllo del dominio di applicabilità. In questo caso, l'esperto deve verificare ed approvare qualsiasi risultato prodotto dal software attraverso tre fattori principali che compongono un modello QSAR: la parte tossicologica, la parte chimica e l'algoritmo utilizzato per la modellazione [48]. Un esempio di implementazione di questo modello è la piattaforma VEGA, che fornisce un valore quantitativo, definito come indice AD (applicability domain index), tramite la considerazione di composti simili nel training set del modello. Il calcolo dell'ADI si basa su fattori come: l'accuratezza e la somiglianza dei risultati su composti simili e la concordanza del valore previsto con i valori sperimentali ricavati da altri composti.

¹ Si intende il composto in esame.

² L'AD è una regione teorica che include le informazioni sul training set del modello e permette di calcolare l'incertezza della predizione dei risultati.

Ogni modello, a causa di un diverso AD, fornirà risultati limitati se utilizzato per testare sostanze chimiche appartenenti a classi molto diverse, per questo è fondamentale scegliere accuratamente il modello adeguato ad uno specifico studio.

La ricerca sui sistemi *in silico* è incentivata dalla necessità di ampliare la ricerca scientifica con approcci integrati e combinati di modelli QSAR.

In generale, i sistemi di modelli tendono a dare risultati migliori quando sono molto differenti tra di loro. La differenza può essere raggiunta in molteplici modi, per esempio, utilizzando set di dati o parametri di addestramento differenti per ogni singolo classificatore oppure combinando tra loro diversi classificatori (regressione lineare, alberi decisionali o macchine vettoriali di supporto). Una delle misure utilizzate per quantificare questa differenza è la “diversità Q” [49]. Considerando due classificatori A e B, il parametro Q può essere determinato a partire dai valori N_t e N_f che rappresentano rispettivamente il numero di dati previsto correttamente o erroneamente da entrambi i classificatori; N_a invece indica il numero di dati predetto correttamente da A ma erroneamente da B e viceversa N_b .

$$Q = \frac{N_t \cdot N_f - N_a \cdot N_b}{N_t \cdot N_f + N_a \cdot N_b}$$

L’equazione assume valori positivi se le stesse istanze sono correttamente classificate da entrambi i classificatori e valori negativi in caso contrario, mentre la differenza massima è per $Q = 0$.

L’integrazione dei singoli modelli QSAR può avvenire tramite cinque differenti metodologie (Figura 3.1):

- 1) metodi algebrici e di voto: questi rappresentano l’integrazione di più programmi che elaborano l’output di diversi modelli. Ad esempio, tramite il software TEST l’utente lancia diversi modelli e tutti i risultati vengono considerati equamente validi. In questo caso è l’utente che si occupa manualmente di verificare l’affidabilità di ogni singolo output;
- 2) metodi di pesatura: diversamente dal metodo precedente, i risultati di ogni singolo modello hanno un peso differente. Quest’ultimo si può basare su diversi criteri tra cui, per esempio, la sostanza bersaglio o l’affidabilità dei modelli per una determinata categoria di sostanze. I metodi di pesatura permettono di non scartare risultati potenzialmente utili [48];

- 3) metodi ibridi: alcuni modelli *in silico* vengono combinati in sistemi intelligenti ibridi [50] che, differentemente dai metodi precedenti dove i modelli venivano integrati a posteriori, l'integrazione è pianificata a monte. I sistemi intelligenti ibridi possono essere classificati in autonomi o integrati. I primi uniscono più tecniche in un solo modello computazionale condividendo le strutture dati, i secondi si concentrano sull'interazione di più modelli computazionali differenti [50]. Un esempio è il modello ibrido CAESAR che si occupa di prevedere se una sostanza è mutagena o meno. Per aumentarne la sensibilità del modello un secondo modello viene integrato a quelle sostanze che hanno dato esito negativo [51], se l'output del secondo modello prevede la mutagenicità il software si arresta altrimenti, viene applicato un terzo modello con una struttura ancora differente che verifichi ulteriormente la mutagenicità o meno;
- 4) metodi di apprendimento: costituiscono un ulteriore passo in avanti verso una maggiore integrazione dei risultati dei diversi modelli. Nello specifico, questi metodi sono strutturati e composti non solo da informazioni a priori, ma sono anche capaci di espandere il proprio database con informazioni acquisite durante le simulazioni [48];
- 5) metodi basati sulla valutazione degli esperti: il giudizio di esperti fornisce informazioni utili per comprendere al meglio come gestire i risultati dei diversi modelli. Le valutazioni si basano su una serie di passaggi necessari, tra cui, l'eliminazione dei dati con bassa affidabilità e l'esclusione dei dati fuori AD [48].

Algebraic and voting methods	<p>Algebraic methods</p> <p>Model 1 → result 1 Model 2 → result 2 Model 3 → result 3</p>
Weighing	<p>Weighing methods</p> <p>Model 1 → result 1 → transformed result 1 Model 2 → result 2 → transformed result 2 Model 3 → result 3 → transformed result 3</p>
Hybrid	<p>Hybrid methods</p>
Learning	<p>Learning methods</p> <p>Model 1 → result 1 Model 2 → result 2 Model 3 → result 3</p>
Expert-based	<p>Expert-based integration</p> <p>Model 1 → result 1 Model 2 → result 2 Model 3 → result 3</p>

Figura 3.1: metodi di integrazione dei modello QSAR

Di seguito vengono analizzate due prassi di integrazione degli output di modelli QSAR.

3.1.1 Integrazione con read – across

Il read – across, applicabile ad un numero ristretto di sostanze chimiche, si basa su estrapolazioni da composti ricchi di dati a composti poveri di dati, sulla base della somiglianza chimica percepita [52]. Infatti, se i risultati di diversi modelli concordano, la valutazione risulta semplice e l'unico nodo è legato al loro livello di affidabilità. Invece se non sono presenti composti strettamente simili la valutazione read – across risulta debole e i risultati di altri modelli QSAR possono essere più informativi. Questa metodologia viene applicata necessariamente per coppie o gruppi di composti con strutture simili ma attività diverse [53]. In generale, non tutti i modelli QSAR si prestano a questa metodologia ma alcuni, come VEGA e TEST, che si basano su protocolli automatici, forniscono i dati sperimentali sulle sostanze chimiche in modo da facilitare il processo di read – across. Esistono anche, modelli statistici

QSAR basati su k-nearest neighbor (kNN) che possiedono read - across integrato. Inoltre, alcuni software sono stati progettati specificatamente per questo metodo, tra i quali [48]:

- 1) il toolbox dell'OCSE che consente all'utente di eseguire il read – across e fornisce la possibilità di esplorare i diversi meccanismi associati all'effetto tossico di una sostanza chimica;
- 2) AMBIT offre una libreria per il read – across e include le sostanze registrate nel REACH (registrazione, la valutazione, l'autorizzazione e la restrizione delle sostanze chimiche);
- 3) Toxmatch offre un'altra libreria open-source per la valutazione della somiglianza tra più proprietà, facilitando il read – across;
- 4) ToxRead si occupa di mostrare graficamente le sostanze chimiche simili e gli allarmi strutturali indicando quali composti simili presentano gli stessi alerts.

3.1.2 Ensemble

Il metodo ensemble integra più modelli. Questo metodo apporta miglioramenti rispetto ad un singolo modello poiché evita il rifiuto a priori di parte delle evidenze che potrebbero essere disponibili in altri modelli. Inoltre, l'unione dei loro output può ridurre l'effetto del rumore casuale nei dati ed evitare le sovra o sottostime [54].

Questo metodo presenta però delle limitazioni legate non solo alla complessità di integrazione tra i numerosi modelli ma anche alle tempistiche e costi proibitivi.

Nonostante la presenza di vari metodi in grado di integrare i risultati dei modelli QSAR, al momento non risulta sia stato validato alcun modello, a causa delle incertezze relative al loro uso nella stima della tossicità delle sostanze chimiche. Attualmente, non è ancora possibile rinunciare completamente ai modelli animali, dal momento che soltanto un organismo vivente può permettere di valutare sulla base di evidenze scientificamente provate le complesse interazioni indotte da un farmaco o da altra sostanza chimica. Tuttavia, i modelli *in silico*, che pure possono essere alimentati dai dati raccolti *in vivo* consentono di acquisire risultati in tempi brevi e a basso costo senza il sacrificio degli animali.

Conclusioni

Il presente elaborato si focalizza sulla ricerca e l'analisi delle alternative alla sperimentazione animale. I modelli animali sono ancora oggi lo standard per la ricerca medica grazie alla loro capacità di riprodurre, almeno in parte, i complessi processi fisiologici umani. Nonostante ciò, la maggior parte delle terapie non supera i test clinici ed è per questo necessario che la ricerca proceda nello studio di nuove alternative che non prevedano l'utilizzo animale, sia per questioni etiche che per abbattere i costi di gestione di uno studio mantenendo allo stesso modo invariata la qualità dei risultati.

I microrganismi e gli invertebrati sono le varietà più semplici di organismi viventi in grado di mostrare proprietà biologiche simili a quelle umane, permettendo di studiare lo sviluppo di una malattia o gli effetti di un farmaco durante tutto il ciclo di vita. In particolare, il lievito di birra non solo ha tempi di gestazione molto brevi che consentono di coltivarlo ed analizzarlo in breve tempo, ma è uno dei modelli fondamentali nella ricerca genetica e per lo studio delle malattie neurodegenerative, grazie alla ricombinazione omologa. Il moscerino della frutta, invece, è uno degli invertebrati più utilizzati nella ricerca in quanto i suoi complessi stadi di vita permettono di studiare lo sviluppo delle malattie lungo l'intero processo della breve vita dell'invertebrato. È chiaro però che questi organismi non solo non risolvono il problema etico legato alla sperimentazione animale ma le loro dimensioni e strutture semplificate rendono difficile la trasposizione degli studi sull'uomo.

Le colture cellulari 2D permettono lo studio dei farmaci riducendo o eliminando completamente l'uso di animali attraverso lo studio di varie tipologie di cellule in ambienti controllati che permettono di ricreare le condizioni fisiologiche dell'uomo. Questo avviene su una superficie limitata, causando l'eliminazione dell'interazione delle cellule con gli ambienti circostanti e di conseguenza riducendo l'efficacia dello studio. D'altra parte, i modelli 3D rappresentano meglio la complessità del tessuto reale, sia rispetto agli studi *in vivo* che ai modelli 2D.

Come si evince dal primo capitolo, esistono 3 approcci differenti ai modelli 3D, i quali presentano vantaggi e svantaggi per la ricerca scientifica. La ricostruzione di organi attraverso la semina cellulare su scaffold 3D è molto avanzata, in quanto ad oggi risultano realizzati modelli di quasi tutti gli organi del corpo umano basandosi su colture primarie a basso costo ed alta disponibilità. Per questo è possibile realizzare singoli modelli ma non intere simulazioni del corpo umano o dell'interazione tra organi. La ricostruzione tramite biostampa 3D permette di utilizzare non solo cellule vive, ma anche biomateriali e biomolecole anche se necessita di un prolungato tempo di maturazione e va incontro alle difficoltà legate alla stampa di più

tipologie di cellule. Per questo, ha bisogno di tempo per poter essere perfezionata e maggiormente impiegata. Nel caso del modello cardiaco, la composizione cellulare di cardiomiociti e cellule non miocitarie si occupa dello studio della cardiotossicità dei farmaci. Infine, è noto che l'espianto di organi consente di avere l'intero organo a disposizione per lo studio, rendendolo perfetto qualora si dovessero svolgere ricerche sull'intero organo e solo su quest'ultimo, senza vagliare le interazioni con i sistemi circostanti.

L'analisi fin qui svolta va incontro non solo alla scarsa disponibilità di materiale ma anche agli elevati costi di gestione nel mantenere a lungo perfusa una superficie di grandi dimensioni.

Nel secondo capitolo vengono analizzate alternative che comprendono colture cellulari in sistemi 3D e simulano le interazioni tra le cellule di ambienti differenti, che replicano la struttura fisiologica umana e anche le connessioni strutturali e fisiche tra i differenti sistemi.

Nello specifico gli organ on chip (OOC) singoli si occupano di simulare il comportamento di un organo attraverso modelli meccanici in grado di replicare le forze fisiche che ne attivano le funzionalità. È noto che il ruolo principale del cuore è quello di pompare il sangue attraverso la contrazione per tutto il corpo umano e il biowire cardiaco OOC, sottoposto a stimolazione elettrica, permette proprio di studiare le fasi della contrazione cardiaca e, nello specifico, le variazioni dell'intervallo QT. Nel caso del polmone, invece, l'interfaccia alveolo polmonare è simulata attraverso l'OOC di polmone che permette di studiare le risposte infiammatorie dei polmoni ad alcune specifiche particelle, anche se questo modello è ancora lontano dalla reale meccanica respiratoria. Da ultimo, nello studio dei farmaci per sarcoma osseo è stato realizzato un modello fluidico in grado di simulare la compressione ossea e verificare la risposta dei farmaci al carico. Esistono inoltre dei modelli microfluidici che si occupano di collegare tra di loro modelli singoli per studiare le caratteristiche di un insieme di organi che comunicano tra loro, come nel caso del metabolismo dei farmaci per il 4OC di intestino, fegato, pelle e reni.

La terza ed ultima parte si occupa di trattare le nuove frontiere dell'intelligenza artificiale dove la strada da fare e gli ostacoli da superare sono ancora notevoli. I modelli QSAR aspirano a diventare le alternative definitive in quanto privi dell'impiego di materiale biologico e capaci, grazie alla potenza computazionale raggiunta ed algoritmi complessi, di effettuare test e simulazioni dell'efficacia di determinati farmaci in brevissimo tempo. Alcuni esempi sono il software CADD che viene impiegato per prevedere il sito di legame del recettore di una molecola specifica, evitando di impiegare la sperimentazione animale. Il modello VirtualLiver prevede la tossicità dei farmaci per il fegato poiché il metabolismo epatico umano è molto differente da quello animale e gli studi su questi ultimi spesso falliscono.

In conclusione, è possibile affermare che allo stato attuale la ricerca è ancora lontana dalla completa sostituzione della sperimentazione animale, poiché i modelli attualmente esistenti non permettono di integrare completamente la complessa fisiologia umana e le ancor più complicate interazioni tra i diversi sistemi. Tuttavia, dall'introduzione della regola delle 3R nel 1959 ad oggi, sono stati svolti notevoli progressi scientifici sia per quanto riguarda i modelli 3D *in vitro* che attraverso l'introduzione degli organi su chip, il tutto con uno sguardo alle intelligenze artificiali che caratterizzeranno il prossimo futuro.

Bibliografia

- [1] Díaz L, Zambrano E, Flores ME, Contreras M, Crispín JC, Alemán G, Bravo C, Armenta A, Valdés VJ, Tovar A, Gamba G, Barrios-Payán J, Bobadilla NA. Ethical Considerations in Animal Research: The Principle of 3R's. *Rev Invest Clin.* 2020;73(4):199-209.
- [2] Taormina G, Ferrante F, Vieni S, Grassi N, Russo A, Mirisola MG longevity: lesson from model organisms. 2019;10:518.
- [3] Weinhart M, Hocke A, Hippenstiel S, Kurreck J, Hedtrich S. 3D organ models- Revolution in pharmacological research? *Pharmacol Res.* 2019;139:446-451.
- [4] Osuchowski MF, Remick DG, et al. Abandon the mouse research ship? Not yet! *Shock* 2014;41: 463–475.
- [5] Pound P, Bracken MB, Is animal research sufficiently evidence based to be a cornerstone of biomedical research? 2018;348:3387.
- [6] Couzin-Frankel J. When mice mislead, *Science* 2013;342:922-923.
- [7] Gerber PA, Bühren BA, et al. The top skin-associated genes: a comparative analysis of human and mouse skin transcriptomes, *Biol. Chim.* 2014;395:577–591.
- [8] Ewald DA, Noda S, et al., Major differences between human atopic dermatitis and murine models, as determined by using global transcriptomic profiling, *J. Allergy Clin. Immunol.* 2017;139:562–571.
- [9] Russel WMS, Burch RL. *The principles of humane experimental technique*, 1959
- [10] Lewis A, Zuckerbraun B, Griepentrog J, Zhang X, Rosengart M. Reducing animal use with a biotelemetry-enhanced murine model of sepsis. *Sci Rep.* 2017;7:6622.
- [11] Jariwala Amar R, Oliveira Luciana M, Diemert David J, Keegan Brian, Plieskatt Jordan L, Periago Maria V, Bottazzi Maria E, Hotez Peter J, Bethony Jeffrey M. Potency testing for the experimental Na-GST-1 hookworm vaccine. *Expert Review of Vaccines* 2010;9:10:1219-1230.
- [12] Smith AJ, Clutton RE, Lilley E, Hansen KE, Brattelid T. PREPARE: guidelines for planning animal research and testing. *Lab Anim.* 2018;52:135-41
- [13] Sangiovanni M. Colture cellulari: tipi, modalità di e strumenti. *Articolo.* 2019
- [14] Zhu W, Ma X, Gou M, Mei D, Zhang K, Chen S, 3D printing of functional biomaterials for tissue engineering. *Curr Opin Biotechnol.* 2016; 40:103-12

- [15] Díaz L, Zambrano E, Flores ME, Contreras M, Crispín JC, Alemán G, Bravo C, Armenta A, Valdés VJ, Tovar A, Gamba G, Barrios-Payán J, Bobadilla NA. Ethical Considerations in Animal Research: The Principle of 3R's. *Rev Invest Clin.* 2020;73(5)
- [16] Bauer B, Mally A, Liedtke D. Zebrafish Embryos and Larvae as Alternative Animal Models for Toxicity Testing. *Int J Mol Sci.* 2021;22(24):13417.
- [17] Wilson-Sanders S.E. Invertebrate models for biomedical research, testing and education. *ILAR J* 2011; 52:126-152
- [18] Doke SK, Dhawale SC. Alternatives to animal testing: A review. 2015;23(3):223-9.
- [19] Botstein D, Chervitz SA, Cherry JM. Yeast as a model organism. *Science.* 29;277(5330):1259-60.
- [20] Pereira C, Bessa C, Soares J, Leao M, Saraiva L Contribution of yeast models to neurodegeneration research. 2012;941232
- [21] Reiter L.T, Potocki L, Chien S, Gribskov M, Bier E. A systematic analysis of human disease- associated gene sequences in *Drosophila melanogaster*. *Genome Res* 2001; 11:1114-1125.
- [22] Pandey UB, Nichols CD. Human disease models in *Drosophila melanogaster* and the role of the fly in therapeutic drug discovery. *Pharmacol Rev.* 2011;63(2):411-36.
- [23] Ridgeon CS, Schlott C, Wong MW, Heringa MB, Heckel T, Leedale J, Launay L, Gryshkova V, Przyborski S, Bearon RN, Wilkinson EL, Ansari T, Greenman J, Hendriks DFG, Gibbs S, Sidaway J, Sison-Young RL, Walker P, Cross MJ, Park BK, Goldring CEP. Innovative organotypic *in vitro* models for safety assessment: aligning with regulatory requirements and understanding models of the heart, skin, and liver as paradigms. *Arch Toxicol.* 2018;92(2):557-569.
- [24] Lee H.P, Gu L, et al. Mechanical confinement regulates cartilage matrix formation by chondrocytes. *Nat. Mater.* 2017;16:1243-1251.
- [25] Blunder S, Ruhl R, et al. Alternations in epidermal eicosanoid metabolism contribute to inflammation and impaired late differentiation in FLG- mutated atopic dermatitis. 2017;137:706-715.
- [26] Nguyen D.G, Funk J, et al. Bioprinted 3D primary liver tissues allow assessment of organ- level response to clinical drug induced toxicity *in vitro*. 2016;11
- [27] Das S, Nam H, Jang J. 3D bioprinting of stem cell-laden cardiac patch: A promising alternative for myocardial repair. *APL Bioeng.* 2021;5(3):031508.
- [28] Cypel M, Yeung J.C, Liu M, Anraku M, Chen F, Karolak W, Sato M, Laratta J, Azad S, Madonik M, Chow C.W, Chaparro C, Hutcheon M, Singer L.G, Slutsky A.S, Yasufuku

- K, de Perrot M, Pierre A.F, Anddell T.K, Keshavjee S. Normothermic *ex vivo* lung perfusion in clinical lung transplantation. *Med.* 2011;20:518-524.
- [29] McAuley DF, Curley GF, Hamid UI, Laffey JG, Abbott J, McKenna DH, Fang X, Matthay MA, Lee JW. Clinical grade allogeneic human mesenchymal stem cells restore alveolar fluid clearance in human lungs rejected for transplantation. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2014;306(9):809-15.
- [30] Ronaldson-Bouchard K, Vunjak-Novakovic G. Organs-on-a-Chip: A Fast Track for Engineered Human Tissues in Drug Development. *Cell Stem Cell.* 2018;22(3):310-324.
- [31] Moya ML, Hsu YH, Lee AP, Hughes CC, George SC. In vitro perfused human capillary networks. *Tissue Eng. Part C Methods* 2013;19: 730–737.
- [32] Marturano-Kruik A, Yeager K, Bach D, Villasante A, Cimetta E, Vunjak-Novakovic G. Mimicking biophysical stimuli within bone tumor microenvironment. *Conf. Proc. IEEE Eng. Med. Biol. Soc.* 2015:2015;3561–3564.
- [33] Nunes SS, Miklas JW, Liu J, Aschar-Sobbi R, Xiao Y, Zhang B, Jiang J, Massé S, Gagliardi M, Hsieh A. Biowire: a platform for maturation of human pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes. *Nat. Methods* 2018;10;781–787.
- [34] Takahashi K, Tanabe K, Ohnuki M, Narita M, Ichisaka T, Tomoda K, Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell* 2007;131; 861–872.
- [35] Shirure VS, Lezia A, Tao A, Alonzo LF, George SC. Low levels of physiological interstitial flow eliminate morphogen gradients and guide angiogenesis. *Angiogenesis* 2017;20:493–504.
- [36] Nunes SS, Miklas JW, Liu J, Aschar-Sobbi R, Xiao Y, Zhang B, Jiang J, Massé S, Gagliardi M, Hsieh A, Thavandiran N, Laflamme MA, Nanthakumar K, Gross GJ, Backx PH, Keller G, Radisic M. Biowire: a platform for maturation of human pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes. *Nat Methods.* 2013;10(8):781-7.
- [37] Ingber DE. Cellular mechanotransduction: putting all the pieces together again. *2006;20(7):811-27.*
- [38] Huh D, Matthews BD, Mammoto A, Montoya-Zavala M, Hsin HY, Ingber DE. Reconstituting organ-level lung functions on a chip. *Science.* 2010;328(5986):1662-8.
- [39] Marturano-Kruik A, Villasante A, Yaeger K, Ambati SR, Chramiec A, Raimondi MT, Vunjak-Novakovic G. Biomechanical regulation of drug sensitivity in an engineered model of human tumor. *Biomaterials.* 2018;150:150-161.

- [40] Li Y, Yang Y, Xiong A, Wu X, Xie J, Han S, Zhao S. Comparative gene expression analysis of lymphocytes treated with exosomes derived from ovarian cancer and ovarian cysts. *Front. Immunol.* 2017;8; 607.
- [41] Phan DTT, Wang X, Craver BM, Sobrino A, Zhao D, Chen JC, Lee LYN, George SC, Lee AP, Hughes CCW. A vascularized and perfused organ-on-a-chip platform for large-scale drug screening applications. *Lab Chip* 2017;17: 511–520.
- [42] Ingber DE. Reverse engineering human pathophysiology with organ-on-chips. *Cell* 2016;164:1105–1109.
- [43] Gintant G, Sager PT, Stockbridge N. Evolution of strategies to improve preclinical cardiac safety testing. *Nat. Rev. Drug Discov.* 2016;15; 457–471.
- [44] Maschmeyer I, Lorenz AK, Schimek K, Hasenberg T, Ramme AP, Hübner J, Lindner M, Drewell C, Bauer S, Thomas A, Sambo NS, Sonntag F, Lauster R, Marx U. A four-organ-chip for interconnected long-term co-culture of human intestine, liver, skin and kidney equivalents. *Lab Chip.* 2015 J;15(12):2688-99.
- [45] Vedani A. Computer-aided drug design: an alternative to animal testing in the pharmacological screening. *Altex* 1991;8: 39.
- [46] Gottlieb A, Stein GY, Rubbin E, Sharan R. PREDICT: a method for inferring novel drug indications with application to personalized medicine. *Mol Syst Biol.* 2011; 7:496.
- [47] Benfenati E, Chaudhry Q, Gini G, Dorne JL. Integrating in silico models and read-across methods for predicting toxicity of chemicals: A stepwise strategy. *Environ Int.* 2019; 131:105060.
- [48] Kulkarni SA, Benfenati E and Barton-Maclaren T. Improving confidence in (Q)SAR predictions under Canada's chemicals management plan, a chemical space approach, SAR QSAR *Environ. Res.* 2016; 27: 851–863.
- [49] Polikar R. Ensemble based systems in decision making. *IEEE Circ. Syst. Mag.* 2006;6: 21–45.
- [50] Amaury N, Benfenati E, Bumbaru S, Chana A, Craciun M, Crétien JR, Gini G, Guo G, Lemke F, Minzu V, Muller J, Neagu D, Pintore M, Stroia SA and Trundle P. Hybrid systems, in *Quantitative Structure-Activity Relationships (QSAR) for Pesticides Regulatory Purposes.* 2007: 149–184.
- [51] Ferrari T, Gini G. An opensource multistep model to predict mutagenicity from statistic analysis and relevant structural alerts. *Chem. Cent. J.* 2010; 4:1.

- [52] Alves VM, Auerbach SS, Kleinstreuer N, Rooney JP, Muratov EN, Rusyn I, Tropsha A, Schmitt C. Curated data in trustworthy in silico models out: the impact of data quality on the reliability of artificial intelligence models as alternatives to animal testing. *Altern Lab Anim.* 2021;49(3):73-82.
- [53] Maggiora GM. On outliers and activity cliffs why QSAR often disappoints. *J Chem Inf Model* 2006; 46: 1535.
- [54] Gaudin C, Cunha D, Ivanoff E, Horcajada P, Chev e G, Yasri A, Loget O, Serre C and Maurin G. A quantitative structure activity relationship approach to probe the influence of the functionalization on the drug encapsulation of porous metal-organic frameworks, *Micropor. Mesopor.* 2012; 157: 125–13.