



**UNIVERSITÀ
DEGLI STUDI
DI PADOVA**

**DIPARTIMENTO
DI INGEGNERIA
DELL'INFORMAZIONE**

DIPARTIMENTO DI INGEGNERIA DELL'INFORMAZIONE

CORSO DI LAUREA IN INGEGNERIA BIOMEDICA

**“POSSIBILI ALTERNATIVE ALLA
SPERIMENTAZIONE ANIMALE”**

Relatore: Prof. Morten Gram Pedersen

Laureando/a: Rebecca Puccini

ANNO ACCADEMICO 2021 – 2022

Data di laurea 07/03/2022

ABSTRACT

Con il termine “sperimentazione animale” si vuole intendere l’utilizzo scientifico, ai fini della ricerca, di animali. Essa viene messa in pratica seguendo i principi di Riduzione, Perfezionamento e Sostituzione esplicitati da Russell e Burch alla fine degli anni ’50 del Novecento. Nel tentativo di ridurre, perfezionare e sostituire l’impiego di animali, soprattutto vertebrati, all’interno della ricerca scientifica, si sono elaborate diverse tecniche “alternative”, come i modelli *in vitro* e quelli *in silico*. In quest’ultima vastissima categoria, focalizzandosi soprattutto sull’ambito tossicologico/farmaceutico, si possono indagare diverse fruibili alternative utili, se non a sostituire del tutto, per lo meno a limitare notevolmente il bisogno di impiegare modelli animali nella sperimentazione. Ne sono esempio i modelli QSAR, basati sullo studio dell’interazione tra la struttura chimica delle molecole e la loro attività biologica. Lungi dall’essere in grado di rimpiazzare completamente i modelli animali, i modelli in silicio presentano, come maggior ostacolo al loro utilizzo, la necessità di validarne la “credibilità”. Nonostante ciò, si è ormai giunti all’impiego di veri e propri “studi clinici in silicio”, in grado di aprire la strada all’applicabilità del principio delle 3R di Russell e Burch non solo in ambito di sperimentazione animale ma, *mutatis mutandis*, anche ai *trial clinici* umani, con il vantaggio di ottenere risultati sempre più accurati e in modo più veloce, efficiente e meno costoso.

INDICE

ABSTRACT	1
INDICE	2
INTRODUZIONE	3
CAPITOLO 1	5
RUSSEL E BURCH: IL PRINCIPIO DELLE 3R	5
<i>RIDUZIONE</i>	7
<i>PERFEZIONAMENTO</i>	7
<i>SOSTITUZIONE</i>	8
METODI ALTERNATIVI	9
<i>In Vitro Cells/Tissue/Organ Models</i>	10
<i>Alternative Organisms</i>	11
<i>Computer Models</i>	13
CAPITOLO 2	15
IN SILICO TOOLS IN TOXICOLOGY	15
<i>Data Quality Assessment</i>	17
<i>Databases</i>	18
<i>Quantitative Structure-Activity Relationship (QSAR)</i>	18
Esempio di analisi QSAR classica (2D): analisi di Hansch	23
CAPITOLO 3	28
PRATICHE DI CREDIBILITY ASSESSMENT	28
<i>MODELLI INGEGNERISTICI</i>	29
<i>MODELLI BIOMEDICI</i>	31
STUDI CLINICI IN SILICIO (ISCT)	33
<i>Esempi di ISCT</i>	34
CONCLUSIONE	43
BIBLIOGRAFIA E SITOGRAFIA	44
CAPITOLO 1	44
CAPITOLO 2	45
CAPITOLO 3	45

INTRODUZIONE

Con la pubblicazione del famoso libro, *Principles of Humane Experimental Technique*, nel 1959, Russell e Burch aprirono di fatto una discussione più strutturata riguardo alla necessità di sostenere una sperimentazione più attenta alla protezione degli animali da laboratorio. Concetto cardine della loro opera è quello espresso per mezzo del termine “disumanità”, costantemente in rapporto con il suo opposto, o con l’assenza di esso, ovvero “l’umanità”. Pur non avendo i due ricercatori affrontato il problema etico di cosa si intenda con “benessere animale” e cosa esso implichi, il principio delle 3R, ampiamente esplicitato nel corso della trattazione, risulta ad oggi la base fondante l’impiego “etico” di animali nella ricerca scientifica. In particolare, forse con una leggera deriva dal significato originale dei due concetti di Riduzione e Sostituzione, questo principio è il cavallo di battaglia di coloro che vogliono diminuire progressivamente il numero di esseri viventi senzienti all’interno della sperimentazione per sostituirli con alternative meno discutibili eticamente, che possano portare nel tempo a rendere del tutto obsoleti certi studi ricorrendo all’impiego di metodologie egualmente efficaci o, addirittura, in grado di permettere in modo molto più performante l’avanzamento scientifico, soprattutto in ambiti strettamente connessi con la salute umana. Questo lavoro intende perciò confrontarsi con lo stato dell’arte circa la sperimentazione animale e, soprattutto, con le sue alternative in ambito ingegneristico e biomedicale in particolare. Lo scopo non è quello di fornire soluzioni a problemi che sono decisamente complessi e non sintetizzabili in poche pagine, quanto quello di frequentare e mappare un campo di indagine che ha grandi margini di miglioramento e che promette di semplificare di molto il lavoro della ricerca sperimentale.

Per quanto la maggior parte delle “alternative” esistenti allo stato attuale abbia più un ruolo additivo, preposto ad affiancare i test *in vivo* ed *ex vivo* e volto alla riduzione, piuttosto che alla sostituzione completa, degli studi sugli animali, esistono tecniche promettenti che potrebbero nel tempo essere riconosciute come alternative in modo assoluto.

All’interno dei due macro ambiti principali che racchiudono quelle che possono essere definite “alternative alla sperimentazione animale”, troviamo i modelli *in silico*, termine usato per indicare fenomeni di natura chimico biologica riprodotti in una simulazione matematica al computer, piuttosto che in provetta o in un essere vivente. Ne sono esempio concreto lo studio delle relazioni quantitative struttura-attività (QSAR), ossia dei modelli in grado di descrivere la relazione tra la struttura chimica di una sostanza e il suo profilo di attività.

I risultati derivanti dalla simulazione di queste relazioni possono infatti essere impiegati in

screening tossicologici predittivi, in modo da scartare sostanze con scarsa speranza di dare risultati vantaggiosi prima di procedere con altre forme di sperimentazione.

Due limiti dei modelli in silicio si ritrovano nella difficoltà elevata di simulare o riprodurre la complessità dell'organismo umano (problema che affligge anche i modelli *in vitro*) e la necessità particolarmente sentita di validarne la "credibilità", cosa non sempre semplice, ad esempio per quanto riguarda modelli raggruppabili sotto la definizione generica di "fenomenologici" (ovvero modelli statistici e di *machine learning*), che necessitano di essere "ritestati" periodicamente per confermarne l'attendibilità.

A dispetto di queste criticità si è giunti alla simulazione di veri e propri studi clinici "in silicio" che potrebbero nel tempo aiutare ad applicare il principio delle 3R non solo in ambito di sperimentazione animale, ma anche di quella umana nei *clinical trials*.

CAPITOLO 1

RUSSEL E BURCH: IL PRINCIPIO DELLE 3R

Nel 1954 la UFAW (Universities Federation of Animal Welfare)¹ assunse due giovani scienziati, lo zoologo William Russell e il microbiologo Rex Burch, per effettuare uno studio sul trattamento riservato agli animali impiegati nell'ambito della sperimentazione. I due visitarono diversi laboratori del Regno Unito negli anni a seguire, pubblicando poi nel 1959 un libro intitolato "The Principles of Humane Experimental Technique", che riassume i risultati delle osservazioni effettuate, introducendo il concetto delle "3Rs": Replacement (Sostituzione), ossia l'utilizzo di materiale non-senziente, Reduction (Riduzione), o meglio la diminuzione del numero di vertebrati impiegati, Refinement (Perfezionamento), ovvero la riduzione del disagio provato dagli organismi adoperati [9].

Il fulcro della definizione delle 3 R si basa su due concetti fondamentali; quello di "umanità" e il suo opposto, la "disumanità". Per quanto sia il primo ad essere l'obiettivo della Sostituzione, della Riduzione e del Perfezionamento; esso viene considerato raggiungibile diminuendo e, quando possibile, abolendo la disumanità.

I due studiosi utilizzano questi termini per delineare un *modus operandi* il cui fine ultimo risiede nel trattamento più etico possibile degli animali (nello specifico dei vertebrati), ma tale risultato non deriva da una riflessione di tipo morale e prescrittiva, si limita a fornire delle linee guida operative che siano spendibili nella pratica effettiva di laboratorio; infatti le due espressioni, di cui sopra, si riferiscono a degli aspetti oggettivamente verificabili e misurabili.

Per definire operativamente il concetto di disumanità senza fare in alcun modo riferimento alla problematica nozione di "coscienza" Russell e Burch stabiliscono che il trattamento disumano genera proporzionalmente *distress*² negli animali che lo subiscono.

Il vocabolo "distress" risulta allora caricato di molteplici significati poiché descrive gli stati mentali sgradevoli sperimentabili dagli animali da laboratorio: essi sono rappresentati *in primis* da dolore e paura, ma non sono da questi esauriti. La categoria di "distress", allora, potrebbe sembrare più ampia del necessario, ma il bisogno di accogliere stati mentali tra loro molto differenti per intensità e sgradevolezza discende dalla considerazione, fatta dagli autori, che

¹ Fu fondata nel 1926 da Charles Westley Hume, un pioniere del movimento per la protezione e il benessere degli animali, col nome di ULAWS (University of London Animal Welfare Society) e rinominata in seguito UFAW.

² Tanto più il trattamento è disumano, maggiore sarà il "distress" generato nell'essere vivente coinvolto.

non sempre gli esseri viventi esprimono quanto provano in determinate situazioni in modo immediatamente comprensibile all'osservatore umano poiché abituati a rimanere calmi di fronte alla promessa di un compenso che riceveranno, perché incapaci di manifestare in modo intelligibile quanto provino o per altre ragioni, tuttavia tali stati emotivi non sono influenti e, soprattutto, devono essere tenuti in considerazione in ogni riflessione che si intenda occupare del benessere degli animali. Per tale ragione il concetto di *distress* accoglie al proprio interno tutta una serie di condizioni mentali spiacevoli anche differenti tra loro.

Inoltre, gli autori non vogliono limitare la disumanità ai tipi specifici di sofferenza discussi in *The Principles*, ma ampliare la nozione a qualsiasi situazione di disagio avvertibile dagli animali da laboratorio, la cui riduzione (o, auspicabilmente, eliminazione) diventa il fine ultimo dell'applicazione delle 3 R. Infatti, col diminuire progressivo della sofferenza e, quindi, della disumanità, un esperimento o una procedura risultano via, via più "umane" [11].

Un'altra importante distinzione viene fatta tra il concetto di disumanità diretta e disumanità contingente. La prima è definita come l'inflizione di uno stato di sofferenza in quanto conseguenza inevitabile della procedura messa in atto, la seconda come l'inflizione involontaria e accidentale di uno stato di sofferenza durante la procedura, non necessaria per la riuscita della stessa. La disumanità contingente risulta sempre dannosa per il buon esito dell'esperimento e può essere limitata, fin'anche all'eliminazione, tramite pratiche diligenti di cura, trattamento e buon senso; mentre la disumanità diretta, essendo inevitabile, può solo essere discussa in termini di incidenza, gravità e in base alle caratteristiche specifiche legate alla particolare procedura [1].

In relazione al livello di umanità, i due autori giungono alla conclusione che un trattamento più umano possibile degli animali coinvolti nella sperimentazione, lungi dall'essere un ostacolo, risulta piuttosto essere un prerequisito necessario per il successo della stessa [3].

Un'ulteriore discussione rimarchevole viene fatta da Russell e Burch riguardo al benessere (e non alla semplice assenza di sofferenza e disumanità) animale. Si tratta di un breve passaggio che non viene ripreso altrove nel libro, ma, considerando il fatto che molte definizioni moderne di trattamento etico degli animali contengono il concetto di "benessere" senza che la nozione stessa abbia un significato universalmente riconosciuto, risulta rilevante specificare che gli autori identificano il benessere animale come fine ultimo del trattamento più "umano" degli animali, limitandosi, però, ad esprimersi esclusivamente sull'assenza di sofferenza e disumanità come obiettivo delle 3R per la maggior parte del libro e non spingendosi a definire con precisione cosa si intenda per "benessere" [11].

In *The Principles* si arriva dunque alla conclusione che la Sostituzione sia sempre una via apprezzabile ma, dove possibile, le si dovrebbero affiancare la Riduzione e il

Perfezionamento [1].

RIDUZIONE

La Riduzione viene definita in *The Principles*: “Reduction in the numbers of animals used to get information of a given amount and precision”³ [1, p. 41], implicando la necessità di identificare il numero di animali necessari al raggiungimento di risultati statisticamente rilevanti [3]. Grazie all’analisi della potenza si può calcolare la numerosità campionaria richiesta per ottenere una determinata probabilità di rifiutare correttamente l’ipotesi nulla. Il numero di animali essenziali per ottenere una potenza statistica dell’80% (ovvero l’ottenimento di un risultato statisticamente rilevante nell’80% dei casi, quando l’ipotesi nulla testata risulta essere falsa) è necessario e considerato dunque eticamente accettabile secondo il principio delle 3R [10]. Una ragione per cui Russell e Burch non includono il concetto di minimizzazione del numero di animali coinvolti nella sperimentazione nella definizione di Riduzione, si trova nel conflitto tra la necessità di limitare la sofferenza individuale del singolo animale e la somma totale di sofferenza provata da tutti gli animali. In una sperimentazione la riduzione al minimo del numero totale di animali coinvolti può portare all’aumento della sofferenza provata dal singolo e quindi non rivelarsi la scelta più “umana” [11].

L’approccio contemporaneo alla Riduzione si focalizza principalmente sull’assicurare la riproducibilità degli esperimenti effettuati. Ad esempio, per sostenere i ricercatori nella comunicazione dei risultati raggiunti e la progettazione stessa della sperimentazione necessaria al loro conseguimento, la NC3Rs⁴ ha creato uno strumento di supporto, l’EDA (*Experimental Design Assistant*), in grado di facilitare la realizzazione di studi con esiti riproducibili. Un altro fattore fondamentale nella Riduzione è la condivisione dei dati raccolti, in modo da ridurre la necessità di ulteriori studi e sperimentazioni animali [4].

PERFEZIONAMENTO

In *The Principles* il Perfezionamento viene definito: “any decrease in the incidence or severity of inhumane procedures applied to those animals that still have to be used”⁵, sottintendendo di fatto la precedente applicazione delle altre due R [1, p. 41]. Nella pratica ciò

³ “La riduzione del numero di animali utilizzati per ottenere informazioni con un livello di precisione prestabilito” (*traduzione mia*).

⁴ La *National Centre for the Replacement, Refinement and Reduction of Animals in Research* (NC3Rs) è un’organizzazione inglese con l’obiettivo di ridurre il numero di animali utilizzati nella ricerca scientifica [2].

⁵ “Qualsivoglia diminuzione dell’incidenza e dell’intensità delle procedure disumane applicate sugli animali che comunque necessitano di essere utilizzati” (*traduzione mia*).

si traduce nel migliorare le condizioni di vita e la sistemazione degli animali in laboratorio, in modo da aumentare il loro benessere e l'attendibilità degli studi compiuti su di essi; per questo è importante conoscere le necessità delle diverse specie trattate, in modo da assicurarsi risultati più affidabili [10]. Infatti, lo stress e il malessere possono portare a squilibri ormonali che, a loro volta, possono risultare in fluttuazioni notevoli dei risultati. Ciò comporta la necessità di ripetere più volte gli stessi esperimenti, aumentando dunque il numero di animali coinvolti in essi, contro il principio della Riduzione. Per questo il Perfezionamento risulta essere indispensabile non solo per ottimizzare le condizioni di vita degli animali, ma anche la qualità della ricerca [5].

Per valorizzare la qualità della vita diventa quindi rilevante l'habitat degli animali, migliorabile attraverso l'arricchimento ambientale, tramite oggetti che possano renderlo più complesso o che gli animali possano utilizzare. Altre forme di arricchimento possono essere quello nutrizionale, la stimolazione sensoriale e spazi che permettano l'esercizio fisico.

Inoltre, è importante ridurre al minimo l'invasività delle procedure applicate: tecniche moderne come l'MRI, la PET, gli ultrasuoni e l'imaging ottico riducono drasticamente la necessità di uccidere gli esemplari oppure condurre biopsie per ottenere campioni in vivo, in modo da monitorare cambiamenti molecolari e/o cellulari in maniera non invasiva. L'applicazione sistematica di queste procedure ha fatto sì che il numero di animali richiesti sia diminuito nel tempo [10].

Un potenziale problema può presentarsi a causa dello stress derivato da ripetute sedazioni, ma risulta ovviabile con tecniche di PRT (*positive reinforcement training*), in modo da aumentare la cooperazione degli animali e ridurre la necessità di sedazione [4].

SOSTITUZIONE

La definizione di Sostituzione in *The Principles* risulta essere: “any scientific method employing non-sentient material which may in the history of experimentation replace methods which use conscious living vertebrates”⁶ [1, p. 42].

Russel e Burch fanno una distinzione tra sostituzione assoluta, che implica la totale assenza di vertebrati nella sperimentazione, e sostituzione relativa, dove sono comunque richiesti animali, ma essi vengono esposti a un livello di sofferenza estremamente ristretto o addirittura inesistente [1]. Questa distinzione sottolinea che, nella definizione originale, il principio di Sostituzione non implica per forza il non utilizzo di animali, né intende creare una

⁶ “Qualsiasi metodo scientifico che utilizzi materiale non-senziente che possa nel corso della sperimentazione sostituire metodi che si avvalgano di vertebrati viventi e coscienti” (*traduzione mia*).

gerarchia tra le forme di vita, si limita, infatti, solo a considerare il livello di coscienza e il fatto di essere senziente o meno, oltre al grado di sofferenza sperimentabile e sperimentata.

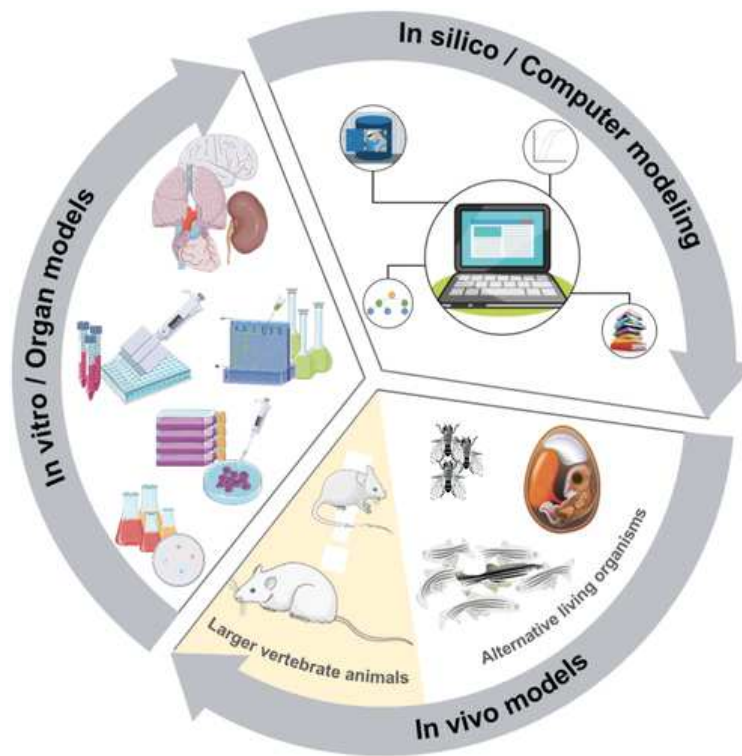
Che il fine principale della Sostituzione non sia l'eliminazione dell'utilizzo di animali, ma della sofferenza da essi potenzialmente provata, è inoltre evidente negli esempi utilizzati per definire la sostituzione relativa: vengono citati esperimenti ad esito letale in cui gli animali sottoposti al trattamento sono sotto anestesia per tutto il tempo; altri ad esito non letale, sempre sotto anestesia rigorosamente dosata e programmata ed esperimenti dove gli animali vanno incontro ad eutanasia prima di essere sottoposti alle pratiche previste. Tutte le casistiche risultano prive di disumanità, così come definita in *The Principles*, pur aprendo un dibattito morale non indifferente [11].

Recentemente, l'utilizzo di tecnologie moderne ha permesso di effettuare esperimenti che non sarebbero stati possibili impiegando i classici modelli animali (ad esempio, con il miglioramento dei metodi computazionali e dei modelli matematici, si sono aperte diverse strade per ottimizzare studi nutrizionali e metabolici su larga scala che precedentemente avrebbero richiesto esperimenti in vivo con risultati meno accurati). È vero che l'utilizzo di tecniche di Sostituzione può inizialmente portare ad un aumento del numero di animali adoperati per assicurare la validità scientifica del metodo, ma questo accrescimento può essere giustificato con la riduzione che dovrebbe derivarne in seguito. Inoltre, anche dal punto di vista economico, si possono riscontrare dei vantaggi derivati dai costi ridotti dei metodi alternativi rispetto al corrispettivo utilizzo di animali e, ulteriormente, si può apprezzare la velocità dei risultati ottenibili [4].

METODI ALTERNATIVI

In *The Principles* non compare una definizione di “metodi alternativi” o “alternative”, non essendo questo termine utilizzato nemmeno nella spiegazione di cosa intendano gli autori per Sostituzione. È David H. Smyth nel 1978 a proporre una rifacendosi in parte al principio delle 3R, nel suo libro “*Alternatives to Animal Experiments*”: “all procedures which can completely replace the need for animal experiments, reduce the numbers of animals required, or diminish the amount of pain or distress suffered by animals in meeting the essential needs of man and other animals.”⁷ [7]

⁷ “Tutte le procedure che possono sostituire completamente il bisogno di esperimenti sugli animali, ridurre il numero di animali necessari, o diminuire la quantità di dolore e sofferenza provata dagli animali nell'adempiere alle esigenze dell'uomo e di altri animali” (*traduzione mia*).



L'inserimento di colture cellulari in vitro, modelli di tessuti e organismi, modelli computerizzati e strumenti bioinformatici può portare alla riduzione sostanziale degli animali utilizzati a scopi scientifici. Ulteriori vantaggi evidenziati dall'applicazione di queste viabili alternative sono il risparmio di tempo, denaro e manodopera umana.

L'Unione europea, seguendo la direttiva 2010/63/EU⁸, porta avanti la coordinazione e la promozione dello sviluppo e l'impiego di metodi alternativi tramite la EURL ECVAM (*European Union Reference Laboratory for alternatives to animal testing*) [8].

In Vitro Cells/Tissue/Organ Models

I modelli in vitro permettono di studiare la risposta molecolare e/o cellulare in un sistema chiuso, dove le condizioni sperimentali sono mantenute statiche. Includono diversi tipi di colture (cellulari in 2D, tissutali e di organi) utili per i test preliminari di tossicità e possibili reazioni di contatto con elementi chimici e materiali. Non solo sono facili da effettuare, poco dispersivi in termini di tempo e meno costosi, ma, in alcuni casi, sono anche modelli più accurati di quelli animali perché più vicini biologicamente e genericamente all'essere umano che all'equivalente animale. Inoltre, i modelli 3D di coltura cellulare, che rappresentano in maniera

⁸ La direttiva 2010/63/EU esplicita la legislazione vigente riguardante la protezione degli animali utilizzati a scopi scientifici e rappresenta uno degli standard etici e di benessere animale più elevati al mondo.

più completa tessuti e organi, permettono l'interazione tra cellule di diverso tipo sia con la matrice extracellulare che con altri organi, consentendo quindi lo studio di risposte biologiche ben più eterogenee [8], per quanto non possano sostituire del tutto i modelli in vivo in grado di comprendere sistemi e percorsi biologici troppo tortuosi per essere riprodotti in vitro [3].

Sono stati ricostruiti modelli 3D con complessità (e conseguente predittività) differenti per la riproduzione di unità funzionali di diversi organi umani, permettendo la costruzione di modelli di vasi sanguigni, ossa, pelle, cartilagine, muscoli e, perfino, del cervello [8]. Una delle alternative più notevoli sono i cosiddetti OOC (*Organs on Chips*), ovvero sistemi biomimetici microingegnerizzati che contengono canali microfluidici composti da cellule umane, capaci di riprodurre la fisiopatologia delle unità funzionali di organi viventi in vitro [3].

Alternative Organisms

Tre specie importanti che hanno portato a risultati sostanziali negli ambiti della biologia cellulare e nella genetica sono il nematode *C. elegans* (ad es. apoptosi, genetica dello sviluppo) il microorganismo *S. cerevisiae* (ad es. malattie mitocondriali, sequenziamento del genoma, invecchiamento) e il moscerino della frutta *D. melanogaster* (ad es. mutazioni, screening tossicologico, biologia dello sviluppo) [3].

Gli organismi alternativi più comunemente impiegati si possono raggruppare in tre categorie [8]:

1. Microorganismi

Un esempio di microorganismo è il lievito *Saccharomyces Cerevisiae*, spesso adoperato per il fatto che possiede un sistema genetico ben definito e una crescita estremamente rapida, oltre ad un sistema di trasformazione del DNA molto versatile. Inoltre, possiede un'architettura e ciclo vitale cellulare simile a quello di organismi eucarioti multicellulari. I numerosi organelli presenti mimano, in aggiunta, le funzioni delle cellule di mammifero. Questo microorganismo è utilizzato per comprendere l'apoptosi, i regolatori della stessa negli esseri umani ed è molto utile nella ricerca sul cancro. Risulta adeguato anche per lo studio di alcuni aspetti fondamentali della biologia cellulare in malattie neurodegenerative come l'Alzheimer, il Parkinson e la malattia di Huntington [5].

2. Invertebrati

Tra le ragioni che favoriscono l'impiego degli invertebrati nella sperimentazione troviamo il ridotto ciclo di vita, le dimensioni ristrette e l'anatomia piuttosto semplice. Il costo del loro mantenimento, soprattutto se comparato con quello degli animali da

laboratorio, risulta decisamente meno oneroso [5]. Non avendo un sistema immunitario adattivo però, presentano dei limiti nello studio di determinate patologie [8]. A scapito di ciò sono stati utilizzati per indagare malattie come il Parkinson, la distrofia muscolare, il diabete o processi come la guarigione di ferite, l'invecchiamento cellulare, l'apoptosi e, inoltre, la biologia retrovirale.

Un primo esempio di invertebrato lo ritroviamo nella *Drosophila Melanogaster*. Questo organismo ha un genoma ormai molto noto che permette lo studio di meccanismi molecolari alla base di diverse patologie umane [5]. Infatti, quasi il 75% dei geni coinvolti in malattie umane presentano un omologo funzionale nel moscerino della frutta. Oltretutto la *Drosophila* presenta quattro stadi della vita, ciascuno utile per approfondire diversi ambiti, a partire dall'organogenesi nell'embrione (prima fase) fino alle funzioni di vari organi nell'insetto adulto [8]: la risposta di questo moscerino a sostanze farmacologiche agenti sul sistema nervoso centrale si sono infatti rivelate simili a quelle osservate in diversi mammiferi. Risulta per queste ragioni un ottimo mezzo per investigare malattie neurodegenerative come l'Alzheimer, il Parkinson e la malattia di Huntington, avvalendosi della sofisticata genetica che lo caratterizza [5].

Un altro valido esempio lo si ritrova nel nematode *Caenorhabditis Elegans*. Questo organismo multicellulare rappresenta un intermediario tra i test in vitro e la sperimentazione su animali più complessi. A sua volta, risulta rilevante nello studio di diverse malattie neurodegenerative, affiancate anche dalle neoplasie e dal diabete ed è stato infatti utilizzato nella sperimentazione per il trattamento di queste patologie.

3. Vertebrati Inferiori

Un vertebrato molto in voga nell'ambito sperimentale è il *Danio Rerio*, comunemente chiamato pesce zebra. Uno dei motivi della sua popolarità è la trasparenza del corpo negli stadi iniziali dello sviluppo, caratteristica che permette un'osservazione diretta sia di quest'ultimi che dell'espressione genica. Inoltre, essendo disponibile il suo genoma completamente sequenziato, risulta essere un'utile possibilità nella ricerca sulle neoplasie, malattie cardiache, malfunzionamenti neurologici, per osservare mutazioni e altri problemi durante lo sviluppo degli organi in seguito all'esposizione a determinati composti. Ha un'applicazione molto vasta soprattutto nei test tossicologici di sostanze chimiche e farmaceutiche [8].

Computer Models

Affiancando gli approcci in vitro e in vivo, i Computer forniscono un ottimo strumento per meglio comprendere diversi meccanismi biologici [8].

La quantità di informazioni e di dati che può essere immagazzinata e analizzata grazie ai progressi dell'informatica a partire dalla metà degli anni Novanta del Novecento, ha permesso la crescita di banche dati online di ogni genere e, grazie a quelle di tipo genetico e proteico, attualmente è molto semplice avere a disposizione la struttura primaria di sostanze di interesse biologico nell'uomo e in diverse specie animali, oltre ad una notevole quantità di strutture 3D sulle quali sperimentare al computer. La disponibilità di modelli tridimensionali permette di portare avanti esperimenti di interazione molecolare di tipo sia statico che dinamico, attraverso tecniche di *docking molecolare* [12].

Inoltre, modelli specializzati e programmi software favoriscono la creazione di nuovi medicinali, così come simulazioni computerizzate possono essere utilizzate per predire la possibile risposta biologica e gli effetti tossici di una specifica sostanza chimica o farmacologica senza avvalersi di dissezione animale. In questo modo, solo le molecole più promettenti vengono poi impiegate in sperimentazioni in vivo. Ad esempio, i software CADD (*Computer Aided Drug Design*), raggruppabili in due categorie, gli SBDD (*structure based drug design*) e gli LBDD (*ligand based drug design*), permettono di predire il sito di legame per una molecola, consentendo dunque la creazione di farmaci per il sito di legame specifico che necessitano di essere testati su animali solo nella fase finale per ottenere risultati di conferma; riducendo in questo modo il numero di animali necessari e favorendo l'applicazione dei principi delle 3R di Russel e Burch [5].

I metodi più popolari tra gli LBDD sono i modelli detti QSAR (*quantitative structure-activity relationship*)⁹ che, insieme ai modelli PBK (*physiologically based kinetic*) e gli approcci read-across, forniscono degli esempi di metodi computazionali impiegati negli IATA (*Integrated Approaches to Testing and Assessment*)¹⁰ per la generazione, interpretazione e l'integrazione di dati [9].

Il computer modelling, pur essendo limitato nella capacità di circoscrivere l'utilizzo di animali nella ricerca, fornisce delle risposte preliminari importanti da affiancare all'utilizzo di

⁹ Cfr. p. 13 di questo scritto.

¹⁰ Utilizzati per la valutazione della sicurezza di sostanze chimiche, i principi su cui si basano sono stati definiti dalla OECD (Organization for Economic Cooperation and Development) con l'obiettivo di modificare la tradizionale valutazione basata su modelli animali. La OECD distingue inoltre gli IATA, che includono un elemento di soggettività dipendente dal giudizio non formalizzato di esperti, dai DAs (Defined Approaches) ovvero approcci formali impiegati per generare delle previsioni sfruttabili nei metodi IATA [6].

altre metodologie e, come menzionato sopra, può in tal modo favorire l'applicazione del principio di Riduzione [3].

CAPITOLO 2

IN SILICO TOOLS IN TOXICOLOGY

La sperimentazione animale risulta sicuramente rilevante in diversi ambiti, trovando risvolti particolarmente utili nel settore biomedicale, soprattutto per quanto concerne la sperimentazione farmacologica (*drug testing*) e gli studi di tossicologia (*toxicology testing*), proprio in ragione di tale capacità esemplificativa nella seguente trattazione ci si intende focalizzare su aspetti pertinenti queste due sfere in modo da evidenziare le potenzialità più interessanti.

L'obiettivo della tossicologia risiede nello studio delle potenziali reazioni avverse di una sostanza chimica su organismi viventi, in base a diversi fattori quali lo stadio di sviluppo, lo stato di salute e la genetica degli stessi.

L'abilità di una sostanza chimica di suscitare un determinato effetto è strettamente correlata alla sua concentrazione nel tempo in un determinato sito e al suo profilo di attività intrinseco. In alcuni casi si possiedono svariati dati circa gli effetti che determinate sostanze generano, in base alle specie e sotto specifiche condizioni di esposizione, ma, allo stesso tempo, non esistono mappature tanto esaustive da fornire risposte per qualsiasi scenario di esposizione o qualsivoglia specie che potrebbe esservi esposta. Considerando la variabilità delle possibili tempistiche di esposizione (con un'ampia gamma che può spaziare da una volta nella vita a più volte consecutivamente) e della concentrazione delle varie sostanze e composti chimici, la valutazione della sicurezza chimica non può essere messa in pratica solo tramite test: diventano dunque essenziali i metodi predittivi.

Non essendo possibile sostituire completamente una sperimentazione su modello animale con un modello non animale, nasce il bisogno di avvalersi di una pletora diversificata di metodi alternativi. Ogni metodo, infatti, possiede la capacità di fornire informazioni differenti che, unificate, danno modo di creare una comprensione meccanicistica e completa di come una sostanza chimica possa interagire con un sistema biologico fino a causarvi una perturbazione e una risposta apicale.

Tradizionalmente i modelli in silicio sono stati ampiamente utilizzati durante i test tossicologici per assicurarsi che solo le sostanze con buona speranza di dare risultati positivi passassero alla fase di sperimentazione animale, per evitare abbandoni in fase di sperimentazione oppure ritiri dal mercato. Gli approcci IATAs confrontano e uniscono informazioni da un variegato ventaglio di fonti per stabilire se esistano abbastanza dati per

procedere, oppure ci sia la necessità di indirizzare studi futuri per colmare dei vuoti di conoscenza. I DAs invece, usano un protocollo di interpretazione dei dati che permette di utilizzare informazioni provenienti da un set specifico di fonti, per assistere il processo di *decision-making*. Accostando i dati sull'assorbimento, la distribuzione, il metabolismo e l'escrezione (ADME) contemporaneamente a quelli sulla loro attività (pericolo e/o tossicità) si può raggiungere una previsione realistica della possibilità che una sostanza mostri degli effetti in vivo.

Ci sono diversi strumenti in silicio disponibili per predire le caratteristiche ADME (basate sull'esposizione interna) e l'attività (tossicità) di una sostanza.

Unendo le proprietà intrinseche, le potenziali interazioni e gli effetti dipendenti dalla struttura molecolare, è possibile sviluppare dei modelli di relazione tra la struttura e l'attività della sostanza: i modelli QSARs (quantitative structure–activity relationship)¹¹.

In aggiunta a ciò, tali modelli sfruttano il fatto che sostanze chimiche simili producono effetti simili per predire le caratteristiche di molecole che hanno tratti comuni: la conoscenza di una sostanza o un gruppo di sostanze può essere utilizzata come riferimento per tali predizioni. Esistono dei limiti a questo tipo di approccio, per esempio il grado di accuratezza con cui possono essere descritte le differenze tra molecole a livello strutturale e il ruolo di fattori che possano influenzare (aumentando o attenuando) il loro tenore di attività [15].

Nell'ambito delle nanoparticelle sono state sviluppate diverse tecniche computazionali per studiare la nanotossicità eludendo il più possibile i test su animali. Ad esempio, *database* nano-specifici vengono utilizzati per la valutazione del rischio mentre le proprietà fisicochimiche e strutturali vengono studiate tramite metodi di *docking* molecolare, *QSAR modeling* e simulazioni di dinamica molecolare [14].

Alcuni dei vantaggi riscontrati rispetto ai test in vivo e in vitro sono: la potenziale riduzione o sostituzione dell'uso di animali nei test tossicologici, il fatto che i metodi in silicio siano meno costosi, l'efficienza temporale (numeri elevatissimi di composti possono essere testati contemporaneamente e in modo più veloce), la facilità di standardizzazione (mancante nei corrispondenti test in vivo, innatamente legati ad una non ovviabile variabilità biologica), la prevenzione dell'utilizzo di sostanze categorizzate come altamente tossiche, la possibilità di studiare sostanze altamente insolubili e di predire il rischio di ecotossicità e l'eliminazione del rischio di esposizione dello staff di laboratorio.

Allo stesso tempo, l'impiego di queste metodologie include diversi svantaggi, tra cui la necessità di essere in grado di contestualizzare e interpretare i risultati ottenuti, il forte impatto

¹¹ Cfr. p. 13 di questo scritto.

della qualità dei dati utilizzati che possono compromettere gli esiti, la difficoltà degli algoritmi utilizzati che possono dimostrarsi non accessibili a personale non esperto, il dominio di applicabilità dei risultati può non essere del tutto chiaro e infine il fatto che i metaboliti dei composti vengano spesso trascurati. Dispetto questi possibili problemi, l'utilizzo di metodi in silicio in campo tossicologico offre certamente una via affinché la sperimentazione animale si avvicini in futuro al diventare obsoleta [13].

Data Quality Assessment

Come precedentemente menzionato, la qualità dei dati risulta essere un punto critico perché ogni modello è considerato affidabile nella misura in cui lo sono i dati su cui è costruito. Con il concetto di "qualità" si vuole indicare il grado di affidabilità e di rilevanza dei dati con una soglia che possa venir considerata accettabile. È necessario tenere a mente, per la trattazione che qui si svolge, che i dati di derivazione biologica sono innatamente variabili e questo pone un limite all'accuratezza dei modelli predittivi.

Associati al significato di qualità dei dati si ritrovano diversi termini il cui significato risulta rilevante nell'analisi della stessa:

Pertinenza - È un aspetto della qualità dei dati relativo all'oggetto dell'indagine. La pertinenza denota la rispondenza tra informazione prodotta e necessità informative dell'utente.

Affidabilità - Il termine si riferisce alla fonte, allo strumento, al metodo, alla procedura, ecc. È quindi affidabile una procedura dalla quale si ottengono dati di qualità costante o poco variabile in ripetute applicazioni della stessa sotto identiche condizioni.

Accuratezza - Il termine accuratezza, nell'accezione più generale, esprime la vicinanza di un valore rilevato al corrispondente valore reale.

Validità – Riferito al dato statistico, validità del dato significa rispondenza dello stesso ai fini della ricerca messa in atto.

I criteri più utilizzati per classificare la qualità dei dati sono quelli di Klimisch, essi suddividono in quattro categorie il tipo di dati: affidabile senza restrizioni, affidabile con restrizioni, inaffidabile, non categorizzabile (per mancanza di informazioni).

Ad esempio, la qualità dei dati usati per costruire o valutare un modello QSAR è determinante per la qualità del modello e la predizione di affidabilità dello stesso, per questo sono necessarie delle precauzioni come la valutazione dell'accuratezza, affidabilità e pertinenza, usando fonti primarie dove possibile [15].

Databases

Essendo cresciuta in modo esponenziale la velocità di espansione della conoscenza scientifica, per sfruttare al meglio le informazioni accumulate, è emersa la necessità di renderle accessibili al pubblico. Questo ha portato alla rapida diffusione di diversi *database*, spesso accessibili gratuitamente, che sono in grado di fornire dati su milioni di sostanze diverse. Sussiste ad oggi un dibattito sulla appartenenza o meno di questi ultimi alla categoria di metodi in silicio; tuttavia, il loro utilizzo è essenziale nella ricerca sulle sostanze chimiche e nello sviluppo e valutazione di diversi modelli. Infatti, se ci sono abbastanza dati adeguati, si annulla la necessità di fare ulteriori test o predizioni.

Generalmente è meglio usare dati sperimentali ottenuti *ad hoc*, piuttosto che predetti; nel caso di insufficienza di dati a disposizione però diventa possibile fare predizioni tramite quelle esistenti per altre sostanze (come nel caso dei metodi QSAR e read-across).

I vari Database possono essere cercati usando una serie di identificatori:

- nome
- stringa *SMILES* (*Simplified Molecular Input Line Entry System*)
- codice hash derivato dall'*International Chemical Identifier*
- numero di registrazione

Alcuni *database* inoltre offrono la possibilità di cercare sostanze chimiche simili a quella d'interesse usando l'impronta chimica e/o le proprietà fisicochimiche. Degli oltre 900 *database* identificati e raggruppati in base alle informazioni disponibili e alla loro accessibilità, tra i più famosi a libero accesso possiamo ricordare *OCHEM*, *QSAR Toolbox*, *PubChem (US)* e *EMBL-EBI/ChEMBL* (Europe) [15].

Quantitative Structure-Activity Relationship (QSAR)

Il *QSAR modeling* è un metodo computazionale i cui modelli sono sviluppati tramite relazioni empiriche, lineari o non-lineari, tra descrittori chimici, calcolati a partire dalla struttura molecolare e dalle proprietà misurate sperimentalmente o dalla bioattività delle molecole stesse. A questi descrittori segue l'applicazione dei suddetti modelli per predirne il comportamento o progettare nuove sostanze chimiche con determinate proprietà desiderate. Sebbene storicamente il *QSAR modeling* sia stato considerato un approccio piuttosto utile, molti studiosi lo considerano ancora limitato nelle capacità di modellazione e predizione della bioattività e delle proprietà delle sostanze [16].

Dal 1962, col lavoro di Hansch e dei suoi collaboratori, la relazione quantitativa struttura-attività (QSAR) è stata appunto utilizzata per dimostrare la relazione quantitativa tra

le proprietà di interesse per una sostanza chimica e i descrittori derivati dalla sua struttura molecolare. Questi modelli sono stati impiegati per predire l'(eco)tossicità e la *drug potency* delle sostanze, ma anche le proprietà fisico-chimiche (*quantitative structure-property relationship*-modelli *QSPR*).

Il *QSAR modeling* si basa su tre requisiti fondamentali:

1) La necessità di misure quantitative (*quantitative measures*) delle proprietà della sostanza che dev'essere modellata (*endpoint values*) per una serie di sostanze correlate. Gli *endpoints* includono l'attività biologica/tossicità (ad es. la dose letale per il 50% degli organismi campione (LD50) e la concentrazione tale da produrre il 50% dell'effetto massimale (EC50)), i parametri ADME (ad es. % HIA) o le proprietà fisico-chimiche (ad es. punto di fusione).

2) Il dover produrre/ottenere descrittori derivati dalla conoscenza della struttura della serie di sostanze utilizzate per generare il modello. Un descrittore spesso adoperato è il logaritmo del coefficiente di ripartizione ottanolo/acqua (logP), impiegato per indicare la lipofilia/idrofilia delle sostanze e, inoltre, dimostratosi connesso alla capacità delle stesse di attraversare membrane biologiche e raggiungere il sito d'azione. Altri tipi di descrittori includono quelli relativi alle dimensioni e alla forma (volume molare, peso molecolare, ...) o all'effetto elettrico (*Ehomo-Energy of the Highest Occupied Orbital*, *Elumo- Energy of the Lowest Unoccupied Orbital*, momento del dipolo, ...).

3) Una tecnica statistica adottata per dimostrare la correlazione tra l'attività (ad es. tossicità) e i valori del descrittore. I metodi statistici utilizzati sono diversi, dalla regressione lineare semplice (dove un unico descrittore è associato con l'attività) a quella multipla (dove vengono sfruttati differenti descrittori).

Prendendo ad esempio il modello per la penetrazione cutanea di Potts e Guy, si ha:

$$\log K_p = 0.71 \log P - 0.0061 M W_t - 6.3$$

$$r^2 = 0.67$$

$$n = 93$$

Dove $M W_t$ è il peso molecolare, K_p il coefficiente di permeabilità cutanea (proprietà indagata) e n il numero di sostanze.

K_p dimostra una correlazione positiva con $\log P$ e negativa con il peso molecolare. Il quadrato del coefficiente di correlazione (coefficiente di variabilità) r^2 indica la variabilità della proprietà di interesse (K_p) rispetto ai descrittori ($\log P$ e $M W_t$).

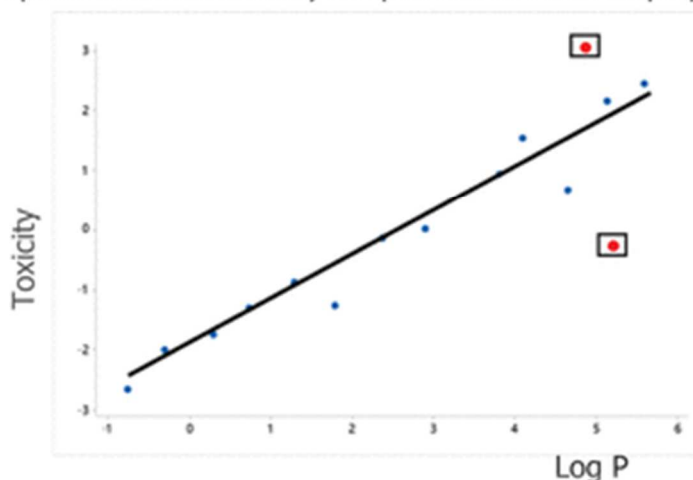
Confrontando un singolo descrittore con una proprietà di interesse, un r di valore 1 dimostra correlazione positiva perfetta, -1 correlazione negativa perfetta. Un valore attorno allo 0.7 è spesso considerato un valore soglia per decretare utile un modello. È importante ricordare però che un valore uguale ad 1 risulta piuttosto irrealistico da ottenere e il valore di r dipende fortemente dal tipo di dati a disposizione, data l'innata variabilità sperimentale in ambito biologico.

Una volta che un modello QSAR attendibile è stato creato con un *data set* di addestramento (*training set data*), si può testare la predittività del modello per sostanze al di fuori dell'insieme di allenamento. Il valore r^2_{cv} (*cross validated*) è ottenuto trattenendo parte dell'insieme di addestramento durante la costruzione del modello (validazione interna) oppure usando un *data set* esterno (validazione esterna). Un valore attorno al 0.6 è frequentemente considerato utile, per quanto non sia da considerarsi una regola ferrea, per i motivi sopra riportati.

I modelli possono essere utilizzati per formulare delle predizioni riguardanti le sostanze che appartengono al dominio di applicabilità del modello. Gli *outliers* (valori erratici, ovvero quelle sostanze che sono malamente descritte dal modello) richiedono studi a parte. Essi possono indicare la presenza di meccanismi alternativi di azione nei processi, non presi in considerazione dal modello, oppure che uno o più valori sono errati (nel qual caso non andrebbero considerati).

In statistica vige il principio che correlazione e causalità non siano la stessa cosa. Se c'è correlazione tra descrittori e proprietà, ciò non implica necessariamente che una modifica di uno dei due porti una modifica dell'altro. Una relazione causale ha bisogno di essere dimostrata, considerando che la correlazione potrebbe essere derivata da qualche fattore esterno. La mala interpretazione della differenza tra causalità e correlazione e il tentativo di ottenere predizioni per sostanze al di fuori del dominio di applicabilità sono tra le ragioni più diffuse per cui si crede che i modelli QSAR "falliscano". Con le dovute accortezze, tuttavia, questi modelli possono fornire una maggiore comprensione dei meccanismi di azione e procurare predizioni utili laddove possano mancare *endpoint data* per certe sostanze [15].

- QSARs are mathematical relationships between physico-chemical or structural descriptors of a series of chemicals and their activity (toxicity).
- Chemicals used to build a QSAR should ideally have the same mechanism of action.
- A QSAR can only be used to make predictions for chemicals that fall within its applicability domain (the region of chemical structural/property space covered by the model).
- The OECD principles for the validation of QSARs specify that QSARs should be associated with (i) a defined endpoint, (ii) an unambiguous algorithm, (iii) robust statistics, (iv) a defined applicability domain and (v) be mechanistically interpretable – where possible.
- Many existing QSARs have not undergone formal validation but can provide useful predictions provided their suitability for specific chemicals and purposes is ascertained.



□ Outliers – poorly fit to model, therefore maybe excluded

An example QSAR using one descriptor (log P) that shows a positive correlation with toxicity:

$$\text{Toxicity} = 0.75 \text{ Log P} - 2.00$$

$$n = 13 \quad r^2 = 0.95$$

n = no of chemicals used in the model (i.e. 13); $r^2 = 0.95$ indicates 95% of variability in model is explained by the variation in log P

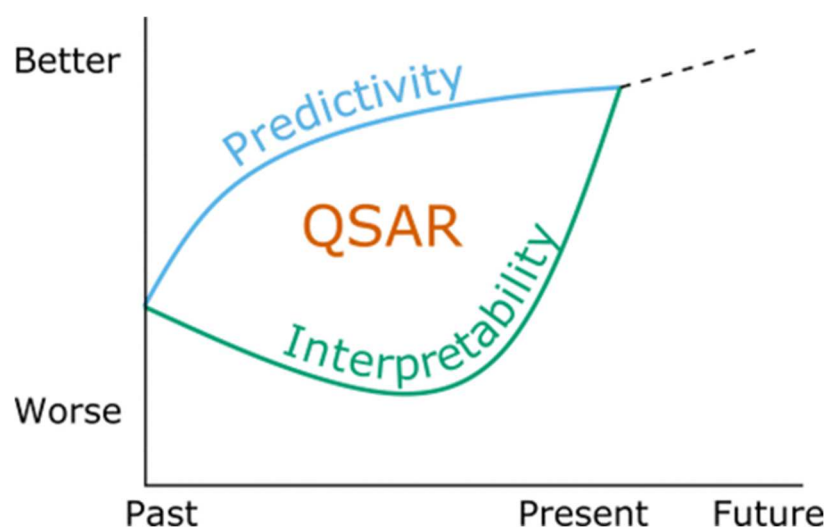
Recentemente si è molto parlato dell'impiego dell'intelligenza artificiale (AI) nell'ambito chimico.

In generale, il *machine learning* (ML), considerabile come un sottoinsieme dell'AI, rappresenta una serie di tecniche utili per predire una proprietà Y basandosi su esempi già conosciuti, dove ciascun esempio i possiede la proprietà Y(i) e un gruppo di k caratteristiche X(i,j), j = 1...k.

Il ML, così come gli altri metodi di educazione induttiva, risente del limite dovuto alla necessità di scindere tra correlazione e causalità e di sapere quanti siano gli esempi indispensabili per generare predizioni accurate per nuove casistiche. Nell'ambito delle QSAR, la variabile Y è solitamente una proprietà fisico/biologica e le caratteristiche indipendenti X (i descrittori) sono dei derivati della struttura chimica. La funzione che mappa Y da X è il modello QSAR [16].

Con l'aumentare dei dati a disposizione, sia *endpoints* che descrittori, tecniche più avanzate di *modeling* e metodi di ML sono stati utilizzati per studiare potenziali *pattern* all'interno di questi dati. Relazioni non lineari tra descrittori ed *endpoints* sono state derivate utilizzando reti neurali artificiali (*ANNs* – *Artificial Neural Networks*), che sono progettate per mimare il processo di apprendimento del cervello umano; reti neurali di apprendimento profondo (*DNNs* - *Deep Learning Neural Networks*), impiegate per poter simultaneamente predire più *endpoints* di interesse da un gruppo di *data set QSAR* e macchine a vettori di supporto (*Support Vector Machines* - *SVMs*). Per quanto questi metodi si siano rivelati efficaci in quanto a predittività, sono spesso considerati modelli “*black box*” perché carenti dal punto di vista interpretativo [15].

L'interpretazione è solitamente vista come un duplice problema: l'interpretabilità dei descrittori scelti e del metodo di *machine learning* impiegato. L'interpretabilità dei descrittori è un dilemma che ha afflitto i modelli QSAR fin dal principio e quasi tutti i modelli interpretabili sono stati costruiti a partire da descrittori facilmente interpretabili con una struttura ben definita o un significato fisico/chimico. In realtà, l'impiego di descrittori non o difficilmente interpretabili, può migliorare la predittività dei modelli. Dall'altra parte però metodi di ML moderni, come quelli sopra menzionati, che producono modelli altamente predittivi, non sono interpretabili proprio per come sono costruiti, a differenza dei primi modelli QSAR che sono stati realizzati con in mente la successiva interpretazione. Questo ha portato alla necessità di un compromesso tra interpretabilità e predittività, visto che i modelli predittivi sono l'obiettivo principale del *QSAR modeling* e l'interpretazione dei modelli è stata più frequentemente considerata meno importante e, perciò, trascurata [18].



Esempio di analisi QSAR classica (2D): analisi di Hansch

Dal punto di vista matematico la QSAR rappresenta un'equazione che correla l'attività biologica a dei parametri fisico-chimici misurabili ed ha come obiettivo quello di identificare e quantificare le proprietà fisicochimiche di una sostanza, se e quale effetto esse abbiano sulla bioattività della stessa [17]. Queste proprietà possono suddividersi in:

- A) Proprietà idrofobiche
- B) Proprietà elettriche
- C) Proprietà steriche

L'attività si misura tramite il logaritmo del reciproco della concentrazione: $\log(1/C)$ con C indicante la concentrazione minima necessaria per indurre una determinata risposta biologica. Una gamma di composti viene sintetizzato per studiare un'unica proprietà e testarne gli effetti sulla bioattività. Si costruisce dunque il grafico che traccia la bioattività in y sulla proprietà indagata in x, e i vari punti del grafico vengono congiunti da un'unica retta tramite l'analisi di regressione lineare con il metodo dei minimi quadrati (che permette di indentificare le costanti k).

A.1) Idrofobia delle molecole

- è un indice importante per valutare quanto facilmente la sostanza indagata attraversa la membrana cellulare e che tipo di interazioni ha con i recettori
- è quantificabile misurando la distribuzione relativa della sostanza in miscele ottanolo/acqua, tramite il coefficiente di ripartizione P.

$$P = [\text{concentrazione sostanza in ottanolo}] / [\text{concentrazione sostanza in acqua}]$$

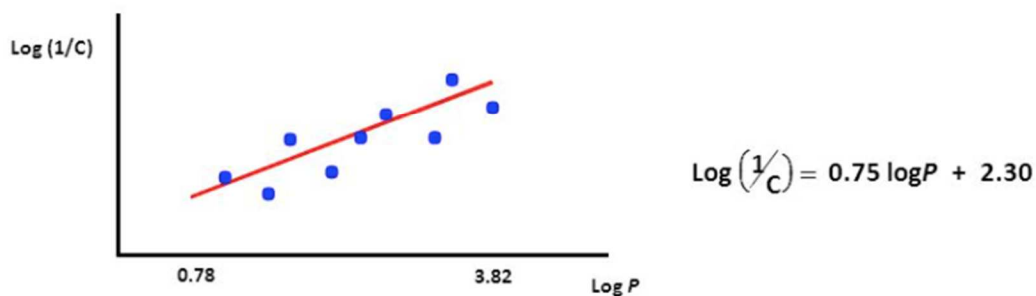
Relazione lineare tra $\log(P)$ e $\log(1/C)$

Per intervalli di $\log(P)$ piccoli, la relazione lineare tra $\log(P)$ e $\log(1/C)$ si può rappresentare nel seguente modo:

$$\log(1/C) = k_1 \log(P) + k_2$$

Un esempio è $\log(1/C) = 0.75\log(P) + 2.30$, che descrive il legame all'albumina sierica (albumina presente nel sangue dei vertebrati), con $\log(P)$ compreso tra 0.78 e 3.82. Questo aumenta in funzione del $\log(P)$, più la sostanza è idrofobica più si lega. Questa relazione è importante per stimare i livelli di dose effettiva nei farmaci, in quanto solo quello libero si legherà al recettore. D'altra parte, l'alta idrofobia favorisce l'attraversamento delle membrane cellulari e il raggiungimento del sito d'azione facilitando inoltre il legame con il recettore.

- **Activity of drugs is often related to P**
 e.g. binding of drugs to serum albumin
 (straight line - limited range of $\log P$)



- **Binding increases as $\log P$ increases**
- **Binding is greater for hydrophobic drugs**

Relazione non lineare tra $\log(P)$ e $\log(1/C)$

Nel caso delle relazioni non lineari, per valori più elevati di $\log(P)$, la curva rappresentata dal grafico risulta parabolica con un valore ottimale (attività biologica massima) di $\log(P)$ indicato con $\log(P^0)$.

Questa relazione si può riassumere nel seguente modo:

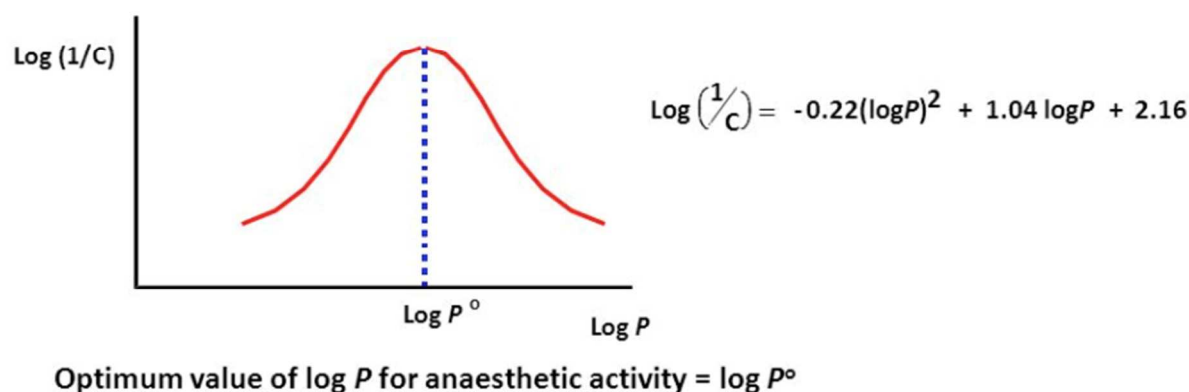
$$\log(1/C) = -k_1 (\log(P))^2 + k_2 \log(P) + k_3$$

Per valori di $\log(P)$ inferiori a quello ottimale, assume importanza il termine $\log(P)$ perché il termine elevato al quadrato ha segno negativo davanti e quindi all'aumentare di $\log(P)$ aumenta l'attività biologica, al contrario per valori maggiori la curva è maggiormente influenzata dal termine quadratico e quindi all'aumentare di $\log(P)$ si avrà una diminuzione dell'attività biologica.

I farmaci la cui attività biologica è influenzata esclusivamente dal $\log(P)$ sono molto pochi, tra questi ritroviamo gli anestetici generali, visto che non agiscono su un particolare recettore ma la loro attività è strettamente correlata alla loro capacità di attraversare la membrana cellulare. Una curva parabolica che descrive l'attività anestetica (valida solo per i derivati eteri) è la seguente:

$$\log(1/C) = -0.22(\log(P))^2 + 1.04\log(P) + 2.16$$

Example 2 General anaesthetic activity of ethers
(parabolic curve - larger range of $\log P$ values)



A.2) costante idrofobica del sostituito (Π)

- misura l'idrofobia di un sostituito relativamente all'idrogeno
- serve per calcolare in maniera teorica i coefficienti di ripartizione P conoscendo il contributo che i vari sostituiti danno all'idrofobia
- il suo valore si misura calcolando sperimentalmente il coefficiente di ripartizione P per un composto standard (come il benzene) con o senza il sostituito x

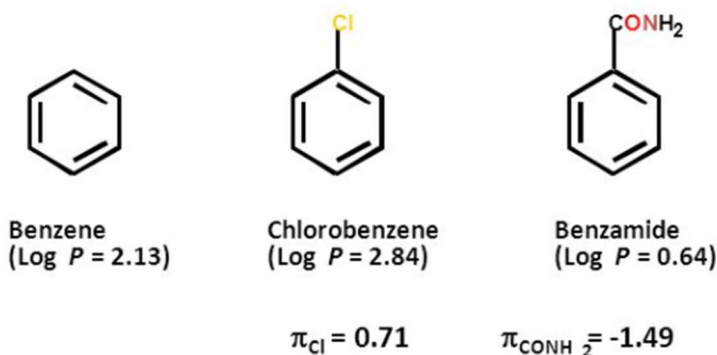
$$\Pi_x = \log(P_x) - \log(P_H)$$

Il valore di Π_x è caratteristico del sostituito, se questo risulta essere positivo allora il sostituito risulta più idrofobico dell'idrogeno, viceversa se è negativo. Nel caso in cui siano presenti più sostituiti diversi su uno stesso composto si possono sommare i vari valori di Π per ottenere una stima del $\log(P)$ totale del composto.

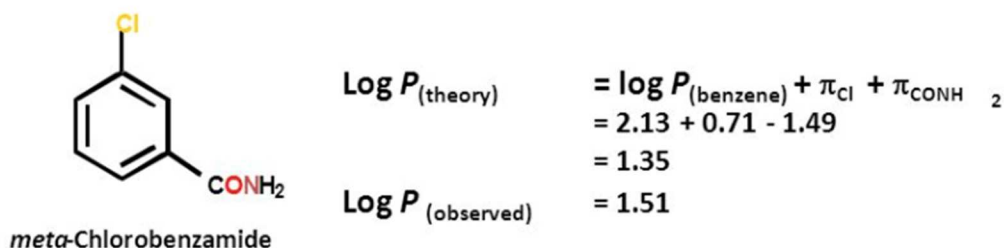
Ad esempio, per il benzene sostituito, si ha che il $\log(P)$ del benzene è 2.13 (calcolato sperimentalmente), il valore di $\Pi_{Cl} = 0.71$ e quello di $\Pi_{CONH_2} = -1.49$ e, di conseguenza, il

log(P) della metaclorobenzamide risulta essere 1.35, piuttosto vicino al valore calcolato sperimentalmente (1.51).

Example:



Example:



Un'equazione QSAR può contenere sia P che Π , con P indice dell'idrofobia totale delle molecole in relazione, ad esempio, alla propensione al legame e Π che identifica regioni specifiche della molecola (riguarda infatti i soli sostituenti) che potrebbero interagire con regioni idrofobiche nel sito di legame.

B) proprietà elettriche dei sostituenti

- Queste proprietà hanno una certa influenza sulla ionizzazione e polarità delle molecole e, di conseguenza, un impatto importante sulla capacità di una sostanza di attraversare la membrana cellulare oppure di interagire con un sito di legame

- La "sigma di Hammett" è un parametro che misura l'influenza che l'inserimento di un sostituito ha sulla reattività di una molecola rispetto alla struttura base, ovvero l'abilità del sostituito su un composto aromatico di donare o ricevere elettroni

$$\sigma = \log (K_x/K_H)$$

Con K costante di equilibrio, σ è positivo per un sostituito elettronattrattore, negativo per un sostituito elettrondonatore.

È possibile, inoltre, separare gli effetti induttivi da quelli di risonanza, con costanti F e R, rispettivamente. Le costanti σ , F ed R possono essere utilizzate solo per sostituito aromatici, (per quanto riguarda quelli alifatici sono state calcolate misurando la velocità di idrolisi) inoltre non possono essere misurate per i sostituito in *orto* perché in questa posizione esercitano sia effetti elettrici che sterici.

C) Proprietà steriche dei gruppi sostituito

-Il volume, la dimensione e la forma di una molecola sono parametri che influenzano il modo in cui interagisce con un sito di legame

-Il calcolo di fattori sterici come la costante di Taft (E_s), è stato uno dei tentativi di relazionare un parametro misurabile, correlato a forma e ingombro di una molecola, alle dimensioni del sito di legame e all'attività biologica. La costante di Taft del sostituito X si misura comparando la velocità di idrolisi di un estere con un gruppo sostituito (k_x) rispetto a quello di un estere standard (k_0).

$$E_s = \log k_x - \log k_0$$

Le equazioni di Hansch correlano l'attività biologica alle proprietà chimico-fisiche più comunemente utilizzate:

Ad esempio, se i valori di idrofobia sono limitati ad un piccolo intervallo allora l'equazione sarà lineare

$$\log\left(\frac{1}{C}\right) = k_1 \log(P) + k_2 \sigma + k_3 E_s + k_4$$

altrimenti sarà parabolica [17].

$$\log\left(\frac{1}{C}\right) = k_1 \Pi - k_2 \Pi^2 + k_3 \sigma + k_4 E_s + k_5$$

CAPITOLO 3

PRATICHE DI *CREDIBILITY ASSESSMENT*

I modelli computerizzati possono essere usati con molteplici scopi nella ricerca biomedica; ma, soprattutto quando le predizioni di tali modelli vengono impiegate per prendere decisioni cliniche, esiste un rischio non trascurabile per il paziente coinvolto. Risulta dunque fondamentale dimostrare la credibilità dei modelli e verificare che questa sia commisurata al calcolo dei rischi/benefici nei riguardi del fruitore dei trattamenti [26].

Possiamo definire il concetto di “credibilità” di un modello come la volontà di basare delle decisioni su informazioni provenienti dallo stesso (*model-based decisions*) [22]. Per provare la credibilità di un modello computazionale ci si può avvalere di tre tipi di riscontri fondamentali: in prima istanza le prove riguardanti la validità delle assunzioni sottostanti le equazioni su cui si basa il modello, che in parte esistono prima che il modello sia stato costruito (le equazioni matematiche sono direttamente correlate con la teoria sottostante il fenomeno che sta venendo modellato) e in parte derivano da evidenze sperimentali (i coefficienti delle equazioni sono derivati da esperimenti o dati clinici).

In secondo luogo, le prove derivate dalla calibrazione, ovvero il processo con cui si adatta il modello in modo che combaci con i dati sperimentali.

Infine, le prove dovute al processo di validazione, che si riferiscono al confronto tra i risultati predetti dal modello con dati reali non impiegati nel processo di validazione [23].

Per quanto riguarda la verifica e la validazione dei modelli, con verifica si intende il processo per determinare se i risultati numerici ottenuti dal modello siano sufficientemente vicini alle soluzioni analitiche della formulazione matematica su cui si basa, mentre per quanto riguarda la validazione bisogna concentrarsi su quanto accuratamente il modello rappresenti la realtà che dovrebbe descrivere [25].

In biologia computazionale e in biomedicina i processi di verifica e validazione dei modelli sono piuttosto complicati a causa della difficoltà di acquisire dati sperimentali. I suddetti modelli possono essere categorizzati tramite una matrice 3x3, chiamata “matrice di credibilità”, dove i “modelli testabili” sono quelli per cui è possibile reperire dati misurabili da esperimenti reali, mentre i “modelli non testabili” sono quelli per cui non è possibile individuare misure corrispondenti alle predizioni del modello, con tutte le varie gradazioni tra i due estremi, dipendenti dal fatto che i dati necessari siano potenzialmente illimitati, rari o irreperibili [22].

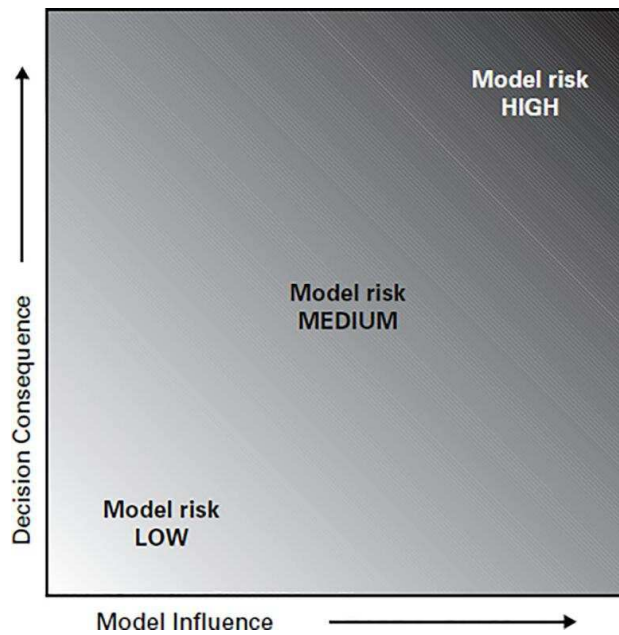
Solitamente un modello predittivo si può costruire ipotizzando una relazione tra variabili in un insieme di dati, focalizzandosi su “come” avvenga la relazione tra le variabili e non sul “perché” dell’interazione (modelli fenomenologici/statistici) oppure basandosi su conoscenze preesistenti in merito alla fisica, chimica, fisiologia e biologia del fenomeno modellato, quindi interessandosi anche al “perché” le variabili interagiscano come fanno (modello meccanicistico). Esiste inoltre una distinzione tra il caso in cui il fenomeno venga modellato come un *continuum* oppure come una serie di eventi discreti, ovvero se il fenomeno possa essere descritto da un set finito di stati discreti [25].

MODELLI INGEGNERISTICI

Come riportato nell’articolo *Credibility of In Silico Trial Technologies—A Theoretical Framing*, pubblicato sul “Journal of Biomedical and Health Informatics” nel gennaio 2020, un modello predittivo può essere formalizzato come $\hat{O} = f(I)$, dove \hat{O} è una stima di O , la quantità che vogliamo predire, $f()$ rappresenta il modello predittivo e I la serie di valori di input (o i parametri) del modello.

Il primo step nel processo di valutazione della credibilità è la definizione del contesto di utilizzo (*Context of Use - CoU*). Questo serve per definire il tipo di decisioni che verrebbero prese utilizzando il modello, come la quantità predetta dovrebbe aiutare queste decisioni, quale sarebbe la struttura di $f()$, quali input richiederebbe e come sarebbero determinati, oltre che la misura della loro incertezza ($\sigma(I)$) e la gamma di valori che la serie I potrebbe assumere quando il modello venisse impiegato nel *CoU* [25].

A questo punto bisogna determinare il rischio del modello, rappresentato dalla possibilità che il modello possa portare a conclusioni false o incorrette. Questa analisi si divide nell’indagine della *model influence* e della *decision consequence*. La *model influence* rappresenta il contributo del modello alle decisioni prese in base alle evidenze fornite dallo stesso, in rapporto ad altre evidenze a disposizione, mentre la *decision consequence* descrive la rilevanza di un esito sfavorevole derivato da una decisione incorretta. In sostanza il rischio di un modello esprime il rischio associato al prendere una decisione basata, almeno in parte, sull’output del modello [26].



Il terzo passo riguarda appunto la verifica, che può essere divisa in *code verification* e *model verification*. La prima è sostanzialmente una valutazione del codice e degli algoritmi impiegati, mentre la seconda ha come obiettivo la stima degli errori di approssimazione $v_{f(I)}$. Infatti, una volta appurato che il codice sia affidabile, si possono imputare gli eventuali errori di approssimazione solo alla soluzione numerica e non ad eventuali errori di codice. Solitamente se un particolare set di input, I^* , semplifica $f()$ al punto da renderne possibile la soluzione analitica, $f(I^*)$, quest'ultima è detta “*benchmark problem*” (valore di riferimento). $v_{f(I)}$ può in tal caso essere quantificato in relazione ad essa. Quando non è invece possibile formulare un *benchmark problem*, esistono metodi alternativi (come il *method of the exact solution* o il *method of the manufactured solutions*). Infine, si giunge all'indagine dei parametri (*parameter exploration*) per assicurarsi che il modello funzioni correttamente per tutti gli input ammissibili e che gli output varino in maniera fluida congruentemente agli input. In alcuni casi viene inoltre considerato l'errore di utilizzo dovuto all'errore umano [25].

Completate le prime tre fasi si passa alla validazione, ovvero la valutazione di quanto il modello sia capace di simulare la realtà di interesse [26]: se è possibile condurre un esperimento così ben controllato che $\sigma(O)$, ovvero la misura dell'incertezza, risulti trascurabile, allora l'errore di predizione, $|O - \hat{O}|$, può essere del tutto attribuito al modello. In caso contrario, bisogna passare alla quantificazione dell'incertezza e all'analisi della sensibilità (*uncertainty quantification - UQ* e *sensitivity analysis - SA*). Questi processi consistono nella stima su come l'errore stocastico che influenza l'input si propaghi tramite il modello sull'output ($\sigma(\hat{O}) = f(\sigma(I))$). $\sigma(\hat{O})$ rappresenta la variabilità di una quantità su misure e predizioni ripetute. La

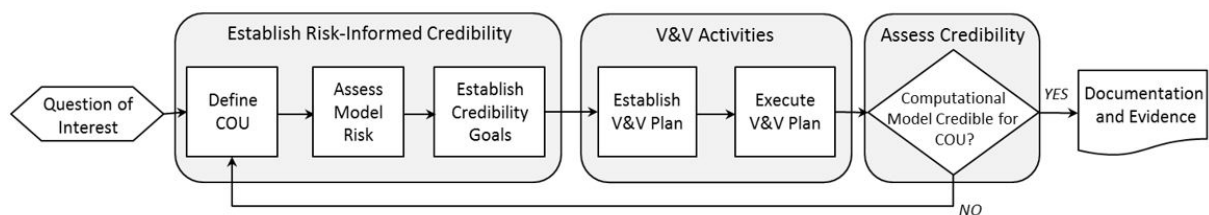
SA viene operata sui risultati della UQ per comprendere quali elementi della serie di input I sono i principali responsabili della variabilità dell'output.

Sapendo che $O - \hat{O} = \alpha_m = \alpha_I + \varepsilon_f + v_{f(I)}$ con α_m l'errore predittivo, α_I l'errore aleatorio (derivato dalla casualità intrinseca/variabilità dei dati usati), ε_f l'errore epistemico (dovuto alla non completa conoscenza dei parametri e dei fenomeni) e $v_{f(I)}$, l'errore di approssimazione. Facendo le seguenti assunzioni [25]:

1. α_I ha media nulla. Se questo è vero, risulta $ave(|O - \hat{O}|) \approx \varepsilon_f + v_{f(I)}$
2. $v_{f(I)} = o(\varepsilon_f)$. Se questo è vero, risulta $ave(|O - \hat{O}|) \approx \varepsilon_f$.
3. Tutta l'incertezza agente su α_m deriva da α_I . Se questo è vero, risulta $\sigma(|O - \hat{O}|) \approx \alpha_I$.

Se queste ipotesi sono verificate si può procedere con il processo di valutazione della credibilità, assicurandosi che tutti gli input non abbiano errori sistematici ingenti (visto che per un numero abbastanza alto di esperimenti di validazione l'errore predittivo dipende solo dalla componente meccanicistica e dall'approssimazione numerica (ipotesi 1)), sapendo che il processo di verifica ambisce a confermare l'ipotesi 2 così che la validazione possa stimare l'errore epistemico e tenendo conto che l'incertezza che colpisce l'errore predittivo si può quantificare calcolando come l'incertezza che colpisce gli input si propaghi negli output [26].

Infine, bisogna indagare il dominio di applicabilità del modello, ovvero se i risultati ottenuti tramite validazione siano rilevanti all'interno del *CoU*.



MODELLI BIOMEDICI

A differenza dei modelli predittivi precedentemente descritti in ambito ingegneristico, dove esiste una buona conoscenza meccanicistica del processo che viene modellato, in biomedicina spesso questa conoscenza è parziale quando non completamente inesistente. La complessità della maggior parte dei processi biologici è difficilmente riducibile e per questo ci si avvale di diversi modelli, come quelli basati sull'agente (*agent-based models*) o i modelli

ML (*machine learning models*) o di loro combinazioni come i modelli multiscala (*multiscale models*).

Nel caso dei modelli ML (raggruppabili assieme a quelli statistici sotto il nome di “modelli fenomenologici”), il processo di *code verification* rimane applicabile, ma non si può dire lo stesso per quanto riguarda il *model verification*, non essendoci un modello matematico da risolvere numericamente. Anche il concetto di validazione risulta essere diverso: per sviluppare un modello fenomenologico è necessario avere una serie di input il cui output sia già conosciuto (*validation set*), il discostarsi dell’output del modello dall’output reale nel momento in cui riceve nuovamente l’input utilizzato per il *training* è chiamato errore di training (*training error*). Essendo il modello sviluppato per induzione, l’errore di *training* non è predittivo dell’errore di test (*test error*), ovvero l’errore riscontrato quando il modello viene sottoposto ad un input diverso da quello di *training*, per cui la valutazione dell’errore di test finisce per diventare il processo di validazione stesso. Il problema principale con questo tipo di modelli però si riscontra nell’ambito dell’applicabilità. Ciò è dovuto sia al fatto che sono altamente ambiente-specifici, ovvero modifiche all’ambiente originale possono portare a risultati molto diversi influenzando l’errore predittivo e dunque l’applicabilità (essendo lo scopo di quest’ultima stimare l’errore predittivo del modello come funzione degli input sulla molteplicità degli input possibili definiti dal *CoU*), sia al fatto che a differenza dei modelli meccanicistici, basati su delle ipotesi (idealizzazioni) accettabili solo a determinate condizioni (limiti di validità) che portano ad un errore predittivo piccolo e costante se queste condizioni vengono rispettate, nei modelli ML non c’è garanzia che questo errore rimanga limitato pur essendolo per il *training* e il *test set*.

In generale, un modello $f(I) = f(\mu(I), \psi(I, J))$ composto da una parte fenomenologica $\psi(I, J)$ e una parte meccanicistica $\mu(I)$, dove J è il *training set*, l’errore del modello può essere scritto come $\varepsilon(f(I)) = \varepsilon(\varepsilon\mu(I), \varepsilon\psi(I, J))$. Se $\varepsilon(f(I))$ risulta pressoché costante su un’ampia gamma di input I , si possono ottenere predizioni al di fuori dei valori usati per la validazione con basso rischio, se invece varia in modo considerevole il rischio aumenta. Essendo la struttura dei modelli meccanicistici esplicita (modelli *white box*) la stima dell’errore della parte meccanicistica risulta meno difficile rispetto a quella della parte fenomenologica (modelli *black box*) dove la struttura stessa non è esplicita e l’errore dipende sia dagli input che dal *training set*. Per tale ragione, per quanto riguarda l’applicabilità, dai modelli a prevalenza meccanicistica è possibile ottenere predizioni accurate entro determinati limiti, pur discostandosi dalla regione di validazione, mentre per quelli a prevalenza fenomenologica l’applicabilità si restringe alla molteplicità di input validati, per cui in un certo senso i modelli fenomenologici necessitano di essere “ritestati” periodicamente perché non possono essere del tutto validati.

Nel caso dei modelli basati sull'agente, ovvero modelli meccanicistici dove almeno una parte degli input sono discreti, il processo di verifica, validazione e quantificazione dell'incertezza si può utilizzare per stabilirne la credibilità, ma la natura discreta del modello non assicura uniformità dell'errore predittivo, per cui predizioni con input molto distanti dai set di validazione devono essere utilizzate con cautela [25].

STUDI CLINICI IN SILICIO (ISCT)

Seguendo accuratamente le pratiche di valutazione della credibilità è possibile convalidare l'accuratezza di un modello predittivo e la sua attendibilità nel generare prove di sicurezza e/o efficacia *in silicio* per coorti di pazienti virtuali, modellati individualmente. Ciò apre diversi scenari dove un nuovo manufatto medico, che sia un dispositivo o un farmaco, potrebbe essere interamente sviluppato e testato in sicurezza in silicio prima di essere fabbricato [20].

Con il termine “studi clinici in silicio” (*In Silico Clinical Trials* - ISCT) ci si riferisce a: “the use of individualised computer simulation in the development or regulatory evaluation of a medicinal product, medical device, or medical intervention.”¹² [24, p. 12].

Secondo Avicenna Action¹³, per quanto il *computer modelling* o simulazioni computerizzate siano attualmente già impiegate nello sviluppo di prodotti biomedicali, come fanno, per esempio, le case farmaceutiche per studiare la farmacocinetica e la farmacodinamica di nuovi composti (es. *QSAR modelling*) o le aziende produttrici di dispositivi medici per mezzo della fluidodinamica computazionale e dell'analisi con il metodo degli elementi finiti per testare l'interazione tra dispositivo e corpo umano, rimane complicato determinare come eventuali prodotti biomedicali possano interagire con i pazienti individualmente poiché i risultati che si ottengono derivano dall'aggregazione statistica di dati compositi e non possono, a causa della loro stessa natura, tenere conto delle variegate differenze che esistono tra singoli individui contingenti. Tuttavia, esiste un modo per ovviare a tale *deficit*: l'impiego di simulazioni computerizzate che permettono di affrontare la questione della variabilità individuale. Infatti l'utilizzo di un modello specifico del paziente permette di personalizzare secondo necessità i parametri così da sviluppare un modello computerizzato del trattamento (ovvero l'effetto del farmaco/dispositivo sull'organismo), delle modalità di somministrazione (somministrazione del farmaco o procedura chirurgica), assieme ad un modello credibile delle

¹² “L'uso di simulazioni computerizzate individuali nello sviluppo o nella valutazione normativa di un prodotto, uno strumento o un intervento medico” (*traduzione mia*).

¹³ Il Progetto Avicenna Action, fondato dalla Commissione Europea, ha coinvolto 525 esperti da 35 paesi, tra cui 22 dei 28 stati membri dell'Unione Europea, per produrre nel corso di 18 mesi una *roadmap* per lo sviluppo tecnologico [24].

caratteristiche del paziente, facendo sì che si possano effettuare ricerche preliminari al computer: i cosiddetti “ISCT”.

In questo contesto si parlerebbe di pazienti e trattamenti “virtuali” arrivando alla riduzione, al perfezionamento e alla sostituzione parziale dei test clinici. La riduzione riguarderebbe la durata e la dimensione degli studi clinici; infatti, si potrebbe procedere a una progettazione migliore dello studio e alla rimozione di pazienti previsti come non-rispondenti alla terapia, ottimizzando l'intero processo, mentre il perfezionamento si tradurrebbe in predizioni più accurate degli esiti degli studi, soprattutto in merito alle conseguenze a lungo termine o rare che gli studi clinici tradizionali hanno più difficoltà ad evidenziare. Per quanto concerne la sostituzione, almeno parzialmente, questa potrebbe venir normata similmente a quanto è già stato fatto nell'ambito dei modelli animali, una volta confermata la credibilità dei modelli. Infatti, tramite test paralleli tra ISCT e studi clinici tradizionali si potrebbe testare l'accuratezza predittiva dei modelli e, una volta raggiunto un numero sufficientemente alto di pazienti, questi dati potrebbero venir sfruttati, assieme a informazioni già consolidate, per creare intere “popolazioni virtuali” che potrebbero essere impiegate per testare in silicio diversi trattamenti, prodotti nuovi o per perfezionarne di esistenti. Si possono, infatti, categorizzare gli ISCT come una branca della “medicina in silicio”, ovvero quella disciplina che comprende simulazioni computerizzate individuali per la predizione, la diagnosi, la valutazione prognostica e il trattamento di malattie [24].

Esempi di ISCT

Pur essendo il concetto di ISCT decisamente innovativo e in via di sviluppo, ci sono degli esempi di impiego dello stesso che possono essere considerati riusciti o, per lo meno, molto promettenti sia per quanto riguarda le 3R in ambito di sperimentazione animale sia per gli equivalenti concetti di riduzione, sostituzione e perfezionamento negli studi clinici umani.

Il primo è un software chiamato *Virtual Assay*, sviluppato all'università di Oxford in collaborazione con *Janssen Pharmaceuticals*. Non rispondendo tutti gli individui nel medesimo modo ad un farmaco e, ovviamente, essendo impensabile testare lo stesso su tutta la popolazione per poterlo decretare sicuro ed efficace, il *modelling* in silicio è diventato sempre più importante nell'ambito della sperimentazione farmaceutica, per quanto i metodi tradizionali faticino ad incorporare questa variabile di mutevolezza individuale, ma proprio qui sta la differenza rappresentata dal *Virtual Assay* che è stato programmato per tenerne conto [24]. Esso è, per l'appunto, in grado di modulare le variabili di modelli di biologia cellulare ben conosciuti (nello specifico nell'ambito dell'elettrofisiologia cardiaca) in modo da tenere conto della

variabilità tra individui in una popolazione. I modelli risponderanno così diversamente agli stessi *input* in modo da fornire una valutazione qualitativa e quantitativa degli effetti farmacologici a livello dell'intera popolazione [19].

Questa nuova metodologia ha la potenzialità di velocizzare e rendere più economico il processo dello sviluppo farmacologico, superare alcune difficoltà intrinseche degli studi clinici tradizionali (come la sottorappresentazione di individui a rischio nelle coorti di pazienti) e minimizzare la sperimentazione animale nell'ambito della ricerca farmacologica, come riconosciuto dalla *NC3Rs* tramite l'assegnazione del *3Rs prize* nel 2014 [24]. Ne è esempio concreto la ricerca di Britton et al., che ha avuto come obiettivo il valutare l'abilità dei *drug trials in silico* (tramite la metodologia sopra esposta, quindi tenente conto la variabilità individuale) di predire il rischio clinico di aritmie farmacologicamente indotte in popolazioni di modelli del potenziale d'azione umano, a confronto con metodi predittivi tradizionali. I risultati della ricerca hanno dimostrato che gli studi farmacologici in silicio sono stati in grado di fornire risultati paragonabili se non addirittura superiori ai corrispettivi test su modello animale [21].

Un altro esempio virtuoso è il simulatore di diabete di tipo 1 sviluppato da Kovatchev e Cobelli come sostituto per i test animali preclinici per la certificazione di trattamenti a base di insulina. Quest'ultimo è stato accettato dall'FDA¹⁴, permettendo il passaggio da un processo che durava dai 4 ai 6 anni, costava attorno a 100 milioni di euro e impiegava milioni di test animali (principalmente cani) ad uno con una durata nell'ordine di qualche mese, con un costo inferiore ai 100000 euro e che non si avvale di sperimentazione animale prima degli studi clinici umani. Questa certificazione da parte dell'FDA ha comportato una corrispondente accettazione da parte delle agenzie preposte di altri paesi (come l'Italia e l'Olanda) e ha stimolato la progettazione e la sperimentazione di nuovi strumenti per il dosaggio dell'insulina, alcuni dei quali sono in fase di studio clinico umano. Una versione aggiornata del simulatore computerizzato del diabete di tipo 1 (*UVA/PADOVA Type 1 Diabetes Simulator*) è stata presentata all'FDA nel 2013 [24].

Come precedentemente menzionato, nel 2008 la *Food and Drug Administration* statunitense ha approvato il simulatore di soggetti T1DM, realizzato dalle università di Padova e della Virginia, ammettendolo come sostituto della sperimentazione preclinica animale per quanto concerne i test dei trattamenti insulinici. Tale simulatore si basa su un modello matematico del sistema glucosio-insulina costituito partendo da un *dataset* di 204 soggetti non

¹⁴ Food and Drug Administration è l'ente governativo statunitense che si occupa della regolamentazione dei prodotti alimentari e farmaceutici, dipendente dal Dipartimento della salute e dei servizi umani degli Stati Uniti d'America.

affetti da diabete di cui si possedevano le stime dei flussi metabolici di glucosio e le misure della quantità di quest'ultimo e di insulina presenti nel plasma. Il simulatore UVA/Padova (S2008) consta di una popolazione di soggetti virtuali di 100 adulti, altrettanti adolescenti e 100 bambini per rappresentare le possibili variabili di una popolazione reale affetta da diabete. Un aggiornamento del 2013 ha fatto sì che la descrizione della glicemia fosse perfezionata rendendola così maggiormente conforme alle osservazioni svolte nei trial clinici.

Nella versione originale del simulatore del 2008 (S2008), è presente un modello della dinamica glucosio-insulina durante un pasto, una popolazione di 300 pazienti virtuali e una *user interface*. La struttura del modello matematico sopra citato deriva da un modello analogo elaborato su soggetti sani: quest'ultimo si basa sul fatto che i sottosistemi del glucosio e dell'insulina sono connessi tra di loro dall'azione dell'insulina sulla produzione endogena di glucosio e sull'utilizzo dello stesso in aggiunta al controllo del glucosio sulla secrezione di insulina da parte delle cellule β [27].

Il sottosistema del glucosio è composto da un modello bicompartimentale che descrive la cinetica di questo zucchero:

$$\dot{G}_p(t) = EGP(t) + Ra_{meal}(t) - U_{ii}(t) - E(t) - k_1 \cdot G_p(t) + k_2 \cdot G_{pt}(t)$$

$$G_p(0) = G_{pb}$$

$$\dot{G}_t(t) = -U_{id}(t) - E(t) + k_1 \cdot G_p(t) - k_2 \cdot G_{pt}(t)$$

$$G_t(0) = G_{tb}$$

$$G(t) = G_p(t)/V_G$$

$$G(0) = G_b$$

G_p (mg/kg) è la massa di glucosio nel plasma in quei tessuti che raggiungono l'equilibrio velocemente (*rapidly equilibrating tissues*) e G_t (mg/kg) la massa di glucosio nel plasma nei tessuti che raggiungono l'equilibrio lentamente (*slowly equilibrating tissues*). G (mg/dL) è la concentrazione plasmatica di glucosio (il suffisso b indica lo stato basale), EGP ((mg/kg)/min) la produzione endogena di glucosio, Ra_{meal} ((mg/kg)/min) è la velocità di comparsa (*rate of appearance*) di glucosio nel plasma ed E ((mg/kg)/min) è la secrezione renale. U_{ii} ((mg/kg)/min) e U_{id} ((mg/kg)/min) sono i valori di utilizzo di glucosio insulino-indipendente e dipendente rispettivamente e V_G (dL/kg) è la distribuzione del volume di glucosio. Infine, k_1 e k_2 sono i parametri delle portate (*rate parameters*).

Il sottosistema dell'insulina è a sua volta composto da due compartimenti, esso rappresenta l'insulina nel plasma e nel fegato.

$$\dot{I}_p(t) = -(m_2 + m_4) \cdot I_p(t) + m_1 \cdot I_l(t) + S(t)$$

$$I_p(0) = I_{pb}$$

$$\dot{I}_l(t) = -(m_1 + m_3) \cdot I_l(t) + m_2 \cdot I_p(t)$$

$$I_l(0) = I_{lb}$$

$$I(t) = I_p(t)/V_I$$

$$I(0) = I_b$$

I_p (pmol/kg) è la massa di insulina nel plasma, I_l (pmol/kg) è la massa di insulina nel fegato, I (pmol/kg) è la concentrazione di insulina nel plasma (con il suffisso b ad indicare lo stato basale), S è la secrezione di insulina ((pmol/kg)/min) e V_I (L/kg) è la distribuzione del volume di insulina. Infine, m_1 e m_2 (1/min) sono i parametri delle portate (*rate parameters*).

La degradazione dell'insulina avviene sia nel fegato (tramite m_3) che perifericamente (in modo lineare tramite m_4) e il flusso della stessa che lascia il fegato in modo irreversibile (insulina epatica-HE), se diviso per il flusso totale di insulina che esce dal fegato, dipende dal tempo tramite S .

$$HE(t) = -m_5 \cdot S(t) + m_6$$

$$HE(0) = HE_b$$

Si ha dunque:

$$m_3(t) = \frac{HE(t)}{1 - HE(t)} m_1$$

I parametri m_2 e m_4 allo stato basale, sapendo che il fegato è il responsabile del 60% dell'eliminazione dell'insulina in stato stazionario, sono:

$$m_2 = \left(\frac{S_b}{I_{pb}} - \frac{m_4}{1 - HE_b} \right) \cdot \frac{1 - HE_b}{HE_b}$$

$$m_4 = \frac{2 S_b}{5 I_{pb}}$$

Con S_b secrezione basale di insulina e HE_b uguale a 0.6.

L'eliminazione del glucosio endogeno prodotto (EGP) è considerato linearmente dipendente dalla massa di glucosio e dall'azione ritardata dell'insulina sul fegato (X^L), con X^L

ottenuto grazie ad una catena di due compartimenti. k_{p1} ((mg/kg)/min), k_{p2} (1/min), k_{p3} ((mg/kg)/min per pmol/L), k_i sono, nell'ordine: l'EGP estrapolato quando i valori di insulina e glucosio equivalgono a zero, l'efficacia del glucosio epatico, il contributo dell'insulina sulla produzione di glucosio (ovvero l'importanza dell'azione dell'insulina sul fegato) e il parametro che tiene in considerazione il ritardo tra il segnale insulinico e l'azione di questo ormone.

$$EGP(t) = k_{p1} - k_{p2} \cdot G_p(t) - k_{p3}X^L(t)$$

$$EGP = EGP_b$$

$$\dot{X}^L(t) = -k_i \cdot [X^L(t) - I'(t)]$$

$$X^L(t) = I_b$$

$$\dot{I}'(t) = -k_i \cdot [I'(t) - I(t)]$$

$$I'(0) = I_b$$

L'assorbimento intestinale del glucosio descrive il tragitto dello zucchero attraverso lo stomaco e l'intestino impiegando un modello a due compartimenti (uno per la fase liquida e uno per quella solida). Q_{sto} (mg) è la quantità di glucosio nello stomaco (con pedice 1 per la fase solida e 2 per quella liquida) e Q_{gut} (mg) è la massa di glucosio nell'intestino. I parametri k_{gri} e k_{empt} rappresentano rispettivamente la velocità di frantumazione (*rate of grinding*) e la costante di velocità di svuotamento gastrico (*gastric emptying*, descritta da una funzione non lineare di Q_{sto}). Inoltre, k_{abs} indica la costante di velocità di assorbimento intestinale, f la frazione assorbimento che appare nel plasma, BW (kg) è il peso corporeo e D (mg) la quantità di glucosio ingerito.

$$Q_{sto}(t) = Q_{sto1}(t) + Q_{sto2}(t)$$

$$Q_{sto}(0) = 0$$

$$\dot{Q}_{sto1}(t) = -k_{gri} \cdot Q_{sto1}(t) + D \cdot \delta(t)$$

$$Q_{sto1}(0) = 0$$

$$\dot{Q}_{sto2}(t) = -k_{empt}(Q_{sto}) \cdot Q_{sto2}(t) + k_{gri} \cdot Q_{sto1}(t)$$

$$Q_{sto2}(0) = 0$$

$$\dot{Q}_{gut}(t) = k_{abs} \cdot Q_{gut}(t) + k_{empt}(Q_{sto}) \cdot Q_{sto2}(t)$$

$$Q_{gut}(0) = 0$$

$$R_{ameal}(t) = \frac{f \cdot k_{abs} \cdot Q_{gut}(t)}{BW}$$

$$R_{ameal}(0) = 0$$

$$k_{empt}(Q_{sto}) = k_{min} \frac{k_{max} - k_{min}}{2} \cdot \{\tanh[\alpha(Q_{sto} - \beta \cdot D)] \tanh[\beta(Q_{sto} - c \cdot D)] + 2\}$$

L'utilizzo del glucosio U è la somma di U_{ii} (utilizzo insulino-indipendente, ovvero quello da parte del cervello e degli eritrociti-Fcns) e U_{id} (utilizzo insulino-dipendente, che avviene nei tessuti periferici e dipende in modo non lineare dalla quantità di glucosio negli stessi - equazione di Michaelis Menten). V_{mx} ((mg/kg)/min per pmol/L) è la sensibilità insulinica, X (pmol/L) l'azione dell'insulina sull'utilizzo del glucosio e p_{2U} è la costante di velocità dell'azione insulinica sull'utilizzo periferico del glucosio.

$$U_{ii}(t) = F_{cns}$$

$$U_{id}(t) = \frac{[V_{m0} + V_{mx} \cdot X(t)] \cdot G(t)}{K_{m0} + G(t)}$$

$$\dot{X}(t) = -p_{2U} \cdot X(t) + p_{2U} \cdot [I(t) - I_b]$$

$$X(0) = 0$$

La secrezione renale del glucosio avviene se il glucosio plasmatico supera un dato valore di soglia ed è descritto linearmente nel seguente modo:

$$E(t) = \begin{cases} k_{e1} \cdot [G_p(t) - k_{e2}] & \text{if } G_p(t) > k_{e2} \\ 0 & \text{if } G_p(t) \leq k_{e2} \end{cases}$$

Dove k_{e1} (1/min) e k_{e2} (mg/dL) sono la velocità di filtrazione glomerulare e la soglia renale di glucosio.

Infine, la secrezione di insulina delle cellule β è descritta dal seguente modello:

$$S(t) = \gamma \cdot I_{po}(t)$$

$$\dot{I}_{po}(t) = -\gamma \cdot I_{po}(t) + S_{po}(t)$$

$$I_{po}(t) = I_{po}$$

$$\dot{S}_{po}(t) = \begin{cases} Y(t) + K \cdot \dot{G}(t) + S_b & \text{for } \dot{G}(t) > 0 \\ Y(t) + S_b & \text{for } \dot{G}(t) \leq 0 \end{cases}$$

$$\dot{Y}_{po}(t) = \begin{cases} -\alpha \cdot [Y(t) - \beta \cdot (G(t) - h)] & \text{if } \beta \cdot (G(t) - h) \geq -S_b \\ -\alpha \cdot [Y(t) + S_b] & \text{if } \beta \cdot (G(t) - h) < -S_b \end{cases}$$

$$Y(0) = 0$$

Con γ (1/min) costante di velocità di trasferimento tra fegato e vena porta, K (pmol/kg per mg/dL) reattività pancreatica alla velocità di cambiamento del glucosio, α (1/min) ritardo tra il segnale glicemico e la secrezione di insulina, β (pmol/kg/min per mg/dL) reattività del pancreas al glucosio e h (mg/dL) (fissata al valore G_b per avere stato stazionario in condizioni basali) è il valore soglia sopra il quale le cellule β secernono nuova insulina.

Il modello T1DM è composto da 26 parametri, tra cui hanno particolare importanza $kp3$ e V_{mx} che descrivono la capacità dell'insulina plasmatica di inibire la produzione endogena e aumentare lo smaltimento del glucosio. In aggiunta al modello dei soggetti sani, nel modello dei soggetti T1DM, avendo essi bisogno di somministrazioni di insulina per colmarne la deficienza di produzione da parte delle cellule β , al posto della secrezione dell'insulina subentra un modello di immissione esterna dell'ormone. In particolare, per quanto concerne la cinetica dell'insulina subcutanea si ha:

$$\dot{I}_{sc1}(t) = -(k_d + k_{a1}) \cdot I_{sc1}(t) + IIR(t)$$

$$I_{sc1}(0) = I_{sc1ss}$$

$$\dot{I}_{sc2}(t) = k_d \cdot I_{sc1}(t) - k_{a2} \cdot I_{sc2}(t)$$

$$I_{sc2}(0) = I_{sc2ss}$$

Con I_{sc1} e I_{sc2} insulina nonmonomerica e monomerica, IIR ((pmol/kg)/min) velocità di immissione di insulina esogena, k_d (1/min), k_{a1} e k_{a2} rispettivamente costante di velocità di dissociazione dell'ormone e velocità di assorbimento dei due tipi di insulina sopra citati.

$$\dot{I}_p(t) = -(m_2 + m_4) \cdot I_p(t) + m_1 \cdot I_l(t) + Ra_I(t)$$

$$I_p(0) = I_{pb}$$

$$\dot{I}_l(t) = -(m_1 + m_3) \cdot I_l(t) + m_2 \cdot I_p(t)$$

$$I_l(t) = I_{lb}$$

$$I(t) = \frac{I_p(t)}{V_I}$$

$$I(0) = I_b$$

La velocità di comparsa (*rate of appearance*) dell'insulina esterna nel plasma è dato da:

$$Ra_I(t) = k_{a1} \cdot I_{sc1}(t) + k_{a2} \cdot I_{sc2}(t)$$

Ogni soggetto T1DM è rappresentato da un vettore contenente specifici parametri e associato ad una terapia insulinica, descritta da tre parametri fondamentali: CR (frazione carboidrato-insulinica, *carbohydrateto-insulin ratio*) (g/U) che indica la quantità di insulina richiesta per i carboidrati (CHO) in un pasto, TDI (insulina totale giornaliera) e CF (fattore di correzione dell'insulina).

Nella versione aggiornata del 2013 (S2013), il modello ha subito delle modifiche, come l'aggiunta di un modello della cinetica, della secrezione e dell'azione del glucagone per considerare il meccanismo di controregolazione. In particolare quello cinetico si basa su un modello monocompartimentale:

$$\begin{aligned}\dot{H}(t) &= -n \cdot H(t) + SR_H(t) \\ H(0) &= H_b\end{aligned}$$

Dove H (ng/L) è la concentrazione plasmatica di glucagone, SRH ((ng/L)/min) è la secrezione dello stesso e n (1/min) è la velocità di eliminazione. L'SRH è descritto come la somma di una componente statica e una dinamica:

$$SR_H(t) = SR_H^s(t) + SR_H^d(t)$$

$$SR_H^s \begin{cases} -\rho \cdot [SR_H^s(t) - \max(\sigma_2[G_{th} - G(t)] + SR_H^b, 0)] & \text{if } G(t) \geq G_b \\ -\rho \cdot [SR_H^s(t) - \max(\frac{\sigma[G_{th} - G(t)]}{I(t) + 1} + SR_H^b, 0)] & \text{if } G(t) < G_b \end{cases}$$

$$SR_H^d(t) = \delta \cdot \max(-\frac{dG(t)}{dt}, 0)$$

Con G e I concentrazioni plasmatiche di glucosio e insulina, σ e σ_2 ((ng/L)/min per mg/dL·L/pmol) la reattività delle cellule α ai livelli di glucosio, ρ (1/min) parametro che descrive il ritardo tra la secrezione statica del glucagone e il livello plasmatico di glucosio (stimolata, ma moderata dall'insulina, per $G < G_b$ e inibita per $G \geq G_b$). Per quanto concerne SRH dinamico invece si ha che δ (ng/L·mg/dL) è la reattività delle cellule α alla velocità di cambiamento dei livelli di glucosio (*glucose rate of change*).

Inoltre, il modello di EGP è stato aggiornato, con X^H (ng/L) risposta ritardata dell'azione del glucagone sulla produzione endogena di glucosio, ξ ((mg/kg)/min per ng/L) reattività del fegato al glucagone e kH (1/min) parametro che considera il ritardo dovuto alla dipendenza dell'azione del glucagone dalla sua concentrazione:

$$EGP(t) = k_{p1} - k_{p2} \cdot G_p(t) - k_{p3} \cdot X^L(t) + \xi \cdot X^H(t)$$

$$EGP = EGP_b$$

$$\dot{X}^H(t) = -k_H \cdot X^H(t) + k_H \cdot \max[(H(t) - H_b), 0]$$

$$X^H(0) = 0$$

Un ulteriore cambiamento apportato al modello del simulatore lo si ritrova nella dinamica del glucosio in condizioni di ipoglicemia, precedentemente non correttamente rappresentata per una descrizione non del tutto adeguata dell'azione dell'insulina (che paradossalmente cresceva quando i livelli di glucosio scendevano sotto una certa soglia). Nel nuovo modello si assume che Uid (utilizzo insulino-dipendente) aumenta quando il glucosio diminuisce sotto una certa soglia seguendo la funzione che descrive il rischio a seconda della quantità di glucosio nel sangue (*blood glucose risk function*).

$$U_{id}(t) = \frac{[V_{m0} + V_{mx} \cdot X(t) \cdot (1 + r_1 \cdot risk)] \cdot G(t)}{K_{m0} + G_t(t)}$$

$$risk = \begin{cases} 0 & \text{if } G \geq G_b \\ 10 \cdot [f(G)]^2 & \text{if } G_{th} \leq G < G_b \\ 10 \cdot [f(G_{th})]^2 & \text{if } G < G_{th} \end{cases}$$

$$f(G) = \log\left(\frac{G}{G_b}\right)^{r_2}$$

Con G_b glucosio basale, G_{th} soglia ipoglicemica (fissata a 60 mg/dL), r_1 e r_2 parametri del rischio.

Infine, sono stati inseriti dei cambiamenti nel calcolo di alcuni parametri clinici come, ad esempio, CR e CF [27].

CONCLUSIONE

Lungi dall'essere ancora applicabili nella pratica di laboratorio come sostituzioni complete dei modelli animali nella maggior parte dei casi, le alternative rappresentate dai modelli in vitro di cellule, tessuti e addirittura organi, affianco a diversi organismi come i microorganismi, gli invertebrati e i vertebrati inferiori sono, accanto ai modelli computerizzati, ampiamente spendibili soprattutto in ambito dei test predittivi preliminari.

Si è parlato in particolar modo dei cosiddetti modelli QSAR che, sfruttando l'analisi di regressione lineare dei minimi quadrati (per trovare la retta migliore per cui la cui somma delle distanze al quadrato è minima) permettono di mettere in relazione matematica la struttura e l'attività biologica di una sostanza per, ad esempio in farmacologia, ridurre al minimo la sintesi di farmaci "non utili", sfruttando le conoscenze già a disposizione. Infatti, nel *drug design* si utilizzano tutte le informazioni disponibili (proprietà chimico-fisiche, farmacologiche, effetti collaterali, ...) di farmaci (*drugs*) già noti, per progettare (*design*) e, se utile, poi realizzare la sintesi di farmaci con migliori caratteristiche.

Si è parlato inoltre di come validare la credibilità della categoria a cui appartengono questo tipo di modelli, ovvero dei modelli in silicio. Tramite il processo di definizione del contesto di utilizzo, analisi del rischio del modello, verifica, validazione e quantificazione dell'incertezza normalmente impiegato nella valutazione dei modelli ingegneristici, con le dovute accortezze, si è in grado di stabilire la credibilità anche di quest'ultimi in ambito biomedicale.

Infatti, esistono ad oggi studi clinici interamente effettuati in silicio, la cui popolarità sta crescendo grazie alla loro potenziale abilità di migliorare l'applicazione delle 3R non solo nell'ambito della sperimentazione animale ma anche nei *clinical trials* umani.

BIBLIOGRAFIA e SITOGRAFIA

Capitolo 1

- [1] Balls, M., “It's Time to Reconsider *the Principles of Humane Experimental Technique.*”, *ATLA*, vol. 48, no. 1, pp. 40-46, Gen. 2020, doi:10.1177/0261192920911339.
- [2] Burden, N., Chapman, K., Sewell, F., Robinson, V., “Pioneering better science through the 3Rs: an introduction to the national centre for the replacement, refinement, and reduction of animals in research (NC3Rs)”, *J Am Assoc Lab Anim Sci.*, vol. 54, no. 2, pp. 198-208, Mar. 2015.
- [3] Cheluvappa, R., Scowen, P., Eri, R., “Ethics of animal research in human disease remediation, its institutional teaching; and alternatives to animal experimentation”, *Pharma Res Per*, vol. 5, no. 4, Ago. 2017, doi: <https://doi.org/10.1002/prp2.332>.
- [4] Clark, J. MA., “The 3Rs in research: a contemporary approach to replacement, reduction and refinement”, *BJN*, vol. 120, no. s1, pp. S1–S7, Ago. 2018.
- [5] Doke, S.K., Dhawale, S.C., “Alternatives to animal testing: A review”, *Saudi Pharm J.*, vol. 23, no. 3, pp. 223-229, Lug. 2015, doi: 10.1016/j.jsps.2013.11.002.
- [6] Eskes, C., Whelan, M., “Evolving the Principles and Practice of Validation for New Alternative Approaches to Toxicity Testing”, in *Validation of Alternative Methods for Toxicity Testing*, a cura di Eskes, C., Whelan, M., Berlino, Svizzera: Springer International Publishing, p. 391, 2016.
- [7] Flecknell, P., “Replacement, Reduction, Refinement”, *ALTEX*, vol. 19, no. 2, pp. 73-78, Mag. 2002.
- [8] Fontana, F., Figueiredo, P., Martins, J. P., Santos, H. A., “Requirements for Animal Experiments: Problems and Challenges”, *Small*, vol. 17, no. 15, Apr. 2015, Art. no. 2004182.
- [9] National Research Council, “Continuing Efforts to More Efficiently Use Laboratory Animals”, in *Science, Medicine, and Animals*, 2nd ed., Washington DC, USA: The National Academies Press, pp. 37-39, Nov. 2004.
- [10] Sneddon, L. U., Halsey, L. G., Bury, N. R., “Considering aspects of the 3Rs principles within experimental animal biology”, *J Exp Biol*, vol. 220, no. 17, pp. 3007–3016, Set. 2017, doi: <https://doi.org/10.1242/jeb.147058>.
- [11] Tannenbaum, J., Bennett, B.T., “Russell and Burch's 3Rs then and now: the need for clarity in definition and purpose”, *J Am Assoc Lab Anim Sci.*, vol. 54, no. 2, pp. 120-132, Mar. 2015.

[12] Treccani Online: https://www.treccani.it/enciclopedia/modelli-sperimentali-nella-ricerca-biomedica_%28Enciclopedia-della-Scienza-e-della-Tecnica%29/. (consultato in data 02/09/2021)

Capitolo 2

[13] Ford, K. A., “Refinement, Reduction, and Replacement of Animal Toxicity Tests by Computational Methods”, *ILAR J.*, vol. 57, no. 2, pp. 226-233, Dec. 2016, doi: <https://doi.org/10.1093/ilar/ilw031>.

[14] Huang, H.-J., Lee, Y.-H., Hsu, Y.-H., Liao, C.-T., Lin, Y.-F., Chiu, H.-W., “Current Strategies in Assessment of Nanotoxicity: Alternatives to In Vivo Animal Testing”, *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 22, no. 8, p. 4216, Apr. 2021, doi: <https://doi.org/10.3390/ijms22084216>.

[15] Madden, J.C., Enoch, S.J., Paini, A., Cronin, M.T.D., “A Review of *In Silico* Tools as Alternatives to Animal Testing: Principles, Resources and Applications”, *Altern Lab Anim.*, vol. 48, no. 4, pp. 146-172, Lug. 2020, doi:10.1177/0261192920965977.

[16] Muratov, E.N., Bajorath, J., Sheridan, R.P., et al., “QSAR without borders”, *Chem Soc Rev.*, vol. 49, no. 11, pp. 3525-3564, Mag. 2020, doi: 10.1039/d0cs00098a.

[17] Patrick, G.L., “Quantitative structure-activity relationships (QSAR)” in *Medicinal Chemistry*, Oxford, New York, Tokyo, USA: Oxford University Press, pp. 128-153, 1995.

[18] Polishchuk, P., “Interpretation of Quantitative Structure–Activity Relationship Models: Past, Present, and Future”, *J. Chem. Inf. Model.*, vol. 57, no. 11, pp. 2618-2639, Set. 2017, doi: 10.1021/acs.jcim.7b00274.

Capitolo 3

[19] National Center for the Replacement, Refinement & Reduction of Animals in Research: <https://nc3rs.org.uk/3rsprizewinners#2015>. (consultato in data 10/12/2021)

[20] Pappalardo, F., Russo, G., Musuamba Tshinanu, F., Viceconti, M., “*In silico* clinical trials: concepts and early adoptions”, *Briefings in Bioinformatics*, vol. 20, no. 5, pp. 1699–1708, Set. 2019, doi: <https://doi.org/10.1093/bib/bby043>.

[21] Passini, E., Britton, O.J., Lu, H.R., et al. “Human *In Silico* Drug Trials Demonstrate Higher Accuracy than Animal Models in Predicting Clinical Pro-Arrhythmic Cardiotoxicity”, *Front Physiol.*, vol. 8, pp. 668, Set. 2017, doi: 10.3389/fphys.2017.00668.

- [22] Patterson, E. A., Whelan, M.P., “A framework to establish credibility of computational models in biology”, *Progress in Biophysics and Molecular Biology*, vol. 129, special issue of *Validation of Computer Modelling*, pp. 13-19, Ott. 2017, doi: <https://doi.org/10.1016/j.pbiomolbio.2016.08.007>.
- [23] Pruetz, A.W., Clemmer, J. S., Hester R. L.,”Physiological Modeling and Simulation—Validation, Credibility, and Application”, *Annual Review of Biomedical Engineering*, vol. 22, pp. 185-206, Giu. 2020, doi: <https://doi.org/10.1146/annurev-bioeng-082219-051740>.
- [24] Viceconti, M., Henney, A., Morley-Fletcher, E., “In silico Clinical Trials: How Computer Simulation will Transform the Biomedical Industry”, Gen. 2016, doi: [10.13140/RG.2.1.2756.6164](https://doi.org/10.13140/RG.2.1.2756.6164).
- [25] Viceconti, M., Juárez, M. A., Curreli, C., Pennisi, M., Russo, G., Pappalardo, F., "Credibility of In Silico Trial Technologies—A Theoretical Framing," *IEEE J-BHI*, vol. 24, no. 1, pp. 4-13, Gen. 2020, doi: [10.1109/JBHI.2019.2949888](https://doi.org/10.1109/JBHI.2019.2949888).
- [26] Viceconti, M., Pappalardo, F., Rodriguez, B., Horner, M., Bischoff, J., Musuamba Tshinanu, F., “In silico trials: Verification, validation and uncertainty quantification of predictive models used in the regulatory evaluation of biomedical products”, *Methods*, vol. 185, pp. 120-127, Gen. 2021, doi: [10.1016/j.ymeth.2020.01.011](https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2020.01.011).
- [27] Visentin, R., “in silico testing of artificial pancreas and new type 1 diabetes treatments: model development and assessment”, Ph.D. dissertation, Dep. Of Information Engineering, Padova Univ., Padova, 2016.