

Massimo Tettamanti

Introduzione alle metodologie sostitutive



LEAL - Lega Antivivisezionista

Sommario

Premessa	pag.	3
Introduzione	pag.	5
Metodi non biologici	pag.	6
Metodi biologici	pag.	8
Esempi di applicazione di metodi sostitutivi	pag.	11
Esperimenti per scopi didattico-dimostrativi	pag.	13



Introduzione alle metodologie sostitutive

di Massimo Tettamanti

Premessa

Questo opuscolo è solo una brevissima “carrellata” sul vastissimo campo dei “metodi sostitutivi” e vuole prendere in considerazione unicamente l’aspetto scientifico della questione.

È stato scritto principalmente per quelle persone che, non so se per egoismo, pavidità o incoscienza e pur non sapendo niente dell’argomento, continuano a ripetere frasi quali: “... non si può fare a meno della vivisezione perché è necessaria per alleviare i mali fisici dell’uomo, ... altrimenti come si proverebbero i farmaci e altri prodotti?” etc. I metodi sostitutivi non dovrebbero rientrare nel campo specifico di una società antivivisezionista: trovarli, adottarli, svilupparli (oltre che conoscerli) dovrebbe essere compito e dovere dei ricercatori, degli scienziati, dell’industria e dei governi.

Non è così purtroppo. Spesso si arriva all’assurdo che sono addirittura le società A/V che finanziano ricerche, progetti o borse di studio per la scoperta di nuovi metodi sostitutivi. Diventa così un dovere per una società A/V il propagandare questi metodi, portarli all’attenzione del pubblico (e purtroppo anche dei ricercatori), esigere che siano ulteriormente sviluppati e obbligatoriamente adottati.



E qui devo mettere in guardia dal trarre una falsa e pericolosa conclusione dalla lettura di questo opuscolo: cioè il dare per sicura e scontata l'adozione dei metodi sostitutivi in tempi più o meno brevi e pensare che sarà **solo** grazie a questi che la vivisezione cesserà automaticamente in un futuro abbastanza prossimo.

Non vi è niente di più falso. Sia l'industria che i ricercatori non hanno "molto" interesse all'adozione di questi metodi e alcune cause sono spiegate nel retrospizio di questo opuscolo. Un'altra, importantissima, è che gli animali, con la loro forte resistenza, danno risultati ambigui alle prove di sperimentazione; forniscono così non solo migliori possibilità per sfornare sempre nuovi prodotti ma soprattutto forniscono un alibi in caso di eventuali danni, peraltro molto frequenti, causati all'uomo dall'uso dei prodotti stessi.

Chi non ha afferrato questo concetto è purtroppo ancora ben lontano dall'aver compreso le ragioni della vivisezione; perché è nata, perché si è imposta e perché continua a prosperare.

Ora un'opinione sul termine "sostitutive" o "alternative": è una parola che piace poco, ha un suono ed un "sapore insoddisfacente", dà quasi l'impressione che la vivisezione sia una pratica giustificata o giustificabile e necessaria o inevitabile... Penso che un termine molto più appropriato sia "tecniche scientifiche" (o "umanitarie") in contrapposizione a "tecniche vivisettorie", che sono tutt'altro che scientifiche e umanitarie.

La Le.A.L.. dispone di molta letteratura sull'argomento perciò qui mi basta ricordare e ribadire alcuni punti che penso siano essenziali, e cioè che la vivisezione:

- è una pratica crudele, incivile, amorale;
- non è essenziale all'avanzamento della medicina, della farmacologia, della scienza;
- ha arrecato enormi danni alla salute umana;
- è interamente asservita all'industria, al carrierismo, al lucro.

Anche uno solo di questi punti è sufficiente per condannare la vivisezione e per chiederne l'abolizione, che esistano o no i metodi sostitutivi.

Ricordino gli antivivisezionisti di non adagiarsi mai in false illusioni o pensare che l'aver versato la quota sia sufficiente a mettere a tacere la propria coscienza. È necessario, è indispensabile non solo che continuino a stringersi attorno alla propria Lega, ma anche che la loro vigilanza, il loro impegno fattivo, il loro continuo aggiornamento in materia ed una loro costante opera di propaganda e sensibilizzazione non vengano mai meno affinché siano svelati tutti gli infami retroscena della vivisezione.

Solo così, oltre che con l'aiuto dei metodi sostitutivi, sarà possibile arrivare all'abolizione di questa vergognosa piaga, retaggio di un'umanità cieca, pavida ed egoista.

Kim Buti



Introduzione

Attualmente un gran numero di ricerche medico-biologiche e quasi tutte le prove tossicologiche delle sostanze chimiche previste dalle leggi vigenti vengono compiute su animali.

Per quanto diverse siano tutte queste sperimentazioni il loro punto in comune, la loro essenza, è il presupposto che i risultati ottenuti sugli animali siano, in qualche modo, indicativi dei risultati ottenibili sull'uomo.

Di conseguenza un farmaco, una terapia o una sostanza potenzialmente pericolosa vengono sperimentati prima sull'animale e, solo successivamente, sull'uomo.

Gli animali vengono utilizzati come modelli sperimentali in modo da evitare rischi e pericoli per l'uomo.

Questo presupposto è privo di fondamento: non vi è mai nessuna garanzia che i risultati ottenuti sugli animali siano estrapolabili all'uomo. Le diversità genetiche e biologiche, il diverso manifestarsi delle malattie, le diverse condizioni di vita degli organismi sono tutti fattori, non controllabili più di tanto, che possono alterare, anche in maniera drastica, i risultati di una sperimentazione su animali.

Sostanze curative per gli animali possono risultare mortali per l'uomo, sostanze eccitanti per gli animali possono risultare calmanti per l'uomo, terapie eccezionali ottenute con animali possono rivelarsi fallimentari sull'uomo o viceversa.

I risultati che si ottengono da una metodologia non scientifica come la sperimentazione su animali non possono mai essere considerati indicativi.

Benché non sia compito di questo opuscolo descrivere le problematiche derivanti dall'utilizzo di animali, questa introduzione è necessaria per ca-

pire come mai un numero sempre maggiore di ricercatori sta abbandonando questa pratica inutile e, negli ultimi anni, si è dedicato alla creazione e allo sviluppo di nuove e migliori metodologie di ricerca e di analisi: le metodologie sostitutive.

La richiesta da parte del mondo scientifico di metodi scientifici finalmente affidabili è dovuta soprattutto alla constatazione che, se le prove su animali non sono affidabili, attualmente, la vera cavia delle nuove sostanze e delle nuove terapie è proprio l'uomo. Esiste la necessità, pressante e importante, di sostituire le ormai superate prove con animali con metodologie più scientifiche, più precise, più affidabili e più utili alla società.

Queste metodologie verranno presentate in questo opuscolo e, dato il gran numero di tecnologie disponibili, verranno suddivise in due grandi categorie: i **metodi non biologici** sono quei metodi che fanno uso di scienze quali l'epidemiologia, la statistica, l'informatica, la chimica e l'ingegneria.

I **metodi biologici** fanno uso di colture di batteri, cellule, tessuti o organi soprattutto di origine umana.

Esistono anche metodi biologici che fanno uso di materiale biologico di origine animale ma non verranno presentati in questa sede in quanto tutte le critiche portate alla sperimentazione su animale valgono anche per questa tipologia di metodologie.

La maggiore critica che viene portata alle metodologie che non utilizzano animali è la loro limitatezza.

Non forniscono informazioni sull'organismo *in toto*, sull'organismo completo, ma soltanto su parti di esso.

Tre brevissime considerazioni:

- per molte prove l'informazione limi-



tata, ma localizzata, è sufficiente (ad esempio per valutare una sostanza, come un cosmetico, che può entrare a contatto con l'occhio, con la pelle, ecc... oppure per studiare una sostanza farmacologica che, entrando a contatto con il DNA, può dare effetti cancerogeni o teratogeni);

- è meglio avere solo informazioni parziali ma affidabili che avere molte informazioni, come quelle ottenibili dall'animale *in toto*, ma nessuna di queste indicativa per l'uomo;

- non si pretende di sostituire un organismo con una singola cellula bensì con un insieme di metodologie. Solo con un insieme di colture cellulari e tissutali epatiche, cardiache, renali, nervose, ecc..., si può iniziare a riprodurre, utilizzando programmi informatici, l'intero organismo.

Metodi non biologici

Epidemiologia - È la scienza che studia la frequenza e la distribuzione dei fenomeni epidemici, e quindi delle malattie, nella popolazione. Sono studi che vengono effettuati selezionando due gruppi di persone che sono il più simili possibili tra di loro ma differiscono per una singola caratteristica: ciò che si vuole studiare è l'effetto di questa singola caratteristica sulla popolazione (es. il fumo di sigaretta, l'alcol, una particolare terapia, la vicinanza di una fonte inquinante, caratteristiche genetiche, ecc.). Lo sviluppo delle analisi statistiche permette di mettere in relazione la caratteristica in esame con il formarsi di particolari patologie (tumori, allergie, ecc.).

L'epidemiologia non è solo un metodo alternativo ma è il principale metodo di ricerca medico scientifica esistente. Centinaia di risultati ottenuti su animali non valgono quanto una singola analisi epidemiologica ben effettuata.

Se una sostanza causa morte cellulare, rottura della membrana, alterazione della comunicazione intercellulare dovrà essere provata sull'uomo? **No**. Se una sostanza è potenzialmente cancerogena verrà provata sull'uomo? **No**.

È vero che con questi test non si possono rilevare tutti gli effetti collaterali di un intero organismo, ma se già si può sapere che può far sviluppare un tumore ... non la si proverà mai sull'uomo.

L'insieme di questi test avrà il compito di rilevare *a priori* il maggior numero di effetti tossici di una sostanza.

Le prove con animali sono invece prove *a posteriori*: solo *dopo* aver provato sull'uomo si può verificare la validità delle indicazioni ottenute dall'animale.

Simulazioni Didattiche Computerizzate - Sono la vera novità nel campo dell'insegnamento universitario e possono facilmente sostituire gli esperimenti didattici di dissezione o stimolazione nervosa dei corsi di scienze: molti nuovi programmi sono multimediali, incorporano video e suoni di alta qualità insieme a grafici e testi convenzionali. Possono essere basati sui dati sperimentali già disponibili o generati dalle classiche equazioni scientifiche; spesso includono anche l'influenza della variabilità biologica. È possibile, da parte del docente, adattare alcuni di questi a obiettivi specifici di personale e particolare interesse. Le simulazioni sono facili da utilizzare e, nella maggior parte dei casi, altamente interattive. Gli studenti possono, anche senza essere seguiti, imparare, autovalutarsi e ripetere parti degli esperimenti.



Modelli riproduttivi animali e umani

Possono essere utilizzati per studi di anatomia, fisiologia e chirurgia. Modellini di organi o di interi organismi possono essere usati ripetutamente e con costi minori. Simulatori di pazienti che utilizzano manichini computerizzati e sofisticati operatori di controllo stanno anche sostituendo gli animali nell'addestramento medico, per esempio nei trattamenti di routine e di crisi in anestesologia. Simulatori meccanici, come il simulatore della circolazione messo a punto alla Uppsala University per l'addestramento veterinario, possono dare una eccellente visione d'insieme delle interrelazioni dei componenti di un sistema biologico. Un altro modello molto utile è il Michelangelo, ideato al Politecnico di Milano, che simula tutti i possibili quadri sintomatologici di differenti patologie cardiache. L'apprendimento delle tecniche nella chirurgia di base ortopedica ed emostatica possono anche utilizzare una serie di modelli di arti, fratture e ferite.

Metologie QSAR - Il computer è ormai diventato uno strumento indispensabile in ogni campo scientifico. In che modo questo strumento può essere usato nello studio della tossicità e della farmacodinamica? Per molte categorie di molecole è possibile compiere uno studio per cercare delle relazioni fra la struttura della molecola e la sua attività biologica. Negli studi QSAR (Relazione Quantitativa fra Struttura e Attività) viene preso in considerazione il momento di contatto tra la molecola in esame e il suo corrispondente recettore biologico: si cerca di collegare la tossicità e la farmacodinamica, conseguenti al legame con il recettore, con la struttura molecolare.

In pratica si cerca di dimostrare che la molecola X è tossica perchè ha una

certa struttura, la molecola Y è meno pericolosa perchè ha una struttura leggermente diversa e la molecola Z è la più innocua perchè ha una struttura ancora diversa.

Per una classe di molecole (cioè per sostanze abbastanza simili tra loro) il computer sarà in grado di dire quali saranno pericolose e quali innocue.

In questo modo, quando si vuole preparare una nuova sostanza, sarà possibile conoscere *a priori* la sua azione biologica e la sua pericolosità. Ma non solo!

Ancora prima di costruire la sostanza il computer può suggerire la struttura delle molecole che svolgeranno l'azione biologica migliore; in questo modo vengono già all'inizio limitate al massimo le sostanze da testare.

Le metodologie applicate negli studi QSAR dipendono dalle conoscenze disponibili del sistema biologico in esame.

Se è nota la struttura del recettore o dell'enzima è possibile eseguire studi per l'individuazione della zona specifica di legame; se la zona è già nota è possibile valutare le energie coinvolte nel processo (**approccio diretto**)

Se mancano informazioni sulla zona d'azione è possibile studiare i requisiti di struttura, necessari perchè possa verificarsi l'attività biologica, mediante un'analisi delle proprietà chimico-fisiche (**approccio indiretto**).

L'approccio indiretto è, attualmente, la metodologia più utilizzata; in futuro, probabilmente, le maggiori conoscenze che si otterranno dalla determinazione di molecole di grandi dimensioni comporteranno un aumento dell'approccio diretto.

Esempi di metodi chimici

Corrositex - In questo test una sostanza potenzialmente corrosiva da esaminare viene messa in una fiala contenente un tessuto artificiale di



consistenza gelatinosa dello spessore di 3 centimetri. Più una sostanza è corrosiva più in fretta distruggerà questa membrana e, alcuni rilevatori chimici posti sotto di essa, segnaleranno la fine della prova. Il tessuto artificiale può essere modificato per simulare qualsiasi tipo di pelle.

SOLATEX-PI - La fotoirritazione è uno degli effetti tossici che si possono verificare quando una sostanza chimica, assorbendo i raggi ultravioletti della luce, danneggia la pelle. Esistono infatti sostanze, più o meno irritanti, che, quando vengono a contatto con la luce, si modificano e diventano più pericolose. Il saggio SOLATEX-PI permette lo studio della capacità di crea-

re fotoirritazione di queste sostanze. Gli effetti tossici di fotoirritazione avvengono quando la luce interagisce con la sostanza creando una serie di reazioni chimiche (reazioni di ossidazione, formazione di radicali liberi e successiva interazione con la pelle); il sistema SOLATEX-PI utilizza una speciale membrana e una serie di composti chimici che possono reagire e "indicare" se stanno avvenendo le reazioni pericolose.

Il metodo è preciso, rapido, affidabile e permette di testare anche più sostanze contemporaneamente; permette quindi di valutare sia una sostanza alla volta (per esempio le materie prime di un prodotto) che tutte insieme (per esempio il prodotto finito).

Metodi biologici

I seguenti saggi tossicologici, comunemente definiti metodi *in vitro*, utilizzano colture di procarioti (organismi unicellulari), cellule, tessuti e organi isolati. Tutto il materiale di origine umana può essere recuperato con estrema facilità soprattutto da biopsie e da scarti chirurgici.

I vantaggi, comuni a tutti i seguenti metodi, sono: la scientificità, la rapidità, il basso costo, la possibilità di testare, non solo la singola sostanza ma anche l'insieme e le interferenze di più composti contemporaneamente, la riproducibilità dei risultati ottenuti sia all'interno dello stesso laboratorio che in laboratori diversi.

Test di Ames - Negli anni '70 il prof. Ames e i suoi collaboratori studiarono l'effetto di numerosi composti, potenzialmente cancerogeni, su topi e ratti. I risultati ottenuti mostrarono che alcuni elementi, che sviluppavano tumori nei topi, erano innocui per i ratti e viceversa. Risultava quindi impos-

sibile valutare la pericolosità, per l'uomo, di un determinato elemento.

L'inevitabile conclusione di questi esperimenti fu l'abbandono delle sperimentazioni su animali e la creazione di una nuova metodologia di valutazione.

Il fondamento scientifico che ha permesso la creazione, e i successivi miglioramenti, del test è la capacità di molti carcinogeni di generare centri elettrofilici che si legano al DNA cellulare.

In pratica, per sapere se una sostanza è potenzialmente cancerogena o teratogena (se può dare, cioè, azione mutagena), viene messa a contatto con ceppi di batteri (*Salmonella typhimurium*) in un apposito terreno di coltura.

Viene usata una varietà del batterio, appositamente modificata, che, per crescere, non ha bisogno di Istidina. Se la sostanza testata è mutagena modifica il batterio e gli ricrea il bisogno di Istidina.



Test di Bettero - Questo test viene utilizzato per testare sostanze potenzialmente irritanti per l'occhio. La prova viene eseguita sulla lacrima umana che, in condizioni normali, contiene mediatori chimici (Istamina, Serotonina, Leucotrene 4, ecc...) dell'infiammazione solo in piccole quantità.

La sostanza in esame viene posta a contatto con la lacrima umana: se la sostanza è un irritante di qualsiasi genere il numero di mediatori chimici aumenta rapidamente.

In questo modo si può determinare con estrema facilità e precisione la forza irritante di una sostanza.

Gli altri vantaggi di questo metodo sono quelli comuni a quasi tutti i metodi *in vitro*: il costo è basso e il metodo è rapido; ma possiede un'altra importante particolarità, è *personalizzabile*.

Vi sono persone allergiche che accusano irritazione congiuntivale per effetto di sostanze che risultano innocue per la maggior parte degli individui.

Prelevando la lacrima di una determinata persona, il metodo fornirà una risposta specifica per quella persona.

È quindi possibile studiare la sostanza sia in generale, sia in maniera specifica per quelle persone che possono avere particolari problemi.

Microtox - Utilizzato in questi anni esclusivamente per analisi in campo ambientale, il Microtox system è invece uno strumento che si presta benissimo a valutare la pericolosità anche di molte altre sostanze potenzialmente tossiche.

Il saggio Microtox consiste nel mettere a contatto con la sostanza da analizzare, che può essere liquida o solida, un ceppo di batteri marini (*Photobacterium phosphoreum*) che presentano una luminescenza naturale.

La luce emessa è il risultato di un processo metabolico naturale delle cellule; in pratica, questa luminescenza, riflette il loro stato di vita.

Una sostanza tossica inibisce il metabolismo cellulare e fa diminuire la luminescenza in misura proporzionale alla propria concentrazione.

Esiste anche una variante di questo metodo che fa uso di un mutante naturale del *Vibrio Fischeri*.

Con questa recentissima metodologia è possibile rilevare la presenza di sostanze mutagene.

Questo mutante naturale non è luminoso ma, se viene a contatto con una sostanza mutagena, subisce una variazione e lo diventa.

Colture di epatociti - Questa metodologia è particolarmente importante perchè gran parte delle trasformazioni chimiche che una sostanza subisce quando entra in contatto con un organismo avviene, nell'uomo, proprio nel fegato.

Gli epatociti possono essere usati, in farmacologia e in tossicologia per diversi studi; i principali sono i seguenti.

Studi di biotrasformazione - Una sostanza a contatto con un organismo si modifica e si rompe formando dei metaboliti che, essendo più polari del composto originario, possono essere espulsi con maggiore facilità. Può capitare che, anche se la sostanza in esame è inizialmente innocua, trasformandosi diventa tossica. Dato che le colture di epatociti contengono gli enzimi che causano queste reazioni di trasformazione, il loro impiego risulta rivoluzionario nella valutazione della pericolosità di una sostanza. Diviene quindi possibile sapere come si trasformerà la sostanza nell'organismo umano ricreando, artificialmente, l'organo responsabile delle reazioni biochimiche in esame.

Studi tossicologici - Gli epatociti



possono essere usati per valutare l'effetto tossico di una sostanza chimica nelle cellule (modificazioni cellulari, rottura della membrana, ecc.), nel fegato (valutando la pericolosità della sostanza e di tutte le sue trasformazioni bio-chimiche) e nei geni (alcuni metaboliti possono essere attivi nell'attaccare e danneggiare il DNA).

Proprio per le sue capacità di prevedere le modifiche di una sostanza, questa metodologia può anche essere affiancata ad altri test che, in questo modo, possono svolgere in maniera ancora più completa il loro compito.

Studi meccanicistici - Epatociti isolati offrono la possibilità di studiare, in dettaglio, i meccanismi con cui avvengono le azioni biologiche; non solo cosa avviene, ma anche *in che modo* avviene.

Studi biocinetici - gli epatociti sono un insostituibile metodo per studiare il trasporto delle sostanze a livello cellulare.

Risulta necessario aggiungere altri due dati:

- Le colture di epatociti **umani** (prelevabili nel corso di biopsie) hanno permesso ai dr Castell e Gomez - Lechon dell'Hôpital de La Fe di Valencia (Spagna) di vincere, nel 1990, il *Prix de la Recherche*, istituito dalla Federazione Europea delle Associazioni delle Industrie Farmaceutiche. Le qualità che sono state riconosciute a questo metodo sono: la maggiore affidabilità (utilizzando epatociti umani si eliminano i problemi legati alle differenze metaboliche fra le varie specie animali), minori costi, risposte più rapide, possibilità di eseguire **precocemente** alcune ricerche fondamentali per la valutazione di un farmaco.

- Il Bollettino di informazione sui farmaci (Novembre 1994) del Ministero della Sanità Italiano informa di "*un probabile effetto genotossico del citrone acetato sull'uomo, sostenuto da*

uno studio preliminare condotto su epatociti umani in coltura...".

Se si fossero presentati effetti tossici su animali, nessuno si sarebbe preoccupato; è ormai noto che specie diverse possono reagire in modo diverso.

Agar Overlay Test (AOT) - L'AOT è un saggio di citotossicità usato per identificare lo stato di vita di cellule esposte ad una sostanza chimica.

Questo test può essere utilizzato per molteplici scopi; recentemente è stato usato anche per testare l'irritabilità oculare fornendo ottimi risultati.

Spiegare l'AOT in maniera particolareggiata esula dagli scopi di questa pubblicazione ma, in pratica, il test consiste nel valutare il danno provocato alla vitalità delle cellule e metterlo in relazione con la dose di sostanza chimica utilizzata.

Lactate Dehydrogenase (LDH) release

- L'enzima LDH può essere usato come indicatore della distruzione della membrana cellulare. Gli effetti di sostanze chimiche a contatto con colture cellulari o tissutali si possono valutare misurando la quantità di LDH nell'ambiente di reazione.

Più la sostanza chimica distrugge le membrane cellulari maggiore sarà la quantità di LDH rilasciata nell'ambiente di reazione.

Neutral Red Uptake (NRU)

- L'NRU è un saggio di citotossicità usato per identificare il numero di cellule rimaste vive dopo esposizione ad una sostanza chimica. Si basa sulla capacità di assorbimento, da parte delle cellule vive e intatte, del colorante NR (3 - amino - 7 - dimethyl - amino - 2 - methylphenazine idrocloride); le cellule uccise dalla sostanza chimica non saranno invece in grado di assorbire il colorante.



Neutral Red Release - L'NRR è un saggio di citotossicità in grado di misurare il danno causato da una sostanza chimica alla membrana cellulare. Viene solitamente usato per valutare la tossicità acuta di una sostanza.

Le cellule, pretrattate con il colorante NR, vengono esposte ad alte dosi della sostanza in esame per brevi periodi di tempo.

Se la membrana cellulare viene attaccata e distrutta rilascia il colorante nell'ambiente di reazione.

Total Protein Content (TPC) - Il più famoso dei saggi citotossicologici usato per identificare l'inibizione della crescita cellulare è, probabilmente, il TPC. In questo metodo una sostanza chimica viene posta a contatto con una coltura di cellule in crescita esponenziale e viene successivamente misurato il contenuto proteico totale.

Il limite dei metodi di determinazione del TPC era dovuto alla loro incapacità di valutare la tossicità delle sostanze volatili. Il metodo è stato recentemente modificato e reso più sensibile e adattato allo studio di queste categorie di sostanze.

MTT Test - Un saggio citotossicologico poco conosciuto ma estremamente valido è l'MTT Test. Come l'NRU, anche l'MTT serve per valutare la diminuzione di vitalità delle cellule a

contatto con una sostanza chimica. Se le cellule sono vive, sono in grado di ridurre chimicamente il colorante 3 - (4,5 - dimethylthiazol - 2yl) - 2,5 - dimethyltetrasolium) bromide (MTT).

Inibizione del legame delle cellule tumorali (ITC) - Il test ITC ha dimostrato di essere in grado di identificare sostanze potenzialmente teratogene; infatti, in presenza di queste sostanze, risulta inibito il legame di cellule tumorali ad una superficie di plastica trattata con Concanavalina A. Con questo saggio è inoltre possibile valutare se il danno, che la sostanza in esame può causare, riguarda la struttura della membrana oppure le sue funzioni.

Tecnica del Disco Epidermico (EST)

- Questo test è utilizzato in maniera specifica per identificare sostanze corrosive per l'occhio o per la pelle.

Modelli *in vitro* della pelle umana sono numerosi e i più recenti sono in grado di fornire molte informazioni utili per le valutazioni di effetti biochimici e biocinetici; la descrizione di questi modelli risulta, però, eccessivamente complicata ed esula dagli scopi di questa pubblicazione.

Nel test EST viene misurata la resistenza chimica di un modello, in pratica di una fettina di pelle, dopo esposizione alla sostanza in esame.

Esempi di applicazione di metodi sostitutivi

Istituto Europeo di Oncologia - "All'Istituto Europeo di Oncologia non si useranno per niente animali di laboratorio. Lo spazio inizialmente previsto per gli stabulari è stato soppresso e trasformato in laboratorio di colture cellulari".

Questa dichiarazione del professor Umberto Veronesi è indicativa di una presa

di coscienza, forse un po' tardiva, dell'inutilità della sperimentazione su animali nella ricerca contro il cancro.

È sempre il professor Veronesi che ne descrive l'origine: "Gran parte delle ricerche sul cancro svoltesi nella prima metà di questo secolo è stata eseguita, come si è visto, soprattutto su animali di laboratorio. Si sperava di



ottenere un modello sperimentale che riproducesse nell'animale le condizioni di sviluppo dei tumori umani e di poter trasferire all'uomo i risultati ottenuti. Ma intorno agli anni Sessanta ci si è resi conto che questa seducente ipotesi di lavoro non era realizzabile. I tumori dei topi, dei ratti, dei polli o delle cavie sono sostanzialmente diversi da quelli dell'uomo; diverso è il loro modo di formarsi; diverso il loro modo di accrescersi; diverso è il loro modo di metastatizzare. Perciò, nonostante l'enorme mole di informazioni che gli studi sperimentali ci avevano fornito sul fenomeno "cancro", l'utilizzazione in campo umano di tali informazioni rimaneva nel complesso trascurabile. Era dunque necessario trasferire le ricerche direttamente sui tumori dell'uomo".

Attualmente vengono preparati modelli in provetta utilizzando cellule in coltura dell'ammalato stesso. Risulta di conseguenza possibile studiare sia il tumore che la terapia in maniera scientifica, dettagliata e precisa.

Materiali di interesse chirurgico - Un Biomateriale è una sostanza (o un insieme di sostanze) che può entrare in contatto, o sostituire, un tessuto o un organo del corpo umano. Alcuni biomateriali molto conosciuti sono, ad esempio, i fili di sutura, i cateteri, i drenaggi, le sonde, i dispositivi per l'assistenza respiratoria, le medicazioni, ecc..

Altri più specialistici sono le protesi vascolari e ortopediche, le valvole cardiache, gli organi artificiali e le loro componenti, ecc.

Soprattutto per le applicazioni nel campo cardiovascolare è importante determinare il ruolo del biomateriale nel modificare il contenuto di emoglobina, nel provocare trombi e sviluppare infezioni.

Il test dell'emolisi *in vitro* è un metodo

ormai sviluppato e abbastanza utilizzato: consiste nel mettere a contatto il biomateriale da testare con piccole quantità di sangue in un incubatore a 37°C per circa 60 minuti. Successivamente, il sangue viene centrifugato e il contenuto di emoglobina nel sovrantante viene misurato tramite uno spettrofotometro.

Il test di trombogenicità *in vitro* viene eseguito allo stesso modo e, alla fine dell'esperimento, viene valutata la capacità del biomateriale a provocare trombi.

Il test di adesività batterica *in vitro* permette di valutare il ruolo del biomateriale nello sviluppo di infezioni: la sostanza da testare viene messa a contatto con una sospensione di batteri a carica nota. Alla fine dell'esperimento viene misurata la quantità di batteri rimasta attaccata al biomateriale.

Vivisezione a scopi militari - Alcuni laboratori di ricerca dell'Esercito Americano hanno iniziato a mettere a punto metodologie sostitutive all'uso di animali per testare sostanze destinate ad uso militare.

Prima metodologia - Dato che l'intossicazione da Cianuro continua ad essere un problema sia civile che militare e l'utilizzo di animali risulta costoso e non affidabile, è stato sviluppato un metodo *in vitro* per cercare eventuali antidoti alla sostanza tossica.

Con questo metodo è possibile studiare, in una soluzione salina, in un plasma o in un campione di sangue, il legame con lo ione Cianuro e eventuali possibili antidoti. È attualmente possibile compiere una stima preliminare rapida ed economica di sostanze che a) possono interagire direttamente col Cianuro, b) possono interagire in maniera indiretta, c) possono interagire in entrambi i modi.



Questo metodo da solo ha permesso di eliminare, perchè inutili o pericolose, 6 sostanze su 9 testate.

Seconda metodologia - IL *Neutral Red Uptake (NRU)* si è dimostrato molto valido per testare una ventina di tipologie diverse di munizioni.

L'utilizzo di colture tissutali umane ha già sostituito, in alcuni centri di ricerca, l'utilizzo di animali.

Istituti statunitensi ed europei, soprattutto britannici, hanno abbandonato l'inutile sperimentazione su animali per dedicarsi alle moderne e più interessanti metodologie di ricerca.

Importanti risultati sono già stati raggiunti, ad esempio, nello studio della formazione e crescita di diverse tipologie di tumore, di patologie come l'epilessia, la distrofia muscolare, il morbo di Parkinson, l'AIDS, ecc.

Ultimamente stiamo seguendo con interesse gli studi sulle osteoartro-

si (London's Kennedy Institute of Rheumatology) tramite colture di cartilagine umana e dischi intervertebrali e sull'epilessia (National Institutes of Health in Bethesda e University of Tennessee Center for the Health Sciences) su colture tessutali cerebrali.

Importantissima è anche la notizia dell'ottobre 1996 della ditta Pharmagene, situata a Royston, nell'Hertfordshire: dal 1997, per testare nuovi farmaci, non vengono più utilizzati animali.

Bob Coleman, uno dei fondatori della ditta, ha dichiarato alla rivista *New Scientist* la decisione di eliminare la sperimentazione su animali sostituendola con le più affidabili colture tissutali umane.

Si sono attrezzati per avere una banca di tessuti umani e molecole biologiche provenienti da tutto il corpo in modo da testare con sicurezza i loro nuovi prodotti.

Esperimenti per scopi didattico-dimostrativi

Ogni anno migliaia di animali vengono uccisi per gli studenti delle facoltà scientifiche delle università italiane.

All'interno dei laboratori didattici lo studente generalmente non lavora su animali vivi; è il docente o uno degli assistenti che, subito prima dell'inizio dell'esercitazione, uccide l'animale (le specie animali più utilizzate sono vermi, rane, roditori, conigli, cani, molluschi e crostacei).

Siamo attualmente in grado di procurare e di offrire gratuitamente, alle Università interessate, circa 800 metodologie alternative all'uso di animali per scopi didattico-dimostrativi.

Per acquisire i fondi necessari è stata creata una Borsa di Studio, patrocinata e parzialmente finanziata da alcuni comuni della provincia di Milano,

dedicata ad Alessandro Virtuani, giovane attivista antivivisezionista recentemente scomparso.

Abbiamo già ottenuto numerosi precedenti mondiali che dimostrano quanto sia valida questa proposta: abbiamo coinvolto amministrazioni comunali, università, facoltà scientifiche; abbiamo organizzato la pubblica firma di protocolli di intesa, gestito e finanziato l'acquisto di materiale didattico sostitutivo dagli USA e dall'Inghilterra, ottenuto dichiarazioni ufficiali su verbali di consigli di facoltà contro la sperimentazione didattica.

Di seguito vengono elencati i risultati raggiunti.

Atenei che hanno rinunciato ufficialmente alla sperimentazione animale



a scopo didattico e, in alcuni casi, hanno da noi ricevuto forniture gratuite di materiale didattico:

- *Università degli Studi di Modena e Reggio Emilia, Facoltà di Scienze matematiche fisiche e naturali*
- *Università degli Studi di Modena e Reggio Emilia, Facoltà di Farmacia*
- *Università degli Studi di Torino, Facoltà di Medicina Veterinaria*
- *Università degli Studi di Torino, Facoltà di Scienze matematiche fisiche e naturali*
- *Università degli Studi di Torino, Facoltà di Farmacia*
- *Università degli Studi di Parma, Facoltà di Medicina Veterinaria*
- *Università degli Studi di Pavia, Facoltà di Farmacia, dipartimento di Farmacologia Sperimentale e Applicata*

Amministrazioni Comunali o Regionali che si sono pubblicamente dichiarate contrarie alla sperimentazione didattica o disponibili ad accordi con gli Atenei per la sua abolizione:

- *Comune di Modena, Assessorato alle Politiche Ambientali e Ufficio Diritti degli Animali*
- *Comune di Parma, Assessorato alle Politiche Ambientali e Ufficio Diritti degli Animali*
- *Comune di Ferrara, Assessorato alle Sanità*
- *Comune di Genova, Assessorato alle Politiche Ambientali e Ufficio Tutela Animali*
- *Consiglio Regionale Piemonte*

È importante fare due segnalazioni:

- in base ai precedenti ottenuti, non è più possibile, da parte delle università, sostenere l'impossibilità di sostituire gli animali nelle prove didattico dimostrative: questo implica che, anche in base alle attuali normative, queste prove dovrebbero essere proibite;
- sempre in base ai precedenti otte-

Alcuni dei modelli



già disponibili



nuti abbiamo quindi la possibilità di abolire l'uso di animali nella didattica. Le leggi attuali sono, per questo argomento, tutte dalla nostra parte e i precedenti ci sono.

Ovviamente più precedenti otteniamo e maggiori sono le possibilità di ottenere una legge che abolisca, su tutto il territorio nazionale, la sperimentazione su animali a scopo didattico.

È per questo motivo che ti chiediamo un aiuto economico.

Non è una richiesta vaga: **per la prima volta al mondo stiamo ottenendo l'abolizione di una intera categoria di sperimentazioni su animali.**

Arrivati a questo punto non possiamo lasciare che l'iniziativa fallisca esclusivamente per un motivo economico. L'importanza di quello che stiamo facendo è racchiusa nelle seguenti parole del professor Russell il quale, nel suo laboratorio, offre agli studenti una serie di esperimenti che non richiedono l'utilizzo delle tradizionali dissezioni:

"Abbiamo bisogno di un approccio radicalmente differente nell'insegnamento della biologia, un approccio che si focalizza maggiormente sulla vita stessa e sulla pienezza degli organismi viventi."

"Il messaggio che ho cercato di trasmettere è molto semplice: se la biologia viene insegnata in modo da sviluppare un senso di meraviglia e di rispetto per la vita, e se lo studente si sente internamente arricchito dai suoi studi, allora si porrà, come obiettivo della propria, il preservare e il proteggere tutta la vita e dedicherà, io credo, se stesso a un mondo migliore e più umano per gli animali e per la specie umana".

George Russell, professore di Biologia all'Università di Adelphi e editore della rivista Orion.



Vuoi aiutarci?

Ecco alcuni modi con i quali puoi aiutarci nella lotta per la civiltà, per porre fine alle sofferenze degli animali da laboratorio e per difendere la nostra stessa salute.

- Associati alla LEAL. Questo è fondamentale se vuoi aiutare la causa antivivisezionista devi avere sempre informazioni attuali ed essere al corrente delle attività della Lega. Queste informazioni verranno date anche tramite il nostro periodico La Voce dei Senza Voce.

- Distribuisci volantini e letteratura della LEAL, fai affiggere manifesti, poster e locandine.

- 3 - se abiti in una località dove non esiste una sezione della LEAL cerca di crearne una che operi autonomamente a livello locale.

- Aiuta a raccogliere fondi e a trovare nuovi soci.

- Scrivi, ogni volta che si presenta l'occasione, ai giornali e ai periodici, sia nazionali che locali, mettendo a fuoco l'odissea degli animali e l'immoralità della vivisezione e chiedi appoggio per la LEAL.

- Incoraggia i più giovani a mostrare pietà per tutti gli indifesi e i deboli, inclusi perciò anche gli animali.

- Mettiti in contatto con gli insegnanti e cerca di organizzare dibattiti nelle scuole.

- Scrivi ai membri della Camera e del Senato attirando la loro attenzione sul problema.

- Informati sul problema e studialo in tutti i suoi aspetti, anche se è una materia raccapricciante, in modo da poterne discutere con competenza e sensibilizzare quante più persone possibile.

- Non sfuggire alla discussione, anzi cerca di provocare l'argomento; la vivisezione ha sempre prosperato sulla segretezza ed è proprio questa cortina di silenzio e omertà che dobbiamo infrangere.

La LEAL

Vuole svegliare la coscienza degli italiani all'iniquità, crudeltà ed inutilità della sperimentazione animale e vuole ottenere leggi che la proibiscano.

In concreto questo è quanto si propone e fa:

- **denunciare** l'immoralità e l'amoralità della vivisezione;

- **dimostrare** i pericoli dell'estrapolazione all'uomo dei risultati della sperimentazione animale;

- **attirare l'attenzione** sui metodi sostitutivi che non richiedono l'uso di animali; finanziare ricerche per l'ulteriore sviluppo di questi metodi;

- **svelare** gli enormi interessi carrieristici, commerciali e di lucro nascosti dietro la vivisezione fornendo relatori per conferenze, discorsi e dibattiti; materiale audiovisivo e letteratura sul problema;

- **assicurarsi** l'interesse e l'appoggio di Deputati e Senatori per fare dichiarare illegittimo questo metodo di ricerca;

- **promuovere** la cooperazione di tutti gli enti protezionistici.

La LEAL è una lega nata nel maggio 1978 con l'intento di condurre con sistemi moderni una lotta fattiva e organizzata alla vivisezione.

Incoraggia l'aiuto attivo dei soci a qualsiasi livello e ne promuove la cooperazione. È in contatto con le maggiori Leghe Antivivisezioniste estere ed è **socia dell'Associazione Internazionale Contro Gli Esperimenti Animali** che ha stato consultivo all'O.N.U.

Lo scopo primario della LEAL è la lotta alla vivisezione; è sensibile però a quanto avviene in altri campi e che considera offesa alla civiltà: caccia e uccellazione, commercio animali e pellicce, randagismo o abbandono animali, maltrattamenti, tagliole e trappole; allevamenti intensivi ecc. È sempre pronta a collaborare con tutti su qualsiasi di questi problemi.

PER ISCRIVERSI

c/c p. n. 12317202 Milano

QUOTE ASSOCIATIVE

Lire	15.000	Giovanile (fino a 17 anni)
Lire	35.000	Ordinario
Lire	70.000	Sostenitore
Lire	150.000	Benemerito
Lire	600.000	Straordinario

Le quote includono l'abbonamento al nostro notiziario **AV La voce dei senza voce**



LEAL - Lega Antivivisezionista

20124 Milano - Via Settala, 2 - Tel. 02.29401323 - 02.2046512 - Fax 02.29523326
www.leal.it - e-mail: parliamone@leal.it