

Senato della Repubblica, 1° Commissione Affari costituzionali

A.S. 1337 - Conversione in legge del decreto-legge 27 dicembre 2024, n. 202, recante disposizioni urgenti in materia di termini normativi

Breve presentazione di Research4Life

Research4Life (R4L) è una **piattaforma italiana multistakeholder** che dal 2015 riunisce numerosi soggetti – quali **enti non profit, Università, IRCCS, ospedali, società scientifiche, associazioni di pazienti e di categoria** – impegnati nell'attività di **ricerca biomedica** per lo sviluppo di risposte ai bisogni di salute pubblica.

Direttiva 2010/63/UE in materia di protezione degli animali utilizzati per scopi scientifici

La **direttiva 2010/63/UE** sulla protezione degli animali utilizzati per scopi scientifici rappresenta il **miglior compromesso possibile** tra le esigenze di **tutela del benessere animale** e quelle della **ricerca biomedica**, motivo per cui il provvedimento è stato **accolto con favore anche dalle associazioni animaliste europee**.

Tale direttiva ha aggiornato la normativa in materia del 1986 (Direttiva 86/609/CEE), in linea con l'**articolo 13 del Trattato di Lisbona** attraverso il quale *“L’Unione e gli Stati membri tengono pienamente conto delle esigenze in materia di benessere degli animali in quanto esseri senzienti, rispettando nel contempo le disposizioni legislative o amministrative e le consuetudini degli Stati membri”*.

Fine ultimo della Direttiva – che rappresenta **una delle cornici normative più stringenti e avanzate a livello mondiale** in materia – è la **graduale ma completa sostituzione del modello animale** di pari passo con la disponibilità di nuovi metodi. Al contempo, grande attenzione viene data alla riduzione del numero di animali coinvolti, al perfezionamento dei metodi e alla trasparenza delle attività dei ricercatori, secondo il **principio internazionale delle “3R”**, ovvero *Reduce, Refine e Replace*.

Procedura d'infrazione 2016/2013 a carico dell'Italia

Nel decreto legislativo n. 26/2014 di recepimento della Direttiva citata, il legislatore italiano ha introdotto **in maniera ingiustificata, priva di fondamento scientifico, norme più restrittive di quelle europee**, che hanno condotto la Commissione europea ad avviare la **procedura di infrazione n. 2016/2013** nei confronti del nostro Paese.

Nel parere motivato che la Commissione europea ha inviato all'Italia vi sono decine di punti di non conformità tra la Direttiva e il decreto legislativo italiano di recepimento contestati, i quali sono riconducibili ad alcune criticità principali sintetizzate di seguito.

In primo luogo, il **divieto di allevamento** sul territorio italiano di alcune specie (art. 10, comma 5, DLgs 26/2014), che entra in forte contrasto con l'intento della Direttiva Europea (art. 10, comma 1) di **garantire la massima protezione possibile di quegli animali** che è ancora necessario coinvolgere nelle ricerche. La Direttiva, infatti, **impone che tutti gli animali provengano da allevamenti autorizzati** – quindi facilmente **ispezionabili e controllabili** – vietando, dunque, la cattura in natura. I ricercatori italiani possono sempre ricorrere all'**acquisto da allevamenti posti in altri Paesi** (europei o extra-europei), ma ciò sicuramente **non giova né al benessere degli animali** (costretti a lunghi

spostamenti fonte di forte stress), **né alla competitività della ricerca italiana**, esposta ad un notevole aumento dei costi, nonché alla disponibilità dei venditori.

Inoltre, **il Dlgs di recepimento** – all’art. 5, comma 2, lettere *d*), *e*) ed *f*) – **intende vietare** l’autorizzazione di procedure basate sul **modello animale per le ricerche su xenotrapianti d’organo** (lettera *d*), negli studi sulle **sostanze d’abuso** (lettera *e*) e nel corso delle **esercitazioni didattiche** (lettera *f*), **salvo alcune eccezioni** (formazione universitaria e alta formazione in medicina veterinaria, alta formazione dei medici). Si tratta di **limitazioni che non trovano riscontro né nella Direttiva, né nei provvedimenti attuativi adottati dagli altri Stati membri**. È da notare, inoltre, che **non esistono giustificazioni scientifiche ai divieti di cui alle lettere *d*) ed *e*)**, che quindi paiono esclusivamente di carattere ideologico, così come è **privo di rationale vietare le esercitazioni a biologi, farmacisti e biotecnologi**, i quali saranno i ricercatori che in maggior numero popoleranno i laboratori di tutto il mondo.

Moratoria dei divieti di sperimentazione animale per xenotrapianti d’organo e sostanze d’abuso

I **divieti di sperimentazione animale negli studi su xenotrapianti d’organo e sostanze d’abuso** sono stati fin da subito **sottoposti a moratoria** (art. 42, comma 1, Dlgs n. 26/2014) e **prorogati negli anni** attraverso ulteriori interventi normativi, oltre ad essere stati **assoggettati alle verifiche del Centro Nazionale di Riferimento sui Metodi Alternativi** (art. 42, comma 2, Dlgs n. 26/2014) in merito alla effettiva necessità del ricorso a modelli animali. Puntualmente tali verifiche hanno attestato che purtroppo, **allo stato attuale, non esistono metodi alternativi al modello animale applicabili in questi ambiti di ricerca**. Tale **evidenza** è stata **confermata dalla Relazione sullo stato delle procedure di sperimentazione autorizzate per le ricerche sulle sostanze d’abuso** trasmessa dal **Ministero della Salute** alle Camere nel **luglio del 2020**.

Recenti sviluppi parlamentari

Nell’ambito della conversione in legge del **Decreto-legge di proroga termini 2021** (DL n. 228/2021), è stata approvata **una proroga triennale che differisce al 1° luglio 2025 l’entrata in vigore dei divieti** di sperimentazione animale negli studi sugli xenotrapianti d’organo e le sostanze d’abuso (art. 4, c. 6).

Quando si parla di **ricerche sulle sostanze d’abuso**, si fa riferimento agli studi che **indagano i meccanismi tramite i quali si sviluppano i fenomeni di abuso** di sostanze, **tra cui i farmaci**. Ad esempio, ogni farmaco che sia in grado di superare la barriera emato-encefalica (e quindi di raggiungere il cervello) deve essere testato per le sue potenziali attività di abuso. Si pensi, solo a titolo esemplificativo, ad un farmaco contro il mal di testa: se fosse efficace, ma rendesse il paziente dipendente, non potrebbe essere certo utilizzato.

Non a caso, la citata **Relazione** sulle sostanze d’abuso **del Ministero della Salute** ha rilevato come **l’eventuale entrata in vigore dei divieti**, oltre a far avanzare la procedura di infrazione, **comprometterebbe gli studi in ambito farmacologico**, come quelli sul controllo del dolore e di alcune malattie neurodegenerative.

Gli **studi sugli xenotrapianti d’organo**, invece, rappresentano una **concreta speranza per moltissimi pazienti che per anni aspettano un donatore compatibile** per un trapianto all’interno di interminabili liste di attesa, con la terribile conseguenza che spesso molti di loro non arrivano a vedere la data dell’intervento.

Sul piano della didattica, occorre considerare come **la corretta formazione** del personale che partecipa alle sperimentazioni rappresenti un **requisito fondamentale** – richiamato anche dall’art. 23 del DLgs 26/2014 – **per il corretto sviluppo delle ricerche e per garantire il benessere degli animali coinvolti**. La maggior parte dei ricercatori che utilizzano modelli animali sono biologi, farmacisti e biotecnologi ai quali è fondamentale consentire un percorso di **formazione anche pratica** e non solo teorica.

Auspici

Alla luce di quanto illustrato, fermo restando che l’archiviazione totale della procedura d’infrazione rappresenta la migliore soluzione auspicabile, nelle more di un intervento in questa direzione, **Research4Life auspica quantomeno una nuova proroga della moratoria**, la cui scadenza è più imminente di quanto non si pensi, soprattutto se si considera che, **da qui all’estate, l’unico veicolo normativo che si prospetta per scongiurare l’entrata in vigore dei divieti, è il Decreto-legge di Proroga termini all’esame di questa Commissione**.

Senza un intervento in questa direzione, si rischia un ulteriore avanzamento della procedura di infrazione e una significativa compromissione della ricerca su farmaci e trapianti.

Proposta emendativa

All’articolo 4, dopo il comma 12, è aggiunto il seguente:
 12-bis. All’articolo 42, comma 1, del decreto legislativo 4 marzo 2014, n. 26, le parole: «1° luglio 2025» sono sostituite dalle seguenti: «1° gennaio 2026».

Testo a fronte

Decreto legislativo del 4 marzo 2014 n. 26 vigente	Decreto legislativo del 4 marzo 2014 n. 26 come modificato dalla presente proposta
<p style="text-align: center;">Art. 42</p> <p style="text-align: center;">Disposizioni transitorie e finali</p> <p>1. Le disposizioni di cui all'articolo 5, comma 2, lettere d) ed e), ed all'articolo 16, comma 1, lettera d), si applicano a decorrere dal 1° luglio 2025; la disposizione di cui all'articolo 16, comma 1, lettera c), si applica fino al 31 dicembre 2016.</p>	<p style="text-align: center;">Art. 42</p> <p style="text-align: center;">Disposizioni transitorie e finali</p> <p>1. Le disposizioni di cui all'articolo 5, comma 2, lettere d) ed e), ed all'articolo 16, comma 1, lettera d), si applicano a decorrere dal 1° gennaio 2026; la disposizione di cui all'articolo 16, comma 1, lettera c), si applica fino al 31 dicembre 2016.</p>

Allegati

- “Relazione sullo stato delle procedure di sperimentazione autorizzate per le ricerche sulle sostanze d'abuso” del Ministero della Salute (luglio 2020)
- “Mozione sulla regolazione della sperimentazione su modelli animali” del Comitato Nazionale per la Biosicurezza, le Biotecnologie e le Scienze della Vita – CNBBSV (dicembre 2020)
- “Documento per affermare la centralità della ricerca e della sperimentazione animale” della Conferenza dei Rettori delle Università Italiane – CRUI (novembre 2020)

Documento per affermare la centralità della ricerca e della sperimentazione animale

Le Università Italiane ribadiscono la centralità della ricerca scientifica come valore fondamentale per il progresso sociale, culturale ed economico del nostro Paese. Le preoccupanti vicende legate all'epidemia di COVID-19 hanno contribuito a far emergere quanto la ricerca scientifica in Italia rappresenti un'eccellenza del Paese e un riferimento nel panorama mondiale. È un dato di fatto che, in momenti critici per la salute della popolazione e di fronte a patologie gravi o incurabili, si chiede alla Scienza di fornire soluzioni definitive nel minor tempo possibile. Per agevolare la risposta a queste sollecitazioni, è indispensabile rispettare e sostenere i fondamenti metodologici della ricerca scientifica biomedica. La sperimentazione animale rientra tra i metodi e mezzi necessari per arrivare a terapie efficaci e sicure. L'uso di animali è infatti previsto nell'ultima fase della sperimentazione che precede le prove di farmaci e terapie sull'uomo, la così detta "ricerca preclinica" ed è indispensabile nella ricerca di base, in particolare nel campo degli studi sul cervello e le sue patologie. Negli ultimi decenni, proprio per salvaguardare la sperimentazione animale sono state emanate norme e direttive che ne tutelano i fondamenti. La sperimentazione animale è riconosciuta e normata dalla Direttiva Europea 63/2010, la quale stabilisce che l'impiego di animali vivi continua ad essere necessario per tutelare la salute umana, animale e l'ambiente. L'impiego di animali nella ricerca è anche previsto da linee guida internazionali (CFR, FDA, EMA, WHO) e specificamente richiesta da enti regolatori (EMA, CBER) per rispondere a domande sulla tossicità, tolleranza ed efficacia di una terapia, ed è passaggio imprescindibile dello sviluppo di nuovi approcci terapeutici. In questo contesto gli animali sono alleati indispensabili della ricerca scientifica, le leggi esistenti sono state emanate per tutelare loro ed il loro benessere, limitandone l'utilizzo al minimo indispensabile. In Italia la sperimentazione animale è normata dal D.Lgs 26/2014 che costituisce il recepimento nazionale della Direttiva Europea e prevede un processo autorizzativo indipendente, autorevole e rigoroso, atto a valutare il suo valore scientifico e rigore etico. Questo processo vede in campo competenze locali delle Università quali gli Organismi Preposti al Benessere Animale (OPBA), i veterinari designati e competenze centrali degli organi di vigilanza e autorizzativi quali il Ministero della Salute, l'Istituto Superiore di Sanità o il Consiglio Superiore di Sanità.

L'autorizzazione di un protocollo sperimentale che preveda l'uso di animali richiede infatti:

- 1) che il protocollo ricada in un progetto scientifico già approvato e finanziato da un organismo riconosciuto;
- 2) che il veterinario designato, il responsabile del benessere animale e un membro scientifico valutino in prima istanza, all'interno dell'OPBA, la congruità del progetto con il D.lgs. 26/2014;
- 3) che il Ministero della Salute e l'Istituto Superiore di Sanità (o il Consiglio Superiore di Sanità, in caso di ricerche su primati non umani, cani e gatti) valutino in ultima istanza la congruità del progetto con D.lgs. 26/2014 in base a 16 parametri (art 31, comma 2) tra cui la i) la valutazione degli scopi del progetto rispetto al suo carattere innovativo e alla giustificazione dell'uso dell'animale, ii) l'analisi dei danni/benefici derivanti dalla sperimentazione; iii) l'impiego del minor numero di animali possibili e di tutte le precauzioni per limitare al massimo stress o sofferenza; iv) la competenza e la preparazione del gruppo di ricerca su tutti gli aspetti progettuali.

./.

Nonostante la presenza di un quadro normativo che garantisce l'adeguatezza dei controlli, in Italia la ricerca che utilizza animali è continuamente oggetto di attacchi anche violenti e diretti a singoli ricercatori da parte di associazioni animaliste, fondati su affermazioni false e non supportate da alcuna evidenza scientifica.

Una serrata campagna mediatica e denunce alla magistratura di attività di ricerca valutate ed approvate dalle autorità preposte ha portato in un numero ormai significativo di casi ad una ingiusta pubblica denigrazione di ricerche di valore scientifico e sociale, quando non a pesanti e spesso contraddittorie vicissitudini giudiziarie. Caso emblematico è quanto sta accadendo al progetto **LightUp**, coordinato dai professori Tamietto e Bonini delle università di Torino e Parma, che studia nel Macaco i deficit visivi conseguenti a lesione cerebrale. Il progetto, di grande rilevanza scientifica e significato per la comprensione e la cura di patologie ad alto impatto sociale, come le malattie cerebrovascolari, è sostenuto dal più competitivo finanziamento dell'Unione Europea (Consolidator ERC Grant). Per queste ricerche, gli scienziati hanno ricevuto per mesi minacce a loro ed alle famiglie. Sul fronte giudiziario, la Lega Anti Vivisezione (il cui nome è già intrinsecamente mistificatorio, visto che la vivisezione è proibita per legge e non più praticata da decenni) ha fatto istanza di annullamento del progetto al **TAR del Lazio**, istanza rigettata perché "le censure dedotte dalle parti ricorrenti si rivelano generiche e prive di fondamento in fatto e in diritto". Il 9 ottobre scorso, il Consiglio di Stato (chiamato in causa dalle associazioni animaliste) ha emanato un'ordinanza sospensiva del progetto Light, nonostante il progetto fosse stato valutato dai revisori scientifici, approvato dai comitati etici preposti e autorizzato dal Ministero della Salute.

Il **Consiglio di Stato** ha superato tutte queste valutazioni con argomentazioni che entrano nel merito scientifico, sospendendolo e subordinandolo: (i) alla dimostrazione *ex ante* della trasferibilità all'uomo delle ricerche in corso - cosa per definizione impossibile: è proprio questo lo scopo della ricerca in oggetto - e (ii) l'eventuale disponibilità di un metodo alternativo - cosa anche questa impossibile, dato che, ad oggi, un "metodo alternativo" per portare avanti quelle sperimentazioni non esiste, come valutato dagli organi competenti (European Research Council, Ministero della Salute, Consiglio Superiore di Sanità e OPBA).

Queste vicende trascendono il caso dei singoli ricercatori, e diventano emblematiche dei molti ostacoli posti in Italia, anche per via giudiziaria, alla libertà della Ricerca in ambito Biomedico. Quello che sta accadendo al progetto LightUp potrebbe essere applicato in futuro a tutti coloro utilizzino qualunque specie animale, come già dichiarato da molti esponenti delle associazioni animaliste. Oltre a questa recentissima violazione della libertà di ricerca e della possibilità di svolgere ricerche regolarmente autorizzate nel nostro Paese, giova ricordare che l'Unione Europea ha aperto una **procedura di infrazione contro l'Italia**, a causa delle limitazioni ingiustificate che si vorrebbero imporre ad alcuni ambiti di ricerca (xenotrapianti e sostanze d'abuso). E' dal 2014 che i nostri ricercatori vedono applicati divieti, tra l'altro ingiustificati, sull'impiego di animali negli studi riguardanti sostanze d'abuso e xenotrapianti. A fine dicembre scadrà la moratoria sui divieti aggiuntivi che sono stati imposti dall'Italia rispetto alla direttiva europea in materia. Qualora questi divieti dovessero realmente entrare in vigore, dal 1° gennaio 2021, numerosi ricercatori italiani afferenti al campo delle scienze della vita si troveranno ostacolati dalla legge più restrittiva d'Europa, che impedirà loro di fare ricerca su sostanze d'abuso e xenotrapianti, argomenti di cui è evidente la rilevanza per la tutela della salute di cittadini e cittadine.

./.

L'auspicio che formuliamo, a nome della comunità accademica, è che ci si adoperi per il recepimento completo delle attuali normative europee sulla ricerca animale e che la libertà e centralità della ricerca, condotta nel rispetto dei principi etici stabiliti dai codici istituzionali, nazionali e internazionali, venga riaffermata come elemento valoriale fondante di una società democratica basata sulla conoscenza. Neppure una recente relazione inviata dal Ministero della Salute alle Camere, nella quale si riconosce "utopistica" la pretesa di prescindere dalla sperimentazione animale nella ricerca sulle sostanze d'abuso pare motivare i decisori politici ad eliminare un divieto infondato e costoso per i cittadini. Le conseguenze negative della mancanza di azioni in questa direzione si stanno già rendendo evidenti.

Va infatti evidenziato che su 436 progetti ERC approvati quest'anno, 53 hanno un titolare italiano ma, di questi, ben 33 si svolgono all'estero, dove si trovano tutele e condizioni di lavoro più adeguate. Gli stessi professori Tamietto e Bonini, titolari del progetto LightUp, hanno dichiarato di essere già pronti a portare fuori dall'Italia il progetto se questo dovesse essere ulteriormente bloccato dalla Magistratura. Il caso del progetto Light-Up è dunque paradigmatico dei numerosi ed ingiustificati ostacoli posti in Italia (anche per via giudiziaria) alla libertà di ricerca che, uniti all'incertezza dei finanziamenti e alle difficoltà burocratiche, rendono il Paese un ambiente sempre meno attrattivo per gli studiosi. Giovani scienziati, ricercatori e dottorandi si sentono abbandonati, quando non addirittura osteggiati da quelle stesse istituzioni che dovrebbero - in primo luogo nell'interesse dei cittadini che rappresentano - tutelare, proteggere e valorizzare la libertà di studiare, di scoprire, di fare scienza e medicina. Tutto ciò risulta ancor più paradossale e incomprensibile in un periodo in cui, a causa dell'emergenza sanitaria in corso, la ricerca viene, quantomeno a parole, osannata in ogni occasione pubblica. Il particolare periodo storico che stiamo attraversando deve far luce su un concetto fondamentale: la ricerca, quella vera, deve necessariamente passare dalla sperimentazione animale, solo così è possibile comprendere i meccanismi patogenetici che portano alle infezioni nell'uomo, all'individuazione dei trattamenti terapeutici e di eventuali effetti collaterali. Non esistono, né tantomeno sono ipotizzabili, vie alternative. Fin quando la libertà scientifica e la sperimentazione animale verranno ostacolate nelle aule di tribunale la scienza continuerà ad essere menomata, paralizzata, ed il nostro Paese reso sempre più debole e più povero. Un Paese civile e democratico deve permettere a coloro che ne hanno le capacità di lavorare, secondo scienza e coscienza, nell'ottica di un benessere che serva alla collettività. Perché impegnare risorse per formare giovani ricercatori e medici se poi agli stessi vengono imposti paletti e divieti incostituzionali? Si annulla così la loro creatività, il loro spirito di abnegazione verso quella che è la loro passione, costringendoli a trovare altrove un terreno fertile dove potersi esprimere. La ricerca è vita, è speranza ed è questo che deve essere garantito, protetto e custodito. Dimostriamo di essere un Paese che conosce le regole e che le applica nel rispetto della libertà, anche quella scientifica.

27 novembre 2020



Ferruccio Resta
Presidente CRUI



Rosario Rizzuto
Coordinatore Commissione Ricerca CRUI

SENATO DELLA REPUBBLICA

XVIII LEGISLATURA

Doc. XXVII

n. 16

RELAZIONE

SULLO STATO DELLE PROCEDURE DI
SPERIMENTAZIONE AUTORIZZATE PER LE RICERCHE
SULLE SOSTANZE D'ABUSO, ANCHE AL FINE DI
EVIDENZIARE LE TIPOLOGIE DI SOSTANZE CHE
POSSONO ESSERE OGGETTO DI PROGRAMMI DI
RICERCA ALTERNATIVI E SOSTITUTIVI
DELLA SPERIMENTAZIONE ANIMALE

(Articolo 42, comma 2-bis, del decreto legislativo 4 marzo 2014, n. 26)

Presentata dal Ministro della salute
(SPERANZA)

Comunicata alla Presidenza il 28 luglio 2020



Ministero della Salute

RELAZIONE DEL MINISTERO DELLA SALUTE ALLE CAMERE SULLO STATO DELLE PROCEDURE DI SPERIMENTAZIONE AUTORIZZATE PER LE RICERCHE SULLE SOSTANZE D'ABUSO, ANCHE AL FINE DI EVIDENZIARE LE TIPOLOGIE DI SOSTANZE CHE POSSONO ESSERE OGGETTO DI PROGRAMMI DI RICERCA ALTERNATIVI E SOSTITUTIVI DELLA SPERIMENTAZIONE ANIMALE (DECRETO LEGISLATIVO 4 MARZO 2014, N. 26, ARTICOLO 42 COMMA 2-BIS, COSÌ COME MODIFICATO DALLA LEGGE N. 8 DEL 28 FEBBRAIO 2020, ARTICOLO 25 COMMA 2-BIS)

INDICE

INTRODUZIONE

SINTESI INTRODUTTIVA

CAPITOLO 1 CONTESTO NORMATIVO

1.1	NORMATIVA VIGENTE.....	pag. 4
1.2	L'ATTIVITÀ DEL MINISTERO DELLA SALUTE.....	6
1.2.1	L'autorizzazione dei progetti di ricerca.....	7
1.3	DEFINIZIONE SOSTANZA D'ABUSO – TABELLA MINISTERO DELLA SALUTE	9

CAPITOLO 2 MODELLI SPERIMENTALI IN VIVO

2.1	STATO DELL'ARTE DELLE SPERIMENTAZIONI IN VIVO CON SOSTANZE D'ABUSO E CONSIDERAZIONI.....	11
2.2.	ELENCO DELLE TIPOLOGIE DI SOSTANZE UTILIZZATE.....	13

CAPITOLO 3 MODELLI SPERIMENTALI ALTERNATIVI

3.1.	STATO DELL'ARTE DELLA POTENZIALE APPLICAZIONE DI METODI HUMAN BASED NEL CAMPO DELLE SOSTANZE D'ABUSO E CONSIDERAZIONI.....	14
3.2.	ELENCO TIPOLOGIE SOSTANZE PER L'IMPIEGO IN RICERCHE CON METODI ALTERNATIVI	19

CAPITOLO 4 Conclusioni (Redazione MINSAL, ISS e Centro Referenza)

4.1.	CONCLUSIONI.....	25
4.2.	FONTI INFORMATIVE.....	27

INTRODUZIONE

Con l'art. 25, comma 2-bis, della Legge n. 8 del 28 febbraio 2020 ("Milleproroghe") è stato modificato l'art. 42 del d.lgs. n. 26 del 4 marzo 2014 concernente la protezione degli animali utilizzati a fini scientifici. Nello specifico è stato previsto che il Ministro della salute deve inviare alle Camere *"una relazione sullo stato delle procedure di sperimentazione autorizzate per le ricerche sulle sostanze d'abuso, anche al fine di evidenziare le tipologie di sostanze che possono essere oggetto di programmi di ricerca alternativi e sostitutivi della sperimentazione animale"*.

A tal proposito si evidenzia come nel citato d.lgs. 26/2014, è previsto all'articolo 5, comma 2, *lett. e)*, il divieto dell'utilizzo di animali per le ricerche sulle sostanze d'abuso. Tale divieto era stato stabilito dalla legge 6 agosto 2013, n. 96, recante delega al Governo *per il recepimento delle direttive e l'attuazione di altri atti dell'Unione europea - Legge di delegazione europea 2013*", tenendo conto dei criteri specifici ivi stabiliti (cfr. art. 1, 13 ed allegato B). Tuttavia nel D.lgs. 26/2014 all'Articolo 42 (*Disposizioni transitorie e finali*) al comma 1, il legislatore aveva previsto, in assenza di metodi alternativi all'impiego di animali, la proroga per tale divieto fino al 31 dicembre 2016. Puntualmente attraverso l'inserimento di atti normativi all'interno dei decreti c.d. "Milleproroghe", l'entrata in vigore del divieto è stata, da ultimo, posticipata al 1 gennaio 2021.

L'obiettivo del documento è fornire alle Camere un quadro tecnico completo in materia di sperimentazioni sulle sostanze d'abuso sui modelli animali, un elenco dei modelli *in vitro* e un elenco delle tipologie di sostanze utilizzate e quelle che possono essere oggetto di studio senza l'impiego di animali.

CAPITOLO 1 CONTESTO NORMATIVO

1.1. NORMATIVA VIGENTE

Con il d.lgs. 26/2014 è stata recepita la Direttiva europea n. 2010/63/UE relativa alla protezione degli animali usati a fini scientifici, che ha portato al superamento del precedente decreto legislativo n. 116/1992.

La tematica sottende due interessi contrapposti e non allineati, da un lato il diritto alla ricerca e dall'altro il sentimento nei confronti degli animali, che porta con sé un peso mediatico ed etico significativo.

Questo è rinvenibile anche nei considerandi della direttiva nei quali viene stabilito che *“benché sia auspicabile sostituire nelle procedure l'uso di animali vivi con altri metodi che non ne prevedano l'uso, l'impiego di animali vivi continua ad essere necessario per tutelare la salute umana e animale e l'ambiente. Tuttavia, la presente direttiva rappresenta un passo importante verso il conseguimento dell'obiettivo finale della completa sostituzione delle procedure su animali vivi a fini scientifici ed educativi non appena ciò sia scientificamente possibile”* (Considerando n. 17) e che *“sono disponibili nuove conoscenze scientifiche con riguardo ai fattori che influenzano il benessere degli animali nonché alla loro capacità di provare ed esprimere dolore, sofferenza, angoscia (distress) e danno prolungato. Per tale motivo è necessario migliorare il benessere degli animali utilizzati nelle procedure scientifiche rafforzando le norme minime per la loro tutela in linea con i più recenti sviluppi scientifici”* (Considerando n. 6).

In quest'ottica il decreto legislativo delinea una normativa che punta all'equilibrio tra questi due interessi.

Il decreto, che ha subito non pochi ritardi e modifiche a causa dell'importanza politica del tema, alla fine, è il connubio delle due forze uguali e contrarie ed è stato predisposto sulla base della delega conferita al Governo con legge 6 agosto 2013, n. 96 recante *“Delega al Governo per il recepimento delle direttive e l'attuazione di altri atti dell'Unione europea - Legge di delegazione europea 2013”*, tenendo conto dei criteri specifici ivi stabiliti (cfr. art. 1, 13 ed allegato B).

Nella legge delega, interpretando in maniera estensiva quanto stabilito dal considerando n. 7, ovverosia che *“l'atteggiamento nei confronti degli animali dipende anche dalla percezione nazionale e in taluni Stati membri vi è l'esigenza di mantenere norme in materia di benessere degli animali più ampie di quelle approvate a livello dell'Unione. Nell'interesse degli animali e purché ciò non pregiudichi il funzionamento del mercato interno, è opportuno consentire agli Stati membri una certa*

flessibilità nel mantenere le norme nazionali miranti ad una protezione più estesa degli animali nella misura in cui esse siano compatibili con il TFUE”, sono stati inseriti dei limiti non presenti nella direttiva. Tra questi si evidenziano in particolare:

- il divieto di allevamento in Italia di cani, gatti e primati non umani da destinare alla sperimentazione;
- il divieto di utilizzo di animali per xenotrapianto e per lo studio di sostanze da abuso;
- il divieto di autorizzare procedure per la produzione e per il controllo di materiale bellico.

Anche per quanto sopra espresso, l’UE ha deciso di aprire nei confronti dell’Italia la procedura di infrazione che è ad oggi ancora in via di definizione.

Come evidenziato sopra, l’entrata in vigore di alcuni di questi divieti, come per l’appunto, quello sulle sostanze d’abuso sono stati prorogati. Come si analizzerà in seguito la proroga trova il suo fondamento sull’ampiezza del concetto di sostanza d’abuso e sulla crescita dei filoni di ricerca sottesi a tale ambito.

Completando la panoramica sul recepimento della normativa sulla sperimentazione si evidenzia che il decreto in parola prevede l’emanazione di quattro decreti ministeriali di attuazione.

Di questi quattro, due hanno trovato attuazione (uno relativo alle tariffe, previsto dall’art. 39, e un altro relativo all’istituzione del comitato nazionale per la protezione degli animali usati a fini scientifici, di cui all’art. 38). Gli altri due, che a causa di una genesi complessa non sono stati ancora emanati, riguardano il reinserimento degli animali post sperimentazione (art. 19) e la formazione del personale coinvolto nelle procedure sperimentali (art. 23). Oltre a questi decreti il 7 giugno 2019 è stato emanato il decreto ministeriale per la costituzione di gruppo di lavoro per la promozione dei metodi alternativi (art. 37). Infine con l’art. 25 del decreto legge 30 dicembre 2019, n. 162 (c.d. “Milleproroghe”), convertito con la legge 28 febbraio 2020, n. 8, è stata aggiunta all’art. 41, comma 2, del d.lgs. 26/14, dopo la lettera c), una lettera c-bis), che prevede, per il triennio 2020-2022, un importo annuo di € 2.000.000 da destinare per l’80%, per l’attività di ricerca e sviluppo dei metodi alternativi, a IZZSS, enti pubblici di ricerca e università, individuati con decreto del Ministro della salute di concerto con il Ministro dell’università e della ricerca.

1.2. L'ATTIVITÀ DEL MINISTERO DELLA SALUTE

Con il recepimento della Direttiva europea 2010/63 sulla protezione degli animali utilizzati a fini scientifici, sono state apportate delle modifiche significative e giuridicamente innovative alla regolamentazione della sperimentazione sugli animali.

Sono stati inseriti, infatti, importanti elementi di controllo sull'attività di ricerca con l'ottica di riconoscere e tutelare in maniera più significativa il crescente concetto di tutela del benessere animale, comportando di fatto un maggior intervento delle autorità competenti sull'attività dei ricercatori.

In precedenza, con il d.lgs. 116/1992, l'attività di ricerca sugli animali, godeva di un regime procedimentale semplificato, in quanto poteva essere avviata previa comunicazione al Ministero della sanità senza necessitare di un'autorizzazione specifica, che invece era rilasciata solo per quei progetti in cui venivano utilizzati cani, gatti, primati non umani, esperimenti di tipo didattico ed esperimenti senza anestesia, con la sola verifica dello scopo progettuale. Con il d.lgs. del 2014 l'attività di controllo dell'autorità competente è cresciuta esponenzialmente essendo stata prevista una complessa procedura valutativa dei progetti. Questi nascendo dal responsabile del progetto di ricerca affrontano prima il controllo "interno" dell'OPBA (Organismo Preposto al Benessere Animale) e successivamente un controllo esterno, da parte del Ministero e degli enti tecnici preposti che si esplica attraverso un controllo documentale e una successiva valutazione tecnico-scientifica che supporta l'atto finale di rilascio o di diniego autorizzativo.

Nello specifico l'atto autorizzativo viene rilasciato previa valutazione di stringenti parametri imposti dalla normativa utili sia a tutelare il benessere degli animali sia ad assicurare la qualità della ricerca, portando l'attività amministrativa a basarsi in maniera solida su norme tecniche vincolando, dunque, le scelte dell'Amministrazione procedente.

Pertanto, l'entrata in vigore del d.lgs. 26/2014 ha avuto un grosso impatto sulle attività connesse all'impiego degli animali a fini scientifici per tutti gli operatori del settore, comprese le autorità competenti. La prima importante criticità affrontata riguarda il rilascio delle autorizzazioni per i progetti di ricerca, in relazione all'aumento del carico burocratico per le Autorità competenti e alla iniziale qualità non elevata nell'elaborazione dei progetti di ricerca stessi, dalla quale ne è derivata nei primi due anni, una percentuale di bocciatura dei progetti presentati vicina al 30%.

Altra attività autorizzativa è quella rilasciata dal Ministero agli stabilimenti utilizzatori ai sensi dell'art. 20 del d.lgs., mentre per quel che concerne i fornitori e gli allevatori l'attività autorizzativa è demandata alle autorità competenti locali quali i Comuni e le ASL (art. 20 d.lgs. 26/2014).

Come ulteriore garanzia delle attività la Direttiva prevede la costituzione di un organismo preposto al benessere degli animali (OPBA) in seno ad ogni soggetto sia questo utilizzatore, fornitore o

allevatore. L'OPBA ai sensi della normativa (art. 25 e 26) funge da punto di controllo e di certificazione interna nella ricerca e nell'allevamento degli animali usati a fini scientifici. Infatti sono gli OPBA che sottopongono i progetti di ricerca, al termine di un proprio procedimento valutativo, al Ministero al fine della valutazione. L'intento della direttiva, nella previsione di questi organismi, è stato proprio quello di creare un punto di contatto sopraelevato rispetto al singolo ricercatore che potesse fare da filtro e indirizzare la ricerca e l'utilizzo degli animali su determinati binari ed ha affidato il ruolo di coordinamento degli OPBA in capo al Comitato Nazionale di cui all'art. 38.

1.2.1 L'AUTORIZZAZIONE DEI PROGETTI DI RICERCA

L'iter autorizzativo del progetto di ricerca, dettagliato all'articolo 31 del citato decreto, prevede in sintesi:

- l'inoltro al Ministero della richiesta di autorizzazione da parte dell'Organismo Preposto al Benessere Animale (OPBA, che ai sensi della normativa è composto da almeno un responsabile del benessere e della cura degli animali, un medico veterinario e un membro scientifico, adeguatamente formati), allegando:
 - a) la proposta del progetto;
 - b) la sintesi non tecnica del progetto di cui all'articolo 34;
 - c) il modulo di cui all'Allegato VI del decreto citato.
- una valutazione tecnico-scientifica da parte del Consiglio Superiore di Sanità o dell'Istituto Superiore di Sanità e successivo rilascio di parere tenendo conto di quanto previsto dal comma 4 dell'art. 31.
- il rilascio della relativa autorizzazione ministeriale, da parte della DGSAF, a seguito del parere tecnico-scientifico favorevole.

Il parere degli organi tecnico-scientifici è un parere vincolante al fine del rilascio dell'autorizzazione o del suo diniego da parte del Ministero, potendo quest'ultimo compiere soltanto una valutazione documentale e procedimentale senza scendere nel merito tecnico-scientifico.

Tale valutazione è affidata a organi tecnici competenti quali il Consiglio Superiore di Sanità per la valutazione di progetti che prevedono l'utilizzo di primati non umani, cani gatti ed esemplari di specie in via di estinzione e, in via residuale, l'Istituto Superiore di sanità per i progetti che prevedono l'impiego di tutte le altre specie animali.

La scelta del legislatore è stata dettata dall'intento di assicurare una valutazione anche bioetica

oltre che tecnico-scientifica (da parte del Consiglio Superiore di Sanità) ai progetti che prevedono l'impiego di animali per i quali sussiste una sensibilità sociale maggiore.

Nel concreto questa valutazione tecnico – scientifica deve verificare una serie di requisiti espressi dall'elenco dell'art. 31, comma 4¹, del d.lgs. 26/2014 molto variegati tra di loro che richiedono l'applicazione di competenze e conoscenze settoriali di alto profilo. Infatti questa valutazione deve tenere conto tra le altre:

- dell'analisi dei danni e dei benefici derivanti dal progetto, tenuto conto anche delle considerazioni di natura etica che vadano a verificare se il danno arrecato agli animali in termini di sofferenza, dolore, distress o danno prolungato è giustificato dal risultato atteso in termini di benefici per gli esseri umani, per gli animali e per l'ambiente;
- del minor numero di animali per il raggiungimento delle finalità del progetto;
- di tutte le precauzioni assunte per prevenire o ridurre al minimo il dolore, la sofferenza e il distress nelle procedure;

¹ Art. 31, comma 4 del d.lgs. 26/2014

"4. La valutazione tecnico-scientifica tiene conto:

- a) della preventiva valutazione sugli scopi del progetto che giustificano l'uso dell'animale;*
- b) della presenza del parere positivo di cui all'articolo 26, comma 1, lettera d);*
- c) dell'analisi dei danni e dei benefici derivanti dal progetto, al fine di comprendere, tenuto conto anche delle considerazioni di natura etica, se il danno arrecato agli animali in termini di sofferenza, dolore, distress o danno prolungato è giustificato dal risultato atteso in termini di benefici per gli esseri umani, per gli animali e per l'ambiente;*
- d) della preventiva valutazione circa lo svolgimento delle procedure nelle condizioni più umanitarie e più rispettose dell'ambiente possibili;*
- e) della effettiva necessità della ricerca in quanto non costituisce una inutile duplicazione di ricerche precedenti;*
- f) della giustificazione del progetto unitamente alle procedure ivi previste da un punto di vista scientifico o educativo o, comunque, previsto per legge;*
- g) della conformità a quanto previsto dal presente decreto relativamente alla competenza professionale del personale designato a condurre le procedure;*
- h) delle motivazioni poste alla base dell'utilizzo di una determinata specie, allevata o meno per essere impiegata nelle procedure;*
- i) del minor numero di animali per il raggiungimento delle finalità del progetto;*
- l) di tutte le possibili precauzioni assunte per prevenire o ridurre al minimo il dolore, la sofferenza e il distress nelle procedure;*
- m) del rispetto di quanto disposto dall'articolo 14;*
- n) delle motivazioni poste alla base della scelta delle vie di somministrazione dei preparati;*
- o) dell'utilizzo di metodi adeguati di eutanasia in conformità con l'articolo 6;*
- p) della preventiva valutazione sulla gravità delle procedure, nonché di una classificazione delle stesse secondo i criteri di cui all'articolo 15 e all'allegato VII del presente decreto;*
- q) della necessità di eseguire o meno una valutazione retrospettiva del progetto di cui all'articolo 32;*
- r) della presenza di personale con competenze specialistiche nei seguenti ambiti:*
 - 1) settori di applicazione scientifica in cui gli animali saranno utilizzati, con particolare riguardo alla realizzazione della sostituzione, della riduzione e del perfezionamento;*
 - 2) progettazione sperimentale e, se del caso, valutazione dei dati statistici;*
 - 3) pratica veterinaria, nelle scienze degli animali da laboratorio o, se del caso, pratica veterinaria applicata alla fauna selvatica;*
 - 4) allevamento e cura degli animali in relazione alle specie che si intende utilizzare."*

- della effettiva necessità della ricerca in quanto non costituisce una inutile duplicazione di ricerche precedenti;

Si evince, quindi, anche da quanto appena rappresentato che il cardine della normativa in questione e dell'autorizzazione dei progetti di ricerca è rappresentato dal principio delle 3R, ovverosia i principi di Refinement, Replacement, Reduction, (sostituire, ridurre e affinare la sperimentazione animale), che, pertanto, rendono possibile la ricerca attraverso il modello animale solo se non esistono metodi alternativi e se si riducono al minimo il numero degli animali da laboratorio e le sofferenze inflitte agli stessi.

Accanto a questa attività il decreto in argomento, all'art. 32, prevede la valutazione retrospettiva dei progetti di ricerca effettuata sempre dal Ministero della salute sui progetti di ricerca le cui procedure siano classificate come gravi e sui progetti che fanno uso di primati non umani nonché su tutti quei progetti per i quali l'ente tecnico-scientifico competente la ritenga necessaria, oltre a quelli con livello di sofferenza moderato.

1.3. DEFINIZIONE SOSTANZA D'ABUSO – TABELLE MINISTERO DELLA SALUTE

L'Organizzazione Mondiale della Sanità (OMS) definisce la dipendenza da sostanze come *“uno stato psichico e talora fisico, derivante dall'interazione con una sostanza, che determina modificazioni del comportamento e la necessità di assumere questa, per ottenere gli stessi effetti psichici ed evitare la sindrome da astinenza”*.

Con il termine “abuso”, si intende, *“l'autosomministrazione di una sostanza attraverso modalità che si discostano dalle norme mediche e sociali condivise”*. (Andrea Vendramin (1), Roberto Boccalon (2) (1) Ser.T. - Bassano del Grappa (IV); Dipartimento di Farmacologia - Università di Padova (2) Ser.T. -- Ferrara; Scuola di Specializzazione in Psichiatria - Università di Ferrara)

Per il **Manuale Diagnostico e Statistico dei Disturbi Mentali (DSM – 5)**, un disturbo da **abuso di sostanze** rappresenta *“un pattern problematico di uso della sostanza che porta a disagio o compromissione clinicamente significativi”*. Sempre nel **Manuale Diagnostico e Statistico dei Disturbi Mentali (DSM – 5)**, il disturbo da uso di sostanze ha sostituito e unificato le categorie abuso di sostanze e dipendenza da sostanza, mentre emerge il concetto di dipendenza comportamentale.

Il Testo unico sugli stupefacenti (DPR 309/90) prevede che tutti gli stupefacenti e le sostanze psicotrope siano iscritti in cinque tabelle che vengono aggiornate, ogni qualvolta, si presenti la necessità di inserire una nuova sostanza o di variarne la collocazione o di provvedere ad una eventuale cancellazione, cioè, ad esempio, quando:

- vengono modificate le liste delle sostanze classificate a livello internazionale come stupefacenti o psicotrope;
- una sostanza diventa oggetto di abuso;
- qualche nuova droga viene immessa nel mercato clandestino;
- quando viene registrato un nuovo medicinale ad azione stupefacente o psicotropa.

In modo sintetico le tabelle comprendono:

Tabella I (ultimo aggiornamento Decreto 13 marzo 2020)

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

Tabella II (ultimo aggiornamento Legge 16 maggio 2014, n. 79)

- Cannabis.

Tabella III (ultimo aggiornamento Legge 16 maggio 2014, n. 79)

- Barbiturici.

Tabella IV (ultimo aggiornamento Decreto 13 marzo 2020)

- Benzodiazepine.

Tabella dei medicinali (ultimo aggiornamento Decreto 23 dicembre 2019)

Nella Tabella dei medicinali sono inserite le sostanze attive che hanno attività farmacologica e pertanto sono usate in terapia e le relative preparazioni farmaceutiche.

- Medicinali a base di morfina e sostanze analgesiche oppiacee;
- Medicinali di origine vegetale a base di Cannabis;
- Barbiturici;
- Benzodiazepine (diazepam, flunitrazepam, lorazepam ecc.).

Sito Ministero della salute:

http://www.salute.gov.it/portale/temi/p2_6.jsp?lingua=italiano&id=3729&area=sostanzeStupefacenti&menu=vuoto

CAPITOLO 2 MODELLI SPERIMENTALI IN VIVO

2.1. STATO DELL'ARTE DELLE SPERIMENTAZIONI IN VIVO CON SOSTANZE D'ABUSO E CONSIDERAZIONI

Al fine di predisporre la relazione in oggetto ai sensi dell'articolo 42, comma 2-bis del Decreto legislativo 4 marzo 2014, n. 26 (così come modificato dalla legge n. 8 del 28 febbraio 2020, Articolo 25 comma 2-bis) è stato chiesto agli utilizzatori che avessero portato a termine o in corso di svolgimento progetti di ricerca sulle sostanze d'abuso, di presentare una o più relazioni sugli studi effettuati.

Le relazioni dovevano contenere come minimo le seguenti informazioni:

- indicazione degli obiettivi e delle finalità principali delle ricerche con sostanze d'abuso che le rendono inevitabili ed indispensabili;
- indicazione dei risultati raggiunti negli anni precedenti mediante le ricerche con le sostanze d'abuso e descrizione sull'importanza, sull'utilità e sulle ricadute pratiche;
- specificazione sull'inevitabilità del ricorso agli animali e indicazione delle tipologie di sostanze;
- indicazione di eventuali metodi di Refinement e Reduction applicati nelle ricerche con sostanze d'abuso;
- definizione delle caratteristiche delle sostanze d'abuso impiegate (di sintesi o naturali; sostanze d'abuso o anche farmaci) al fine di individuare le diverse tipologie;
- elenco di tipologie di sostanze e descrizione di eventuali metodiche alternative ai test in vivo.

Le informazioni sull'impiego di animali in procedure sperimentali per lo studio di sostanze d'abuso sono state acquisite da venti enti di ricerca (19 enti di ricerca pubblici e 1 ente di ricerca privato).

Tali informazioni riguardano circa 60 progetti di ricerca autorizzati, corrispondenti a circa l'80% del totale dei progetti di ricerca sulle sostanze d'abuso che a loro volta rappresentano circa lo 0,70% del totale dei progetti autorizzati nel periodo 2014-2020.

Gli ambiti di ricerca si collocano per la stragrande maggioranza nell'area della ricerca di base e della ricerca traslazionale o applicata. In minima parte riguarda l'ambito regolatorio cioè studi condotti secondo linee guida nazionali o internazionali.

Nell'ambito della ricerca di base e della ricerca traslazionale o applicata, attraverso l'utilizzo di modelli animali, si cerca di comprendere:

- gli effetti che le sostanze d'abuso esercitano sul Sistema Nervoso Centrale;
- i meccanismi neurobiologici responsabili della dipendenza,
- i processi psicocomportamentali alla base della complessità dei quadri sintomatologici, dei fenomeni e dei diversi stadi di evoluzione dei disturbi da uso di sostanze che esitano in modificazioni permanenti e comportamenti “dannosi” per l'individuo;
- gli effetti che le sostanze d'abuso determinano a livello tossicologico.

Inoltre, da ricordare l'attività di ricerca per la scoperta di meccanismi neurali attivati dalle sostanze d'abuso o per l'identificazione di target molecolari o cellulari verso i quali sviluppare nuovi approcci terapeutici per le dipendenze, in quanto i farmaci attualmente autorizzati hanno un'efficacia limitata e reazioni avverse spesso non tollerate dai pazienti e al fine anche di gestire nel migliore modo la fase di recupero e di astinenza.

Al contrario un numero ridottissimo di progetti di ricerca prevedono studi di tipo regolatorio cioè l'obbligo di condurre studi in vivo utilizzando modelli animali secondo normative nazionali (AIFA) o internazionali (EMA, FDA). Tali linee guida prevedono studi di “abuse liability” per ogni nuovo farmaco che sia in grado di attraversare la barriera ematoencefalica e quindi la valutazione dell'eventuale presenza di proprietà d'abuso.

Senza questi studi non è possibile avere le autorizzazioni al commercio da parte di AIFA, EMA e FDA.

Nell'esecuzione dei progetti è stata prevista l'applicazione dei principi di Riduzione del numero di animali da impiegare utilizzando metodi statistici di “power analysis” che permettono di calcolare la minima numerosità richiesta per ottenere dati statisticamente significativi, e di conseguenza portano alla riduzione della numerosità dei gruppi sperimentali.

Per ridurre lo stress degli animali sono state rispettate le condizioni ottimali di stabulazione (ad es. utilizzo di arricchimenti ambientali, maggior spazio a disposizione), controllate ogni giorno per quanto riguarda la temperatura, il ciclo luce-buio, il grado di umidità relativa. Gli animali hanno libero accesso a cibo fresco e acqua. Le procedure sperimentali sono state accuratamente disegnate ed ottimizzate per ridurre al minimo potenziali fattori di stress e/o distress e sono eseguite da personale adeguatamente formato e competente. Lo stato di benessere degli animali è monitorato quotidianamente e in alcuni casi con la registrazione di segni clinici e comportamentali. La necessità di mantenere ottime condizioni di benessere degli animali è giustificata anche dal fatto che fattori stressanti potrebbero alterare l'interpretazione dei risultati ottenuti e se questi siano ascrivibili ad eventuali alterazioni della sfera cognitiva e/o sociale oppure unicamente ai meccanismi studiati o da più complesse conseguenze dovute al distress.

Infine non sono state segnalate tipologie di sostanze che potrebbero essere utilizzate con metodi in vitro nella ricerca di base e nella ricerca traslazionale o applicata così come a livello regolatorio.

2.2. ELENCO DELLE TIPOLOGIE DI SOSTANZE UTILIZZATE

- Tranquillizzanti minori o ansiolitici: attività sedativa, anticonvulsivante e miorilassante (es. benzodiazepine);
- Tranquillizzanti maggiori o neurolettici: attività sedativa e antipsicotica (es. fenotiazine);
- Stimolanti dell'umore o antidepressivi (ad es. gli inibitori delle Mono-Ammino-Ossidasi (I-MAO) e gli antidepressivi triciclici o eterociclici);
- Stimolanti della vigilanza (ad es. le anfetamine MDMA e i suoi derivati amfetaminici (DOB, parametossiamfetamina).);
- Deprimenti: oppiacei, etanolo;
- Stimolanti: cocaina, anfetaminici;
- Allucinogeni: LSD, mescalina, psilocibina, DMT, fenciclidina (PCP);
- Dissociativi: ketamina;
- Nicotina;
- THC e cannabinoidi (Δ^9 tetraidrocannabinolo).

CAPITOLO 3 MODELLI SPERIMENTALI ALTERNATIVI

3.1 STATO DELL'ARTE DELLA POTENZIALE APPLICAZIONE DI METODI *HUMAN BASED* NEL CAMPO DELLE SOSTANZE D'ABUSO E CONSIDERAZIONI

Il campo della ricerca per i metodi non-animali o *human-based* nell'ambito delle sostanze d'abuso è ancora in fase di sviluppo; infatti, la legislazione vigente in ambito regolatorio, precede la tecnologia che sia in grado di garantire l'implementazione effettiva di metodi alternativi per lo studio a livello sistemico delle sostanze d'abuso e delle relative dipendenze.

Tuttavia, esistono delle eccezioni per le quali è consentito lo studio degli effetti potenzialmente avversi *in vitro*; uno di questi è la valutazione della nicotina sul tessuto polmonare, dove esistono vari sistemi anche commerciali per l'esposizione a nuvole di fumo in regimi controllati e di modelli (anche complessi e tridimensionali) dell'epitelio polmonare umano².

Si possono individuare tre differenti approcci che non si basano sull'impiego di animali da laboratorio:

- Modelli *in vitro*;
- Metodi *in silico*;
- Modelli epidemiologici.

Modelli *in vitro*

Negli ultimi 15 anni le tecnologie *in vitro* hanno subito dei miglioramenti significativi, rendendo i modelli sempre più complessi e quindi più vicini alla realtà fisiologica umana. Questi miglioramenti sono dovuti allo sviluppo di nuove biotecnologie, quali ad esempio:

- colture di cellule e tessuti in strutture tridimensionali;
- possibilità di indurre caratteristiche staminali in cellule umane (le iPSC);
- sviluppo di metodi per realizzare organoidi di diversi tessuti partendo da cellule staminali e di tecnologie fluidiche per poter coltivare cellule in condizioni più fisiologiche;
- nuove tecniche di analisi '*highthroughput*'. (es. metodiche di screening e di imaging);

² Giandomenico, S. L. *et al.* Cerebral organoids at the air-liquid interface generate diverse nerve tracts with functional output. *Nat. Neurosci.* 22, 669–679 (2019).

Recentemente, vi è stata una grande attenzione anche da parte dell'opinione pubblica rispetto alle potenzialità di questi metodi; infatti, nell'ambito tossicologico i modelli *in vitro* stanno gradualmente sostituendo i modelli animali anche a livello regolatorio.

Attualmente, esistono pochi studi *in vitro* sulle sostanze d'abuso, soprattutto se viene confrontato il numero di pubblicazioni su ricerche di base condotte mediante l'utilizzo di animali rispetto ad articoli scientifici basati su colture cellulari. Più in particolare, nell'ambito delle sostanze d'abuso, i modelli *in vitro* ad oggi sviluppati riguardano lo studio e l'analisi dell'effetto delle sostanze su cellule e tessuti in coltura. Come sopra evidenziato, i modelli polmonari con esposizione a fumo e/o vapori sono molto sofisticati e possono essere utilizzati per investigare gli effetti avversi (infiammazione, fibrosi, morte cellulare, ecc.) di sostanze d'abuso inalate sui tessuti alveolari o bronchiali³.

Alcuni studi hanno mostrato la possibilità di classificare le sostanze d'abuso (anfetamine e alcune nuove sostanze psicoattive) a seconda dell'inibizione o meno dell'attività elettrofisiologica di neuroni (anche umani) in coltura. La stessa è stata misurata tramite matrici di microelettrodi ad alta densità⁴.

La tabella presentata come allegato, riporta altri metodi *in vitro* che riguardano lo studio di sostanze d'abuso, con possibili sviluppi e percorsi utili per migliorare le conoscenze relative a questi nuovi ambiti applicativi, che rappresentano la sfida dei prossimi anni. Da questi primi approcci, si evince che ulteriori sviluppi nel campo *in vitro* possono comprendere l'uso di organoidi cerebrali, cellule derivate da prelievi biotici di persone affette da dipendenze⁵, uso di sistemi multi-organo⁶ e impiego di modelli di zebrafish⁷.

Comunque, va sottolineato che i modelli *in vitro* attuali non sono utilizzabili per studi di comportamento o alterazioni della locomozione, per i quali sono al momento limitati quanto lo sono anche i modelli animali (impossibilità di replicare l'effetto società/ambiente). In ogni caso, questo aspetto non deve impedire l'opportunità di prevedere sviluppi in tale direzione; infatti, recentemente, una delle ricerche più all'avanguardia sugli organoidi cerebrali ha mostrato la loro capacità di generare attività elettrica spontanea in tratti assonali in grado di provocare la contrazione muscolare⁸.

³ Cei, D. Development of a dynamic model of the alveolar interface for the study of aerosol deposition. (University of Pisa, 2015) e Benam, K. H. *et al.* Matched-Comparative Modeling of Normal and Diseased Human Airway Responses Using a Microengineered Breathing Lung Chip. *Cell Syst.* **3**, 456-466.e4 (2016).

⁴ Hondebrink, L. *et al.* Neurotoxicity screening of (illicit) drugs using novel methods for analysis of microelectrode array (MEA) recordings. *Neurotoxicology* **55**, 1–9 (2016).

⁵ Prytkova, I., Goate, A., Hart, R. P. & Slesinger, P. A. Genetics of Alcohol Use Disorder: A Role for Induced Pluripotent Stem Cells? *Alcoholism: Clinical and Experimental Research* **42**, 1572–1590 (2018).

⁶ Merikangas, K. R. & McClair, V. L. Epidemiology of substance use disorders. *Human Genetics* **131**, 779–789 (2012).

⁷ Maximino, C. *et al.* Fingerprinting of Psychoactive Drugs in Zebrafish Anxiety-Like Behaviors. *PLoS One* **9**, e103943 (2014) e de Souza Anselmo, C. *et al.* Is zebrafish (*Danio rerio*) a tool for human-like metabolism study? *Drug Test. Anal.* **9**, 1685–1694 (2017).

⁸ Giandomenico, S. L. *et al.* Cerebral organoids at the air–liquid interface generate diverse nerve tracts with functional output. *Nat. Neurosci.* **22**, 669–679 (2019).

I **modelli *in silico*** utilizzano metodi matematici, statistici e computazionali per simulare sistemi complessi biologici. Nell'ambito dei cosiddetti "metodi alternativi" sono spesso di supporto ai modelli *in vitro* sviluppati al computer. Ad esempio, nel caso dello studio dell'attività neuronale in presenza di anfetamine e altre droghe, i segnali elettrici acquisiti dai microelettrodi sono stati analizzati con metodi statistici per classificare le sostanze rispetto a controlli positivi e negativi. È importante citare i modelli molecolari, che sfruttano librerie di dati su strutture molecolari di droghe con attività nota per predire l'attività di nuove molecole⁹. Questi sistemi, noti come QSAR (*Quantitative Structure Activity Relationships*), si basano su tecniche di intelligenza artificiale e possono essere utilizzati per lo *screening* di nuove sostanze illecite.

Data la complessità della patologia legata alla dipendenza, sono stati proposti approcci basati sulla biologia dei sistemi e modelli non lineari. Nello specifico, la biologia dei sistemi è un campo della biologia teorica che tenta di identificare schemi in insiemi di dati complessi; a differenza dei classici approcci riduzionisti delle scienze biomediche, la biologia dei sistemi consente l'integrazione delle informazioni molecolari, fisiologiche e anche cliniche disponibili nel contesto di un quadro quantitativo, tipicamente utilizzato dalle scienze matematiche e dall'ingegneria. Per esempio, il metodo viene utilizzato al fine di ricostruire le reti cellulari come sistemi dinamici e quindi studiare l'inibizione e attivazione delle reti in presenza di nicotina, implementando regole, soglie e processi di apprendimento/ricompensa computazionale¹⁰. Si presta bene anche come supporto alle tecniche *in vitro* descritte sopra. Infine, i modelli non lineari associano l'ingresso di un sistema complesso con la sua uscita in modo da identificare le caratteristiche del sistema e, quindi, predire la sua risposta a diversi ingressi. Sono noti nell'ambito clinico, dove vengono utilizzati per regolare le quantità di farmaco, soprattutto ormoni, da somministrare ai pazienti. Nell'ambito delle sostanze d'abuso i modelli non lineari riescono a seguire le dinamiche del consumo di alcool e del complesso meccanismo legato al fenomeno del *relax* sostenute dall'abuso di sostanze psicoattive¹¹.

I **modelli epidemiologici** sfruttano dati epidemiologici e clinici riferibili sia ai pazienti sia alla popolazione. Esistono numerosi studi prospettici eseguiti utilizzando campioni di giovani e giovani adulti che hanno evidenziato i fattori di rischio per il consumo di cannabis e la successiva progressione nell'utilizzo di droghe lecite e illecite. Si possono citare anche diversi studi longitudinali a breve

⁹ Negus, S. S. & Banks, M. L. Decoding the structure of abuse potential for new psychoactive substances: Structure-activity relationships for abuse-related effects of 4-substituted methcathinone analogs. in *Current Topics in Behavioral Neurosciences* 32, 119–131 (Springer Verlag, 2017) e Todeschini, R. & Consonni, V. *Handbook of molecular descriptors*. WileyVCH, Weinheim. Wiley-VCH 11, (Wiley, 2000).

¹⁰ Tretter, F., Gebicke-Haerter, P. J., Albus, M., an der Heiden, U. & Schwegler, H. Systems biology and addiction. *Pharmacopsychiatry* 42 Suppl 1, S11–S31 (2009).

¹¹ Warren, K., Hawkins, R. C. & Sprott, J. C. Substance abuse as a dynamical disease: Evidence and clinical implications of nonlinearity in a time series of daily alcohol consumption. *Addict. Behav.* 28, 369–374 (2003).

termine che hanno fatto luce sui predittori di transizione di uso e abuso di polisostanze¹². Un esempio di questo tipo di studio è rappresentato dalla messa a punto dell'analisi di grandi dati (*big data*) basata sulla propensione da parte di utilizzatori di droghe a consultare determinati siti internet. La rielaborazione di tali dati ha permesso di correlare determinati processi cognitivo/comportamentali con la dipendenza nei confronti di alcol, nicotina e cannabinoidi¹³.

Ancora, altri studi si basano su approcci di intelligenza artificiale correlati alla raccolta di dati tramite questionari demografici/clinici per identificare soggetti con suscettibilità e tendenze di dipendenza verso diverse sostanze psicoattive (eroina, anfetamine)¹⁴. Data proprio la natura del problema, con fattori multipli che giocano un ruolo nella predisposizione alla dipendenza e la manifestazione di sintomi più o meno gravi, si ritiene che i modelli epidemiologici sull'uso e abuso di droghe, potenziate dall'intelligenza artificiale, possano giocare un ruolo fondamentale sia per le potenzialità scientifiche sia per l'impatto clinico e sociologico.

Attualmente, pensare di sostituire *in toto* il modello animale con quello non animale, perché il primo ha un limitato valore traslazionale, sarebbe non solo utopistico, ma, al momento, anche non scientificamente valido; infatti, è fondamentale ricordare che, come nei modelli *in vivo*, vi sono dei forti limiti applicativi legati anche all'approccio *human-based* che devono essere tenuti in considerazione. Vi sono degli ostacoli oggettivi che non possono essere ignorati e questi sono relativi agli effetti che le sostanze d'abuso presentano sul sistema nervoso centrale che, con le metodiche attualmente disponibili sia con o senza l'impiego di animali, non possono essere studiati in modo completo e corretto. Un esempio ne è la valutazione delle reazioni comportamentali determinate dall'assunzione di sostanze psicoattive a scopo terapeutico e non. In questo senso, l'unica alternativa, come evidenziato nello studio di Soares¹⁵, è il ricorso a volontari umani, che, però, rappresenta un compromesso etico discutibile e non di facile attuazione. La stessa valutazione deve essere compiuta in merito alla terapia del dolore, legata a patologie gravemente invalidanti (pazienti oncologici, dolore cronico, etc), per il quale l'effetto terapeutico/farmacologico delle sostanze psicoattive può essere valutato solo nel modello animale, in quanto gli attuali sistemi neuronali *in vitro* non sono

¹² Merikangas, K. R. & McClair, V. L. Epidemiology of substance use disorders. *Human Genetics* 131, 779–789 (2012).

¹³ Whelan, R., Cao, Z., O'Halloran, L. & Pennie, B. Genetics, imaging, and cognition. in *Cognition and Addiction* 365–377 (Elsevier, 2020). doi:10.1016/b978-0-12-815298-0.00027-7

Kim, S. J., Marsch, L. A., Hancock, J. T. & Das, A. K. Scaling Up Research on Drug Abuse and Addiction Through Social Media Big Data. *J. Med. Internet Res.* 19, e353 (2017).

¹⁴ Shahriar, A., Faisal, F., Mahmud, S. U., Chakrabarti, A. & Rabiul Alam, M. G. A machine learning approach to predict vulnerability to drug addiction. in 2019 22nd International Conference on Computer and Information Technology, ICCIT 2019 (Institute of Electrical and Electronics Engineers Inc., 2019). doi:10.1109/ICCIT48885.2019.9038605.

Ahn, W. Y. & Vassileva, J. Machine-learning identifies substance-specific behavioral markers for opiate and stimulant dependence. *Drug Alcohol Depend.* 161, 247–257 (2016).

¹⁵ P. Soares, V. & C. Campos, A. Evidences for the Anti-panic Actions of Cannabidiol. *Curr. Neuropharmacol.* 15, 291–299 (2016).

sufficientemente sviluppati e predittivi. Come riportato nel precedente paragrafo, i progressi compiuti in questo particolare ambito con i modelli neurologici, stanno fornendo i primi risultati interessanti, che, nel futuro, potranno essere d'aiuto anche per questo tipo di valutazioni.

3.2. ELENCO TIPOLOGIE SOSTANZE PER L'IMPIEGO IN RICERCHE CON METODI ALTERNATIVI

Metodi *in vivo* che utilizzano specie a sviluppo evolutivo minore

Modello		Sostanza	Scopo
Pesce teleosteo <i>D. rerio</i>	Larva	Fitocannabinoidi, Alcool, cannabinoidi	Test di tossicità-Test comportamentali "visual motor response" (VMR) Test di tossicità-Test comportamentali "visual motor response" (VMR) /valutazione dell'impatto dello stile di vita associato a co-esposizione a agenti cancerogeni (es. benzo [a] pirene) e all'etanolo (epatotossico), Analisi dell'assorbimento, metabolismo e effetti comportamentali legati a cannabinoidi
	Embrione	Smart drugs, sostanze psicoattive e d'abuso in genere	Studi comportamentali (movimento), Analisi trascrittoma; analisi espressione genica, Studio rilascio neurotrasmettitori, Valutazione alterazioni morfologiche (con zebrafish transgenici), Drug screening su nuove sostanze
			Effetti sullo sviluppo embrionale
Adulti ed embrioni	Sostanze psicostimolanti, nicotina, cannabinoidi, Alcool	Effetti neurocomportamentali; valutazione degli effetti potenziali dell'esposizione acuta alla nicotina nel prevenire comportamenti di tipo ansioso indotti da sostanze di allarme specifiche; valutazione della potenziale mitotossicità degli agonisti del recettore della nicotina acetilcolina; valutazione del potenziale dell'esposizione a nicotina nel migliorare le risposte contestuali alla paura e del coinvolgimento putativo di acetilcolinesterasi cerebrale (AChE) nell'apprendimento associativo; studio dello spettro dei disordini fetocalcolici"	
Insetti	Caenorhabditis elegans	Alcohol	Identificazione di approcci terapeutici per i disordini associati all'abuso di alcool
	Drosophila	Nicotina, sostanze d'abuso; alcool	Effetti della nicotina su un organismo in via di sviluppo; Sensore molecolare di nicotina nel gusto; genetica e genomica delle risposte all'alcool

	Modello	Substrato cellulare	Sostanza	Scopo
Scaffold	Polimerici 3D	Cardiomiociti/hPSC (cellule staminali pluripotenti umane)	smart drugs, steroidi, agenti per doping (es. betabloccanti)	Modulazione attività cardiaca
	Generico	Cellule epatiche	Alcool	Danno epatico (marcatori di infiammazione/steatosi e fibrosi)
Modelli di tessuto	Adiposo (3D)	Preadipociti umani o MSC (cellule staminali multipotenti umane)	Smart drugs, sostanze psicoattive e diabuso in genere	Tossicità e alterazioni del metabolismo lipidico e ormonale
	Epiteliale (3D)	Cellule epiteliali (EpiAirway)	Sigarette, sigari, sigarette elettroniche (nicotina, aromi, oli essenziali)	Effetti sullo sviluppo
	Epatico (3D)/modello di steatosi epatica	Epatociti HepaRG ; linea WIF-B9; Sferoidi HepG2, Microsomi	Benzodiazepine (farmaco psicoattivo), Alcool, sostanze psicoattive	Tossicità e infiammazione alveolo/bronchiale
	Cardiaco normale e patologico (fibrotico)	NA	Smart drugs, steroidi, agenti per doping (es. betabloccanti)	Effetti sulla funzionalità cardiaca in cuori patologici vs. sani
Modelli dinamici	Barriera ematoencefalica (BEE)	NA	Smart drugs, steroidi	Danni alla BEE (in particolare steroidi), funzionalità cerebrale
	Osseo	NA	Ormoni (Steroidi, corticotropina)	Incremento della fragilità ossea, osteoporosi
	Tessuto epiteliale	Cellule epiteliali intestinali e gastriche	Alcool	Tossicità, infiammazione, assorbimento e studi su metaboliti
		Cellule epiteliali polmonari	Sigarette, sigari, sigarette elettroniche (nicotina, aromi, oli essenziali)	Esposizione controllata ad aerosol o fumo accompagnati da modellistica computazionale sugli effetti avversi. Tossicità e infiammazione alveolo/bronchiale

Modello	Substrato cellulare	Sostanza	Scopo
Modelli dinamici	Tessuto epiteliale	Alcool	Tossicità, infiammazione, assorbimento e studi su metaboliti
	Cellule epiteliali intestinali e gastriche	Sigarette, sigari, sigarette elettroniche (nicotina, aromi, olii essenziali)	Esposizione controllata ad aerosol o fumo accompagnati da modellistica computazionale sugli effetti avversi, Tossicità e infiammazione alveolo/bronchiale
Tessuto epatico	Cellule parenchima e stroma epatico	Benzodiazepine (sostanze psicoattive)	Epatotossicità
	Funghi Zygomyceti: Cunninghamella echinulata, Cunninghamella elegans	Nuove sostanze psicoattive	Studio del metabolismo
Modelli microbiologici	NA	Sigarette, sigari, sigarette elettroniche (nicotina, aromi, olii essenziali)	Tossicità e infiammazione alveolare/bronchiale
	Smoking machines combinate con camere di esposizione	Alcool, steroidi	Studi sugli effetti a carico delle articolazioni
Substrati cellulari	Condrociti articolari	Nicotina	Studio degli effetti della inalazione della nicotina sullo sviluppo dell'enfisema associato alle BPCO (broncopneumopatie ostruttive croniche)
	Cellule bronchiali umane non tumorali (Beas2b)	Smart drug, nuove sostanze psicoattive	Studi sulla funzionalità tiroidea
	Cellule CHO-K1 (da ovaio di hamster) transfetate con TSHR	Nicotina	Modello per lo studio degli effetti dell'esposizione prenatale a nicotina.
Organoidi umani cerebrali on a chip	hiPSCs (cellule staminali pluripotenti umane)	Sigarette, sigari	Stress ossidativo
Polmone on a chip	Endotelio, epitelio e macrofagi		

Modello	Substrato cellulare	Sostanza	Scopo	
Modelli dinamici	Tessuto epiteliale	Cellule epiteliali intestinali e gastriche	Alcool	Tossicità, infiammazione, assorbimento e studi su metaboliti
	Tessuto epatico			
Modelli microbiologici	Funghi Zygomyceti:	Cellule parenchima e stroma epatico	Benzodiazepine (sostanze psicoattive)	Epatotossicità
	Cunninghamella echinulata, Cunninghamella elegans			
Smoking machines combinate con camere di esposizione		NA	Sigarette, sigari, sigarette elettroniche (nicotina, aromi, olii essenziali)	Tossicità e infiammazione alveolo/bronchiale

Modello	Substrato cellulare	Sostanza	Scopo
Substrati cellulari	Condrociti articolari	Alcool, steroidi	Studi sugli effetti a carico delle articolazioni
	Cellule bronchiali umane non tumorali (Beas2b)	Nicotina	Studio degli effetti della inalazione della nicotina sullo sviluppo dell'enfisema associato alle BPCO (broncopneumopatie ostruttive croniche)
Organoidi umani cerebrali on a chip	Cellule CHO-K1 (da ovaio di hamster) transfettate con TSHR	Smart drug, nuove sostanze psicoattive	Studi sulla funzionalità tiroidea
	hiPSCs (cellule staminali pluripotenti umane)	Nicotina	Modello per lo studio degli effetti dell'esposizione prenatale a nicotina.
Polmone on a chip	endotelio, epitelio e macrofagi	Sigarette, sigari	Stress ossidativo
Organoidi	Cellule epatiche	Alcool	Danno epatico (marcatori di infiammazione/steatosi e fibrosi)
Colture su MEA (Multielectrode Array)	Colture cellule corticali da IPS umane	Smart drug, nuove sostanze psicoattive, Nicotina	Analisi statistica del segnale per identificare pattern rispetto a controlli negativi e positivi, Modulazione attività sinaptica, Utilizzo di mezzo precondizionato dopo averlo passato per I modelli polmonari
	cellule staminali neurali	Nuovi farmaci contro Alzheimer's con potenziali effetti psicotropi	Immunomodulazione e distress metabolico
Colture neuronali	Colture neuronali e astrocitarie derivate da iPSC umane	Smart drugs, sostanze psicoattive e dabuso in genere	Modulazione attività sinaptica - rilascio di neurotrasmettitori

Modelli *in silico*

Modello	Sostanza	Scopo
QSAR	Designer drugs, nuove sostanza psicoattive	Analisi di forme strutturali di nuove molecole in base a dati sull'attività di molecole simili, Alterazioni comportamentali
Studi di modellistica epidemiologica	Sostanze psicoattive in generale	Studi su popolazioni e pazienti in base a dipendenze, indicatori sociali/comportamentali e outcomes per evidenziare situazioni e soggetti più suscettibili e identificare modalità di intervento
Effect-compartment model	Sostanze psicoattive	Studi per la predizione del potenziale effetto del composto in esame e per identificare la relazione tra concentrazioni dei componenti psicoattivo e effetti osservati nell'ipotetico sito d'azione.
Modelli farmacocinetici su base fisiologica (PBPK)	sostanze psicoattive, nicotina	Stima degli effetti derivati dalla esposizione fetale ai cannabinoidi; effetti dei vaccini con anticorpi anti-nicotina sulla disponibilità di nicotina in cervelli umani e di ratto.
Misura delle costanti cinetiche Km e Vmax delle isoforme del citocromo P450.	sostanze psicoattive	determinare i valori Km e Vmax per le isoforme del CYP usando l'approccio alla deplezione del substrato per i sei nuove sostanze psicotrope derivate da N-2-metossibenzil fenetilamina (NBOMe),
Modelli matematici (equazioni differenziali) e Matematico/computazioni (automi ibridi)	Nicotina, altre sostanze d'abuso	Dipendenza

CAPITOLO 4 CONCLUSIONI

4.1 CONCLUSIONI

La presente relazione è stata redatta in ottemperanza a quanto previsto dall'Art. 42 del Decreto legislativo 4 marzo 2014, n. 26 così come modificato dall'Art. 25, comma 2-bis, della Legge n. 8 del 28 febbraio 2020 e concernente la protezione degli animali utilizzati a fini scientifici. In particolare è disposto che il Ministro della salute deve inviare alle Camere, entro il 30 giugno 2020, *“una relazione sullo stato delle procedure di sperimentazione autorizzate per le ricerche sulle sostanze d'abuso, anche al fine di evidenziare le tipologie di sostanze che possono essere oggetto di programmi di ricerca alternativi e sostitutivi della sperimentazione animale”*.

L'abuso di sostanze ha effetti sociali e sanitari importanti come evidenziato, tra l'altro, dal Dipartimento per le Politiche Antidroga della Presidenza del Consiglio dei Ministri che nella Relazione Annuale al Parlamento (anno 2019) stima che, per l'anno 2018, il solo costo sanitario derivante dall'uso delle sostanze di abuso si aggiri attorno ad 1 miliardo e 800 milioni di euro.

A livello mondiale l'Organizzazione Mondiale della Sanità (OMS 2014) riporta che l'alcolismo è tra le prime cause di morte e disabilità in molti paesi con circa 2,3 milioni di persone che muoiono per cause legate all'alcol e 76,3 milioni hanno disturbi da dipendenza alcolica.

Emerge, dunque, l'importanza della ricerca sulle sostanze d'abuso proprio per l'impatto sociale e sanitario con lo scopo di approfondire ed aggiornare i meccanismi d'azione e di identificare terapie efficaci nel trattamento delle dipendenze. Il raggiungimento di tale obiettivo produrrebbe un grande beneficio economico con la riduzione dei costi a carico del SSN, essendo le ricadute tra gli eventi che maggiormente compromettono i programmi di disintossicazione.

Non da meno sono gli effetti prodotti oltre che sulla sfera comportamentale (come ad esempio l'induzione e il mantenimento della farmacodipendenza), anche sulla sfera tossicologica, con l'induzione di neurotossicità e di tossicità periferica. La tossicità delle sostanze d'abuso rappresenta un ulteriore fenomeno che ha un impatto dannoso concreto sui Sistemi Sanitari Nazionali, in termini di ricoveri ospedalieri e di trattamento dei soggetti intossicati.

Oltre a sussistere la necessità di ricerca relativa all'approfondimento di quanto sopra esposto, l'attività di ricerca in alcune circostanze è resa obbligatoria per lo studio dei nuovi farmaci che attraversano la barriera ematoencefalica, al fine di determinare il loro eventuale effetto *“abuse liability”*. Tali studi sono richiesti da enti regolatori nazionali (AIFA) o internazionali (EMA e FDA).

Da un esame dei contributi inviati dagli enti di ricerca si evidenziano alcune considerazioni.

Nessun progetto di ricerca sul modello animale era finalizzato allo sviluppo di nuove sostanze d'abuso ovvero aveva scopi diversi da quelli terapeutici od assistenziali o dello studio e dell'approfondimento dei meccanismi fisiologici o patologici che sono alla base del loro funzionamento.

Lo studio e la ricerca legati alle sostanze d'abuso rappresentano un campo molto ampio di applicazioni che riguardano differenti ambiti scientifici (ricerca di base, traslazionale, regolatorio).

La stessa considerazione può essere sviluppata anche per i metodi alternativi alla sperimentazione animale; infatti, molto spesso, si tende a semplificare l'approccio scientifico legato alle applicazioni di tali metodi ed ai dati che possono essere forniti dagli stessi.

Se da una parte vi sono sistemi *in vitro* in grado di produrre dati utili ad ampliare informazioni relative allo studio di alcune sostanze d'abuso, come ad esempio nicotina ed alcol, gli stessi non possono sostituire *in toto* il modello animale soprattutto per l'ambito regolatorio e lo studio di quelle sostanze che necessitano di un sistema autosufficiente e completo per dimostrare le loro azioni chimiche sull'organismo (come ad esempio sul sistema nervoso centrale e periferico).

I ricercatori e il mondo scientifico mondiale sostengono che allo stato attuale delle conoscenze scientifiche, per lo studio delle sostanze di abuso, non è possibile sostituire l'uso dei modelli animali *in vivo*. Diverse, infatti, sono state le rimostranze legate all'attuazione della Direttiva europea sul territorio italiano da parte del mondo della ricerca che con più solleciti e richieste di incontro, da ultimo con nota della Società Italiana di Farmacologia indirizzata anche al Presidente del Consiglio, hanno rilevato come il divieto all'utilizzo degli animali in studi su sostanze d'abuso e xenotrapianti, rappresenti un ostacolo per la ricerca italiana.

L'uso dei modelli animali sono autorizzati dal Ministero della salute conformemente a quanto disposto dal d.lgs. 26/2014, nel rispetto del principio delle 3R, ovverosia i principi di *Refinement*, *Replacement*, *Reduction*, (sostituire, ridurre e affinare la sperimentazione animale), che, pertanto, rendono possibile la ricerca attraverso il modello animale solo se non esistono metodi alternativi e se si riducono al minimo il numero degli animali da laboratorio e le sofferenze inflitte agli stessi.

Nel rilascio delle autorizzazioni ministeriali si tiene conto dell'assoluta indispensabilità e necessità dell'uso dell'animale, dell'assenza di metodi alternativi *in vitro*, della non ripetizione degli studi e in ultimo, dell'utilizzo del minor numero di animali per raggiungere l'obiettivo prefissato. Infine si verifica che gli studi siano finalizzati alla salute dell'uomo.

Questo sistema valutativo, basato sulle valutazioni tecniche dei maggiori enti tecnico-scientifici, è il naturale filtro per la ricerca sperimentale sul modello animale che consente lo svolgimento di un progetto di ricerca innovativo e potenzialmente utile e blocca la ricerca ripetitiva di precedenti ricerche.

In conclusione qualora venisse mantenuto e non ulteriormente prorogato il divieto di sperimentazione animale sulle sostanze d'abuso a decorrere dal 1 gennaio 2021, è necessario stabilire, partendo da una puntuale definizione a livello legislativo, cosa s'intenda per sostanza d'abuso, sapendo che un divieto su tali studi potrà avere delle ripercussioni sulla ricerca sulle patologie non solo legate alla tossicodipendenza, ma anche su tutti gli studi per il controllo del dolore, per la terapia di alcune malattie neurodegenerative nelle quali i principi attivi utilizzati, come i farmaci, rientrano nella definizione di sostanze psicotrope o stupefacenti.

Ciò definito, qualora il divieto fosse mantenuto, oltre a dover rispondere all'Unione Europea per l'inevitabile prosieguo della procedura di infrazione, assisteremo a una limitazione sul territorio italiano dello studio e della ricerca, riconosciuti in tutto il territorio UE, volti a garantire un sistema di cure per delle malattie i cui meccanismi d'azione comportamentali e tossicologici necessitano di ulteriori approfondimenti.

4.2 FONTI INFORMATIVE

1. Direttiva 2010/63/UE del Parlamento europeo e del Consiglio del 22 settembre 2010 sulla protezione degli animali utilizzati a fini scientifici.
2. Decreto Legislativo 4 marzo 2014, n. 26, Attuazione della direttiva 2010/63/UE sulla protezione degli animali utilizzati a fini scientifici.
3. Cei, D. Development of a dynamic model of the alveolar interface for the study of aerosol deposition. (University of Pisa, 2015).
4. Benam, K. H. *et al.* Matched-Comparative Modeling of Normal and Diseased Human Airway Responses Using a Microengineered Breathing Lung Chip. *Cell Syst.* **3**, 456-466.e4 (2016).
5. Hondebrink, L. *et al.* Neurotoxicity screening of (illicit) drugs using novel methods for analysis of microelectrode array (MEA) recordings. *Neurotoxicology* **55**, 1-9 (2016).
6. Prytkova, I., Goate, A., Hart, R. P. & Slesinger, P. A. Genetics of Alcohol Use Disorder: A Role for Induced Pluripotent Stem Cells? *Alcoholism: Clinical and Experimental Research* **42**, 1572-1590 (2018).
7. Maximino, C. *et al.* Fingerprinting of Psychoactive Drugs in Zebrafish Anxiety-Like Behaviors. *PLoS One* **9**, e103943 (2014).
8. de Souza Anselmo, C. *et al.* Is zebrafish (*Danio rerio*) a tool for human-like metabolism study? *Drug Test. Anal.* **9**, 1685-1694 (2017).

9. Giandomenico, S. L. *et al.* Cerebral organoids at the air–liquid interface generate diverse nerve tracts with functional output. *Nat. Neurosci.* 22, 669–679 (2019).
10. Negus, S. S. & Banks, M. L. Decoding the structure of abuse potential for new psychoactive substances: Structure-activity relationships for abuse-related effects of 4-substituted methcathinone analogs. in *Current Topics in Behavioral Neurosciences* 32, 119–131 (Springer Verlag, 2017).
11. Todeschini, R. & Consonni, V. *Handbook of molecular descriptors. WileyVCH, Weinheim. Wiley-VCH* 11, (Wiley, 2000).
12. Tretter, F., Gebicke-Haerter, P. J., Albus, M., an der Heiden, U. & Schwegler, H. Systems biology and addiction. *Pharmacopsychiatry* 42 Suppl 1, S11–S31 (2009).
13. Warren, K., Hawkins, R. C. & Sprott, J. C. Substance abuse as a dynamical disease: Evidence and clinical implications of nonlinearity in a time series of daily alcohol consumption. *Addict. Behav.* 28, 369–374 (2003).
14. Merikangas, K. R. & McClair, V. L. Epidemiology of substance use disorders. *Human Genetics* 131, 779–789 (2012).
15. Whelan, R., Cao, Z., O’Halloran, L. & Pennie, B. Genetics, imaging, and cognition. in *Cognition and Addiction* 365–377 (Elsevier, 2020). doi:10.1016/b978-0-12-815298-0.00027-7
16. Kim, S. J., Marsch, L. A., Hancock, J. T. & Das, A. K. Scaling Up Research on Drug Abuse and Addiction Through Social Media Big Data. *J. Med. Internet Res.* 19, e353 (2017).
17. Shahriar, A., Faisal, F., Mahmud, S. U., Chakrabarti, A. & Rabiul Alam, M. G. A machine learning approach to predict vulnerability to drug addiction. in *2019 22nd International Conference on Computer and Information Technology, ICCIT 2019* (Institute of Electrical and Electronics Engineers Inc., 2019). doi:10.1109/ICCIT48885.2019.9038605
18. Ahn, W. Y. & Vassileva, J. Machine-learning identifies substance-specific behavioral markers for opiate and stimulant dependence. *Drug Alcohol Depend.* 161, 247–257 (2016).
19. P. Soares, V. & C. Campos, A. Evidences for the Anti-panic Actions of Cannabidiol. *Curr. Neuropharmacol.* 15, 291–299 (2016).



Presidenza del Consiglio dei Ministri



MOZIONE

SULLA REGOLAZIONE DELLA SPERIMENTAZIONE

SU MODELLI ANIMALI

Dicembre 2020

Premesso che:

- Il Comitato Nazionale per la Bioetica si è espresso sui temi della sperimentazione su modelli animali già il 18 dicembre 2009 richiamando l'attenzione sulla necessità di *“un miglior coordinamento a livello internazionale per lo sviluppo e la convalida di metodi alternativi atti a fornire lo stesso livello di evidenze scientifiche rispetto alle procedure condotte su animali”*;
- L'Unione Europea è intervenuta sul tema della protezione degli animali utilizzati a fini scientifici con la Direttiva 2010/63/ UE del Parlamento europeo e del Consiglio del 22 settembre 2010, con l'obiettivo di rimuovere le discordanze tra le leggi, i regolamenti e le previsioni amministrative dei singoli Stati Membri riguardo alla protezione degli animali utilizzati per la sperimentazione o altri fini scientifici suscettibili di ostacolare il funzionamento del mercato interno;
- Il percorso di recepimento in Italia è culminato nell'emanazione del D. Lgs. 26/2014 che, attenendosi ai principi e ai criteri stabiliti dalla Legge di delegazione europea 2013, ha introdotto, rispetto alla normativa comunitaria, una disciplina molto più restrittiva;
- Nel nostro Paese, secondo gli ultimi dati statistici pubblicati dal Ministero della Salute, nel 2017 sono stati impiegati circa 575 mila modelli animali, di cui il 90% circa roditori, con una riduzione di circa il 5% rispetto all'anno precedente;
- Il Decreto Legislativo 26/2014 ha vietato l'utilizzo di animali per le ricerche su xenotrapianti d'organo e sostanze d'abuso (art.5, comma 2, lettera d e lettera e), ha proibito l'utilizzo degli animali nelle attività di formazione universitaria, ad eccezione di quella di medici e medici veterinari (art.5, comma 2, lettera f) ed ha posto il divieto di allevamento di cani, gatti e

primati non umani, non prevedendo tuttavia il divieto di loro utilizzo sul territorio italiano (art.10, comma 5);

- Il citato Decreto Legislativo ha previsto, all'art. 42, due limiti per l'entrata in vigore dei divieti sopramenzionati: un limite temporale ed uno legato all'effettiva disponibilità di metodi alternativi;
- Con l'art. 42 comma 1 del decreto legislativo n. 26/2014 è stata introdotta una moratoria per l'entrata in vigore dei suddetti divieti. Tale sospensione del divieto è stata estesa a più riprese sino ad oggi
- L'art. 42, c.2 del Decreto prevedeva - inoltre - che, al fine di dare attuazione ai divieti introdotti in fase di recepimento della Direttiva, il Ministero, avvalendosi del Laboratorio del reparto substrati cellulari ed immunologia cellulare dell'Istituto Zooprofilattico sperimentale della Lombardia e dell'Emilia-Romagna, effettuasse un monitoraggio sull'effettiva disponibilità di metodi alternativi, da concludersi entro il 30 giugno 2016;
- L'Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia-Romagna, nel luglio 2016 e nel luglio 2019, ha pubblicato la Relazione sul ricorso alla sperimentazione animale per le sostanze d'abuso e sullo xenotrapianto. In quei rapporti ha, tra l'altro, affermato che "le indagini pre-cliniche (da intendersi su modelli animali) permettono non solo di determinare il potenziale rischio di una sostanza ad indurre dipendenza (potenziale d'abuso) conseguente ad un processo di adattamento neurologico, ma anche di valutare gli effetti della sua cessazione dell'assunzione/somministrazione". Inoltre, negli stessi documenti, è stato affermato che il *"ricorso allo xenotrapianto: trapianto di organi di specie diverse da quella del ricevente, rappresenterebbe un approccio importante per la salvezza di milioni di vite umane. [... e che] al momento non esistono metodi alternativi a tale tipo di sperimentazione"*;
- La Commissione Europea ha aperto, nel 2014, una pre-infrazione (pilot) per analizzare le importanti difformità tra quanto disposto dalla direttiva 2010/63/UE e la sopraccitata, vigente normativa italiana; questa analisi ha portato all'avvio, nell'aprile 2016, di una procedura di infrazione nei confronti dell'Italia. Nel febbraio 2017 la Commissione europea ha emesso un parere motivato con cui ha fissato un termine di due mesi per la modifica delle disposizioni in contrasto con la normativa europea;
- Il 12 marzo 2019 la Commissione Igiene e Sanità del Senato, nel dare il proprio parere sulla "Relazione programmatica sulla partecipazione dell'Italia all'Unione Europea per l'anno 2019", ha chiesto al Governo di adottare iniziative per recepire integralmente la direttiva 2010/63/UE;
- La Comunità Scientifica e, in particolare, la Federazione Italiana Scienze della Vita (FISV), Research4Life, la Conferenza dei Rettori delle Università Italiane CRUI) hanno espresso grande preoccupazione per le conseguenze sulla ricerca scientifica italiana derivanti dall'applicazione del decreto legislativo n. 26/2014 auspicando che la normativa italiana sulla sperimentazione animale sia resa pienamente coerente con la Direttiva europea varata nel 2010 e che la moratoria sia prorogata per un congruo orizzonte temporale.

Considerato, altresì, che:

- in data 11 giugno 2019 è stato istituito, presso il Ministero della Salute, il tavolo di lavoro per la promozione di metodi alternativi all'impiego di animali nelle sperimentazioni scientifiche;
- La sperimentazione su modelli animali risulta essere, allo stato attuale, un percorso ineludibile posto che i metodi alternativi all'impiego di animali nella ricerca scientifica devono essere preventivamente validati dall'*European Center for the Validation of Alternative Methods*, secondo una procedura particolarmente complessa, concordata dagli Stati membri, avente una durata di circa 10 anni;
- Anche rispetto agli studi sulla infezione da SARS-CoV 2, la ricerca non può prescindere dalla sperimentazione animale, che sola fornisce modelli validi e, ad oggi, insostituibili, inclusi gli xenotrapianti, per indagare i meccanismi patogenetici associati alle infezioni, valutare preliminarmente l'efficacia e la sicurezza dei trattamenti terapeutici e individuare eventuali effetti collaterali. Al momento non esistono, né tantomeno sono ipotizzabili a breve, vie alternative.
- A fine dicembre scadrà la moratoria sui divieti aggiuntivi che sono stati imposti dall'Italia rispetto alla direttiva europea in materia. Qualora questi divieti dovessero realmente entrare in vigore, dal 1° gennaio 2021, numerosi ricercatori italiani afferenti al campo delle scienze della vita si troveranno ostacolati dalla legge più restrittiva d'Europa, che impedirà loro di fare ricerca su sostanze d'abuso e xenotrapianti, argomenti di cui è evidente la rilevanza per la tutela della salute di cittadini e cittadine.

Con la presente mozione il Comitato Nazionale per la Biosicurezza, le Biotecnologie e le Scienze della Vita

CHIEDE

al Governo

- di garantire la congrua estensione temporale dei termini sopracitati;
- di adoperarsi per il recepimento completo delle attuali normative europee sulla ricerca animale e che la libertà e centralità della ricerca, condotta nel rispetto dei principi etici stabiliti dai codici istituzionali, nazionali e internazionali, venga riaffermata come elemento valoriale fondante di una società democratica basata sulla conoscenza;
- di inserire in un provvedimento ritenuto congruo, quale la prossima Legge di bilancio 2021, correzioni alle distorsioni presenti nel D. Lgs n. 26 del 2014 che, nel recepire la normativa europea in materia di utilizzo di animali per la sperimentazione, ha introdotto divieti che non esistono negli altri Stati membri. Il CNBBSV ritiene che tale provvedimento debba essere adottato con urgenza, visto il grande rilievo che la ricerca scientifica ha per la salute dell'uomo e degli animali, in particolare nel presente periodo emergenziale.