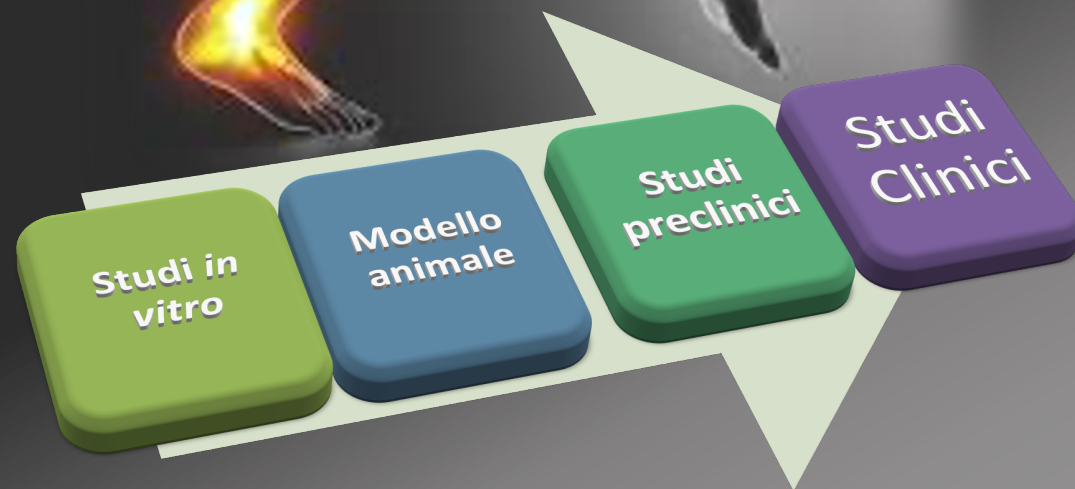


TE IN VIVO EXPERIMENTS





M
E
D
I
C
I
N
A

R
I
G
E
N
E
R
A
T
I
V
A

CONSIDERATIONS IN TISSUE ENGINEERING

- Clearly define the specific clinical problem to be solved.
- Implement the simplest procedure for treating the problem to achieve a meaningful clinical benefit.
 - – Benefit-Risk Ratio (e.g., risks of using cells: cell transformation, morbidity of a 2nd surgical procedure)
 - – Cost
- Need to evaluate tissue engineering
- products in animal models that come closest to human problems to be treated.

GRANT AGREEMENT

P4 FIT must comply with the ethical principles set in the GA:

ARTICLE 34 — Ethics and research integrity

ARTICLE 34.1 Obligation to comply with ethical principles

- ethical principles (including the highest standards of research integrity avoiding fabrication, falsification, plagiarism or other research misconduct)

ARTICLE 34.3 — Activities involving human embryos or human embryonic stem cells



This project has received funding from the European Union's Horizon 2020 research and innovation programme under the Marie Skłodowska-Curie grant agreement No 955685

www.helsinki.fi/p4fit

G.A. ARTICLE 34.2 — Activities raising ethical issues

34.2 Before the beginning of an activity raising an ethical issue, the beneficiary must submit to the Agency copy of any ethics committee opinion required under national law and any notification or authorization for activities raising ethical issues required under national law.

In P4 FIT each BENEFCIARY that has any activity raising ethical issues must obtain:

- any notification/authorisation required under national law needed for implementing the action tasks in question.**
- If these documents are not in English, the BENEFCIARY must produce an English summary of the notifications or authorizations (containing, if available, the conclusions of the committee or authority concerned).**

Screening of ethics issues for each ESR project

3. Human cells/tissues

This section refers to research using, producing or collecting human cells or tissues.

Such cells or tissues may:

- be obtained from commercial sources
- originate from another laboratory, institution or biobank
- be produced or collected by you during previous research activities or
- be produced or collected by you as part of this research project.

3.1 Ethics issues checklist

Section 3: HUMAN CELLS / TISSUES	YES/ NO	Pa ge	Information to be provided	Documents to be provided
Does your research involve human cells or tissues (other than from Human Embryos/Foetuses, see section 1)?	<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>		Details of the cells/ tissue types. plus:	Copies of relevant Ethics Approvals. Copies of accreditation/designation/authorisation/ licensing for using, processing or collecting the human cells or tissues (if required). plus:

Self-assessment of each ESR project on ethical issues

https://ec.europa.eu/research/participants/data/ref/h2020/grants_manual/hi/ethics/h2020_hi_ethics-self-assess_en.pdf



The implementation of ethics issues is monitored during the **entire project life cycle**

Metodi alternativi

Modello matematico:

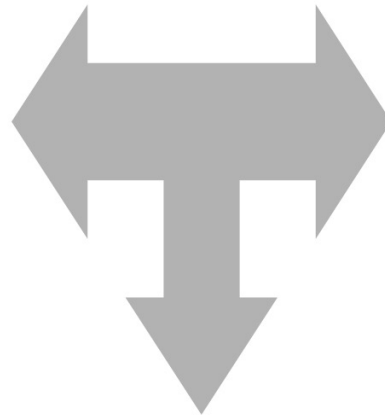
viene comunque elaborato da un essere umano ed è legato a ciò che si conosce fino a quel momento della malattia

Studi in vitro

il limite è dato dal fatto che è una porzione di tessuto rimosso che non funziona esattamente come quando è in rapporto con il sangue, il sistema immunitario, il sistema nervoso, i tessuti adiacenti etc...

IMPIEGO COMPLEMENTARE

Sperimentazione
in vitro



Sperimentazione
in vivo

SVILUPPO DI TERAPIE EFFICACI CHE UTILIZZINO IL
MINOR NUMERO POSSIBILE DI ANIMALI NELLA
SPERIMENTAZIONE

Sperimentazione *in vivo*

Vantaggi

- Valutazione di effetti sistemici
- Monitoraggio di più parametri biologici contemporaneamente
- Possibilità di studiare per un periodo di tempo prolungato processi biologici complessi (cancerogenesi, teratogenesi, comportamento, ecc)
- Valutazione dei meccanismi di tossicocinetica

Svantaggi

- Costo elevato
- Necessità di strutture e processi di stabulazione adeguati
- Elevata variabilità biologica delle rilevazioni sperimentali
- Fattore bioetico

Sperimentazione *in vivo*

Le ragioni del sì

Numerose scoperte medico-scientifiche sono passate attraverso l'utilizzo di animali (es: Fleming sperimentò l'attività antibiotica della penicillina sui topi)

Miglioramento delle tecniche di chirurgia a cuore aperto (es: innesto di bypass), test di materiali chirurgici (fili di sutura, protesi per la sostituzione di valvole cardiache)

Comprensione dei meccanismi immunitari coinvolti nel rigetto di organi trapiantati

Sperimentazione dei vaccini

Sperimentazione *in vivo*

Le ragioni del no

Nessuna specie animale è paragonabile in toto all'uomo. Di conseguenza alcuni farmaci risultati sicuri sull'animale si sono rivelati letali nell'uomo, rendendo vana la sperimentazione sull'animale.

Lo stress cui sono sottoposti gli animali da laboratorio invaliderebbe i risultati degli esperimenti rendendo tutto inattendibile



Regola delle 3R

- *Rimpiazzamento (Replacement)*, sostituzione con metodi alternativi.
- *Riduzione (Reduction)*, riduzione del numero di animali.
- *Raffinamento (Refinement)*, miglioramento delle condizioni degli animali.
- Questa regola è stata inserita dall'[Unione europea](#) nella [Direttiva](#) 2010/63/UE sulla *Protezione degli animali utilizzati a fini scientifici*

gli animali possono essere usati come modelli di una malattia della specie umana o di una specie animale per studiare..

cause

progressione

terapia



<http://www.awionline.org/ht/d/ContentDetails/i/1559>

Osservando animali con una malattia simile all'uomo

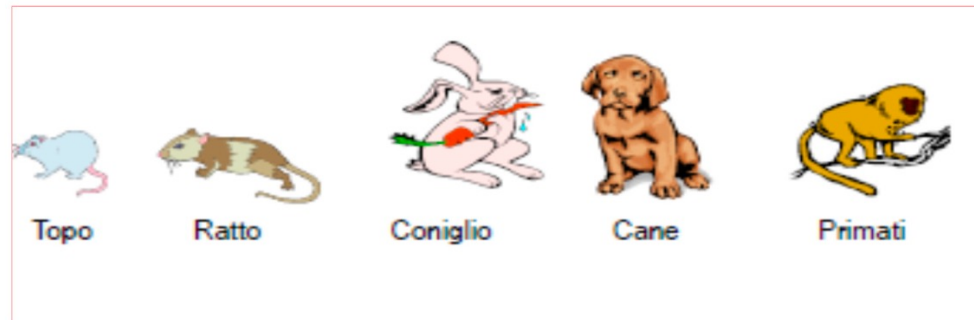
Inducendo la malattia in una specie animale suscettibile



Modelli animali

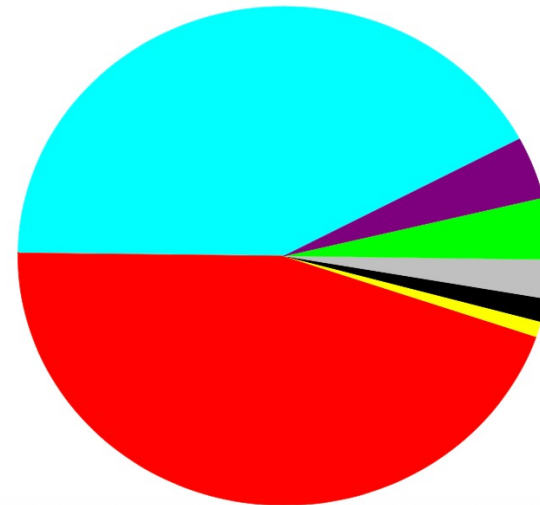


TIPI DI ANIMALI DA ESPERIMENTO



Circa il 95% degli animali utilizzati nella ricerca biomedica è rappresentato da roditori:

topi e ratti	90 %
criceti	2%
cavie	2%
altre specie	1%



Modello animale	Vantaggi	Svantaggi
Topo/Ratto	<ul style="list-style-type: none"> - Economico da comprare e stabulare - Possibilità di avere animali immunodeficienti e knock-out 	<ul style="list-style-type: none"> - Hanno un apparato muscolo scheletrico ridotto - Possibilità di effettuare solo lesioni di piccole dimensioni
Coniglio	<p>Questo animale è molto docile e non aggressivo e quindi facile da maneggiare e osservare.</p> <p>Ampiamente allevato e molto economico.</p> <p>Ha cicli vitali brevi (gestazione, allattamento e pubertà)</p> <p>Rientra nella categoria dei piccoli animali.</p>	<p>Il coniglio è un animale da preda che deve essere veloce. Pertanto, hanno una piccola struttura ossea leggera e fragile. il che lo rende inadeguato per gli impianti di dimensioni maggiori generalmente associati agli esseri umani.</p> <p>I coniglio è un animale vulnerabile soggetto a diarrea post-antibiotica, stasi gastrointestinale e fratture post-impianto dovute a un fragile femore portante.</p>
Cane	<ul style="list-style-type: none"> - Docile - Possibilità di controllare la riabilitazione - Tollera I fissatori esterni 	<ul style="list-style-type: none"> - Costoso da comprare - Problemi ETICI <p>SONO ANIMALI DA COMPAGNIA</p>
Maiale	<ul style="list-style-type: none"> - Anatomia vicina all'uomo (soprattutto il cuore) - Più facilmente accettabili da un punto di vista etico 	<ul style="list-style-type: none"> - Hanno una crescita ponderale troppo rapida (100kg in 4 mesi!) - Sono difficili da gestire

Fonte: Matthew J. Allen, Vet. M.B., Ph.D. Orthopedic Surgery, SUNY Upstate Medical University, Syracuse, New York

THERAPEUTIC APPROACHES IMPLEMENTING TISSUE ENGINEERING

- Injection of cells alone
- Injection of growth factor alone
- Implantation of scaffold alone
- Implantation of scaffold incorporating GFs or genes
- Implantation of cell-seeded scaffold*

TOPI

To assess the biological response and efficacy of the scaffolds in vivo, purpose-made defects were created in the flexor digitorum profundus tendon located within the hindpaw of mice. This was achieved by isolating the once healthy tendon and using a scalpel to create a 50% window. PCL grafts (3 mm) were implanted within this window and held in place by the surrounding tissues. For comparison, the discarded tendon tissue was used as an autograft control in the opposite hindpaw of the same mouse. Mice were free to move about their cages and feed as normal. Harvest of the tissue was taken after 3 days, 3 weeks, and 6 weeks.

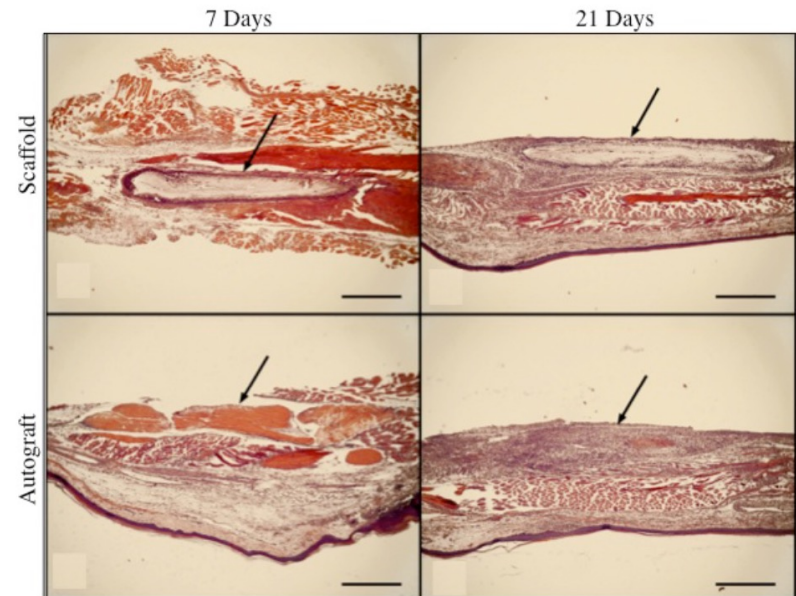
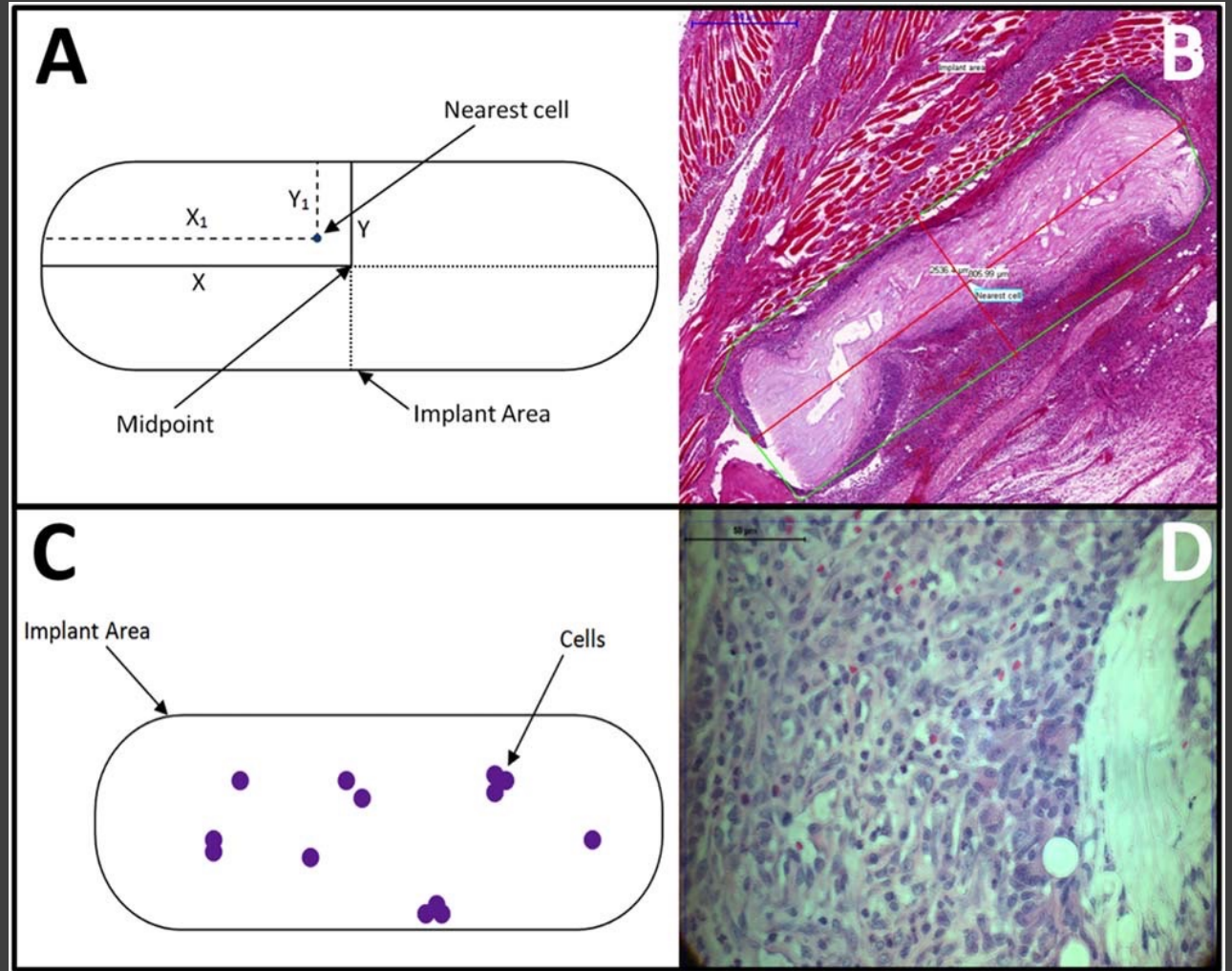
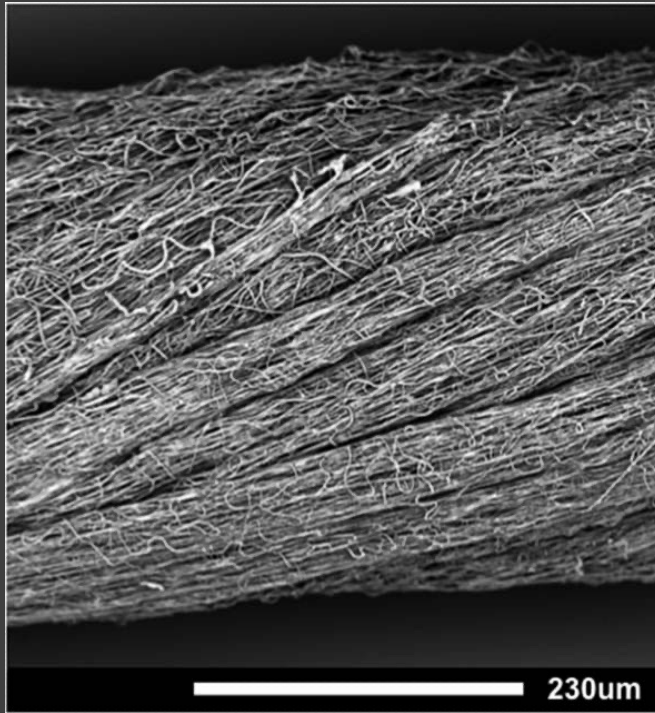
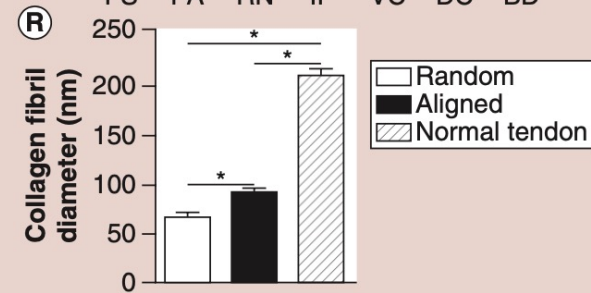
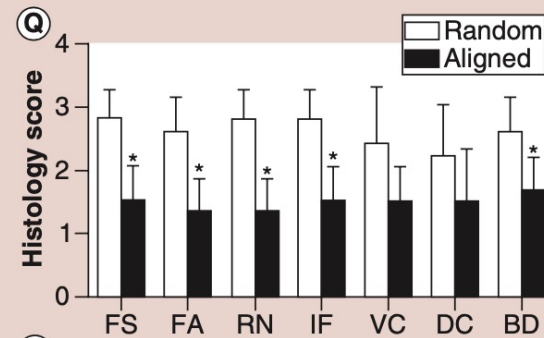
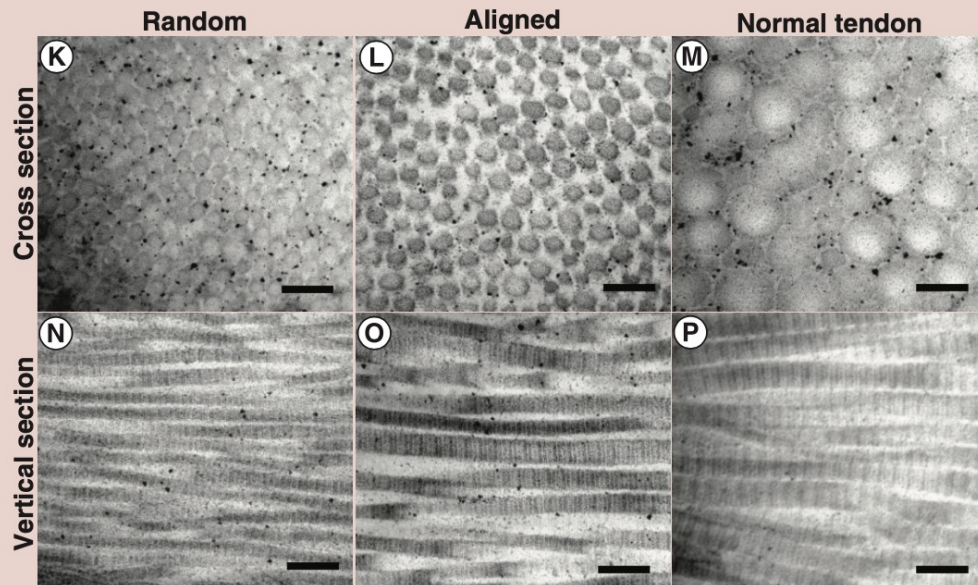
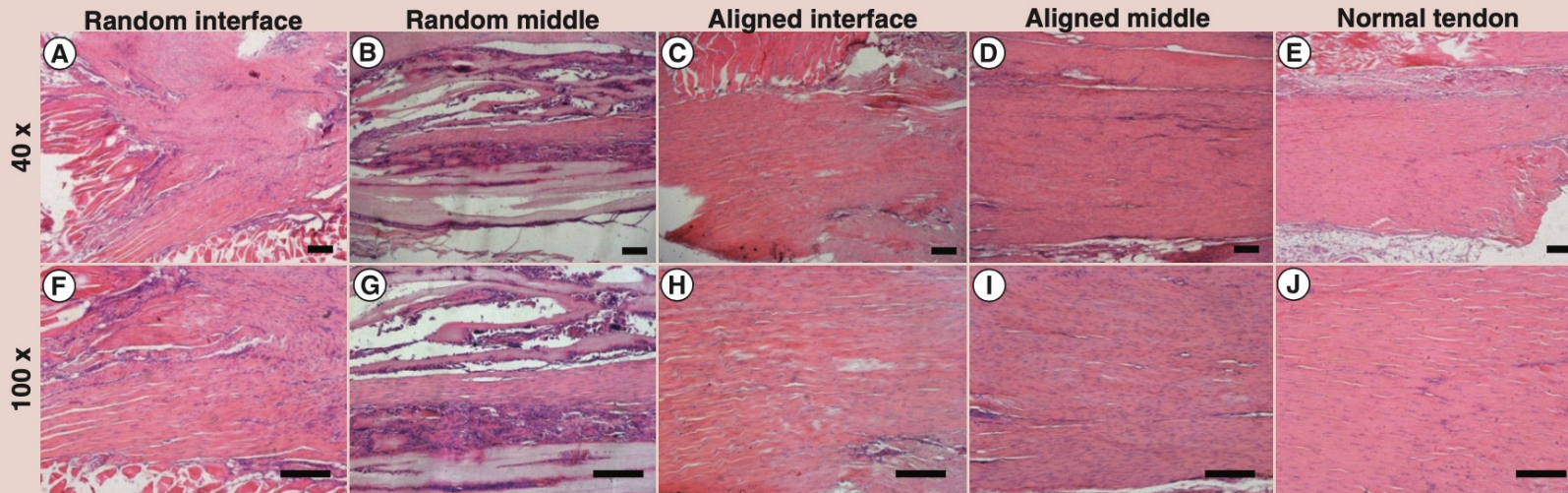


Figure 2: Histological sections comparing electrospun 3D-scaffold to autograft after 7 and 21 days. Arrows highlight position of graft. Scale bar = 500 μ m.

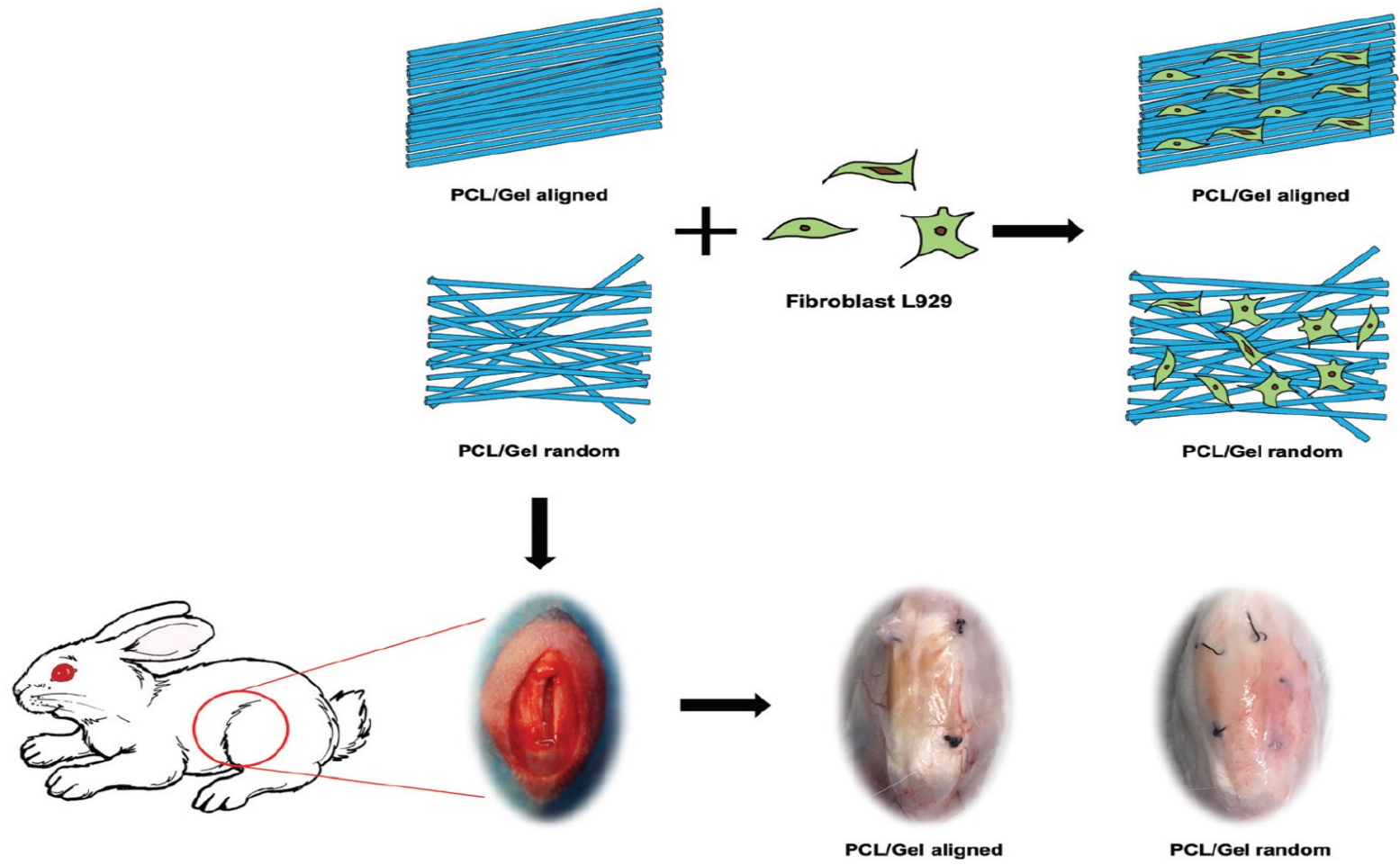


Bhaskar et al. 2016

RATTI



CONIGLI



PECORA

L'ovino come modello preclinico delle lesioni osteo-tendinee



Pecora di razza Appenninica

Similitudini con l'uomo

- Vivono all'aria aperta
- Metabolismo basale
- Morfologia e fisiologia degli organi
- Peso (soggetto adulto ~78kg)
- Sforzo biomeccanico

Wagner et al. *Curr. Opin. Hematol.* 3:410–415 (1996); Bruns et al. *Knee Surg. Sports Traumatol. Arthrosc.* 8:364–369 (2000); Wang J. *Biomech.* 39:1563–1582 (2006); McCarty et al. *J. Cell. Physiol.* 219:324–333 (2009).

Alcuni esempi di studi preclinici ...