

RELAZIONE DR. LORENZO MARTINI PER LA GIORNATA LEGISLATIVA 13/12/05

Troppo si è dissertato nel corso degli anni sulla necessità dei tests in vivo su animali, al fine di sincerarsi della sicurezza, atossicità e anallergenicità di prodotti chimici, che trovano impiego nei cosmetici, negli house-holding products e nei farmaceutici, sull'inutile massacro delle cavie, sulle varie metodiche di supplizio.

Anche se sono previste innovazioni e modifiche delle attuali normative che autorizzano la criminalità nei confronti degli animali da laboratorio (c'è chi parla di genocidio programmato), è bene evidenziare che a tuttoggi vige e rimane valido, ai fini sperimentali, il famigerato DL 116/92 del Presidente della Repubblica che incoraggia la sperimentazione cruenta sulle cavie **a chiunque sia provvisto del titolo idoneo a svolgere le funzioni previste dal decreto stesso.**

E infatti intendo in primis mettere in luce alcuni riferimenti di legge del DL in questione.

Il DL 116/92 del 27/1/92 su supplemento ordinario di GU 40 del 18/2/92, in attuazione della Dir.CEE 609/86, fornisce le definizioni esatte che incoraggiano la ricerca scientifica espletata su animali, spesso, detta ricerca, corredata di protocolli autogiustificativi che dichiarano che gli animali subiranno alcune sofferenze di breve durata.

L'articolo 1 del decreto legislativo recita:

il presente decreto disciplina la protezione degli animali utilizzati a fini sperimentali o ad altri fini scientifici

L'art. 2 fornisce le definizioni di pragmatica che sono, a mio parere, lapidarie, nel vero senso del termine:

animale: qualsiasi vertebrato vivo non umano, ivi comprese le forme larvali capaci o non di riprodursi

esperimento: impiego di un animale a fini sperimentali o fini scientifici che può causare **dolore, sofferenza, angoscia o danni temporanei durevoli grazie alla corretta applicazione di un anestetico o di un analgesico**

persona competente: chiunque sia provvisto del titolo idoneo a svolgere le funzioni previste dal presente decreto

UCCISIONE CON METODI UMANITARI: uccisione di un animale in condizioni che comportino, secondo la specie, **la minore sofferenza fisica e psicologica.**

Ora premetto subito che non sono assolutamente un animalista dell'ultim'ora, anzi sostengo che in Italia si spende in un anno per la derattizzazione di ambienti pubblici e privati, più di quanto si spende per i musei e le gallerie d'arte, ma vorrei altresì riportare le espressioni salienti che impiegarono Draize e collaboratori nel famigerato "Appraisal of the Safety of Chemicals in Foods, Drugs and Cosmetics", edito dopo approvazione del FDA in Texas più di mezzo secolo fa e che tuttoggi sono alla base della forma mentis di produttori al varo di nuovi ritrovati chimici di qualsiasi sorta che vengano a interferire con l'organismo umano.

"the skin of the rabbit is more susceptible to irritation than is possible to identify any substance likely to have an effect on man. The method of assising results may lead to false positives and rejection of materials harmless to man".

Negli USA lo standard prevedeva l'applicazione della sostanza da testare direttamente su pelle abrasa o leggermente scarificata per almeno 24 ore.

In Europa, nello stesso periodo, fu messa in discussione l'iniziativa statunitense e si proponeva di accorciare il supplizio almeno di 4 ore e si indagava se era proprio necessario scarificare la pelle.

Ancora il dibattito è aperto, nonostante il fiorire di protocolli ufficiali che inneggiano alla prescrizione del sacrificio dell'animale.

Comunque, ripeto, per quale motivo si deve tuttoggi compiere dei tests cruenti che svelano solo un margine dichiarato di approssimazione nei confronti di quella che è la reale risposta della cute umana?

Maibach recentemente in "Advances in Modern Toxicology" asserì:

"tests on man confirm the results of the animal test, albeit on a small number of persons who cannot be considered truly representative of a large population".

Eppure qualsiasi nuova issue di materie prime sul mercato cosmetico e farmaceutico prevede sempre uno screening tossicologico.

Vediamo ora le ultimissime novità a livello legislativo:

secondo un D.L., il 193/2005, qualsiasi test animale dovrebbe essere proscritto.

In primis non sono assolutamente riuscito a reperirlo e a decifrarlo, forse si riferisce alla circ. 193/2005 sulla disciplina delle locazioni e dell'equo canone o forse a un regio decreto spagnolo "por el qual se concede la Gran Cruz de la Real y Militar Orden de San Hermenegildo al Contralmirante...omissis".

In effetti sono riuscito a trovare uno schema di D.L., il 50 del 15/03/2005 che reca attuazione della direttiva 2003/80/CE.

La lettera a dell'art. 2-bis recita: è vietata l'immissione sul mercato di prodotti cosmetici la cui formulazione finale sia stata oggetto, allo scopo di conformarsi alle discipline della presente legge, di una sperimentazione animale con un metodo diverso da un metodo alternativo dopo che un tale metodo alternativo sia stato convalidato e adottato a livello comunitario, tenendo debitamente conto dello sviluppo della convalida in seno all'OCSE.

Alla lettera b sempre dell'art. 2-bis si legge:

il problema specifico riguardante la salute umana è dimostrato e la necessità di effettuare esperimenti sugli animali è **giustificata** e supportata da un protocollo di ricerca dettagliato proposto come base per la valutazione.

Ora, infinite sono le proposte di tests alternativi e innovativi e molti sono anche convalidati a livello centrale, ma purtroppo sono spesso molto costosi, teorici e alcuni ancora ufficiosi e ufficializzabili.

Ripeto, non è che non si possa ricorrere a altre chances di effettuare tests sicuri e scientifici, ma, grazie al fatto che la legge lascia aperta la porta di servizio, ebbene, la maggiorparte dei laboratori predilige il massacro degli animali per supportare la credibilità della atossicità e della anallergenicità di un prodotto chimico finito.

Praticamente la dicitura "non testato sui animali" è un plus e non è obbligatoria.

Molto interessante e indimenticabile è il rinomato test di Draize per l'evaluation dell'anallergenicità, test che non si avvale dell'aggiunta del Freund's adjuvant, che corrisponde a una miscela di sostanze capaci di potenziare l'attività antigenica.

"Guinea pigs are injected with the test substances on ten occasions during three weeks..."

Un altro capitolo degno di interesse è quello che riguarda i tests per l'evaluation dei tensioattivi irritanti della cornea di coniglio albino o di topo da laboratorio.

Mc Donald e Gershbein già nel 1977 riferivano che la risposta irritativa corneale varia molto a seconda della cavia sottoposta all'esame.

Topi e conigli infatti sono molto sensibili, addirittura la risposta irritativa è esagerata rispetto a quella che si presume dell'uomo (volontario sano), ma per esempio gatti, scimmie e volatili sono quasi refrattari all'aggressione da tensioattivi o comunque mostrano un tempo di ripristino fisiologico molto rapido.

Tensioattivi polioossietilenici, nonché ammine di acidi grassi, inducono un'iniziale anestesia dell'occhio che sfalsa di conseguenza il grado di percezione sensoriale dell'irritazione.

L'irritazione della cornea, per poter fornire dei dati soddisfacenti, segue un climax tossicologico del tipo no-return: dal semplice eritema fino alla cecità completa per opacizzazione generale di cornea e retina, attraverso le varie stazioni cruciali

dell'annebbiamento (clouding), visione doppia, edema, necrosi e vascolarizzazione della sclera.

Ora però intendo subito evidenziare quanto i farmacologi Stephen e Kaufman, hanno espresso nel 1989 a proposito dell'uso degli animali da laboratorio previsti per la ricerca biomedica e comportamentale, e cioè delle differenze suggestive tra la natura stessa della cornea del coniglio e quella dell'uomo che non costituiscono affatto un'apologia di reato, vale a dire che non consentirebbero aprioristicamente e logicamente una "validation" aprioristica.

- 1) La superficie epiteliale esterna della cornea del coniglio albino è 10 volte più permeabile ai soluti idrofili esogeni irritanti, rispetto alla superficie epiteliale esterna della cornea dell'uomo.
- 2) La membrana di Bowman dell'occhio del coniglio è sei volte più spessa di quella dell'uomo
- 3) La soglia del dolore nell'occhio del coniglio è molto più elevata rispetto a quella dell'uomo
- 4) Il coniglio possiede un sistema lacrimale meno efficace rispetto all'uomo
- 5) Il coniglio possiede una membrana nittitante che esplica un'azione ancora non ben chiarita di facoltà di eliminazione degli aggenti aggressivi esterni
- 6) La cornea dell'uomo in risposta all'aggressione esterna riesce a produrre dei vacuoli epiteliali di difesa, mentre il coniglio non è dotato di questa capacità intrinseca
- 7) Lo spessore medio della cornea del coniglio è di 3,7 mm, mentre quello della cornea dell'uomo è di 5,1 mm
- 8) L'occhio del coniglio è più suscettibile all'aggressione di agenti alcalini, in quanto il pH endoculare nell'umor vitreo è di 8,2 mentre nell'uomo è 7,3
- 9) La cornea del coniglio rappresenta il 25% della superficie corporea totale dell'animale stesso, mentre quella dell'uomo rappresenta solo il 7%.

Alla luce di queste osservazioni, ribadisco, è superfluo al giorno d'oggi continuare a adoperare la cornea del coniglio vivo per effettuare dei tests in vivo che possano avere un riscontro scientifico approvabile e veritiero.

Dall'ECVAM (European Committee on Validation of Alternative Methods) la lieta nuova che dal 2009 non dovranno più assolutamente essere fatti tests in vivo su animali e quindi la ricerca mondiale si sta adoperando per studiare e proporre nuove metodiche in vitro, non cruenti e crudeli, anche se il digesto che riporto di seguito prende in considerazione tests sì, in vitro, ma che si avvalgono di tessuti o cellule di cadaveri animali, di microorganismi o di espianti di origine umana, i quali ancora non sono stati approvati dagli enti soprannazionali adibiti alla validation e alla ufficializzazione concreta, a livello centrale, degli stessi.

Gli enti e le organizzazioni soprannazionali che sovrintendono all'eventuale approvazione di nuovi tests sono:

ECVAM (European Committee on the Validation of Alternative Methods)

ICCVAM (Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods)

COLIPA

CTFA

ECPEP (European Committee Pilot Evaluation Study)

EC/UKHO (European Committee/U.K. Health Office)

OPAL (Œuvre pour l'Assistance aux Animaux de Laboratoire)

SDA (U.S.A. Soaps and Detergents Association)

BGA (Bundesgesundheitsamt)

JCIA (Japanese Cosmetic Industry Association)

JSAAE (Japanese Society for the Alternatives to Animal Experiments).

Al giorno d'oggi, l'unico tests alternativo in vitro che è stato promosso e quindi autorizzato ufficialmente da tutti quanti è:

l' IRRITECTION TEST

Basato su un un substrato glicoproteico che mima la risposta biochimica, modificandosi nella sua struttura quaternaria, all'aggressione dei tensioattivi.

E infatti è stato recentemente riconosciuto come test ufficiale per poter classificare un prodotto chimico nel V Annex della Dir. 67/548/CE riguardo alla salvaguardia per la "free circulation of goods", e inoltre dalle seguenti ulteriori organizzazioni sopranazionali che vicariano il controllo delle esportazioni a livello mondiale:

DOT (Dept. of Transports)

EPA (Environmental Protection Agency)

FDA

OSHA (Occupational Safety and Health Administration)

JATA (Japanese Association for Travel Agencies).

Adirittura l'Irritection tests prevede due tipi di evaluation:

la **ocular** (che designa l'attribuzione dell'epiteto: **irritant**) codificata come NAICS 000001

la **dermal** (che designa l'attribuzione dell'epiteto: **corrosive**) codificata come 000002

(che fanno presagire senz'altro la fiducia nella sollecitudine da parte dei ricercatori e degli studiosi di tutto il mondo a proporre ulteriori nuove alternative in vitro...).

Al vaglio ancora oggi dell'ipotetica validation da parte delle organizzazioni succitate la seguente lista di tests alternativi non ancora ufficiali, secondo categoria specifica:

- a) cell-based tests
- b) micro-organism-based tests
- c) tissue based tests
- d) organotypic models
- e) plant based tests
- f) physico-chemical tests.

Tra i cell based tests, riporto a titolo informativo i seguenti:

- 1) **HTD**: highest tolerated dose (mette in evidenza il cambiamento morfologico cellulare in risposta all'aggressione)
- 2) **Cell-viability** con Tryptan Bleu (metodo istologico-colotimetrico)
- 3) **MIT** test (cambiamento di pH intracellulare)
- 4) **Cell proliferation** (intende determinare le proteine totali con colorazione con cristal violetto)
- 5) **Cell lysis**
- 6) **Denaturation of the Haemoglobin of red cells**
- 7) **Release of radioactive precursors (51Chromium)**
- 8) **Staining by Florescein Diacetate**
- 9) **Staining by Ethidium Bromide**
- 10) **Staining by Propyidium Jodide**
- 11) **Change of metabolism by incorporation of radioactive precursors (leucine)**

12) Uridine uptake

13) Glutamic acid uptake

14) Release of Plasminogen activator from peritoneal cells of rabbits (vengono agevolmente usati anche peritoneo di ratti o mucosa buccale di cadavere umano).

Tra i micro-organism based tests si annoverano:

- 1) Luminescence of Photobacter Phosphoreum**
- 2) Reduction in motility of Tetrahymena Thermophyllia**

Tra i tissue based tests, si ricordano:

- 1) Contraction inhibition of rabbit ileum**
- 2) Release of inflammation mediators from vaginal explant**
- 3) Cell proliferation by 3-H-thymidine of gel-hysthiculture of native cells of hamsters**

Tra gli Organotypic models:

- 1) Fluorescein retention of the mouse eye**
- 2) Fluorescein leakage of mouse eye**
- 3) Transparency of isolated lens**

L'unico plant based test:

Growth inhibition of the pollen tube

Tra i Physico-chemicals:

- 1) EYTEX:** che si basa sulla rilevazione del cambiamento della struttura quaternaria della biomembrana a seguito di perturbazioni indotte
- 3) Zein tests:** che si basa sulla solubilizzazione della zeina e conseguente misurazione quantitativa tramite indagine spettrofotometrica.

Ho a disposizione un documento estremamente interessante, redatto da un ente statunitense (affine all'ICCVAM) che non esito a mostrarvi, anche se documento strettamente riservato che sono riuscito a ottenere grazie all'intervento del mio fratello che è stato per diversi anni rappresentante alle Nazioni Unite a N.Y.C.

L'ente di competenza è il NICEATM (National Interagency Centre for the Evaluation of Alternative Toxicological Methods) e il documento è il numero:

57 del 24 Marzo 2004, Vol. 69, Notices, pag. 13859-61, estratto dal Federal Register.

In questo documento la NICEATM risponde all'ECCVAM in merito a una raccomandazione per la validation di 4 tests tossicologici in vitro:

- 1) BCOP (bovine corneal opalescence and permeability assay)
- 2) IRE (o REET) (rabbit enucleated eye test)
- 3) ICE (o CEET) (chicken enucleated eye test)
- 4) HET-CAM (hen's egg test-chorioallananoic membrane test)

Ora, l'Ente statunitense, in coorte con il NIEHS (National Institute of Environmental Health Sciences) e il NIH (National Institute for Health) in conformità al NTP (National Toxicology Program), esprime delle riserve al riguardo, in quanto, nonostante si operi su culture tissutali e espianti d'organo,

L'irritazione primaria, che ne risulta, dovuta a corrosività, è estremamente severa e irreversibile

E pertanto, cito il testo in lingua originale:

NICEAMT requests the submission of information for standardized in vitro ocular irritancy methods, other than the four identified above, and especially methods that might accurately identify:

non irritating and mild to moderate irritants,

sì che questi:

data on mildly irritating and non irritating substances are welcome.

Ed è proprio per questo esatto motivo che insieme al prof. Lili Wang dell'Istituto di Chimica Analitica della Nagoya University in Giappone e con il patrocinio dell'Istituto Superiore di Sanità, sono alla ricerca di metodi alternativi in vitro che si avvalgono dell'impiego di biomateriale di origine animale che non prevede il sacrificio dell'animale stesso.

La shellac è una lacca di origine animale che tra gli elementi costitutivi annovera l'acido jalarico, un diidrossiterpenoide.

La nostra ricerca si basa sul principio che qualora si intenda deterpenare un olio essenziale di origine vegetale o animale di solito a livello industriale si opera grazie all'impiego di un tensioattivo (ISOBUTYRATE SUCROSE ACETATE) disperdendo l'olio in substrato inerte (di solito CMC, gomma arabica o altre sospensioni idrocolloidali naturali o sintetiche).

Wang è stato il primo e l'unico al mondo che è riuscito nel 1998 a misurare quantitativamente la percentuale di acido jalarico in campioni standardizzati di shellac indiana decerata e depurata (34-36%).

Qualora si sottoponga la shellac a aggressione di tensioattivi chimici, si opera una deterpenazione che influisce sulla percentuale di acido jalarico.

Siamo riusciti a tabulare i valori di deterpenazione di alcuni tensioattivi standard su shellac, ascrivendo detti valori ai seguenti gruppi di appartenenza, secondo la scala canonica di Draize:

primo gruppo: **NO TOXIC:** ACQUA DISTILLATA

secondo gruppo: **MAY IRRITATE:** NON IONICI, BETAINE E ESTERI DI ZUCCHERI

terzo gruppo: **MILD IRRITATING:** ANIONICI, SAPONI ALCALINO-TERROSI

quarto gruppo: **MODERATE IRRITATING:** LAURILSOLFATI, LAURILETERI SOLFATI

quinto gruppo: **SEVERE IRRITATING::** CATIONICI

sesto gruppo: **EXTREMELY SEVERE IRRITATING:** ALCALI CAUSTICI.