

# *Principi di biologia di base*

*Alessandra Coli*  
*Dipartimento di Scienze Veterinarie*  
*Università di Pisa*

✓ *L'utilizzo di un modello animale implica che le informazioni che possano derivare siano esportabili in un ambito più ampio, partendo dall'assunto che somiglianze tra specie diverse portino acquisizioni di conoscenze esportabili in altre specie.*

Se la similarità tra specie risulta fondamentale, la scelta di un modello animale implica:

- La conoscenza della sua biologia
- Un presupposto etico nella scelta

✓ *Il legame tra modello animale e conoscenza della biologia risulta quindi fondamentale per l'esito della sperimentazione.*

Es. negli Eucarioti caratteri comuni sono la presenza di citoscheletro, mitocondri, DNA organizzato in cromosomi e ribosomi.

#### AREE di RICERCA con modelli animali:

- ricerca di base
- ricerca preclinica.
- tests di sicurezza di prodotti non medici per agricoltura e industria (non cosmetici, dal 1998)
- metodi di diagnosi

## *Dati Istituto Mario Negri (1966-1993)*

Anno	Unità di personale	N. di animali* (tratti e topi)	N. di animali per unità di personale (per anno)	Pubblicazioni scientifiche (per anno)
1966	100	64.000	640	58
1974	196	95.000	484	80
1978	280	195.000	697	140
1980	305	140.000	459	160
1982	340	80.000	235	180
1984	450	52.000	115	206
1986	505	50.000	99	275
1988	535	42.000	79	246
1990	527	34.000	64	328
1992	541	32.000	58	365
1993	539	31.000	57	419

\* Utilizzo di animali durante un anno (numero arrotondato).

*(2011)*

82% roditori

18% pesci, anfibi, rettili

0,8% grandi mammiferi (erbivori)

0,4% piccoli mammiferi (coniglio)

0,1% gatti e cani

< 0,1% primati

# Principali scoperte e innovazioni grazie agli animali usati a fini scientifici:

*"Sperimentazione animale e diritto alla conoscenza e alla salute".*

*Materiali dell'ufficio stampa della senatrice Elena Cattaneo*

## Pre XX secolo:

Scoperta della causa della tubercolosi (cavia, coniglio, bovino)

Vaccino contro il vaiolo (bovino)

Vaccino contro il carbonchio (pecora)

Vaccino contro la rabbia (coniglio e cane)

## 1900-1930:

Trapianto di cornea (coniglio)

Scoperta anestetici locali (coniglio e cane)

Scoperta vitamina C (cavia)

Trasfusioni di sangue (cane, cavia e maiale)

Uso dell'insulina (cane, coniglio e topo)

Scoperta dei sulfamidici (cavia)

## 1930-1950:

Sviluppo dei moderni anestetici (ratto coniglio, cavia, gatto, cane, scimmia)

Vaccino antitetanico (cavallo e cavia)

Vaccino antidifterico (cavallo, scimmia, coniglio e cavia)

Scoperta e sviluppo anticoagulanti (coniglio, cavia, topo e gatto)

Scoperta penicillina e streptomina (topo)

Scoperta fattore Rh (scimmia)

Dialisi renale (cavie, coniglio, cane e scimmia)

Vaccini anti-pertosse (topo e coniglio)

Macchina cuore-polmoni per chirurgia cardiaca (cane)

## 1950-1970:

Vaccino antipolio (topo e scimmia)

Trapianto di reni (cane)

Pacemaker cardiaco (cane)

Farmaci per l'ipertensione (ratto, topo e cane)

Sostituzione valvole cardiache (cane, vitello, coniglio, cavia e ratto)

Trapianto di cuore (cane)

Vaccino antimorbillo (scimmia)

Levodopa per cura del Parkinson (topo)

## 1970-1990:

TAC (maiale)

Chemioterapici per le leucemie (topo)

Farmaci inalanti per l'asma (cavia e coniglio)

RNM (coniglio e maiale)

Farmaci anti-rigetto (topo, coniglio, cane e gatto)

Vaccino per l'epatite B (scimmia)

Farmaci antiretrovirali (diverse specie animali)

Cura per la lebbra (scimmia)

## 1990-2000:

Terapia combinata per HIV (topo e scimmia)

Vaccino antimeningite (topo)

Farmaci antidepressivi (ratto)

Farmaci per cancro al seno e prostata (topo, cane e ratto)

Farmaci per il diabete di tipo 2 (topo)

Nuovi farmaci per l'asma (cavia e scimmia)

Statine per ridurre il colesterolo (topo)

### **1950-1970:**

Vaccino antipolio (topo e scimmia)  
Trapianto di reni (cane)  
Pacemaker cardiaco (cane)  
Farmaci per l'ipertensione (ratto, topo e cane)  
Sostituzione valvole cardiache (cane, vitello, coniglio, cavia e ratto)  
Trapianto di cuore (cane)  
Vaccino antimorbillo (scimmia)  
Antidepressivi e antipsicotici (ratto, cavia e coniglio)  
Levodopa per cura del Parkinson (topo)

### **1970-1990:**

TAC (maiale)  
Chemioterapici per le leucemie (topo)  
Farmaci anti-ulcera (ratto e cane)  
Farmaci inalanti per l'asma (cavia e coniglio)  
RNM (coniglio e maiale)  
Farmaci anti-rigetto (topo, coniglio, cane e gatto)  
Vaccino per l'epatite B (scimmia)  
Farmaci antiretrovirali (diverse specie animali)  
Cura per la lebbra (scimmia)

### **1990-2000:**

Terapia combinata per HIV (topo e scimmia)  
Vaccino antimeningite (topo)  
Farmaci antidepressivi (ratto)  
Farmaci per cancro al seno e prostata (topo, cane e ratto)  
Farmaci per il diabete di tipo 2 (topo)  
Nuovi farmaci per l'asma (cavia e scimmia)  
Statine per ridurre il colesterolo (topo)

### **2000-2010:**

Anticorpi monoclonali per leucemie e linfomi (topo)  
Vaccino contro il tumore del collo dell'utero (coniglio e bovino)  
Vaccino antinfluenzale (pollo)  
Cellule staminali per la cura di patologie neurodegenerative (topo, ratto e scimmia)  
Insulina orale o inalatoria per diabete tipo 1 (topo)  
Sviluppo in corso della terapia genica per distrofia muscolare, fibrosi cistica e anemia falciforme (topo)  
Sviluppo in corso del vaccino per l'Alzheimer (topo)  
Sviluppo in corso del vaccino antimalarico (topo)

Oggi il termine “ANIMALE DA LABORATORIO”  
può essere sostituito con il termine  
“ORGANISMO MODELLO”

definito come:

Organismo vivente con un processo patologico che può essere *trasmesso geneticamente, spontaneamente acquisito o indotto*, che in uno o più aspetti ha stretta similitudine con uno stesso fenomeno che si verifica nell’uomo

✓ Le eventuali differenze tra la fisiologia degli **ORGANISMI MODELLO** e quella dell'uomo, che possano permettere estrapolazioni di concetti da una specie ad un'altra, sono il target della *biologia comparativa*.

(<http://www.animalresearch.info/en/science/animalmodels>)

✓ Il concetto di **ORGANISMO MODELLO** è strettamente legato ad un **BERSAGLIO** che può essere l'uomo o altri animali.

Es. per studi di genetica l'uomo presenta caratteristiche di ciclo riproduttivo troppo lungo, per cui determinati processi genetici sono meglio valutabili in animali che si riproducono in ore o giorni (come *Drosophila Melanogaster*)

## *5 sono le caratteristiche chiave della ricerca biomedica:*

1. **Il modello e il bersaglio hanno bisogno di avere almeno una sola caratteristica in comune, insieme a un qualsiasi numero di differenze:** i modelli utili possono essere anche astratti, come un'equazione matematica o una simulazione al computer.
2. **Alcune delle differenze tra modello e bersaglio sono determinanti:** si agisce sul modello in modo non possibile su bersaglio (es. uomo). Il modello topo è piccolo, prolifico, modificabile geneticamente in modi non possibile per un suo bersaglio (es. uomo).
3. **I modelli dovrebbero essere altamente specifici per un particolare studio:** se adatti per studi su cancro, malattie cardiache, diabete o malattie neurologiche, i topi sono inadatti nella tossicologia regolatoria (perché servono modelli a lunga vita). Attenzione: non esiste buono o cattivo modello senza specificare il contesto dello studio proposto.
4. **I modelli devono essere convalidati:** solo gli studi clinici dimostrano se il modello è valido o meno.
5. **I modelli sono soggetti a miglioramento:** la comprensione della *biologia della specie* è fondamentale e strettamente legata al crescere delle conoscenze scientifiche.

Gli **ORGANISMI MODELLO** *più diffusi* sono caratterizzati da:

- Rapido sviluppo e ciclo vitale breve
- Piccola taglia
- Facile disponibilità

Il loro uso deve prevedere:

- Condivisione del sistema fisiologico oggetto di studio
- Facile allevamento e manutenzione
- Adeguato sviluppo neurologico rispetto allo studio prescelto

## Progetto genoma

Organismo	Sequenziamento genoma	Ricombinazione omologa	Conoscenza della biochimica
<b><i>Procariota</i></b>			
Escherichia coli	Si	Si	Eccellente
<b><i>Eucariota unicellulare</i></b>			
Dictyostelium discoideum	Si	Si	Eccellente
Saccharomyces cerevisiae	Si	Si	Buono
<b><i>Eucariota pluricellulare</i></b>			
Caenorhabditis elegans	Si	Difficoltoso	Non così buono
Drosophila melanogaster	Si	Difficile	Buono
<b><i>Vertebrato</i></b>			
Danio rerio	Si	No	Buono
Xenopus laevis	Si		
Mus musculus	Si	Si	Buono
Rattus norvegicus	Si	Si	Buono
Cavia cobaya	Si	Si	Buono
Oryctolagus cuniculus	Si	Si	Buono
<i>Homo sapiens</i>	Si	Si	Buono

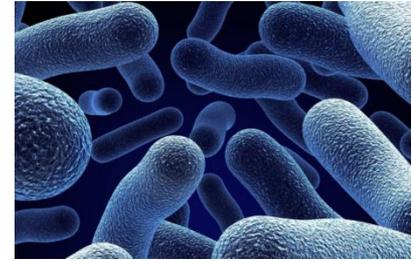
**Ricombinazione omologa:** segno di mantenimento di integrità genomica: meccanismo di riparazione a danni di DNA e intervento nel corretto appaiamento dei cromosomi omologhi in meiosi

## **ORGANISMI MODELLO NON MAMMIFERI**

organismi utilizzabili per lo studio di alcuni processi biologici di mammiferi e per la maggior parte degli studi di genomica.

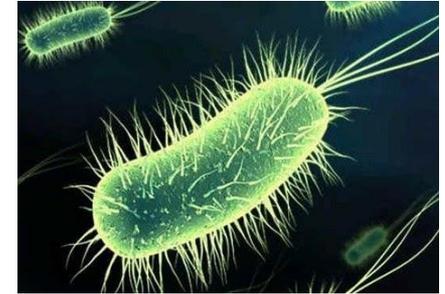
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/About/model/mammal.html>

## Archea (Archeobatteri)



- Ipotesi oggi accettata: forme di vita che hanno dato origine agli eucarioti (fusione di un archaea, senza nucleo, e un eubacterio, per endosimbiosi).
- Vivono in ambienti estremi (“batteri estremofili”).
- Gli *studi sulle molecole che consentono loro particolari condizioni di vita* si sono rivelati interessanti in **campi di biorisanamento ambientale, cambiamenti climatici globali, biotecnologie e produzione di energia.**
- Nonostante le somiglianze con il corredo genetico dei batteri, presentano *caratteristiche geniche simili agli eucarioti*: studi sulla **loro genomica possono fornire informazioni sull’evoluzione della vita sulla terra.**

## Procarioti unicellulari Es. Escherichia coli



- Batterio con DNA facilmente modificabile (88% del suo genoma)
- Utilizzato per produzione di sostanze con **processi biotecnologici** (reingegnerizzazione del DNA con l'inserimento di DNA di altri batteri per ottenere organismi non presenti e non ottenibili in natura).

# Eucarioti unicellulari

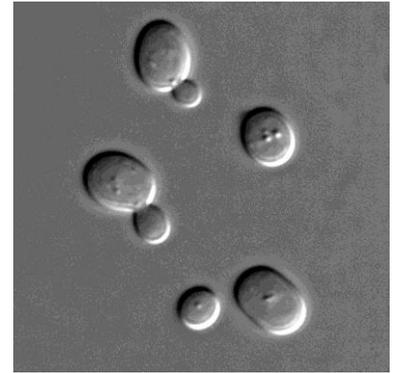
## Es. *Dictyostelium discoideum*



- Organismo modello per studi di **biologia dello sviluppo, biologia molecolare e tossicologia ambientale**.
- Come organismi unicellulari vivono nel terriccio del sottobosco, nutrendosi di batteri.
- In condizioni ambientali avverse → si aggregano a formare organismi pluricellulari (*pseudoplasmodio*), capaci di differenziarsi in zone illuminate in una base, uno stelo e corpo fruttifero. In quest'ultimo si differenziano *spore* che, in ambiente favorevole, producono nuovi organismi unicellulari, mentre la base e lo stelo disseccano.
- *In questo processo di sviluppo (alternanza di unicellularità e pluricellularità), questo eucariota rappresenta un buon modello di studio di chemiotassi, differenziamento cellulare, modifiche del citoscheletro, trasduzione del segnale e fagocitosi).*

## Eucarioti unicellulari

### Es. *Saccharomyces cerevisiae* (lievito)



- Lievito che si riproduce per gemmazione (produzione di vino e birra, processo di fermentazione).
- La sua coltura è semplice e ricava energia sia da processi aerobici che anaerobici.
- Il genoma del ceppo S288C è stato il primo genoma di eucariota completamente sequenziato (1996). Condivisione del 23% del genoma umano.
- Organismo modello **in studi di citologia e genetica**.

# Eucarioti pluricellulari

## Es. *Caenorhabditis elegans* (nematode)



- Piccolo nematode del suolo. Ciclo generazionale di giorni, alta prolificità.
- Modello pluricellulare ben caratterizzato a livello genomico, embriologico, per **studi di biologia cellulare e neurobiologia**. Può essere manipolato geneticamente con la stessa facilità e velocità di un microrganismo, con il vantaggio di avere una completa organizzazione in organi, sistemi o apparati, compreso un sistema di sensorio (permette suscettibilità a cambiamenti ambientali).
- Modello per **identificare sostanze chimiche con eventuale proprietà antibiotica**.
- *Procedura*: infezione del nematode con batterio → verifica della sopravvivenza dei nematodi all'infezione → possibile azione antibiotica della sostanza utilizzata (ad oggi 28 antibiotici su 37000 testati).
- Test non conclusivo ma utile punto di partenza.

# Eucarioti pluricellulari

## Es. *Drosophila melanogaster* (insetto)



- Moscerino della frutta. Ciclo riproduttivo veloce, presenta una complessità biologica paragonabile a quella di un mammifero. Ha permesso di approfondire gli studi genetici mendeliani (studio dell'ereditarietà legata ai cromosomi sessuali e della scarsa capacità di ricombinazione di geni vicini fra loro)
- Presenta solo 4 cromosomi (3 autosomi e 1 eterocromosoma) di dimensioni “giganti” rispetto alla norma, facilmente visibili e studiabili nel dettaglio. Il sequenziamento dell'intero genoma ha permesso di conoscere con esattezza i geni che promuovono la crescita delle varie parti anatomiche dell'insetto.
- Grazie alla sua simmetria bilaterale viene utilizzato per **studi sullo sviluppo dell'organismo di forme animali superiori** (ha permesso la scoperta di *geni omeotici*: geni di controllo che regolano altri geni adibiti allo sviluppo del piano strutturale di un organismo), **studi di genetica, di neoplasie, immunità, invecchiamento, ereditarietà.**

# Vertebrati

## Es. Danio rerio (zebrafish)



- Utilizzato per lo studio della biologia evolutiva dello sviluppo di vertebrati. Sviluppo rapido (organi formati a 24 h. dalla fertilizzazione, uscita dall'uovo a 3 gg dalla fertilizzazione), maturità sessuale a 3-4 mesi, alta fertilità (200 uova/settimana), facile allevamento.
- Lo sviluppo embrionale può essere seguito grazie alla trasparenza dell'uovo (embrioni trasparenti = migliore accessibilità del dato).
- Frequente manipolazione del genoma (es. modello di zebrafish sviluppa un particolare tipo di leucemia: le cellule leucemiche sono fosforescenti).

### Possibili svantaggi:

- I mutanti embrionali sopravvivono anche in presenza di grosse malformazioni.
- Inadatti per studio di comportamenti cerebrali complessi.

# Vertebrati

## Es. *Xenopus laevis* (Xenopo liscio)

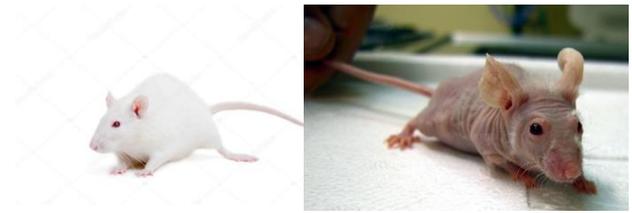


- La maggior parte del ciclo vitale è in acqua.
- Fertilità più comune in primavera, ma sono documentabili fino a circa 4 cicli l'anno, embrioni di grandi dimensioni.
- I girini si sviluppano completamente in 6-8 settimane, maturità sessuale in 1-2 anni.
- Organismo modello per la **biologia evolutiva dello sviluppo**: interessanti gli studi di espressione del DNA e RNA e modello ideale per lo studio del **meccanismo di apoptosi**.

# **ORGANISMI MODELLO MAMMIFERI**

*Corso di base in materia di protezione degli animali utilizzati a fini scientifici*  
Pisa, 5 – 6 novembre 2018

# Mus musculus (Topo)



- Circa il 70% degli organismi modello mammiferi.
- Piccoli, poco costosi e facili da maneggiare. Ciclo vitale e riproduttivo breve.
- **Modello per malattie umane:** organizzazione del loro DNA e espressione genica *simile* a quella dell'uomo (condivisione del 98% dei geni). Le sequenze geniche che codificano per diverse proteine coinvolte in processi vitali presentano un elevato grado di somiglianza fra uomo e topo.
- Molte malattie umane colpiscono spontaneamente anche i topi (**neoplasie, diabete**) e manipolando i loro geni è possibile ottenere lo sviluppo di patologie che normalmente non presentano.
- Il loro utilizzo ha permesso di realizzare *banche dati e ceppi ad alta omogeneità genetica* tali da ridurre il più possibile la variabilità e l'errore nelle valutazioni.
- Tramite selezione artificiale, *topi nudi o immunodeficienti* sono caratterizzati da sistema immunitario carente. Permettono studi su **patologie del sistema immunitario (AIDS, leucemie)** (Necessitano di ambiente sterile).

## Rattus norvegicus (Ratto)



- Rispetto al topo presenta il vantaggio della maggiore mole corporea.
- Il ratto rappresenta il modello principale nello **studio del legame geni-funzione**.
- Grande numero di ceppi inbred (~400).
- Alcuni modelli di malattia umana sono ottenibili solo nel ratto → rappresenta una risorsa unica per la conoscenza delle basi genetiche di alcune patologie.
- Organismo modello di studio per la **fisiologia dell'apparato cardio-vascolare, metabolismo, controllo neurologico, differenze genere-correlate e età-correlate, studi sull'ipertensione e sui sistemi di neurotrasmissione**.

## ***PARAMETRI BIOLOGICI***

	<b>TOPO</b>	<b>RATTO</b>
<b><i>Durata vita</i></b>	24-36 mesi	3 anni
<b><i>Pubertà</i></b>	6-8 settimane	45gg ♀ e 50gg ♂
<b><i>Ciclo estrale</i></b>	≈5gg	≈5gg
<b><i>Gravidanza</i></b>	18-21gg	19-23gg
<b><i>Peso alla nascita</i></b>	≈1,5g	≈4,5g
<b><i>Peso adulto</i></b>	20-50g	300-600g
<b><i>Svezzamento</i></b>	21-23gg	21-23gg
<b><i>Prole</i></b>	8-10	8-12
<b><i>Temperatura rettale</i></b>	36-37°C	37,5-38,5°C
<b><i>Frequenza cardiaca</i></b>	≈400-700/min	≈270-350/min



## Cavia cobaya (Cavia)

- Utilizzo molto ridotto nelle più attuali ricerche scientifiche, sostituita da topo e ratto, caratterizzati da ciclo vitale più breve, tempo di gestazione inferiore, maggiore sensibilità dimostrata a tecniche di ingegneria genetica.
- Nel passato utilizzata in studi di **batteriologia**, rimane ad oggi di una certa validità come **organismo modello per ricerche di tipo metabolico**: es. è uno dei pochi animali che, come l'uomo, deve assumere vitamina C con la dieta (non è in grado di sintetizzarla).

## ***PARAMETRI BIOLOGICI***

<b>CAVIA</b>	
<b><i>Durata vita</i></b>	≈6-8 anni
<b><i>Pubertà</i></b>	70gg ♀ e 25-30gg ♂
<b><i>Ciclo estrale</i></b>	14-19gg
<b><i>Gravidanza</i></b>	59-72gg
<b><i>Peso alla nascita</i></b>	75-100g
<b><i>Peso adulto</i></b>	600-1000 g
<b><i>Svezzamento</i></b>	15-20gg
<b><i>Prole</i></b>	8-12
<b><i>Temperatura rettale</i></b>	38,2-40,5°C
<b><i>Frequenza cardiaca</i></b>	≈226-400 /min

# Oryctolagus cuniculus ( Coniglio)

- In passato: organismo modello per lo studio delle malattie cardiovascolari (ipertensione e aterosclerosi), cancro, per studi su glaucoma, infezioni oculari e dell'orecchio, sulle condizioni della pelle e patologie metaboliche (diabete).
- Uso più comune attuale è la **produzione di anticorpi**, utilizzati per rilevare la presenza o l'assenza di malattie e per la ricerca su malattie infettive e immunologia.
- Eccellente modello per simulare la risposta del tessuto umano alla radiazione prodotta dai **laser chirurgici** (nella chirurgia oculare e intervento su placche ateromatose delle pareti delle arterie).
- Più recente utilizzo: **coniglio di razza Watanabe** presenta alti livelli di colesterolo ematico causati da difetto genetico (*LDL-receptor-defective Watanabe heritable hyperlipidemic (WHHL) rabbit*): organismo modello per migliorare il trattamento in soggetti con ipercolesterolemia familiare. Sviluppo di tale modello: fegato artificiale

Jain, M., Frobert, A., Valentin, J., Cook, S., Giraud, M. N. The Rabbit Model of Accelerated Atherosclerosis: A Methodological Perspective of the Iliac Artery Balloon Injury. *J. Vis. Exp.* (128), (2017)



## ***PARAMETRI BIOLOGICI***

<b>CONIGLIO</b>	
<i>Durata vita</i>	7-8 anni
<i>Pubertà</i>	4-12 mesi
<i>Ciclo estrale</i>	poliestrale
<i>Gravidanza</i>	28-36gg
<i>Peso alla nascita</i>	30-70g
<i>Peso adulto</i>	2,5-6Kg
<i>Svezzamento</i>	6-8 settimane
<i>Prole</i>	6-10
<i>Temperatura rettale</i>	38,5-40°C
<i>Frequenza cardiaca</i>	≈200-250 /min

## ORGANISMI MODELLO MAMMIFERI (topo)

### *STANDARDIZZAZIONE GENETICA sulla base del proprio background genetico*

<b>RANDOM BREEDING (outbred)</b>	Accoppiamenti tra non consanguinei
<b>INBREEDING (inbred)</b>	Accoppiamenti fratello sorella per almeno 20 generazioni
<b>COISOGENICI e CONGENICI</b>	Linee mutanti
<b>TRANSGENICI e KNOCKOUT</b>	Linea con un carattere genetico introdotto/tolto

## Organismi modello OUTBRED

- Un ceppo costituito da una colonia di organismi modello «*geneticamente non definita*» = genotipo ignoto in ogni singolo locus.
- Le caratteristiche genetiche derivano da *incrocio random* e cambiano nel tempo per un lento processo di inbreeding (che dovrebbe rimanere inferiore al 1%).
- Colonie outbred dovrebbero avere almeno 25 coppie di riproduttori.
- Meccanismo ideale (minimal breeding): evitare incroci tra consanguinei, usare i riproduttori per un tempo prolungato.

## Organismi modello INBRED (Es. Balb/c)

- Un ceppo inbred è tale dopo almeno 20 generazioni di incroci fratello/sorella.
- Questi ceppi sono tracciabili fino a 20-30 generazioni, con il 99% di omozigosi dalla 21° generazione in poi.
- La isogenicità permette istocompatibilità, stabile nel tempo, non cambia a seguito di processi di selezione, randomizzazione o inbreeding ma solo per mutazione.
- Uniformità fenotipica e individualità → ogni ceppo inbred è caratterizzato da una unica combinazione di alleli, diversa da altro ceppo inbred.

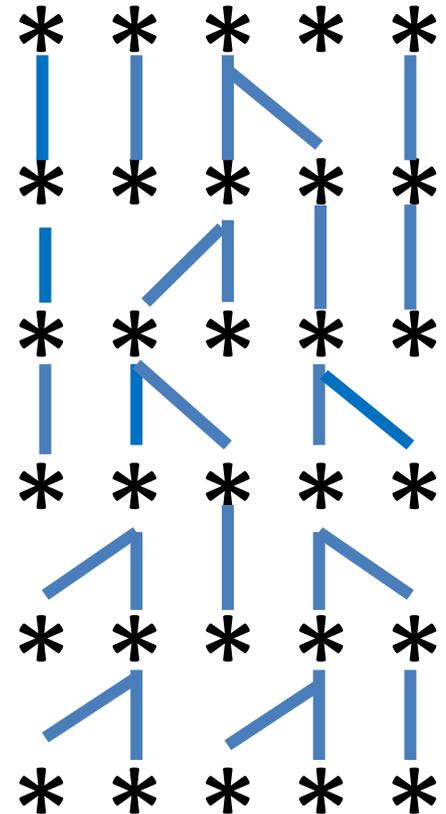


## Conseguenze di INBREEDING

- I ceppi inbred non presentano alta fertilità e sono meno resistenti alle infezioni, specie al variare dell'ambiente di stabulazione.
- Causa: aumento di omozigosi per geni letali.
- Possibile conseguenza: perdita della linea genetica con *aumento della sua variabilità*.
- *Metodo migliore per ridurre la possibile variabilità genetica*:

Per ogni generazione:

- ❖ *alcuni soggetti sono accoppiati random (fino a 3 generazioni), cercando di mantenere costante il grado di inbreeding, con prole che entra solo in progetti sperimentali*
- ❖ *alcuni soggetti sono destinati al mantenimento della linea pura»*



## Organismi modello mutanti (topi)

### COISOGENICI

- Derivano da occasionale mutazione in un ceppo inbred.
- *Se vitale* e si può *propagare mediante incrocio di omozigoti mutanti*, la differenza con il ceppo inbred sarà relativa a un solo locus.
- *Se stabilizzata*, la mutazione potrebbe risultare utile a fini sperimentali.

### CONGENICI

- Derivano da trasferimento (per almeno 10 generazioni) di un gene in un ceppo inbred.
- Il ceppo congenico differisce dall'originario *solo per il gene donato* (e eventuali geni concatenati al locus modificato)

# TRANSGENICI

- Derivano da *introduzione di un gene esogeno* (estraneo alla specie dell'organismo esaminata) nel DNA di un ceppo inbred stabilizzato.

## *Metodologia di introduzione*

- **Microiniezione del DNA** nel *pronucleo*: la collocazione della sequenza genica all'interno del cromosoma ed il numero delle copie di DNA ottenute sono *casuali*.  
*Vantaggio*: DNA esogeno introdotto codifica per tutti i tessuti dell'organismo modello e nella linea germinale.
- **Infezione con retrovirus**: DNA a corta lunghezza inserito mediante genoma di virus (*trasfezione* = introduzione di materiale biologico esogeno in cellule eucariotiche). Si inserisce generalmente DNA e RNA o proteine. Le cellule così modificate formano un organismo modello «mosaico» o «chimerico». *Svantaggio*: il tessuto germinale può non essere coinvolto.
- **Trasferimento di cellule embrionali nella blastocisti**: introduzione di cellule staminali totipotenti coinvolte nella formazione dei vari tessuti di un organismo.

# KNOCKOUT

- Derivano da meccanismo di *inattivazione di un gene esistente*, mediante sostituzione di uno specifico gene con un *allele inattivo*.
- Tale meccanismo agisce selettivamente su un gene target in cellule staminali embrionali e consente così di approfondire le specifiche funzioni del gene sostituito.
- *Ulteriore evoluzione di tale meccanismo sostitutivo: creazione di organismi modello knock-out solo per specifici tessuti → il gene si inattiva al momento in cui il tessuto ha terminato il suo processo di differenziazione e «spegnendosi» a sviluppo completato, non determinerà la morte precoce dell'embrione.*

La domanda attuale nella comunità scientifica:

*... date le tecnologie oggi disponibili e i relativi progressi scientifici è ancora oggi necessario utilizzare organismi modello animali?.....*

L'opinione prevalente nella stessa comunità scientifica è che *dall'impiego complementare della sperimentazione in vivo e in vitro e della relativa elaborazione informatica possa derivare un'evoluzione delle conoscenze scientifiche tale da favorire lo sviluppo di terapie efficaci che possano ridurre il numero di tali modelli animali nella sperimentazione.*

**Concludendo...**

La conoscenza della biologia dell'organismo modello in relazione alla specie bersaglio e al target della ricerca sono fondamentali per dare una giusta risposta al quesito attuale della comunità scientifica

**GRAZIE PER L'ATTENZIONE**