




# TOSSICOLOGIA E FARMACOLOGIA SPERIMENTALE

Dott.ssa Giulia Caioni, PhD  
[gcaioni@unite.it](mailto:gcaioni@unite.it)

- 
- Lo studio della **tossicologia sperimentale** è fondamentale nell'ambito dell'ecologia e dell'ecotossicologia ambientale perché permette di **comprendere come sostanze chimiche, inquinanti e contaminanti influenzino non solo gli organismi singoli, ma intere popolazioni e comunità biologiche.**
  - Attraverso approcci sperimentali è possibile valutare gli effetti diretti e indiretti delle sostanze tossiche sui processi vitali, come crescita, riproduzione e dinamiche alimentari, arrivando a prevedere cambiamenti potenzialmente dannosi negli ecosistemi. Ciò risulta essenziale per sviluppare strategie di prevenzione, gestione del rischio e politiche di tutela ambientale, contribuendo a garantire un equilibrio sostenibile tra attività antropiche e conservazione della biodiversità.

- **Branca che studia gli effetti delle sostanze chimiche (farmaci, tossine, veleni) sugli organismi viventi, utilizzando modelli sperimentali.**



Passare dalla teoria alla pratica, con tutte le implicazioni:

- Studio della letteratura scientifica
- Programmazione dei disegni sperimentali
- Scelta dei modelli appropriati
- Studi di drug-design
- Conoscenza delle linee guida internazionali

## Perché?

### •Sicurezza dei farmaci veterinari

Testare e comprendere come un farmaco agisce sugli animali, specie-specificamente.

### •Gestione delle intossicazioni

Capire come intervenire in caso di ingestione accidentale di sostanze tossiche (pesticidi, piante velenose, farmaci umani).

### •Prevenzione e diagnosi

Individuare segni clinici legati a sostanze tossiche o a dosaggi errati di farmaci.

### •Ricerca e sviluppo

Sviluppare nuovi trattamenti per malattie animali attraverso modelli sperimentali.

### •Controllo degli alimenti di origine animale

Verificare la sicurezza per l'uomo (es. residui di antibiotici o contaminanti).

Gli studi tossicologici possono essere condotti:

- Su animali di laboratorio (*in vivo*)
- Su organi e tessuti prelevati da animali (*ex vivo*)
- Su colture cellulari, microorganismi, frazioni subcellulari, enzimi purificati (*in vitro*)
- Con modelli matematici e previsionali (*in silico*)
- Su popolazioni (studi epidemiologici, studi clinici, studi sul campo)

In uno studio sperimentale: si somministra la sostanza con precise modalità (dose, tempo, via ecc.) e se ne studiano gli effetti tossici.

- ✓ L'esposizione alla sostanza è controllata.
- ✓ L'esposizione ad altre sostanze è eliminata o comunque controllata (gruppi di controllo)

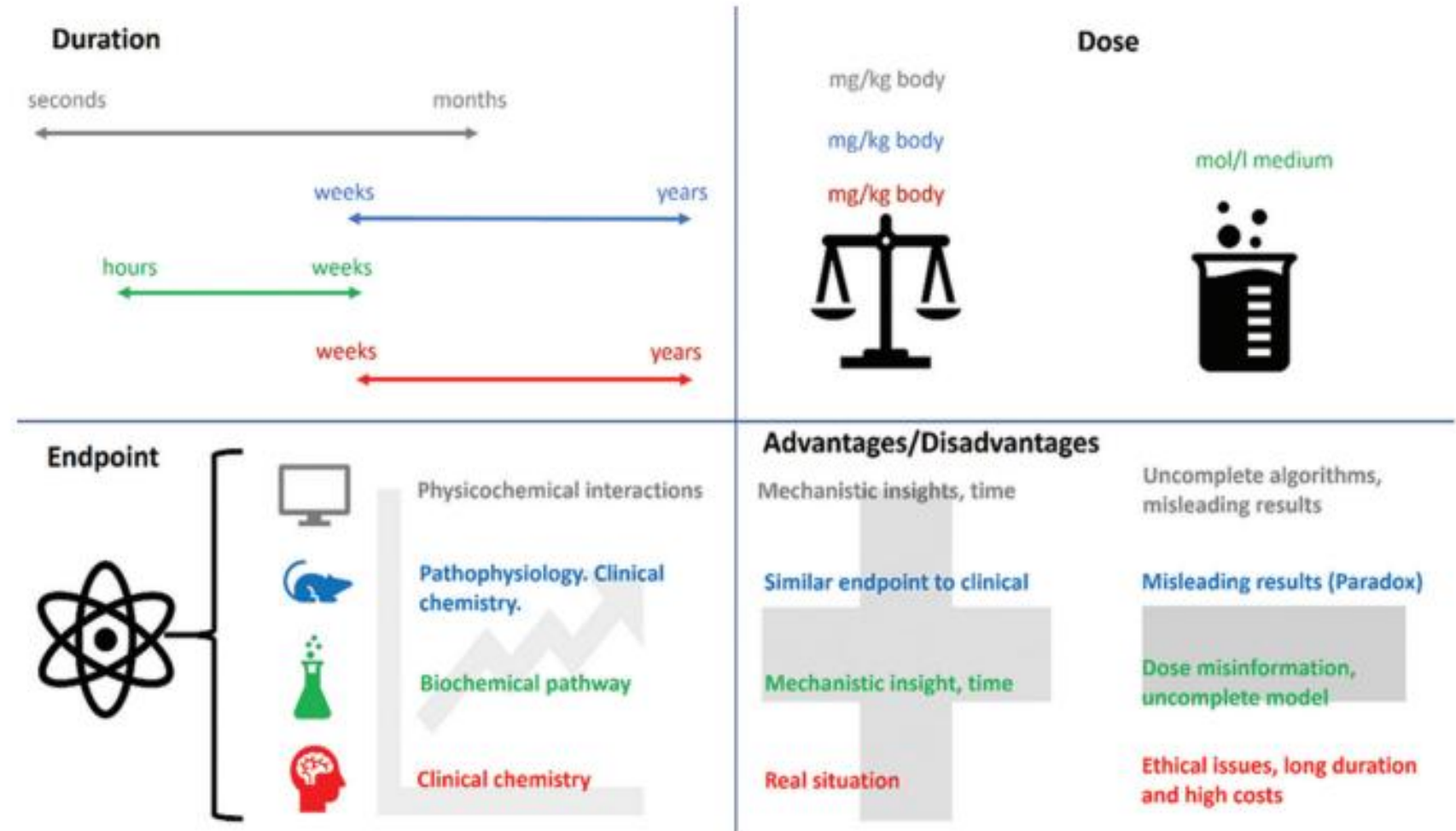
Modelli *in vivo*

Modelli *in vitro*

Modelli *clinici*

Modelli *in silico*

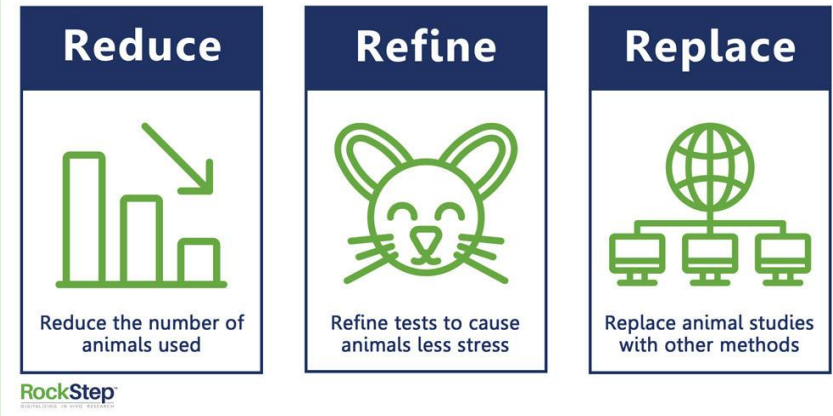
= utilizzo di computer e software per simulare, analizzare e prevedere il comportamento di sistemi biologici o chimici.



# NAMs (new approach methodologies)

- ♦ Tecnologie, metodologie, approcci avanzati che possono essere utilizzati per ottenere informazioni sul rischio associato alle sostanze chimiche e che non prevedono l'uso di animali interi.

## The 3 R's of Animal Research

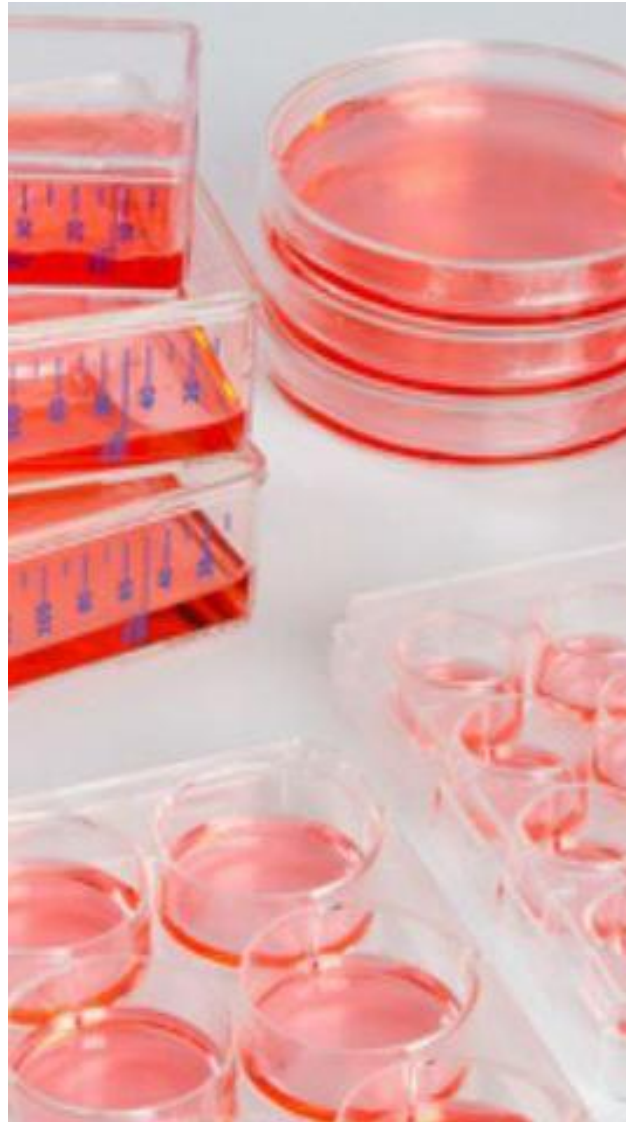


Con il principio delle 3R si fa riferimento ad un insieme di strategie volte alla riduzione del numero degli animali da laboratorio e della loro sofferenza. La soluzione ottimale sarebbe quella di sostituire i metodi che richiedono l'utilizzo di animali con uno o più modelli *in vitro*. Qualora non sia possibile, sarebbe opportuno diminuire il numero di animali usati negli studi senza compromettere la qualità dei dati. In caso di impossibilità, si dovrebbe per lo meno condurre gli esperimenti in modo da minimizzare lo stress e in generale l'impatto sugli animali.



# Modelli e metodologie *in vitro* per gli studi tossicologici





# Cosa s'intende per metodi *in vitro*?

- Tecniche di sperimentazione, che avvengono «in provetta», o più in generale in un **ambiente controllato** e **al di fuori dell'organismo vivente**.





## Screening

Fornire risultati preliminari in modo rapido e meno costoso rispetto ad altre metodologie. I test di screening seguono regole rigorose (ma meno rigorose rispetto ai test finali) e forniscono le conoscenze di partenza per i test successivi.

(si fa riferimento alle linee guida OECD)



## Implementazione

I test *in vitro* sono parte integrante nelle valutazioni del rischio chimico, e i dati ottenuti si affiancano a quello ottenuti *in vivo*.



## Sostituzione

Per la loro natura, riducono il numero di animali vivi da utilizzare per i test.

**\*\*Tuttavia, bisogna considerare i limiti della sperimentazione *in vitro*.**

Le tecniche *in vitro* richiedono metodologie analitiche sensibili

Vantaggi	Limitazioni
Riduzione dei costi e dei tempi della sperimentazione	Ambiente artificiale
Semplice manipolazione del materiale	Difficoltà di correlare le concentrazioni usate <i>in vitro</i> con quelle da usare nell'organismo intero
Sistemi semplificati e controllati: riproducibilità e configurazione omogenea	Impossibilità di studiare fenomeni complessi
Rapidità di risposta: saggi ad alta capacità o numerosità (high-throughput screening)	Alterazioni nella segnalazione biochimica
Facile verifica della reversibilità di un effetto (recovery)	Assenza di vascolarizzazione
Impiego di materiale umano	Sovrastima degli effetti tossicologici/farmacologici
Analisi dei meccanismi cellulari e molecolari	Mutazioni genetiche (selezione di cloni)
No problemi etici e legali (riduzione del numero degli animali sacrificati)	Rispetto dei «tempi di coltura» (es. colture primarie)

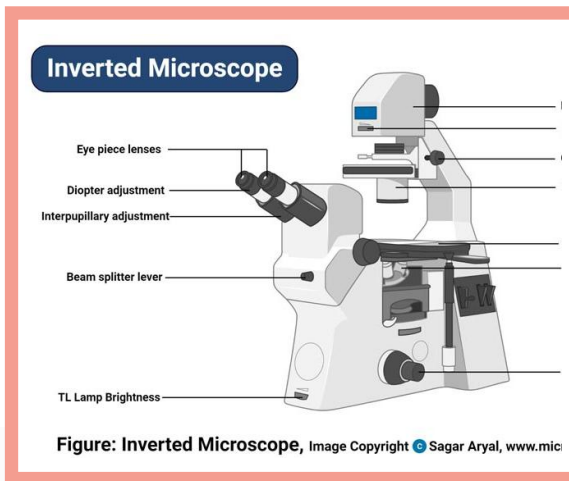
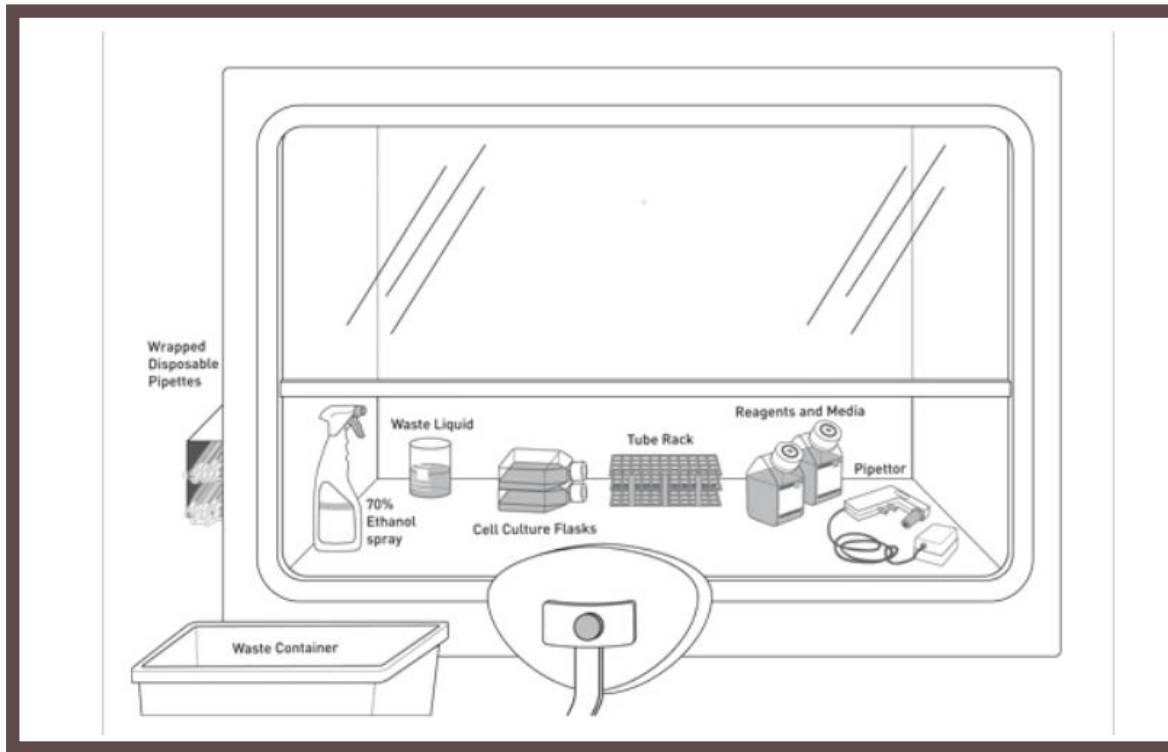


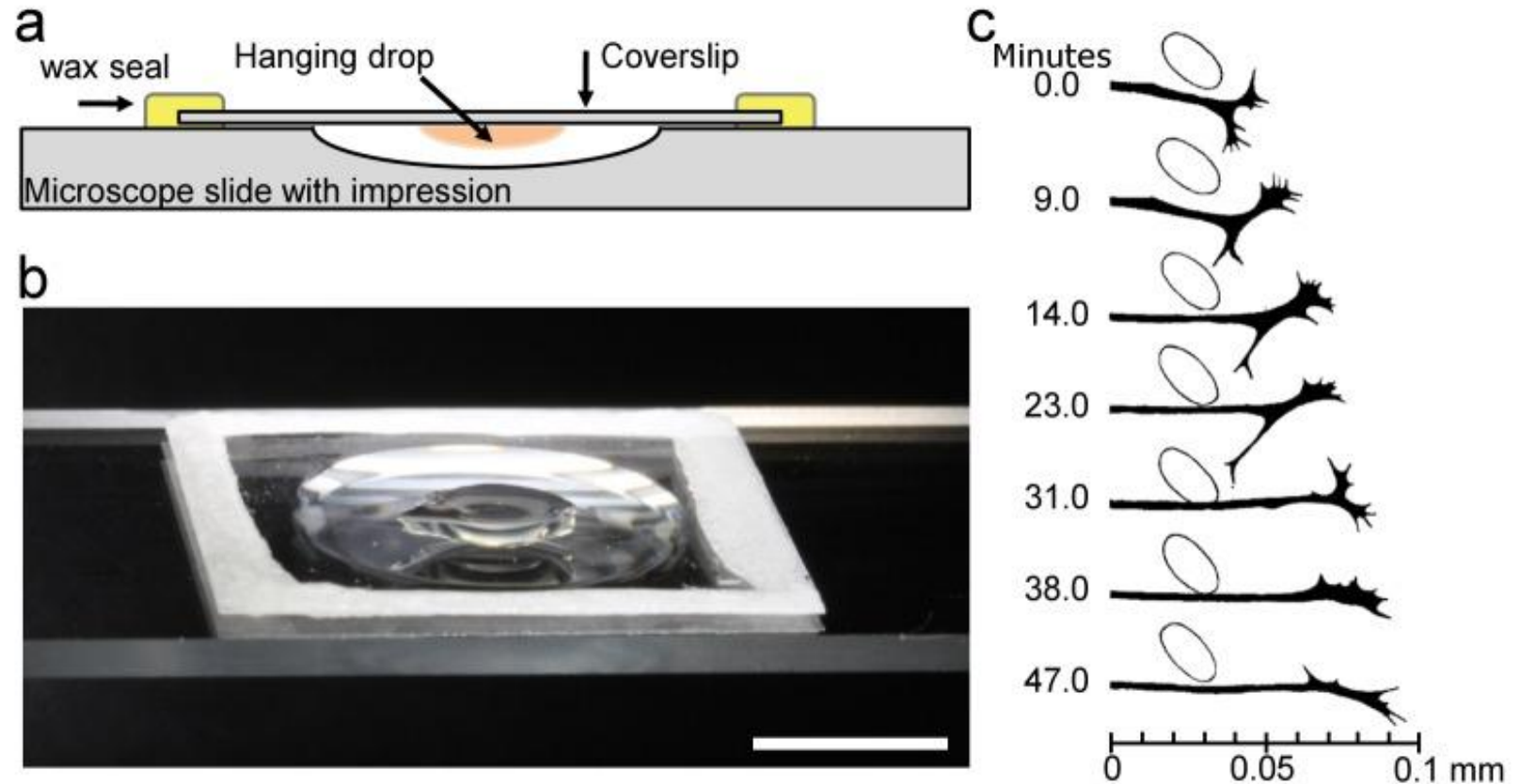
Figure: Inverted Microscope, Image Copyright © Sagar Aryal, www.mic

Year	Historical landmarks in the development of cell culture
1878	Claude Bernard proposed that physiological systems of an organism can be maintained in a living system after the death of an organism.
1885	Roux maintained embryonic chick cells in a saline culture.
1897	Loeb demonstrated the survival of cells isolated from blood and connective tissue in serum and plasma.
1903	Jolly observed cell division of salamander leucocytes <i>in vitro</i> .
1907	Harrison cultivated frog nerve cells in a lymph clot held by the 'hanging drop' method and observed the growth of nerve fibers <i>in vitro</i> for several weeks. He was considered by some as the father of cell culture
1910	Burrows succeeded in long term cultivation of chicken embryo cell in plasma clots. He made detailed observation of mitosis.
1911	Lewis and Lewis made the first liquid media consisted of sea water, serum, embryo extract, salts and peptones. They observed limited monolayer growth.
1913	Carrel introduced strict aseptic techniques so that cells could be cultured for long periods
1916	Rous and Jones introduced proteolytic enzyme trypsin for the subculture of adherent cells.
1923	Carrel and Baker developed 'Carrel' or T-flask as the first specifically designed cell culture vessel. They employed microscopic evaluation of cells in culture.
1927	Carrel and Rivera produced the first viral vaccine - Vaccinia.
1933	Gey developed the roller tube technique
1940	The use of the antibiotics penicillin and streptomycin in culture medium decreased the problem of contamination in cell culture
1948	Earle isolated mouse L fibroblasts which formed clones from single cells. Fischer developed a chemically defined medium, CMRL 1066.
1952	Gey established a continuous cell line from a human cervical carcinoma known as HeLa (Helen Lane) cells. Dulbecco developed plaque assay for animal viruses using confluent monolayers of cultured cells.
1954	Abercrombie observed contact inhibition: motility of diploid cells in monolayer culture ceases when contact is made with adjacent cells.
1955	Eagle studied the nutrient requirements of selected cells in culture and established the first widely used chemically defined medium.
1961	Hayflick and Moorhead isolated human fibroblasts (WI-38) and showed that they have a finite lifespan in culture.
1964	Littlefield introduced the HAT medium for cell selection.
1965	Ham introduced the first serum-free medium which was able to support the growth of some cells.
1965	Harris and Watkins were able to fuse human and mouse cells by the use of a virus.
1975	Kohler and Milstein produced the first hybridoma capable of secreting a monoclonal antibody
1978	Sato established the basis for the development of serum-free media from cocktails of hormones and growth factors.
1982	Human insulin became the first recombinant protein to be licensed as a therapeutic agent.
1985	Human growth hormone produced from recombinant bacteria was accepted for therapeutic use.
1986	Lymphoblastoidy IFN licensed.
1987	Tissue-type plasminogen activator (tPA) from recombinant animal cells became commercially available.
1989	Recombinant erythropoietin in trial
1990	Recombinant products in clinical trial (HBsAG, factor VIII, HIVgp120, CD4, GM-CSF, EGF, mAbs, IL-2).
1998	Production of cartilage by tissue engineered cell culture by Aigner et al.
2000	Mapping of the human genome.
2007	Use of viral vectors to reprogram adult cells to embryonic state (induced pluripotent stem cells) by Yu et al.
2008	And beyond- Era of induced pluripotent stem cells

# Il padre delle colture cellulari



Ross Granville Harrison (1870–1959)



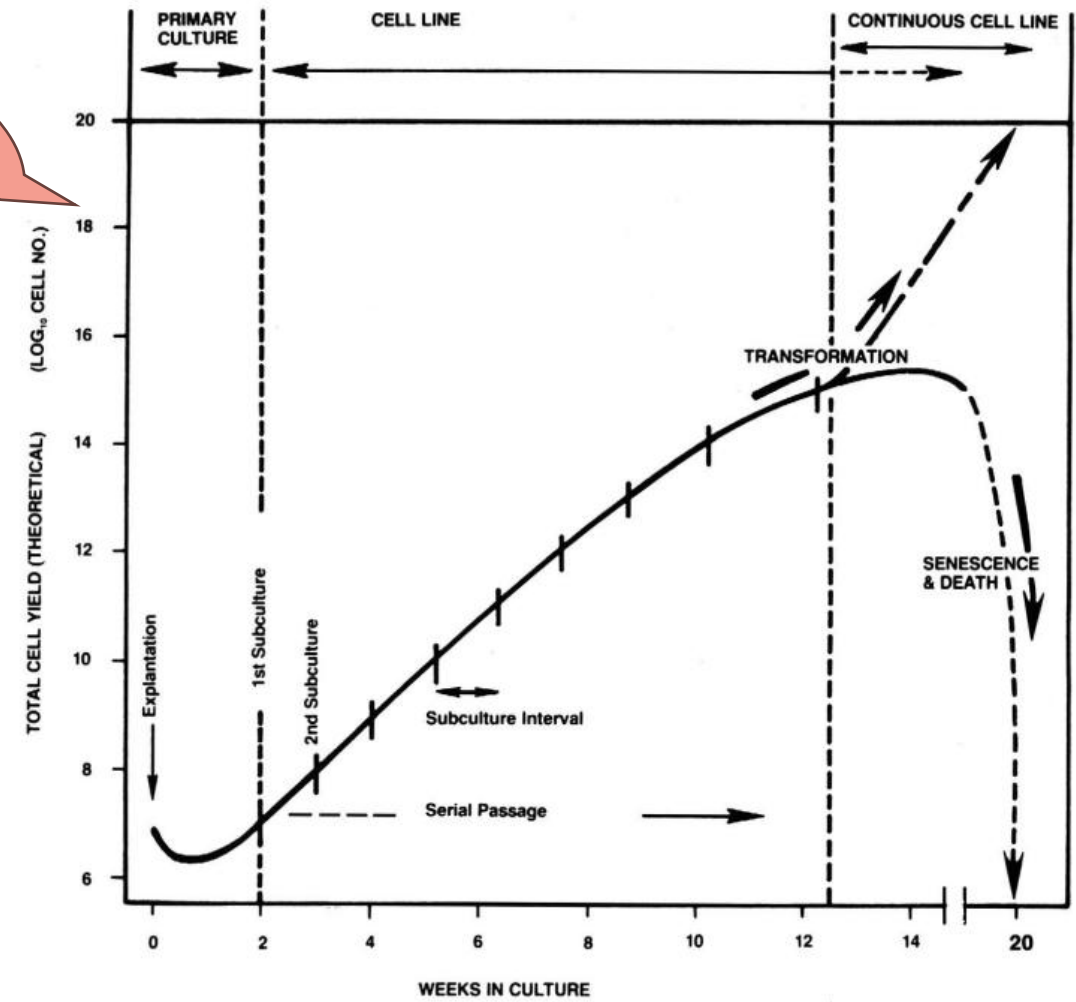
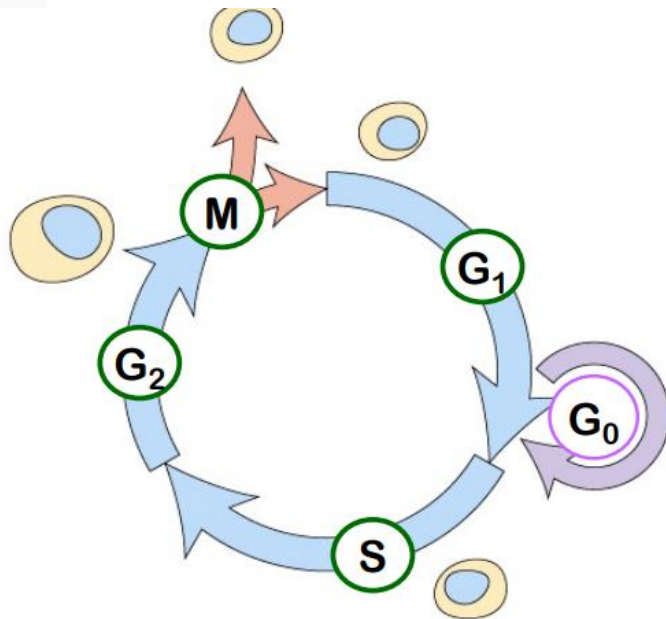
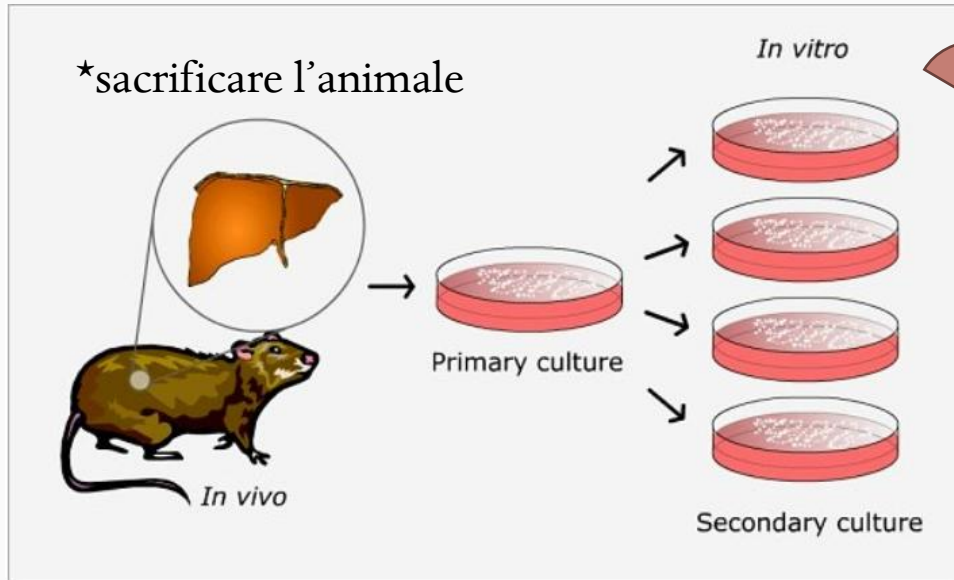
Espianti di tubo neurale di embrioni di rana

Coltura in una goccia di linfa di rana contenuta in un vetrino in ambiente sterile

\*Osservazione «in vitro» dello sviluppo nel tempo di fibre nervose



\*sacrificare l'animale

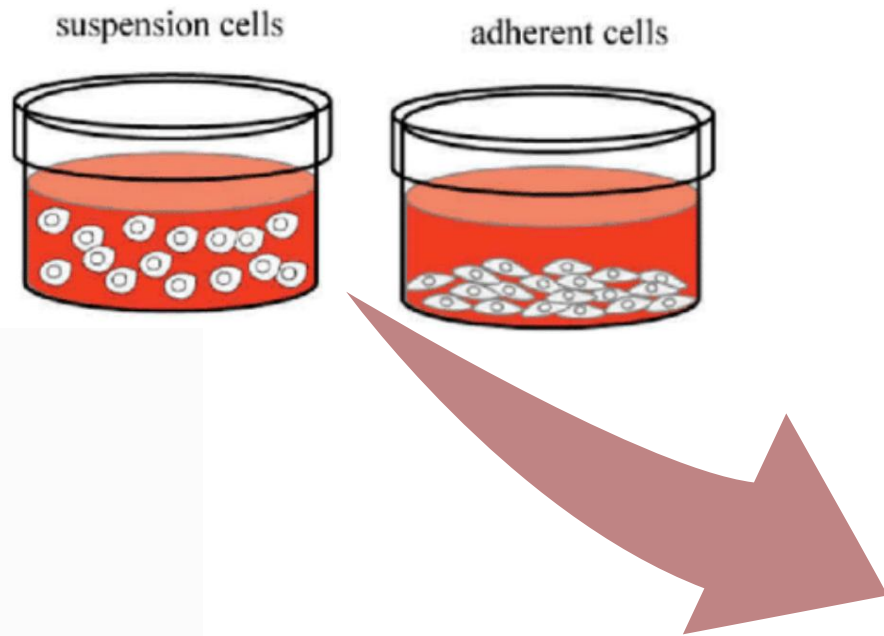


L'asse verticale riporta la crescita cellulare totale (assumendo nessuna riduzione ad ogni passaggio) per una ipotetica coltura cellulare. Quindi, il numero totale delle cellule è rappresentato sull'asse Y (scala log), mentre sull'asse X è riportato il tempo (scala lineare). \*La senescenza può avvenire dopo diversi cicli di duplicazione, a seconda del tipo cellulare.

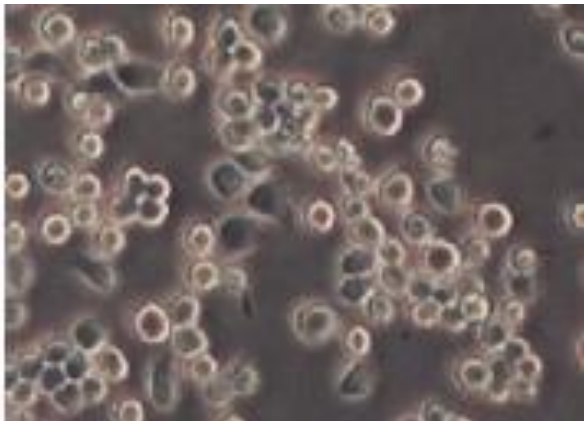
(limite di Hayflick ed accorciamento dei telomeri)



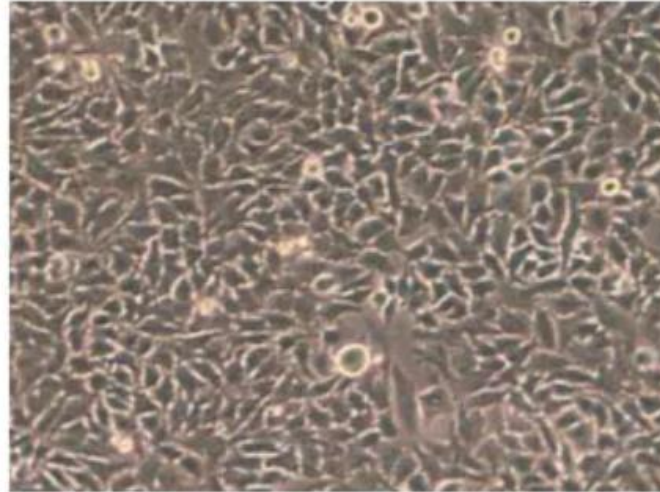
Le cellule possono essere coltivate in adesione o sospensione



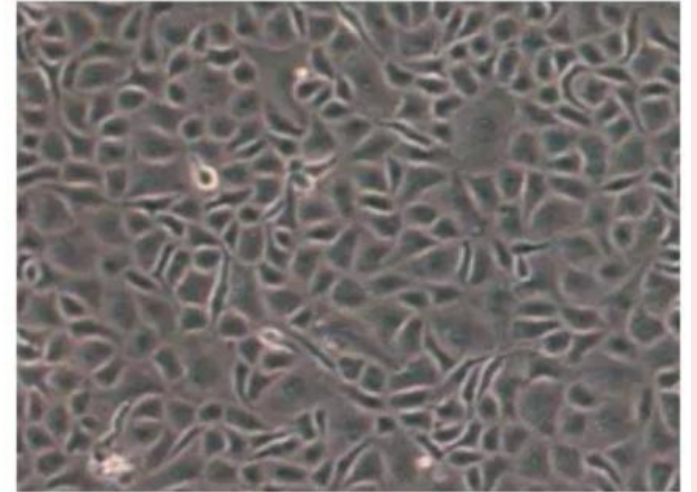
**Lymphoblast-like cells**



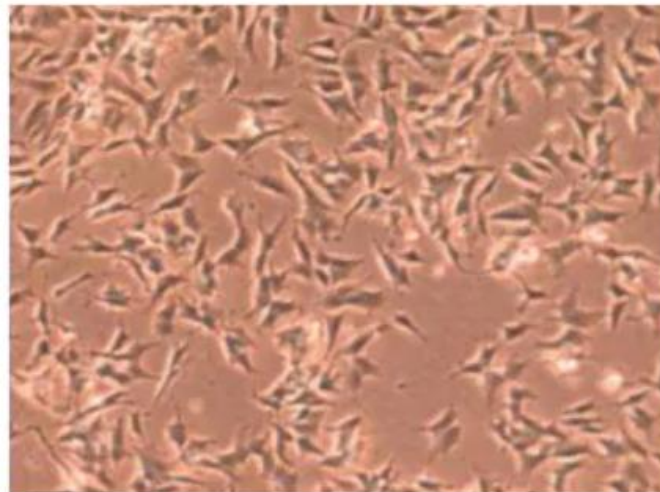
**Epithelial Cell Type**



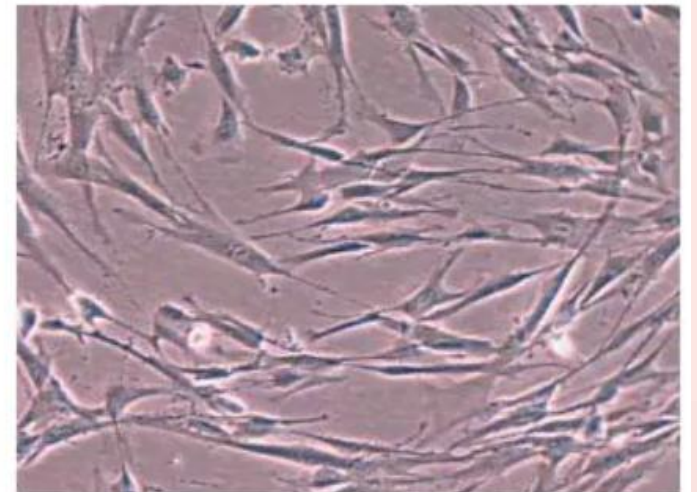
**Endothelial Cell Type**



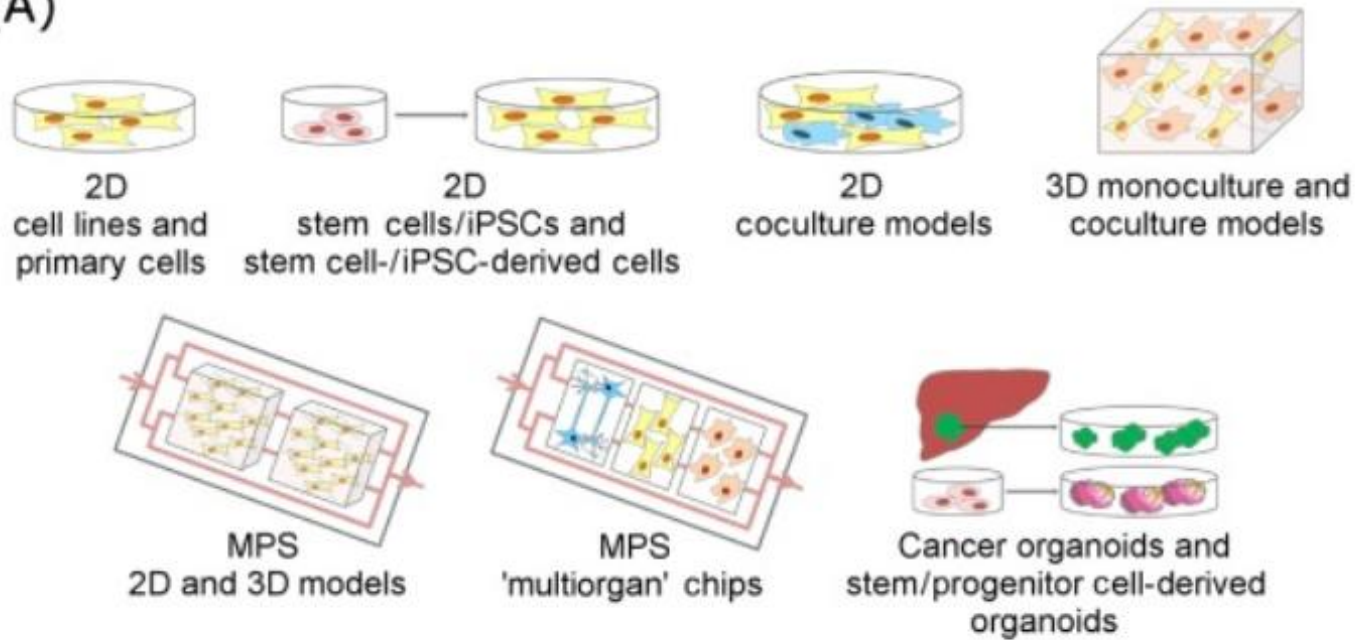
**Neuronal Cell Type**



**Fibroblast Cell Type**



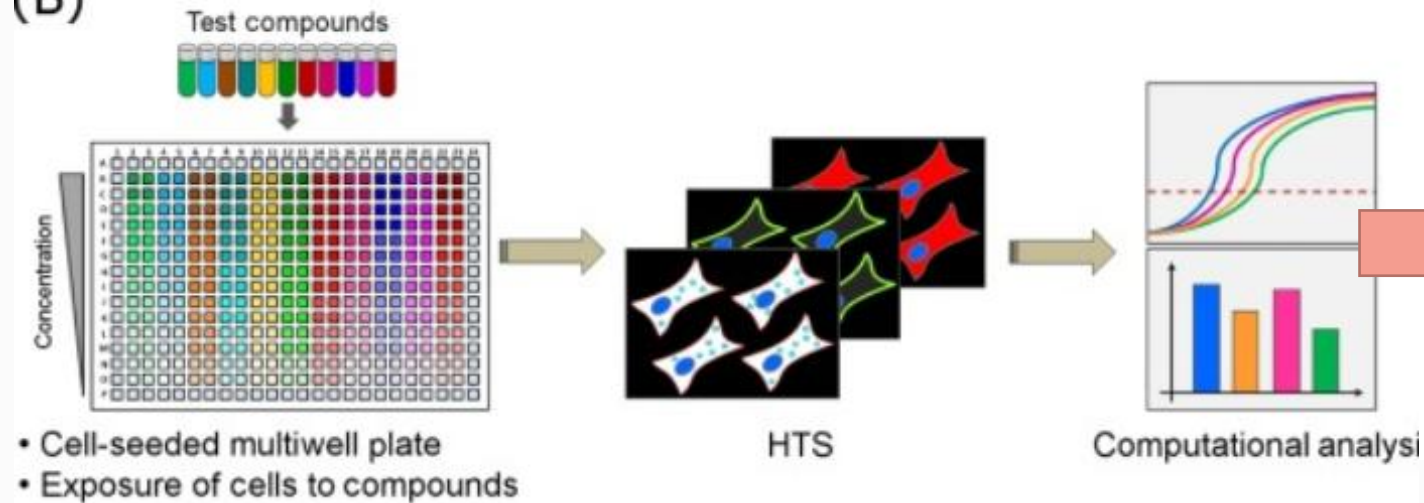
(A)



Panoramica dei differenti tipi di *modelli in vitro*:

- Monocolture 2D
- Co-culture 2D
- Modelli 3D
- Organoidi
- Sistemi microfluidici e organ-on-chip

(B)

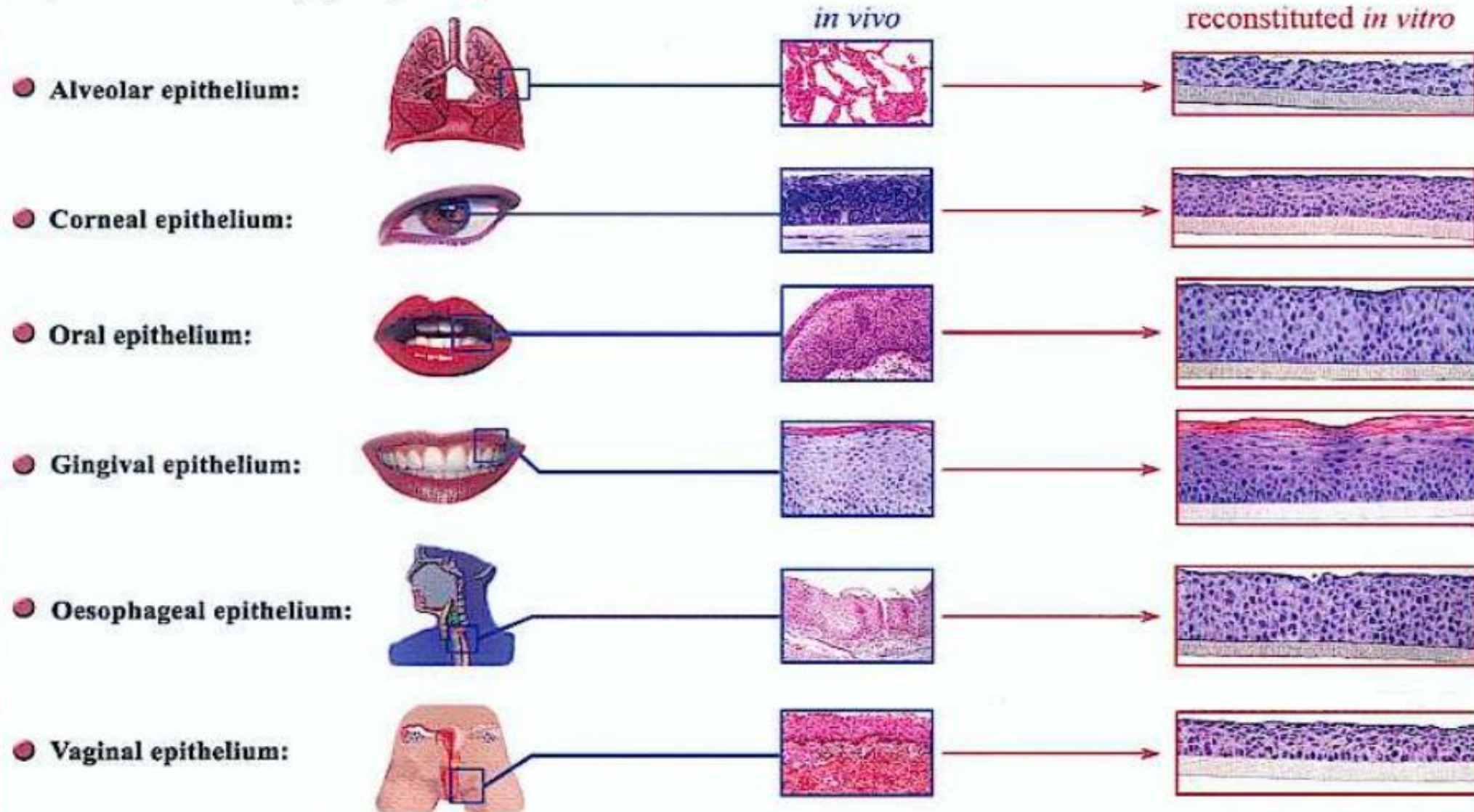


Saggi ad alta numerosità (high-throughput screening), che danno risultati analizzabili con diversi tool bioinformatici.



# Human epithelial models

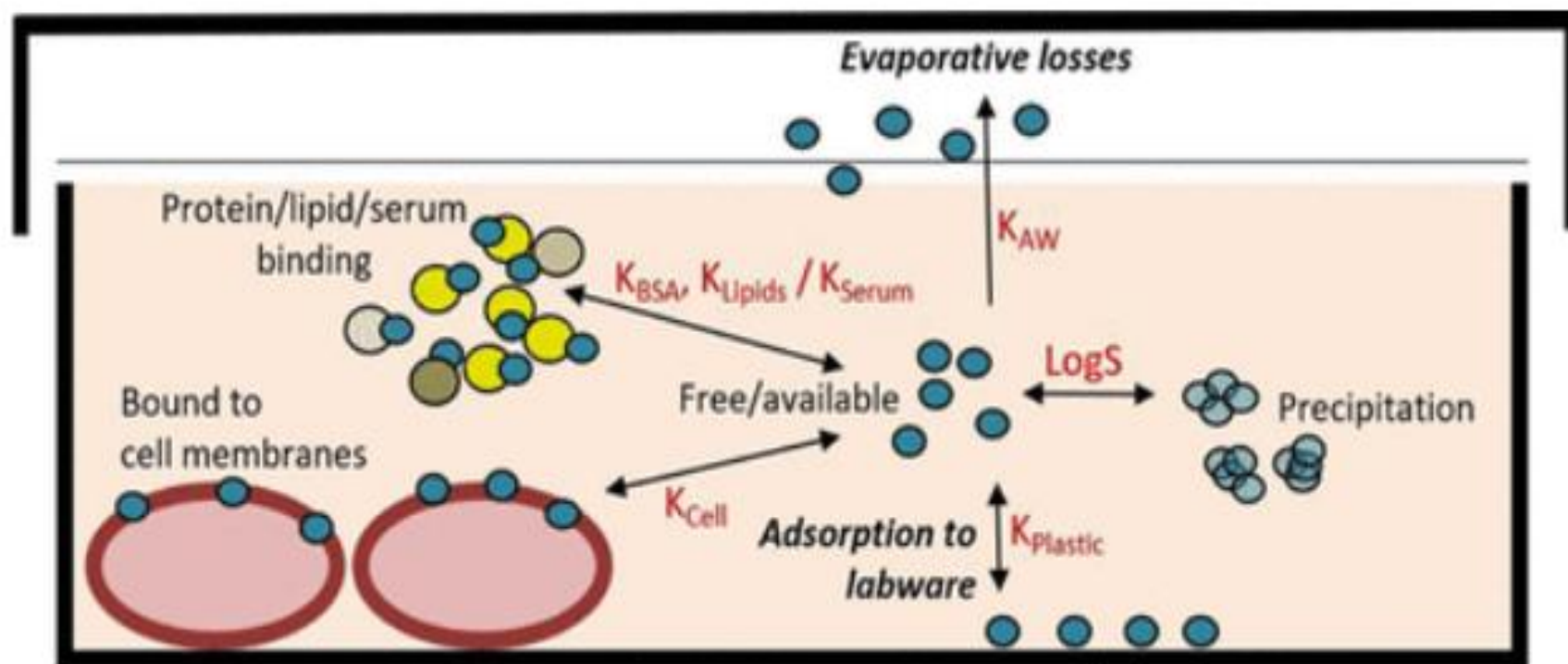
Using the same tissue culture techniques as for the reconstruction of human epidermis, several human mucosal tissue models are being produced, either by using immortalized cell lines (for the reconstruction of corneal, oral, oesophageal, alveolar or vaginal epithelial tissues) or primary cells (for the reconstruction of gingival epithelium).



# La «dose» nelle colture cellulari

mg di farmaco / volume di terreno di coltura (litri)  
vs  
mg di farmaco / kg di corpo

- Difficoltà nel tradurre i risultati della dose-risposta ottenuti nel modello *in vitro*
- Ambiente artificiale: rispetto all'organismo vivo, la cellula ha a disposizione una grande quantità di sostanza, poiché il rapporto tra terreno di coltura e numero di cellule è elevato.
- Maggiore disponibilità del farmaco/tossico **(nelle cellule vedo gli effetti in modo amplificato, con rischio di sottostima del dosaggio nei modelli interi/vivi).**
- Non si possono rappresentare le alterazioni che subisce il farmaco/tossico nel percorso di raggiungimento del target



# Valutazioni

Relazione struttura molecolare-attività

Tossicocinetica

Tossicità organo-specifica

Teratogenicità

Genotossicità

Irritazione e infiammazione

Citotossicità



Organizzazione per la  
Cooperazione e lo Sviluppo  
Economico

1. Standardizzazione dei test
2. Riconoscimento internazionale
3. Qualità scientifica e affidabilità dei dati
4. Rilevanza normativa e regolatoria



## Citotossicità

- ♦ Valutare la capacità intrinseca di una sostanza di provocare morte cellulare. Sono stati sviluppati dei test *in vitro* più o meno specifici (target specifici) che possono essere utilizzati su diverse linee cellulari. Essi però non possono sostituirsi ai test di tossicità acuta *in vivo*.  
\*\*Nell'animale si possono valutare più risposte simultaneamente ed effetti tessuto-specifici.

## Irritazione e infiammazione

- ♦ Possono essere realizzati dei modelli *in vitro* ad hoc, che possano evitare l'utilizzo di animali vivi. ES: le linee guida OECD hanno proposto **Human Skin Model Tests**, ossia test condotti su una pelle artificiale (in sostituzione dell'animale vivo) per valutare se una sostanza è irritante o meno.

## Genotossicità

- ♦ Valutare la capacità di un agente (chimico, fisico o biologico) di determinare effetti tossici a carico del materiale genetico, causando mutazioni geniche (o puntiformi) o cromosomiche.
- ♦ Prevedere la possibile attività cancerogena e valutarne il meccanismo d'azione.

## Teratogenicità

- ♦ Proprietà di una sostanza di provocare danni all'embrione durante la gravidanza.

## Tossicità organo-specifica

- ♦ Utilizzo di linee cellulari organo-specifiche per lo studio dei meccanismi di tossicità (cuore, rene, fegato, sistema nervoso)
- ♦ Es: *in vitro* hepatotoxicity test- linea cellulare epatica

## Tossicocinetica

- ♦ Come faccio a studiare il «destino» di un tossico con un modello *in vitro*?
- ♦ Utilizzo di linee cellulari o co-culture per valutare l'assorbimento delle sostanze.  
OECD 428: *Skin absorption in vitro model*



# Endpoint

caratteristiche quantitative misurabili o indicatori specifici (biomarker) utilizzati per valutare gli effetti delle sostanze chimiche o farmaceutiche sulle cellule o tessuti in coltura.

Le misurazioni e le osservazioni fatte *in vitro* sono utilizzate per predire i fenomeni *in vivo*, ossia nell'intero organismo.

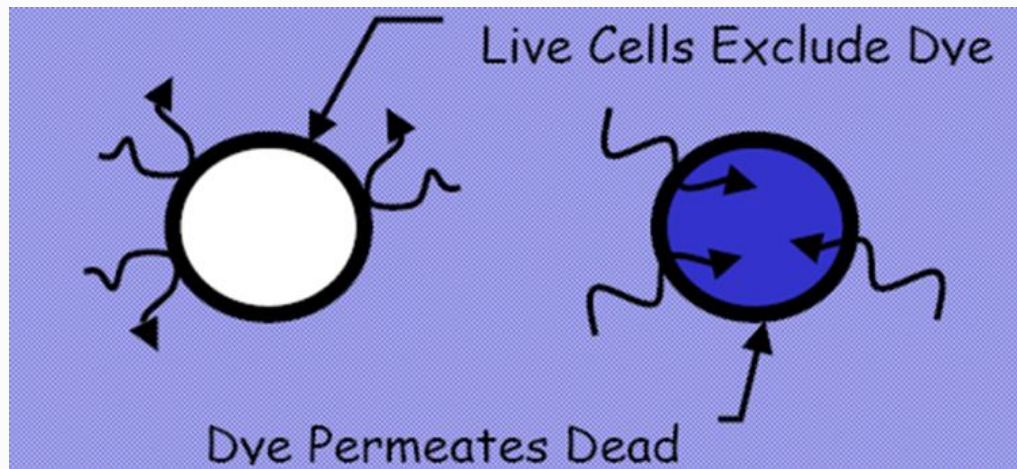
Si effettua una **estrapolazione in vitro-in vivo (IVIVE)**.

# Esempio: citotossicità e vitalità cellulare

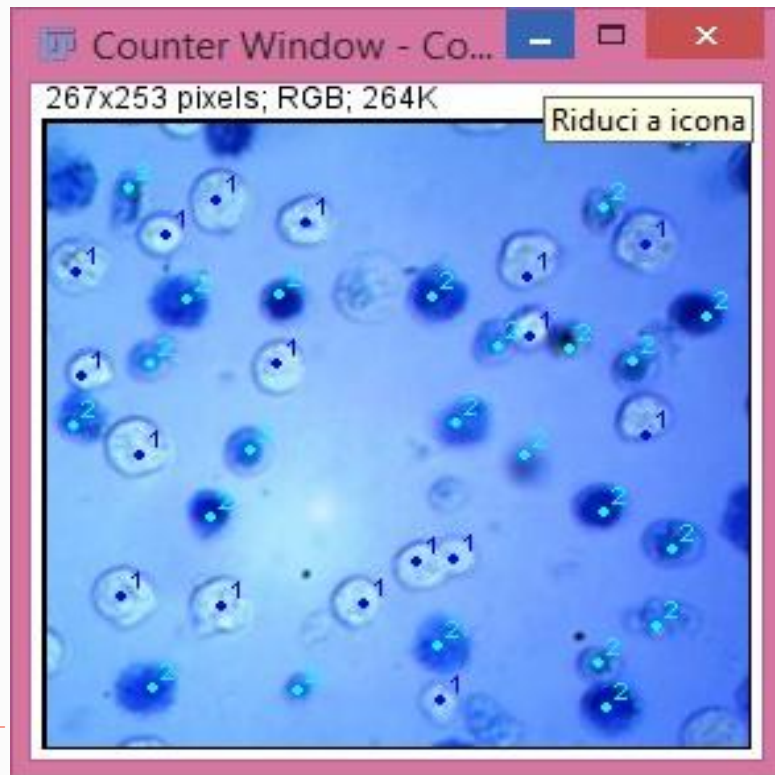
Valutazione delle cellule sane all'interno di una coltura cellulare tramite:

- ♦ Integrità della membrana cellulare (structural cell damage: trypan blue, LDH assay, acridine orange )
- ♦ Metabolismo cellulare (MTT, ATP assay)
- ♦ Morte cellulare (TUNEL, caspase, Annexin)
- ♦ Crescita cellulare (Cell counting, BrdU or EdU incorporation)

OECD (2018), “List of viability testing methods (non-inclusive) of cell cultures”, in Guidance Document on Good In Vitro Method Practices (GIVIMP), OECD Publishing, Paris. DOI: <https://doi.org/10.1787/9789264304796-24-en>



### Saggi di esclusione: esempio del Trypan Blue

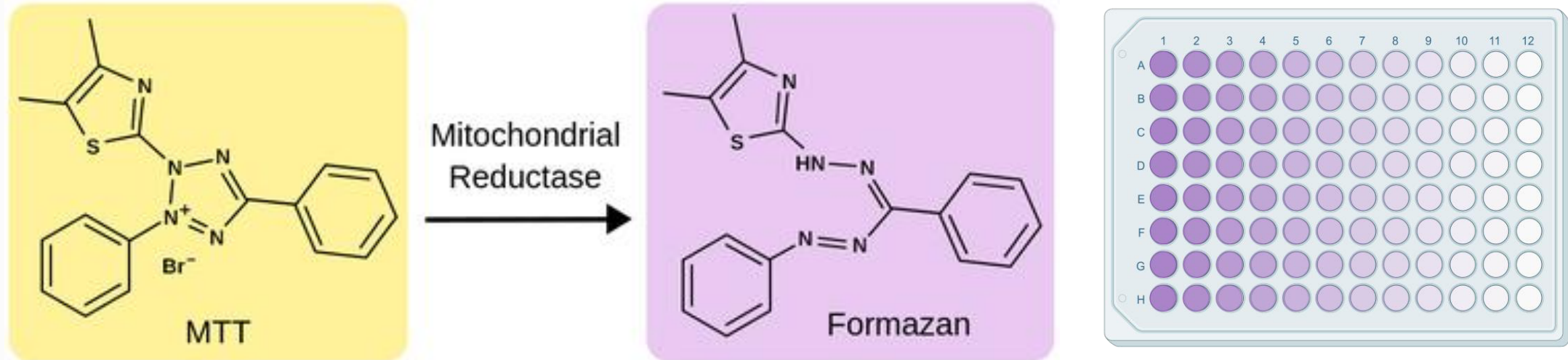


- Le cellule vive (membrana integra) escludono i coloranti, mentre quelle morte non lo fanno.
- La procedura di colorazione è piuttosto semplice, ma se i campioni sono molti richiede troppo tempo.
- Sono utilizzati diversi tipi di coloranti, tra cui eosina, rosso Congo, eritrosina B, ma il Trypan Blue è più diffuso.



## Attività metabolica

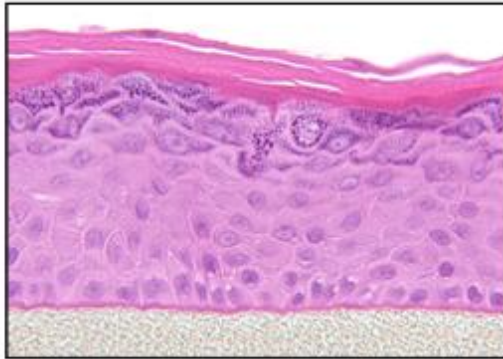
I saggi che misurano l'attività metabolica sono indicati per analizzare la proliferazione e la vitalità cellulare e la citotossicità. La riduzione dei sali di tetrazolio come **MTT**, **XTT** e **WST-I**.



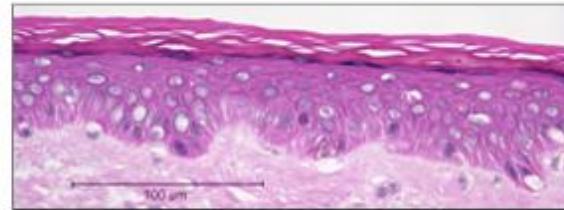
- **MTT** (3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5- difeniltetrazolio bromuro; blu di tiazolile): un sale di tetrazolio idrosolubile che conferisce una colorazione gialla quando presente in terreni o soluzioni saline prive di rosso fenolo. L'MTT dissolto è convertito in un formazano (viola) insolubile a seguito della scissione dell'anello tetrazolico da parte di deidrogenasi. Questo formazano insolubile in acqua può essere solubilizzato usando isopropanolo o altri solventi e il materiale dissolto si valuta spettrofotometricamente misurando l'assorbanza (492 nm) come funzione della concentrazione del colorante convertito. La quantità di formazano prodotta dipende dal numero di cellule vive presenti in coltura.



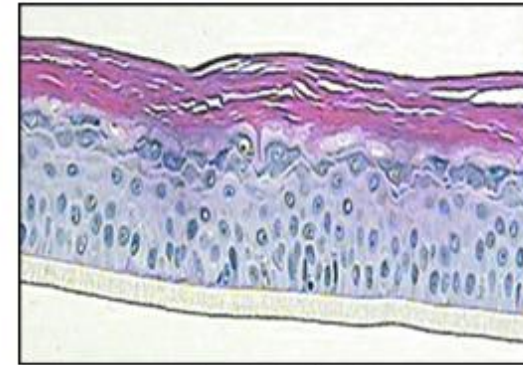
# Es. *In Vitro* Skin Irritation: Reconstructed Human Epidermis Test Methods (OECD n.439)



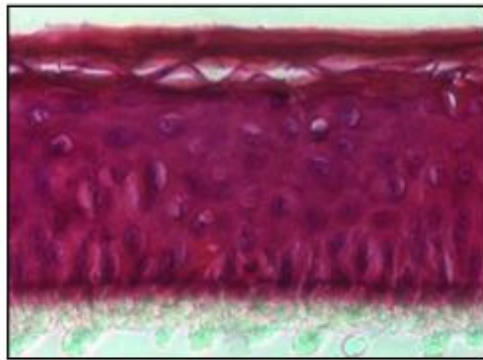
MatTek Corp. EpiDerm™ (EPI-200)



Native human skin



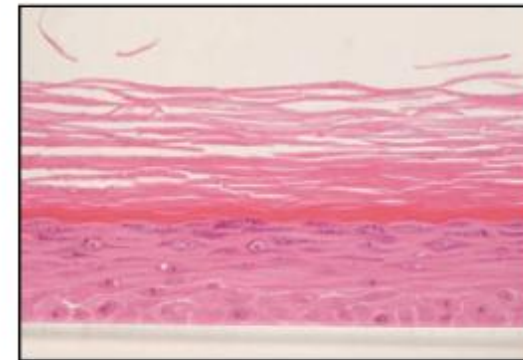
SkinEthic™ RHE



Cell Systems epiCS®



EpiSkin™ (SM)



J-TEC LabCyte EPI-MODEL

Epidermide umana ricostruita (RhE)

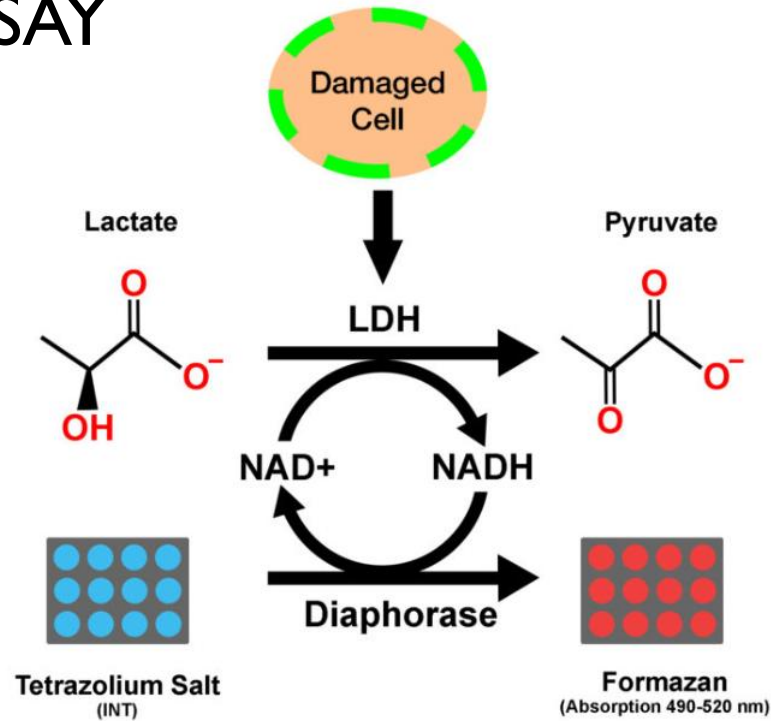
- ♦ MTT assay: le cellule vitali del tessuto RhE possono ridurre il colorante vitale MTT in un precipitato blu di formazano. L' MTT viene quindi estratto dal tessuto utilizzando isopropanolo (o un solvente simile) e viene misurata la densità ottica (OD).
- ♦ I valori OD ottenuti con ciascuna sostanza chimica in esame possono essere utilizzati per calcolare la percentuale di vitalità, normalizzata rispetto al controllo negativo, impostato al 100%.
- ♦ «La funzione di barriera dovrebbe essere dimostrata e può essere valutata mediante determinazione della **concentrazione** alla quale una sostanza chimica di riferimento **riduce la vitalità del tessuto del 50% (IC50)** dopo un tempo di esposizione fisso o determinando il tempo di esposizione necessario per ridurre la vitalità cellulare del 50% (**ET50**) dopo l'applicazione della sostanza chimica di riferimento a una concentrazione fissa»

Quindi, nei test di vitalità cellulare la IC50 corrisponde alla concentrazione della sostanza che causa il 50% della riduzione della vitalità (o crescita) cellulare.

-minore è il valore di IC50, maggiore è la potenza della sostanza

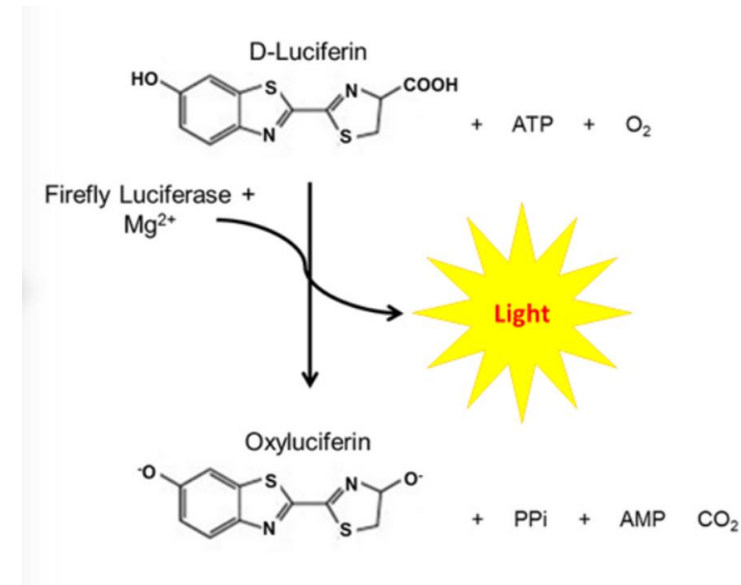
ET50: *time to toxicity*, il tempo necessario per avere una riduzione del 50% della vitalità

## Lactate dehydrogenase (LDH)- ASSAY



LDH: enzima citosolico che viene rilasciato in caso di morte cellulare per necrosi o apoptosi, in seguito al danneggiamento della membrana plasmatica. Il test misura quantitativamente l'enzima che viene rilasciato dalle cellule danneggiate, tramite una reazione enzimatica accoppiata di tipo colorimetrico.

## Saggi di vitalità in luminescenza: **ATP assay**



L'ATP è un indicatore delle cellule metabolicamente attive e l'emissione di luce sarà proporzionale alla quantità di ATP disponibile nella coltura cellulare (la luciferasi di lucciola ossida la D-luciferina)

**Table 1: Current status of the test guidelines for genetic toxicology**

TG	Title	adopted	revised	deleted
471	Bacterial reverse mutation test (also named Ames test)	1983	1997	
472	Genetic Toxicology: <i>Escherichia coli</i> , Reverse Assay	1983		1997
473	<i>In vitro</i> mammalian chromosomal aberration test	1983	1997/2014	
474	Mammalian erythrocyte micronucleus test	1983	1997/2014	
475	Mammalian bone marrow chromosomal aberration test	1984	1997/2014	
476	<i>In vitro</i> mammalian cell gene mutation test using the <i>hprt</i> or <i>xprt</i> locus	1984	1997/20xx	
477	Sex-linked recessive lethal test in <i>Drosophila melanogaster</i>	1984		2013
478	Rodent dominant lethal assay	1984	20xx	
479	<i>In vitro</i> sister chromatid exchange assay in mammalian cells	1986		2013
480	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> , gene mutation assay	1986		2013
481	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> , mitotic recombination assay	1986		2013
482	Unscheduled DNA synthesis in mammalian cells <i>in vitro</i>	1986		2013
483	Mammalian spermatogonial chromosome aberration test	1997	20xx	
484	Mouse spot test	1986		2013
485	Mouse heritable translocation assay	1986		
486	Unscheduled DNA synthesis test with mammalian liver cells <i>in vivo</i>	1997		
487	<i>In vitro</i> mammalian cell micronucleus test	2010	2014	
488	Transgenic rodent somatic and germ cell gene mutation assays	2011	2013	
489	<i>In vivo</i> alkaline Comet assay	2014		
4xx	<i>In vitro</i> mouse lymphoma assay ( <i>tk</i> locus)	20xx		

## OECD TEST GUIDELINES FOR TESTING OF CHEMICALS: INTRODUCTION TO THE OECD GUIDELINES ON GENETIC TOXICOLOGY TESTING

# Valutazione del danno genetico

## Test di mutazione nei batteri

- Test di Ames (OECD 471: **pilastro** nei programmi di testing di sicurezza e tossicità.
- Il test prende il nome dal suo inventore, il biologo Bruce Ames, e utilizza ceppi di batteri di *Salmonella typhimurium* che sono stati geneticamente modificati per essere particolarmente sensibili alle mutazioni.

## Test di mutazione su cellule di mammifero

- OECD 476- HPRT mutation assay

## Test di aberrazioni cromosomiche

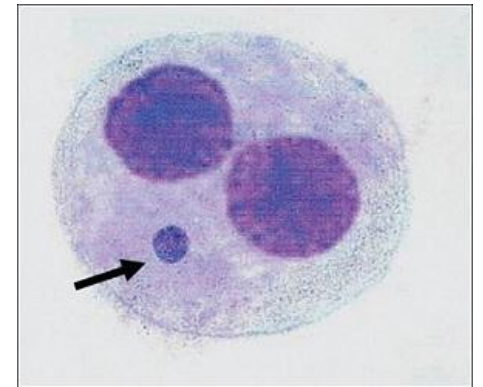
- OECD 473- anomalie visualizzate nei cromosomi condensati in metafase

## Test del micronucleo

OECD 487-

In Vitro Mammalian Cell

Micronucleus Test



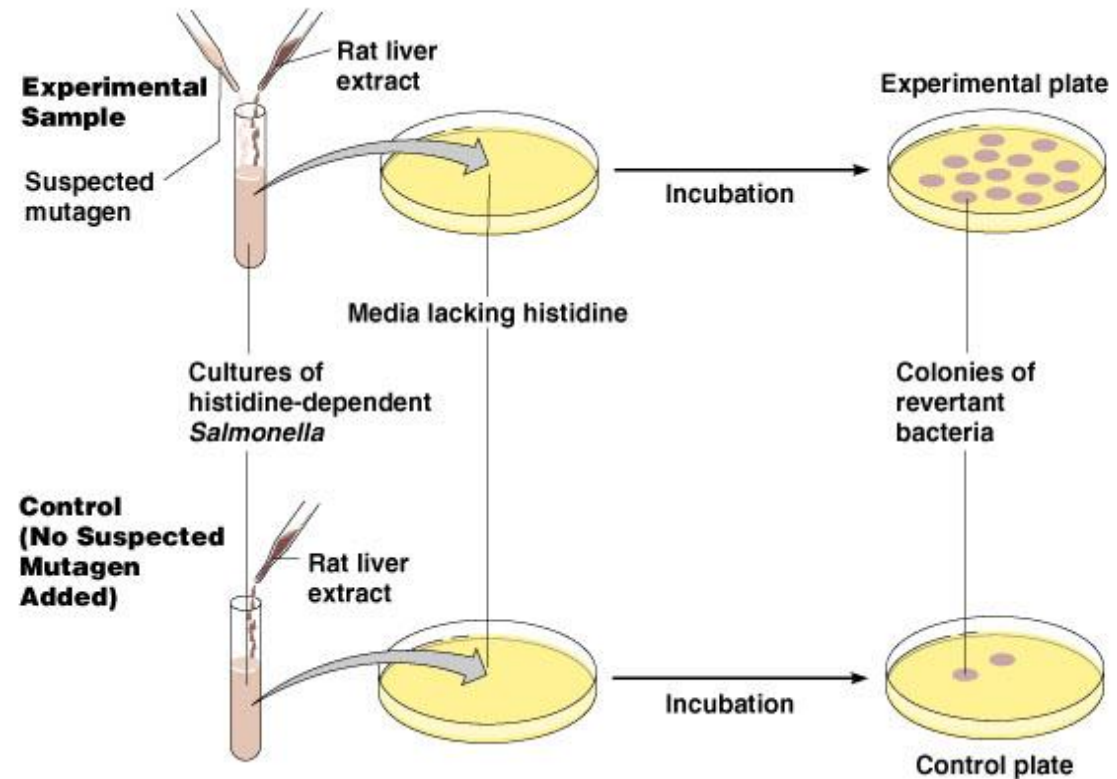
Il test dei micronuclei è un metodo per valutare l'effetto genotossico di sostanze chimiche e fisiche su cellule eucariotiche. Esso è comunemente utilizzato sia nella ricerca di base che nella tossicologia per valutare il potenziale mutageno e cancerogeno di varie sostanze. I micronuclei sono piccole strutture nucleari che si formano a partire da frammenti cromosomici o interi cromosomi che non vengono inclusi nel nucleo principale durante la divisione cellulare.



# Test di Ames

Il test si effettua utilizzando ceppi mutati di *Salmonella thiphymurium*. La mutazione impedisce loro di poter sintetizzare l'amminoacido **istidina**. L'istidina è uno dei 20 amminoacidi utilizzati dalle cellule per costruire le proteine, quindi è una molecola di fondamentale importanza per la sopravvivenza delle cellule. I microrganismi vengono fatti crescere in un terreno di coltura dove l'istidina è presente in quantità limitanti (vi è abbastanza istidina da permettere solo un certo numero di divisioni cellulari).

Quindi lo scopo del test è di appurare che un composto che si sospetta essere mutageno possa indurre mutazioni, tra le quali una mutazione in grado di invertire quella che rende impossibile al microrganismo di sintetizzare l'istidina.



- 1 Two cultures are prepared of *Salmonella* bacteria that have lost the ability to synthesize histidine (histidine-dependent).
- 2 The suspected mutagen is added to the experimental sample only; rat liver extract (an activator) is added to both samples.
- 3 Each sample is poured onto a plate of medium lacking histidine. The plates are then incubated at 37°C for two days. Only bacteria whose histidine-dependent phenotype has mutated back (reverted) to histidine-synthesizing will grow into colonies.
- 4 The numbers of colonies on the experimental and control plates are compared. The control plate may show a few spontaneous histidine-synthesizing revertants. The test plates will show an increase in the number of histidine-synthesizing revertants if the test chemical is indeed a mutagen and potential carcinogen. The higher the concentration of mutagen used, the more revertant colonies will result.

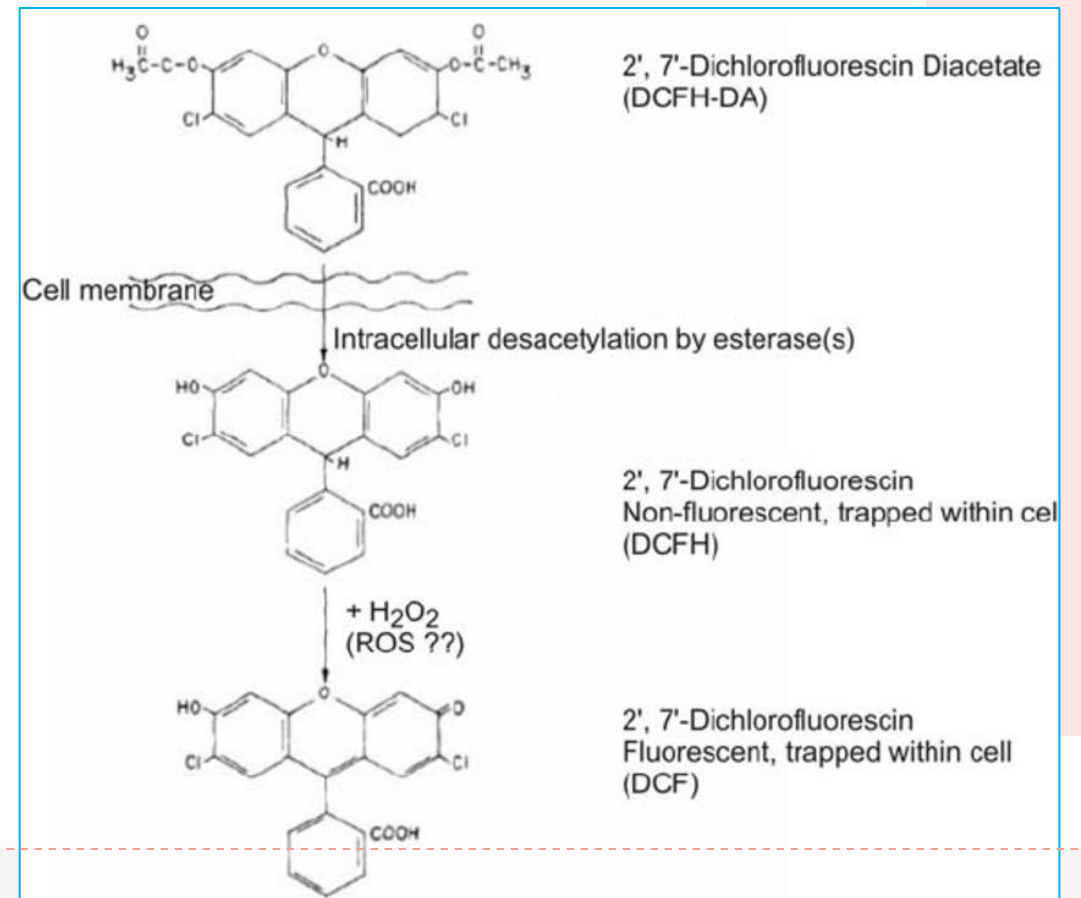


# ALTRE VALUTAZIONI NELLA SPERIMENTAZIONE IN VITRO

## • Stress Ossidativo

= squilibrio tra la produzione di specie reattive dell'ossigeno (ROS) e la capacità della cellula di disintossicare rapidamente questi intermedi reattivi o di riparare il danno subito. Le ROS sono molecole contenenti ossigeno con alta reattività e possono danneggiare lipidi, proteine e DNA cellulari.

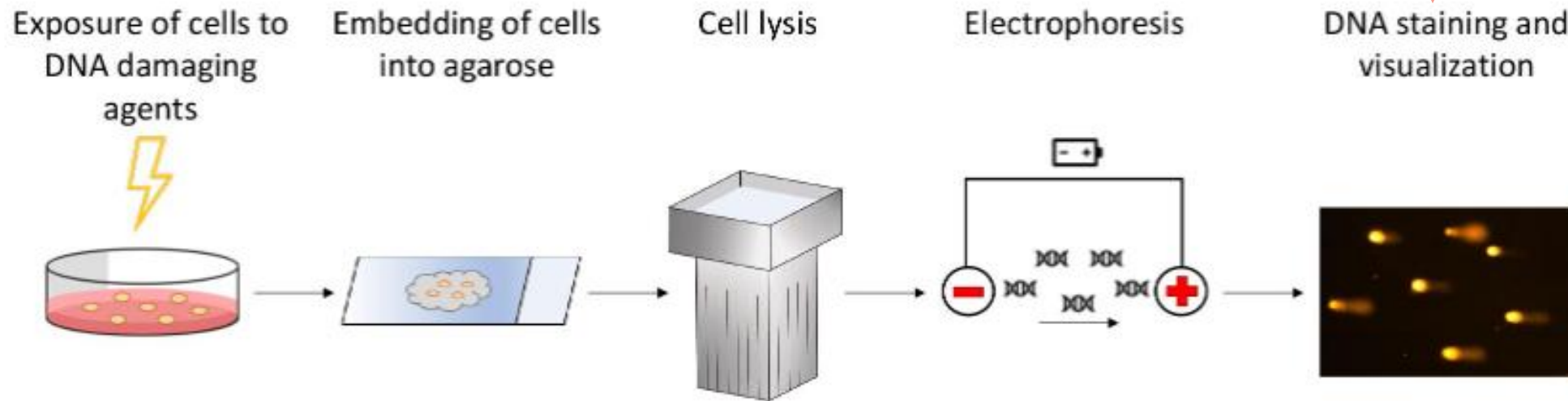
Il 2',7'-diclorofluoresceina diacetato (DCFDA) è un colorante fluorogenico in grado di attraversare la membrana cellulare, misura molte specie reattive dell'ossigeno (ROS) all'interno della cellula. Dopo la diffusione nel citoplasma, il DCFDA è deacetilato da esterasi cellulari ad un composto non fluorescente, che viene successivamente ossidato dai ROS (se presenti) in 2',7'-diclorofluoresceina (DCF). Il DCF è un composto altamente fluorescente che può essere rilevato mediante spettroscopia di fluorescenza con eccitazione massima e spettri di emissione di 495nm e 529nm, rispettivamente.



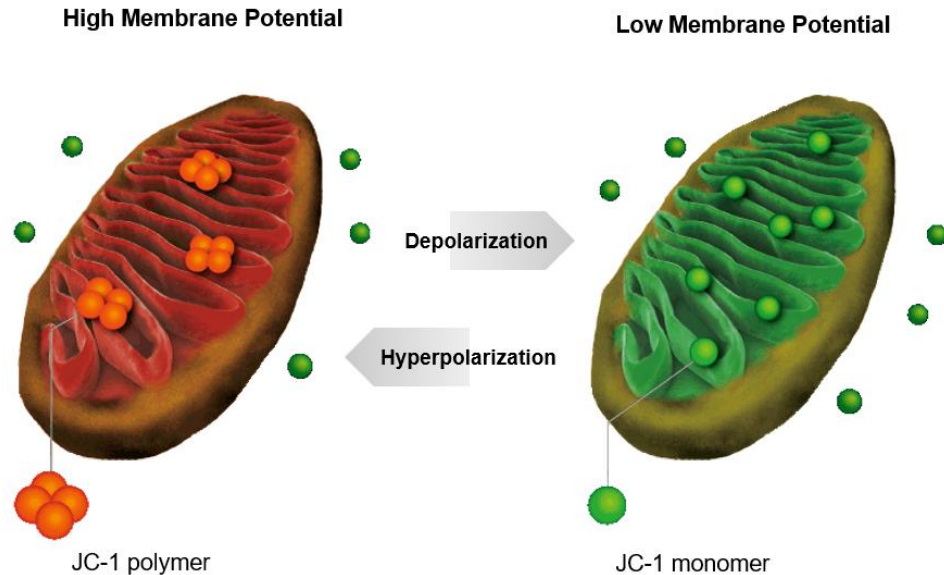
**COMET ASSAY:** individuare le **rottture nei filamenti di DNA** in cellule o nuclei isolati dopo esposizione a sostanze potenzialmente genotossiche. In condizioni alcaline ( $\text{pH} > 13$ ) il test individua rottture singole o doppie di filamenti provocate da interazioni dirette col DNA, siti alcali-labili o riconducibili a rottture provvisorie del DNA (dovute a riparazioni per escissione)= **VALUTAZIONE DEL RISCHIO GENOTOSSICO**

- Può essere combinato con altri test di genotossicità

Applicando un campo elettrico, i frammenti di DNA danneggiato migrano verso il polo positivo, formando una "coda".



## «Mitochondrial depolarisation assays (based on fluorescent indicator dyes)»



## Corretto funzionamento cellulare = mantenimento del potenziale di membrana mitocondriale

Il potenziale di membrana è un importante parametro della funzione mitocondriale ed è utilizzato come indicatore di benessere della cellula. **JC-1** è un colorante cationico e lipofilo in grado di penetrare nella membrana mitocondriale e cambia le sue proprietà fluorescenti in base all'aggregazione della sonda. Nelle cellule sane JC-1 forma degli aggregati (J-aggregati) che fluorescono nel rosso; nelle cellule con un basso potenziale, JC-1 rimane nella forma monomerica, che esibisce una fluorescenza verde. Maggiore è la ratio tra rosso e verde, maggiore è la polarizzazione della membrana.

Uno strumento prezioso nella pratica laboratoriale e negli studi tossicologici in vitro è:

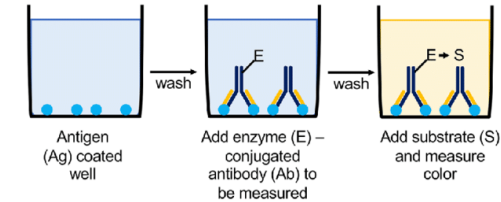
# ELISA: Enzyme-Linked Immunosorbent Assay

I kit ELISA possono essere utilizzati per identificare e misurare una grande varietà di *biomarker* all'interno di studi tossicologici. È una tecnica ampiamente impiegata perché consente di rilevare molecole con elevata specificità e sensibilità.

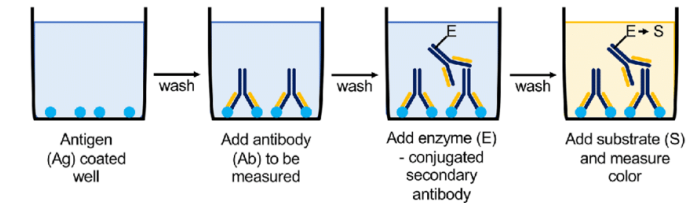
Può essere usata per:

- biomarcatori di esposizione e di danno (rilevare e quantificare marcatori liberati dalle cellule in seguito al danno, in risposta a un'esposizione tossica)
- studi di citossicità (misurare il rilascio di enzimi o altre molecole indicatrici di danno)
- valutazione della risposta immunitaria (valutare la produzione di mediatori da parte di cellule immunitarie)
- analisi dell'espressione proteica
- studi di attivazione/inibizione di recettori

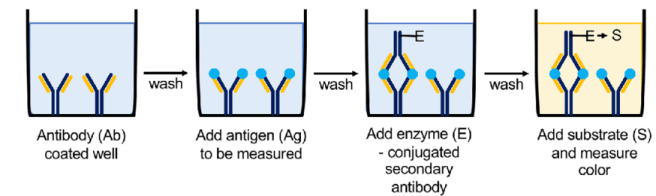
(a) Direct ELISA



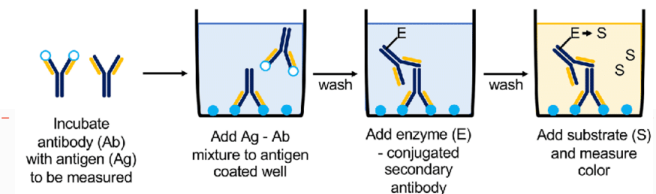
(b) Indirect ELISA



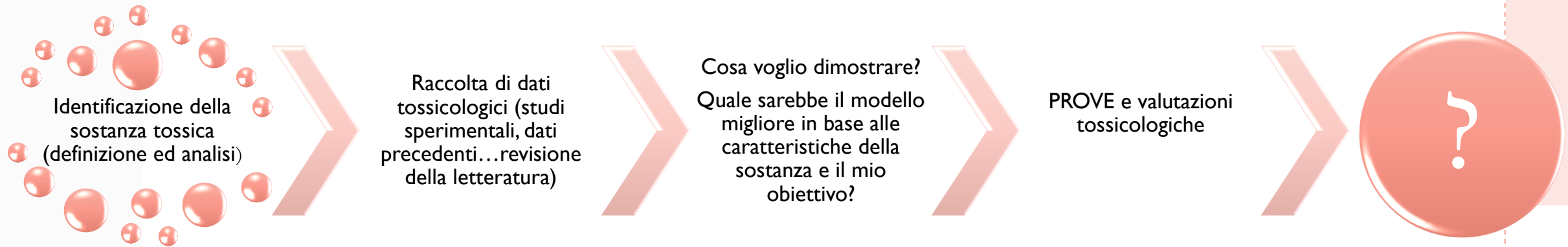
(c) Sandwich ELISA

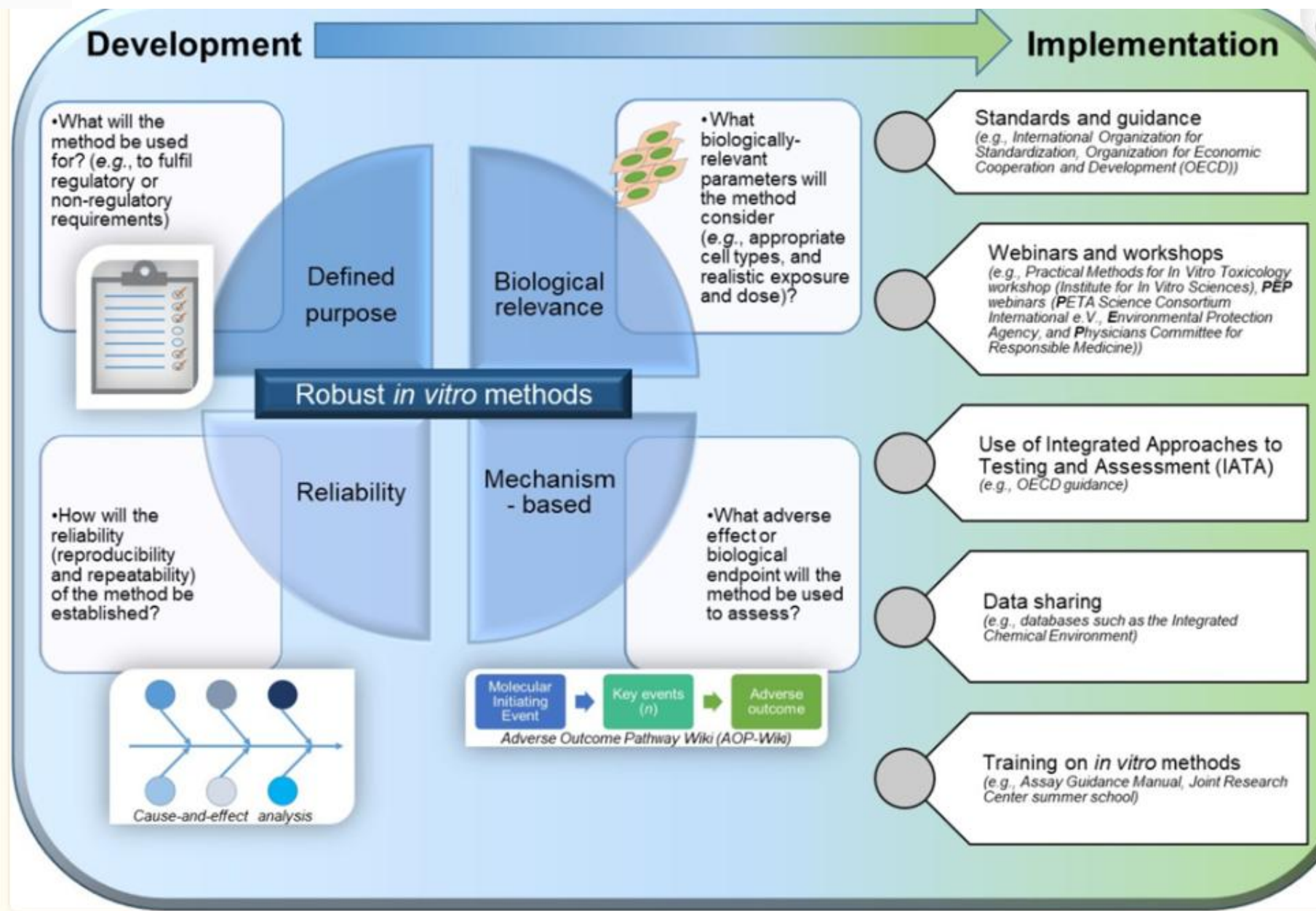


(d) Competitive ELISA







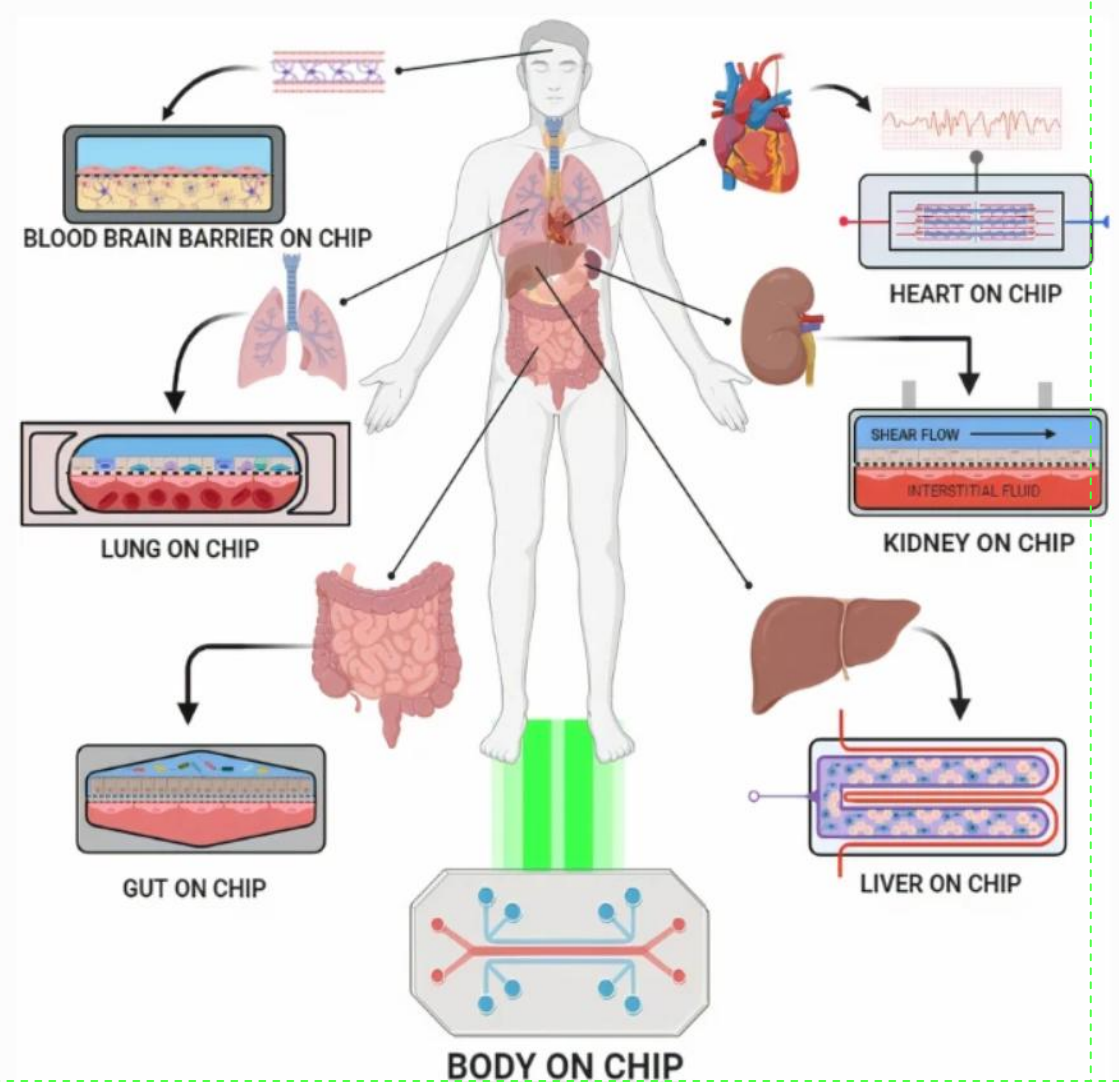
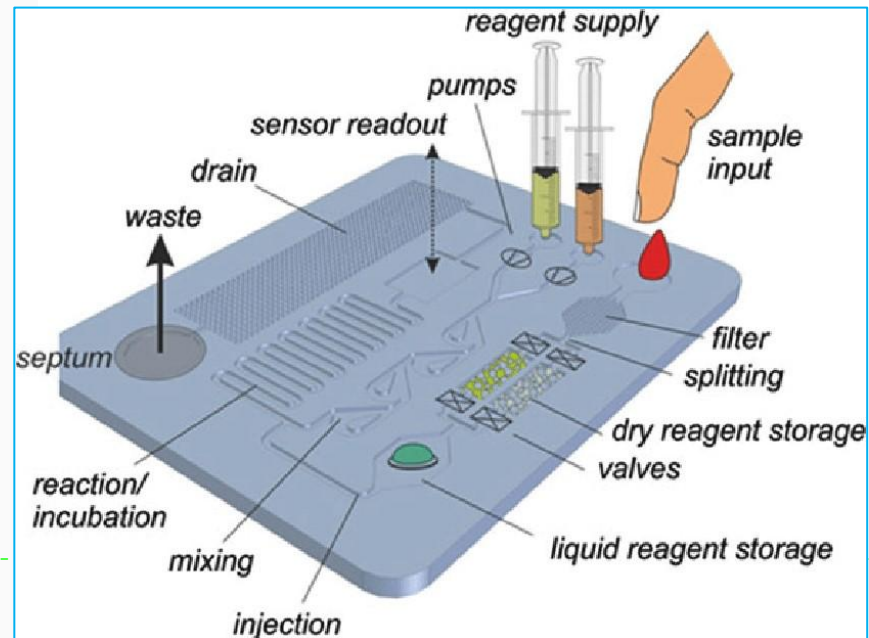


Seguire degli standard e linee guida affidabili (GIVIMP, guidance document on good in vitro method practices)

# Lab-on-chip

Sistemi miniaturizzati che sfruttano la tecnologia microfluidica.

- «Organ-on-a-chip» è un sottocampo dei lab-on-a-chip che si focalizza sulla creazione di modelli cellulari che imitano la struttura e la funzione degli organi umani.
- Questi modelli possono essere utilizzati per studiare gli effetti tossici delle sostanze chimiche su specifici organi in un ambiente controllato.



## ARTICLE

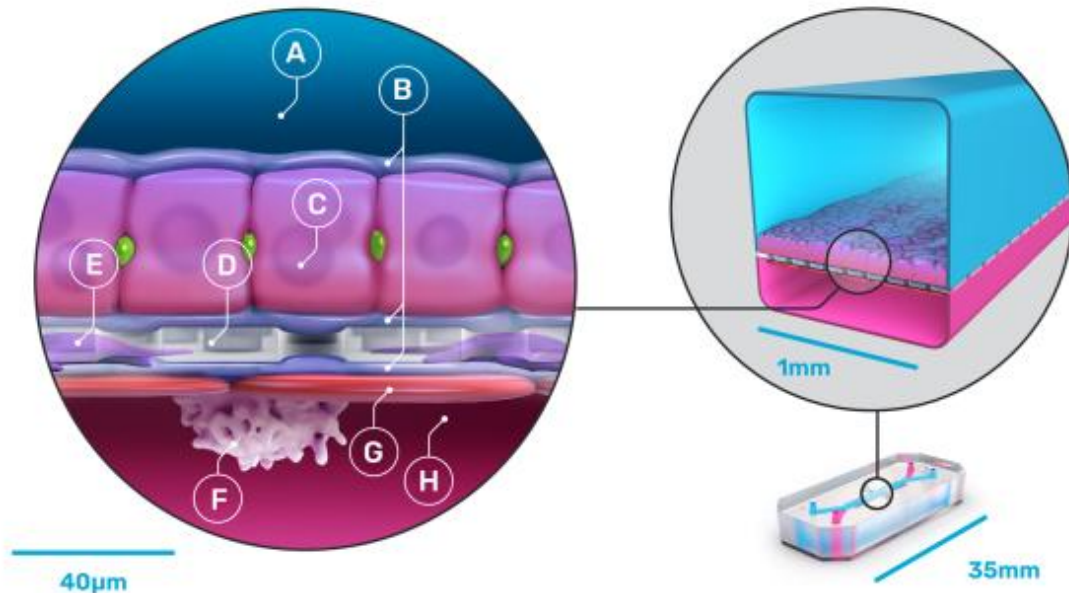
<https://doi.org/10.1038/s43856-022-00209-1>

OPEN



# Performance assessment and economic analysis of a human Liver-Chip for predictive toxicology

Lorna Ewart<sup>1</sup>✉, Athanasia Apostolou<sup>1</sup>, Skyler A. Briggs<sup>1</sup>, Christopher V. Carman<sup>1</sup>, Jake T. Chaff<sup>1</sup>, Anthony R. Heng<sup>1</sup>, Sushma Jadalanna<sup>1</sup>, Teekin Jeyarajagan<sup>1</sup>, Kwang-Jin Lee<sup>1</sup>, Savitri D. Joshi<sup>1</sup>, Mahika M. Kadam<sup>1</sup>, Marianne Kanellias<sup>1</sup>, Carolina Lucchesi<sup>1</sup>, Dimitris V. Manatakis<sup>1</sup>, Ann Catherine Rizos<sup>1</sup>, John F. K. Sauld<sup>1</sup>, James Velez<sup>1</sup>, Max Wendell<sup>1</sup>, Onyi Irra<sup>1</sup>, Jack W. Scannell<sup>7</sup> & Daniel Levner<sup>1</sup>



**Fig. 1 Schematic of the Emulate Liver-Chip.** This diagram shows primary human hepatocytes (C) that are sandwiched within an extracellular matrix (B) on a porous membrane (D) within the upper parenchymal channel (A), while human liver sinusoidal endothelial cells (G), Kupffer cells (F), and stellate cells (E) are cultured on the opposite side of the membrane in the lower vascular channel (H).



Vantaggi	Svantaggi
Sono richiesti volumi piccoli di reagenti	Non adatto a volumi grandi
Costi operativi più bassi rispetto alle metodologie tradizionali	Adsorbimento delle molecole sulla superficie
Procedure automatizzate	Interazione delle componenti con le molecole da testare
High-throughput screening	Perdita della standardizzazione
Risultati in tempi veloci	Richiede personale altamente qualificato
Customizzazione (integrazione con sensori e dispositivi per analisi <i>in situ</i> )	Accumulo di aria nei micro-canali
Integrazioni di diverse funzioni	Non adatto ai campioni troppo complessi