

UTILIZZO DI ORGANISMI INTERI NELLA TOSSICOLOGIA

Dott.ssa Giulia Caioni, PhD

TOSSICOLOGIA

< τοξικόν φάρμακον

«τοξικός»: relativo all'arco e «φάρμακον»: rimedio-medicina/veleno

- Scienza che studia le interazioni dannose tra **sostanze xenobiotiche** e sistemi biologici (=si occupa degli effetti avversi di trattamenti chimici e fisici su esseri viventi);
- esamina la natura, gli effetti, i meccanismi di azione delle **sostanze tossiche** e valuta la probabilità con cui tali effetti ricorrono (VALUTAZIONE DEI RISCHI).



DEFINIZIONI

Tossico (*toxicant*)

una sostanza chimica che, una volta venuta a contatto con un sistema biologico, determina una alterazione dello stato fisiologico non desiderata.

Veleno (*poison*)

Composto chimico naturale o sintetico in grado di produrre un effetto nocivo, morboso o fatale sulle cellule viventi o sul corpo quando vengono assunte o somministrate quantità adeguate



“Omnia venenum sunt: nec sine veneno quicquam existit. Dosis sola facit, ut venenum non fit.”
Tutto è veleno, e nulla esiste senza veleno. Solo la dose fa in modo che il veleno non faccia effetto

DEFINIZIONI

Tossina *(toxin, biologically produced)*

Sostanza specifica prodotta da organismi viventi, con effetti generalmente immediati

Tossicità

la capacità che la sostanza stessa ha di recare un danno alla vita di un organismo (effetto tossico).

Grado di tossicità: acuta, subcronica, cronica.

Intossicazione

stato morboso (=malattia, acuta o cronica) provocato nell'organismo dall'azione di sostanze tossiche.

TOSSICITÀ

Il grado di tossicità di una sostanza chimica è valutata mediante studi **diretti su animali** o mediante rilievi fatti sull'uomo.

- Tossicità acuta, subacuta, cronica, subcronica
- Tossicità immediata e ritardata
- Tossicità locale e sistemica
- Effetti tossici reversibili e irreversibili



Roditori: pilastro della ricerca tossicologica



- Similarità biologica (omologia genetica e sistemi biologici simili)
- Praticità (dimensioni, allevamento)
- Risultati prevedibili (dati in letteratura, riproducibilità dei dati)
- Disponibilità di protocolli sperimentali
- Versatilità sperimentale (manipolazione genetica)

SVANTAGGI NELL'UTILIZZO DI MODELLI MURINI

- Differenze fisiologiche e metaboliche
- Eterogeneità dei risultati
- Complessità delle malattie umane
- Barriere etiche
- Variabilità genetica
- Comprensione meccanicista

I risultati dei test in vivo sono realmente predittivi?

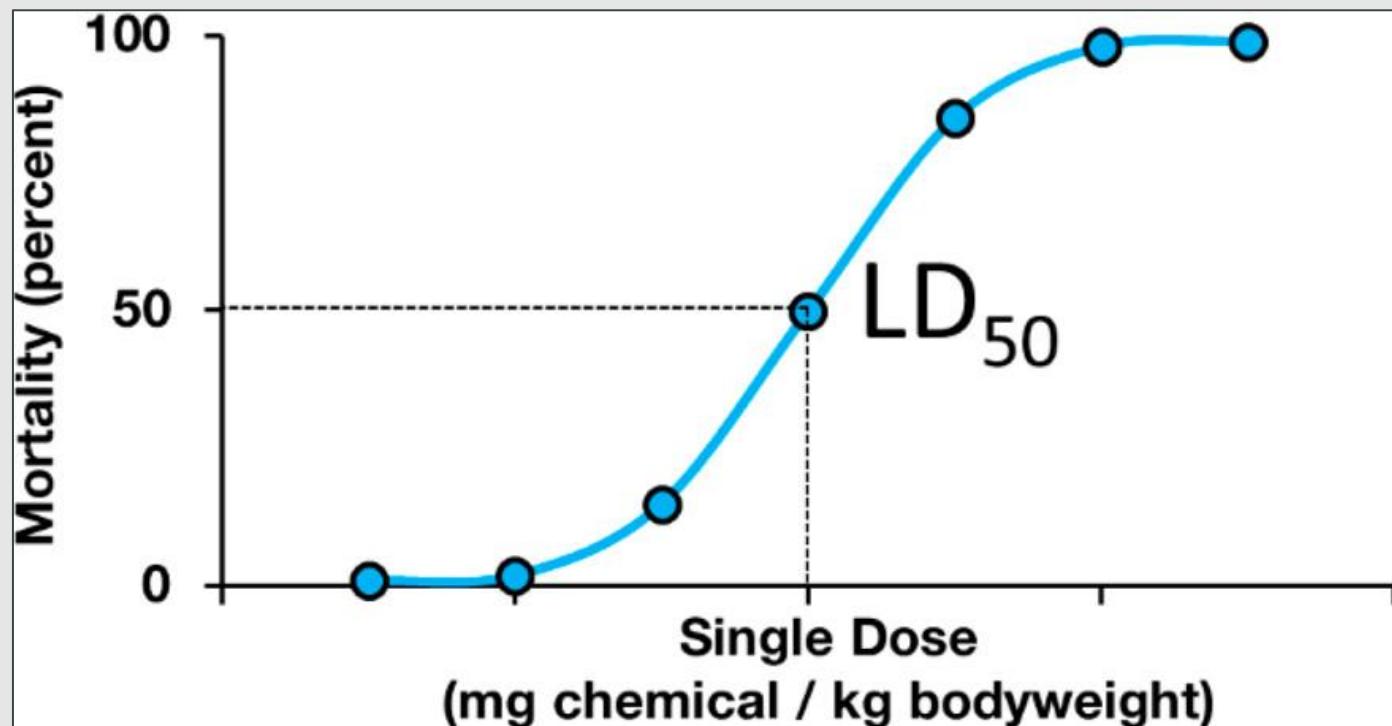
Come si ricreano i vari tipi di tossicità nel modello murino?

TOSSICITÀ ACUTA

Influenzata da:

- FATTORI SPECIE-SPECIFICI
- FATTORI ESTERNI (es: stress termico)
- Modalità di somministrazione

- **Singola esposizione o multiple esposizioni in un giorno; l'effetto si manifesta immediatamente o entro due settimane dalla esposizione**
- **DL50**= quella dose alla quale, dopo la somministrazione di una singola quantità di sostanza chimica, si provoca la morte del 50% degli animali trattati. La risposta a questo tipo di trattamento permette di classificare, anche se in modo un po' arbitrario, il grado di pericolosità delle sostanze chimiche (poco tossiche, tossiche, molto tossiche, estremamente tossiche)



Acute toxicity

Life-threatening one-time doses

SUBSTANCE	FOUND IN	Lethal dose (LD50 mg/kg)	CATEGORY
Water	... Water	90000	Practically non-toxic
Sucrose	Table sugar	30000	
Monosodium glutamate	Flavor enhancer, soy, cheese	16000	
Ethanol	Alcoholic beverages	7000	
Glyphosate	Hericide (RoundUp)	5600	
Aluminum hydroxide	Antacid, vaccine adjuvant	>5000	
Fructose	Fruits, component of sucrose	4000	
Spinosad	Organic insecticide	3700	
Sodium chloride	Table salt	3000	
Eugenol	Clove oil, organic pesticide	2700	Slightly toxic
Paracetamol (acetaminophen)	Tylenol, Panadol	2400	
Vanillin	Vanilla bean, vanilla sugar	1600	
Hydrogen peroxide 70%	Bleach, disinfectant	1000	
Theobromine	Chocolate, tea, guarana	950	
Copper sulfate	Organic fungicide	300	
Chlorpyrifos	Organophosphate insecticide	230	
Caffeine	Natural pesticide, coffee plant	190	Moderately toxic
Lead	Batteries, cables, paints	155*	
DDT	Restricted insecticide	100	
Rotenone	Restricted organic pesticide	60	
Vitamin D3	Supplements, fish, mushrooms	37	Highly toxic
Nicotine	Natural pesticide, tobacco	10	
Mycotoxin T2	Plant pathogen, moldy grain	5	
Aflatoxin	Soil fungus, moldy foods	5	
Hydrogen cyanide	Fruit pits, bitter cassava	4	
Botulinum toxin	Botox, Clostridium botulinum	0.001	

LD₅₀: Generally rat oral. Botulinum: mouse and human; cyanide: human, cyanide: mouse.

*Lead: no LD₅₀, lowest human lethal dose included. Colours: EPA toxicity categories.

Mommy
PHD

Sources: EFSA, WHO,
EPA, NIH, NHS

Facciamo degli esempi

Pericolosità

Dose letale



TOSSICITÀ SUB-ACUTA

A BREVE TERMINE, con
esposizioni ripetute per un
mese o poco meno: 14-28
giorni

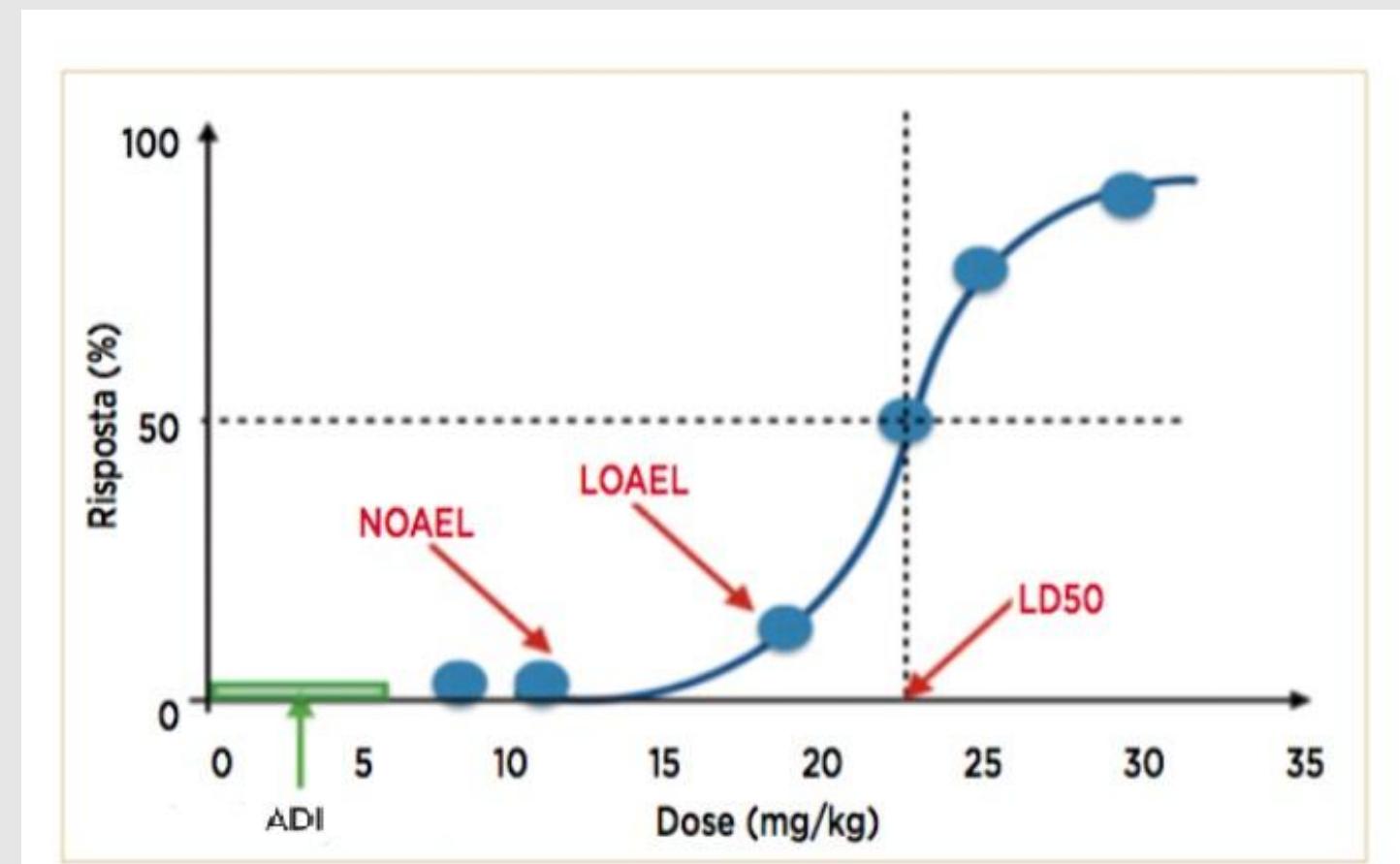
- Nelle prove di tossicità subacuta la comune durata della sperimentazione è di un mese, con somministrazioni giornaliere
- SCOPI: determinare gli effetti tossici a dosi che consentono la sopravvivenza degli animali; identificare organi bersaglio; identificare eventuale tossicità selettiva di specie; identificare biomarker di effetto tossico
- Si usano 3-4 dosaggi della sostanza (la più elevata deve far comparire effetti tossici d'organo o mortalità in non più del 10% degli animali; la minore permette di fissare il margine di tolleranza);

TOSSICITÀ SUB-CRONICA

o PROLUNGATA con esposizioni ripetute per il 10-25 % della vita dell'animale:

la dose più alta deve dare < 10% di mortalità, la dose più bassa non deve avere effetti tossici acuti

- determinare **NOAEL** (no adverse effect level) e **LOAEL** (lowest adverse effect level) x studi a lungo termine
- calcolo della dose accettabile giornaliera (accepted daily intake, ADI) $ADI = \frac{NOAEL}{100 \text{ o } 1000}$



TOSSICITÀ CRONICA

- Basata sui valori di NOAEL e LOAEL
- La maggiore dose deve dare segni di tossicità

- con questi studi si identificano gli effetti indotti dopo ripetute e prolungate somministrazioni. Permettono di determinare la natura ed il tipo di effetti tossici nonché i periodi di latenza, i **fenomeni di bioaccumulo e la reversibilità degli effetti**.
- La continua esposizione può causare l'insorgenza di forme tumorali, anomalie della funzione riproduttiva, insorgenza di malformazioni nel feto (effetto teratogeno della sostanza tossica) o comparsa di mutazioni nelle cellule riproduttive (effetto mutagено della sostanza tossica).
- Identificazione di un **NOEL** (No Observed Effect Level) e di un **LOEL** (Lowest Observed Effect Level)

Altri esempi

Chronic toxicity

Acceptable daily intakes
of minimal concern

SUBSTANCE	FOUND IN	Limit mg/kg
Water	You know this one	50000
Sucrose	Table sugar	800
Ethanol	Alcoholic beverages	170
Monosodium glutamate	Cheese, soy, flavor enhancer	120
Sodium chloride	Table salt	60
Vanillin	Vanilla bean, vanilla sugar	10
Eugenol	Clove oil, organic pesticide	1
Glyphosate	Herbicide (RoundUp)	0.5
Copper sulfate	Organic fungicide	0.5
Aluminum hydroxide	Antacid, vaccine adjuvant	0.14
Paracetamol	Tylenol, Panadol	0.093
Spinosad	Organic insecticide	0.024
Hydrogen cyanide	Fruit pits, bitter cassava	0.012
DDT	Restricted insecticide	0.010
Lead	Batteries, cables, paints	0.007
Caffeine	Coffee, tea, chocolate	0.003
Vitamin D3	Supplements, fish	0.002
Chlorpyrifos	Organophosphate pesticide	0.001
Nicotine	Natural pesticide, tobacco	0.0008
Rotenone	Restricted organic pesticide	0.0004
Mycotoxin T2	Fusarium, moldy grain	0.00002

Limits: Reference Dose (RfD or ADI), Reference Intake (RI), Upper Limit (UL), or Tolerable Daily Intake (TDI). Colours for readability (no official categories exist for these limits).



Thoughtscapism More at: thoughtscapism.com

Sources: EFSA, WHO, EPA, NIH, NHS

MOMMY,
Ph.D

-
- I parametri di tossicità costituiscono un essenziale punto di partenza per valutare comparativamente i rischi correlati a diverse sostanze chimiche. Data l'incessante esposizione umana a numerose sostanze, la loro potenziale minaccia emerge in presenza di elevate concentrazioni, frequenti esposizioni o percorsi di esposizione inadatti. Anche le sostanze classificate normativamente come "sicure" comportano avvertenze legate al contesto e alla probabilità, e *nessuna sostanza può essere definita totalmente sicura*. È fondamentale comparare i dati di rilevamento e i livelli di esposizione con tali parametri per determinare eventuali rischi. La tossicità, sia acuta che cronica, fornisce utili benchmarks comparativi per discernere la nocività di una sostanza.

INDAGARE LA TOSSICITÀ COL MODELLO ZEBRAFISH



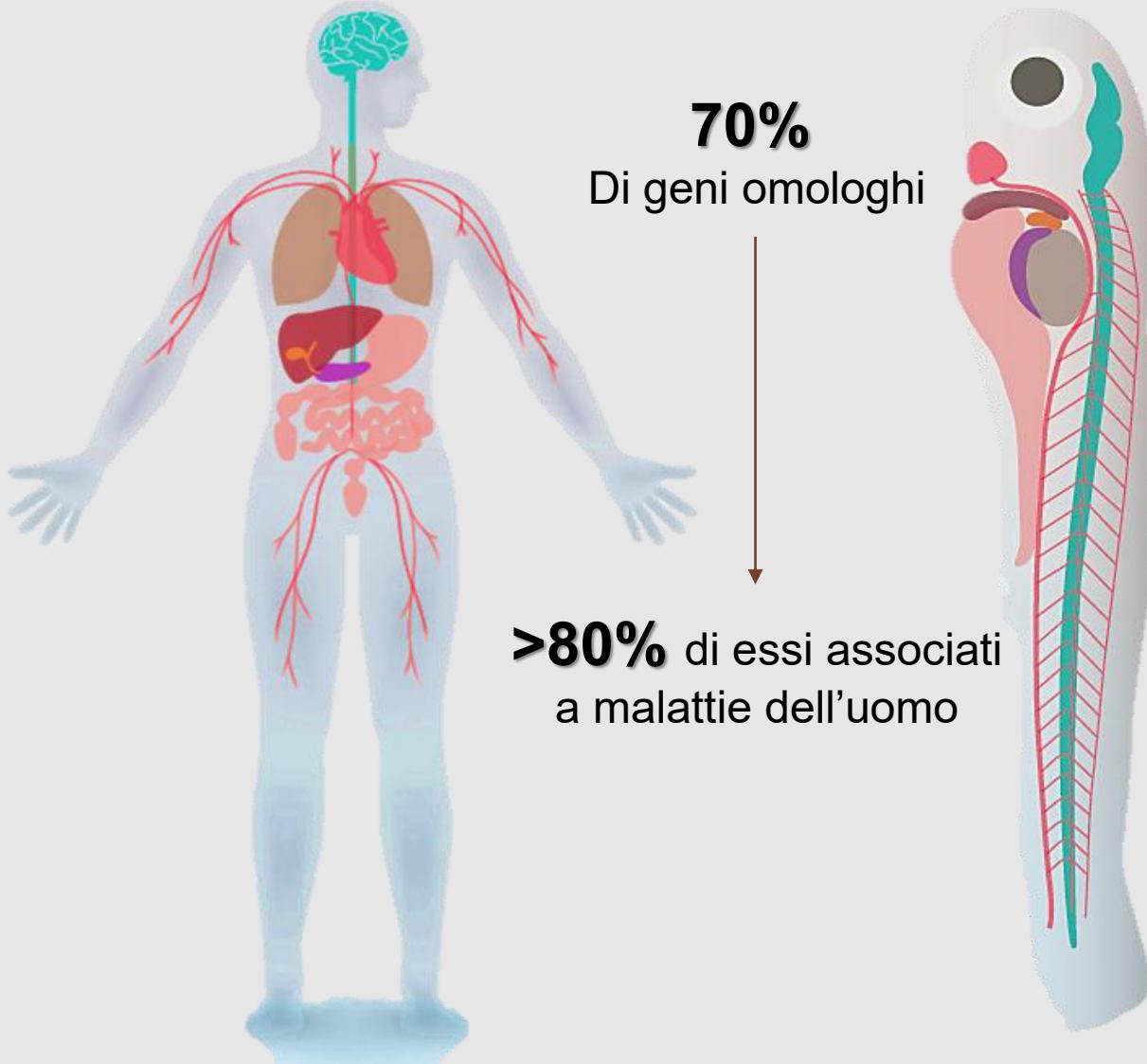
Fish Embryo Toxicity (FET) Test

= determinare la tossicità acuta
delle sostanze chimiche sugli stadi
embrionali del pesce

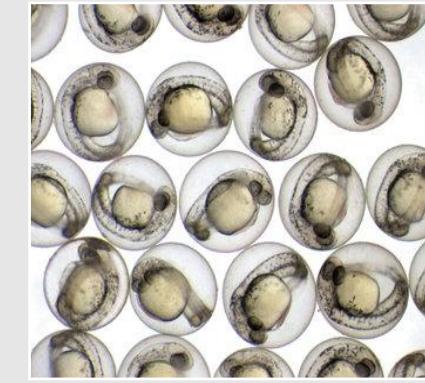
Perché zebrafish?

«vertebrato canonico»

Somiglianza genetica



Perché zebrafish?

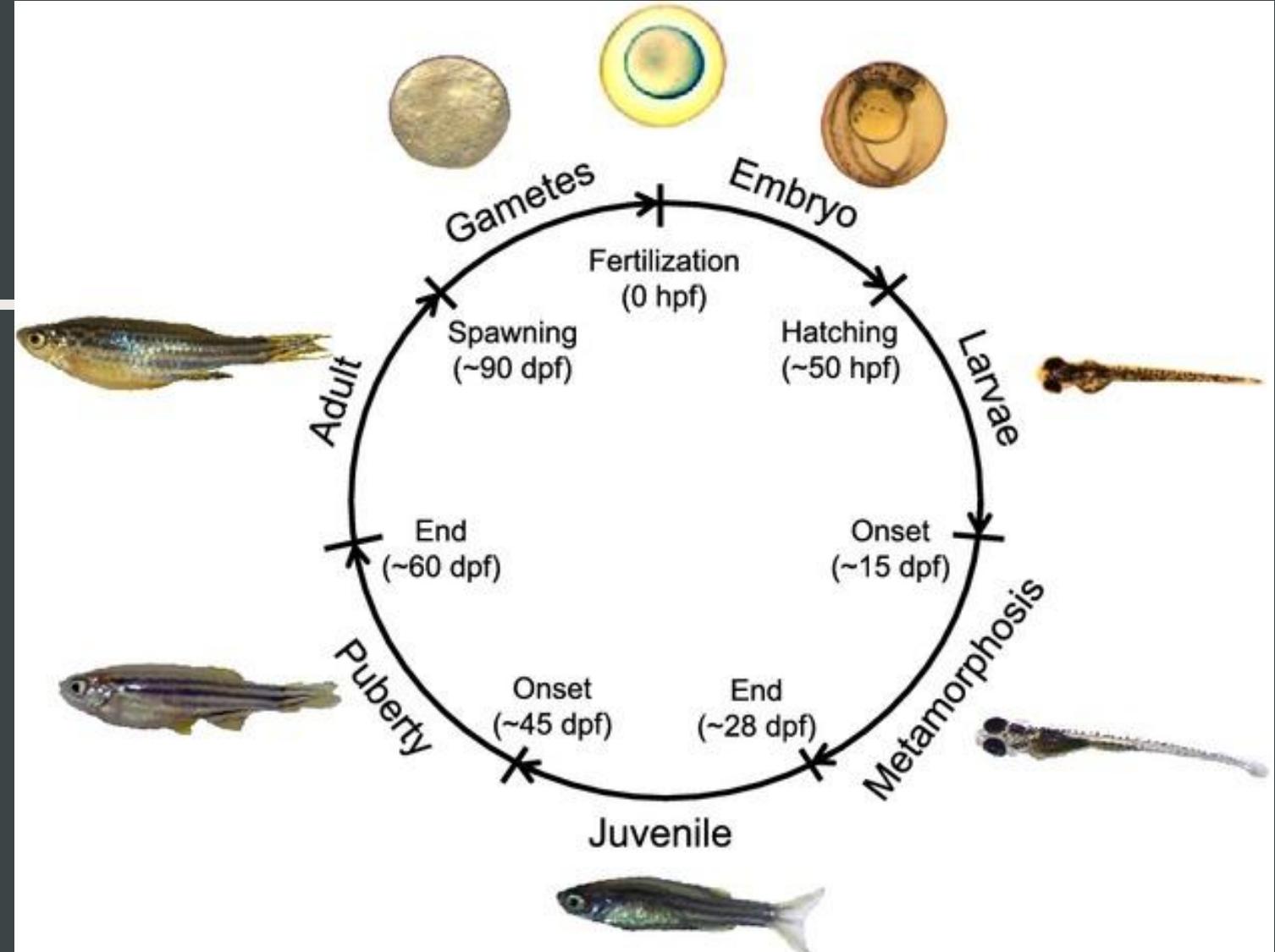


Facilità di mantenimento:
piccole dimensioni
sviluppo veloce
elevata fecondità.

Semplice manipolazione:
fecondazione esterna;
genome editing (es.
CRIPR/Cas9);
high throughput screening.

Trasparenza:
lo sviluppo embrionale può essere facilmente osservato (=tracciatura visiva).

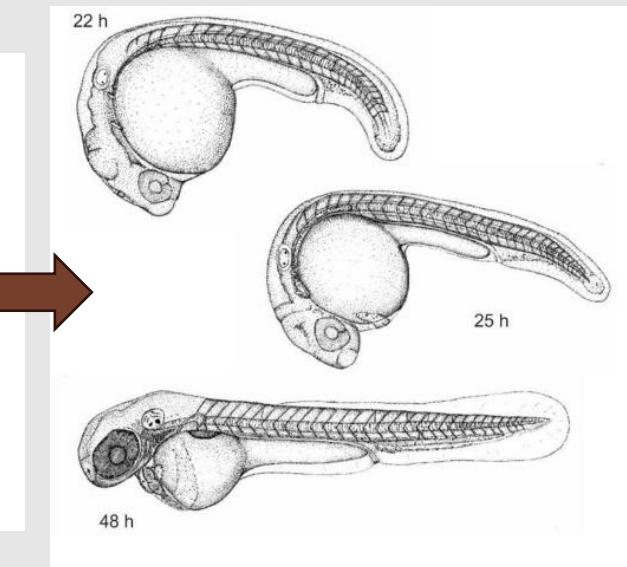
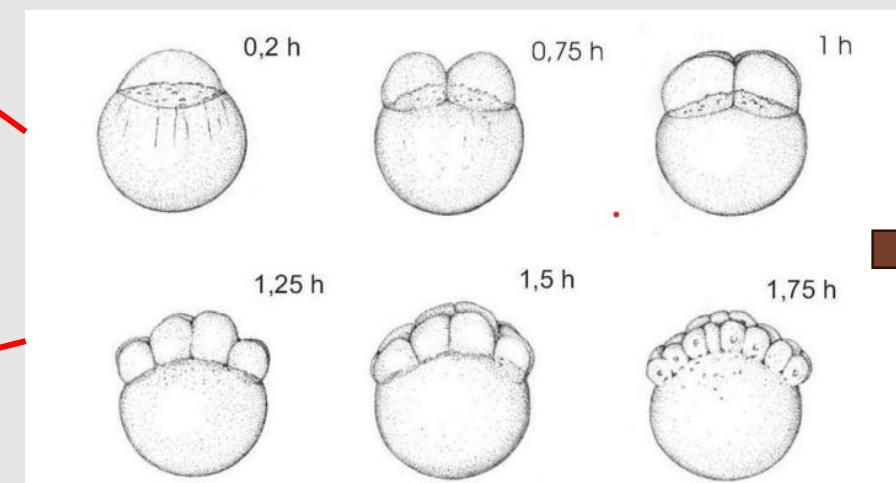
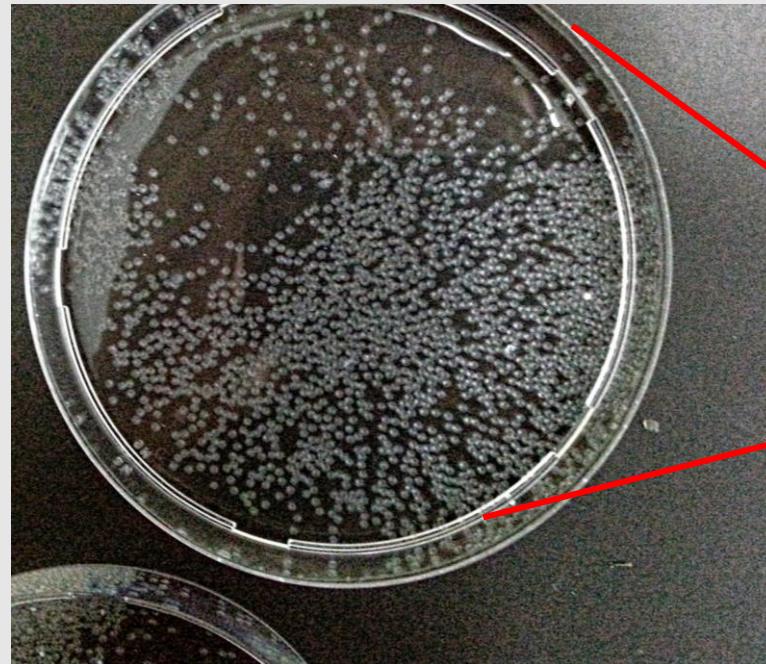
SVILUPPO

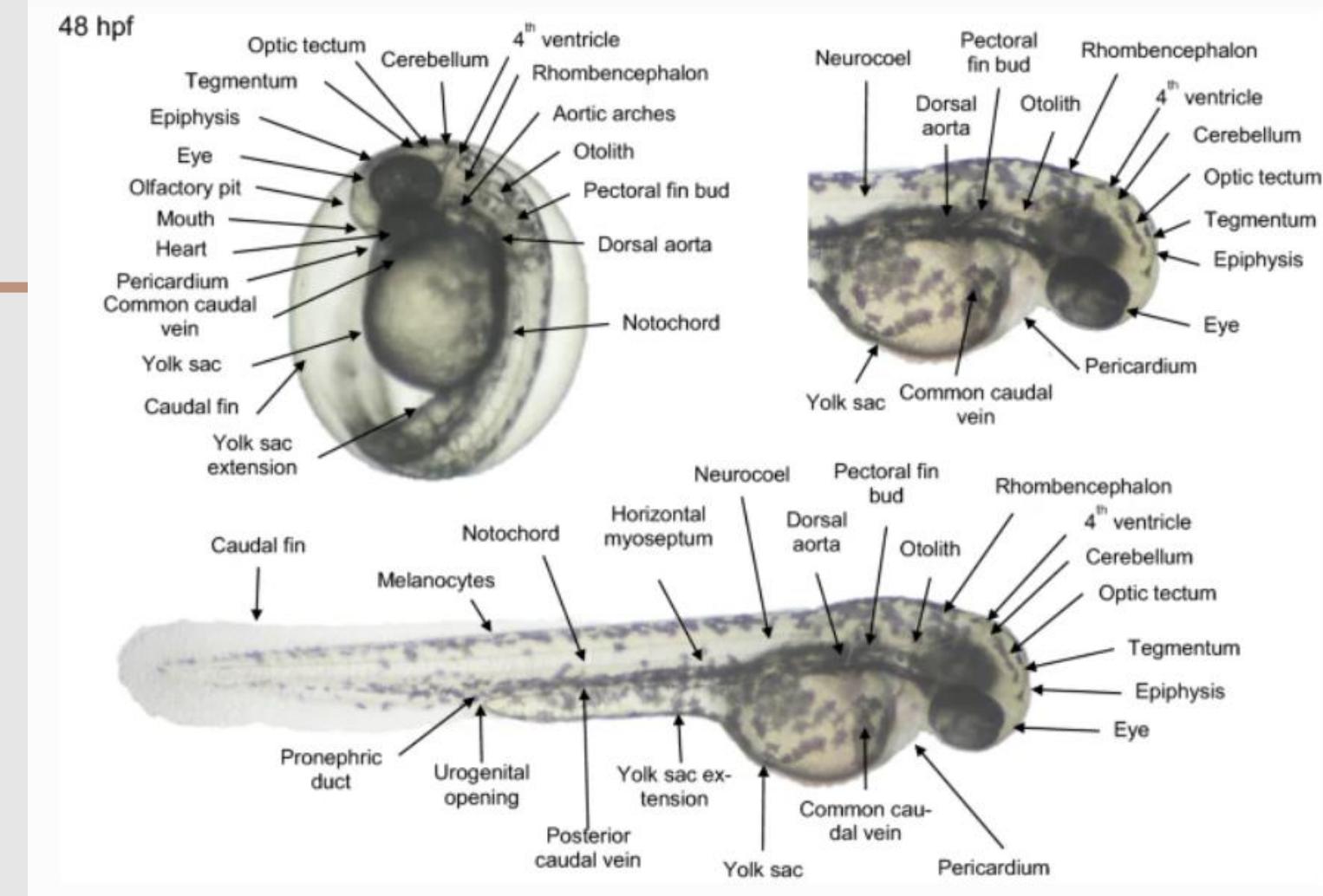
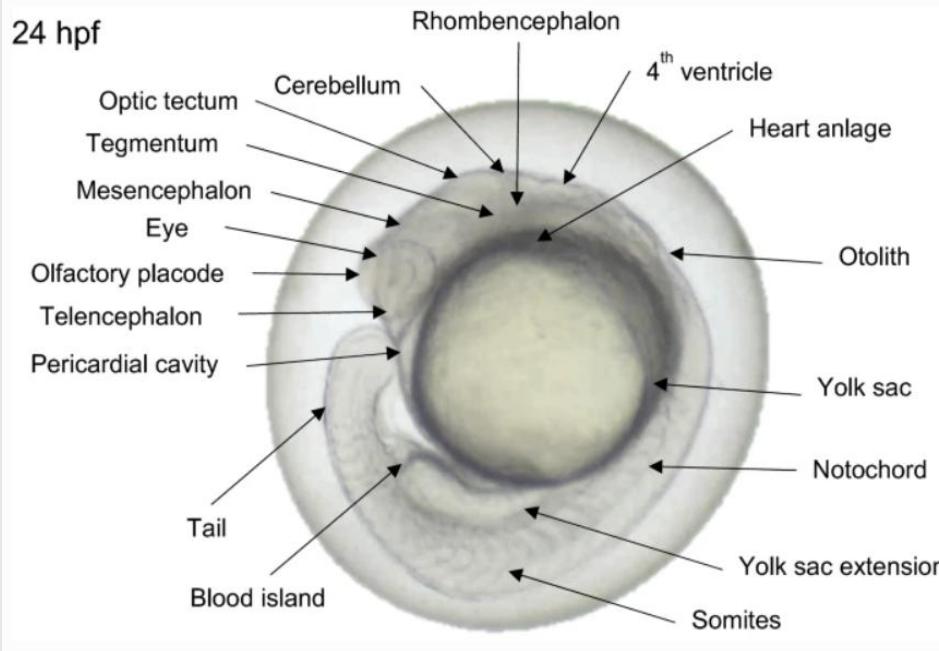


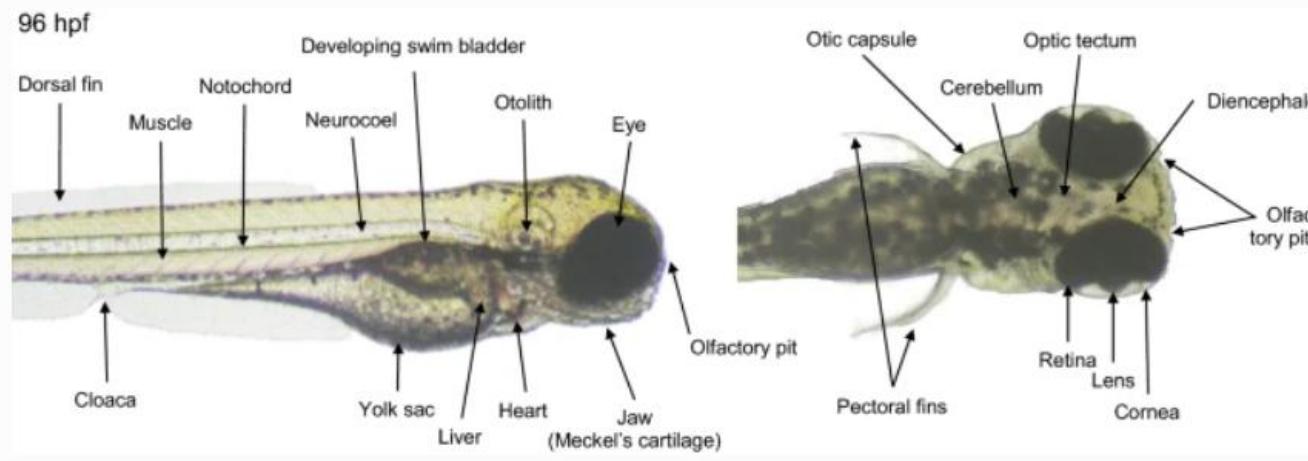
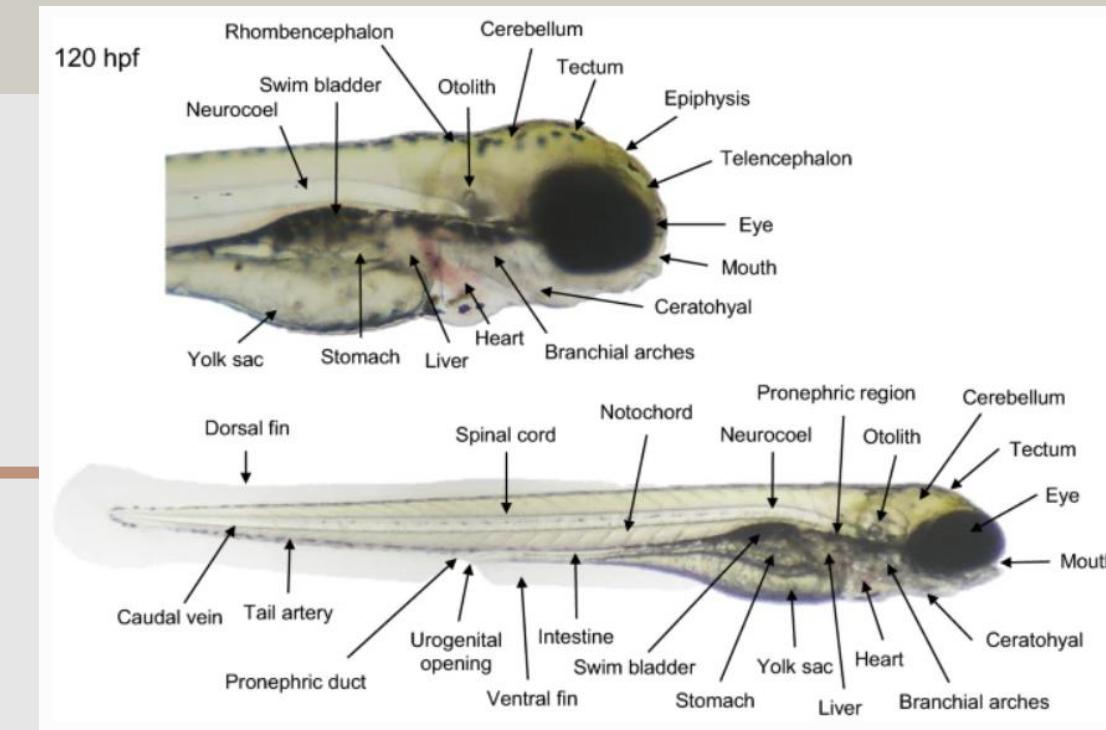
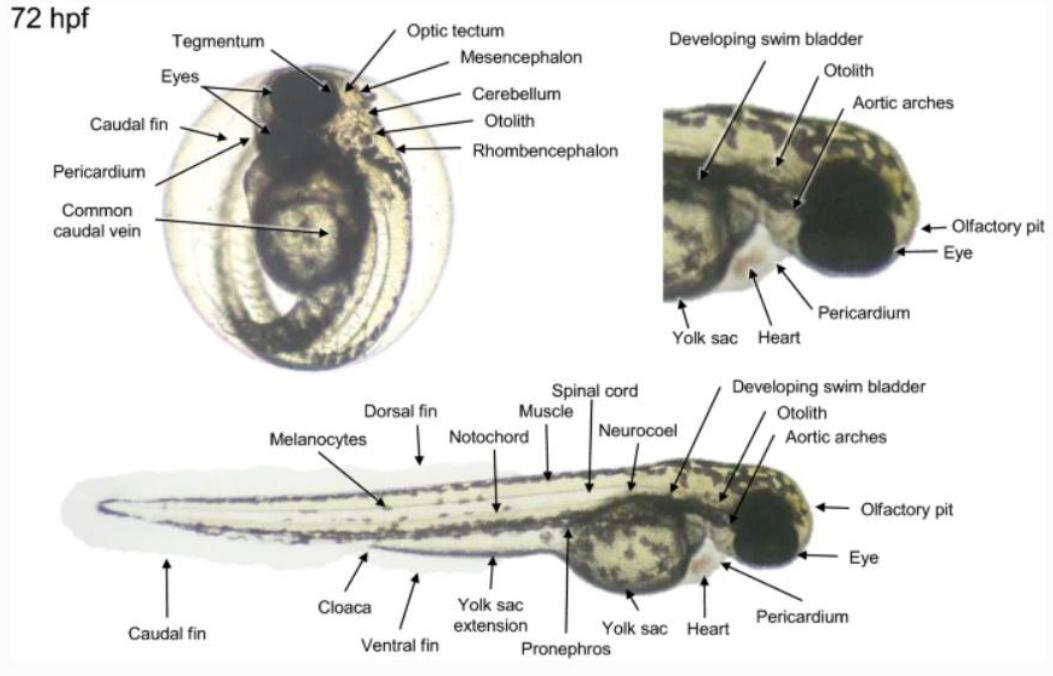
Hpf: hours post-fertilization
Dpf: days post-fertilization

<https://doi.org/10.1111/raq.12041>

SVILUPPO







von Hellfeld, R., Brotzmann, K., Baumann, L. et al. Adverse effects in the fish embryo acute toxicity (FET) test: a catalogue of unspecific morphological changes versus more specific effects in zebrafish (*Danio rerio*) embryos. *Environ Sci Eur* 32, 122 (2020). <https://doi.org/10.1186/s12302-020-00398-3>

IL PRINCIPIO DELLE 3R

Il principio 3R (introdotto nel 1959 dagli accademici britannici Russel e Burch) per sostenere una sperimentazione più attenta alla protezione degli animali da laboratorio.

Direttiva n. 2010/63/UE, recepita in Italia con il D.LGS. del 4 marzo 2014, n. 26.

The 3 R's of Animal Research

Reduce



Reduce the number of animals used

Refine



Refine tests to cause animals less stress

Replace



Replace animal studies with other methods

RockStep
DIGITALIZING IN VIVO RESEARCH

Le larve di zebrafish possono essere utilizzate per sostituire animali come topi, ratti e cavie nello studio *in vivo* degli effetti farmacologici di una molecola in un organismo intatto. Ciò rende possibile valutare i composti negli animali di ordine inferiore (come il pesce zebra), anziché nei roditori.

Ad esempio: lo studio degli effetti in un organismo complesso rende la selezione precoce dei composti molto più affidabile, riducendo il numero complessivo di topi o ratti utilizzati nelle successive fasi di ricerca (*screening iniziale più affidabile*).

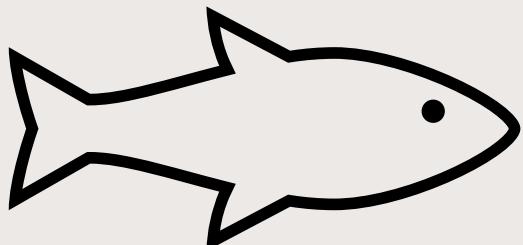
D.LGS. del 4 marzo 2014, n. 26.

«E' consentito l'utilizzo degli animali ai fini scientifici o educativi soltanto quando, per ottenere il risultato ricercato, non sia possibile utilizzare altro metodo o una strategia di sperimentazione scientificamente valida, ragionevolmente e praticamente applicabile che non implichì l'impiego di animali vivi».

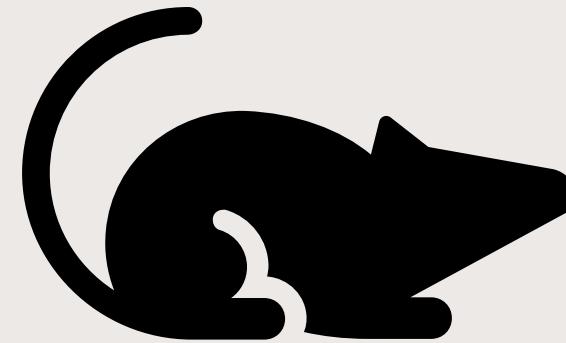
Il presente decreto si applica ai seguenti animali:

- a) animali vertebrati vivi non umani, comprese:
 - 1) forme larvali capaci di alimentarsi autonomamente;**
 - 2) forme fetali di mammiferi a partire dall'ultimo terzo del loro normale sviluppo;
- b) cefalopodi vivi.

CONSIDERARE LE DIFFERENZE INTER-SPECIFICHE E LE VIE DI SOMMINISTRAZIONE



vs





GUIDELINES

Organisation for Economic Co-operation and Development (OECD), It: OCSE.

Oecd guideline n.236

- Descrive i Fish Embryo Acute Toxicity test. Questo test è stato progettato per determinare la tossicità acuta data da sostanze chimiche su **embrioni e larve** di zebrafish. Fasi precoci dello sviluppo

Comprendere e prevedere gli impatti ambientali di sostanze immesse negli ecosistemi acquatici (ricerca ambientale)

Sviluppo di linee guida e normative (es: contributo a definire i limiti di concentrazione di alcune sostanze chimiche)

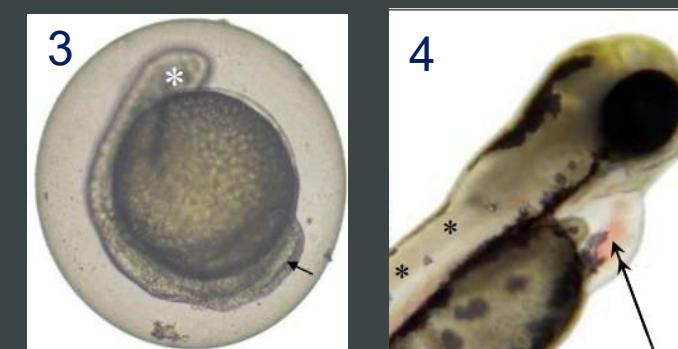
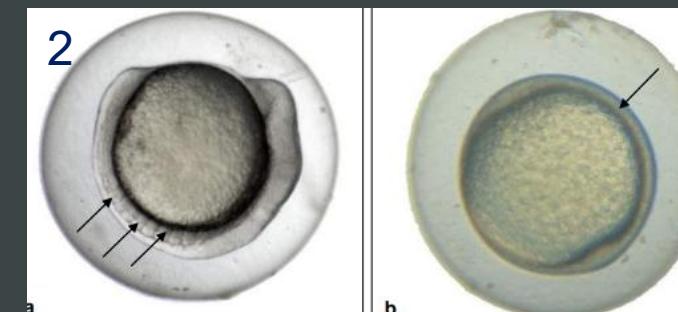
Valutazione del rischio
(*toxicological tool* for...)

PRINCIPIO BASE

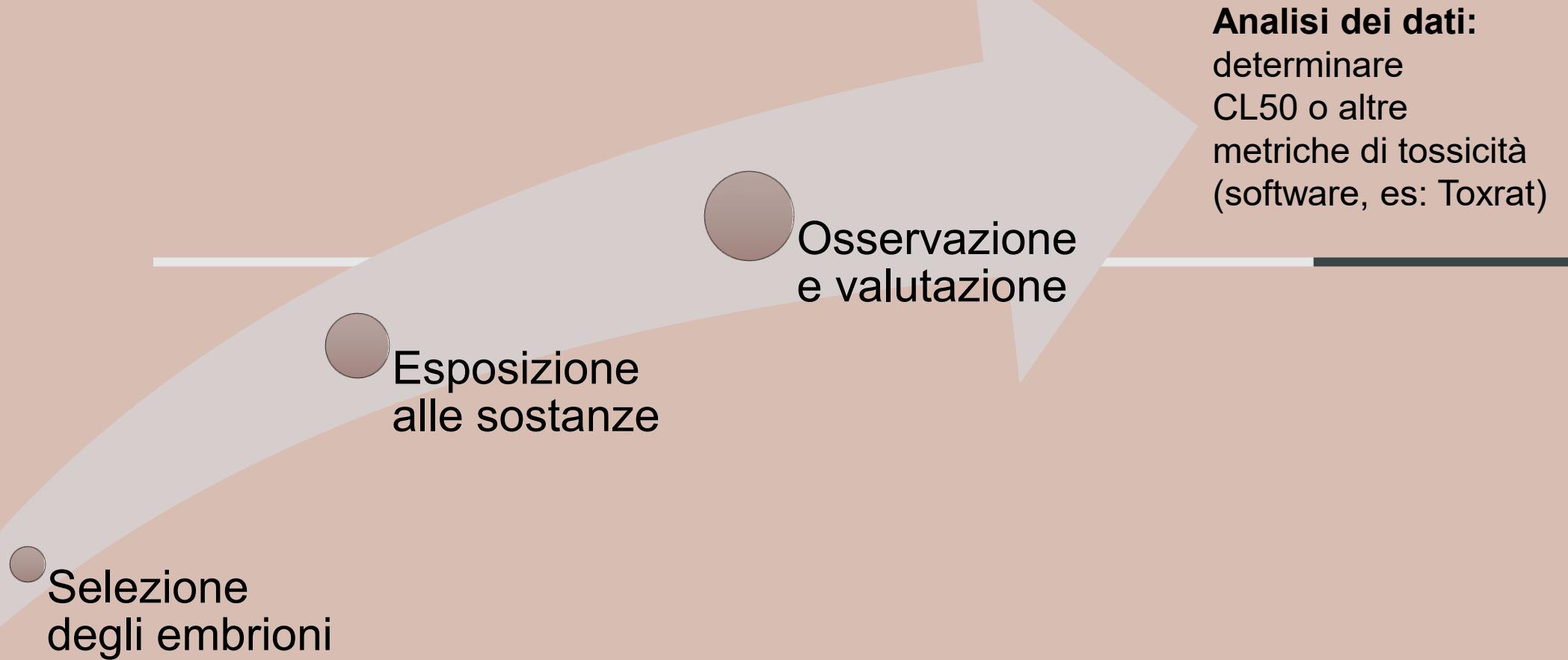
Il test inizia con l'esposizione chimica delle uova appena fecondate e ha una durata di **96 ore**. Ogni 24 ore vengono effettuate delle osservazioni. Si identifica la presenza di indicatori di letalità:

- (1) coagulazione delle uova fecondate
- (2) mancata formazione di somiti
- (3) mancato distacco del bottone caudale dal sacco vitellino
- (4) assenza di battito cardiaco

Al termine del periodo di esposizione, la tossicità acuta è determinata in base a un risultato positivo in una qualsiasi delle quattro osservazioni registrate (l'embrione è morto) e viene calcolata la CL50.



OECD guideline n.236



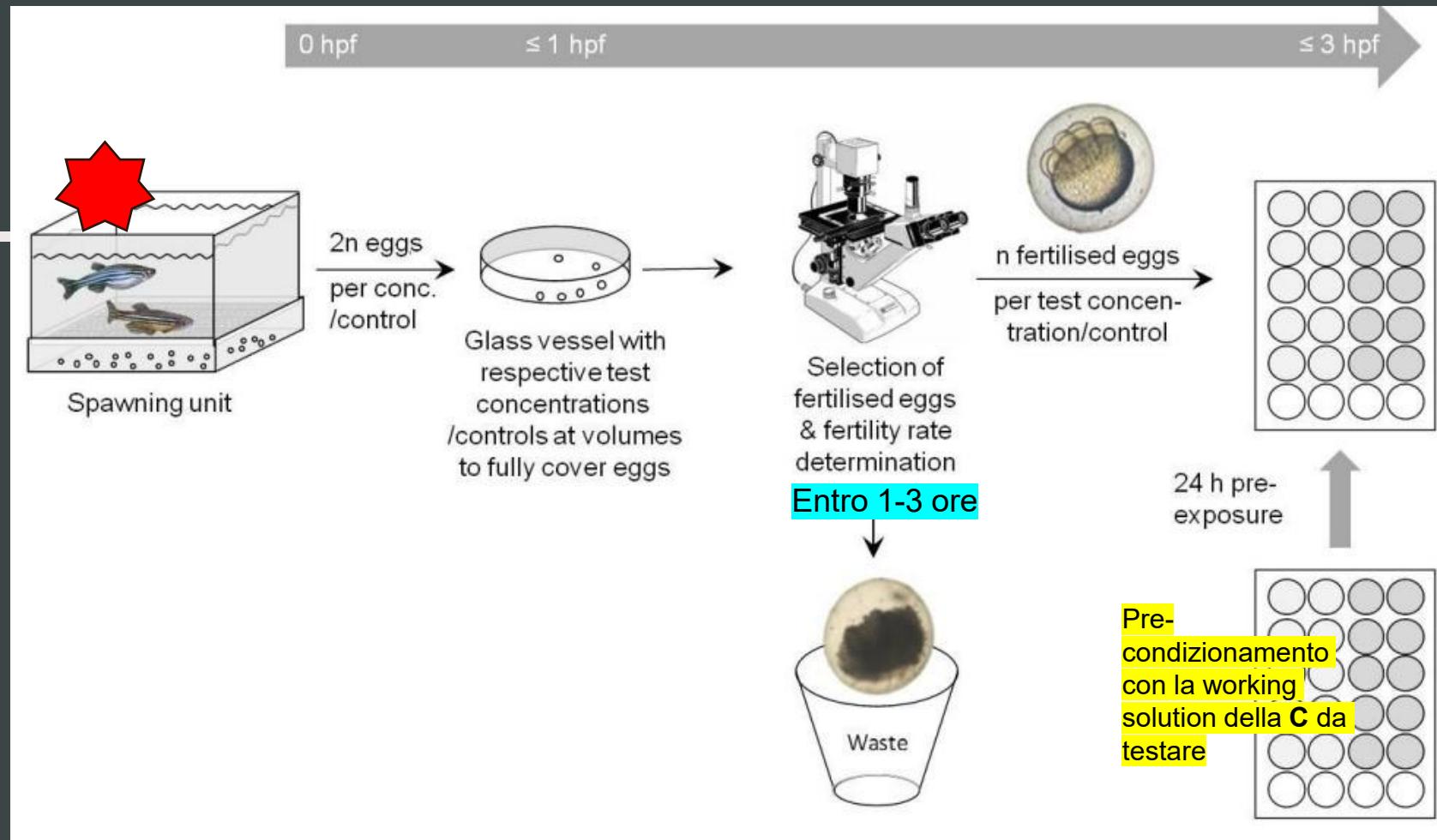
PROCEDURA

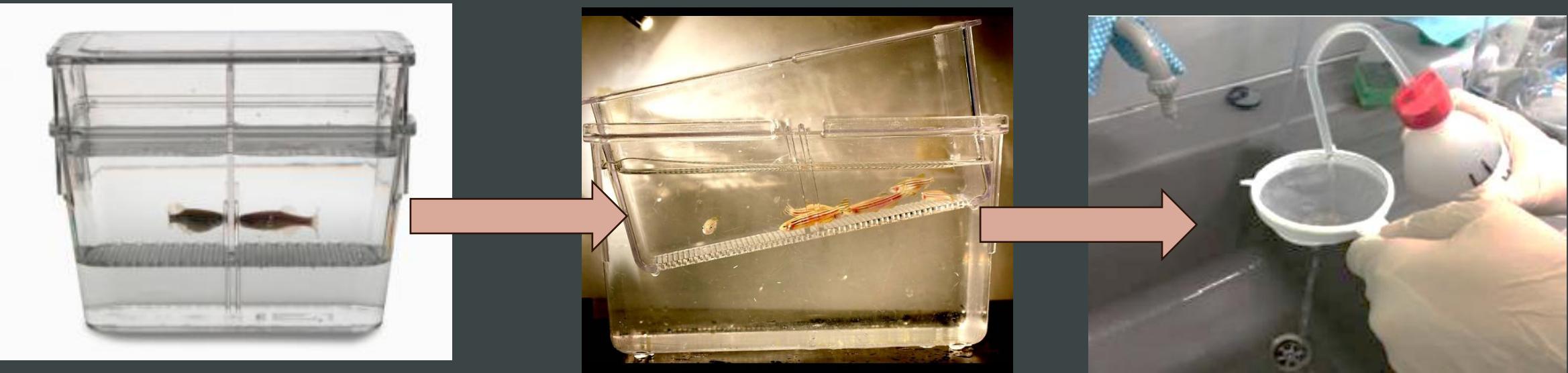
Working solution: vengono preparate quotidianamente a partire da una soluzione madre più concentrata ($C_i \times V_i = C_f \times V_f$).

Lo standard chimico della sostanza in esame da testare viene sciolto in acqua (Dilution water) o in solvente (dimetilsolfossido, DMSO) per le sostanze non solubili in acqua.

Dilution water (OECD n°203), contiene CaCl₂, MgSO₄, NaHCO₃, KCl, viene fatta ossigenare per 30 minuti e portata a pH di 7,75 (6,5-8,5).

DMSO: concentrazione max 0,01% (effetti subletali a 2-2,5%)





- 1) Il pomeriggio prima dell'inizio del test i pesci vengono messi in accoppiamento: si separano i maschi dalle femmine e vengono messi in vaschette per l'accoppiamento (*sistema di accoppiamento statico*)
La vaschetta è costituita da un contenitore, da una griglia concentrica (serve ad evitare che i pesci adulti predino gli embrioni), da un separatore e da un coperchio.
- 2) La mattina dell'inizio del test il separatore viene tolto e la vaschetta inclinata per garantire l'accoppiamento
- 3) Gli embrioni vengono «raccolti» e risciacquati con acqua deionizzata e Dilution water e poi selezionati macroscopicamente e microscopicamente

DESIGN Sperimentale

Controllo positivo: 4mg/L di 3,4 dichloroanilina per valutare la sensibilità degli embrioni e del ceppo utilizzati

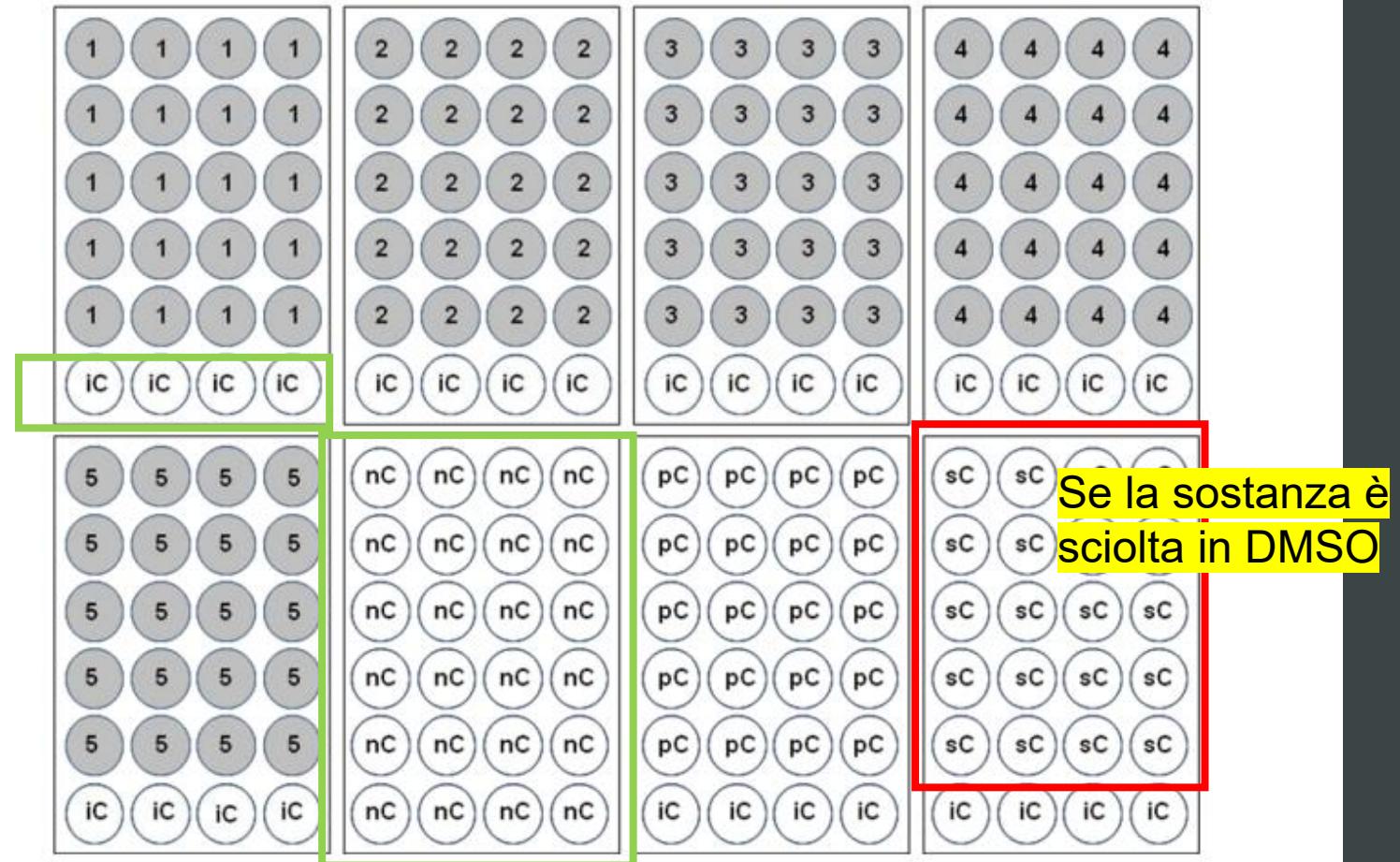
Controllo negativo: (Dilution water) sia come controllo interno che come piastra intera

Le «working solution» vengono rinnovate quotidianamente senza sostituire l'embrione

Piastre in polistirene o vetro da 2,5-5 mL

Annex 5

Fig 1: Layout of 24-well plates



1-5 = five test concentrations / chemical; nC = negative control (dillution water); iC = internal plate control (dilution water); pC = positive control (3,4-DCA 4mg/L); sC = solvent control

QUANDO I FET SONO VALIDI?

- Criteri di accettazione del test (vanno eseguiti 3 replicati indipendenti):
 - Tasso di fertilizzazione degli embrioni superiore al 70%
 - Temperatura delle «working solution» mantenuta a $26\pm1^\circ\text{C}$
 - La sopravvivenza degli embrioni nel controllo negativo e nel controllo solvente superiore o al massimo uguale al 90% alla fine del test
 - Nel controllo positivo una mortalità almeno del 30% al termine del test
 - Tasso di schiusa almeno uguale o superiore all'80% nel controllo negativo a 96 hpf
 - Concentrazione dell'ossigeno dissolto almeno uguale o superiore all'80% al termine del test

ALTERAZIONI SUBLETTALI

Un catalogo generale di
alterazioni morfologiche che si
osservano dopo esposizione a
sostanze chimiche (von Hellfeld
et al., 2020)

Common sublethal endpoints with potential for regeneration

32

Blood congestion and lack of heart pooling

Formation of edemata (pericardial, yolk and tail)

Frequent sublethal endpoints with little or no potential for regeneration

Lordosis

Kyphosis

Deformed caudal fin

Reduced eye size

Deformation of the jaw

Less common sublethal endpoints

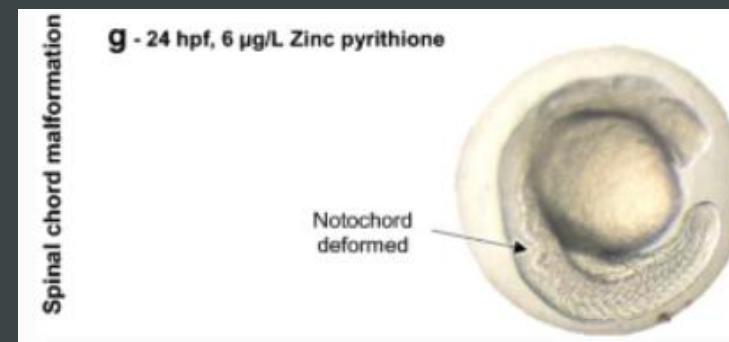
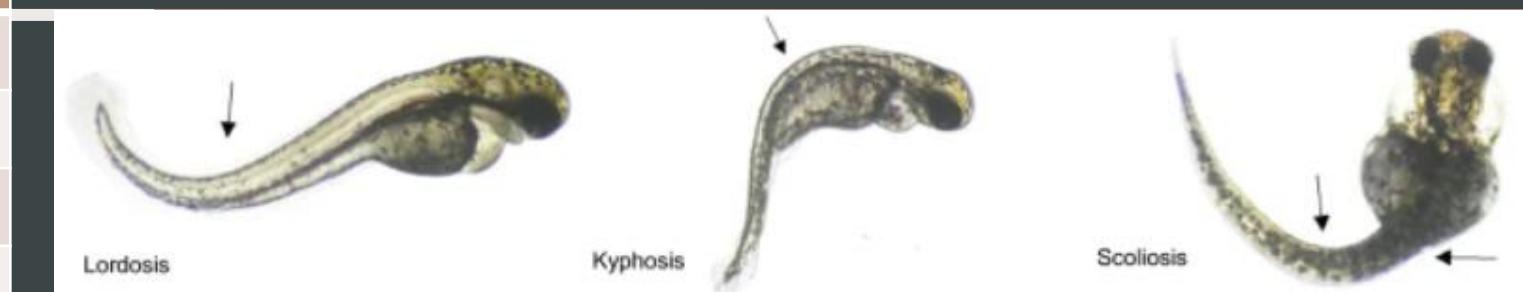
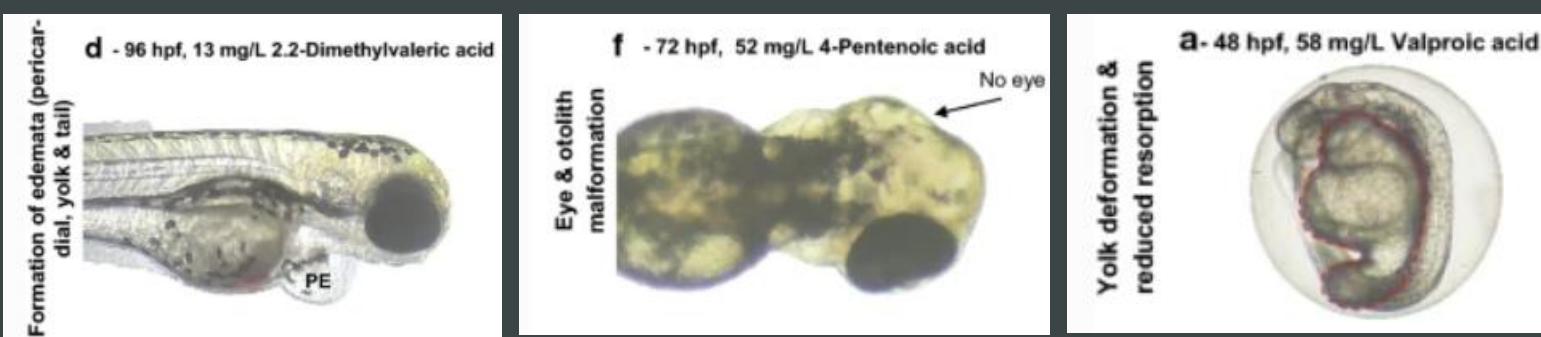
Yolk deformation

Reduced yolk resorption

(Overall or partial) Lack of body pigmentation

Notochord deformation

Spinal chord malformation



Behavioral alterations (neurotoxic effects)

tremor

modified spontaneous movement

L'esposizione a sostanze tossiche può portare a molteplici alterazioni dello sviluppo, che vanno oltre quelle elencate nella Linea Guida 236. Le osservazioni morfologiche possono fungere da importante fonte di indicatori per potenziali meccanismi tossici; studi addizionali (molecolari) potrebbero essere generalmente necessari per chiarire le vie sottostanti.

Servirebbero una descrizione completa e più differenziata delle osservazioni e una standardizzazione della nomenclatura utilizzata (uso di **SCORES**).

CHE
IMPORTANZA
HANNO QUESTE
OSSERVAZIONI?

- Mortalità
- Mancata schiusa
- Anomalie dello sviluppo
- Comportamento
- Tossicità a sub-letale
- Tossicità a livello molecolare e biochimico
- Cinetica e metabolismo della sostanza
- Tossicità a livello del sistema nervoso

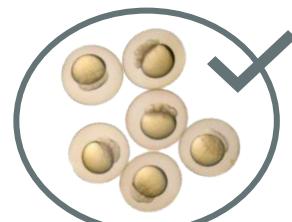
Panoramica generale della valutazione della tossicità

La combinazione di diversi end-point aiuta a fornire una immagine complessiva dell'impatto tossicologico di una sostanza aiutando anche a definire i meccanismi di azione tossica e le implicazioni per la salute umana ed ambientale

DETERMINATION OF ACUTE TOXICITY: FISH EMBRYO TOXICITY (FET) TESTS

Esempio: voglio determinare gli effetti del triclocarban sullo sviluppo di zebrafish

ACCOPIAMENTO



SELEZIONE

ESPOSIZIONE AL TRICLOCARBAN

From 2 hpf to 96 hpf

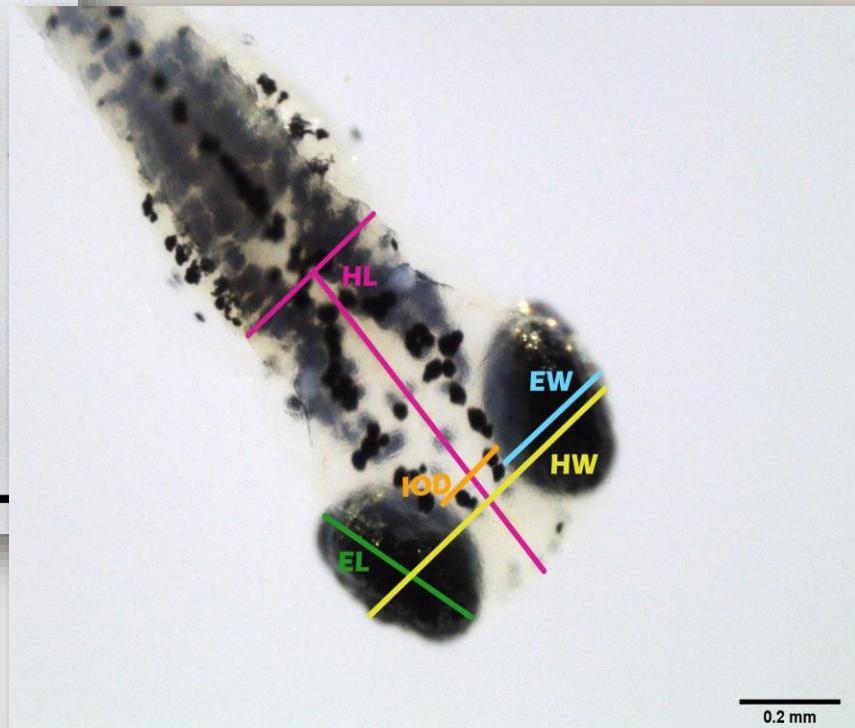
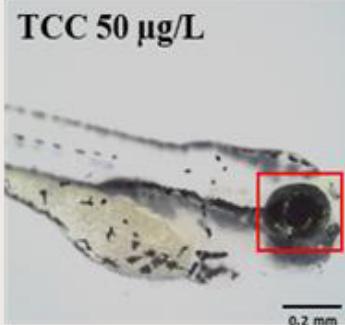
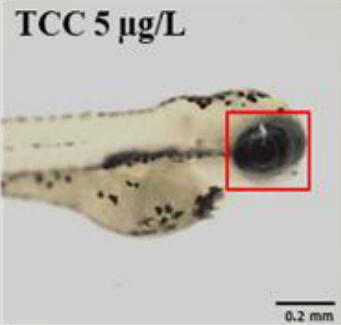
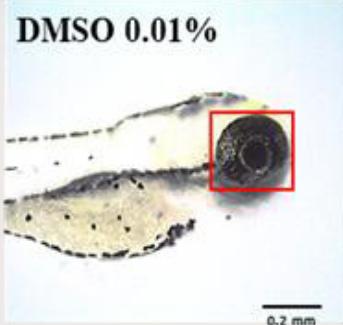
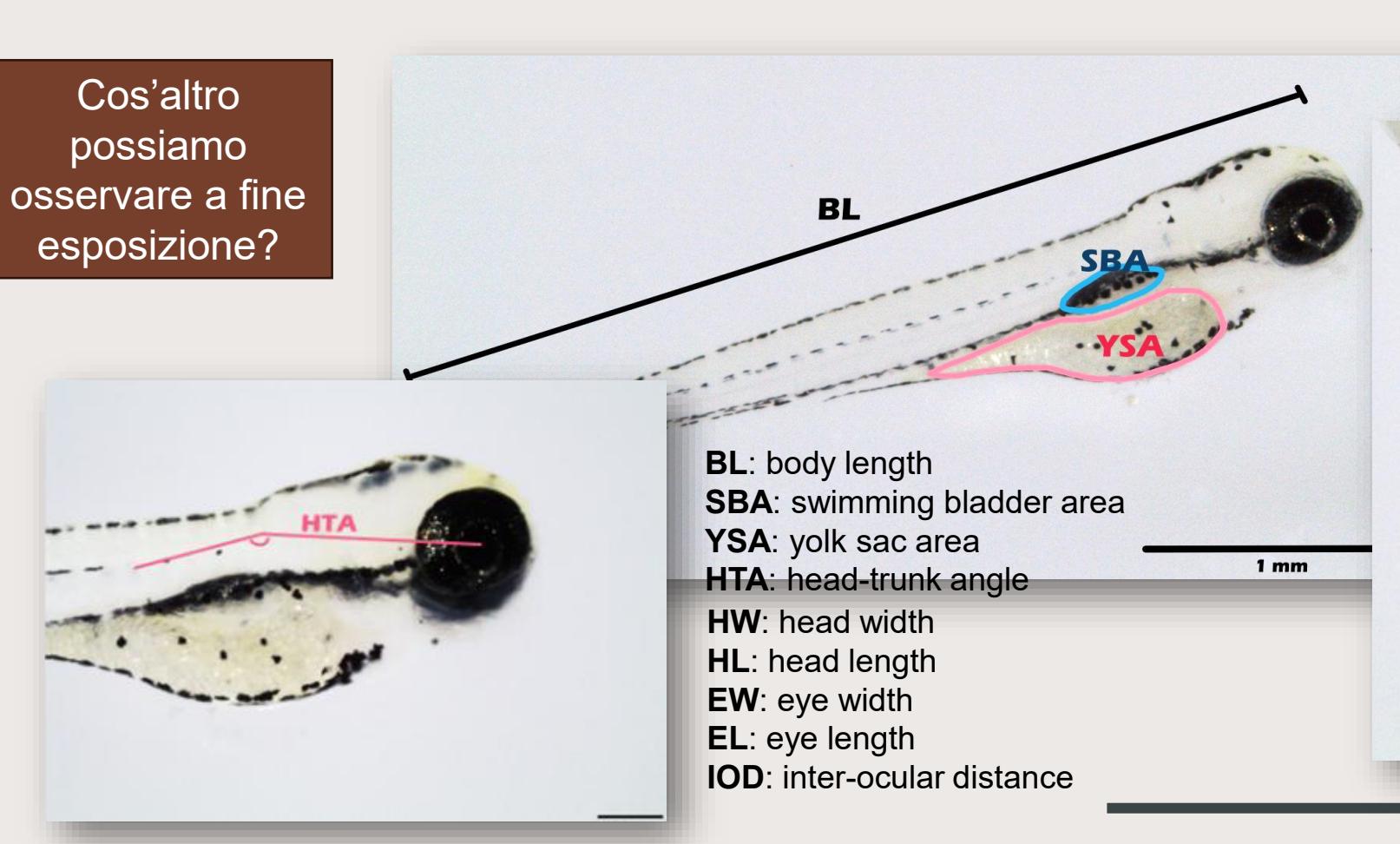
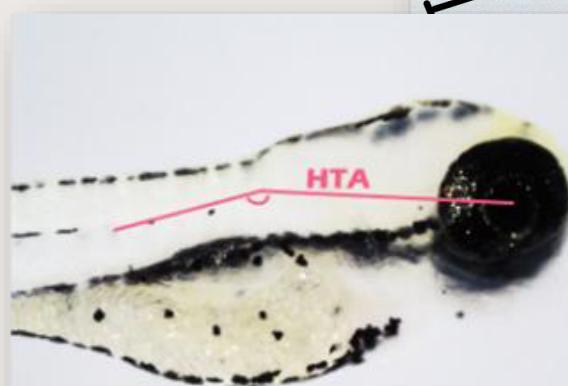
ALTERAZIONI LETALI



Coagulazione tardiva

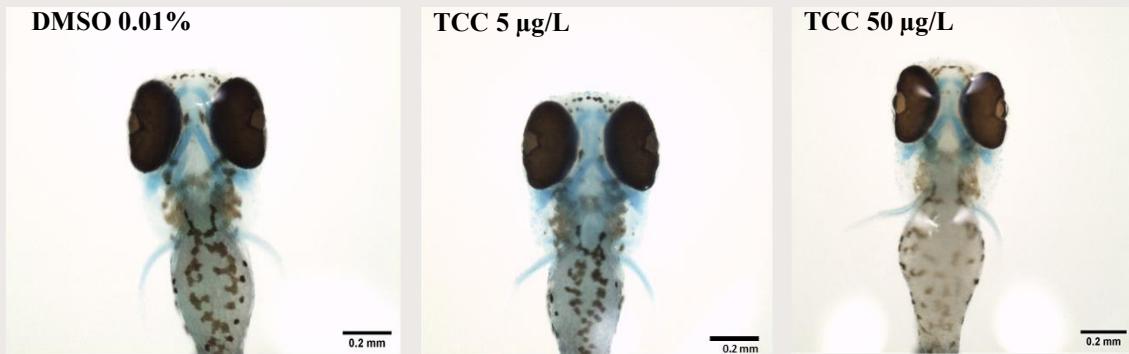
*(performed according to **OECD n. 236** (OECD, 2013):
exposure from 2 hpf to 96 hpf to 7 concentrations:
50 µg/L; 100 µg/L; 150 µg/L; 200 µg/L; 250 µg/L; 300 µg/L;
350 µg/L)

Cos'altro
possiamo
osservare a fine
esposizione?

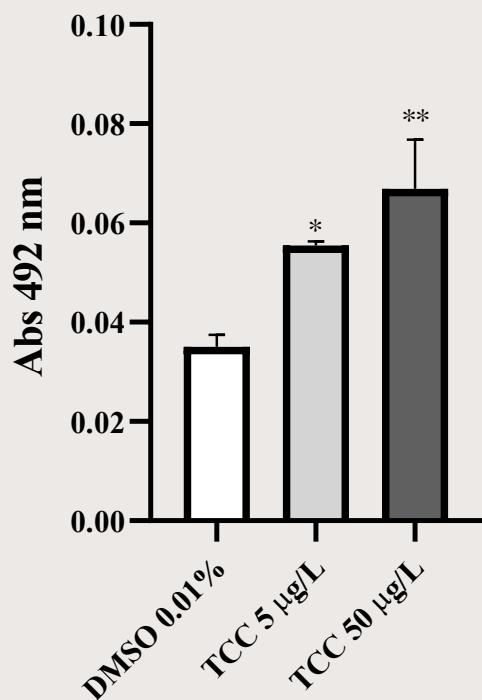
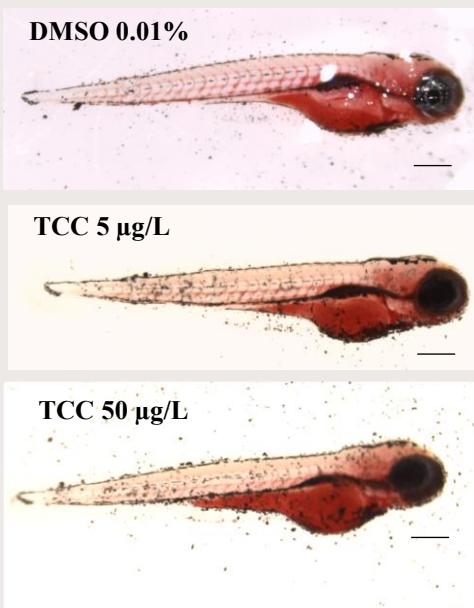


VALUTAZIONI DEL FENOTIPO:
Misure di parametri morfologici

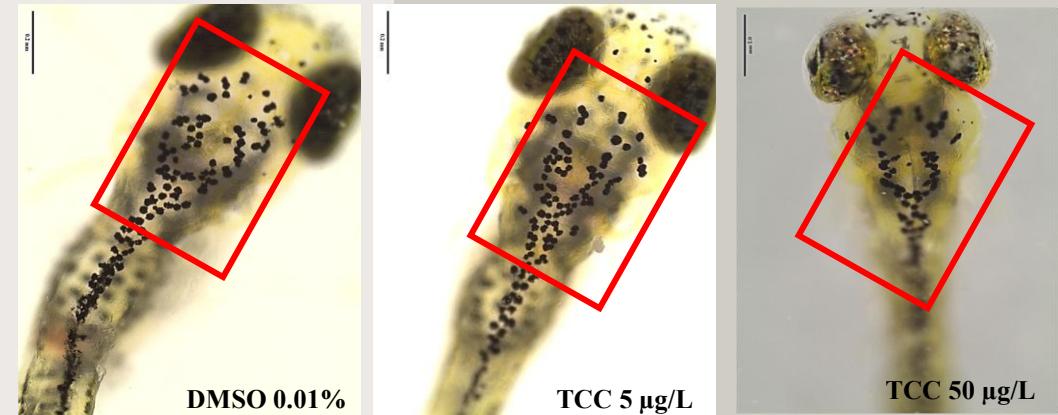
Alcian Blue Staining-cartilagini



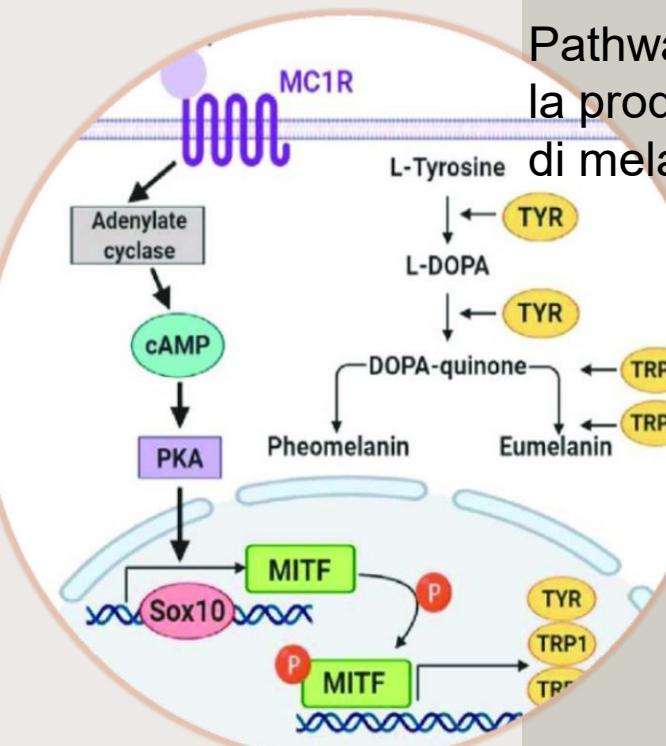
Oil Red O (ORO) staining and quantification of the yolk



Conteggio dei melanofori



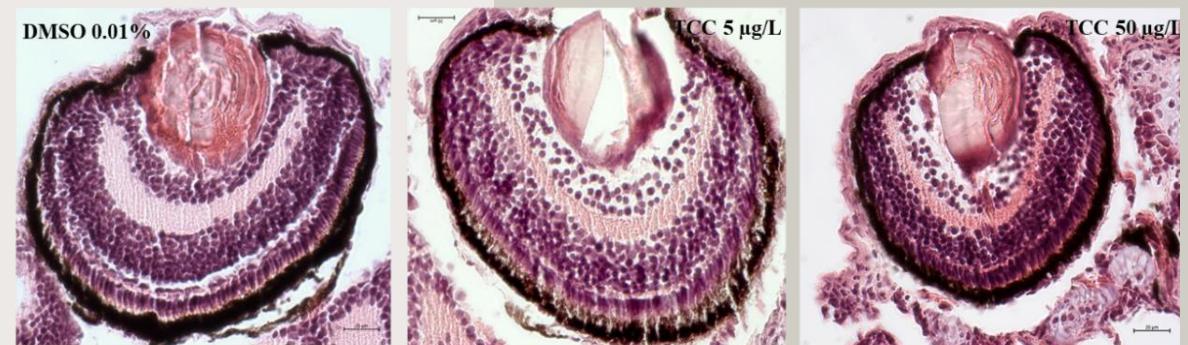
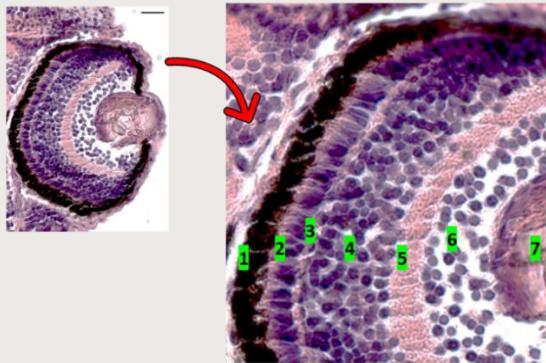
Pathway per la produzione di melanina



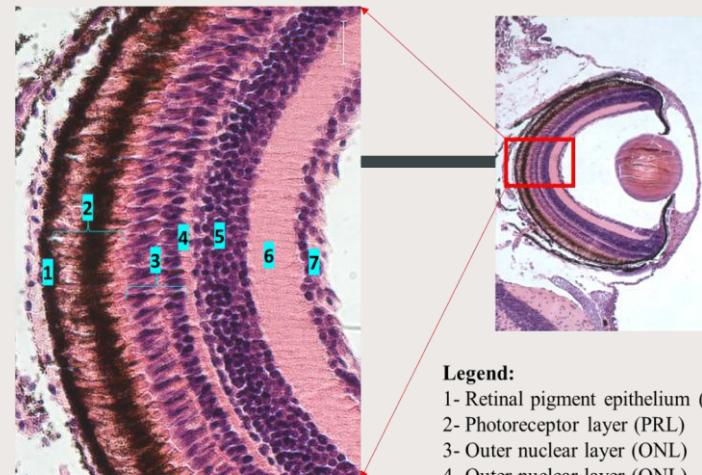
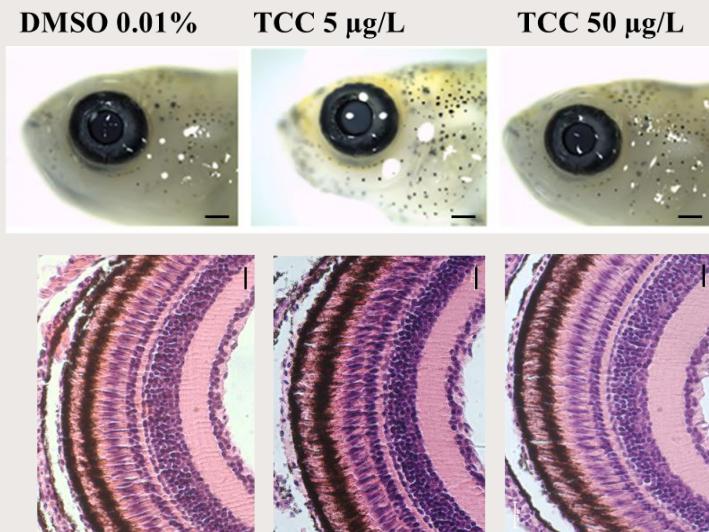
- Si possono valutare:
- Attività di enzimi (tirosinasi)
 - Espressione di geni coinvolti (qPCR)

Tecniche istologiche: colorazione Ematossilina/Eosina

Larva a fine esposizione



Esemplari a 20 giorni

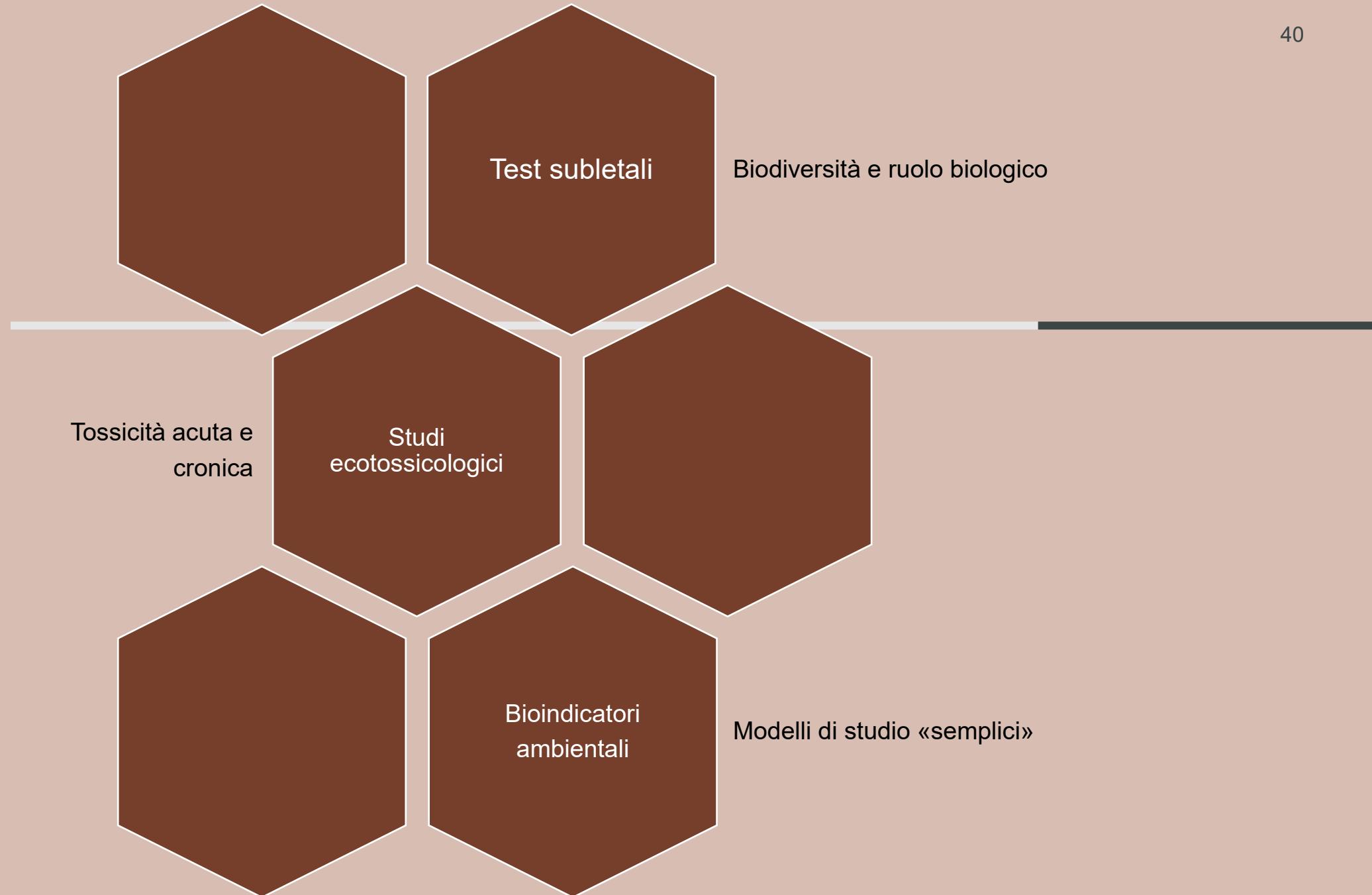


Legend:

- 1- Retinal pigment epithelium (RPE)
- 2- Photoreceptor layer (PRL)
- 3- Outer nuclear layer (ONL)
- 4- Outer nuclear layer (ONL)
- 5- Inner nuclear layer (INL)
- 6- Inner plexiform layer (IPL)
- 7- Retinal ganglion cell layer (RGL)

Spessore degli strati retinici
Test comportamentali associati

IL RUOLO DEGLI INVERTEBRATI NELLA TOSSICOLOGIA



Daphnia magna



- Il crostaceo cladocero planctonico *Daphnia magna* è uno degli invertebrati più utilizzati in ecotossicologia.
- Sono state adattate diverse linee guida nella forma di saggi acuti e cronici che vanno a valutare diversi endpoints come ad esempio il tasso di riproduzione (OECD guideline 211/2012, 21 giorni di esposizione semistatica) oppure il grado di immobilizzazione di giovani individui (<24 h) (OECD guideline 202/2004, 48 ore di esposizione)

Caenorhabditis elegans:

Un ponte tra i test *in vitro* e le valutazioni
In modelli *in vivo* di mammiferi



- Piccolo verme appartenente al phylum dei Nematodi, su cui si possono effettuare indagini di natura comportamentale, di identificazione biochimica dei suoi percorsi metabolici e ricerche sulla sua ereditarietà genetica. È riconosciuto, ad esempio, che alcune vie metaboliche di C. elegans, come la reazione allo stress ossidativo e l'attivazione di enzimi antiossidanti e/o depurativi, sono ampiamente preservati negli esseri umani. I valori di LD50 ottenuti in C. elegans mostrano correlazione con quelli raggiunti nei roditori, ciò lo qualifica come un affidabile modello di esperimento per anticipare la tossicità nei mammiferi in maniera complementare alle indagini *in vitro* e *in vivo* (Leung MCK et al., Toxicological Sci., 2008).

- Ampia omologia con i mammiferi a livello genetico.
- Molti percorsi metabolici e di segnalazione cellulare chiave sono conservati.
- Molti elementi della funzione neuronale sono conservati.
- Le caratteristiche alimentari conservate rendono *C. elegans* un buon modello di tossicità orale.
- A differenza delle colture cellulari e tissutali, *C. elegans* possiede sistemi neuronali, motori, digestivi e riproduttivi, segnalazione endocrina e risposte sensoriali/comportamentali agli stimoli.

-
- Piattaforma economica** permette di valutare simultaneamente più concentrazioni e tempi di esposizione.
 - Il breve ciclo di vita permette test su durata della vita a basso dosaggio e test su più generazioni in un paio di settimane anziché anni.
 - Tessuti trasparenti e piani corporei e neuronali completamente mappati permettono una rapida valutazione della morfologia e dell'espressione del transgene a livello di tessuto, cellulare e subcellulare.
 - Diversi tipi di schermi per la classificazione della tossicità hanno dimostrato una buona correlazione degli endpoint in *C. elegans* con gli LD50 nei ratti, con i dati su *C. elegans* e i dati sui topi che prevedono la classificazione della tossicità nei ratti altrettanto bene.