

Alternative alla sperimentazione animale nello studio e  
rilevazione delle biotossine marine

---

# *Utilizzo di metodi biologici alternativi alla sperimentazione animale*

Antonella Ciarelli/Mirella Luciani

Istituto Zooprofilattico Sperimentale Abruzzo e Molise "G. Caporale"

9 marzo 2009



# *The Principles of Human Experimental Technique* (Russel e Burch, 1959)

---

## Il modello delle 3 R

- Rimpiazzamento (Replacement)
- Riduzione (Reduction)
- Raffinamento (Refinement)

Strategia per ottenere il maggior beneficio possibile dalla sperimentazione, minimizzando la perdita di vite animali



## Direttiva del Consiglio 86/609/CEE

Art. 7.2: "Si eviterà di eseguire un esperimento qualora per ottenere il risultato ricercato sia ragionevolmente e praticamente applicabile un altro metodo, scientificamente valido, che non implichi l'impiego di animali"

Art. 23.1: "La Commissione e gli Stati Membri dovrebbero incoraggiare la ricerca intesa a sviluppare e rendere più efficaci tecniche alternative atte a fornire lo stesso livello d'informazione degli esperimenti su animali [...]"



# Decreto Legislativo 27 gennaio 1992, n. 116

## Attuazione della CEE 609/86

Art. 4.1: "Gli esperimenti [...] possono essere eseguiti soltanto quando, per ottenere il risultato cercato, non sia possibile impiegare un altro metodo scientificamente valido, ragionevolmente e praticamente applicabile, che non implichi l'uso degli animali"

Art. 17.1: "Nella programmazione dei piani di ricerca scientifica applicata alla sanità umana e animale ed alla salubrità dell'ambiente, saranno preferiti, ove possibile:

a) quelli che non si avvalgono di sperimentazione animale [...]"



## Normativa italiana di riferimento

---

### Applicazioni DL n.116

Circ. n.32 (26 agosto 1992)

Circ. n.17 (5 maggio 1993)

Circ. n.18 (5 maggio 1993)

Circ. n.8 (22 aprile 1994)

Circ. n.6 (14 maggio 2001)

**DM 29 settembre 1995:** Riconoscimento titoli di laurea idonei ai fini della sperimentazione animale

**Legge n.413/1993:** Norme sull'obiezione di coscienza alla sperimentazione animale



## Raccomandazione CEE 18 giugno 2007

---

Linee guida per la sistemazione e tutela degli animali da esperimento

Parte generale: sistemazione, alloggio e tutela degli animali

Parti specifiche: informazioni sulle specie più comunemente usate



## Proposta di Direttiva CE (Novembre 2008)

---

Sostiene la strategia globale della Commissione sulla sperimentazione animale

Finalizzata ad assicurare maggiore promozione dello sviluppo di metodi alternativi



## Quali sono i metodi alternativi?

---



Qualunque procedura che sostituisca l'uso degli animali, ne riduca il numero e/o ne ottimizzi il benessere



## Metodi biologici

---

Colture di procarioti, cellule, tessuti e organi isolati

**Vantaggi:** studio di funzioni altamente differenziate, meccanismi cellulari e molecolari

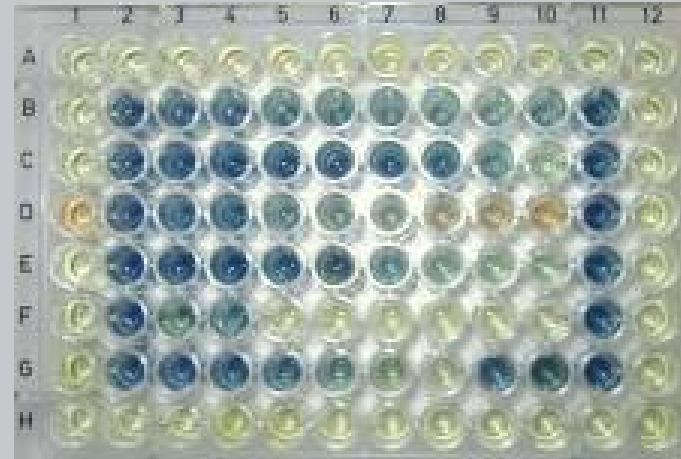
**Svantaggi:** utilizzo di un sistema semplificato, estrapolazione dei dati *ex vitro* *in vivo*



## Metodi biologici



**Microtox:** valuta il decremento di luminescenza

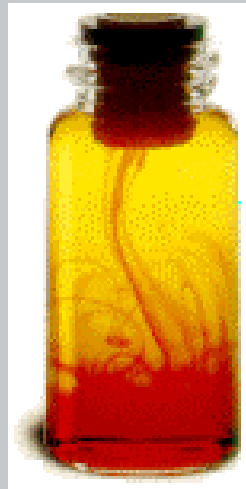


**MTT test:** valuta la diminuzione di vitalità cellulare



## Metodi chimici

---

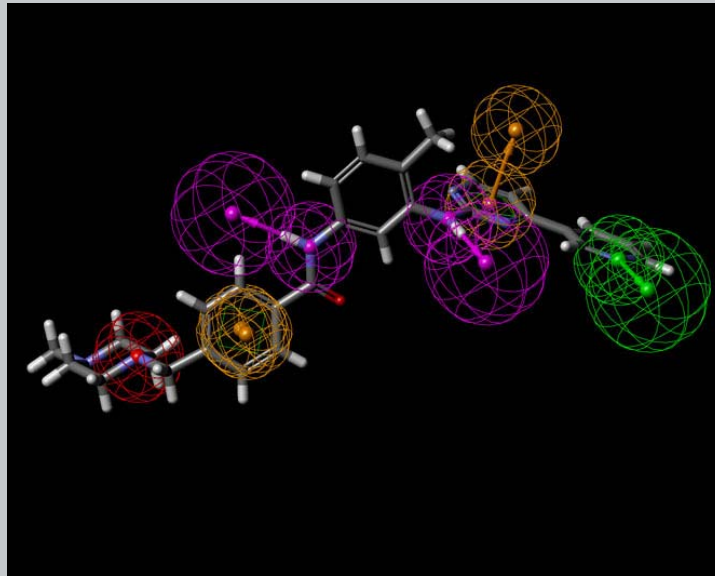


**Corrositex:** valuta l'effetto irritante o corrosivo su un modello artificiale di pelle umana



# Metodi matematico-informatici

---



*QSAR (Quantitative Structure Activity Relationship):*  
 collega la tossicità con la struttura molecolare



# Ricerca corrente 2006 IZS AM 09/06



## OBIETTIVO:

applicazione di un modello tossicologico *in vitro* che studi gli effetti delle yessotossine (YTXs) su linee cellulari confrontando l'efficienza della nuova metodica diagnostica con il MBA

Progetto presentato da: IZS AM

Area tematica: Benessere animale

Responsabile Scientifico: Prof. G.P. Rossini



## Procedura di Dosaggio funzionale delle YTXs

---

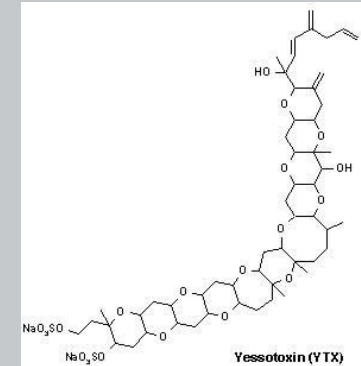
- ✓ Principio del metodo: capacità delle YTXs di indurre una risposta dose-dipendente su colture cellulari
- ✓ Procedura Operativa Standard 27 Giugno 2007  
(Dipartimento di Scienze Biomediche, Università di Modena e Reggio Emilia)
- ✓ Patent application No PCT/EP01/07487



# YESSOTOSSINE (YTXs)

Polieteri solforati, capaci di causare la morte dei topi da esperimento se iniettate i.p.

## MECCANISMI D'AZIONE

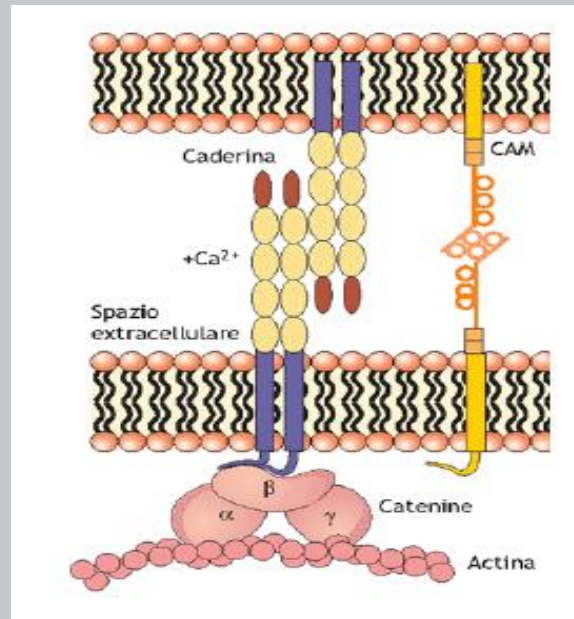


- ✓ Citotossicità (apoptosi)
- ✓ Interazione canali  $Ca^{2+}$  (movimento transmembrana  $Ca^{2+}$ )
- ✓ [cAMP] intracellulare (attivazione Fosfodiesterasi)
- ✓ Adesione cellulare (accumulo frammento E-caderina)



## YTXs: meccanismi d'azione

- ✓ E-caderina: glicoproteina trans-membrana che media l'adesione cellulare in presenza di  $\text{Ca}^{2+}$



## YTXs: meccanismi d'azione

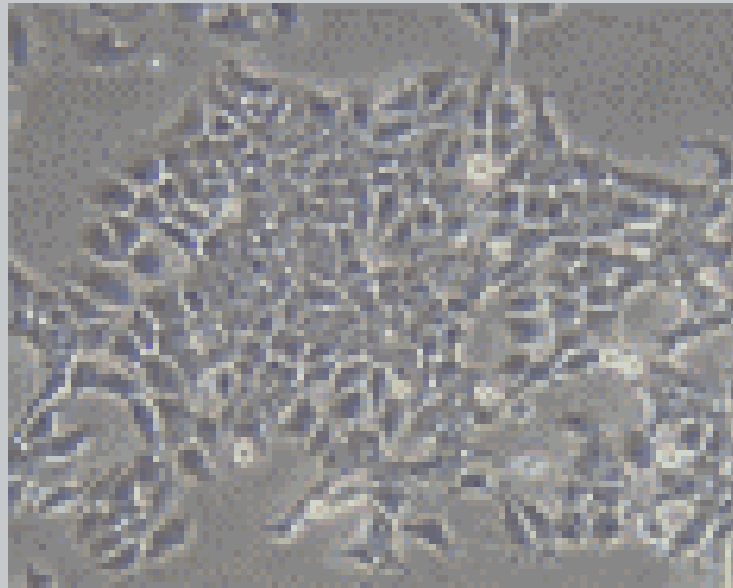
---

- ✓ YTXs causano l'accumulo citoplasmatico del frammento  $ECRA_{100}$  (E-cadherine-related antigen)
- ✓ Eterodimeri E-caderina/ $ECRA_{100}$  sono privi di proprietà adesive



## Dosaggio funzionale YTXs

- ✓ Allestimento colture MCF-7  
(human caucasian breast adenocarcinoma)



## Dosaggio funzionale YTXs

---

- ✓ Aggiunta di soluzioni standard di YTXs (CRM-YTX calibration solution)
- ✓ Aggiunta degli estratti di *Mytilus galloprovincialis* (5.b)
- ✓ Incubazione delle cellule per 20 ore a 37°C



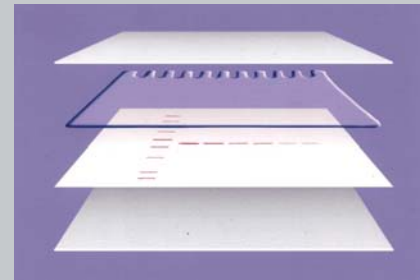
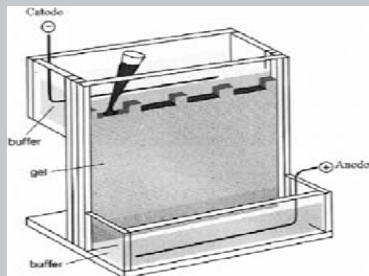
## Dosaggio funzionale YTXs

- ✓ Preparazione degli estratti cellulari mediante lisi con detergenti



## Dosaggio funzionale YTXs

- ✓ Separazione elettroforetica degli estratti in SDS-PAGE
- ✓ Trasferimento su membrana di nitrocellulosa



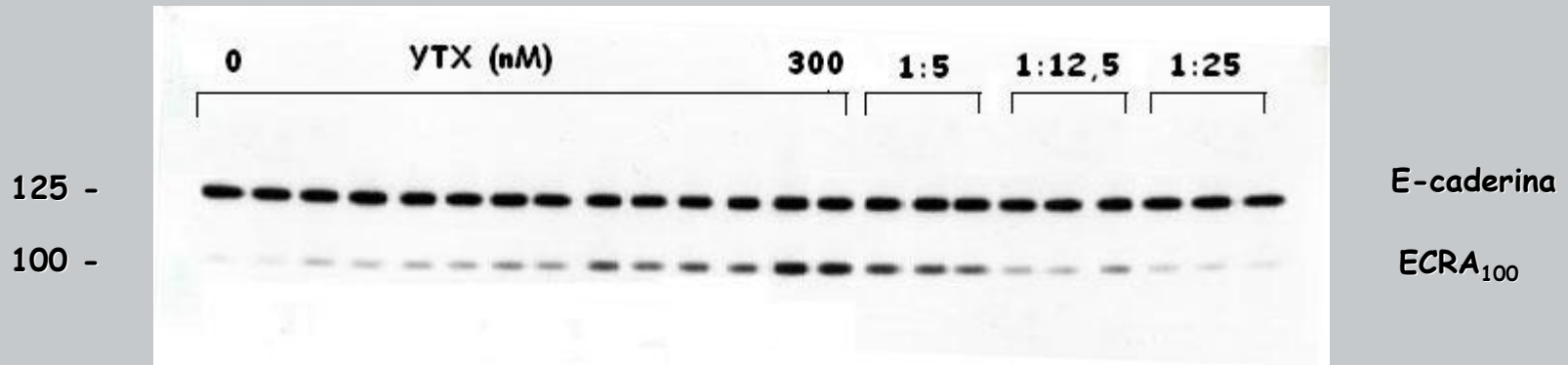
## Dosaggio funzionale YTXs

---

- ✓ Saturazione membrana
- ✓ Incubazione con MoAb anti E-caderina
- ✓ Incubazione con Ab II HRP-coniugato
- ✓ Rivelazione immunoenzimatica in chemiluminescenza
- ✓ Analisi densitometrica degli elettroferogrammi



## Dosaggio funzionale YTXs



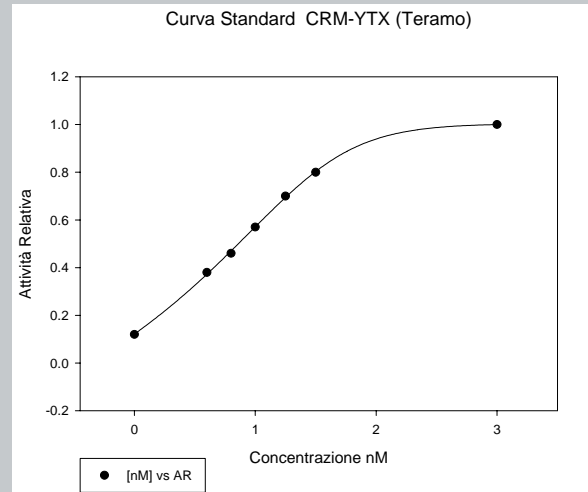
- ✓ Determinazione Immunoreattività totale (AU) e relativa (IR)
- ✓ Calcolo dell'Attività Relativa (AR)

$$AR = IR_{ECRA_{100}} / IR_{ECRA_{100}^{MAX}}$$



# Dosaggio funzionale YTXs

- ✓ Elaborazione dati con SigmaPlot 11 e creazione di una curva standard



*Sigmoide a 5 parametri*

- ✓ Dall'interpolazione dei valori di AR dei campioni incogniti si ottiene il valore di  $mg_{eq} YTX/kg$  p.e.

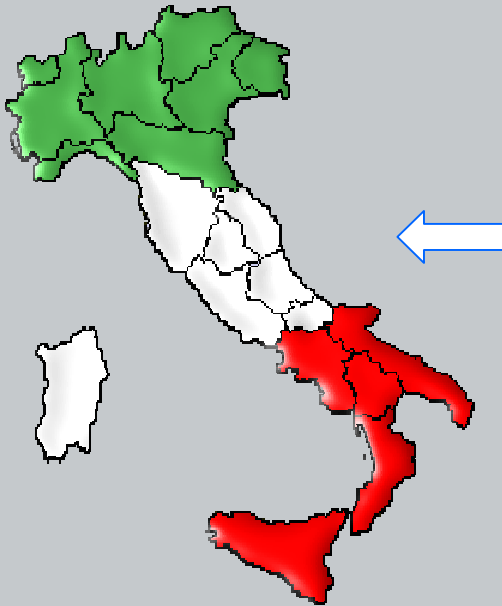




esp#	diluizione	AU E-cad	AU E100	AU S	IR E100	IR E100 medi	IR E100 max	AR	AR medi	nME	ngeq YTX pz.
1A		1793,75323	0	1793,75	0,00	0,70	41,57	0,00	0,02		
1B		1960,52743	27,7417	1988,27	1,40		41,57	0,03			
2A	60 nM	1965,11736	231,245	2196,36	10,53	9,54	41,57	0,25	0,23		
2B	60 nM	2099,97973	196,3089	2296,29	8,55		41,57	0,21			
3A	80 nM	1792,52845	314,4619	2106,99	14,92	13,43	41,57	0,36	0,32		
3B	80 nM	1866,3691	253,0342	2119,40	11,94		41,57	0,29			
4A	100 nM	1786,44828	534,1135	2320,56	23,02	22,37	41,57	0,55	0,54		
4B	100 nM	1640,71017	455,1152	2095,83	21,72		41,57	0,52			
5A	125 nM	1838,1948	718,8629	2557,06	28,11	30,14	41,57	0,68	0,73		
5B	125 nM	1692,43103	802,8091	2495,24	32,17		41,57	0,77			
6A	150 nM	1599,09263	775,244	2374,34	32,65	33,52	41,57	0,79	0,81		
6B	150 nM	1638,39326	858,7201	2497,11	34,39		41,57	0,83			
7A	300 nM	1598,60226	1107,64	2706,24	40,93	41,57	41,57	0,98	1,00		
7B	300 nM	1604,14971	1171,302	2775,45	42,20		41,57	1,02			
8A	25	1568,17633	81,3944	1649,57	4,93	4,37	41,57	0,12	X1	X1	#VALORE!
8B	25	1799,7263	82,52462	1882,25	4,38		41,57	0,11			
8C	25	1679,10629	66,2175	1745,32	3,79		41,57	0,09			
9A	12,5	1662,2965	282,905	1945,20	14,54	13,85	41,57	0,35	X2	X2	#VALORE!
9B	12,5	1914,42625	271,8495	2186,28	12,43		41,57	0,30			
9C	12,5	1800,56823	306,8097	2107,38	14,56		41,57	0,35			
10A	5	2020,83672	1019,359	3040,20	33,53	33,44	41,57	0,81	X3	X3	#VALORE!
10B	5	2071,11701	1015,3	3086,42	32,90		41,57	0,79			
10C	5	2089,48088	1070,874	3160,36	33,88		41,57	0,82			

## La nostra esperienza

---



Esaminati 2 gruppi di campioni  
*Mytilus galloprovincialis*

3 negativi MBA

4 positivi MBA



## La nostra esperienza

NRG IZSAM	MBA test	Test in vitro (mg <sub>ec</sub> /kg p.e.)
715	negativo	0,550
724	negativo	0,454
757	negativo	0,900

Campioni della costa abruzzese-molisana



## La nostra esperienza

NRG IZSAM	MBA test	Test <i>in vitro</i> (mg <sub>eq</sub> /kg p.e.)	LC-MS/MS (mg <sub>eq</sub> /kg p.e.)
798	positivo	1,300	1,440
799	positivo	1,630	1,802
809	positivo	1,485	1,970
810	positivo	1,632	1,222

Campioni della costa romagnola



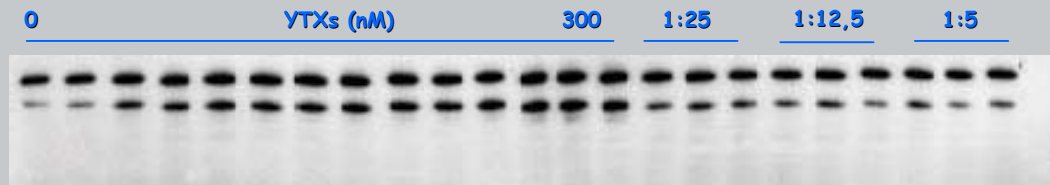
## Su due campioni positivi...

---

- ✓ Utilizzo di Precast Gels Midi per elettroforesi
- ✓ Western Blotting mediante iBlot™ Dry Blotting System
- ✓ Maggior diluizione MoAb anti E-caderina



## Risultati



- ✓ Tempo di esecuzione Western Blotting 3 ore
- ✓ Riduzione del quantitativo di MoAb anti E-caderina (1/64)



## Risultati

NRG IZSAM	LC-MS/MS	Test in vitro (mg <sub>eq</sub> /kg p.e.)	Midi System (mg <sub>eq</sub> /kg p.e.)
798	1,440	1,300	1,582
809	1,970	1,485	1,670

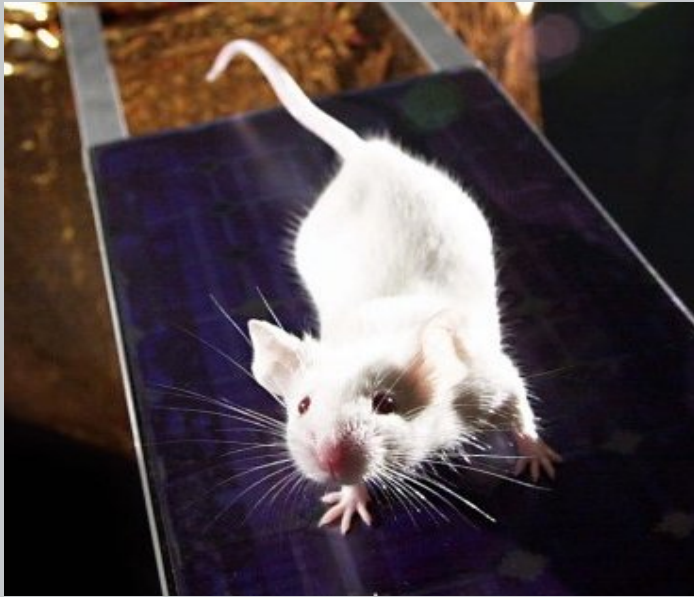
I differenti test forniscono risultati confrontabili



## Bibliografia

- ✓ Callegari F., Rossini G.P. Yessotoxin inhibit the complete degradation of E-cadherin. 2008. *Toxicology*, 244:133-144.
- ✓ Hess P., Grune B., Anderson D. B., Aune T., Botana L. M., Caricato P., van Egmond H.P., Halder M., Hall S., Lawrence J.F., Moffat C., Poletti R., Richmond J., Rossini G.P., Seamer C., Vilageliu J.S. Three Rs Approaches in Marine Biotoxin Testing. The Report and Recommendation of a joint ECVAM/DG SANCO Workshop (ECVAM Workshop 55). 2006. *ATLA*, 34:193-224.
- ✓ Panzini G., Lorenzini R.N. Animali experimentation in Italy. Legislation and the authorization of research protocols. 2004. *Ann Ist Super Sanità*, 40:205-210.
- ✓ Pierotti S., Malaguti C., Milandri A., Poletti R., Rossini G.P. Functional assay to measure Yessotoxins in contaminated mussel samples. 2003. *Anal. Bioch.*, 312:208-216.
- ✓ Ronzitti G., Rossini G.P. Yessotoxin induces the accumulation of altered E-cadherin dimers that are not part of adhesive structures in intact cells. 2008. *Toxicology*, 244:145-156.





*Io speriamo che me la  
cavo!!!*

*Se qualcuno sostenesse che, non diversamente che i frutti della terra, il dio ci ha dato anche gli animali per il nostro uso, è comunque vero che, sacrificando esseri viventi, si commette contro di loro un'ingiustizia, perché si fa rapina della loro vita....*

**Teofrasto, *Metafisica***

