

# Metodi alternativi *in vitro*: utilizzo della linea cellulare stabilizzata di pesce RTG-2 (Rainbow Trout Gonad)

*Daniela Conti*



ISPRA

Istituto Superiore per la Protezione  
e la Ricerca Ambientale

# Regolamento REACH

- **Art. 1**

Il regolamento REACH “ha lo scopo di assicurare un elevato livello di protezione della salute umana e dell’ambiente inclusa la promozione di metodi alternativi per la valutazione dei pericoli che le sostanze comportano”

- **Art. 13**

Le informazioni relative alle proprietà delle sostanze “sono acquisite , ove possibile, ricorrendo a mezzi diversi dai test su animali vertebrati attraverso l’uso di metodi alternativi, ad esempio metodi in vitro o modelli di relazioni qualitative o quantitative struttura-attività”

- **Art. 25**

“Per evitare sperimentazioni su animali, sono effettuati esperimenti su animali vertebrati ai fini del presente regolamento soltanto in caso di assoluta necessità. E’ inoltre necessario adottare disposizioni per limitare le ripetizioni inutili di altri test”



# Regolamento REACH

All. da VII a X (da 1 a 1000 tonnellate)

Prima di realizzare nuovi test per determinare le proprietà elencate nei diversi allegati:

“si procede alla valutazione di tutti i dati disponibili: dati in vitro, dati in vivo, dati storici sull'uomo, dati ottenuti mediante (Q)SAR validi e quelli relativi a sostanze strutturalmente affini (read-across).”

# Regolamento REACH: metodi in vitro

## All. XI par. 1.4

I risultati ottenuti con idonei metodi in vitro possono indicare la presenza di una certa proprietà pericolosa o possono essere importanti per capire il meccanismo d'azione che può essere rilevante per la valutazione.

**Idonei** significa: "elaborati sufficientemente bene secondo criteri per lo sviluppo di test riconosciuti a livello internazionale (ad es. i criteri dell'ECVAM) per l'immissione di una prova nel processo di preconvalida".

# Regolamento REACH: metodi in vitro

Se i risultati ottenuti utilizzando tali metodi in vitro non rivelano una certa proprietà pericolosa, è necessario effettuare la prova in vivo per confermare il risultato negativo, salvo che:

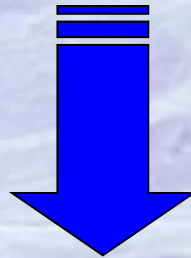
- “1. i risultati sono derivati da un metodo in vitro la cui validità scientifica è stata stabilita da uno studio di convalida, secondo principi riconosciuti a livello internazionale;
2. i risultati sono idonei ai fini della classificazione e dell’etichettatura e/o della valutazione dei rischi; e
3. è fornita una documentazione adeguata e attendibile del metodo applicato”.



# Implementazione delle 3R alternatives

**REDUCE, REFINE, REPLACEMENT**

(Russell and Burch, 1959)



**RELIABLE, RELEVANT, READY-TO-USE, ROBUST**

(Weighardt, 2009)

| Regolamento REACH                                 | SAGGI CON SPECIE ITTICHE   | Linea guida OCSE |
|---|--|------------------|
| <u>Allegato VIII</u><br>≥ 10 ton/anno             | <ul style="list-style-type: none"> <li>● Saggio di tossicità a breve termine</li> </ul>  | GL n. 203: 1992. |
| <u>Allegato IX</u><br>≥ 100 ton/anno              | <ul style="list-style-type: none"> <li>● Saggio di tossicità a lungo termine con pesci adulti</li> </ul>                               | GL n. 204: 1984  |
|   | <ul style="list-style-type: none"> <li>● Saggio di tossicità con pesci nelle prime fasi di vita</li> </ul>                             | GL n. 210: 1992  |
|   | <ul style="list-style-type: none"> <li>● Saggio di tossicità a breve termine con pesci nelle fasi embrionali e di avannotto</li> </ul> | GL n. 212: 1998  |
|   | <ul style="list-style-type: none"> <li>● Saggio di tossicità a breve termine con pesci nelle fasi embrionali e di avannotto</li> </ul> | GL n. 215: 2000  |
| <u>Allegato X</u><br>Identificazione di PBT -vPvT | <ul style="list-style-type: none"> <li>● Saggio di bioaccumulo</li> </ul>  | GL n. 305: 1996  |

# SAGGIO DI TOSSICITA' A BREVE TERMINE

- Il saggio maggiormente effettuato è quello di tossicità a breve termine che, sulla base del metodo OCSE n° 203, richiede, per la valutazione di un solo composto chimico, il sacrificio di **126-180 pesci\***.

\* Saggio eseguito in 3 repliche, almeno 5 concentrazioni del campione di prova, 7-10 pesci/concentrazione + il controllo



# SISTEMI ALTERNATIVI IN VITRO

- Embrioni di *Brachidanio rerio* (Zebrafish embryos test)

## ■ Colture di cellule di pesce (o di mammifero)

COLTURE PRIMARIE

LINEE CELLULARI CONTINUE

## LINEE CELLULARI CONTINUE DI PESCE

- Esistono più di 150 linee cellulari continue di pesce (Castaño et al., 2003).
- La maggior parte sono di tipo fibroblastico o epiteliale → crescono aderenti al substrato
- Hanno avuto origine da tessuti di salmonidi e ciprinidi

# Linee cellulari continue di pesce: alcuni vantaggi tecnici

- Possono essere incubate a temperatura ambiente ( $20\pm 2$  °C) e in atmosfera normale
- Alcune di loro possono essere conservate per lunghi periodi (fino a 2 anni) a 4°C
- Possono essere esposte a matrici liquide di differente osmolarità
- Possono essere acquistate presso Enti certificati che ne garantiscono rigorosi controlli di qualità (caratteristiche morfologiche e genotipiche) e l'assenza da contaminazioni



## Confronto vivo-vitro

- Uso di saggi di citotossicità basale (NRU, MTT, AB assay) con cellule di pesce per la valutazione di pericolosità dei composti chimici in sostituzione del saggio acuto in vivo con pesci.

La sensibilità delle linee cellulari di pesce nel valutare la tossicità delle sostanze chimiche è stata studiata analizzando la correlazione tra i valori di  $EC_{50}$  in vitro (ottenuti con diversi saggi di citotossicità basale) e i valori di  $LC_{50}$  in vivo (ottenuti nel saggio acuto con pesci).

## ALCUNI ESEMPI (Schirmer, 2006)

| Linea cell. vs specie ittica        | Endpoint misurato in vitro | r    | Precisione                                |
|-------------------------------------|----------------------------|------|---|
| RTG-2 vs <i>Oncorhynchus mykiss</i> | Distacco cellulare         | 0,98 | meno sensibile di 1-2 ordini di grandezza |
| RTG-2 vs <i>Oncorhynchus mykiss</i> | Metabolismo energetico     | 0,97 | meno sensibile di 1-2 ordini di grandezza |
| RTG-2 vs <i>Danio rerio</i>         | Vitalità cellulare         | 0,95 | meno sensibile di 1ordine di grandezza    |
| RTG-2 vs <i>Danio rerio</i>         | Incorporazione di RN       | 0,99 | meno sensibile di 1ordine di grandezza    |

**r: Il coefficiente di correlazione è ottenuto dalla comparazione tra i valori di EC<sub>50</sub> in vitro con i valori di LC<sub>50</sub> in vivo. r≥0,80: forte correlazione**

**La precisione è data dalla distanza dalla linea di correlazione**

## Confronto vivo-vitro

- Sebbene la maggior parte degli studi effettuati mostri una comparabilità tra i saggi in vitro con linee cellulari di pesce e il test acuto in vivo con pesci, tuttavia in termini assoluti, i valori di  $EC_{50}$  in vitro sono, in media, più elevati di 1-2 ordini di grandezza dei corrispondenti valori di  $LC_{50}$  in vivo (Fent, 2001; Kramer, 2009).

Il problema della minore sensibilità è una peculiarità di tutti i sistemi in vitro in quanto tali. La sensibilità delle linee cellulari continue di pesce è confrontabile con quella delle cellule umane e di mammifero (Clemedson et al., 1998a, 1998b).



# Modalità per aumentare la sensibilità dei saggi di citotossicità con cellule di pesce

- Sostituzione/riduzione della percentuale di siero fetale addizionato al terreno di crescita
- Valutazione della concentrazione effettiva di composto chimico che viene a contatto con le cellule
- Selezione di endpoint citotossici appropriati e utilizzo di batterie di saggi di citotossicità
- Uso combinato di diverse linee cellulari di pesce che rappresentino i vari siti bersaglio (fegato, gonadi, branchie, cervello) dell'animale

# Progetto ISPRA

## Servizio di Metrologia Ambientale

- REACH: promozione di metodi alternativi
- Adempimenti del DM 22 novembre 2007

### Progetto triennale 2010-2012

Applicazione e armonizzazione di metodi in vitro per valutazioni ecotossicologiche delle sostanze chimiche ai fini del Regolamento REACH: utilizzo della linea cellulare stabilizzata di pesce RTG-2 (Rainbow Trout Gonad)

## Partecipanti ARPA

- ARPA VENETO Stefano Comin –  
Manuela Benzoni
- ARPA CAMPANIA Marialuisa Gallo
- ARPA SICILIA Gisella Marino
- ARPA MARCHE Tristano Leoni
- ARPA Toscana Gioia Benedettini –  
Francesco Vigna Guidi



# SCOPO DEL PROGETTO

- Diffusione presso i laboratori ARPA/APPA dei saggi di citotossicità basale con linee cellulari stabilizzate di pesce, in alternativa al saggio di tossicità a breve termine con pesci.

# FASI DEL PROGETTO

Acquisizioni preliminari

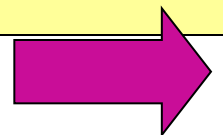
Prove sperimentali con la linea cellulare RTG-2 presso lab ISPRA:

- curve di crescita e conservazione della linea a 4°C

Invio cellule e materiali ai lab. ARPA partecipanti:

- curve di crescita presso lab ARPA
- Elaborazione risultati (valutazione della ripetibilità e della riproducibilità del PDT) e stesura del protocollo di mantenimento della linea cellulare

Sperimentazione I



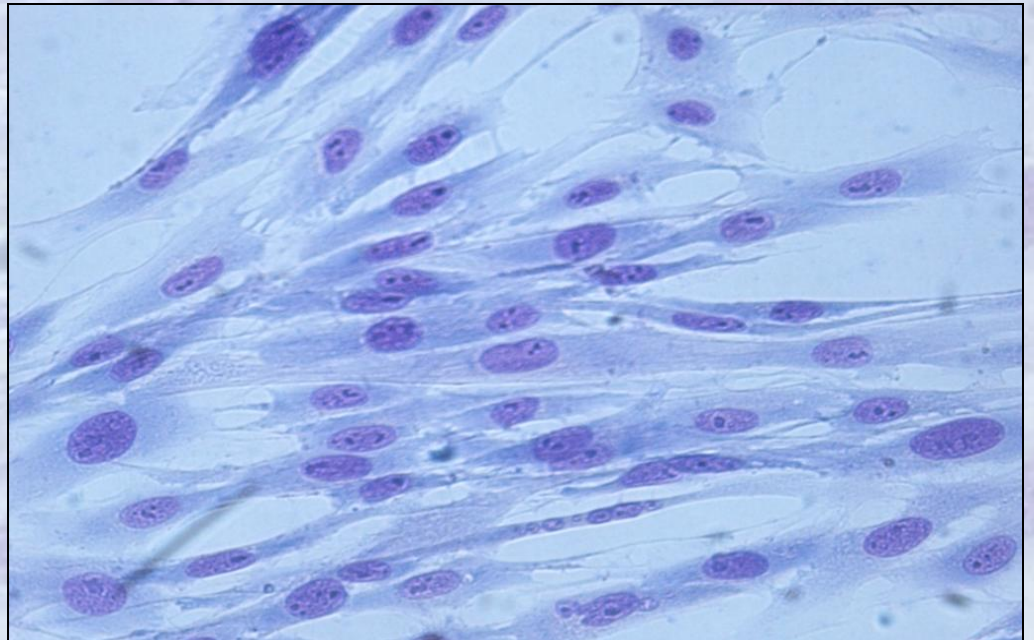
## Sperimentazione II

- Messa a punto ed esecuzione sperimentale dei saggi di citotossicità basale: NRU, MTT e AB
  - Scelta dei composti tossici di riferimento per l'esecuzione dei saggi di citotossicità basale
  - Elaborazione dei risultati, scelta del saggio più idoneo (in base a criteri di sensibilità, ripetibilità ed economicità e fattibilità) e stesura del protocollo preliminare
  - Esecuzione del saggio di citotossicità prescelto presso i lab ARPA/APPA partecipanti, sulla base del protocollo preliminare
  - Valutazione della sperimentazione e stesura del protocollo definitivo
  - Richiesta certificazione in BPL per il saggio prescelto
- ## IC
- Diffusione delle metodiche *in vitro* con cellule di pesce al sistema delle agenzie.
  - Circuito d'interconfronto (CI) con il saggio di citotossicità prescelto



## La linea cellulare RTG-2

- Sviluppata originariamente dalle gonadi di *Oncorhynchus mykiss* (Trota arcobaleno) allo stadio giovanile per studi di virologia ittica (Wolf and Quimby, 1962)
- Cellule di tipo fibroblastico che crescono come monostrato adeso ad un substrato costituito dalle plastiche (PS) utilizzate per le fiasche da colture cellulari (nn trattate)



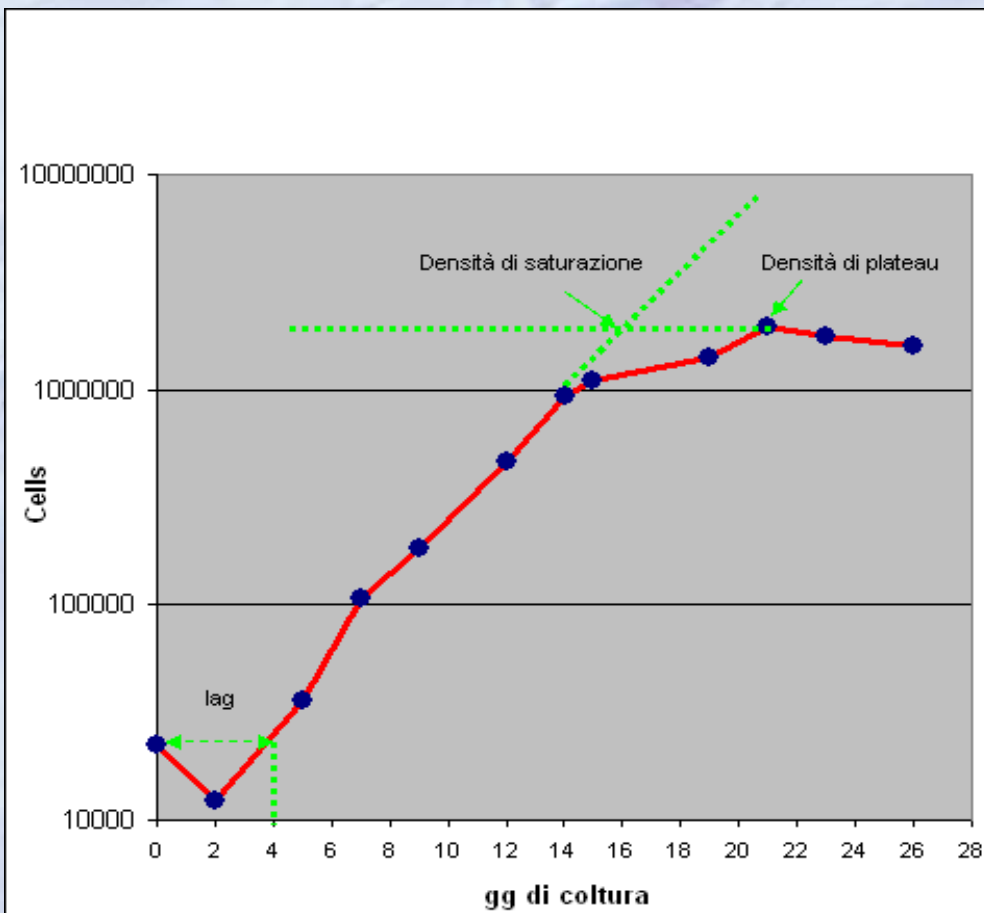
**Monostrato di cellule RTG-2 in coltura (ingrandimento 40X)**

# Perché la linea cellulare RTG-2?

- Cresce anche in atmosfera normale (non è necessario l'incubatore a CO<sub>2</sub>) alla temperatura ottimale di 20 ± 2 °C
- Sopporta ampie variazioni di temperatura (4 - 26 °C) e cresce con diverse formulazioni di terreno in funzione delle modalità d'incubazione delle cellule
- Può essere conservata a 4°C (il congelamento in azoto liquido non è strettamente necessario)

# STUDIO DELLE CONDIZIONI DI CRESCITA

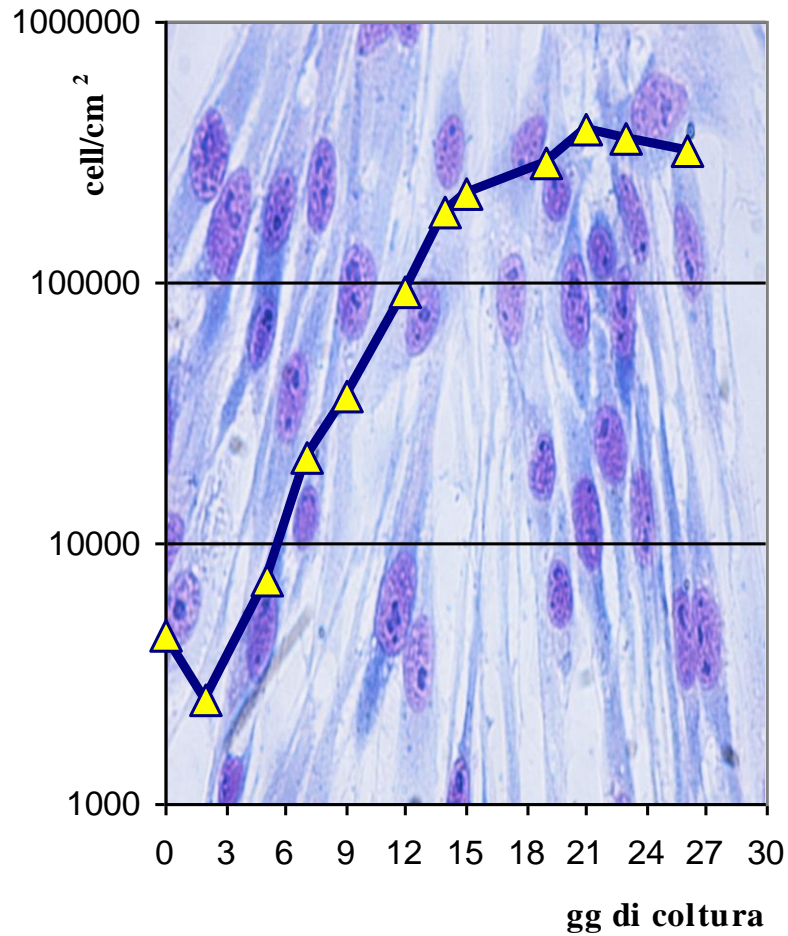
- Terreno e siero, durata fase lag, PDT



CURVE DI CRESCITA



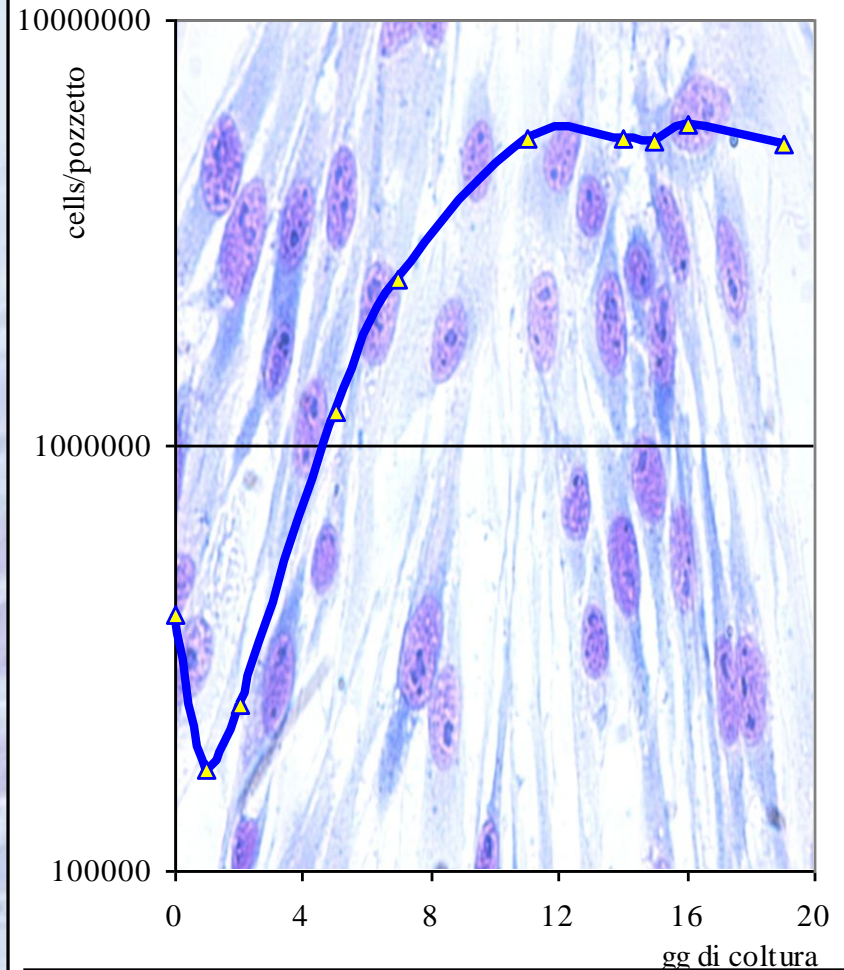
## FIASCHE 25 cm<sup>2</sup>



E-MEM (Earle) + FBS 10% + Neomicina solfato 5g/L → Fase lag: 3,5 gg

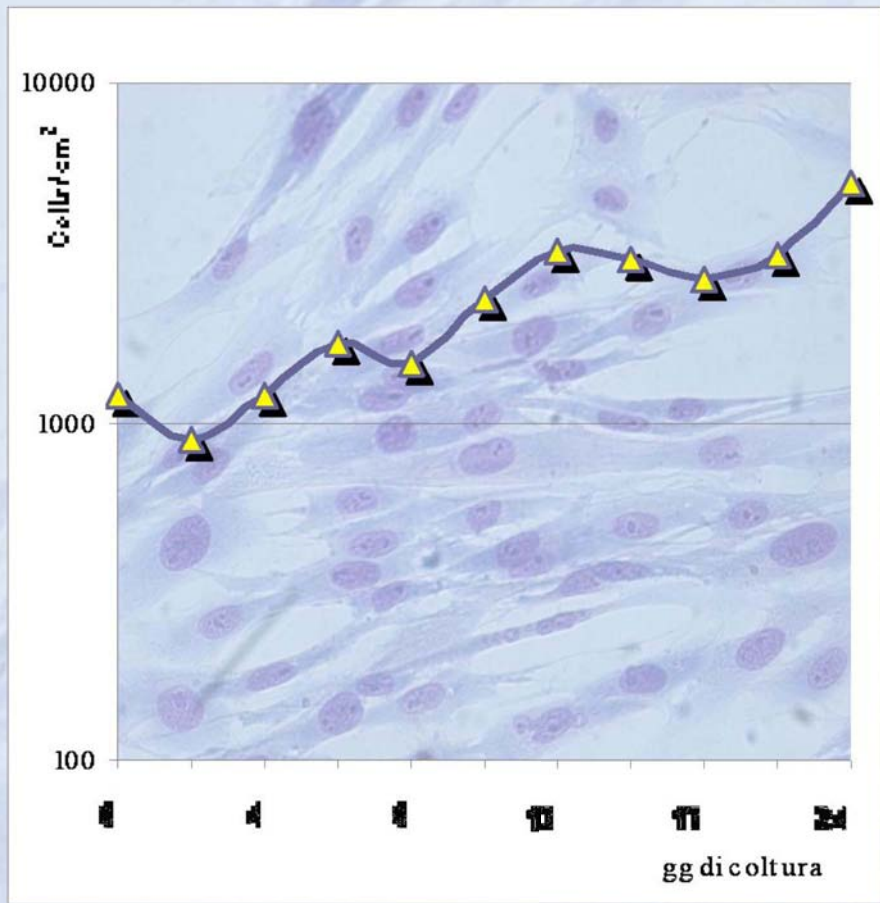
PDT: 2,1 gg

## PIASTRE MULTIPOZZETTO 24

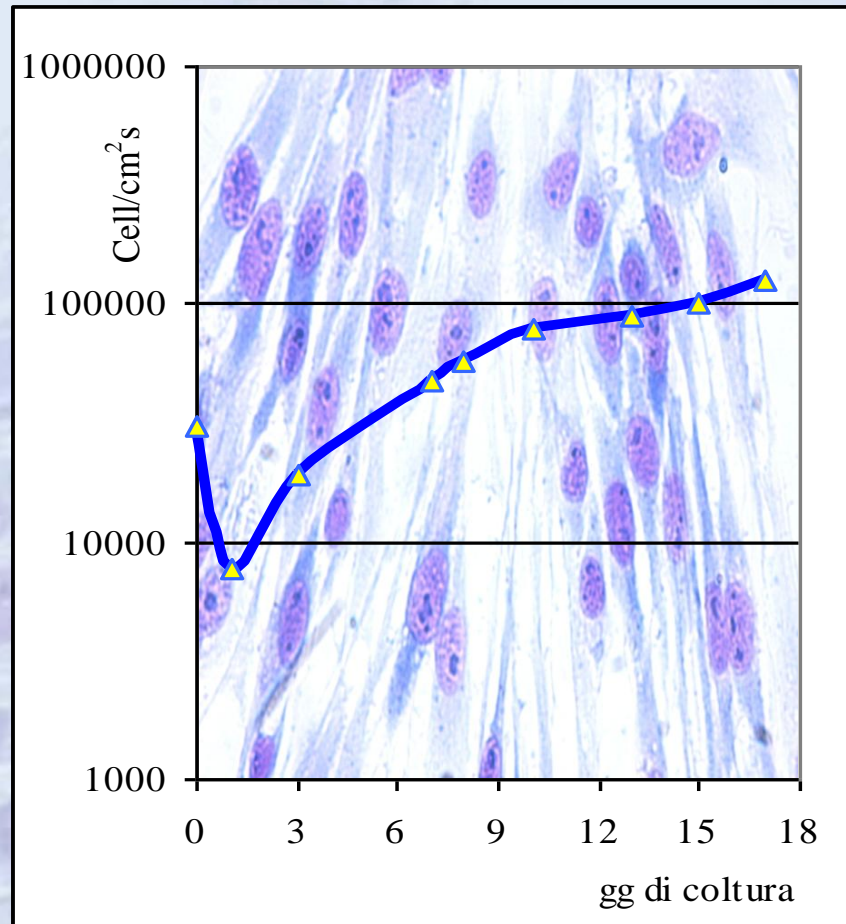


E-MEM (Hanks) + FBS 10% + P/S 50UI/50µg/L → Fase lag: 3,5 gg

PDT: 2,5 gg



E-MEM (Earle) + **FBS 5%** + NEAA +  
Neomicina solfato 5g/L



E-MEM (Hanks) + **NCS 10%** + P/S

PDT: 6,7 gg

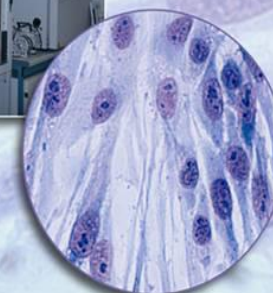
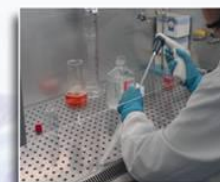
## Condizioni di crescita e conservazione della linea cellulare RTG-2:

- Incubazione →  $20 \pm 2^\circ\text{C}$       atmosfera normale
- Terreno di crescita → E-MEM sali di Hank's o Earle con L-glu, NEAA, senza sodio bicarbonato o con ridotto contenuto di sodio bicarbonato (0,35 g/L), addizionato con FBS al 10% e antibiotico P/S 50UI/50 $\mu\text{g/ml}$
- PDT medio → 2,5 – 3 gg (in linea con i risultati della letteratura: 3-3,5 gg)
- Conservazione della linea cellulare a  $4^\circ\text{C}$  fino a 1 anno



## Uso di colture cellulari per la valutazione ecotossicologica delle sostanze chimiche ai fini del Regolamento REACH: manuale per il mantenimento della linea stabilizzata di pesce RTG-2 (Rainbow Trout Gonad)

Uso di colture cellulari per la valutazione ecotossicologica delle sostanze chimiche ai fini del Regolamento REACH:  
manuale per il mantenimento della linea stabilizzata di pesce RTG-2 (Rainbow Trout Gonad)



# IN FASE DI STUDIO

## **UltraMEM™ Medium**

---

### **Product Use**

UltraMEM™ Medium is a chemically-defined medium designed to support growth and maintenance of several anchorage-dependent cell types under reduced serum concentrations. When supplemented with 2-4% serum, UltraMEM™ Medium growth performance is comparable and, in some instances, superior to that of standard media supplemented with 10% fetal bovine serum. UltraMEM™ Medium is currently labeled for laboratory/manufacturing use.

# Supplementi

- **ITS**

Insulina, transferrina e selenio

- **ITES**

Insulina, transferrina, etanolamina e selenio

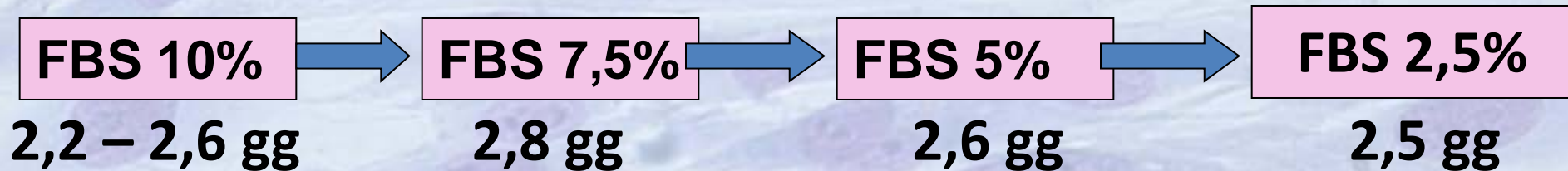
- **L-Glu**

a causa della sua termo sensibilità (si degrada durante l'incubazione e i prodotti di degradazione possono danneggiare le membrane cellulari, specialmente nei terreni serum-free) è preferibile utilizzarla come dipeptide stabile L-alanyl-L-glutamine



# Prove sperimentali in corso (implementa quanto riportato nel MLG 59/10)

1. Riduzione progressiva della concentrazione di siero FBS con un terreno misto composto da E-MEM + UltraMEM



## Prove sperimentali in corso (modifica quanto riportato nel manuale MLG 59/10)

2. Distacco con tripsina: la tripsina va eliminata dopo 2 minuti di contatto. In questo modo la crescita cellulare riprende velocemente, le cellule non risultano danneggiate e la fase lag dura solo 1 gg.

## Prove sperimentali in corso (in collaborazione con ARPAV)

3. Crescita del monostrato cellulare (che ha raggiunto una confluenza dell'80%) con terreno al 2% di siero

**Crescita delle cellule fino alla confluenza dell'80% con terreno normale al 10% di siero**

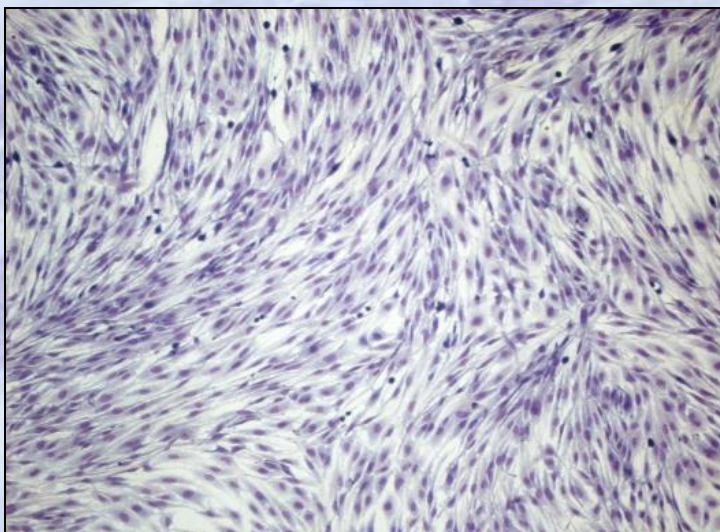
La crescita prosegue con terreno al 10% di siero

La crescita prosegue con terreno al 2% di siero

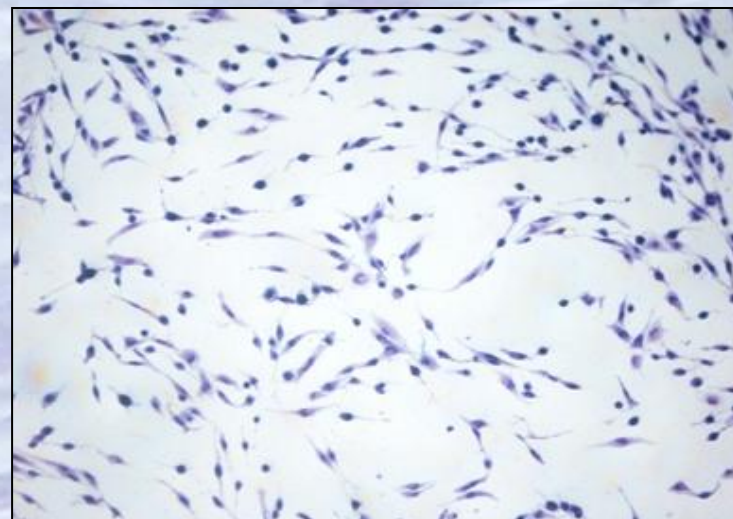
per 24, 48 e 72 h



|            | <b>24 h<br/>(gg)</b> | <b>48 h<br/>(gg)</b> | <b>72 h<br/>(gg)</b> |
|------------|----------------------|----------------------|----------------------|
| <b>10%</b> | <b>0,9</b>           | <b>1,4</b>           | <b>1,5</b>           |
| <b>2%</b>  | <b>1,8</b>           | <b>22,5</b>          | <b>N.D.</b>          |



**10% siero (72 h)**



**2% siero (72 h)**



Grazie per l'attenzione

