

## **PROGETTO DI RICERCA**

**Tutor proponente:** Dott.ssa Monia Lenzi

**Titolo:** VitroTox – Innovation in Toxicology

### **Premessa**

Al fine di tutelare la salute pubblica e ambientale è di fondamentale importanza valutare la sicurezza di qualsiasi sostanza a cui l'uomo sia potenzialmente esposto. Dai farmaci per uso umano e veterinario ai fitofarmaci, dai materiali a contatto con gli alimenti ai mangimi per animali, dai detersivi ai deodoranti per ambiente, qualsiasi prodotto farmaceutico, agrochimico, alimentare e cosmetico, destinato all'immissione in commercio, deve rispondere a severi criteri di sicurezza. In questo contesto la recente norma ISO 10993-1:2018 [1] e il regolamento 2017/745/UE [2], entrato in vigore a maggio 2021, hanno imposto precise valutazioni riguardanti i componenti dei dispositivi medici. Inoltre, occorre sottolineare come i prodotti di scarto delle stesse industrie manifatturiere e le acque reflue agricole e industriali costituiscano un fattore di rischio ambientale.

Il processo di valutazione del rischio associato all'esposizione a qualsiasi sostanza risulta, quindi, un passaggio limite chiave per tutti i produttori di nuove molecole, nuovi materiali e materie prime, così come per i laboratori di ricerca e sviluppo associati e gli enti regolatori preposti alla tutela della salute pubblica e ambientale. Una completa ed esaustiva analisi tossicologica deve comprendere necessariamente la valutazione degli effetti sul materiale genetico, per escludere l'eventuale genotossicità, mutagenicità e potenziale cancerogenicità di una sostanza. A questo proposito occorre ricordare come anche l'introduzione della normativa REACH (Registration, Evaluation, Authorisation and restriction of CHemicals) abbia richiesto lo studio della tossicità di numerose sostanze chimiche già in commercio, prevedendo la priorità della valutazione proprio del potenziale mutageno, di cui è ben noto il ruolo nello sviluppo di numerose patologie, come le anomalie ereditarie, il cancro, le malattie cardiovascolari, l'Alzheimer e il morbo di Parkinson.

È quindi di estrema necessità disporre di test, che consentano un rapido e accurato screening tossicogenetico. Tuttavia, i diversi test di mutagenesi attualmente validati dall' OECD (Organisation for Economic Co-operation and Development) sono in generale affetti da criticità, quali la scarsa oggettività e forza statistica del risultato e i costi, soprattutto in termini di tempo e di risorse umane. Occorre quindi perfezionare le tecniche già disponibili e sviluppare nuove metodologie per perseguire gli obiettivi di sicurezza, innovazione e sostenibilità.

### **Obiettivo e attività previste**

Pertanto, lo scopo di questo progetto è rendere l'analisi della genotossicità e mutagenicità di qualsiasi sostanza, miscela complessa, botanicals o dispositivo medico, efficace, sensibile e accurata, ma anche rapida, economica e sostenibile. A tale scopo, verrà studiata una batteria di test in vitro per valutare i principali tipi di danno al DNA, che possono essere riparati o meno ed eventualmente sfociare in una mutazione. I test selezionati saranno condotti esclusivamente utilizzando colture cellulari, in linea con il principio delle 3R, introdotto nel 1959 da Russel e Burch per promuovere i cosiddetti metodi alternativi; ovvero tutte le procedure utili per ridurre l'uso degli animali (Reduce), per sostituirli completamente nella sperimentazione (Replace), ma anche per limitare o eliminare le loro sofferenze affinando le condizioni sperimentali (Refine) [3,4]. Questo principio ben si integra nell'importante concetto di sostenibilità, intesa anche come diminuzione dei costi e dei tempi di analisi, necessari per ottenere i risultati richiesti.

Tra i test di mutagenesi disponibili figura il "In vitro Mammalian Cell Micronucleus Test" (OECD guideline n° 487), che sfrutta, come biomarcatore di danno cromosomico, il micronucleo, un piccolo nucleo accessorio facilmente identificabile al microscopio ottico attraverso una tecnica validata dall'ECVAM (Centro Europeo per la Validazione di Metodi Alternativi) [5,6], ma la cui metodica di analisi tradizionale è limitata da soggettività di interpretazione da parte degli operatori, lunghi tempi di preparazione a analisi di campi, e capacità di fornire un risultato esiguo ai fini di una robusta analisi statistica, a fronte tra l'altro di un'elevata produzione di rifiuti chimico-biologici. Per il superamento di queste criticità il nostro laboratorio ha recentemente sviluppato una versione automatizzata del test

in citometria a flusso [7]. Questa piattaforma ha mostrato grandi potenzialità e i risultati ottenuti incoraggiano il proseguimento degli studi. Pertanto le ricerche saranno dedicate all'implementazione e al perfezionamento del metodo per approfondire la sua versatilità di utilizzo su diversi campioni e introdurre, ad esempio, la possibilità di evidenziare e discriminare le diverse tipologie di eventi mutazionali e il meccanismo d'azione attraverso il quale lo xenobiotico esercita la sua mutagenicità, permettendo quindi di capire se può indurre danni strutturali o numerici.

## **Bibliografia**

1. ISO 10993-1:2018 Biological Evaluation of Medical Devices — Part 1: Evaluation and Testing within a Risk Management Process. Available online: <https://www.iso.org/cms/render/live/en/sites/isoorg/contents/data/standard/06/89/68936.html> (accessed on 22 July 2021).
2. Regulation (EU) 2017/745 of the European Parliament and of the Council of 5 April 2017 on Medical Devices, Amending Directive 2001/83/EC, Regulation (EC) No 178/2002 and Regulation (EC) No 1223/2009 and Repealing Council Directives 90/385/EEC and 93/42/EEC Available online: <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/HTML/?uri=CELEX:32017R0745&from=EN> (accessed on 17 September 2021).
3. Regulation (EC) No 1907/2006 of the European Parliament and the Council of 18 December 2006 Concerning the Registration, Evaluation, Authorisation and Restriction of Chemicals (REACH), Establishing a European Chemicals Agency, Amending Directive 1999/45/EC and Repealing Council Regulation (EEC) No 793/93 and Commission Regulation (EC) No 1488/94 as Well as Council Directive 76/769/EEC and Commission Directives 91/155/EEC, 93/67/EEC, 93/105/EC and 2000/21/EC Available online: <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/HTML/?uri=CELEX:02006R1907-20220301&qid=1653304603517&from=EN> (accessed on 23 May 2022).
4. OECD Overview of the Set of OECD Genetic Toxicology Test Guidelines and Updates Performed in 2014-2015 Available online: [https://www.oecd.org/officialdocuments/publicdisplaydocumentpdf/?cote=ENV-JM-MONO\(2016\)33/rev1&doclanguage=en](https://www.oecd.org/officialdocuments/publicdisplaydocumentpdf/?cote=ENV-JM-MONO(2016)33/rev1&doclanguage=en) (accessed on 22 July 2021).
5. Fenech, M. The in Vitro Micronucleus Technique. *Mutat. Res. Mol. Mech. Mutagen.* **2000**, *455*, 81–95, doi:10.1016/S0027-5107(00)00065-8.
6. Test No. 487: In Vitro Mammalian Cell Micronucleus Test Available online: [https://read.oecd-ilibrary.org/environment/test-no-487-in-vitro-mammalian-cell-micronucleus-test\\_9789264264861-en](https://read.oecd-ilibrary.org/environment/test-no-487-in-vitro-mammalian-cell-micronucleus-test_9789264264861-en) (accessed on 19 April 2021).
7. Lenzi, M.; Cocchi, V.; Hrelia, P. Flow Cytometry vs Optical Microscopy in the Evaluation of the Genotoxic Potential of Xenobiotic Compounds. *Cytometry B Clin. Cytom.* **2018**, *94*, 852–862, doi:<https://doi.org/10.1002/cyto.b.21546>.

## **PROGRAMMA FORMATIVO**

Il progetto si propone di fornire al beneficiario dell'assegno competenze specifiche prevalentemente tossicologiche, da acquisire presso i laboratori del FaBiT e in particolare, presso il laboratorio del Tutor proponente.

Nel dettaglio, il piano di formazione è finalizzato a:

1. Formazione dell'assegnista in merito alla conoscenza della problematica inerente alla valutazione tossicologica di uno xenobiotico, in particolare in termini di genotossicità e mutagenicità.
2. Formazione di un ricercatore esperto nell'utilizzo del citofluorimetro Guava easyCyte 5HT dotato di laser blu operante a 488 nM (presente nel laboratorio del tutor proponente)
3. Formazione di un ricercatore esperto in grado di utilizzare metodologie e strumentazioni avanzate per valutare il potenziale genotossico e mutageno di uno xenobiotico e dei relativi metaboliti, mediante citometria a flusso, come innovativa alternativa alla microscopia ottica.
4. Acquisizione da parte del beneficiario dell'assegno delle competenze necessarie alla valutazione della genotossicità anche in microscopia ottica.
5. Il ricercatore, divenuto esperto delle metodologie connesse alla valutazione degli effetti genotossici e mutageni singole sostanze, miscele, botanicals e dispositivi medici sarà in grado di rapportarsi con le aziende produttrici e gli enti regolatori preposti alla tutela della salute pubblica e ambientale.