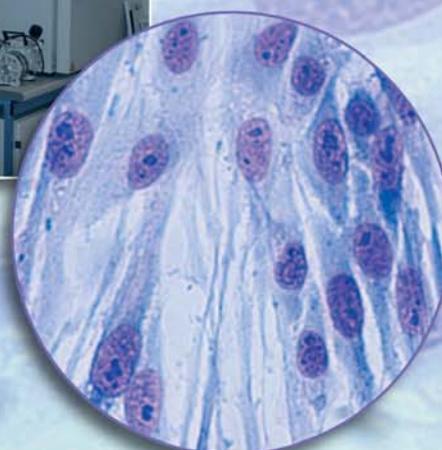




ISPRA

Istituto Superiore per la Protezione
e la Ricerca Ambientale

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)





ISPRA

Istituto Superiore per la Protezione
e la Ricerca Ambientale

**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)**

Informazioni legali

L'istituto Superiore per la Protezione e la Ricerca Ambientale (ISPRA) e le persone che agiscono per conto dell'Istituto non sono responsabili per l'uso che può essere fatto delle informazioni contenute in questo manuale.

ISPRA – Istituto Superiore per la protezione e la ricerca ambientale
Via Vitaliano Brancati, 48 - 00144 Roma
www.isprambiente.it

ISPRA, Manuali e Linee Guida 59/2010

ISBN 978-88-448-0440-4

Riproduzione autorizzata citando la fonte

Elaborazione grafica

ISPRA

Grafica di copertina: Franco Iozzoli

Foto di copertina: Franco Iozzoli e Daniela Conti

Coordinamento tipografico:

Daria Mazzella

ISPRA - Settore Editoria

Amministrazione:

Olimpia Girolamo

ISPRA - Settore Editoria

Distribuzione:

Michelina Porcarelli

ISPRA - Settore Editoria

Impaginazione e Stampa

Tipolitografia CSR - Via di Pietralata, 157 - 00158 Roma

Tel. 064182113 (r.a.) - Fax 064506671

Finito di stampare ottobre 2010

AUTORI

Daniela Conti, Stefania Balzamo, Alessandra Pati, Maria Belli del Servizio di Metrologia Ambientale ISPRA

INDICE

1. INTRODUZIONE	Pag 1
2. LE COLTURE CELLULARI	Pag 9
3. LE COLTURE CELLULARI DI PESCE	Pag 17
3.1 Good Cell Culture Practice (GCCP)	Pag 27
4. PROTOCOLLO PER IL MANTENIMENTO DELLA LINEA CELLULARE RTG-2	Pag 33
4.1 Definizioni e abbreviazioni	Pag 33
4.2 Materiali	Pag 35
4.2.1 <i>Attrezzature di laboratorio</i>	Pag 35
4.2.2 <i>La cappa di sicurezza biologica</i>	Pag 36
4.2.3 <i>Materiale plastico per le colture di cellule</i>	Pag 37
4.2.4 <i>Vetreteria</i>	Pag 38
4.2.5 <i>Terreni e reagenti</i>	Pag 39
4.3 Norme per lavorare in sterilità	Pag 41
4.3.1 <i>Norme generali</i>	Pag 41
4.3.2 <i>Sterilizzazione</i>	Pag 41
4.3.3 <i>Norme per lavorare sotto cappa</i>	Pag 42
4.3.4 <i>Come maneggiare pipette, puntali e filtri da siringa (sotto cappa)</i>	Pag 44
4.3.5 <i>Come aliquotare i liquidi da una bottiglia, una fiasca, una provetta</i>	Pag 44
4.4 Terreno e reagenti per la crescita della linea cellulare RTG-2	Pag 45
4.4.1 <i>Caratteristiche generali dei terreni per colture cellulari</i>	Pag 45
4.4.2 <i>Ricostituzione del terreno di base in polvere</i>	Pag 45
4.4.3 <i>Preparazione dei supplementi per il terreno di crescita</i>	Pag 46
4.4.3.1 <i>Il siero</i>	Pag 46
4.4.3.2 <i>Antibiotici</i>	Pag 46
4.4.4 <i>Preparazione del terreno di crescita per uso</i>	Pag 47
4.4.5 <i>Trypsina</i>	Pag 47
4.4.6 <i>D-PBS</i>	Pag 47
4.5 Arrivo delle cellule in laboratorio	Pag 48
4.5.1 <i>Cellule da fiala congelata</i>	Pag 48
4.5.2 <i>Cellule in fiasca da coltura</i>	Pag 48
4.6 Mantenimento della linea cellulare RTG-2	Pag 49
4.6.1 <i>Esame delle colture cellulari al microscopio invertito</i>	Pag 50
4.6.2 <i>Cambio del terreno di crescita</i>	Pag 50
4.6.3 <i>Passaggi o subcolture</i>	Pag 51
4.6.4 <i>Conta cellulare con Coulter Counter</i>	Pag 52
4.7 Colorazione della linea cellulare RTG-2	Pag 52
4.7.1 <i>Colorazione del monostrato in piastra (Fresheney, 2005)</i>	Pag 52
4.7.2 <i>Colorazione del monostrato su vetrino (modificato da Fresheney, 2005)</i> ...	Pag 53
4.8 Curva di crescita	Pag 54
4.8.1 <i>Curva di crescita in fiasca</i>	Pag 56

4.8.2 <i>Curva di crescita in piastra multipozzetto</i>	Pag 57
4.9 Determinazione dell'efficienza di piastramento	Pag 58
5. ALLEGATI	Pag 61
6. BIBLIOGRAFIA	Pag 79
7. GLOSSARIO	Pag 87

1. INTRODUZIONE

La ricerca ecotossicologica, sia che indagli i meccanismi d'azione delle sostanze, sia che riguardi i saggi di tossicità per la sorveglianza ambientale e il monitoraggio, si basa principalmente su studi *in vivo*. Diversamente infatti, dalla tossicologia umana, incentrata sull'individuo e su una singola specie, l'obiettivo peculiare dell'ecotossicologia è la valutazione degli effetti delle sostanze chimiche a livello di popolazioni ed ecosistemi. Ne consegue che un sistema *in vitro*, sviluppato in ambito ecotossicologico, dovrebbe essere in grado non solo di estrapolare gli effetti tossici *in vivo*, ma anche di fornire informazioni sulle risposte biologiche a livello di ecosistema. La difficoltà di ottenere questo tipo di risposte costituisce una delle ragioni per cui i ricercatori e le Autorità che si occupano di controllo ambientale, sono da sempre riluttanti a proporre l'uso di metodi *in vitro*, basati su linee cellulari, nel contesto dell'ecotossicologia. Questa visione, tuttavia, è destinata a cambiare.

Il 1 giugno 2007, in Europa, è entrato in vigore il Regolamento comunitario REACH (Registration, Evaluation and Authorisation of Chemicals) CE n. 1907/2006, che ha modificato radicalmente la disciplina per l'immissione in commercio delle sostanze chimiche, annullando gran parte della normativa preesistente e stabilendo un sistema unico di gestione del rischio chimico. Tale Regolamento prescrive l'obbligo di registrare tutte le **sostanze** chimiche (come tali o contenute in **preparati** e **articoli**) prodotte o importate in quantità pari o superiore a 1 tonnellata/anno, attraverso la presentazione all'ECHA (Agenzia Europea per le sostanze chimiche), di *dossier* tecnici contenenti le informazioni chimico-fisiche, tossicologiche ed ecotossicologiche finalizzate a definire i rischi potenziali per la salute umana e per l'ambiente (tabella 1). Per le sostanze prodotte e importate in quantità pari o superiore a 10 tonnellate l'anno è previsto, inoltre, un rapporto sulla sicurezza chimica che comprende la valutazione di pericolosità della sostanza e, nel caso in cui essa sia classificata come persistente, bioaccumulabile o molto tossica, anche la descrizione degli scenari di esposizione associati agli usi previsti e la caratterizzazione del rischio. In Italia, l'adozione del Regolamento è avvenuta con la legge n. 46 del 6 aprile 2007. Questa ha attribuito il ruolo di Autorità Competente per il REACH al Ministero della Salute, prevedendo che esso operi d'intesa con il Ministero dell'Ambiente e della Tutela del Territorio e del Mare (MATTM) e con il Ministero dello Sviluppo Economico (MSE), avvalendosi, per gli aspetti tecnico scientifici, dell'Istituto Superiore per la Protezione e la Ricerca Ambientale (ISPRA) e dell'Istituto Superiore di sanità (ISS). Le istituzioni suddette concorrono congiuntamente, sebbene con specifiche attribuzioni, allo svolgimento dei compiti previsti dal Regolamento a livello nazionale. Tra questi compiti, in particolare, si evidenziano: la valutazione della sicurezza chimica delle sostanze, l'istituzione di un sistema di ispezione e vigilanza, l'assistenza alle imprese, la formazione, l'informazione del pubblico sui rischi connessi alle sostanze chimiche, la promozione della ricerca e dello sviluppo dei centri di saggio (Mezzanotte, 2008). L'attività di raccordo operativo per gli aspetti relativi all'attuazione del Regolamento viene svolta dal Comitato tecnico di Coordinamento (CtC) istituito presso il Ministero della Salute, cui partecipano, con un componente, tutti i Ministeri coinvolti, i due organismi tecnici di supporto e un rappresentante regionale e delle province autonome. Il successivo decreto interministeriale 22 novembre 2007, pubblicato sulla G.U. n° 12 del 15 gennaio 2008, ha stabilito il piano di attività, relativo agli adempimenti a breve termine (2007-2009) previsti da REACH, specificando i compiti delle varie Istituzioni interessate e la ripartizione delle risorse finanziarie. In tabella 2 sono riportati i compiti previsti per ISPRA.

* Le parole riportate in grassetto nel testo sono spiegate nel glossario.

Tab. 1 - Elenco delle informazioni fisico-chimiche, tossicologiche ed ecotossicologiche riportate negli allegati da VII a IX del Regolamento REACH.

Informazioni sulle proprietà fisico-chimiche della sostanza	
7.1	Stato della sostanza a 20 °C e 101,3 kPa
7.2	Punto di fusione/congelamento
7.3	Punto di ebollizione
7.4	Densità relativa
7.5	Pressione di vapore
7.6	Tensione superficiale
7.7	Idrosolubilità
7.8	Coefficiente di ripartizione n-ottanolo/acqua
7.9	Punto di infiammabilità
7.10	Infiammabilità
7.11	Proprietà esplosive
7.12	Temperatura di auto infiammabilità
7.13	Proprietà comburenti
7.14	Granulometria
7.15	Stabilità dei solventi organici e identificazione dei prodotti di degradazione pertinenti
7.16	Costante di dissociazione
7.17	Viscosità
Informazioni tossicologiche	
8.1	<u>Irritazione o corrosione cutanea</u> : (valutazione dei dati umani e animali disponibili; valutazione della riserva acida o alcalina; studio <i>in vitro</i> della corrosione cutanea; studio <i>in vitro</i> dell'irritazione cutanea).
8.1.1	Irritazione cutanea <i>in vivo</i>
8.2	<u>Irritazione oculare</u> (valutazione dei dati umani e animali disponibili; valutazione della riserva acida o alcalina; studio <i>in vitro</i> dell'irritazione oculare).
8.2.1	Irritazione oculare <i>in vivo</i>
8.3	<u>Sensibilità cutanea</u> (valutazione dei dati umani e animali disponibili; sperimentazione <i>in vivo</i>).
8.4	<u>Mutagenicità</u>
8.4.1	Mutazione genica nei batteri
8.4.2	Analisi citogenetiche (aberrazioni cromosomiche) o studio <i>in vitro</i> del micronucleo su cellule di mammifero
8.4.3	Mutazioni geniche su cellule di mammifero
8.5	<u>Tossicità acuta</u>
8.5.1	Tossicità per via orale
8.5.2	Tossicità per via inalatoria
8.5.3	Tossicità per via cutanea
8.6	<u>Tossicità a dosi ripetute</u>
8.6.1	Tossicità a dose ripetuta a breve termine (28 gg), una sola specie, maschio o femmina, via di somministrazione più appropriata tenuto conto della via probabile di esposizione umana.
8.6.2	Tossicità subcronica (90 gg) una sola specie (roditore), maschio o femmina, via di somministrazione più appropriata tenuto conto della via probabile di esposizione umana.
8.7	<u>Tossicità per la riproduzione</u>
8.7.1	Screening della tossicità per la riproduzione/lo sviluppo, una sola specie
8.7.2	Tossicità per lo sviluppo prenatale
8.7.3	Tossicità per la riproduzione su due generazioni, una sola specie
8.8	<u>Tossicocinetica</u>
8.8.1	Comportamento tossicocinetico della sostanza
8.9	8.9.1 Studio sulla cancerogenicità

Informazioni ecotossicologiche	
9.1	<u>Tossicità acquatica</u>
9.1.1	Tossicità a breve termine su invertebrati (specie preferita <i>Daphnia magna</i>)
9.1.2	Inibizione della crescita su piante acquatiche (specie preferita <i>Algae</i>)
9.1.3	Tossicità a breve termine sui pesci
9.1.4	Inibizione respiratoria su fanghi attivi
9.1.5	Tossicità a lungo termine su invertebrati (specie preferita <i>Daphnia magna</i>)
9.1.6	Tossicità a lungo termine con pesci
	9.1.6.1 tossicità con pesci nelle prime fasi di vita
	9.1.6.2 tossicità a breve termine su pesci nelle fasi di embrione e avannotto
	9.1.6.3 prova di crescita di pesci in fase giovanile
9.2	<u>Degradazione</u>
9.2.1	Degradazione biotica
	9.2.1.1 Pronta biodegradabilità
	9.2.1.2 Simulazione sulla degradazione finale nelle acque di superficie
	9.2.1.3 Simulazione al suolo per sostanze con forte potere di adsorbimento al suolo
	9.2.1.4 Simulazione su sedimenti per sostanze con forte potere di adsorbimento sui sedimenti
9.2.2	Degradazione abiotica
	9.2.2.1 Idrolisi come funzione del pH
9.2.3	Identificazione dei prodotti di degradazione
9.3	<u>Destino e comportamento nell'ambiente</u>
9.3.1	Screening dell'adsorbimento/desorbimento
9.3.2	Bioaccumulo nelle specie acquatiche soprattutto pesci
9.3.3	Informazioni su adsorbimento/desorbimento
9.3.4	Informazioni supplementari su destino e comportamento nell'ambiente
9.4	<u>Effetti sugli organismi del suolo (terrestri)</u>
9.4.1	Tossicità a breve termine per invertebrati
9.4.2	Effetti sui microrganismi del suolo
9.4.3	Tossicità a breve termine per le piante
9.4.4	Tossicità a lungo termine su invertebrati
9.4.6	Tossicità a lungo termine su piante
9.5.1	Tossicità a lungo termine per gli organismi che vivono nei sedimenti
9.6	<u>Tossicità sugli uccelli</u>
9.6.1	Tossicità a lungo termine per la riproduzione degli uccelli

La corretta applicazione del Regolamento REACH all'interno di ogni Stato Membro della CE prevede l'organizzazione di un sistema di controllo e vigilanza, che, nel nostro Paese, è stato adeguato di recente, attraverso l'Accordo tra Stato, Regioni e Province autonome di Trento e Bolzano (29 ottobre 2009, G.U. del 7 dicembre 2009). Tale accordo definisce i ruoli per la gestione delle attività di controllo, la cui operatività viene assicurata dal Ministero della Salute. In esso si stabilisce che il sistema dei controlli coinvolga le seguenti amministrazioni dello Stato: gli Uffici di Sanità Marittima, Aerea e di Frontiera «USMAF», i Nuclei Antisofisticazioni e Sanità dell'Arma dei Carabinieri «NAS», l'Istituto Superiore Prevenzione e Sicurezza sul Lavoro «ISPESL», il «Corpo ispettivo centrale» di cui al D 27 gennaio 2006 del Ministro della Salute, l'Agenzia delle dogane ed i Nuclei Operativi Ecologici dell'Arma dei Carabinieri «NOE», ciascuna nell'ambito delle proprie attività istituzionali.

Tab. 2 - Compiti di ISPRA in ambito REACH, previsti dal DM 22 novembre 2007

1.6 L'ISPRA*, collaborando anche con il sistema della rete nazionale delle agenzie regionali e delle province autonome per la protezione dell'ambiente ha al proprio interno le competenze per svolgere un ruolo determinante nella valutazione del rischio delle sostanze e organizza nel proprio ambito una struttura tecnica adeguata ai compiti previsti.

L'ISPRA* in particolare:

- 1) partecipa alla formulazione delle proposte d'inserimento delle sostanze prioritarie nel "Piano d'azione a rotazione";
- 2) effettua, per le sostanze assegnate all'Italia, la valutazione dei rischi per l'ambiente, anche avvalendosi del sistema delle agenzie ambientali ed in collaborazione con il CSC per gli aspetti relativi all'ecotossicologia, alla caratterizzazione del rischio e all'uso di modelli predittivi dell'esposizione;
- 3) collabora con il CSC, per le sostanze assegnate all'Italia, per gli aspetti relativi alla valutazione dell'esposizione attraverso l'ambiente alla valutazione del rischio per la salute umana;
- 4) definisce, in collaborazione con il CSC, le informazioni supplementari da richiedere alle imprese per le sostanze oggetto di valutazione;
- 5) collabora con il CSC alla definizione della bozza di parere per le richieste relative alle sostanze prodotte o importate per scopi di ricerca e sviluppo;
- 6) propone al Comitato tecnico di Coordinamento iniziative per l'informazione del pubblico sui rischi chimici;
- 7) propone al Comitato tecnico di Coordinamento, in collaborazione con il CSC, le sostanze da candidare all'inserimento in allegato XIV (autorizzazioni) o alle procedure di restrizione o alla classificazione armonizzata;
- 8) compila i fascicoli di cui all'allegato XV per gli aspetti di propria competenza;
- 9) può partecipare con propri esperti ai Comitati tecnici dell'Agenzia europea;
- 10) assicura il supporto tecnico-scientifico per la partecipazione dei rappresentanti nazionali alle attività dei suddetti comitati e organi dell'Agenzia europea;
- 11) partecipa con propri esperti alle attività nazionali d'informazione e formazione;
- 12) partecipa all'attività di **Help desk** centrale svolta dal Ministero dello sviluppo economico, fornendo il proprio supporto tecnico-scientifico;
- 13) fornisce supporto tecnico-scientifico per le attività di controllo e vigilanza, per le attività di sviluppo dei laboratori di saggio e per le attività di ricerca finalizzate all'individuazione di metodi alternativi ai test che richiedono l'uso di animali;
- 14) concorre, in collaborazione con l'Autorità Competente, a promuovere le attività di controllo e vigilanza sul territorio nazionale.

* APAT nel testo originale del decreto; CSC: Centro Sostanze Chimiche

Le regioni e province autonome, nell'ambito della propria organizzazione e legislazione, hanno il compito di individuare l'Autorità per i controlli sul REACH, e di nominare i propri esperti per il "Gruppo tecnico", provenienti dai ruoli delle medesime Regioni/ Province o delle Aziende Sanitarie Locali, ASL, o delle Agenzie Regionali/Provinciali per la Protezione Ambientale, ARPA/APPA. Tale Gruppo tecnico di esperti, che opera d'intesa con il Comitato Tecnico di Coordinamento del REACH, deve seguire nel tempo le attività di programmazione del controllo garantendone il coordinamento territoriale.

L'Accordo Stato-Regioni stabilisce inoltre, che le regioni e le province autonome, debbano individuare, sulla base delle strutture analitiche già esistenti, i laboratori che eseguiranno le analisi chimiche e i saggi tossicologici ed ecotossicologici sui campioni prelevati durante le attività di controllo. Per l'assolvimento di determinate esigenze si potrà promuovere anche una rete di centri analitici di eccellenza interregionale o nazionale.

Il Regolamento REACH oltre a voler assicurare un elevato livello di protezione della salute umana

e dell'ambiente (art. 1), ha, come obiettivo non meno importante, la promozione e lo sviluppo di metodi alternativi ai saggi *in vivo*, per la valutazione dei pericoli che le sostanze chimiche comportano. In vari capitoli viene specificato che le informazioni da raccogliere in merito alla tossicità ed ecotossicità delle sostanze chimiche devono essere acquisite *ricorrendo, ove possibile, a mezzi diversi dai test su animali vertebrati* (art. 13), perché questi devono essere considerati *come ultima risorsa* (art. 25), adottando, inoltre, disposizioni per limitare ripetizioni inutili dei test attraverso, ad esempio, la condivisione, all'interno di ogni **SIEF** (Forum per lo scambio di Informazioni sulle Sostanze), dei dati ottenuti mediante le prove sperimentali sia *in vivo* che *in vitro* (art. 30). Già la Direttiva 86/609/EEC, precedente al Regolamento REACH, all'articolo 23, incoraggiava gli Stati Membri a supportare le iniziative capaci di ridurre (**R**educe), migliorare (**R**efine) e sostituire (**R**eplace) i saggi con animali di laboratorio impiegati per scopi scientifici e di ricerca. La strategia delle "3R alternatives" (*3Rs strategy*), elaborata da Russell e Burch nel 1959, è quanto mai attuale e fa riferimento a tutte quelle procedure che riducono drasticamente il numero di animali utilizzati in ciascun esperimento, alleviano o minimizzano le sofferenze loro inflitte, sostituiscono in modo parziale o completo gli animali vertebrati con diverse tipologie di colture cellulari *in vitro* (Balls et al., 1995). Nella tabella 3 sono riportati i dati riguardanti l'uso degli animali per scopi scientifici in alcuni Paesi del mondo. È stato rilevato che fino al 70% delle procedure che infliggono grandi sofferenze agli animali sono dovute all'esecuzione di saggi di tossicità per scopi normativi.

Il Regolamento REACH intende per metodi alternativi, sia *idonei metodi in vitro, che modelli di relazioni qualitative o quantitative struttura-attività o dati relativi a sostanze strutturalmente affini* (art. 13 e Allegato XI). In primo luogo, *idonei* significa metodi *in vitro* convalidati, come, per citare qualche esempio, il saggio d'irritazione cutanea che utilizza epidermide ricostituita con lo strato corneo funzionale o il saggio di mutagenicità con *Salmonella typhimurium* (test di Ames). In secondo luogo, sono considerati idonei i saggi in fase di elaborazione sufficientemente avanzata secondo criteri riconosciuti a livello internazionale, come quelli adottati dal Centro Europeo per la Convalida dei Metodi Alternativi (ECVAM) per l'immissione di una prova nel processo di preconvalida (ECHA, 2008).

La *3Rs strategy* costituisce oggi, nell'era REACH, un imperativo cui i ricercatori di tutto il mondo devono rispondere, e va implementata, come indicato nel VII Congresso Internazionale ALTEX (ALternative to animal EXperimentation) tenutosi a Roma dal 30 agosto al 3 settembre 2009, con le **R** di: **R**eliable, **R**elevant, **R**eady-to-use e **R**obust proprie dei metodi alternativi *in vitro* (Weighardt, 2009). Nella tabella 4 sono elencati tali metodi, utilizzabili per gli scopi di REACH, approvati o in via di approvazione nell'Unione Europea presso il Tracking System for Alternative test methods Review (TSAR).

In linea con le indicazioni del Regolamento in merito alla promozione dei metodi alternativi *in vitro*, e con gli adempimenti previsti dal DM 22 novembre 2007 (tabella 2, punto 13), il Servizio di Metrologia Ambientale dell'ISPRA, ha presentato al CtC per il REACH, un progetto dal titolo: "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)". Scopo del suddetto progetto è la diffusione, presso i laboratori delle Agenzie Regionali e Provinciali per la Protezione dell'Ambiente (ARPA/APPA) dei saggi di citotossicità basale con linee cellulari stabilizzate di pesce da impiegare nello screening preliminare di valutazione dell'ecotossicità delle sostanze chimiche, in alternativa al saggio di tossicità a breve termine con pesci (Conti et al., 2009).

In questa pubblicazione viene presentato un protocollo per la crescita e il mantenimento della linea cellulare RTG-2, elaborato al termine della fase I del progetto .

Tab. 3 - Statistiche relative al numero di animali annualmente impiegati a scopi scientifici in alcuni Paesi del mondo

Paese	Ambito di applicazione	Pesci	Animali utilizzati				Totale	Anno di riferimento/ Bibliografia
			Roditori/Conigli	Artiodattili e Perissodattili ^a	Altri animali			
Unione Europea	Attività di ricerca e sviluppo per la medicina umana e veterinaria, l'odontoiatria e per studi biologici di base	1,815,000 ^b	9,377,500	133,100	653,400	12,100,000	2005/COM (2007) 675 definitivo	
USA	Attività di ricerca	136,509 ^c	616,266	109,961	164,714	1,027,450	2007/USDA 2008 ^d	
Canada	Attività di ricerca, insegnamento, esecuzione di test e produzione di fattori biologici	499,455	1,393,901	83,238	296,231	2,272,815	2008/CCAC 2009	
UK	Valutazioni tossicologiche ^e	263,854	657,518	7,047	32,433	960,852	2008/ Statistics 2009	
Australia	Attività di ricerca e insegnamento	6,953,228 ^f	743,186	419,844	2,194,817	10,311,075	2007/HRA ^g	

Annotazioni: ^acomprende suini, caprini, ovini e bovini (artiodattili) e cavalli, asini e ibridi (perissodattili); ^b dato che comprende tutti gli animali a sangue freddo; ^c dato che comprende anche altri animali oltre ai pesci; ^d la valutazione effettuata dal Dipartimento dell'agricoltura degli USA, dipende dal numero di ispezioni che nell'anno 2007 sono state 16,487; ^e è riportato solo il numero di animali impiegati per le valutazioni tossicologiche (tossicologia, sviluppo di metodi, controllo qualità, ecc.); ^f la maggior parte dei pesci viene utilizzata allo stadio larvale; ^g I dati non sono completi.

Tab. 4 - Test alternativi (*in vitro* e *in vivo*) approvati o in fase di approvazione nella CE

Tipologia di test	Metodo	Classificazione	Strategia delle 3R (3Rs strategy)
Irritazione e corrosione cutanea	TER- Corrosione	<i>In vitro</i> , ex-vivo	Parziale sostituzione
	HSM - Corrosione	<i>In vitro</i>	Sostituzione
	CORROSITEX - Corrosione	<i>In vitro</i>	Parziale sostituzione
	EPISKIN – Irritazione	<i>In vitro</i>	Sostituzione
	EPIDERM – Irritazione	<i>In vitro</i>	Parziale sostituzione
	EPIDERM modificato	<i>In vitro</i>	Sostituzione
Irritazione oculare	SKINETHIC	<i>In vitro</i>	Sostituzione
	BCOP	<i>In vitro</i> , ex-vivo	Parziale sostituzione
	ICE	<i>In vitro</i> , ex-vivo	Parziale sostituzione
	RRET, IRE	<i>In vitro</i> , ex-vivo	Parziale sostituzione
Sensibilizzazione cutanea	HET-CAM	<i>In vitro</i>	Sostituzione
	LLNA	<i>In vivo</i>	Riduzione e miglioramento
Mutagenicità	MICRONUCLEO	<i>In vitro</i>	Riduzione
Tossicità acuta sistemica	FDP	<i>In vivo</i>	Sostituzione (sostituisce il test <i>in vivo</i> di tossicità orale acuta eliminato nella Dir. 2001/59/EC (Official Journal L225 2001))
	ATC	<i>In vivo</i>	Sostituzione (sostituisce il test <i>in vivo</i> di tossicità orale acuta eliminato nella Dir. 2001/59/EC (Official Journal L225 2001))
	UP AND DOWN	<i>In vivo</i>	Riduzione
Tossicità per la riproduzione	EST	<i>In vitro</i>	Parziale sostituzione
	MM	<i>In vitro</i> , ex-vivo	Miglioramento
	WET	<i>In vitro</i> , ex-vivo	Miglioramento
Fototossicità	3T3 NRU PT	<i>In vitro</i>	Sostituzione
Assorbimento cutaneo	SKIN ABSORPTION	<i>In vitro</i>	Sostituzione
Tossicità acuta con pesci	FTA	<i>In vivo</i>	Strategia di riduzione (non può essere considerato un test)

Legenda: Ex-vivo: l'esposizione avviene su organi asportati da animali sacrificati; Sostituzione parziale (Partial Replacement): sostituisce parzialmente il metodo *in vivo*; Sostituzione (Replacement): sostituisce il test *in vivo*; Riduzione e Miglioramento (Reduction e Refinement): riduce il numero di animali e usa procedure meno aggressive; Riduzione (Reduction): riduce il numero di animali/test *in vivo*; Miglioramento (Refinement): usa procedure meno aggressive, ad es. utilizza gli embrioni, quindi richiede solo il sacrificio del "genitore"; TER: Transcutaneous Electrical Resistance; HSM: Human Skin Model; CORROSITEX: In Vitro Membrane Barrier Test Method for Skin Corrosion; EPISKIN: Artificial Skin Model for Skin Irritation (with MTT reduction and IL-a release); EPIDERM: Artificial Skin Model for Skin Irritation (with MTT reduction and IL-a release); SKINETHIC-RHE: Artificial Skin Model for Skin Irritation; BCOP: Bovine Corneal Opacity/Permeability Test; ICE: Isolated Chicken Eye Test; RRET, IRE: Isolated rabbit enucleated eye test; HET-CAM: Hen's egg test – chorio-allantoic membrane test; LLNA: Local Lymph Node Assay; rLLNA: Reduced Local Lymph Node Assay; FDP: Acute oral Toxicity – Fixed Dose Procedure; ATC: Acute oral toxicity – Acute Toxic Class Method; EST: Embryonic Stem Cell Test for Embryotoxicity; MM: Micromass Embryotoxicity Assay; WET: Whole rat Embryo Embryotoxicity test; 3T3 NRU PT: *In vitro* 3T3 Neutral Red Uptake Phototoxicity Test; FTA: Fish Threshold Approach.

2. LE COLTURE CELLULARI

Le cellule sono l'unità fondamentale di tutte le forme vitali e rappresentano un livello chiave di organizzazione per la comprensione, sia dei meccanismi di tossicità specie-specifici, che di quelli comuni a più specie, nonché per lo sviluppo di *biomarkers*.

Le colture di cellule originate da animali vertebrati costituiscono modelli sperimentali *in vitro*. Il termine *in vitro* si riferisce al modo in cui parti di un organismo vivente (organi, tessuti, cellule) sono mantenute al di fuori dell'organismo stesso, in un ambiente artificiale, controllato, isolate dai molteplici sistemi fisiologici che regolano le loro attività *in vivo*.

Le colture di cellule animali possono essere utilizzate come strumento di *screening* rapido e a basso costo per la valutazione tossicologica ed ecotossicologica di sostanze chimiche e campioni ambientali, permettendo, inoltre, la comparazione inter-specie in condizioni equivalenti di esposizione ai composti tossici.

Le prime colture di tessuto risalgono agli inizi del '900 e furono messe a punto per studiare l'ambiente delle cellule animali senza l'influenza delle variazioni sistemiche e metaboliche che si presentano nella sperimentazione animale. In origine, la tecnica venne elaborata con frammenti interi di tessuto in cui la crescita si limitava alla migrazione spontanea di cellule dal frammento stesso con occasionali mitosi. Il termine generico, iniziale, di *coltura di tessuto* include sia le colture d'organo che le colture cellulari. Le prime implicano una struttura tridimensionale del tessuto intero, che quindi conserva molti degli aspetti istologici e funzionali che aveva *in vivo*; le seconde invece derivano da cellule disperse dal tessuto di origine attraverso una disgregazione enzimatica, meccanica o chimica.

Le colture cellulari sono di due tipi: le colture primarie e le linee cellulari (figura 1). Le colture primarie sono colture di cellule derivanti direttamente dall'organo o dal tessuto dell'animale e sono considerate tali fino al momento in cui, con la prima sottocoltura, o passaggio, ha origine una linea cellulare che può essere propagata per un limitato numero di generazioni (cellule a vita finita o linee cellulari finite), dopo le quali, va incontro a senescenza e morte.

Le linee cellulari continue (o stabilizzate) possono avere origine dalle colture primarie e dalle linee cellulari a vita finita, sia spontaneamente, che per trasformazione indotta con agenti virali, chimici e fisici o mettendo in coltura, cellule provenienti da un tumore *in vivo* (De Angelis, 1990). Esse hanno la potenzialità teorica di sopravvivere per infiniti passaggi *in vitro*.

Il passaggio dalla situazione *in vivo* (organismo) a quella *in vitro* (tessuti/cellule in coltura), comporta la variazione di diversi parametri, quali il livello di organizzazione, le relazioni intercellulari, il controllo ambientale e la riproducibilità. Il sistema delle colture cellulari presenta pertanto potenzialità e limiti da considerare attentamente in relazione agli obiettivi da perseguire.

Potenzialità

Controllo ambientale. Le condizioni di coltura consentono il controllo sia dei parametri chimico-fisici (pH, temperatura, pressione osmotica, ossigeno, tensione di CO₂), che delle condizioni fisiologiche che possono essere mantenute relativamente costanti.

Caratterizzazione e omogeneità dei campioni. I campioni prelevati dai tessuti sono, per loro natura, eterogenei in quanto le cellule presenti variano, di volta in volta, per natura e quantità.

Le colture cellulari sono invece più uniformi, perché la pressione selettiva esercitata dalle condizioni di coltura, tende a selezionare i tipi cellulari più forti. Utilizzando stessi livelli di sottocoltura si ottengono campioni e risposte riproducibili.

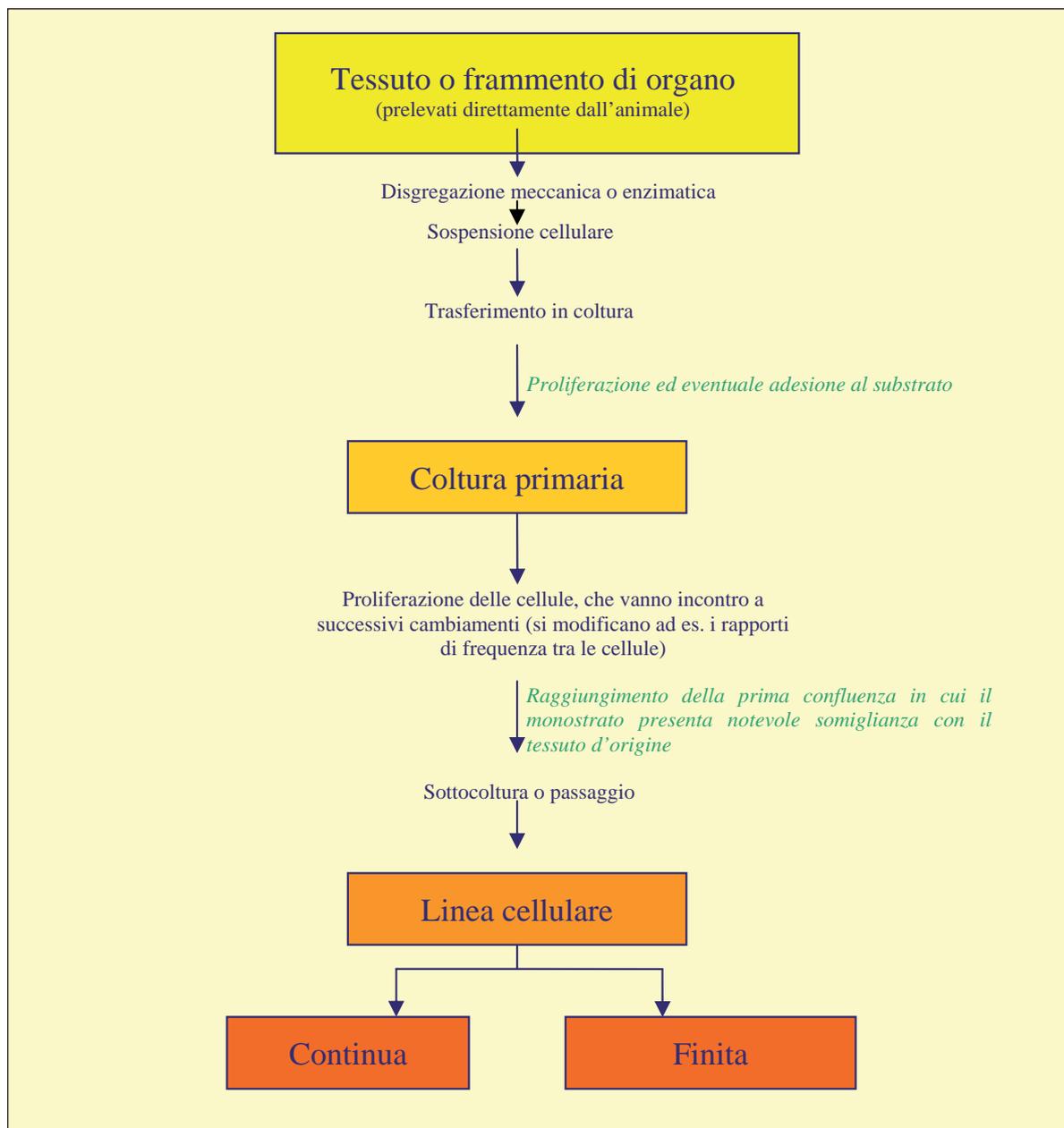


Fig. 1 - Formazione delle colture primarie e delle linee cellulari

Economicità e rapidità di risposta. Le colture di cellule possono essere esposte direttamente ai campioni di prova (sostanze chimiche o campioni di matrici ambientali), a concentrazioni basse e relativamente definite. A tale proposito, sebbene non si verifichino le perdite dovute a fenomeni di distribuzione ed escrezione, riscontrabili nell'esposizione *in vivo*, tuttavia, anche *in vitro*, va presa in considerazione la concentrazione biodisponibile del campione di prova (vedi capitolo 3). L'interazione del campione con le cellule, consente una valutazione molto rapida (anche di ore) dell'effetto sulle attività cellulari e permette inoltre, di verificare la reversibilità della risposta.

Disponibilità. Sono disponibili in commercio molte linee cellulari, provenienti da varie specie, ca-

ratterizzate sia dal punto di vista del cariotipo che di eventuali marcatori specifici e garantite contro le contaminazioni microbiche e cellulari. Il 30% di queste linee è di origine umana e si tratta perlopiù di cellule tumorali provenienti da biopsie di pazienti affetti da tumori di varia natura.

Limiti

Perdita della struttura tridimensionale. Il passaggio vivo-vitro causa la perdita delle interazioni specifiche cellula-cellula, delle caratteristiche istologiche del tessuto di origine e dei componenti coinvolti nella regolazione omeostatica (soprattutto quelli dei sistemi nervoso ed endocrino). Vi sono inoltre, alterazioni metaboliche con caduta di alcuni livelli enzimatici (ad esempio il **citocromo P450**) o variazioni di cicli metabolici, per cui il metabolismo energetico delle cellule è basato in massima parte sulla glicolisi. A causa della forte selezione a favore delle cellule più attivamente proliferanti, la coltura subisce anche una perdita delle proprietà differenziate.

Instabilità. Molte linee continue sono caratterizzate da un corredo cromosomico **aneuploide**, largamente instabile. Le linee a vita finita sono costituite da una popolazione cellulare eterogenea che può originare variabilità da un passaggio all'altro.

La vita di una coltura cellulare può essere schematicamente divisa in tre fasi: coltura primaria, sviluppo di una linea cellulare, senescenza o trasformazione. Nell'ambito di tali fasi la composizione e le caratteristiche delle cellule presenti variano notevolmente. Inizialmente la coltura è composta da cellule staminali multipotenti, cellule determinate (programmate per il differenziamento) e cellule mature differenziate, in equilibrio tra loro. Le condizioni ambientali successive possono alterare questo equilibrio, per cui passaggi seriali a densità relativamente basse stimolano la proliferazione, mentre ad alte densità, con basse concentrazioni di siero e ormoni appropriati, viene favorito il differenziamento.

La definizione dei tipi cellulari presenti in una coltura dipende dall'animale/organo/tessuto d'origine. Le linee cellulari provenienti da embrioni contengono soprattutto cellule staminali e cellule determinate rispetto a quelle provenienti da animali adulti e, per questo motivo, presentano una maggiore adattabilità alle condizioni di coltura. Colture provenienti da tessuti soggetti a continuo rinnovamento *in vivo* (epidermide, epitelio intestinale, cellule ematopoietiche), essendo ricche di cellule staminali, vanno incontro, nelle opportune condizioni sperimentali, ad una sopravvivenza pressoché illimitata, mentre le linee cellulari provenienti da tessuti che si rinnovano solo in condizioni di stress (tessuto muscolare, connettivo) contengono esclusivamente cellule differenziate e sono destinate ad una vita limitata in coltura.

Perché una coltura cellulare possa vivere e accrescersi, è necessario predisporre un ambiente idoneo che garantisca un substrato adatto, la temperatura ottimale, un'adeguata fase gassosa e un terreno di coltura in cui siano presenti tutte le sostanze necessarie.

Il substrato. Sebbene alcune cellule, come quelle ematopoietiche e i tumori ascitici, crescano in sospensione, tutte le altre si accrescono come monostrato adeso ad un substrato artificiale. Il substrato è solitamente costituito da contenitori di plastica (soprattutto in polistirene), monouso, che consentono un adeguato controllo della sterilità. Alcune linee cellulari, come i neuroni, le cellule muscolari e alcuni tipi di cellule epiteliali, richiedono il pretrattamento della superficie plastica con gelatina, collagene o polilissina per incrementare la crescita e favorire il differenziamento cellulare. In alcuni casi vengono utilizzate delle matrici tridimensionali, come spugne di cellulosa o gelatine di collagene, per permettere lo stabilirsi di interconnessioni simili a quelle presenti nei tessuti. La scelta del tipo di contenitore di crescita, dipende da diversi fattori, quali: la modalità di crescita, la resa cellulare, il tipo di atmosfera, il tipo di analisi da effettuare e il costo.

Fase gassosa. La concentrazione di ossigeno impiegata per le colture cellulari è quella atmosferica, eccetto che per le colture d'organo che richiedono ossigeno al 95%. L'anidride carbo-

nica svolge invece un ruolo più complesso, perché da essa dipendono sia il pH che la concentrazione di ioni bicarbonato (HCO_3^-). Dalla concentrazione atmosferica di CO_2 dipende quella della CO_2 nel terreno di coltura e quindi anche quella di H_2CO_3 e degli ioni H^+ e HCO_3^- . La concentrazione di bicarbonato nel terreno di coltura delle cellule, deve quindi essere regolata considerando la concentrazione atmosferica di CO_2 , la concentrazione cellulare, il tipo di contenitore (con o senza tappo, tappo ventilato), e l'eventuale presenza di altri ioni.

Temperatura. Le linee cellulari di mammifero crescono ad una temperatura ottimale di 37°C , quelle che derivano da uccelli a 38°C , mentre quelle di animali a sangue freddo presentano un'ampia tolleranza di temperature ($15\text{-}26^\circ\text{C}$), pur presentando, per la crescita ottimale, valori che dipendono dalle temperature dell'habitat in cui normalmente vivono. Per quanto riguarda le cellule di mammifero, esse sopportano bene gli abbassamenti di temperatura, sopravvivendo per alcuni giorni a 4°C e rimanendo vitali dopo il congelamento in azoto liquido (-196°C); al contrario, non tollerano aumenti della temperatura e muoiono rapidamente a 40°C .

Terreno di coltura. La possibilità di coltivare ed espandere le cellule *in vitro*, comporta la necessità di scegliere un terreno di coltura idoneo. Tale scelta deve essere effettuata tenendo presenti: a) le esigenze nutrizionali delle cellule; b) lo scopo per cui esse vengono coltivate; c) le modalità di preparazione del terreno e le apparecchiature richieste; d) i costi relativi all'acquisto e alla preparazione del terreno stesso.

I terreni di coltura, nelle loro diverse formulazioni, contengono principalmente: aminoacidi, vitamine, sali, glucosio, e minerali. Vengono spesso addizionati con siero di origine bovina, bovina fetale, equina e umana, che contiene supplementi organici, vitamine e minerali necessari alla crescita, al trasporto di molecole e all'adesione al substrato. Fin dal 1950 si è cercato di sostituire i sieri con terreni sintetici dalla composizione definita (terreni *serum-free*), molti dei quali sono ora disponibili in commercio (Freshney, 2005). La possibilità di impiegare terreni di coltura privi di siero permette di eliminare gli effetti dannosi provocati dalla citotossicità di alcuni dei suoi componenti e dalla variabilità dovuta alla diversità delle preparazioni (lotti diversi), aumentando la riproducibilità dei risultati.

Le colture cellulari sono ampiamente utilizzate in molte applicazioni di routine della medicina e dell'industria, oltre a costituire lo strumento principale della ricerca di base per gli studi su struttura e attività delle cellule. Tra le principali applicazioni, abbiamo: l'analisi genetica di cellule somatiche ed embrionali; l'identificazione e la quantificazione delle infezioni virali; lo studio degli effetti tossici di composti chimici, campioni e inquinanti ambientali; la produzione di composti biologici (ad es. ormone della crescita e insulina); la produzione di anticorpi monoclonali; la formazione di strutture differenziate (ad es. lamine di epidermide per trapianti, chirurgia ricostruttiva, ecc...).

La ragione scientifica a sostegno dell'uso delle colture di cellule per predire la tossicità *in vivo* all'intero animale, è la constatazione che l'interazione iniziale delle sostanze chimiche con un organismo, avviene, a livello cellulare (citotossicità basale di Ekwall, 1995). Successivamente, le modificazioni cellulari possono provocare cambiamenti funzionali a livello di tessuto o di organo, fino ad influenzare l'intero organismo. Sulla base del ruolo centrale delle cellule nell'espressione della tossicità, l'Organizzazione per la Cooperazione e lo Sviluppo Economico (OCSE) ha approvato, come alternativa ai saggi *in vivo*, molti sistemi cellulari di mammifero per la valutazione dei pericoli per la salute umana. Un esempio di questo, è dato dal saggio di fototossicità con il Rosso Neutro eseguito con la linea cellulare Balb/c 3T3 di topo, che è stato convalidato per determinare la tossicità delle sostanze chimiche in presenza di radiazioni ultraviolette (Spielmann et al., 2000).

Le colture cellulari, oltre il loro potenziale di sostituzione e/o riduzione del numero di animali nei saggi di tossicità, hanno altri vantaggi:

1. La valutazione rapida, di un elevato numero di sostanze potenzialmente tossiche, con l'analisi spettrofluorimetrica in piastre multipozzetto. A tale proposito, merita ricordare che la recente rivoluzione tecnologica in ambito tossicologico (figura 2) avvenuta con l'introduzione delle metodologie *high-throughput* (HTS), caratterizzate da un elevato livello di automazione, ha ridotto enormemente i tempi d'esecuzione dei saggi. La rivista Science (Collins et al., 2008) ha stimato che, con le nuove tecnologie HTS, è sufficiente un solo giorno per analizzare più di 10,000 composti chimici con linee cellulari umane, a fronte dei 100 composti/anno valutati *in vivo* con cavie di laboratorio.

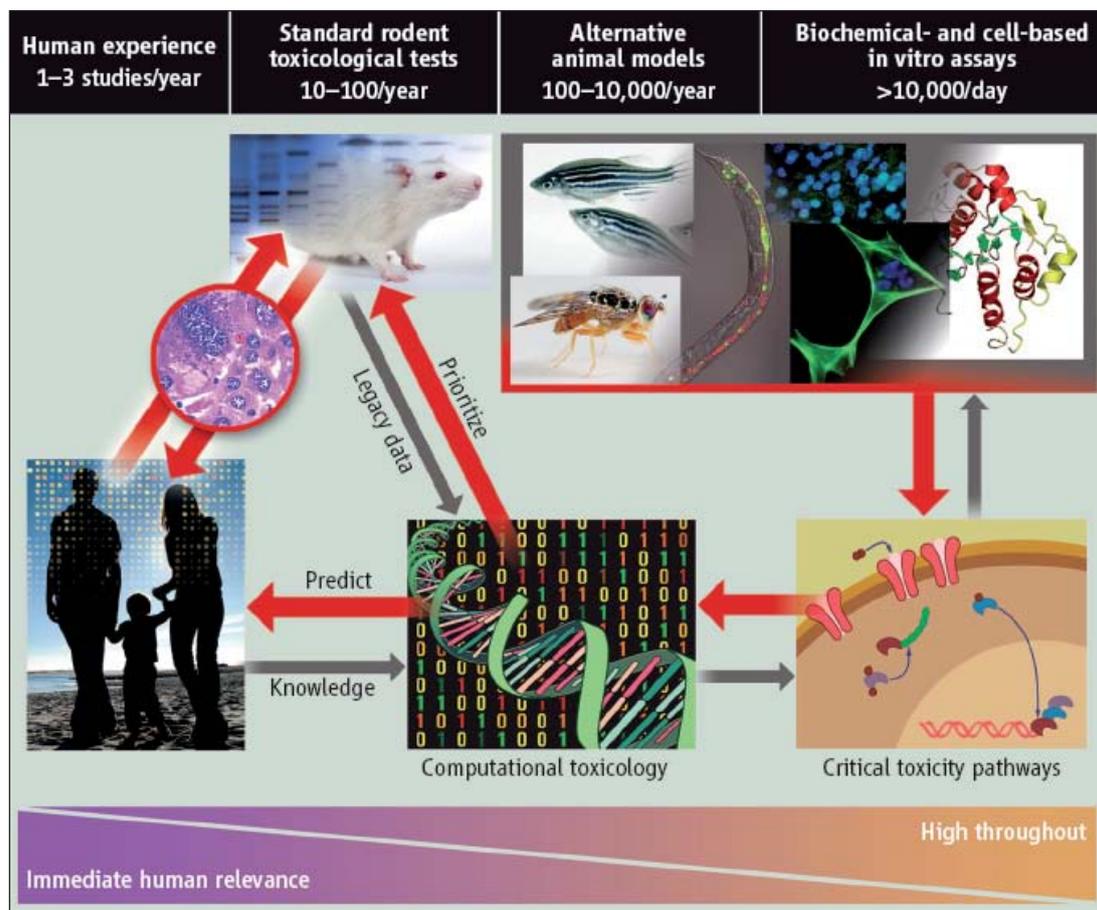


Fig. 2 – La rivoluzione cellulare nella tossicologia. Immagine tratta da: <http://www.genome.gov/26524913>

2. La notevole diminuzione di quantità di sostanza potenzialmente tossica impiegata nell'esecuzione dei saggi e, di conseguenza, di rifiuti prodotti dalla sperimentazione.
3. La possibilità di studiare i meccanismi d'azione delle sostanze tossiche.
4. L'opportunità di risparmiare anche il sacrificio dell'animale donatore, se vengono utilizzate le linee cellulari continue.

Negli ultimi 20 anni si sono verificati enormi progressi tecnologici e scientifici comprendenti la nascita della genomica funzionale, lo sviluppo della biologia computazionale e della **bioin-**

formatica, la diffusione delle piattaforme robotizzate per lo screening ad alta efficienza delle sostanze chimiche e, più recentemente, il sequenziamento del genoma umano. Le nuove tecnologie hanno messo a segno una rivoluzione nel campo della biologia molecolare, portando alla nascita di centri di ricerca specializzati, nonché di iniziative collaborative tra vari Paesi allo scopo di esplorare e sfruttare queste nuove opportunità. Simili iniziative hanno già prodotto una vasta quantità di dati riguardanti il funzionamento degli organismi viventi a livello di geni, proteine, metaboliti e altri componenti cellulari e biochimici. Per questo motivo, l'International Life Sciences Institutes (ILSI) ha provveduto a formare un gruppo di esperti per studiare le questioni pertinenti all'accettabilità e uso delle nuove tecnologie per la valutazione dei rischi per la salute umana e dell'ambiente (Seidle and Stephens, 2009).

Il rapporto del National Research Council (NRC) "Toxicity testing in the 21st century: a vision and a strategy" (2007), raffigura, per la tossicologia e l'ecotossicologia, un futuro in cui i test di tossicità saranno effettuati solo su cellule umane o su linee cellulari *in vitro*, attraverso la valutazione dei cambiamenti delle risposte cellulari, utilizzando metodologie che impiegano robotiche ad alta efficienza (Andersen and Krewski, 2009). La tossicologia del 21 secolo sarà caratterizzata quindi da maggiore flessibilità, bassi costi, rapidità d'esecuzione ed elevata produttività (figura 3).

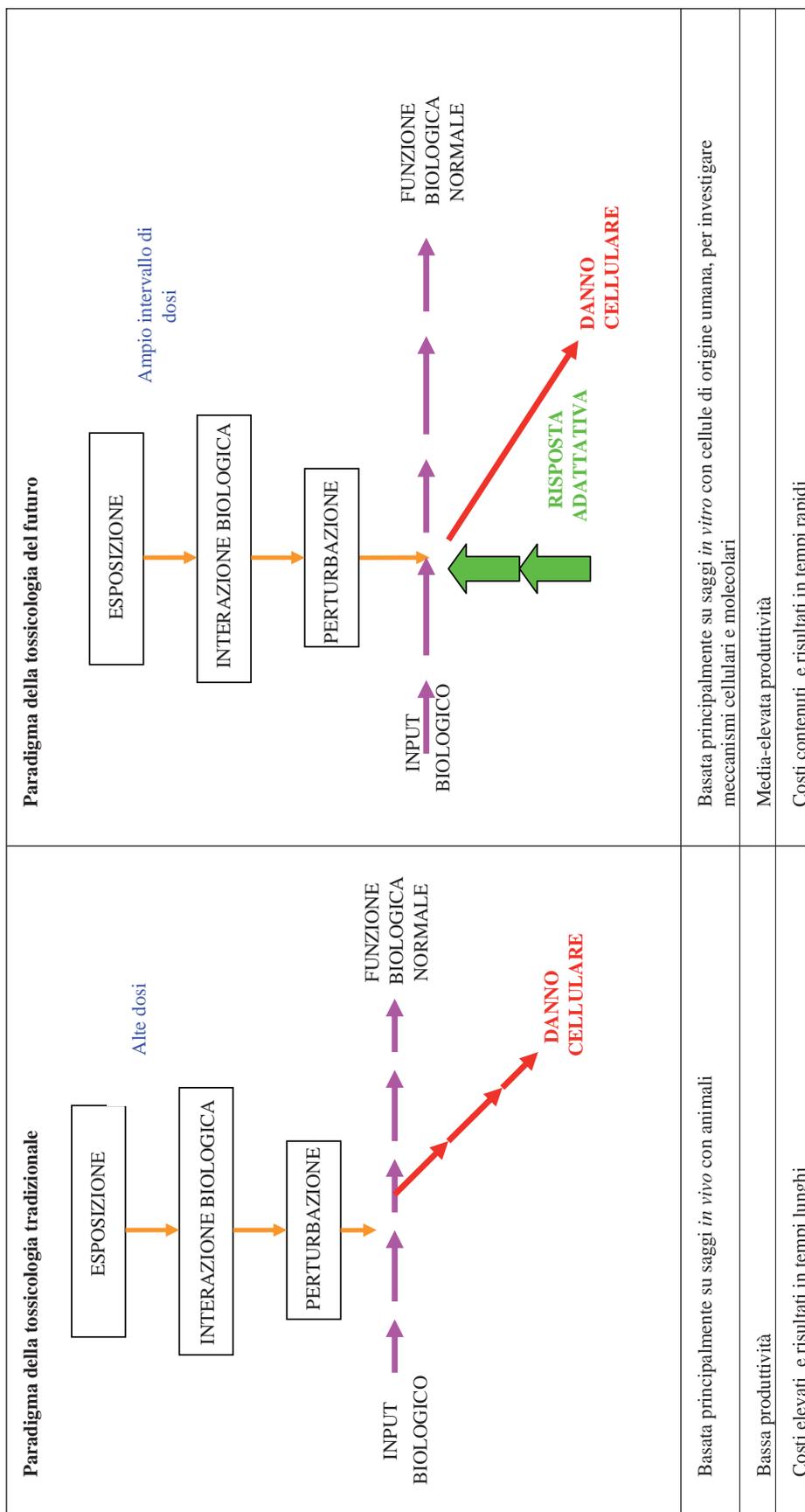


Fig. 3 – Confronto tra le caratteristiche della tossicologia tradizionale e le nuove prospettive future.

3. LE COLTURE CELLULARI DI PESCE

I pesci sono la principale specie di vertebrati utilizzata per la valutazione dell'ecotossicità nella sorveglianza ambientale, nel monitoraggio e nella ricerca. Gli obblighi introdotti dalla normativa REACH, riguardanti i saggi condotti con specie ittiche per la valutazione di pericolosità delle sostanze chimiche sono, riportati in tabella 5.

Tab. 5 – I saggi con pesci previsti dal Regolamento REACH

Regolamento REACH	Saggio	Endpoint misurato	Linea guida OCSE
Allegato VIII ≥ 10 tonnellate/anno	<ul style="list-style-type: none"> Saggio di tossicità a breve termine (o eventualmente a lungo termine, se lo ritiene il dichiarante) 	Mortalità	Fish acute toxicity test. Guideline n° 203: 1992. Recentemente revisionata con l'introduzione del "Threshold Approach"
Allegato IX ≥ 100 tonnellate/anno	<ul style="list-style-type: none"> Saggio di tossicità a lungo termine con pesci adulti Saggio di tossicità con pesci nelle prime fasi di vita Saggio di tossicità a breve termine con pesci nelle fasi embrionali e di avannotto Saggio di accrescimento con pesci in fase giovanile 	Mortalità Effetti letali e subletali. Sono utilizzate uova fecondate Effetti letali e subletali sugli stadi di embrione, e di larva con sacco vitellino Effetti sul tasso di crescita di pesci allo stadio di giovanili	Fish prolonged toxicity test: 14-day study. Guideline n° 204: 1984 Fish, early-life stage toxicity test. Guideline n° 210: 1992 Fish, short-term toxicity test on embryo and sac-fry stages. Guideline n° 212: 1998 Fish juvenile growth test. Guideline n° 215: 2000
Allegato X Identificazione di PBT e vPvT	<ul style="list-style-type: none"> Saggio di bioaccumulo 	Potenziale di bioconcentrazione della sostanza di prova	Bioconcentration: flow-through fish test. Guideline n° 305: 1996

OCSE: Organizzazione per la Cooperazione e lo Sviluppo Economico, in inglese OECD ; PBT: sostanze Persistenti, Bioaccumulabili, Tossiche; vPvT: sostanze altamente Persistenti e altamente Tossiche.

Il saggio con pesci che viene maggiormente utilizzato, sia per le sostanze chimiche, che per le acque di scarico, è quello della tossicità a breve termine, che prevede la valutazione della LC₅₀ (concentrazione del campione di prova che provoca la morte del 50% degli organismi) dopo 96 ore di esposizione. Il test va eseguito in 3 repliche, ognuna delle quali richiede l'esposizione di 7-10 pesci/concentrazione, ad almeno 5 concentrazioni del campione di prova, più il controllo (in totale da 126 a 180 pesci per la valutazione di un solo composto chimico).

Il Medical Research Council Institute for Environment and Health (IEH) aveva dichiarato, prima dell'entrata in vigore del Regolamento Europeo, che la registrazione, nella CE, delle 30,000 sostanze chimiche previste, avrebbe richiesto l'impiego di 12,8 milioni di vertebrati, di cui almeno 4,4 milioni di pesci. Queste previsioni si sono rivelate ottimistiche, come viene mostrato dai dati di tabella 6.

Tab. 6 – Previsioni e stato delle cose in ambito REACH

	Previsione (IEH, 2006)	Stato delle cose (Leist et al., 2009)
N° Sostanze chimiche /Produttori	30,000/27,000	144,000/65,000
Numero di pre-registrazioni	180,000	> 2,7 milioni
N° animali vertebrati	12,8 milioni	30 milioni
N° pesci	4,4 milioni	10,3 milioni

Per ridurre l'impiego di pesci sono stati proposti due sistemi *in vitro*: gli embrioni di *Brachydanio rerio* (Zebrafish embryos test) e le colture di cellule di pesce o di mammifero.

Le cellule di mammifero sono state applicate spesso a studi di tossicologia acquatica. Sebbene, si possano riconoscere delle similarità tra cellule di mammifero e cellule di pesce, soprattutto per quanto concerne i meccanismi cellulari di base, la superiorità di queste ultime nell'ambito della valutazione dell'impatto delle sostanze chimiche sull'ambiente acquatico, deriva da almeno tre considerazioni:

1. Le sostanze chimiche vengono applicate alle cellule di pesce a temperature molto simili a quelle cui vivono i pesci.
2. Non è corretto estrapolare la suscettibilità dei pesci ai composti tossici, impiegando uno strumento d'indagine che proviene da una specie differente.
3. Le cellule di pesce riflettono meglio le caratteristiche della specie da cui sono originate, di quanto non facciano le cellule di mammifero. Unica eccezione a questa evidenza è il caso in cui le proprietà funzionali di una linea cellulare risultino più importanti della specie da cui le cellule provengono (Bols et al., 2005).

In ambito ecotossicologico sono state utilizzate sia colture primarie che linee stabilizzate di pesce. Le prime, poiché conservano molte delle strutture dei tessuti d'origine e continuano ad esprimere alcune funzioni cellulari di questi, risultano specificatamente utili per indagini riguardanti il destino e l'azione dei composti tossici. Sono note colture primarie di pesce provenienti da fegato, epitelio cutaneo e branchiale, gonadi, macrofagi renali, tessuti endocrini, cellule muscolari e globuli bianchi del sangue. Lo svantaggio principale derivante dal loro uso è la variabilità della risposta in funzione dello stato fisiologico del pesce donatore e/o della qualità del procedimento d'isolamento delle cellule.

Le linee cellulari stabilizzate di pesce rappresentano un sistema armonizzato e di facile impiego che presenta una variabilità relativamente bassa. Il loro uso è conveniente da un punto di vista economico e meno laborioso rispetto sia agli animali che alle colture primarie, sebbene tale sistema cellulare risulti scarsamente caratterizzato dal punto di vista delle proprietà cellulari e funzionali. La prima linea cellulare stabilizzata di pesce, denominata RTG-2 (Rainbow Trout Gonad), è stata sviluppata dalle gonadi della trota arcobaleno (*Oncorhynchus mykiss*) allo stadio giovanile, per studi di virologia ittica (Wolf and Quimby, 1962). Attualmente, esistono più di 150 linee cellulari stabilizzate di pesce (Castaño et al., 2003). La maggior parte sono di tipo fibroblastico o epiteliale, crescono quindi aderenti al substrato e hanno avuto origine da tessuti di salmonidi e ciprinidi.

Le linee cellulari di pesce possono essere acquistate presso Enti certificati (tabella 7) o procurate nell'ambito della comunità scientifica. Il numero di linee cellulari certificate e depositate rappresenta, probabilmente, solo una piccola parte di tutte le tipologie di colture ittiche sviluppate dai ricercatori nelle varie parti del mondo. Tuttavia, il loro impiego è fortemente consigliato, per ragioni metodologiche e normative. Queste cellule sono infatti sottoposte a rigorosi controlli di qualità che ne garantiscono le caratteristiche morfologiche e genotipiche, nonché l'assenza di contaminazioni (da funghi, batteri e micoplasma); inoltre, l'applicazione dei principi di Buone Pratiche di Laboratorio (BPL) richiede l'utilizzo di substrati biologici certificati.

Le linee guida OECD per le BPL sono scaricabili gratuitamente sul sito:

http://www.oecd.org/departement/0,3355,en_2649_34381_1_1_1_1_1,00.html

Tab. 7 – Enti certificati per colture cellulari

Ente certificato	Nazione	Indirizzo web
Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia – Centro di referenza nazionale Substrati Cellulari	Italia	http://www.wizsler.it/
American Type Culture Collection (ATCC) The Global Bioresource Centre	USA	http://www.atcc.org/
German Collection of Microorganisms and Cell Cultures (DSMZ)	Germania	http://www.dsmz.de/
European Collection of Cell Cultures (ECACC) a Health Protection Agency Culture Collection	Regno Unito	http://www.hpacultures.org.uk/collections/ecacc.jsp

Nella tabella 8 sono riportate le caratteristiche di crescita (mezzo di coltura, temperatura di mantenimento, tessuto di provenienza) delle linee cellulari stabilizzate di pesce maggiormente utilizzate (Conti et al., 2009). I terreni di coltura e i sieri sono quelli già impiegati per la crescita delle cellule di mammifero e principalmente: Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM), Eagle's Minimum Essential Medium (EMEM), Leibovitz's L-15 Medium (L-15M), Dulbecco's Modified Eagle Medium-Nutrient Mixture F12 Ham (DMEM:F12), addizionati con siero fetale bovino (FBS) o siero di vitello (FCS) al 5-10%. Le linee cellulari derivate da specie ittiche marine richiedono la presenza di cloruro di sodio nel terreno di coltura (Babich e Borenfreund, 1991; Bols et al., 2005)

Le linee cellulari stabilizzate di pesce hanno alcuni vantaggi tecnici che le rendono uno strumento sperimentale interessante e degno di approfondimento:

- Alcune di esse possono essere incubate a temperatura ambiente (20°C) e in atmosfera normale (quindi non è necessario l'incubatore a CO₂ come per le cellule di mammifero).
- Possono essere conservate per lunghi periodi (fino a 2 anni) a 4 °C, per cui il congelamento o la conservazione in azoto liquido possono essere evitati.
- Possono essere esposte a campioni ambientali con differenti osmolarità (con le cellule di mammifero, è possibile solo con quelle renali) (Castaño et al., 2003).

Da oltre 30 anni, i ricercatori propongono, per valutare la pericolosità dei composti chimici, l'uso dei saggi di citotossicità *in vitro* con cellule di pesce, in alternativa al saggio di tossicità a breve termine *in vivo* con pesci. La citotossicità può essere determinata mediante diversi **endpoint** cellulari, quali: misure di letalità o vitalità, di funzionalità, cambiamenti della morfologia, del metabolismo energetico, distacco e proliferazione cellulare. Alcuni tra i metodi più frequentemente utilizzati con le cellule di pesce sono: il Test del Rosso Neutro (NRU, Neutral Red Uptake) e il test MTT (Tetrazolium salt reduction assay).

Nonostante la risposta citotossica *in vitro* possa variare tra le diverse linee cellulari in funzione di differenze nell'attività metabolica o di variazioni metodologiche (composizione del siero, tempo di esposizione, temperatura d'incubazione, modalità di esecuzione dei saggi), molti studi hanno mostrato una buona correlazione con i risultati della tossicità acuta.

Tab. 8 – Caratteristiche di crescita di alcune linee cellulari stabilizzate di pesce

Linea cellulare	Specie ittica	Tessuto di provenienza	Composizione del terreno di coltura	T incubazione (°C)
BF-2	<i>Lepomis macrochirus</i>	Porzioni caudali del tronco	1) MEM (HBSS) o MEM (EBSS) con Glu 2 mM, NaHCO ₃ 850 mg/L, NEAA 1%, NaP 120 mg/L, siero FBS 10% 2) Miscela di MEM HBSS e MEM EBSS e siero FBS 1-2% ottimale per la stabilità del monostrato e come terreno di mantenimento	23-26
CCO	<i>Ictalurus punctatus</i>	Ovario	EMEM (EBSS) con Glu 2 mM, NEAA 1%, siero FBS 10%	NS
CLC	<i>Cyprinus carpio</i>	Leucociti di sangue periferico	1) EMEM (EBSS) con Glu 2 mM, NEAA 1%, siero FBS 10% 2) TC-199 con Glu 2 mM, NEAA 1%, siero FBS 10%	25-28
CAR	<i>Carassius auratus</i>	Pinne embrionali	EBM (HBSS) o EMEM (EBSS), siero FCS 10%	25
FHM	<i>Pimephales promelas</i>	Porzioni caudali del tronco	EMEM (EBSS) e siero FCS 10%	34
Hepa-T1	<i>Oreochromis niloticus</i>	Fegato	Xcell300 con Glu 2mM e siero FBS 5%	26-28
RTG-2	<i>Oncorhynchus mykiss</i>	Gonadi	EMEM (EBSS) con Glu 2 mM, NEAA 1%, siero FBS 10%	4-24
R1	<i>Oncorhynchus mykiss</i>	Fegato	Medium 199 (HEPES 25 mM) in EBSS, Glu 2 mM, siero FBS 10%	20
RTO	<i>Oncorhynchus mykiss</i>	Ovario	EMEM (EBSS) con aminoacidi e vitamine, siero FBS 10%	24
TPS	<i>Oncorhynchus mykiss</i>	Rene anteriore	RPMI 1640 con Glu 2 mM, Hepes 25 mM, NaP 2,5 mM, Idrocortisone 0,01 mM, Guanosina 0,088 mM, Citidina 0,0225 mM, Adenosina 0,094 mM, Uridina 0,102 mM, HS 10%, siero FBS 10%,	4-22
CHSE-214	<i>Oncorhynchus tshawytscha</i>	Embrione	EMEM (EBSS) con Glu 2 mM, NEAA 1% NaP 120 mg/L, siero FBS 10%	20-26
PG	<i>Exocoetia lucius</i>	Ovario	MEM + Glu 2 mM, siero FBS 10%	4-25
WCI	<i>Stizostedion vitreum</i>	Sarcoma del derma	EMEM (EBSS) e siero FCS 10%	22

Abbreviazioni: MEM (HBSS): Eagle's Minimum Essential Medium con Earle's Balanced Salt Solution; MEM (HBSS): Eagle's Minimum Essential Medium con Hanks' Balanced Salt Solution; Glu: Glutamina; NaP: Sodio Piruvato; NEAA: Non essential Amino Acids; FBS: Fetal Bovine Serum; FCS: Fetal Calf Serum; EBM: Eagle's Basal Medium; HS: Horse Serum; HEPES: acido 4-2-idrossietil-1-piperazinil-etansolfonico; T: temperatura; NS: non specificato.

In particolare, 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 i diversi saggi di citotossicità basale) e i valori di LC_{50} *in vivo* (ottenuti nel saggio acuto con pesci). I vari studi, riassunti in tabella 9, evidenziano, per la maggior parte dei gruppi di sostanze chimiche sottoposte a valutazione, un coefficiente di correlazione $r \geq 0,80$ (correlazione lineare positiva). Sebbene questi risultati dimostrino una comparabilità tra i sistemi *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 (minore sensibilità), dei corrispondenti valori di LC_{50} *in vivo*. Questo significa che, per indurre un effetto tossico misurabile, le colture cellulari *in vitro* richiedono concentrazioni (nominali) di sostanza chimica più elevate rispetto a quelle necessarie nei saggi *in vivo* (Bols et al., 1985; Segner et al., 1993; Castaño et al., 1996; Fent, 2001; Castaño et al., 2003; Schirmer, 2006; Kramer, 2009).

Clemedson et al. (1998a, 1998b) hanno dimostrato che nella valutazione di molti composti chimici la sensibilità delle linee cellulari stabilizzate di pesce è, tuttavia, confrontabile, con quella delle cellule di mammifero, ipotizzando dunque che il problema della minore sensibilità non sia legato alla specie ittica, ma a tutti i sistemi *in vitro* in quanto tali. A tale proposito, come mostrato nella tabella 10, il confronto tra i valori di EC_{50} , ottenuti con diverse linee cellulari umane (n=8), di mammifero (n=6) e di pesce (n=2), mostra livelli simili di sensibilità ai composti chimici analizzati.

In generale, la minore sensibilità dei sistemi *in vitro* rispetto ai saggi *in vivo* costituisce il punto più controverso in merito all'uso delle colture cellulari, perché limita la loro applicazione in tutti quei casi in cui la sensibilità è un requisito fondamentale, come nella valutazione dei livelli di pericolosità per la salute dell'uomo e dell'ambiente.

Sono diverse le ragioni che possono spiegare la minore sensibilità dei sistemi cellulari *in vitro*. In primo luogo, una singola coltura di cellule ha un numero di siti-bersaglio inferiore rispetto ad un intero organismo, di cui, quindi, non riesce a rappresentarne, in modo completo, la diversità e complessità. Questo aspetto non sempre viene considerato con attenzione. Infatti, la disponibilità di colture cellulari provenienti dai vari organi e tessuti dei pesci è ancora piuttosto limitata.

D'altra parte, l'adozione del concetto di citotossicità basale di Ekwall (1995) sottintende che la selezione del sistema cellulare sia di secondaria importanza (Schirmer, 2006), e che la scelta della linea cellulare di pesce per il confronto *in vitro/in vivo*, sia determinata principalmente dalla disponibilità, piuttosto che dalla presenza di specifiche funzioni o bersagli nelle cellule. Per migliorare la sensibilità dei saggi di citotossicità è quindi necessario, per prima cosa, sviluppare e utilizzare dei modelli *in vitro* che riflettano la diversità funzionale e la complessità dei siti bersaglio su cui agiscono le varie classi di composti chimici. Attualmente sono disponibili linee cellulari continue che conservano alcune delle funzioni del tessuto da cui sono originate, quali, ad esempio, le cellule RTL-W1 (Rainbow Trout Liver) originate dal fegato, capaci di bioattivare composti chimici come il benzo(a)pirene; i macrofagi RTS-11 (Rainbow Trout Spleen) originati dalla milza, in grado di esprimere alcune citochine (fattore di necrosi tumorale $TNF\alpha$, fattore di crescita $TGF\beta$) e le interleuchine 1 β , 8, 11 e 18 (Wang et al., 2005; Zou et al., 2004); gli epatociti ZF-L (zebrafish liver) capaci di indurre il complesso enzimatico P450 coinvolto nel metabolismo di varie classi di composti chimici (Collodi et al., 1994).

Tab. 9 - Confronto tra i valori di EC₅₀ ottenuti con linee cellulari stabilizzate di pesce e i valori di LC₅₀ ottenuti con il test acuto *in vivo* con pesci, per diverse classi di composti chimici (i dati sono tratti e modificati da Castaño et al., 2003 e da Schirmer, 2006)

Linea cellulare vs specie ittica	Endpoint	Composto chimico	n	Correlazione ^a r	Precisione ^b	Riferimento bibliografico
RTG-2 vs <i>Oncorhynchus m.</i>	Distacco cellulare	Fenoli, benzene, aniline	9	0,92	La linea cellulare è meno sensibile del pesce di 3 ordini di grandezza	Bols et al., 1985
RTG-2 vs <i>Oncorhynchus m.</i>	Distacco cellulare	Vari	26	0,98	La linea cellulare è meno sensibile del pesce di 1-2 ordini di grandezza	Castaño et al., 1994
RTG-2 vs <i>Oncorhynchus m.</i>	Metabolismo energetico	Vari	26	0,97		
RTG-2 vs <i>Danio rerio</i>	Vitalità cellulare	Vari	5	0,95	La linea cellulare è meno sensibile del pesce di 1 ordine di grandezza	Lange et al., 1995
RTG-2 vs <i>Danio rerio</i>	Incorporazione di RN	Vari	4	0,99		
RTG-2 vs <i>Leuciscus idus</i>	Incorporazione di RN	Composti dello studio MEIC ^c	-	n.q.	La linea cellulare è meno sensibile del pesce in funzione del composto chimico studiato, fino a 3 ordini di grandezza	Segner, 2004
PLHC-1 vs <i>Oryzias latipes</i>	Vitalità cellulare	Composti organici a base di stagno	9	0,80	La linea cellulare è meno sensibile del pesce di 2 ordini di grandezza	Bräschviler et al., 1995
BGF/F vs <i>Pleuronectes Platessa</i>	Incorporazione di RN	Composti organici a base di piombo	4	0,99	La linea cellulare è da 5 a 21 volte meno sensibile del pesce	Babich et al., 1990
GFS vs <i>Cyprinus carpio</i>	Incorporazione di RN	Pesticidi organofosforati e non	34	0,85	La linea cellulare è meno sensibile del pesce di circa 1 ordine di grandezza	Saito et al., 1991
GFS vs <i>Pimephales promelas</i>	Incorporazione di RN	Solo Pesticidi organofosforati	-	0,69		
		Narcotici, aniline, fenoli	31	0,96	La linea cellulare è meno sensibile del pesce di 1 ordine di grandezza	Saito et al., 1993
GFS vs <i>Carassius auratus a.</i>	Vitalità cellulare	Fenoli clorurati	7	0,96	La linea cellulare è meno sensibile del pesce di 1 ordine di grandezza	Saito et al., 1994
GFS vs <i>Oryzias latipes</i>	Vitalità cellulare	Fenoli clorurati	15	0,92		
FHM vs <i>Leuciscus idus</i>	Incorporazione di RN	Vari	28	0,93	La linea cellulare è risultata da 1,2 a 60 volte meno sensibile del pesce per 24 dei 28 casi e da 2 a 67 volte meno sensibile per 4 dei 28 casi	Dierckx and van de Vyver, 1991
FHM vs <i>Leuciscus idus</i>	Contenuto proteico (metodo di Lowry)	Solventi lipofili	-	0,43	La linea cellulare è meno sensibile del pesce di 2 ordini di grandezza	Dierckx, 1993
CHSE vs <i>Oncorhynchus m.</i>	Metabolismo (Alamar Blue)	Antimuffa	-	0,95	Le cellule sono meno sensibili del pesce di 2 ordini di grandezza	Okamura et al., 2002

Abbreviazioni: RN: Rosso Neutro n: numero di osservazioni; r: coefficiente di correlazione; n.q.: non quantificabile; RTG-2: Rainbow Trout Gonad cells; PLHC-1: Poeciliopsis lucida hepatocellular carcinoma line 1; BGF/F: Bluegill smfish cell; GFS: Gold fish scale cell line; FHM: Fathead Minnow cell line; CHSE: Chinook salmon embryo cells. **Spiegazioni:** ^a: Il coefficiente di correlazione è ottenuto dalla comparazione tra i valori di EC₅₀ *in vitro* vs LC₅₀ *in vivo*. Valori di r ≥ 0,80 indicano una forte correlazione; ^b: Sulla base della comparazione tra i valori di EC₅₀ *in vitro*, la precisione è data dalla distanza dalla linea di correlazione; 1:1 indica precisione assoluta; ^c MEIC: Multicentre Evaluation of *In vitro* Cytotoxicity; si tratta di uno studio internazionale che ha cercato di comparare il potere predittivo dei sistemi *in vitro* di cellule di pesce con la letalità acuta sui pesci *in vivo*, che ha portato alla costituzione di un database per centinaia di composti chimici.

Tab. 10 – Confronto tra i valori di citotossicità *in vitro* per linee cellulari umane, di mammifero e di pesce (tabella tratta e modificata da Clemedson et al., 1998)

Composto chimico	Linee cell. umane	Linee cell. mammifero	Linee cell. di pesce
	Media EC ₅₀ 24h (n=8)	Media EC ₅₀ 24h (n=6)	Media EC ₅₀ 24h (n=2)
Paracetamolo	-1,85	-2,14	-2,01
Acido acetilsalicilico	-2,28	-2,20	-2,39
Digoxina	-6,28	-3,24	-3,75
Metanolo	0,03	0,15	0,16
Etanolo	-0,23	-0,86	-0,15
Alcool isopropilico	-0,78	-1,16	-0,37
Fenolo	-2,13	-2,77	-2,12
1,1,1 Tricloroetano	-1,70	-1,91	-1,77
Cloruro di sodio	-1,00	-1,00	-0,84
Fluoruro di sodio	-2,16	-2,87	-2,26
Malation	-2,83	-4,24	-3,26
2,4 Acido dicloro fenossiacetico	-2,61	-2,94	-2,81
Xilene	-1,95	-2,27	-2,04
Fenobarbital	-2,14	-2,36	-1,92
Paraquat	-2,74	-3,07	-1,87
Triossido di arsenico	-4,33	-4,92	-4,00
Cloruro di mercurio (II)	-4,71	-5,07	-4,64

I valori di EC₅₀ sono espressi come logM.

Vari studi hanno messo in evidenza che la sensibilità dei saggi di citotossicità *in vitro* con cellule di pesce, può essere ulteriormente migliorata attraverso:

1. la sostituzione/riduzione della percentuale di siero fetale bovino che viene addizionato al terreno di crescita;
2. la valutazione della concentrazione effettiva di composto chimico che viene a contatto con le cellule;
3. la selezione di *endpoint* citotossici appropriati.

L'ambiente in cui le cellule vengono fatte crescere e proliferare può avere un'influenza profonda sulle loro capacità di risposta. Ad esempio, i componenti che vengono addizionati al terreno di crescita, come il siero, possono esercitare un effetto protettivo sulle cellule, che risultano, per questo motivo, meno sensibili all'azione di alcune sostanze chimiche.

Schirmer et al., 1997 hanno dimostrato che il siero, oltre a mantenere in soluzione il fluorantene, protegge le cellule branchiali di trota arcobaleno (*Oncorhynchus mykiss*), dagli effetti fototossici di questo composto, durante l'esposizione a raggi ultravioletti (UV). Hestermann et al. (2000) e Schirmer et al., 2004, hanno evidenziato che i valori di EC₅₀ per l'induzione del **citocromo CYP1A** (mediata dal recettore Aril idrocarburico, AhR) da parte della 2,3,7,8 tetraclorodibenzodiossina (TCDD) sono più bassi in assenza di siero. Al contrario, altri composti

inducenti il citocromo CYP1A sono rivelati più efficacemente nei campioni ambientali, se il siero viene addizionato al terreno di esposizione (Schirmer et al., 2004).

Le procedure di adattamento di una linea cellulare ad un terreno *serum-free* oltre ad essere lunghe e laboriose non garantiscono che le cellule saranno in grado di sopravvivere al termine del periodo di adattamento stesso. Per quanto riguarda le cellule di mammifero esistono, disponibili in commercio, diverse formulazioni di terreno *serum-free* (Freshney, 2005). Per le linee cellulari di pesce PLHC-1 e RTG-2, Ackermann e Fent (1998) hanno provato l'adattamento a tre diversi terreni *serum-free* formulati per le cellule di mammifero (UltraCULTURE, UC, Biowhitaker, CH-8304 Wallisellen; TurboDoma, TD, Cell Culture Technologies, CH-8052 Zurich; Dulbecco's MEM/Nutrient Mix F12 1:1, addizionato con "Controlled process serum replacement-type 1" al 10%, Sigma Chemie, CH-9471 Buchs), verificando, al termine della sperimentazione, che solo il terreno UC è in grado di far crescere entrambe le linee cellulari al pari del terreno DMEM normalmente utilizzato e contenente siero FCS al 10%.

I terreni *serum-free* hanno dimostrato di aumentare la sensibilità delle cellule di pesce nei saggi di citotossicità a breve termine, in cui le colture sono esposte per 24 ore o meno alla sostanza/campione di prova, (Dayeh et al., 2005; Teneva et al., 2003).

La maggior parte dei ricercatori ritiene che si debbano sviluppare nuovi terreni *serum-free* per provvedere in modo più specifico alle richieste nutrizionali delle cellule di pesce, favorendo al contempo la definizione di un protocollo d'esposizione più appropriato e sensibile per lo screening di composto chimici ed effluenti.

Oltre al siero, la rimozione di altre sostanze presenti nel terreno di crescita, ha mostrato di migliorare la sensibilità delle cellule di pesce. Ad esempio, la modificazione del terreno Leibovitz's L-15 in L-15/ex (Schirmer et al., 1997) in cui sono rimossi i composti antiossidanti e vengono mantenuti solo i sali, il galattosio e l'acido piruvico, ha dimostrato di migliorare l'espressione della citotossicità da parte delle cellule branchiali di trota arcobaleno (*Oncorhynchus mykiss*) esposte al fluorantene. La stessa formulazione di terreno L-15/ex, si è rivelata utile anche per i saggi con cellule di pesce su effluenti industriali e acque di scarico (Dayeh et al., 2002).

Un diverso sistema rivelatosi efficace per sensibilizzare le cellule in coltura, è la pre-esposizione a L-butionina-SR-sulfoximina (BSO) che riduce i livelli di L-glutatione che esercita un effetto protettivo sulle cellule stesse (Scheers et al., 2002; Dayeh et al., 2004; Dayeh et al., 2005).

Un aspetto, inoltre, non trascurabile della minore sensibilità dei sistemi cellulari *in vitro* è la determinazione della concentrazione effettiva di sostanza di prova cui vengono esposte le cellule. Infatti, a causa di fenomeni di assorbimento ed evaporazione, la frazione biodisponibile della sostanza può risultare inferiore alla sua concentrazione nominale. Alcuni studi riguardanti la distribuzione dei composti chimici idrofobici nelle piastre di coltura per cellule, hanno dimostrato, ad esempio, che quantità significative di sostanza chimica sono adsorbite dalla plastica dei contenitori per colture cellulari e che alcuni composti chimici sono in grado di legarsi alle proteine (come l'albumina) e ai lipidi del siero diventando indisponibili per le cellule.

Per misurare la concentrazione interna di esposizione (cioè la concentrazione di sostanza di prova liberamente disciolta in prossimità delle cellule) che costituisce il determinante diretto della biodisponibilità (Escher and Hermens, 2004), sono utilizzati diversi modelli (Gülden and Seibert, 1997; Hestermann et al., 2000; Gülden et al., 2002; Heringa et al., 2004; Bopp et al., 2006). In particolare, Gülden e Seibert (1997; 2005; 2007) hanno sviluppato un mo-

dello di distribuzione che permette di determinare la concentrazione citotossica libera (ECu_{50}) attraverso un algoritmo [$ECu_{50} = EC_{50} - B \cdot P / 1 + K_{ow} \cdot V_L$] che tiene conto della concentrazione dell'albumina (P) e del volume di lipidi (V_L) presenti nel siero, addizionato al terreno di coltura, del coefficiente di ripartizione ottanolo/acqua (K_{ow}) della sostanza chimica, del legame tra la sostanza chimica e l'albumina (B) e della concentrazione citotossica nominale (EC_{50}). Trasformando in ECu_{50} , i valori di EC_{50} ottenuti nei saggi di inibizione di crescita con cellule di mammifero Balb/c 3T3 e cellule di pesce R1 e RTG-2, esposte a diverse classi di composti chimici, gli autori hanno verificato una migliore corrispondenza con i valori assoluti di LC_{50} ottenuti con il saggio acuto *in vivo* con tre differenti specie ittiche *Oryzias latipes*, *Oncorhynchus mykiss* e *Pimephales promelas*. Il modello di Gülden e Seibert prevede, quindi, la misura preventiva della concentrazione di albumina e di lipidi nel terreno di coltura, e del coefficiente di ripartizione ottanolo/acqua delle sostanze chimiche che vengono analizzate. Un modo pragmatico di applicazione di questo modello viene presentato in figura 4 (Gülden e Seibert, 2007).

La concentrazione biodisponibile di alcune sostanze chimiche pu risultare inferiore a quella nominale anche a causa della loro volatilit. Per ovviare a questo problema, Wichmann et al. (2005) hanno messo a punto un sistema sperimentale, in cui le colture cellulari, mantenute in tubi parzialmente chiusi, sono sistemate in bottiglie di vetro alle quali viene addizionato, in forma gassosa, il toluene, utilizzato come composto volatile di riferimento. L'analisi chimica, eseguita con gas cromatografia *headspace*, dimostra una comparabilit tra la concentrazione esterna di toluene e quella interna alla coltura cellulare, garantendo in tal modo la riproducibilit dell'esposizione al composto volatile.

Un composto chimico esercita i suoi effetti sui vari livelli di organizzazione subcellulare, quindi la scelta dell'*endpoint* utilizzato per determinare la tossicit delle sostanze, pu avere un impatto profondo sulle concentrazioni di effetto che se ne ricavano. Nella maggior parte delle indagini di citotossicit con cellule di pesce viene preso in considerazione un unico *endpoint*, rappresentato, quasi sempre, dalla morte cellulare dopo 24 ore di esposizione al campione di prova, misurata come alterazione della permeabilit della membrana plasmatica. A tale scopo, vengono impiegati diversi tipi di coloranti e molecole (fluorescenti e non) attraverso i quali è possibile studiare anche altre alterazioni subcellulari che potenzialmente precedono la morte delle cellule.

E' stato spesso osservato che le procedure che impiegano pi coloranti fluorescenti, specifici per *endpoint* differenti, indagano meglio i meccanismi tossici delle sostanze e facilitano l'interpretazione dei risultati.

Ad esempio, Schirmer et al., (1998) hanno sviluppato una metodologia che, impiegando Alamar Blue, Rosso Neutro e 5-carbossifluoresceina diacetato (CFDA-AM), valuta contemporaneamente il metabolismo cellulare, l'integrit dei lisosomi e della membrana plasmatica. Con essa, è stato osservato che l'esposizione al benzo[a]pirene (BaP) di due linee cellulari epatiche di pesce, RTL-W1 e R1, provoca, inizialmente, una riduzione del metabolismo energetico delle cellule, come rivelato dal saggio colorimetrico Alamar Blue. Tuttavia, questa riduzione è transitoria e successivamente solo le cellule RTL-W1, che esprimono bioattivazione mediata dall'enzima CYP1A, mostrano segni significativi di morte cellulare, come rivelato dal CFDA-AM e dall'Alamar Blue (Schirmer et al., 2000). Differenti combinazioni di coloranti sono state applicate da altri ricercatori (Castano et al., 2003; Shuilleabhain et al., 2004; Davoren et al., 2005; Jos et al., 2005; Davoren et al., 2006; Zurita et al., 2007; Tan et al., 2008; Jos et al., 2009). Knauer et al., 2007, e Kramer et al., 2009 oltre a raccomandare l'utilizzo di batterie di saggi di citotossicit *in vitro*,

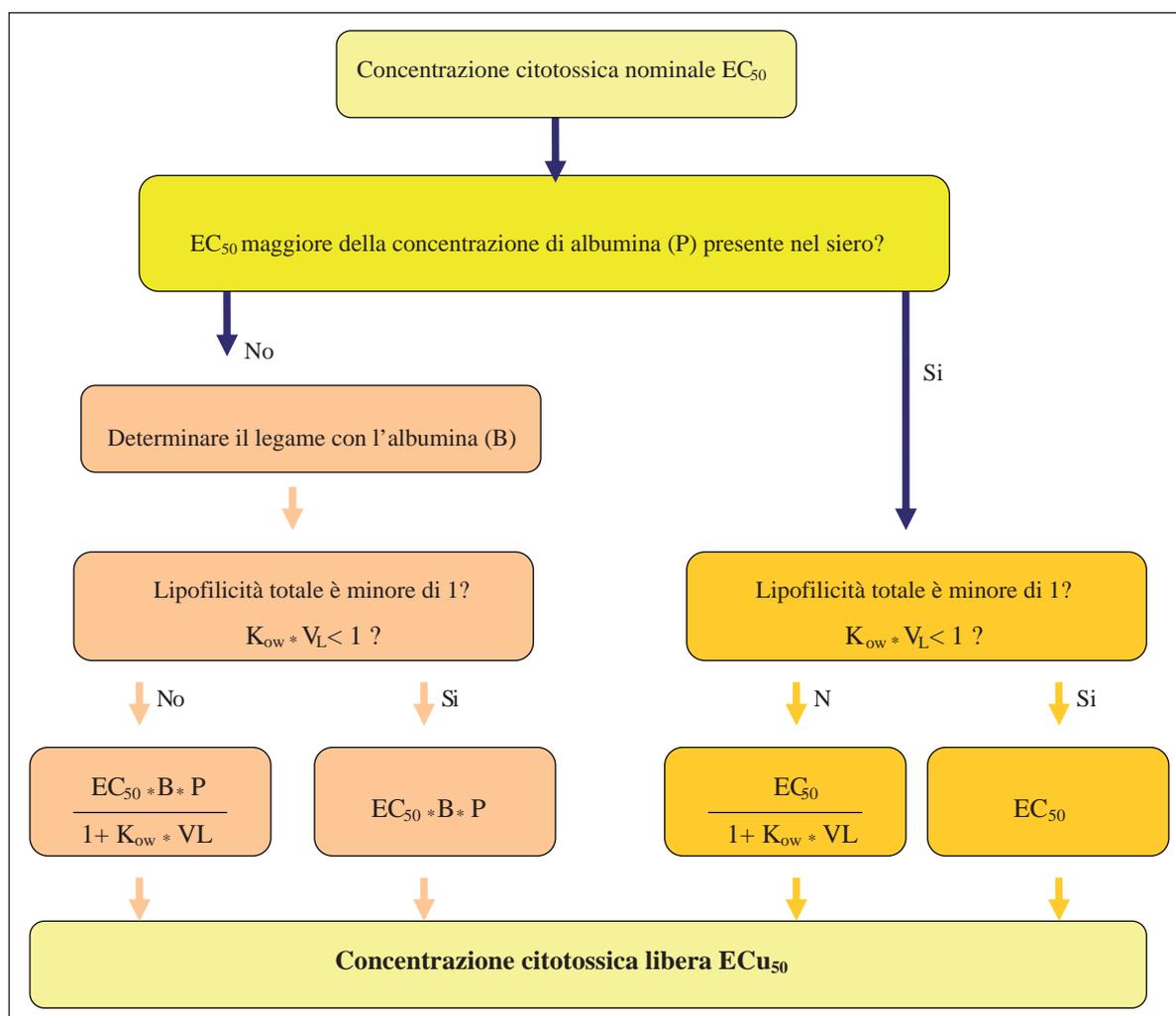


Fig. 4 – Strategia per stimare la concentrazione citotossica libera EC_{u50}
(Tratto e modificato da Gülden e Seibert, 2007)

propongono anche l'uso combinato di diverse linee cellulari di pesce, che rappresentino i possibili siti bersaglio (fegato, gonadi, branchie, cervello) presenti nell'animale, per indagare le differenti modalità d'azione (modes of action, MOA) delle varie classi di composti chimici.

Le alterazioni nell'espressione e/o nella funzione di molecole o *pathway* molecolari, che precedono la morte o alterano le funzioni della cellula, possono a loro volta costituire un sistema sensibile per evidenziare la risposta alle sostanze chimiche. Un esempio di *endpoint* molecolare studiato con le cellule di pesce in coltura, è l'espressione dell'attività dell'enzima CYP1A attivato dai composti diossinici attraverso il recettore Ah. Quest'ultimo agisce come fattore di trascrizione che regola direttamente l'espressione di vari geni, compresi quelli che codificano le varie isoforme dell'enzima CYP1A. Con la linea epatica RTL-W1, il valore di EC₅₀ per l'induzione di enzima CYP1A dopo 24 h di esposizione al BaP è risultato di 1-2 ordini di grandezza inferiore a quello determinato mediante citotossicità dopo 11 giorni di esposizione (Schirmer et al. 2000). Quindi, la misura dell'induzione di enzima CYP1A ha costituito nella valutazione del BaP, un *endpoint* più sensibile rispetto alla citotossicità.

Costituisce, al momento, un obiettivo scientifico importante la possibilità di selezionare *endpoint*

molecolari che siano predittivi per l'espressione della tossicità delle diverse classi di composti chimici (Schirmer, 2006).

3.1 Good Cell Culture Practice (GCCP)

La Buona Pratica delle Colture Cellulari (Good Cell Culture Practice, GCCP) rappresenta un'iniziativa volta a massimizzare riproducibilità, affidabilità, credibilità, e accettabilità dei risultati derivanti dall'applicazione delle metodiche *in vitro* con colture di cellule e tessuti, attraverso la costituzione di principi che mirano alla razionalizzazione e unificazione delle pratiche di laboratorio, della nomenclatura, dei sistemi di controllo qualità, delle procedure di sicurezza e di archiviazione (Hartung et al., 2002).

Tale necessità scaturisce dal riconoscimento dell'espansione rapida dell'uso dei sistemi *in vitro* non solo per la ricerca di base, ma anche per la regolamentazione dei composti chimici e, in particolare, nell'ambito dello sviluppo dei saggi di tossicità. I sistemi *in vitro*, inoltre, sono ampiamente utilizzati per la produzione di anticorpi monoclonali, vaccini, ormoni, droghe e nutrienti, nonché in settori emergenti quali genomica e proteomica, e per la valutazione dei biomarcatori di malattia, suscettibilità, esposizione ed effetto. Hanno un ruolo fondamentale nello studio delle terapie geniche e dei tessuti ingegnerizzati e vi sono settori avanzati della ricerca che utilizzano diffusamente cellule umane e animali geneticamente modificate, o cellule e tessuti ricavati da quest'ultimi.

I principi di GCCP sono analoghi ai principi di BPL costituiti dall'OCSE, per regolare la mutua accettazione, da parte degli Stati Membri della CE, degli studi non clinici volti a valutare gli effetti delle sostanze chimiche sull'uomo, sugli animali e sull'ambiente, ma riguardano in modo specifico la manipolazione di colture di cellule e tessuti.

Il gruppo di lavoro sui principi di GCCP, istituito nel 2003 presso l'ECVAM (European Centre for the Validation of Alternative Methods) e costituito da un elevato numero di esperti internazionali nel campo delle colture cellulari, ha portato alla produzione del documento "Guidance on Good Cell Culture Practice" (Coecke et al., 2005) con lo scopo di: stabilire e mantenere la migliore pratica per l'uso di cellule/tessuti in coltura; promuovere un efficace sistema di controllo qualità; facilitare la formazione degli operatori; fornire supporto alle pubblicazioni scientifiche; facilitare l'interpretazione degli studi che applicano sistemi *in vitro*.

I principi operativi e gli elementi fondamentali della Guidance GCCP (2005) sono schematicamente riassunti nelle tabelle da 11 a 16.

Tab. 11 – I principi operativi di GCCP

Principi GCCP	Scopo	Contenuti
Principio 1 Conoscenza del sistema <i>in vitro</i> e dei fattori che lo possono influenzare	Assicurare l'affidabilità e l'accuratezza del lavoro condotto con il sistema cellule/tessuti, attraverso: a) l'identificazione (provenienza, caratteristiche genotipiche e fenotipiche); b) la purezza (libero da contaminazioni batteriche, virali o da micoplasma); c) la stabilità e integrità funzionale del sistema <i>in vitro</i> che viene utilizzato.	<ul style="list-style-type: none"> Definizione dei 3 principali sistemi di colture di cellule/tessuti: 1) organi/tessuti isolati; 2) colture primarie e ai primi passaggi; 3) linee cellulari (a vita finita, continue, staminali) Condizioni di coltura <i>in vitro</i> (Terreno di coltura, supplementi e additivi, condizioni di incubazione) Crioconservazione Contaminazioni microbiche, virali e erociate
Principio 2 Assicurazione di qualità dei materiali e dei metodi	Mantenere l'integrità, la validità e la riproducibilità del lavoro condotto con il sistema cellule/tessuti in coltura.	<ul style="list-style-type: none"> Personale specificamente designato per assicurare la qualità: a) dei substrati biologici; b) dei terreni, reagenti e di tutti gli altri materiali; c) di metodi, protocolli e SOP; d) delle attrezzature e del loro mantenimento; e) delle procedure di registrazione; f) dell'espressione dei risultati. Cellule/tessuti devono essere controllati in merito a: autenticità, aspetto morfologico, vitalità, tasso di crescita, numero del passaggio e/o raddoppiamento cellulare, funzionalità, stato di differenziazione, <i>performance</i> in relazione all'applicazione, contaminazioni. Per la valutazione di qualità di terreni e reagenti vedi tab. 12
Principio 3 Documentazione	Tenere sotto controllo tutti i processi, i materiali e i metodi utilizzati per consentire la riferibilità, la ripetizione e l'interpretazione del lavoro eseguito con il sistema cellule/tessuti. Per l'armonizzazione delle informazioni sui sistemi <i>in vitro</i> , da inserire negli studi pubblicati su riviste internazionali, vedi tab. 13.	<ul style="list-style-type: none"> La documentazione deve comprendere: a) obiettivo del lavoro; B) <i>rationale</i> per la scelta di procedure e materiali; c) materiali ed attrezzature utilizzate; d) origine e caratterizzazione delle cellule/tessuti (vedi anche tab. 14 e 15); e) registrazioni di risultati, dati grezzi, controllo qualità; f) procedure di conservazione di cellule/tessuti; g) protocolli e SOP, compresa ogni loro successiva variazione.
Principio 4 Misure di protezione per gli operatori e l'ambiente	Identificare e valutare i rischi per intraprendere azioni appropriate che li evitino o li minimizzino.	<ul style="list-style-type: none"> Definizione dei pericoli di tipo fisico, chimico e biologico derivanti dalla presenza, manipolazione e uso di cellule e tessuti in coltura. Vedi anche tab. 22 inserita al capitolo "Norme per lavorare in sterilità".
Principio 5 Conformità a legislazioni, normative e principi etici	Garantire che le manipolazioni e gli studi con i sistemi cellulari/tissutali siano eseguiti nel rispetto delle normative nazionali ed internazionali.	<ul style="list-style-type: none"> Rispetto dei principi derivanti dalla <i>3Rs strategy</i>
Principio 6 Adeguate formazione degli operatori SOP: Standard Operational Procedure;	Assicurare che il lavoro svolto con colture di cellule/tessuti sia di elevata qualità e venga effettuato nel rispetto delle norme di sicurezza.	<ul style="list-style-type: none"> Si rimanda a tabella 16

Tab. 12 – Valutazione di qualità dei reagenti utilizzati per cellule/tessuti (Coecke et al., 2005)

Reagente	Parametro	Valutatore	
		Fornitore	Utilizzatore
Siero	Sterilità e endotossine	+	
	Analisi fisico-biochimiche	+	
	Test di funzionalità	+(generali)	+(specifici)
Terreno di coltura basale, terreno di coltura completo <i>serum-free</i> , additivi (ad es. aminoacidi non essenziali)	Sterilità	+	
	Analisi fisico-biochimiche	+	
	Test di funzionalità	+(generali)	+(specifici)
Soluzioni per il distacco enzimatico (ad es. tripsina)	Sterilità	+	
	Analisi fisico-biochimiche	+	
	Test di funzionalità	+	+
Reagenti che favorisco l'adesione delle cellule al substrato	Sterilità	+	
	Analisi fisico-biochimiche	+	
	Test di funzionalità	+	+

Tab. 13 – Informazioni su cellule/tessuti che devono essere inserite in una pubblicazione su rivista specializzata. Esempio con la linea cellulare RTG-2

	Dettagli	Fornitore
Tipo di coltura	Linea cellulare continua	na
Tipologia di cellula/tessuto	Fibroblastica	na
Specie	Pesci: Trota arcobaleno (<i>Oncorhynchus mykiss</i>)	na
Origine	Gonade	na
Denominazione	RTG-2	na
Catalogo/Numero del prodotto	BS CL 76	IZSLER – Brescia - Italia
Terreno di coltura basale	MEM	Sigma
Siero	10% FBS	Sigma
Antibiotici	50 U/ml penicillina- 50 µg/ml streptomina	Sigma
Altri supplementi	na	na
Frequenza dei cambi di terreno	ogni 3 giorni	na
Contenitori per le colture	Fiasche 25- 75 cm ² con collo inclinato	Falcon o Nunc
Piastre per coltura (nei saggi)	Piastre multipozzetto da 96	Falcon
Frequenza delle sottocolture	A confluenza intorno a 80-90%	na
<i>Split ratio</i>	1:2	na
Soluzione per il distacco cellulare	Tripsina-EDTA 0,25 %	Sigma
Numero del passaggio all'arrivo in lab.	88	na
Numero del passaggio al momento dell'uso	95	na
Condizioni di mantenimento	Temperatura 20 ± 2 °C; atmosfera normale	na
Condizioni di conservazione	In frigo alla temperatura di 4°C o in azoto liquido con FBS al 10% e DMSO al 10%	na
Applicazione	Test con rosso neutro	na
Normativa	na	na
Procedure/Linee guida	ECVAM INVITTOX Protocol Neutral Red Uptake (NRU)	na
Bibliografia	Babich e Borenfreund, 1990; Repetto e Sanz, 1993; Castaño et al., 2003; Bols et al., 2005;	na

na: non applicabile; IZSLER: Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia Romagna – Centro Substrati Cellulari; FBS: Fetal Bovine Serum

**Tab. 14 – Documentazione richiesta riguardante l’origine delle colture di cellule utilizzate in laboratorio
(Tratta da Coecke et al., 2005 e modificata)**

	Colture primarie di origine animale	Linee cellulari
Questioni etiche e di sicurezza	+	Applicabile, se la linea è di origine umana o coinvolge DNA ricombinante o patogeni
Specie/Ceppo	+	+
Provenienza	+	+
Sesso	+	+
Età	+	+
Numero di donatori	+	na
Stato di salute	+	+
Pre-trattamenti	+	+
Organo/tessuto d’origine	+	+
Tipo/i cellulari isolati	+	+
Tecnica d’isolamento	+	+
Data dell’isolamento	+	+
Operatore	+	+
Fornitore	+	+
Consenso informato	na	+ se la linea è di origine umana
Accordo per il trasferimento del materiale	na	+
Storia medica del donatore	na	+ se la linea è di origine umana
Test per presenza di patogeni	+	+
Condizioni di trasporto	+	+
Stato del materiale all’arrivo	+	+
Identificazione e autenticazione della linea cellulare	na	+
Test per la presenza di micoplasma	na	+

na: non applicabile

Tab. 15 – Documentazione richiesta, riguardante la manipolazione, il mantenimento e la conservazione delle colture di cellule utilizzate in laboratorio (Tratta da Coecke et al., 2005 e modificata)

	Colture primarie di origine animale	Linee cellulari
Questioni etiche e di sicurezza	na	Applicabile, se la linea è di origine umana o coinvolge DNA ricombinante o patogeni
Morfologia	+	+
Istopatologia	na	na
Periodo di quarantena ^a	+	+
Purezza	+	+
Fenotipo	+	+
Stato di differenziamento	+	+
Tipo di coltura ^b	+	+
Terreno di coltura ^c	+	+
Frequenza dei cambi di terreno	+	+
Caratteristiche di crescita e sopravvivenza ^d	+	+
Numero del passaggio iniziale	na	+
Confluenza al momento della sottocoltura	na	+
Dettagli su il procedimento di sottocoltura ^e	na	+
Induzione del differenziamento	+	+
Identificazione e autenticazione della linea cellulare	+ ^f	+
Invecchiamento ^g		
Test per la presenza di micoplasma	na	+

na: non applicabile

^a Periodo di isolamento da altre colture; ^b se monostrano o in sospensione; ^c tipologia del terreno di coltura, additivi e supplementi e volumi utilizzati; ^d sopravvivenza cellulare, espressione di marcatori specifici, invecchiamento, densità iniziale, tempo di raddoppiamento; ^e data della sottocoltura, intervallo di tempo tra le varie sottocolture, split ratio, densità iniziale di semina; ^f le cellule e i tessuti devono essere riferibili ad un particolare animale o gruppo di animali; ^g limiti di replicazione, numero del passaggio/raddoppiamento cellulare per le cellule e/o numero massimo di passaggi

Tab. 16 – Tecniche, procedure e regolamenti che devono essere inclusi in un programma di formazione su colture di cellule/tessuti

<p>Procedure di laboratorio (livello base)</p> <ul style="list-style-type: none">• Natura e scopo delle SOP• Uso del microscopio• Centrifugazione• Uso dell'autoclave• Uso della cappa a flusso laminare (funzionamento, pulizia)• Mantenimento delle apparecchiature e attrezzature essenziali (frigorifero, incubatore, pipettrici, etc...),• Norme di sicurezza in laboratorio• Valutazione dei rischi e gestione del rischio del lavoro <i>in vitro</i>• Controllo qualità• Gestione dei rifiuti• Procedure di disinfezione, fumigazione, pulizia <p>Procedure di manipolazione delle colture cellulari (livello base)</p> <ul style="list-style-type: none">• Tecniche di manipolazione in sterilità• Preparazione, conservazione e controllo dei terreni di coltura• Tecniche di isolamento di cellule e tessuti• Test di vitalità cellulare e conta• Sottocolture o passaggi• Test per il controllo della contaminazione da micoplasma• Crioconservazione, conservazione e recupero di cellule/tessuti <p>Procedure di manipolazione delle colture cellulari (livello avanzato)</p> <ul style="list-style-type: none">• Caratterizzazione e autenticazione delle cellule• Metodi d'isolamento e purificazione• Banca di cellule e tessuti• Induzione del differenziamento• Tecniche di coltura complesse (co-colture, colture in perfusione, etc...)• Trasfezione e selezione di linee cellulari stabilizzate• Uso di bioreattori <p>Mantenimento della documentazione</p> <ul style="list-style-type: none">• Registrazione dei dati di laboratorio, della gestione delle apparecchiature e della conservazione di cellule/tessuti• Registrazione della formazione degli operatori• Registrazioni riguardanti l'assicurazione di qualità, i manuali e le informazioni <p>Leggi e regolamenti</p> <p>Tutti gli operatori devono essere a conoscenza di leggi, procedure, linee guida e regolamenti nazionali e internazionali riguardanti il proprio lavoro:</p> <ul style="list-style-type: none">• Regole dell'Istituto/Ente di appartenenza• Responsabilità dei vari attori• Regole sull'uso delle cellule/tessuti animali e/o umani• Regole per il contenimento dei microorganismi
--

4. MANTENIMENTO DELLA LINEA CELLULARE RTG-2

Viene qui presentato un protocollo per la crescita e il mantenimento in laboratorio, della linea cellulare stabilizzata di pesce, RTG-2 (Rainbow Trout Gonad), originariamente sviluppata dalle gonadi di trota arcobaleno (*Oncorhynchus mykiss*) allo stadio giovanile, per studi di virologia ittica (Wolf and Quimby, 1962).

La linea RTG-2 è stata acquistata dai laboratori di Metrologia Ambientale dell'ISPRA, presso il Centro di Referenza Nazionale Substrati Cellulari dell'Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia ed Emilia Romagna (IZSLER) "Bruno Ubertini", sotto forma di fiala congelata da 1 ml.

Il certificato allegato alla fiala di cellule e la scheda di sicurezza, rilasciate dall'IZSLER sono riportate in allegato 1.

4.1 Definizioni e abbreviazioni

Acqua ultrapura: acqua con una conducibilità $< 1\mu\text{S}/\text{cm}$

Coltura cellulare (*Cell Culture*): crescita di cellule che si sono dissociate dal tessuto d'origine mediante migrazione spontanea o dispersione meccanica o enzimatica.

Concentrazione cellulare (*Cell concentration*): numero di cellule per mL di terreno. Si utilizza prevalentemente per le cellule che crescono in sospensione.

Confluenza: si dice di un monostrato cellulare in cui tutte le cellule sono a contatto le une con le altre e non rimangono zone libere sul substrato di crescita. Vedi anche "Subconfluente".

Convalida di una linea cellulare (*Validation of a cell lines*): processo che implica l'autenticazione, la caratterizzazione e la dimostrazione di assenza di contaminazioni, di una linea cellulare.

Curva di crescita (*Growth curve*): grafico, in semilog, che rappresenta la concentrazione/densità cellulare (in scala logaritmica) in funzione del tempo di coltura (in scala lineare). Nella curva di crescita di una linea cellulare sono riconoscibili tre fasi: la fase lag (di adattamento, prima che abbia inizio la crescita), la fase log (di crescita esponenziale), la fase di *plateau* (le cellule, dopo che hanno raggiunto una densità elevata, smettono di crescere).

Densità cellulare (*Cell density*): numero di cellule per cm^2 di substrato. Si utilizza per le cellule che crescono adese ad un substrato.

Densità di saturazione (*Saturation density*): numero massimo di cellule ottenibile per cm^2 (per le cellule che crescono aderenti) o per mL (per le cellule che crescono in sospensione) sotto specifiche condizioni di crescita.

Efficienza di semina (*Seeding efficiency*): percentuale di cellule seminate che si attacca al substrato entro un determinato periodo di tempo (implica la vitalità, e la sopravvivenza delle cellule, ma non necessariamente la loro capacità di proliferare)

Fase di *plateau*: vedi "Curva di crescita"

Fase lag: vedi “Curva di crescita”

Fase log: vedi “Curva di crescita”

Inibizione da contatto (*Contact inhibition*): meccanismo attraverso il quale le cellule arrestano la loro crescita quando sono in contatto completo le une con le altre, come nel monostrato a confluenza.

In vitro: termine utilizzato per tutto quello che viene “coltivato fuori dell’ospite”, come le colture cellulari, le colture d’organo o di tessuto; usato anche per indicare reazioni biochimiche e molecolari eseguite in provetta (anche se in quest’ultimo caso è preferibile il termine inglese *system cell free*).

Linea cellulare (*Cell line*): si ottiene dalla coltura primaria dopo la prima sottocoltura ed è formata da numerose linee di cellule originariamente presenti nella coltura primaria. Le linee cellulari possono essere finite o continue (stabilizzate).

Numero del passaggio o della sottocoltura (*Passage number*): corrisponde al numero di volte che una coltura è stata passata o *subcoltivata* (cioè staccata e trasferita in un nuovo contenitore).

Osmolarità: concentrazione di particelle osmoticamente attive (molecole e ioni) in 1 litro di soluzione acquosa. Si esprime in osmoli/L

Passaggio o sottocoltura (*Passage*): trasferimento (o sottocoltura) delle cellule da un recipiente di coltura ad un altro con terreno di coltura fresco. Se le cellule crescono in monostrato, implica il loro preventivo distacco enzimatico. Vedi anche “Numero del passaggio”.

Split ratio: divisore del rapporto di diluizione di una coltura cellulare quando viene effettuato il passaggio. Ad es. se il contenuto di una fiasca madre lo divido in 2 fiasche figlie, avrò utilizzato uno *split ratio* di 2 (corrispondente a 1:2).

Splittare: dividere. Vedi “*Split ratio*”.

Subconfluente (*Subconfluent*): poco meno che a confluenza, quando le cellule non ricoprono completamente tutto il substrato a disposizione.

Substrato (*Substrate*): superficie solida o matrice su cui si accrescono le cellule in monostrato.

Tempo di raddoppiamento della popolazione cellulare (Population-Doubling Time, PDT): tempo che occorre ad una popolazione cellulare per raddoppiarsi, quando si trova nella fase esponenziale di crescita (fase log).

Terreno di base (*Medium*): detto anche mezzo di base. E’ una miscela di sali inorganici e altri nutrienti, che permette alle cellule di sopravvivere *in vitro* per 24 ore.

Terreno di crescita (*Growth medium*): detto anche mezzo di crescita o terreno di coltura. E’ il terreno usato per propagare una determinata linea cellulare, in modo tale che il numero delle cellule aumenti nel tempo. Contiene il terreno di base (*medium*), cui vengono aggiunti, il siero e altri fattori di crescita.

Terreno di mantenimento (*Maintenance/Holding medium*): detto anche mezzo di mantenimento. E’ una formulazione di terreno che fa sopravvivere le cellule, senza farle proliferare (e quindi aumentare di numero). Per questo motivo il terreno di mantenimento ha, di solito, basse concentrazioni di siero o è completamente privo di siero e fattori di crescita.

Soluzione Salina Bilanciata (*Balanced Salt Solution*): soluzione isotonica di sali inorganici che può, in alcuni casi, contenere glucosio, ma più spesso è priva di nutrienti organici.

AA: Aminoacido/i

BSS: Balanced Salt Solution (Soluzione salina bilanciata)

D-PBS: Dulbecco's Phosphate Buffered Saline

DPI: Dispositivi di Protezione Individuale

EP: Efficienza di piastramento

FBS: Fetal Bovine Serum

HEPA: High Efficiency Particulate Air

IZSLER: Istituto Zooprofilattico Sperimentale di Lombardia ed Emilia Romagna

L-glu: L-glutammina

MEM: Minimum Essential Medium

NEAA: Non essential Amino Acids

PBS: vedi D-PBS

PDT: Population Doubling Time

PP: Polipropilene

PS: Polistirene

P/S: Penicillina/Streptomicina

RTG: Rainbow Trout Gonad

Try: Trypsin (tripsina)

4.2 Materiali

La preparazione e il mantenimento delle colture cellulari di pesce *in vitro* richiedono l'applicazione di numerosi mezzi e di diverse tecniche al fine di ottenere sia l'accrescimento ottimale delle cellule e sia l'eliminazione degli agenti contaminanti, quali batteri, lieviti, funghi o cellule di altro tipo.

E' necessario, in primo luogo, che venga garantita la massima sterilità, sia nel corso della preparazione delle soluzioni, che durante la manipolazione delle colture stesse. Tale obiettivo viene raggiunto con un'adeguata e corretta manualità da parte degli operatori e con ambienti e apparecchiature idonee.

Le apparecchiature e i banconi destinati ad essere a maggior contatto con le cellule, devono trovarsi il più lontano possibile dall'ingresso del laboratorio. E' buona norma poter disporre di due ambienti separati: uno per il trattamento delle cellule e la preparazione delle soluzioni e l'altro per lavaggi e sterilizzazioni. Qualora si disponga di un solo ambiente la zona dove vengono trattate le cellule sarà quella opposta all'ingresso e alla zona dei lavaggi.

4.2.1 Attrezzature di laboratorio

Sono assolutamente necessarie le seguenti attrezzature (alcune di esse sono mostrate in allegato 2):

- Cappa a flusso laminare verticale o orizzontale (paragrafo 4.2.2)
- Frigorifero e congelatore
- Centrifuga da tavolo
- Bagno termostato (10 - 60 °C)

-
- Microscopio rovesciato
 - Coulter Counter
 - pHmetro
 - Bilancia (normale e analitica)
 - Dispositivo per la produzione di acqua ultrapura (conducibilità < 1 $\mu\text{S}/\text{cm}$)
 - Incubatore o armadio termostato o stanza termostata (Temperatura d'incubazione 20 ± 2 °C)
 - Microscopio ottico (obiettivi 10X, 40X, e 100X ad immersione) con contrasto di fase
 - Autoclave
 - Pompa peristaltica per la sterilizzazione dei liquidi
 - Pipette (*Pipett aid*)
 - Micropipette e puntali monouso sterili (10-100 μl 100-1000 μl)
 - Pipette in plastica sterili monouso da 1, 2, 5, 10, 25 ml (paragrafo 4.2.3)
 - Fiasche per colture cellulari (paragrafo 4.2.3)
 - Piastre di Petri per colture cellulari (paragrafo 4.2.3)
 - Provette per centrifuga (paragrafo 4.2.3)
 - Bottiglie in vetro Pyrex, con tappo a vite, autoclavabili, da 250, 500 e 1000 ml (paragrafo 4.2.4)
 - Vetreria varia in Duran o Pyrex (beute, becker, imbuti, cilindri, matracci da 1000 ml)
 - Filtri per siringa 0,22 μm e per filtraggio di soluzioni acquose (Sterivex-GV 0.22 μm)
 - Vaschette per la colorazione dei vetrini
 - Vetrini portaoggetto e coprioggetto
 - Camera di conta Neubauer

Sono attrezzature addizionali (alcune di esse sono mostrate in allegato 3):

- Pompa da vuoto
- Sistema di analisi dell'immagine annesso al microscopio ottico
- Macchina fotografica annessa al microscopio ottico
- Lavavetreria
- Stufa a secco (fino a 200 °C)
- Cytospin (citocentrifuga)
- Contenitore per l'azoto liquido (per la conservazione della linea cellulare)
- Provette per criogenia

4.2.2. *La cappa di sicurezza biologica*

Le cappe di sicurezza biologica a flusso verticale vengono suddivise in tre classi (I, II e III) cui corrispondono differenti strutture e schemi di funzionamento in grado di garantire livelli diversi di sicurezza. Tutte e tre le classi sono dotate di un filtro HEPA (High Efficiency Particulate Air) sul flusso d'aria in espulsione, mentre solo le cappe di classe II e III sono dotate anche di un sistema di filtraggio HEPA dell'aria in ingresso sul piano di lavoro. I filtri HEPA sono costituiti da sottili fogli di microfibre di borosilicato ripiegati più volte al fine di aumentare la superficie totale di filtrazione. Essi, a seconda della loro qualità, sono in grado di trattenere un numero di particelle, dal diametro di 0,3 micron, che varia da 9997 a 9999 su un totale di 10000. Prima di scegliere la cappa, è necessario individuare il livello di sicurezza richiesto, in relazione alle caratteristiche dei campioni da trattare. In ogni caso, le cappe di classe I e II non proteggono l'operatore dalla contaminazione delle mani e delle braccia causata da schizzi e aerosol, di conseguenza, è indispensabile anche l'uso di Dispositivi di Protezione Individuale (DPI) come camici con maniche lunghe e guanti.

Le cappe di classe II sono utilizzate per la manipolazione di materiale a medio o basso rischio biologico, garantendo la protezione del prodotto, dell'operatore e dell'ambiente. Sono provviste di un'apertura frontale attraverso la quale è immesso un flusso d'aria che viene aspirato sotto il piano di lavoro, filtrato (HEPA), messo in circolo dall'alto verso il basso (flusso laminare verticale di aria sterile che funziona da barriera tra l'interno della cabina e l'operatore) e infine espulso all'esterno dopo filtrazione (HEPA). In base allo schema di flusso, alla posizione dei filtri e alla velocità di ventilazione le cappe di classe II vengono ulteriormente suddivise in:

- tipo A
- tipo B1
- tipo B2

Le maggiori differenze fra i tre tipi di cappe consistono nel rapporto tra aria riciclata e aria scaricata e nel modo in cui viene espulsa l'aria dalla camera di lavoro. Nelle cappe di tipo A il 70% dell'aria contenuta nella cappa viene costantemente riciclato, mentre il 30% è scaricato per sovrappressione.

Per la manipolazione delle colture di cellule risulta idonea una cappa di classe II A.

Le norme generali per il corretto uso della cappa biologica, sono le seguenti:

- In presenza degli operatori in laboratorio spegnere la lampada UV.
- Accendere il motore di aspirazione, 10 minuti prima dell'inizio dell'attività lavorativa per stabilizzare il flusso laminare ed eliminare la contaminazione aerotrasportata.
- Accertarsi che il vetro frontale (se a scorrimento) sia alla giusta altezza (20-30 cm).
- Introdurre sotto cappa, prima di iniziare a lavorare, tutto il necessario avendo cura di non bloccare le griglie di aspirazione e comunque di ridurre allo stretto indispensabile la presenza di oggetti, contenitori o altro.
- In caso di sversamento accidentale di materiale biologico all'interno della cappa adottare la seguente procedura: rimuovere immediatamente il liquido versato, utilizzando materiale imbevuto di disinfettante (alcool etilico al 70%); disinfettare anche pareti, superfici e strumenti; se il piano è una superficie continua coprirlo con disinfettante e lasciare agire qualche minuto. Al termine di queste operazioni, lasciare la cappa in funzione per 10 minuti.
- Non mangiare, non bere, non fumare, non conservare alimenti o bevande nelle vicinanze della cappa.
- Al termine dell'attività lavorativa, svuotare completamente la cappa e disinfettare accuratamente il piano di lavoro. Mantenere la cappa in funzione per almeno 10 minuti per permettere l'eliminazione di qualsiasi sostanza contaminante. Infine, chiudere la cappa con il pannello di chiusura frontale e accendere la lampada UV.

4.2.3 Materiale plastico per le colture di cellule

La linea cellulare stabilizzata RTG-2 cresce come monostrato adeso ad un substrato artificiale. Questo substrato deve essere adeguato e consentire l'adesione cellulare.

I substrati in plastica si sono dimostrati ottimali per la crescita delle cellule RTG-2. A tale scopo, utilizzare fiasche per colture cellulari, sterili, monouso, in polistirene (PS), nei formati 25 e 75 cm² con tappo a vite normale (fig. 1 in allegato 4).

Per la colorazione delle colture di RTG-2, per l'esecuzione del saggio di sopravvivenza clonale, e altre applicazioni che lo richiedano, utilizzare piastre di Petri per colture cellulari (fig. 2 in allegato 4), sterili (sterilizzazione con raggi gamma), monouso, in PS, con superficie non trat-

tata, oppure in vetro Pyrex (queste ultime dovranno essere opportunamente sterilizzate, prima dell'uso). Nella tabella 17 sono riportate le caratteristiche (repliche, volume e superficie di crescita) dei principali contenitori in plastica per la crescita delle cellule in coltura.

Tab. 17 – Caratteristiche dei contenitori in plastica per colture cellulari

Tipologia di contenitore	Repliche	Volume (ml)	Superficie (cm ²)
Piastre multipozzetto	4	2	2
	6	2	10
	12	1	3
	24	1	2
	96	0,1	0,3
	144	0,1	0,3
Petri con diametro 35 mm	1	2	8
Petri con diametro 60 mm	1	5	21
Petri con diametro 90 mm	1	10	49
Fiasche 25 cm ²	1	5	25
Fiasche 75 cm ²	1	25	75
Fiasche 175 cm ²	1	75	175
Fiasche 225 cm ²	1	100	225

Per la centrifugazione, utilizzare provette a fondo conico (figura 3 in allegato 4), sterili (sterilizzate con raggi gamma), in PS e in PP, apirogene, con graduazioni e tappo a vite blu in polietilene (ad es. provette Falcon 2095 e 2096).

Le provette maggiormente utilizzate hanno le dimensioni riportate nella tabella 18.

Tab. 18 – Dimensioni delle provette da centrifuga

Tipologia di provetta	Dimensioni (mm) (diametro x altezza)	Capacità (ml)
Provetta da 15 ml	17x120	15
Provetta da 50 ml	30x115	50

Per la dispensazione dei liquidi e delle sospensioni cellulari, utilizzare pipette sterili (figura 4 in allegato 4), monouso, in PS, sterilizzate con raggi gamma, certificate apirogene, con graduazione negativa, con accuratezza entro $\pm 2\%$ (a volume intero), da 1, 2, 5, 10, 25 e 50 ml, preferibilmente confezionate singolarmente (ad es. pipette Corning, Falcon, ecc.).

4.2.4 Vetreria

Per la conservazione dei liquidi (terreni di base reidratati, terreni di crescita, soluzioni) vengono utilizzate bottiglie in vetro Pyrex (borosilicate glass Pyrex) con collo largo, complete di tappo a vite in PP. Queste bottiglie sono conformi alla norma ISO 4796, hanno una graduazione bianca per l'identificazione dei volumi, una resistenza termica e chimica molto elevata. Pos-

sono essere sterilizzate in autoclave (121 °C per 20 minuti). Le bottiglie maggiormente utilizzate sono quelle da 200, 500 e 1000 mL. Vedi figure 1-4 in allegato 5.

4.2.5 Terreni e reagenti

La linea cellulare RTG-2 cresce alla temperatura di $20 \pm 2^\circ\text{C}$. Se in laboratorio è presente questa temperatura costante sottoposta a controllo, o si ha a disposizione una stanza termostata, è possibile mantenere le fiasche con le cellule anche in un normale armadietto, lontano da possibili fonti di contaminazione. In caso contrario, utilizzare un incubatore a temperatura controllata e atmosfera normale.

Il terreno base per la crescita delle cellule RTG-2 utilizzato con successo presso i laboratori ISPRA, è il terreno MEM con sali di Hanks, L-glu e NEAA, senza bicarbonato di sodio. La composizione del suddetto terreno è mostrata in tabella 19. Il terreno MEM con questa formulazione corrisponde al MEM M1018 Sigma, in polvere.

Per la preparazione del terreno di crescita per le cellule RTG-2, il terreno base, ricostituito e filtrato, viene addizionato, con:

- Siero FBS per colture cellulari (sterile, filtrato, testato per il micoplasma, endotossine ed emoglobina, con osmolarità 260-340 mOsm/kg H₂O) al 10%
- Antibiotici P/S 50 UI/ml - 50 µg/ml

I reagenti utilizzati per il distacco delle cellule, sono:

- D-PBS (o semplicemente PBS) senza calcio e magnesio (ad es. soluzione Sigma D8537)
- Soluzione Tripsina-EDTA 0,25% (o anche solo tripsina 0.25%) (ad es. Sigma T4049)

Per la colorazione delle cellule, su piastra o su vetrino, sono necessarie le seguenti sostanze:

- Colorante Giemsa liquido (Carlo Erba Reagenti)
- Alcool metilico assoluto
- Xilene
- Montante per vetrini a base di xilene (Eukitt, Carlo Erba)

Tab. 19 - Composizione del terreno di coltura MEM Sigma M1018

Componenti	Quantità (g/L)
<u>Sali inorganici</u>	
Cloruro di calcio · 2H ₂ O	0.185
Solfato di magnesio anidro	0.09767
Cloruro di potassio	0.4
Fosfato di potassio monobasico (anidro)	0.06
Cloruro di sodio	8.0
Fosfato di sodio dibasico (anidro)	0.04788
<u>Aminoacidi</u>	
L-alanina	0.0089
L-arginina · HCl	1.26
L-asparagina · H ₂ O	0.015
L-acido aspartico	0.0133
L-cisteina · 2HCl	0.0313
L-acido glutammico	0.0147
L-glutammina	0.292
Glicina	0.0075
L-istidina · HCl · H ₂ O	0.042
L-iso-leucina	0.052
L-leucina	0.052
L-lisina · HCl	0.0725
L-metionina	0.015
L-fenilalanina	0.032
L-prolina	0.0115
L-treonina	0.048
L-triptofano	0.01
L-tirosina · 2Na · 2H ₂ O	0.0519
L-valina	0.046
<u>Vitamine</u>	
Cloruro di colina	0.001
Acido folico	0.001
Inositolo	0.002
Niacinamide	0.001
Acido pantotenico (emicalcico)	0.001
Piridoxal · HCl	0.001
Riboflavina	0.0001
Tiamina · HCl	0.001
<u>Altro</u>	
Glucosio	1.0
Rosso fenolo · Na	0.011

4.3 Norme per lavorare in sterilità

4.3.1 Norme generali

1. Lavare mani e braccia con acqua e sapone, prima di cominciare a lavorare.
2. Togliere orologio, anelli e bracciali, che possono essere una fonte di contaminazioni.
3. Indossare i guanti. I guanti non sono sterili, quindi pulirli con etanolo al 70%.
4. Indossare un camice pulito. Indossare la maschera se si è raffreddati o si lavora con materiale potenzialmente patogeno.
5. Utilizzare prevalentemente materiale plastico sterile e monouso o materiale in vetro lavato e sterilizzato.
6. Pulire periodicamente le superfici di lavoro con etanolo al 70%.

4.3.2 Sterilizzazione

Le modalità di sterilizzazione del materiale di laboratorio, sono principalmente due: in autoclave a 121 °C, per 15-20 minuti o in stufa a 160-180°C, per 1 ora (tabella 20).

Tab. 20 – Modalità di sterilizzazione delle principali attrezzature utilizzate in laboratorio

Sterilizzazione in stufa 160-180°C, per 1 ora	Sterilizzazione in autoclave 121 °C per 15-20 minuti
Beute, beker e cilindri in vetro	Bottiglie in vetro con tappo a vite (tappo svitato)
Pipette Pasteur in vetro	Cilindri in vetro
Piastre di Petri in vetro	Siringhe in vetro (separare il pistone se in PTFE)
Vetrini coprioggetto e portaoggetto	Attrezzature contenenti vetro e tubi in silicone
Provette in vetro	Puntali per micro pipette su apposito vassoio autoclavabile o in buste di nylon
	Micropipette (separare il pistone se in PTFE)
	Ancorette magnetiche
	Materiale in policarbonato

Beute, beker e cilindri devono essere chiusi con carta argentata, mentre vetrini, provette, piastre Petri e pipette Pasteur è preferibile che vengano sterilizzati in scatole di acciaio inossidabile che saranno lasciate parzialmente aperte durante la permanenza in stufa. Le bottiglie in vetro poste in autoclave devono avere il tappo parzialmente svitato. Sul materiale posto in autoclave può essere apposto il nastro indicatore della sterilizzazione, disponibile in commercio.

In tabella 21 sono riportate le principali modalità di sterilizzazione e conservazione dei liquidi.

Tab. 21 – Principali modalità di sterilizzazione e conservazione delle soluzioni utilizzate nel laboratorio di colture cellulari

Soluzione	Modalità di sterilizzazione	Conservazione
Aminoacidi	Filtrazione 0,2 µm	4 °C
Antibiotici	Filtrazione 0,2 µm	- 20 °C
Siero albumina bovina	Filtrazione 0,2 µm	4 °C
DMSO	Autosterilizzazione: dispensare aliquote in provette sterili	Temperatura ambiente al buio
EDTA	Autoclave	Temperatura ambiente
Glucosio 20%	Autoclave	Temperatura ambiente
Glucosio 1-2 %	Filtrazione 0,2 µm	Temperatura ambiente
Glutammina	Filtrazione 0,2 µm	- 20 °C
HEPES	Autoclave	Temperatura ambiente
HCL 1M	Filtrazione 0,2 µm	Temperatura ambiente
Bicarbonato di sodio	Filtrazione 0,2 µm	Temperatura ambiente
NaOH 1M	Filtrazione 0,2 µm	Temperatura ambiente
Siero	Filtrazione 0,2 µm	- 20 °C
Rosso fenolo	Autoclave	Temperatura ambiente
Soluzioni saline (PBS)	Autoclave	Temperatura ambiente
Tripsina	Filtrazione 0,2 µm	- 20 °C
Vitamine	Filtrazione 0,2 µm	- 20 °C
Acqua	Autoclave	Temperatura ambiente

4.3.3 Norme per lavorare sotto cappa biologica

1. La zona frontale della cappa (i primi 20 cm, dove di solito sono presenti i fori) è la zona attraverso la quale viene aspirata l'aria esterna contaminata. Non bisogna mai lavorare in quest'area, perché non è garantita la sterilità.
2. Accendere la cappa 10 minuti prima dell'inizio delle attività lavorative.
3. Inserire sotto cappa tutto il materiale necessario, per evitare frequenti movimenti di entrata e uscita che perturbano il flusso laminare e rendono la cappa meno efficiente.
4. Lavorare seduti il più vicino possibile al bordo della cappa con gli avambracci a livello dell'apertura.
5. Compiere le manipolazioni nella zona centrale della cappa, con movimenti dolci e lenti, riducendo al minimo le entrate e le uscite delle braccia.
6. All'interno della cappa, tenere le pipette in modo che puntino verso avanti e non verso l'operatore. Non toccarle mai con le mani. Evitare che la punta delle pipette esca dalla cappa, o superi la zona forata dove non c'è protezione.
7. Non appoggiare mai una pipetta, senza il suo involucro protettivo, sul piano di lavoro della cappa.
8. Se, sotto cappa, la punta della pipetta tocca l'esterno di una bottiglia, o altro materiale non rigorosamente sterile, eliminare la pipetta.
9. Evitare, quanto più è possibile, il passaggio di personale all'interno del locale e

- l'apertura/chiusura di porte durante il funzionamento della cappa.
10. Allentare i tappi delle bottiglie e delle fiasche prima di montare la pipetta sulla pipettatrice. Questo permette di lavorare tenendo il tappo della bottiglia in uso in mano (senza contaminarlo) e di richiudere la bottiglia (o la fiasca) nel piu' breve tempo possibile.
 11. Non passare mai sulle fiasche o sulle bottiglie aperte con le mani o con le braccia.
 12. Se cade un tappo, se viene toccato accidentalmente con le mani o viene appoggiato sopra qualcosa, eliminarlo.
 13. Richiudere ogni contenitore appena terminata l'operazione da effettuare.
 14. Non lasciare residui di terreni di coltura o altri liquidi, perché si tratta di substrati idonei alla crescita di microorganismi contaminanti.
 15. Le bottiglie di terreno o altri contenitori, preriscaldati nel bagno termostato, devono poi essere asciugati e puliti con etanolo al 70%, prima della loro introduzione sotto cappa. E' consigliabile che i bagni termostatati contengano agenti batteriostatici.
 16. Evitare di operare sotto cappa con linee cellulari diverse contemporaneamente, per impedire contaminazioni crociate.
- Si riportano, per completezza d'informazione, anche le indicazioni GCCP (tabella 22) tratte da Coecke et al., 2005.

Tab. 22 – Precauzioni fondamentali GCCP per gli operatori che lavorano con cellule e tessuti
(trad. tabella 7 da Coecke et al., 2005)

Lavare o disinfettare le mani, prima e dopo la manipolazione delle colture cellulari.
Un indumento idoneo o un camice da laboratorio deve essere indossato prima di entrare in laboratorio e tolto prima di uscire.
Togliere o coprire, per prevenire eventuali contaminazioni, qualsiasi accessorio personale (come anelli, orologio, etc..) perchè potrebbe compromettere la manipolazione di cellule e tessuti.
Se opportuno, indossare i guanti e sostituirli immediatamente in caso di strappi, punture o in caso di lavoro molto prolungato.
Quando si manipolano colture cellulari o tissutali, gli operatori devono evitare di trasferire, attraverso le proprie mani, la contaminazione, proveniente dalle colture, a parti non protette del corpo (come ad esempio, gli occhi o la bocca), a vestiti o oggetti presenti nell'ambiente del laboratorio.
Per quanto è ragionevolmente fattibile, il lavoro con cellule e tessuti deve essere eseguito sotto una cappa di classe II o una cabina (micro)biologica di sicurezza. N.B: le cabine a flusso orizzontale proteggono le cellule e i tessuti, ma non l'operatore o l'ambiente.
E' vietato pipettare con la bocca.
Tutte le procedure devono essere eseguite con metodi che minimizzano la produzione di aerosol che potrebbero diffondere la contaminazione mediante microorganismi o cellule.
I disinfettanti utilizzati devono essere efficaci e appropriati al lavoro che si deve svolgere.
Tutte le superfici di lavoro devono essere pulite con un disinfettante idoneo, prima e dopo l'uso.
Evitare quanto più possibile, l'uso di oggetti taglienti. Ogni oggetto tagliente utilizzato deve essere smaltito in sicurezza, secondo procedure approvate.
Tutte le colture cellulari e tissutali devono essere identificabili chiaramente e inequivocabilmente.

4.3.4 Come maneggiare pipette, puntali e filtri da siringa (sotto cappa)

1. La pipetta di plastica monouso confezionata singolarmente, deve essere tenuta con la mano sinistra mentre, con la mano destra, si strappa l'involucro in corrispondenza della parte superiore della pipetta e non dalla parte della punta (fig. 1, allegato 6). Per i mancini l'operazione sarà inversa. La pipetta, ancora incartata, è montata sulla pipettatrice (fig. 2, allegato 6). Solo a questo punto si elimina l'involucro di carta.
2. Se si usano i puntali sterili, confezionati in scatole portapuntali, dopo aver aperto il coperchio, infilare un puntale sulla micropipetta (avendo cura di non toccare niente con le dita e di non passare con le mani sopra a tutti i puntali), tenendola, sopra la scatola, perpendicolarmente (fig. 3, allegato 6). Sono in commercio scatole portapuntali autoclavabili che hanno il coperchio a scorrimento e permettono di scoprire una fila di puntali per volta, mantenendo così incontaminate tutte le altre file.
3. La filtrazione di qualsiasi liquido deve essere effettuata sotto cappa, in recipienti sterili. Vi sono filtri adatti per diversi sistemi e capacità. Molto usati sono i filtri da siringa Millex 0,22 μm , per piccoli volumi. Si deve operare in modo da evitare la contaminazione del filtro. I filtri sono venduti in confezioni singole. Procedere come segue: a) aprire la confezione, portando via la copertura di carta, continuando però a mantenere il filtro nell'involucro di plastica; b) montare la siringa, riempita con il liquido da sterilizzare, tenendo il filtro attraverso l'involucro, quindi procedere alla filtrazione.
Se si deve riutilizzare il filtro, lo si depone nuovamente nel suo involucro, si riempie di nuovo la siringa e si ripete l'operazione precedente.

4.3.5 Come aliquotare i liquidi da una bottiglia, una fiasca o una provetta

1. Per aprire fiasche e provette, con tappo a vite, svitare il tappo, quindi scostarlo con indice e medio, al di sopra del contenitore, che viene mantenuto nella stessa mano, con anulare e mignolo (fig. 4, allegato 6). Nel caso non si riesca ad assumere questo tipo di controllo, i tappi devono essere svitati completamente e appoggiati sul fondo della cappa con l'apertura verso l'alto (fig. 5, allegato 6), avendo cura di non toccarli con nessun oggetto o di passarci sopra con le mani.
2. Le bottiglie e le fiasche non vanno mai afferrate vicino al collo.
3. Durante le operazioni di prelievo e di inoculo, la pipetta non deve toccare la parete dei contenitori.
4. Preparare quantità di terreno proporzionali al lavoro che deve essere svolto. Tuttavia, quando si hanno grandi quantità di terreno, la precauzione migliore, per evitare contaminazioni, è prelevarne la quantità necessaria al lavoro giornaliero, versandola (sotto cappa) in un contenitore sterile più piccolo e riponendo il resto in frigo.
5. Per le soluzioni madri di siero, antibiotici, o glutammina, che possono essere vendute o preparate in quantità elevate, suddividere le preparazioni originarie in aliquote più piccole, utilizzando provette sterili, e conservarle secondo quanto riportato sulle confezioni.

4.4 Terreno e reagenti per la crescita della linea cellulare RTG-2

4.4.1 Caratteristiche generali dei terreni per colture cellulari

La possibilità di coltivare le cellule *in vitro* dipende dal terreno di coltura che è una miscela di diverse sostanze, responsabili del mantenimento delle caratteristiche chimico-fisiche del terreno stesso.

La composizione dei terreni di coltura è estremamente variabile, tuttavia le principali sostanze contenute nel terreno base sono le seguenti:

Aminoacidi. Nei terreni più semplici sono presenti solo gli AA essenziali, mentre nei terreni complessi vengono aggiunti anche AA non essenziali, richiesti dal tipo di cellula in coltura. La glutammina è un AA essenziale per molti tipi di cellule, sia come fonte di energia, che di carbonio. E' aggiunta al terreno, tenendo presente che a temperature $> 10^{\circ}\text{C}$ ha una vita media di circa 1 mese.

Vitamine. Un terreno semplice come il MEM contiene solo le vitamine del gruppo B. L'aggiunta di altre vitamine si rende necessaria soprattutto quando vengono impiegate basse concentrazioni di siero.

Sali. La pressione osmotica ottimale varia nelle diverse linee cellulari, a seconda della specie d'origine, ma risulta, in genere, compresa tra 260 e 320 mOsm/Kg. La corretta pressione osmotica si ottiene con un'adeguata concentrazione di una BSS. Una BSS è composta di sali inorganici e può includere bicarbonato di sodio e, a volte, glucosio. In tabella 23 è mostrata la composizione delle BSS più utilizzate. Il sodio (Na^+) regola il movimento dell'acqua dentro e fuori le cellule. Si trova con il suo anione Cl^- . La pressione osmotica esercitata sulla membrana plasmatica dipende dalla concentrazione di NaCl . Il potassio (K^+) è essenziale per il funzionamento di molti enzimi, è cofattore nella sintesi proteica ed è parte dell'ATPasi $\text{Na}^+\text{-K}^+$ dipendente. Il calcio (Ca^{++}) influisce sulla capacità delle cellule di aderire al substrato. Il magnesio (Mg^{++}) è cofattore delle reazioni enzimatiche e serve a garantire l'integrità dei ribosomi. Il bicarbonato di sodio, interagendo con l'anidride carbonica atmosferica, svolge un ruolo molto importante come sistema tampone. Le BSS si dividono in due gruppi: 1) le BSS che si equilibrano con la pressione atmosferica in un sistema chiuso, come i sali di Hanks che contengono poco bicarbonato di sodio; 2) le BSS che si equilibrano in fase gassosa (con pCO_2 5%), come i sali di Earle.

Glucosio. Costituisce la fonte di energia.

Soluzioni tampone. Per aumentare le capacità tamponanti delle BSS, il terreno può contenere anche una soluzione tampone. L'agente più comunemente usato è il bicarbonato di sodio. Un'altra sostanza tampone è l'HEPES (N-2-hydroxyethylpiperazine-N-2-Ethansulfonic acid) che si comporta in modo anfotero e quindi non necessita di un'atmosfera arricchita per mantenere il pH costante.

Minerali. Quando viene impiegato un terreno povero di siero, è necessaria l'aggiunta di ferro, rame, zinco e selenio.

Supplementi organici. Quando viene impiegato un terreno povero di siero, è necessaria l'aggiunta di nucleosidi, piruvati e lipidi.

Ormoni. Vengono aggiunti solo nei terreni privi di siero.

4.4.2 Ricostituzione del terreno di base in polvere

Per preparare 1 L di terreno MEM (formulazione, paragr. 4.2.5) partendo dalla polvere (1 X), procedere come segue:

1. Sterilizzare in autoclave (121°C , 20 minuti) poco più di 1 L di acqua ultrapura e far raffreddare

Tab. 23 – Soluzioni saline bilanciate

Componenti	Sali di Earle	Dulbecco PBS senza Ca ²⁺ e Mg ²⁺	Dulbecco PBS con Ca ²⁺ e Mg ²⁺	Sali di Hanks
	g/L	g/L	g/L	g/L
CaCl ₂	0,02		0,2	0,14
KCl	0,4	0,2	0,2	0,4
KH ₂ PO ₄	-	0,2	0,2	0,06
MgCl ₂ · 6H ₂ O	-	-	-	0,1
MgSO ₄ · 7H ₂ O	0,2	-	0,98	0,1
NaCl	6,68	8	8	8
NaHCO ₃	2,2	-	-	0,35
Na ₂ HPO ₄ · 7H ₂ O	-	2,2	2,16	0,09
NaH ₂ PO ₄ · H ₂ O	0,14	-		-
D-glucoso	1	-		1
Rosso fenolo	0,01	-		0,01
Fase gassosa	5%	-	Atmosfera normale	Atmosfera normale

2. Sciogliere la polvere, in un matraccio da 1 L, con l'acqua ultrapura sterilizzata. Procedere aggiungendo la polvere e l'acqua poco alla volta (in modo che non si formino grumi), solubilizzando bene tramite agitazione manuale (o con agitatore magnetico). Portare a volume.
3. Quando la soluzione è limpida, filtrare il terreno con la pompa peristaltica, sotto cappa biologica, utilizzando un filtro Sterivex-GV e bottiglie in vetro sterilizzate in autoclave (121 °C, 20 minuti).
4. Conservare il terreno in frigo (4 °C), fino al momento dell'uso.

4.4.3 Preparazione dei supplementi per il terreno di crescita

Il terreno di base MEM ricostituito come al paragrafo precedente, deve essere addizionato con siero FBS al 10%, e P/S 50 UI/ml-50 µg/ml, prima di poter essere utilizzato per la crescita delle cellule RTG-2.

4.4.3.1 Il siero

Il siero FBS viene conservato a -20°C. Scongelo, prima di aggiungerlo al terreno, lasciandolo a temperatura ambiente o in bagno termostato alla temperatura di crescita delle cellule (20 ± 2°C) per il tempo necessario (circa 1 ora). Quando si acquistano confezioni da 500 ml di FBS, è possibile scongelarlo, aliquotarlo nel modo più conveniente per le proprie esigenze e ricongelare le varie aliquote fino al momento dell'uso.

4.4.3.2 Antibiotici

Allo scopo di prevenire le contaminazioni batteriche, è opportuno addizionare il terreno di coltura con antibiotici. Nel caso delle colture di RTG-2, si può utilizzare penicillina-streptomina 50 UI/ml-50µg/ml:

Preparazione a partire da soluzione P/S 5000UI-5 mg/ml (Sigma P4458):

- Porre in una bottiglia sterile, 445 ml di acqua ultrapura e sterilizzare in autoclave (121°C per 20 min.).
- Far raffreddare l'acqua.

- Aggiungere all'acqua 5 ml di soluzione P/S 5000UI-5 mg/ml (Sigma P4458), e miscelare.
- Conservare in provette sterili, aliquote da 5 ml, a -20°C fino al momento dell'uso.

4.4.4 Preparazione del terreno di crescita, per uso

Per preparare 500 ml di terreno completo per la crescita delle cellule RTG-2, procedere come segue:

1. Prendere: terreno MEM di base ricostituito (come al punto 4.4.2), siero FBS e antibiotici P/S.
2. Porli in un bagno termostato alla temperatura di 20 ± 2 °C per almeno 30 minuti (fino a che il siero e gli antibiotici non si sono scongelati).
3. Porre sotto cappa una bottiglia in vetro sterile da 500 ml.
4. Portare sotto cappa il terreno MEM di base, il siero e gli antibiotici, dopo aver pulito la superficie esterna dei contenitori con alcool etilico al 70%.
5. Inserire nella bottiglia in vetro da 500 ml (utilizzando per ogni sostanza una pipetta diversa) nell'ordine:

Terreno MEM di base ricostituito (come al punto 4.4.2)	445 ml
Siero FBS (10%)	50 ml
P/S 50 UI/ml-50 µg/ml	5 ml
6. Conservare il terreno di crescita per uso in frigo (4 °C).

Il terreno di crescita va sempre portato alla stessa temperatura di crescita delle cellule, quindi prima dell'uso riscaldarlo a 20 ± 2 °C, utilizzando un bagno termostato.

4.4.5 Tripsina

La tripsina è un enzima proteolitico derivato dal pancreas dei bovini o dei suini, che taglia le proteine in corrispondenza del gruppo carbossilico degli amminoacidi basici, lisina e arginina. E' l'enzima più frequentemente impiegato per il distacco rapido delle cellule dal substrato, perché è ben tollerato e viene facilmente neutralizzato con il siero.

Può essere utilizzata da sola alla concentrazione di 0,25%, oppure in soluzione con EDTA (che rimuove gli ioni calcio e magnesio dalla superficie cellulare, facilitando l'azione della tripsina). Viene conservata a -20°C. Deve essere scongelata prima dell'uso e conservata in frigo a 4°C per un massimo di 3 settimane (Freshney, 2005).

Prima dell'uso con le cellule RTG-2 deve essere portata alla temperatura di 20 ± 2 °C. Va lasciata fuori dal frigorifero, per il tempo strettamente necessario alle operazioni di distacco e comunque non oltre 30 minuti, altrimenti si disattiva (Freshney, 2005).

4.4.6 D-PBS

La soluzione Dulbecco Phosphate Buffered Saline, chiamata per brevità PBS, è una soluzione tampone da utilizzare nella formulazione senza Ca^{2+} e Mg^{2+} . Essa viene prevalentemente impiegata per lavare il monostrato cellulare, prima del distacco enzimatico con tripsina. Può essere acquistata in forma liquida e sterile (Sigma 8537), o può essere preparata in laboratorio.

Preparazione di PBS (per 1 L):

- Sciogliere in un matraccio da 1 L, utilizzando acqua ultrapura, i seguenti sali:

KCl	0.2 g
KH ₂ PO ₄	0.2 g
NaCl	8.0 g
NaHPO ₄ (anidro)	1.15 g (oppure NaHPO ₄ ·2 H ₂ O 1.8 g)

- Sterilizzare in autoclave (121 °C, 20 min).

La soluzione PBS può essere conservata in frigo a 4°C.

Deve essere portata alla temperatura di 20 ± 2 °C prima dell'uso con le cellule RTG-2.

4.5 Arrivo delle cellule in laboratorio

4.5.1. Cellule da fiala congelata

Le cellule RTG-2 che arrivano in fiala congelata, devono essere scongelate e poste in coltura. E' fondamentale scongelare le cellule correttamente per garantire un rapido recupero e il mantenimento della loro vitalità.

Alcune sostanze usate per la crioconservazione, come il Dimetilsolfossido (DMSO), sono tossiche sopra i 4°C, quindi è essenziale che le colture siano scongelate velocemente e diluite nel terreno di coltura per minimizzare gli effetti tossici.

Procedere come segue:

- Preparare il terreno di crescita e porlo alla temperatura di 20 ± 2°C per almeno 30 minuti.
- Preparare una fiasca da 75 cm² (o di altra capacità, se indicato nel foglio allegato alla fiala di cellule) e marcarla, con pennarello indelebile, indicando il nome della linea, il passaggio e la data.
- Sotto cappa biologica di sicurezza, riempire la fiasca con 30 ml di terreno di crescita.
- Porre la fiala di cellule (immergendola solo per metà) nel bagno termostato alla temperatura di 20 ± 2°C per qualche minuto, fino a che non si nota che la sospensione cellulare è diventata liquida e si è scongelata.
- Portare la fiala sotto la cappa biologica.
- Utilizzando della carta inumidita con etanolo al 70%, pulire esternamente la fiala e togliere il tappo.
- Lentamente, prelevare la sospensione cellulare con una pipetta da 1 ml e trasferirla, gocciolandola, nella fiasca contenente il terreno.
- Incubare a 20 ± 2 °C in atmosfera normale*.
- Dopo 24 ore, esaminare le cellule, con il microscopio rovesciato (paragrafo 4.6.1) per verificare l'adesione, ed effettuare il primo passaggio (paragrafo 4.6.3).

4.5.2 Cellule in fiasca da coltura

Le cellule possono giungere in laboratorio, nelle normali fiasche da coltura riempite di terreno fino all'orlo.

All'arrivo in laboratorio, procedere come segue:

- Rimuovere tutto il terreno dalla fiasca (1 ml di questo terreno può essere analizzato per verificare l'assenza di contaminazioni);

* I tappi delle fiasche devono essere avvitati completamente. Se si utilizzano fiasche con tappo ventilato, coprire con parafilm.

- Se la fiasca è da 75 cm², aggiungere 30 ml di terreno di crescita; se la fiasca è da 25 cm², aggiungere 8 ml di terreno di crescita.
- Incubare la fiasca a 20 ± 2 °C.
- Dopo 24 ore, osservare le cellule al microscopio rovesciato e se le cellule sono in buone condizioni, effettuare il passaggio (paragrafo 4.6.3) *splittandole* 1:2.

Se si osserva invece il distacco delle cellule dal substrato, procedere nel modo seguente:

- Prelevare tutta la sospensione cellulare e dividerla in provette da centrifuga.
- Centrifugare a 1000 rpm per 10 minuti.
- Eliminare il sopranatante.
- Risospendere molto bene il *pellet* di ogni provetta con 3-4 ml di terreno di coltura per uso, agitando con la pipetta.

Prelevare le varie sospensioni cellulari e inocularle in una nuova fiasca da 25/75 cm²

- Aggiungere terreno di coltura per uso per arrivare a 8/30 ml.
- Incubare a 20 ± 2°C.
- Osservare al microscopio rovesciato dopo 24 ore e proseguire la coltura fino a subconfluenza.

4.6 Mantenimento della linea cellulare RTG-2

La linea cellulare RTG-2 deve essere periodicamente *subcoltivata*.

In generale, quando una linea cellulare viene *subcoltivata* o *passata*, la ricrescita delle cellule, fino al punto in cui sarà necessario effettuare un nuovo passaggio, segue un ciclo ben conosciuto, caratterizzato dalla presenza di tre fasi (allegato 7). La prima fase, detta fase lag, è quella che si presenta subito dopo la semina delle cellule, ed è seguita da una seconda fase, di crescita esponenziale, detta fase log. In quest'ultima fase, le cellule potranno necessitare di periodici cambiamenti del terreno di crescita. Quando la densità cellulare (cells/cm²) è tale che non vi è più superficie disponibile di substrato, la crescita delle cellule si riduce e, poco dopo, cessa del tutto (fase di plateau). Poco prima che la coltura raggiunga la fase di plateau, deve essere subcoltivata.

I parametri che vengono presi in considerazione per stabilire la frequenza di cambiamento del terreno e dei passaggi, sono i seguenti:

- **pH.** Le cellule di pesce crescono in un pH compreso tra 7.2 e 7.8 (Bols and Lee, 1994). La crescita delle cellule provoca una diminuzione del pH. La maggior parte delle linee cellulari smette di crescere quando il pH scende da 7.0 a 6.5 e muore tra 6.5 e 6.0. Questo fenomeno si manifesta con un cambio di colore del terreno, grazie alla presenza del rosso fenolo, che dal colore rosso arancio cambia in arancio chiaro, e giallo. A questo punto il terreno va sostituito
- **Concentrazione cellulare.** La frequenza dei cambiamenti del terreno di coltura è direttamente proporzionale al numero di cellule seminate. Colture con un'elevata concentrazione cellulare consumano il terreno di crescita più rapidamente di quelle a bassa concentrazione. Anche questo fenomeno di solito viene evidenziato da un cambiamento del pH.
- **Tipo cellulare.** Cellule normali come i fibroblasti, smettono di dividersi quando hanno raggiunto una concentrazione elevata, e questo può essere dovuto all'esaurimento dei fattori di crescita presenti nel terreno. Le cellule si bloccano in fase G1 del ciclo cellulare e si deteriorano molto poco anche se vengono lasciate per 2-3 settimane.
- **Deterioramento delle cellule.** E' caratterizzato da presenza di granuli in prossimità del nucleo, di vacuoli nel citoplasma, e da arrotondamento delle cellule con distacco dal substrato di crescita. I cambiamenti morfologici vengono osservati al microscopio invertito e la loro presenza richiede il cambio del terreno e del contenitore.

Nel caso della linea cellulare di pesce RTG-2, la divisione di una coltura, o *sottocoltura*, comporta la rimozione del terreno di crescita e la dissociazione del monostrato di cellule con tripsina. E' essenziale conoscere il ciclo di crescita della linea cellulare con cui si sta lavorando, soprattutto la densità cellulare di semina e la durata della fase log, prima del passaggio. Di solito, la concentrazione cellulare utilizzata nel passaggio è ridotta di 2, 4, 8, fino a 16 volte (cioè lo *split ratio* è pari a 2, 4, 8 o 16, rispettivamente), rendendo così il calcolo del numero di raddoppiamenti cellulari, più facile. Infatti uno *split ratio* pari a 2, corrisponde a 1 raddoppiamento cellulare, 4 a 2, 8 a 3 e 16 a 4. Ad esempio, una coltura che viene divisa 8 volte richiede 3 raddoppiamenti cellulari per tornare alla concentrazione cellulare di partenza. Una linea cellulare che cresce lentamente viene splittata (divisa) 1:2, mentre una linea che cresce rapidamente deve essere divisa 1:8 o 1:16 (Freshney, 2005).

Il metodo ideale per determinare la corretta densità cellulare di semina è quello di effettuare varie curve di crescita con differenti concentrazioni iniziali di semina, per determinare quella con cui si otterranno una fase lag e un PDT di più breve durata. In generale, molte linee cellulari continue di mammifero, presentano concentrazioni di semina comprese tra 1×10^4 e 5×10^4 cellule/ml; i fibroblasti e le linee cellulari più fragili (endoteliali ed epiteliali) vengono seminate alla concentrazione di 1×10^5 cellule/ml.

4.6.1 Esame delle colture cellulari al microscopio rovesciato

Il microscopio rovesciato o invertito (allegato 2) è uno degli strumenti più importanti del laboratorio di colture cellulari. Si tratta di un microscopio la cui sorgente di luce e il condensatore sono posti nella parte superiore, al di sopra del tavolino portaoggetti, mentre gli obiettivi e la torretta si trovano al di sotto. Viene utilizzato per osservare cellule viventi o organismi posti sul fondo di un contenitore (come le cellule aderenti sul fondo di una fiasca per colture) in condizioni naturali. Esso è di solito provvisto anche di un dispositivo per il contrasto di fase.

Il microscopio invertito consente il regolare controllo delle colture di cellule RTG-2. Procedere come segue:

1. Pulire il tavolino portaoggetti con alcool etilico al 70%, le lenti e gli obiettivi, se necessario, con una soluzione di ammoniaca e Vetril 1:1, utilizzando la carta per lenti.
2. Accendere il microscopio e porre la fiasca da osservare sul tavolino portaoggetti.
3. Esaminare le cellule con obiettivo 10X a contrasto di fase (un obiettivo 4X non fornisce dettagli sufficienti, mentre un ingrandimento maggiore di 10X delimita un'area troppo ristretta) e osservare:
 - lo stato di crescita (cellule sparse, subconfluenza, confluenza, addensamenti)
 - lo stato delle cellule (chiarezza, trasparenza, presenza di granuli, vacuolizzazione)
 - trasparenza del terreno di crescita (presenza di detriti, di granuli galleggianti, segni di contaminazione) selezionando un obiettivo a maggiore ingrandimento (40X) quando occorre.
4. Registrare sul quaderno di laboratorio tutte le osservazioni effettuate.
5. Riportare le colture in incubatore o utilizzarle sotto cappa per le manipolazioni previste.

4.6.2 Cambio del terreno di crescita

Procedere come segue:

- Portare il terreno di crescita delle cellule alla temperatura di 20 ± 2 °C utilizzando un bagno termostato.

- Esaminare le colture di RTG-2 al microscopio invertito (paragrafo 4.6.1).
- Porre sotto cappa, le fiasche con le cellule RTG-2, la bottiglia di terreno (dopo averla pulita con alcool etilico al 70%) e un beker pulito (se sterile, è meglio).
- Rimuovere il terreno vecchio dalla fiasca, aspirandolo con una pipetta Pasteur sterile montata su una pompa da vuoto, o versandolo direttamente nel beker.
- Aggiungere lo stesso volume di terreno fresco.
- Reincubare le colture.

E' stato dimostrato sperimentalmente, presso i laboratori ISPRA, che le cellule RTG-2 seminate in fiasche da 75 cm², con una densità cellulare iniziale di 500,000 cellule/ml, in un volume di terreno di crescita (paragr. 4.4.4) di 20-25 ml, necessitano di un cambio del terreno di crescita ogni 3 giorni.

4.6.3 Passaggi o sottocolture

Quando le cellule RTG-2 sono giunte a subconfluenza (fiasca madre), effettuare il passaggio, come segue:

1. Porre PBS e tripsina in bagno termostato (20 ± 2 °C) e tenere per non più di 15 minuti. Porre il terreno di crescita in bagno termostato (20 ± 2 °C) fino al momento dell'uso.
2. Osservare la fiasca madre di cellule al microscopio invertito.
3. Portare sotto cappa biologica e rimuovere il terreno vecchio, aspirandolo con una Pasteur sterile montata su pompa da vuoto o versandolo direttamente in un beker.
4. Lavare la fiasca con 2 ml (se da 25 cm²) o 3 ml (se da 75 cm²) di PBS, ed eliminarlo aspirandolo o versandolo in un beker sterile. Il lavaggio può essere eseguito 2-3 volte. Assicurarsi di aver eliminato completamente il PBS prima di passare al punto successivo.
5. Ricoprire il monostrato cellulare con circa 2 ml (fiasca da 25 cm²) o 3 ml (fiasca da 75 cm²) di Tripsina-EDTA 0,25%. Muovere la fiasca in senso orizzontale per permettere alla tripsina di ricoprire il monostrato cellulare in modo uniforme.
6. Attendere dai 3 ai 5 minuti, a temperatura ambiente o in incubatore a 20 ± 2°C, che si verifichi il distacco delle cellule.
7. Osservare la fiasca madre al microscopio rovesciato per verificare il distacco: le cellule appaiono rotondeggianti e il monostrato appare opaco e visibile in modo grossolano.
8. Agitare la fiasca madre battendola sul palmo della mano e poi con una pipetta da 5 o 10 ml, *monodisperdere* la sospensione cellulare.
9. Bloccare l'azione della tripsina, aggiungendo 4-5 ml di terreno di coltura (alla fiasca da 25 cm²) o 7-8 ml (alla fiasca da 75 cm²), pipettare energicamente, per separare bene le cellule.
10. Procedere al conteggio cellulare con Coulter Counter (paragrafo 4.6.4).
11. Calcolare la concentrazione cellulare (cellule/ml) e/o la densità cellulare (cellule/cm²) della fiasca madre.
12. Preparare una o più fiasche nuove (fiasche figlie) sulle quali va annotato il numero del passaggio, la data e la propria sigla personale.
13. Inoculare le fiasche figlie con un'opportuna quantità di sospensione cellulare della fiasca madre e di terreno di crescita. NB: ricordare che nelle fiasche vanno inseriti prima il terreno e poi le cellule.
14. Per decidere l'inoculo delle fiasche figlie, tener conto che le cellule RTG-2 possono essere *splittate* nel rapporto 1:2, come indicato nel certificato dell'IZSLER.

Esperienze effettuate presso i laboratori ISPRA hanno messo in evidenza che nelle fiasche da 25/75 cm², risulta idoneo un inoculo con concentrazione cellulare iniziale pari a 3x10⁵/5x10⁵ cellule/ml.

I passaggi delle cellule vanno tenuti sotto controllo attraverso il registro delle colture cellulari (allegato 8).

Per valutare la *salute* delle proprie colture, calcolare il tempo di raddoppiamento cellulare, PDT, con la seguente formula:

$$PDT = 0,3 \times t / \log N_f - \log N_o$$

dove

t = tempo della coltura in giorni

N_f = concentrazione/densità cellulare finale*

N_o = concentrazione/densità cellulare iniziale*.

Il PDT delle cellule RTG-2 con il terreno di crescita indicato nel paragrafo 4.4.4 è risultato compreso tra 3 e 3,5 giorni .

4.6.4 Conta cellulare con Coulter Counter

Se si utilizza il Coulter Counter modello Z1 doppia soglia (allegato 3), le condizioni dello strumento per il conteggio delle cellule RTG-2, sono le seguenti:

Capillare 100 µm

Soglie inferiore e superiore (intervallo di dimensioni): 3 - 10,5 µm

Modalità di conteggio: “above threshold lower”

Volume prelevato dallo strumento per il conteggio: 0,5 ml

Volume totale di diluente isotono: 20 ml

Dopo aver distaccato le cellule con tripsina e aver bloccato la sua azione con il terreno di coltura, procedere come segue:

- Preparare un bicchierino con 19,5 ml di isotono.
- Aggiungere (con la pipetta da 1 ml) 0,5 ml di sospensione cellulare e miscelare, facendo attenzione a non fare bolle.
- Aspettare 4-5 minuti, che le cellule si distribuiscano, per gravità, nel liquido di conta.
- Effettuare da 3 a 6 conteggi successivi (i conteggi non devono differire tra loro per più di 300 unità).
- Fare la media dei conteggi ritenuti validi. Il valore ottenuto va moltiplicato per 20 (0,5+19,5) e diviso per 0,5, ottenendo così il numero di cells/ml o concentrazione cellulare. Se la sospensione cellulare contata proviene da una diluizione (ad es. 1:10) moltiplicare tutto per il fattore di diluizione utilizzato. Se occorre stabilire la densità cellulare, moltiplicare per il volume di sospensione cellulare presente nella fiasca e dividere per i cm² della fiasca stessa.

NOTA: Un conteggio ideale non è inferiore a 5000 conte per volta, quindi quando si prevedono sospensioni cellulari poco concentrate, prelevare un volume di sospensione cellulare maggiore di 0,5 ml, ad esempio, 1 + 19 ml, 2 + 18 ml o 3 + 17 ml di isotono (fino ad un massimo di 5 ml + 15 ml di isotono). In questo caso il valore medio dei 3 conteggi va moltiplicato per 20 e diviso per, 1, 2 o 3, rispettivamente.

4.7 Colorazione della linea cellulare RTG-2

4.7.1 Colorazione del monostrato in piastra (Freshney, 2005)

Materiale occorrente

PBS

Soluzione PBS: Metilico assoluto 1:1
Colorante Giemsa (filtrato su carta bibula)

Alcool metilico assoluto

Acqua distillata

2 Piastre Petri per colture cellulari, 60 mm (in polistirene monouso o in vetro)

NB: Le Petri in vetro devono essere sterilizzate in autoclave prima dell'uso

Procedimento

1. Seminare in ognuna delle 2 Petri da 60 mm, 10000-15000 cellule/cm² (210.000-315.000 cellule totali) e incubare a 20 ± 2 °C.
2. Dopo 48-96 ore, osservare le Petri al microscopio invertito e verificare lo stato delle cellule: se appaiono in monostrato, procedere alla colorazione (si possono anche colorare a tempi diversi, ad es. una piastra dopo 48 ore e l'altra dopo 72 o 96 ore)
3. Eliminare il terreno dalle Petri.
4. Lavare il monostrato con PBS (3-4 ml) e poi eliminarlo.
5. Aggiungere 4,2 ml di soluzione PBS:metilico 1:1, in ogni piastra, e lasciare agire per 2 minuti, quindi eliminare la soluzione.
6. Aggiungere, ad ogni piastra, 5 ml di metilico assoluto e lasciare agire per 10 minuti, poi eliminarlo.
7. Sciacquare nuovamente il monostrato di ciascuna piastra, con metilico assoluto fresco e poi eliminarlo.
8. Aggiungere ad ogni piastra, 1,7 ml di Giemsa, coprendo bene i monostrati con il colorante, e lasciare agire per 2 minuti.
9. Aggiungere al Giemsa, 7,7 ml di acqua distillata, agitando delicatamente con movimenti rotatori le piastre, per 2 minuti.
10. Lavare delicatamente ogni piastra sotto acqua corrente, per rimuovere i precipitati di colorante, per circa 20 secondi.
11. Sciacquare con acqua distillata (usando una spruzzetta).
12. Esaminare al microscopio ottico (solo ad ingrandimenti che non richiedono uso di olio) i monostrati umidi. Le piastre possono essere conservate a secco. Per poterle osservare al microscopio, vanno sempre prima inumidite con acqua distillata.

4.7.2 Colorazione del monostrato su vetrino (modificato da Freshney, 2005)

Materiale occorrente

PBS

Soluzione PBS: Metilico assoluto 1:1

Colorante Giemsa (filtrato su carta bibula)

Alcool metilico assoluto

Acqua distillata

2 Piastre di Petri per colture cellulari 90 mm (in polistirene monouso o in vetro sterilizzate in autoclave)

2 Vetrini portaoggetto (sterilizzati in autoclave)

2 Vetrini coprioggetto

2 Bacchette in vetro

Vaschette per la colorazione dei vetrini

Montante per vetrini Eukitt

Xilene

Procedimento

1. Inserire, in ciascuna delle due Petri da 90 mm, un vetrino portaoggetto sterile e quindi *seminare* circa 10000 cells/cm² (490.000 cellule totali) e incubare a 20 ± 2 °C
 2. Dopo 48-96 ore di coltura, osservare le piastre al microscopio invertito e verificare l'adesione delle cellule al vetrino, quindi procedere alla colorazione (si possono anche colorare a tempi diversi, ad es. un vetrino dopo 48 ore e l'altro dopo 72 o 96 ore).
 3. Eliminare il terreno dalle piastre, lasciando dentro i vetrini.
 4. Lavare i vetrini aggiungendo PBS nelle piastre (circa 5 ml) ed eliminarlo.
 5. Aggiungere circa 10 ml di soluzione PBS:metilico 1:1, lasciare agire per 2 minuti e poi eliminarla.
 6. Aggiungere 9 ml di metilico assoluto, lasciare agire per 10 minuti e poi eliminarlo.
 7. Sciacquare i vetrini nelle Petri, con metilico assoluto fresco e poi eliminarlo.
 8. Porre ogni vetrino sospeso su due bacchette.
 9. Ricoprire ciascun vetrino con circa 2 ml di Giemsa e lasciar agire 2 minuti.
 10. Aggiungere sopra al Giemsa, 8 ml di acqua distillata, lasciando agire per 2 minuti.
 11. Lavare delicatamente ciascun vetrino sotto acqua corrente, per rimuovere i precipitati, per circa 20 secondi.
 12. Sciacquare con acqua distillata.
 13. Lasciar asciugare i vetrini all'aria.
 14. Montare il coprioggetto sui vetrini, sotto cappa chimica (attenzione, lo xilene è cancerogeno), come segue:
 - utilizzando le apposite vaschette per vetrini, immergere i vetrini in xilene per 2-3 minuti.
 - estrarre i vetrini uno per volta dallo xilene, scolarli, e poggiarli su un piano.
 - mettere 2-3 gocce di Eukitt su un coprioggetto.
 - far aderire bene il coprioggetto al vetrino premendo delicatamente per eliminare ogni bolla.
 - far asciugare i vetrini per alcune ore sotto cappa chimica.
 15. Osservare i vetrini al microscopio anche con obiettivo 100 X ad immersione.
- Nelle figure da 1 a 4 in allegato 9, sono mostrate le cellule RTG-2 fotografate al microscopio ottico a diversi ingrandimenti.

4.8 Curva di crescita

Come precedentemente descritto, le cellule, dopo il passaggio, progrediscono attraverso un ciclo di crescita, caratterizzato dalle fasi lag, log e plateau. E' essenziale conoscere bene il ciclo di crescita della linea cellulare che si sta utilizzando, in quanto, le cellule nelle loro diverse fasi, possono presentare differenze rispetto alla proliferazione, all'attività enzimatica, al metabolismo energetico e alla sintesi di prodotti specializzati.

La fase lag è il periodo immediatamente successivo alla semina, in cui non si ha crescita cellulare. E' un periodo di adattamento durante il quale le cellule ripristinano gli elementi del glicocalice persi durante la tripsinizzazione e si attaccano al substrato. Durante questa fase ricompare il citoscheletro, c'è nuova sintesi di DNA e di proteine strutturali e aumentano i livelli di enzimi come la DNA polimerasi. Non si evidenziano ancora prodotti cellulari specializzati che riappariranno solo quando le cellule avranno raggiunto un'elevata densità.

La fase log, è il periodo di crescita esponenziale, la cui lunghezza è direttamente proporzionale al numero di cellule seminate, alla velocità di crescita e alla densità cui si verifica l'inibizione da contatto. In questa fase, la quasi totalità delle cellule è in crescita e la coltura è nella sua

forma più riproducibile. E' quindi il momento migliore per effettuare campionamenti, perché la popolazione è uniforme e la vitalità molto elevata.

La fase di plateau o fase stazionaria, viene raggiunta quando la coltura diviene confluyente e si ha una riduzione della crescita, con, in alcuni casi, la cessazione della proliferazione. Le cellule divengono meno mobili (per inibizione da contatto), possono assumere un orientamento preferenziale (fibroblasti) e aumenta la sintesi di proteine specializzate rispetto a quella di proteine strutturali (De Angelis, 1990).

E' utile, durante la fase log, calcolare il PDT. Questo valore viene utilizzato per quantificare la risposta delle cellule alle diverse condizioni di coltura, come ad es. le variazioni della concentrazione di nutrienti nel terreno o nei componenti del siero. Esso rappresenta inoltre, un indicatore dello "stato di salute" delle cellule e permette di calcolare il fattore di diluizione richiesto nei passaggi. Il PDT derivato da una curva di crescita è un valore medio che rappresenta l'intera popolazione cellulare e costituisce il risultato netto di velocità di divisione cellulare differenti all'interno di una stessa coltura. Il PDT è quindi influenzato dal numero di cellule che non si dividono e da quelle che muoiono.

La curva di crescita della propria linea cellulare, può essere effettuata utilizzando contenitori di crescita differenti: fiasche, piastre di Petri, piastre multipozzetto. La prima volta, se non si hanno a disposizione dati dalla letteratura scientifica, la concentrazione cellulare iniziale viene stabilita in base al contenitore utilizzato e al criterio tratto da Freshney, 2005, schematizzato nella tabella 24.

Dopo aver realizzato la prima curva di crescita, ripetere la prova, aggiustando la concentrazione cellulare iniziale sulla base dei risultati ottenuti.

La curva di crescita permette di stabilire i seguenti parametri per la propria linea cellulare, nelle condizioni di crescita utilizzate:

- durata fase lag
- PDT fase log
- densità di saturazione (in funzione del contenitore utilizzato)

Tab. 24 – Concentrazione iniziale di semina in funzione del contenitore utilizzato (da Freshney, 2005)

Tipologia di cellule	Tipologia di contenitore	Concentrazione iniziale (cells/ml)	N° totale di contenitori
Cellule che crescono rapidamente	Fiasche da 25 cm ²	2×10^4	20 fiasche
Cellule che crescono lentamente	Fiasche da 25 cm ²	1×10^5	20 fiasche
Tutte le cellule	Piastre multipozzetto da 12	4 pozzetti con 1×10^4 4 pozzetti con 3×10^4 4 pozzetti con 1×10^5	3 piastre
Tutte le cellule	Piastre multipozzetto da 24	8 pozzetti con 1×10^4 8 pozzetti con 3×10^4 8 pozzetti con 1×10^5	3 piastre

Per la curva di crescita con la linea cellulare RTG-2, procedere secondo i protocolli descritti successivamente.

4.8.1 Curva di crescita in fiasca

Materiali

Fiasche di cellule RTG-2 in fase esponenziale (colture di partenza)

Terreno di crescita (paragr. 4.4.4)

Tripsina-EDTA o tripsina 0,25%

PBS

20 Fiasche da 25 cm²

1 beuta in vetro da 250 ml sterile

Procedimento

1. Osservare le cellule delle colture di partenza al microscopio rovesciato e verificare che siano a subconfluenza.
2. Tripsinizzare le cellule e contarle al Coulter Counter (è preferibile unire il contenuto delle varie fiasche e fare un unico conteggio).
3. Preparare nella beuta sterile in vetro, una sospensione cellulare madre di 105 ml con 2×10^5 cell/ml. Agitare bene la sospensione cellulare.
4. Siglare le 20 fiasche da 25 cm² (numero progressivo, data e sigla personale).
5. Seminare 5 ml di sospensione cellulare madre in ciascuna fiasca (1×10^6 cellule totali), avendo cura di agitare la beuta da cui vengono prelevate le cellule, prima di ogni inoculo.
6. Utilizzare i 5 ml di sospensione cellulare rimasti, per effettuare una conta di verifica della concentrazione cellulare iniziale. Questa conta rappresenta la concentrazione cellulare iniziale (Ci).
7. Porre tutte le fiasche in incubatore a 20 ± 2 °C, annotando l'ora sul quaderno di laboratorio.
8. Dopo 24 ore di coltura, rimuovere dall'incubatore 2 fiasche.
9. Osservare le 2 fiasche al microscopio rovesciato.
10. Sotto cappa, rimuovere il terreno di coltura ed effettuare 2 lavaggi con PBS.
11. Aggiungere ad ogni fiasca 2 ml di tripsina e lasciare agire per 15 minuti a temperatura ambiente.
12. Al termine, neutralizzare la tripsina con 3 ml di terreno di coltura in ogni fiasca (per questo passaggio può andar bene un terreno qualsiasi, purchè contenga siero) e miscelare bene.
13. Contare separatamente le sospensioni delle due fiasche al Coulter Counter.
14. Ripetere il procedimento dal punto 8 al punto 13, dopo 48 e 72 ore.
15. Trascorse 72 ore, cambiare il terreno a tutte le fiasche rimaste.
16. Ripetere il procedimento dal punto 8 al punto 13 dopo 96 ore di coltura e, successivamente, ogni 2-3 giorni fino al raggiungimento della fase di plateau, effettuando cambi di terreno ogni 2-3 giorni in base al pH (quando il terreno è giallo o giallo-arancio).

Analisi dei dati

Le conte realizzate al Coulter forniscono la concentrazione cellulare, cioè le cellule/ml. Moltiplicando questo numero per 5 (2 ml di tripsina + 3 ml di terreno) si ottiene il numero totale di cellule per fiasca. Dividendo il numero totale di cellule per fiasca per 25 cm², si ottiene la densità cellulare, cioè le cellule/cm².

Disegnare un grafico, ponendo sull'asse delle ordinate la concentrazione cellulare (cell/ml) o la densità cellulare (cell/cm²) in scala logaritmica e sull'asse delle ascisse il tempo (in giorni) in scala lineare. E' possibile utilizzare il programma Excell o fogli di carta millimetrata in scala semilog.

Utilizzare sempre i valori medi ottenuti dai conteggi su 2 fiasche. La fase lag (in giorni), la den-

sità di plateau e la densità di saturazione possono essere valutati graficamente, come indicato dalla figura in allegato 10.

Il PDT in fase log può essere calcolato con la formula fornita nel paragrafo 4.6.3, impostando il calcolo su un foglio Elettronico Excell. Si riporta un esempio in allegato 11.

4.8.2 *Curva di crescita in piastra multipozzetto*

Materiali

Fiasche di cellule RTG-2 in fase esponenziale (colture di partenza)

Terreno di crescita

Tripsina-EDTA 0,25%

PBS

6 piastre multipozzetto da 6

Beute in vetro sterili

Procedimento

1. Osservare le cellule delle colture di partenza al microscopio rovesciato e verificare che siano a subconfluenza.
2. Tripsinizzare le cellule e contarle al Coulter Counter (è preferibile unire il contenuto delle varie fiasche e fare un unico conteggio).
3. Preparare in una beuta sterile, 112 ml di sospensione cellulare con 1×10^5 cell/ml ($11,2 \times 10^6$ cellule totali occorrenti). Agitare bene la sospensione cellulare.
4. Siglare le 6 piastre multipozzetto.
5. Seminare 3 ml di sospensione cellulare in ciascun pozzetto (3×10^5 cellule totali), avendo cura di agitare la beuta da cui vengono prelevate le cellule, prima di ogni inoculo.
6. Utilizzare 2-3 ml della sospensione cellulare rimasta, per effettuare una conta di verifica della concentrazione cellulare iniziale. Questa conta rappresenta la concentrazione cellulare iniziale (C_i).
7. Coprire le piastre con parafilm per evitare gli scambi gassosi.
8. Porre le piastre in incubatore a 20 ± 2 °C, annotando l'ora sul quaderno di laboratorio.
9. Dopo 24 ore di coltura, rimuovere dall'incubatore una piastra.
10. Osservare i pozzetti al microscopio rovesciato.
11. Sotto cappa, rimuovere il terreno di coltura da 2 pozzetti ed effettuare un lavaggio con 2 ml di PBS per ciascun pozzetto.
12. Aggiungere 1 ml di tripsina per pozzetto e lasciare agire per 15 minuti a temperatura ambiente.
13. Al termine, neutralizzare la tripsina con 1-2 ml di terreno di coltura (può andar bene un terreno qualsiasi, purchè contenga siero) in ogni pozzetto e miscelare bene.
14. Contare separatamente le sospensioni dei due pozzetti al Coulter Counter.
15. Ripetere questo procedimento dal punto 8 al punto 14, dopo 48 e 72 ore.
16. Trascorse 72 ore, cambiare il terreno a tutti i pozzetti.
17. Ripetere il procedimento dal punto 8 al punto 14 dopo 96 ore di coltura e successivamente, ogni 2-3 giorni fino al raggiungimento della fase di plateau, effettuando cambi di terreno ogni 2-3 giorni in base al pH (quando il terreno è giallo o giallo-arancio).

Analisi dei dati

Procedere come al paragrafo 4.8.1

Nota bene

La curva di crescita può essere realizzata anche in piastre multipozzetto 12 e 24, cambiando i

volumi di sospensione cellulare da inoculare nei pozzetti e la concentrazione iniziale delle cellule. Per maggiori dettagli, consultare “Protocol 21.8 – Growth curve with a monolayer in multiwell plates” da Freshney 2005 pag. 348-350.

4.9 Determinazione dell'efficienza di piastramento

La formazione di colonie in seguito a piastramento delle cellule a bassa densità, denominata anche efficienza di piastramento (EP), costituisce uno dei metodi più utilizzati per studiare le richieste nutrizionali delle cellule, per testare i lotti di siero, per misurare l'effetto dei fattori di crescita e come test di tossicità.

L'EP è la percentuale di cellule in grado di dare origine a colonie e viene determinata come percentuale del rapporto tra il numero di colonie formate e il numero di cellule seminate:

$$EP = (\text{N}^\circ \text{ colonie formate} / \text{N}^\circ \text{ cellule seminate}) \times 100$$

Per la valutazione dell'EP della linea RTG-2, procedere con il protocollo sottostante.

Materiali

1 Fiasca da 75 cm² di cellule RTG-2 in fase esponenziale (coltura di partenza)

Terreno di crescita

PBS

Tripsina-EDTA 0,25%

20 Piastre di Petri 6 cm

Provette sterili da 50 ml (o beutine in vetro da 50 ml sterilizzate) per le diluizioni

Giemsa o Cristal violetto

Alcool metilico assoluto

Protocollo

1. Tripsinizzare (3 ml di tripsina) le cellule della coltura di partenza. Quando le cellule si arrotondano e cominciano a staccarsi, disperderle in 7 ml di terreno di crescita. Agitarle molto bene e contare la sospensione cellulare madre (SCM) al Coulter Counter.
2. Diluire la SCM a 2000 cell/ml come concentrazione di partenza (CON1) per le successive diluizioni.
3. Dalla concentrazione CON1 preparare 5 diluizioni successive: 200 – 100 – 50 – 20 – 10 cell/ml.
4. Con ognuna delle diluizioni preparate, seminare 3 piastre di Petri (5 ml/piastra).
5. Con la diluizione CON1, seminare 2 piastre (5 ml/piastra) che costituiranno il controllo.
6. Chiudere le piastre con parafilm e porre in incubatore per 1 settimana.
7. Un esempio di procedimento è mostrato in allegato 12.
8. Al termine, osservare le piastre con microscopio rovesciato. Se non si sono formate colonie, cambiare il terreno a tutte le piastre e proseguire la coltura per un'altra settimana.

Se le colonie si sono formate procedere alla colorazione secondo protocollo 4.7.1 oppure con cristal violetto secondo il seguente procedimento:

- a. Rimuovere il terreno dalle piastre.
- b. Lavare con PBS ed eliminarlo.
- c. Aggiungere ad ogni piastra, 5 ml di PBS e successivamente 5 ml di alcool metilico assoluto. Miscelare delicatamente (per evitare che le colonie si staccino dal substrato).
- d. Eliminare la soluzione precedente dalle piastre e aggiungere 5 ml di alcool metilico assoluto (per fissare le cellule). Lasciare per 10 minuti.
- e. Eliminare l'alcool metilico e aggiungere 2-3 ml di cristal violetto puro, assicurandosi che

- venga perfettamente coperto il fondo della piastra. Lasciare per 10 minuti.
- f. Rimuovere il colorante (questo può essere filtrato e conservato per le colorazioni successive).
 - g. Sciacquare le piastre con acqua distillata. Far asciugare.
 - d. Contare le colonie in ogni piastra.
 9. Calcolare l'EP per ogni densità di semina. L'andamento del valore di EP viene evidenziato *plottando* su grafico il numero di colonie/piastra in funzione del numero di cellule seminate/piastra (figura 5).

Effettuare prove successive per valutare la migliore densità di semina iniziale per le cellule RTG-2, considerando solo i valori di EP entro l'intervallo di linearità.

Prove interne ai laboratori ISPRA hanno portato alle seguenti conclusioni:

- la formazione di colonie richiede 10-14 gg di coltura
- la densità di semina iniziale deve essere di circa 12,5 cellule/cm²
- ogni colonia deve essere costituita da almeno 200-250 cellule

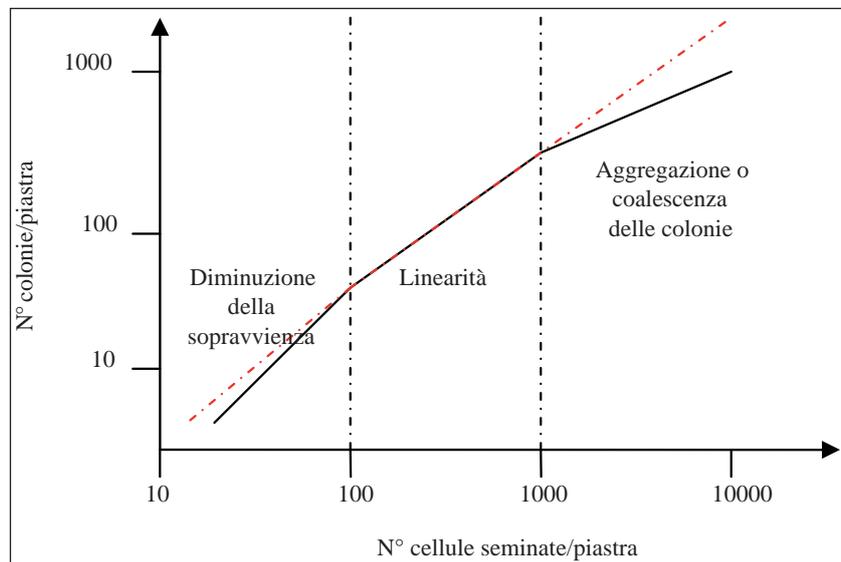


Fig. 5 - Andamento dell'Efficienza di Piastramento

Sono in corso prove ulteriori per stabilire l'EP della linea cellulare. In allegato 13 sono mostrate alcune immagini di colonie di RTG-2.

5. ALLEGATI

- Allegato 1. Certificato e scheda di sicurezza della linea cellulare RTG-2
- Allegato 2. Attrezzature di laboratorio necessarie
- Allegato 3. Attrezzature di laboratorio addizionali
- Allegato 4. Materiale plastico per colture cellulari
- Allegato 5. Vetreria per colture cellulari
- Allegato 6. Manipolazioni in sterilità
- Allegato 7. Curva di crescita della linea cellulare RTG-2
- Allegato 8. Registro delle colture cellulari
- Allegato 9. Foto al microscopio del monostrato RTG-2
- Allegato 10. Curva di crescita (determinazione fase lag, densità di saturazione e densità di plateau)
- Allegato 11. Foglio di calcolo Excell per la determinazione del PDT
- Allegato 12. Schema delle diluizioni per la determinazione dell'EP
- Allegato 13. Foto al microscopio di colonie di RTG-2

Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia
- Brescia -

LABORATORIO CENTRO SUBSTRATI CELLULARI

CELL LINE:	BS CL 76 / RTG 2 (Gonad rainbow trout)
SPECIES:	Fish
ORIGIN:	American Type Culture collection, Rockville, Md (
DATE OF ARRIVAL:	1980
PASSAGE LEVEL N.:	60
CULTURE MEDIUM:	Eagle's minimum essential medium in Earle's BSS calf serum (10%). Temperature of incubation : 20°
FREEZE MEDIUM:	Culture medium + DMSO (10%)
CELL NUMBER per ml:	
- FROZEN IN AMPOULES:	4.1 x 10 ⁶
- IN BOTTLES (25 cm ²):	3.0 x 10 ⁶
MORPHOLOGY:	Fibroblastic-like
KARYOTYPE:	2n = 60 in 100 cells
STERILITY TESTS:	Free of bacteria and mycoplasma
VIRUS SUSCEPTIBILITY:	Infectious pancreatic necrosis, viral hemorrhagic septicemia, EEE and VEE [ATCC catalogue], H. salmonis, infectious hematopoietic, oncorhynchus masou, pike fry rhabdovirus disease and spring vir of carp viruses
APPLICATIONS:	
NOTES:	
MONOCLONAL ANTIBODIES:	
REFERENCES:	Science 135 : 1065, 1962; Proc. Soc. Exp. Biol. M 116 : 190, 1964
ACTUAL PASSAGE LEVEL N.:	88
SPLIT:	1 : 2



SCHEDA DI SICUREZZA

Nome del prodotto : Linea cellulare RTG 2

Data emissione : 20.04.2004

Rev. 1 Pag. 1 di 3

1. Identificazione del preparato e della società

- *Identificazione del preparato :* Linea cellulare: RTG 2
Codice: BS CL 76
Origine: Gonad rainbow trout
- *Caratteristiche:*
 - cariotipo diploide
 - cariotipo modificato
 - trasformata
 - agenti chimici
 - agenti virali
 - caratteristiche tumorali
- *Identificazione della società :* Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia Romagna
Via Bianchi 7/9
Tel. 030 22901
Fax 030 225613
Centro Substrati Cellulari
Tel./Fax 030 2290386
- *Numeri utili :* Informazioni Centro Antiveleni presso
Spedali Civili di Brescia e/o presso Oncologia/
Medicina Interna / Azienda Ospedaliera
25125- Brescia- Piazzale Spedali Civili
Tel. 030 3995118

2. Composizione e informazione sugli ingredienti

- Cellule coltivate in terreno di crescita (MEM) arricchito con siero fetale bovino, esente da BSE
- Non presenti sostanze pericolose ai sensi della direttiva 67/548
 - Altro

3. Indicazioni dei pericoli

Rischi per la salute /ambiente Tutte le colture cellulari vengono sottoposte a controlli volti ad accertare la eventuale contaminazione da parte di alcuni agenti virali;tuttavia non è possibile escludere la potenziale infezione in forma silente di agenti patogeni di varia natura. In particolare, tutte le colture di origine umana e di primate, nonché le linee tumorali possono essere pericolose per ingestione e per contatto. Le cellule tumorali sono comunque portatrici di DNA modificato.

Rischi per l'operatore

Rischi non accertati

4. Misure di primo soccorso

- Contatto con la pelle :* lavare immediatamente e abbondantemente con acqua se compare irritazione consultare un medico.
- Contatto con gli occhi:* lavare immediatamente e abbondantemente con acqua tenendo la palpebra aperta. Consultare un oculista
- Ingestione:* consultare il Servizio Oncologico e/o di Medicina Interna più vicino



SCHEDA DI SICUREZZA

Nome del prodotto : Linea cellulare RTG 2

Data emissione : 20.04.2004

Rev. 1 Pag. 2 di 3

5. Misure antincendio	Non previste
6. Misure in caso di fuoriuscita accidentale	
<i>Precauzioni individuali:</i>	usare mezzi di protezione personali per evitare il contatto con la pelle, gli occhi e con gli indumenti
<i>Precauzioni ambientali:</i>	non permettere l'entrata nel sistema fognario, smaltire previa sterilizzazione e secondo disposizioni
<i>Metodo per la pulizia:</i>	disinfettare, assorbire con materiale inerte, asciugare immediatamente, completare la pulizia dell'area colpita, secondo le disposizioni
7. Manipolazione e stoccaggio	
<i>Precauzioni per la manipolazione</i>	<u>La potenziale infezione da parte di agenti estranei delle colture cellulari ne suggerisce la manipolazione</u> secondo le buone pratiche di laboratorio di igiene e sicurezza per i prodotti diagnostici. <ul style="list-style-type: none">• Operare in cabine a flusso laminare classe 2• Usare guanti e propipette• <u>Non si assume alcuna responsabilità relativamente ad eventuali inconvenienti dell'operatore conseguentemente alla manipolazione della linea cellulare.</u>
<i>Stoccaggio</i>	Per le cellule in coltura riferirsi alla scheda tecnica allegata al materiale Per le fiale congelate : congelare a -80°C (per brevi periodi) conservare in azoto liquido (per periodi illimitati)
8. Protezione individuale	
Attenersi alle indicazioni riportate nel punto 7 relative alle precauzioni per la manipolazione	
9. Proprietà fisiche e chimiche	
<i>Aspetto:</i>	Recipienti contenenti soluzione di colore rosso per cellule in coltura; in alternativa, fiale contenenti 1 ml di soluzione di colore rosso per fiale congelate
<i>Odore:</i>	nessuno
<i>pH:</i>	7-7.5
<i>Infiammabilità:</i>	Non Determinata
<i>Densità relativa:</i>	Non Determinata
<i>Idrosolubilità:</i>	solubile
10. Stabilità e reattività	
Stabile ai fini della sicurezza anche se altamente deteriorabile ai fini dell'utilizzo, se mantenuto in condizioni differenti da quelle indicate nella scheda tecnica allegata al materiale.	



SCHEDA DI SICUREZZA

Nome del prodotto : Linea cellulare RTG 2

Data emissione : 20.04.2004

Rev. 1

Pag. 3 di 3

11. Informazioni tossicologiche

- Il preparato è privo di effetti tossici
 Altro

12. Informazioni ecologiche

Utilizzare secondo buone pratiche di laboratorio, evitando di disperdere il preparato, i contenitori e gli imballaggi nell'ambiente.
Non eliminare nelle acque di scarico né fognature

13. Considerazioni sullo smaltimento

Preparato: dopo l'uso trattare come rifiuto speciale legge 915/82. Tutto il materiale eliminato va immerso in soluzioni disinfettanti ed eliminato come rifiuto ospedaliero speciale.
Operare secondo le vigenti disposizioni locali e nazionali

Imballo: Smaltimento secondo le normative nazionali e regionali. Gli imballi contaminati devono essere maneggiati con le stesse modalità del preparato: gli imballi non contaminati possono essere trattati o riciclati come rifiuti normali

14. Informazioni sul trasporto

Esente da prescrizioni per la sicurezza.

Per l'integrità del preparato : cellule in coltura (temperatura ambiente)
cellule in fiale congelate (in ghiaccio secco o contenitori d'azoto)

15. Informazioni sulla regolamentazione

Non disponibili informazioni specifiche

16. Altre informazioni

- Informazioni relative alle caratteristiche peculiari di ogni linea o coltura cellulare, nonché le specifiche modalità di manipolazione, sono indicate negli specifici allegati
- Il prodotto è destinato esclusivamente all'uso di laboratorio da parte di personale qualificato
- Le informazioni contenute sono basate sull'attuale stato di conoscenza. Esse caratterizzano il prodotto con riferimento alle appropriate precauzioni di sicurezza e non rappresentano una garanzia sulle proprietà del prodotto.

Allegato 2



**Cappa a flusso laminare
verticale di classe II A**



Centrifuga refrigerata



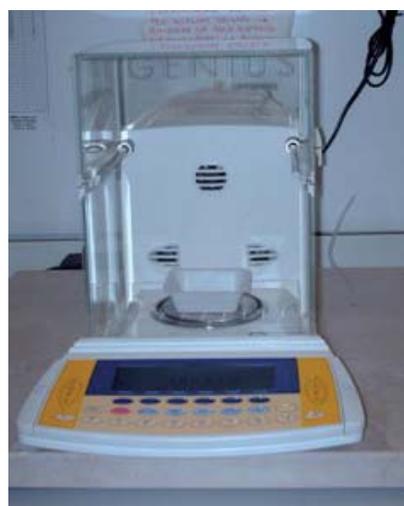
Bagno termostato



Microscopio rovesciato



pHmetro



Bilancia analitica



Dispositivo per la produzione di acqua ultrapura



Incubatore ad atmosfera normale



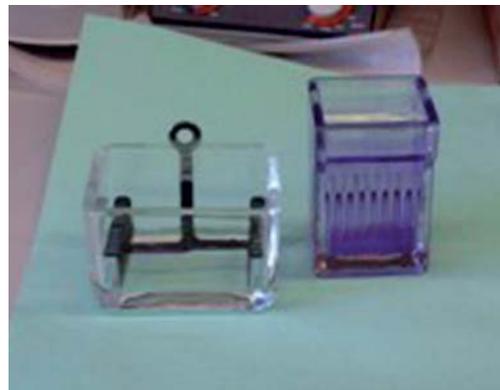
Microscopio ottico con sistema di analisi dell'immagine e macchina fotografica



Autoclave



Pipette (Pipett aid)



Vaschette per la colorazione dei vetrini

Allegato3
Attrezzature aggiuntive



**Coulter Coulter Z1 doppia soglia
(Laboratory Instruments)
Da considerare attrezzatura necessaria**



Lavavetria



**Contenitore per la conservazione
delle cellule in azoto liquido**

Allegato 4

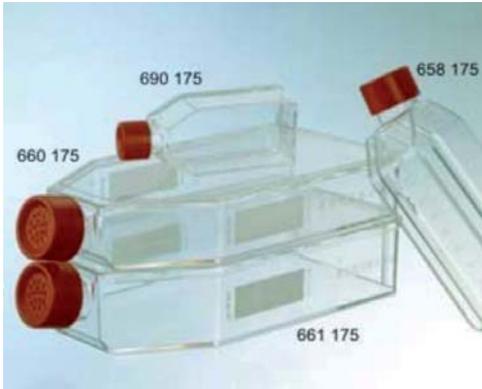


Fig. 1 - Fiasche per colture cellulari

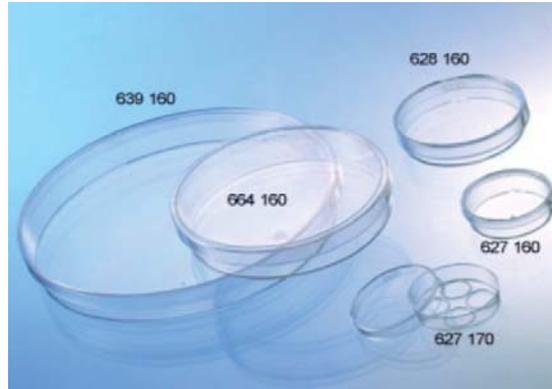


Fig. 2 - Piastre per colture cellulari

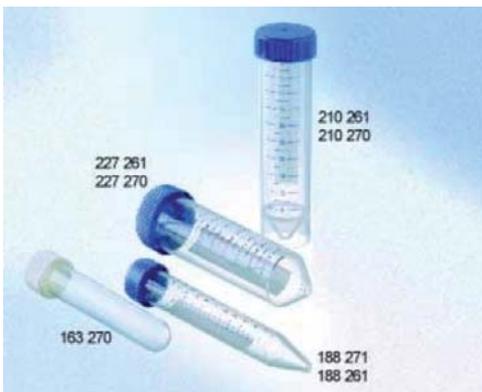


Fig. 3 - Provette per colture cellulari



Fig. 4 - Pipette in plastica monouso

Allegato 5



Fig. 1 – Bottiglie in vetro Pyrex, autoclavabili per la conservazione dei terreni e delle soluzioni



Fig. 2 – Cilindri graduati



Fig. 3 - Matracci



Fig. 4 – Beute in vetro Duran

Allegato 6



Fig. 1



Fig. 2



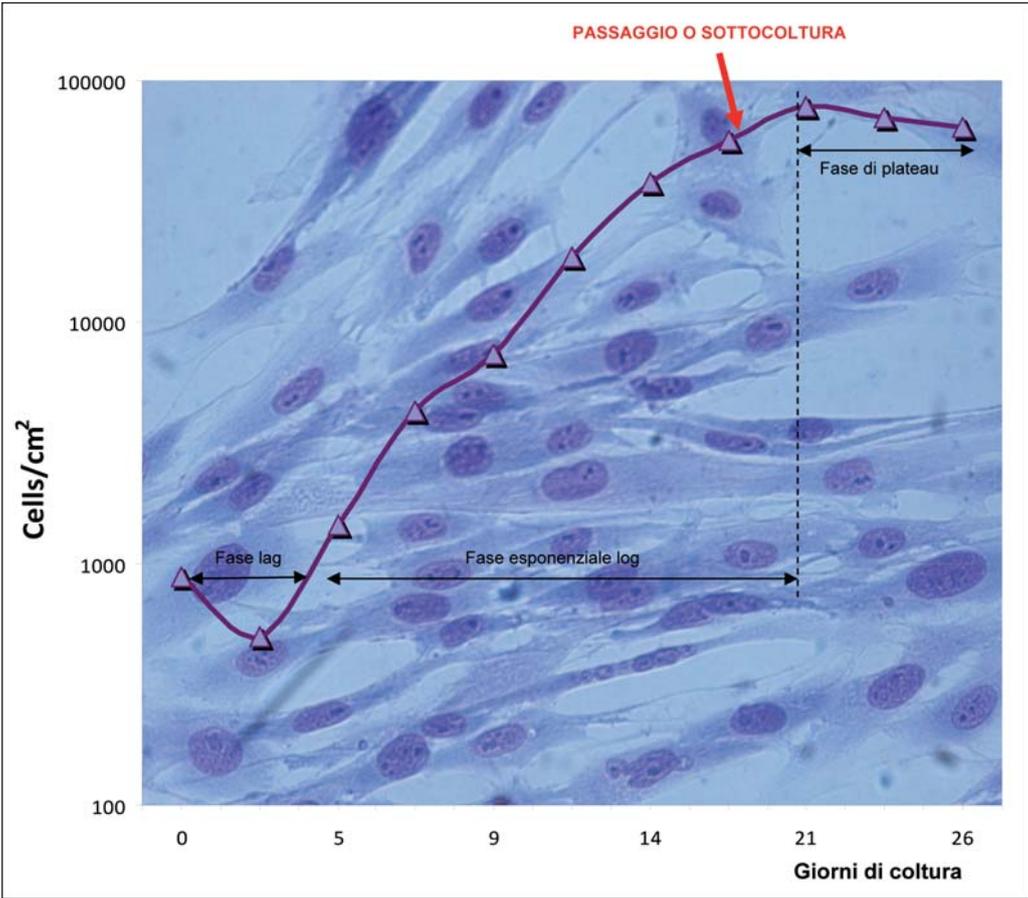
Fig. 3



Fig. 4



Fig. 5



Curva di crescita della linea cellulare RTG-2

Allegato 7

Data	Ora	Tipo cellulare	Numero passaggio	Volume fiasca (cq)	Cells iniziali	Giorni di coltura	Cellule finali	Population Doubling Time

Registro delle colture cellulari

Allegato 9



Fig. 1- Ingrandimento 10X

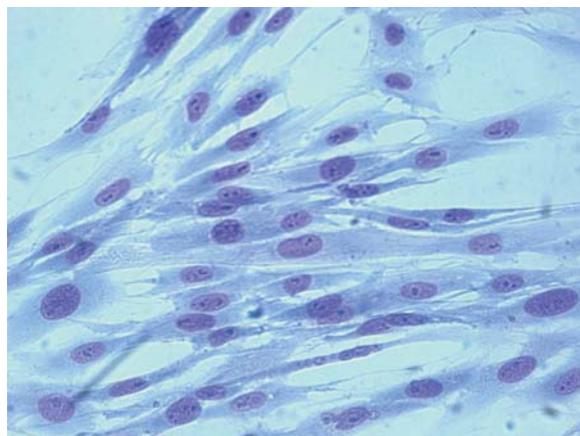


Fig. 2 - Ingrandimento 40X

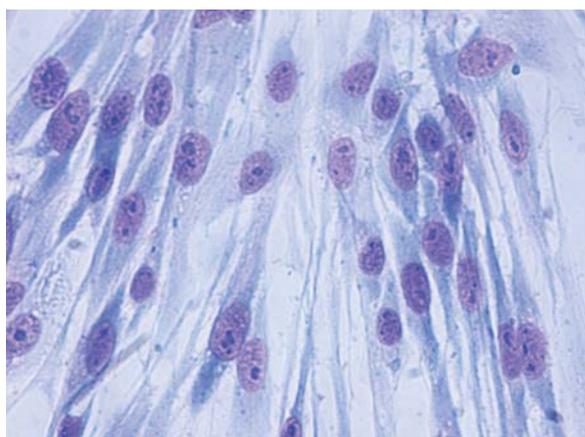


Fig. 3 Ingrandimento 60X

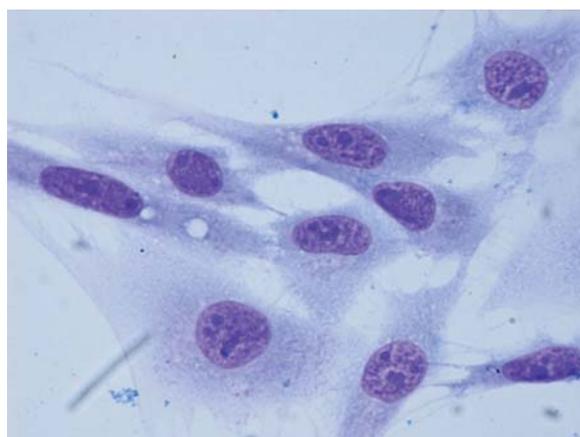
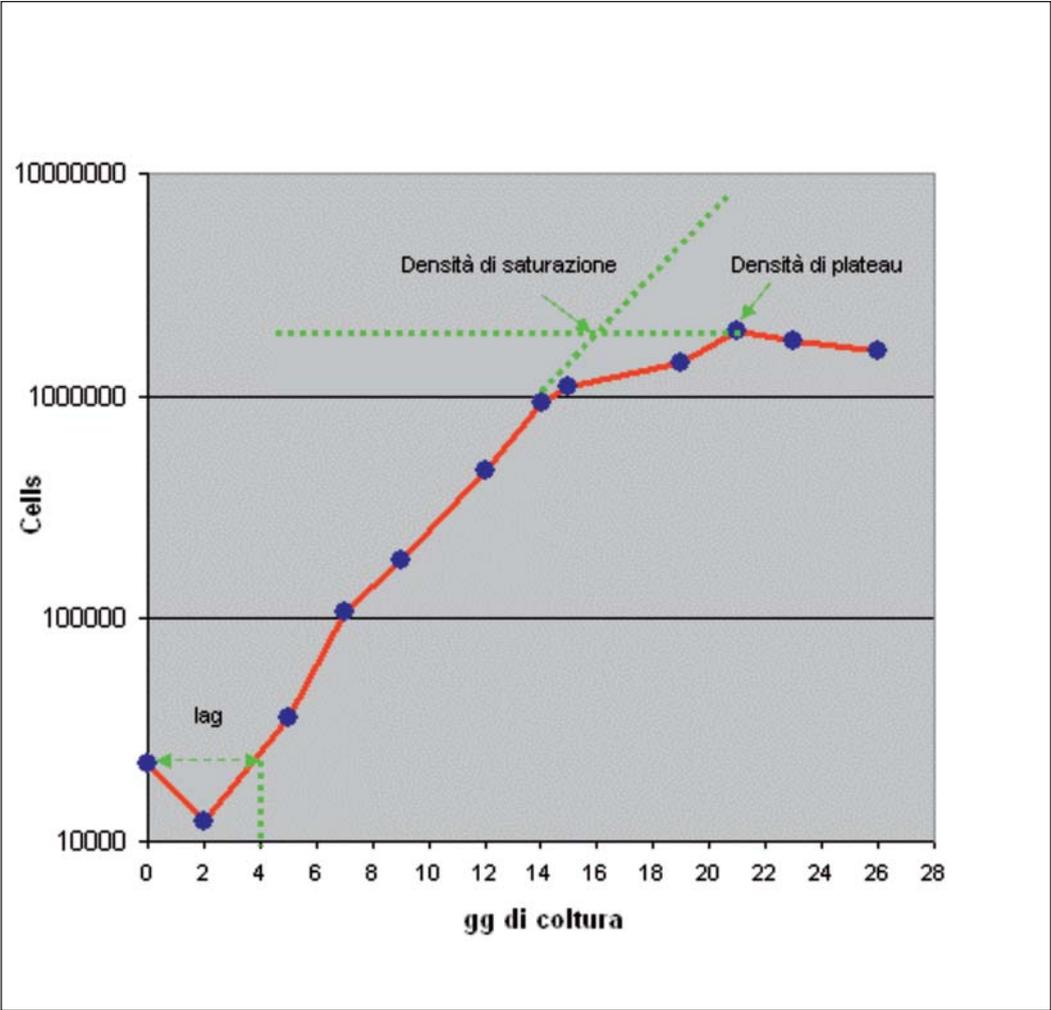
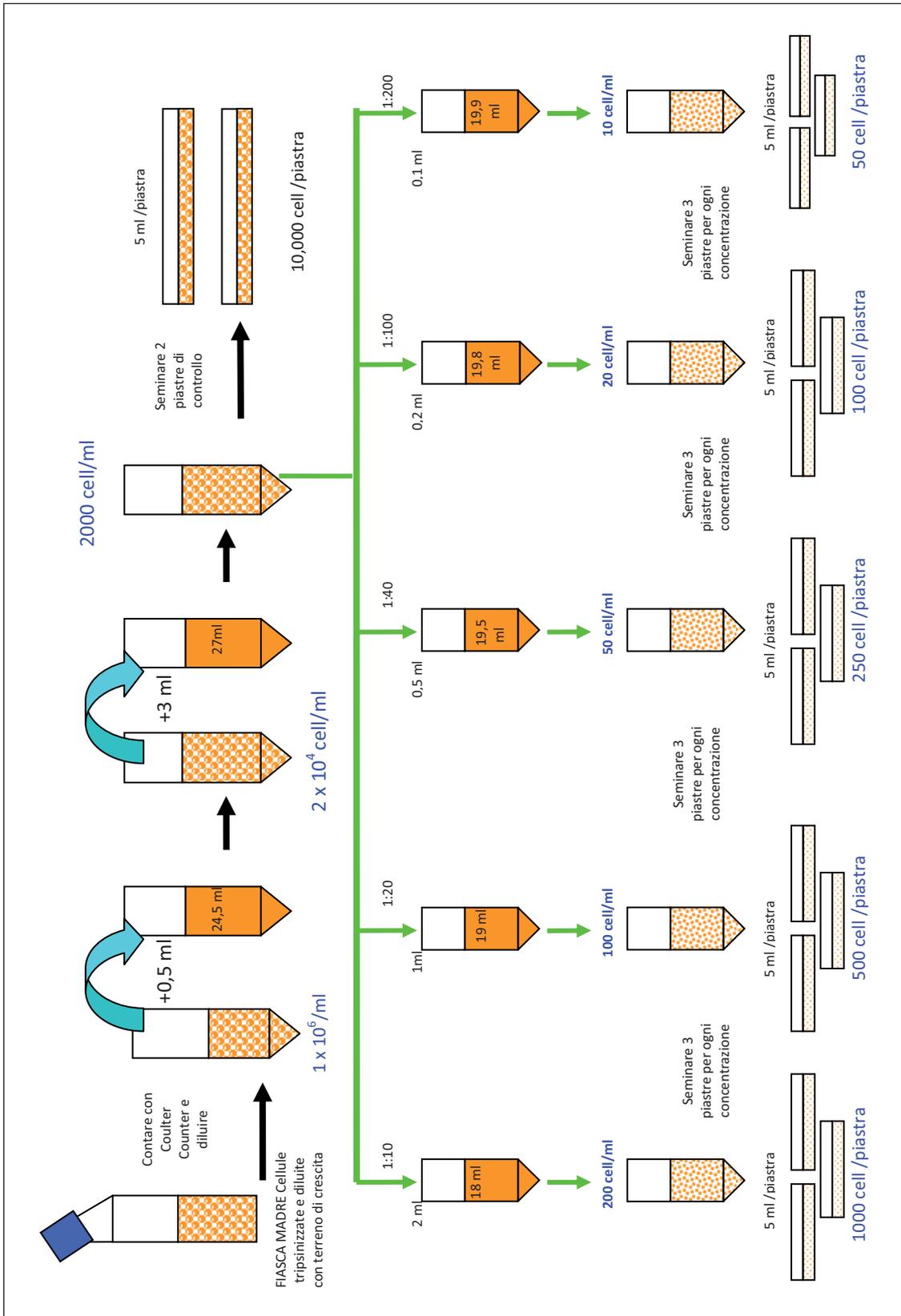
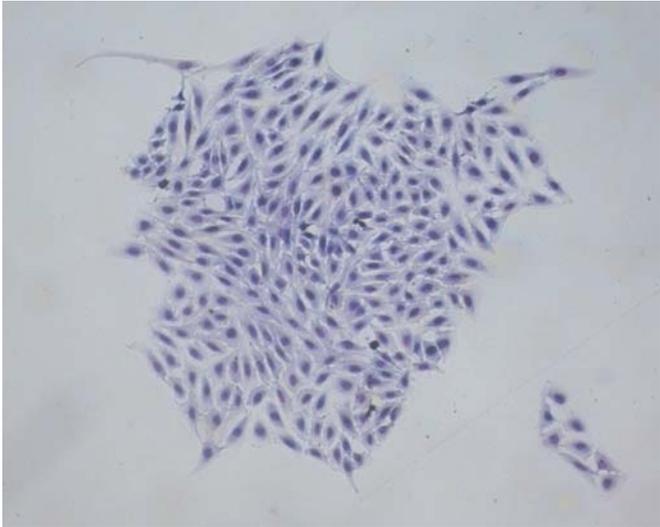
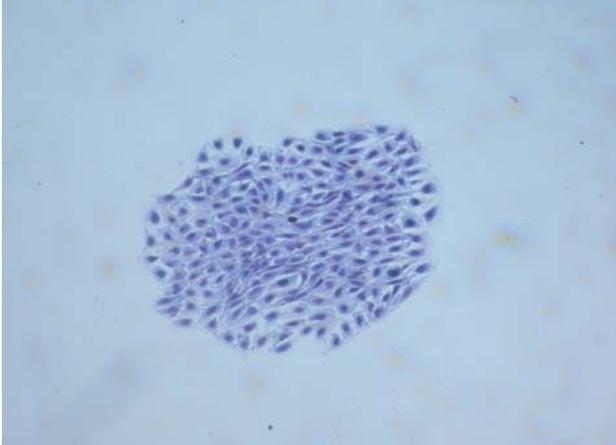
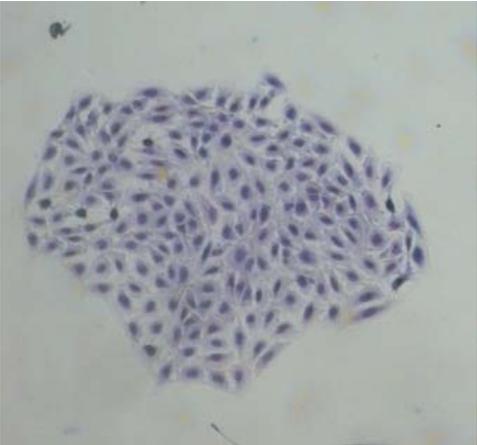


Fig. 4 - Ingrandimento 100X





Allegato 13



6. BIBLIOGRAFIA

Acherman GE, and Fent K. (1998) The adaptation of the permanent fish cell lines PLHC-1 and RTG-2 to FCS-free media results in similar growth rates compared to FCS-containing conditions. *Marine Environmental Research* 46: 363-367.

Andersen M, Krewski D. (2009) Toxicity testing in the 21st century: bringing the vision to life. *Toxicological Sciences* 107: 324-330.

Babich H. and Borenfreund E. (1990) Application of the Neutral Red cytotoxicity assay to in vitro toxicology. *ATLA* 18: 129-144.

Babich H. and E. Borenfreund (1991) Cytotoxicity and genotoxicity assays with cultured fish cells: a review. *Toxicology in vitro* 5: 91-100.

Balls M, Goldberg AM, Fentem JH, Broadhead CL, Burch RL, Festing MFW, Frazier JM, Hendriksen CFM et al. (1995) The Three Rs: the way forward. *ATLA* 23: 838-866.

Bols NC, Boliska SA, Dixon DG, Hodson PV, Kaiser KLE. (1985) The use of fish cell cultures as an indication of contaminant toxicity to fish. *Aquatic Toxicology*, 6, 147-155.

Bols N.C. and Lee L. E. J. (1994) Cell lines: availability, propagation and isolation. *Bochemistry and Molecular Biology of Fishes* vol 3. Analytical techniques. P. W. Hochachka and T.P. Mommsen (Editors) Elsevier B.V. pp 145-159.

Bols N.C. et al. (2005) Use of fish cell lines in the toxicology and ecotoxicology of fish. *Piscine cell lines in environmental toxicology. Bochemistry and Molecular Biology of Fishes* vol 6. T.P. Mommsen and T. W. Moon (Editors) Elsevier B.V.

Bopp S, Bols NC, Schirmer K. (2006) Development of a solvent-free solid-phase *in vitro* bioassay using vertebrate cells. *Environmental Toxicology & Chemistry* 25: 1390-1398

Brüschwiler B.J., Würgler F.E., Fent K. 1995. Cytotoxicity in vitro of organotin compounds to fish hepatoma cells PLHC-1 (*Poeciliopsis lucida*). *Aquatic Toxicology*, 32, 143-160.

Castaño A., Cantarino M. J., Castillo P., Tarazona J. V. (1994) Biological alternatives to chemical identification for the ecological assessment of industrial effluents: the RTG-2 cytotoxicity test. *Environmental Toxicology & Chemistry* 13: 1607-1611.

Castaño A, Cantarino MJ, Castillo P, Tarazona JV. +(1996) Correlations between the RTG-2 cytotoxicity test and in vivo LC50 rainbow trout biomass. *Chemosphere*, 32, 2141-2157.

Castaño A. et al. (2003) The use of fish cells in ecotoxicology. *ATLA* 31: 317-351.

CCAC (Canadian Council on Animal Care) (2009): 2008 CCAC survey of animal use.

http://www.ccac.ca/en/CCAC_Programs/Assessment/AUDFen.html

Clemedson C., Barile F.A., Ekwall B., Gomez-Lechon M.J., Hall T., Imai K., Kahru A., Logemann P., Monaco F., Ohno T., Segner H., Sjostrom M., Valentino M., Walum E., Wang X. and Ekwall B. 1998a. MEIC evaluation of acute systemic toxicity. Part III. In vitro results from 16

additional methods used to test the first 30 reference chemicals and a comparative cytotoxicity analysis. *ATLA*, 26, Suppl. 1, 93-129.

Clemenson C., Andersson M., Aoki Y., Barile F. A., Bassi A. M., Calleja M.C., Castaño A., Clothier R.H., Dierickx P., Ekqall B., Ferro M., Fiskesjo G., Garza-Ocanas L., Gomez-Lechon M.J., gulden M., Hall T. et al. 1998b. MEIC evaluation of acute systemic toxicity. Part IV. In vitro results from 67 toxicity assays used to test reference chemicals 31-50 and a comparative cytotoxicity analysis. *ATLA*, 26, Suppl. 1, 131-183.

Coecke S. et al. (2005) Guidance on Good Cell Culture Practice. A report of the second ECVAM Task Force on Good Cell Culture Practice. *ATLA* 33: 261-287.

Collins FS, Gray GM, Bucher JR. (2008) Transforming Environmental Health Protection. *Science* 319, n° 5865: 906-907.

Collodi P, Miranda CL, Zhao X, Buhler DR, Barnes DW. (1994) Induction of zebrafish (*Brachydanio rerio*) P450 *in vivo* and in cell culture. *Xenobiotica* 24: 487-493.

COM (2007) 675 definitivo: Quinta relazione sulle statistiche riguardanti il numero di animali utilizzati ai fini sperimentali o ad altri fini scientifici negli Stati Membri dell'Unione Europea. <http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=COM:2007:0675:FIN:IT:PDF>

Conti D, Balzamo S, Simeone MG, Belli M. (2009) REACH applicazione di metodi alternativi. *Acqua & Aria* n° 3: 28-32.

Davoren M, Ní Shùilleabháin S, Hartl MGJ, Sheehan D, O'Brien NM, O'Halloran J, Van Pelt ENAM, Mothersill C. (2005) Assessing the potential of fish cell lines as tools for the cytotoxicity testing of estuarine sediment aqueous elutriates. *Toxicology in vitro* 19: 421-431.

Davoren M., Fogarty A. M. (2006) In vitro cytotoxicity assessment of the biocidal agents sodium o-phenylphenol, sodium o-benzyl-p-chlorophenol, and sodium p-tertiary amylphenol using established fish cell lines. *Toxicology in vitro* 20: 1190-1201.

Dayeh V. R. et al. (2002) Applying whole-water samples directly to fish cell cultures in order to evaluate the toxicity of industrial effluent. *Water Research* 36: 3727-3738.

Dayeh V. R. et al. (2004) Evaluating the toxicity of Triton X-100 to protozoan, fish and mammalian cells using fluorescent dyes as indicators of cell viability. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 57: 375-382.

Dayeh VR, Lynn DH, Bols NC. (2005) Cytotoxicity of metals common in mining effluent to rainbow trout cell lines and to the ciliated protozoan, *Tetrahymena thermophila*. *Toxicology in vitro* 19: 399-410

Dierickx PJ, van de Vyver IE. (1991) Correlation of the neutral red uptake inhibition assay of cultured fathead minnow fish cells with fish lethality tests. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 46: 649-665.

Dierickx PJ. (1993) Comparison between fish lethality data and the *in vitro* cytotoxicity of lipophilic solvents to cultured fish cells in a two-compartment model. *Chemosphere* 27: 1511-1518.

De Angelis (1990) Le colture cellulari: caratteristiche e potenzialità. ISS *Rapporti Istisan* 90/11 pag. 35-47.

ECHA. 2008. Guidance on information requirements and chemical safety assessment. Chapter R.4: Evaluation of available information.

Ekwall B. (1995) The basal cytotoxicity concept. In *Alternative Methods in Toxicology and the Life Sciences, vol II, The World Congress on Alternatives and Animal Use in the Life Sciences: Education, Research, Testing* (ed. AM Goldberg & LFM van Zutphen), pp. 721-725. New York, NY, USA: Mary Ann Liebert.

Escher BI, Hermens JLM. (2002) Modes of action in ecotoxicology: their role in body burdens, species sensitivity, QSARs, and mixture effects. *Environmental Science and Technology* 36: 4201-4217.

Fent K. (2001) Fish cell lines as versatile tools in ecotoxicology: assessment of cytotoxicity, cytochrome P4501A induction potential and estrogenic activity of chemicals and environmental samples. *Toxicology in vitro* 15:477-488.

Freshney R. I., Culture of animal cells. A manual of basic technique. Fifth Edition, 2005. J. Wiley & Sons, Inc., Publication.

Gülden M., Seibert H. (1997) Influence of protein binding and lipophilicity on the distribution of chemical compounds in *in vitro* systems. *Toxicology in vitro* 11: 479-783.

Gülden M. et al. (2002) Impact of protein binding on the availability and cytotoxic potency of organochlorine pesticides and chlorophenols *in vitro*. *Toxicology* 175:201-213.

Gülden M. and Seibert H. (2005) Impact of bioavailability on the correlation between *in vitro* cytotoxic and *in vivo* acute fish toxic concentration of chemicals. *Aquatic Toxicology* 72: 327-337.

Gülden M., Seibert H. (2007) The improvement of *in vitro* cytotoxicity testing for the assessment of acute toxicity in fish. *ATLA* 35:39-46.

Heringa MB, Scheurs RHMM, Busser F, van der Saag PT, van der Burg B, Hermens JLM. (2004) Toward more useful *in vitro* toxicity data with measured free concentrations. *Environmental Science and Technology* 38: 6263-6270.

HRA (Human Research Australia): <http://www.aahr.org.au/statistics.html>

Hartung T. et al. (2002) Good Cell Culture Practice. ECVAM Good Cell Culture Practice Task Force Report 1. *ATLA* 30: 407-414.

Hestermann EV, Stegemann JJ, Hahn ME. (2000) Serum alters the uptake and relative potencies of halogenated aromatic hydrocarbons in cell culture bioassays. *Toxicology Science* 53: 316-325.

Jos A. et al. (2005) Ecotoxicological evaluation of the additive butylated hydroxyanisole using a battery with six model systems and eighteen endpoints. *Aquatic toxicology* 71: 183-192.

Jos A. et al. (2009) Aquatic toxicity assessment of the additive 6-methylcoumarine using four experimental systems. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 56: 52-59.

-
- Kramer NI, Hermens JLM, Schirmer K. (2009) The influence of modes of action and physicochemical properties of chemicals on the correlation between *in vitro* and acute fish toxicity data. *Toxicology in vitro* 23: 1372-1379.
- Lange M., Gebauer W., Markl J., Nagel R. 1995. Comparison of testing acute toxicity on embryo of zebra fish, *Brachydanio rerio* and RTG-2 cytotoxicity as possible alternatives to the acute fish test. *Chemosphere* 30: 2087-2102.
- Leist M., Blaauboer B, Brune K, Cosson P, Gruber FP, and Hartung T. (2009) Establishment of dedicated chairs for alternative methods as strategy to promote the 3R. Lettura plenaria al VII Congresso Mondiale ALTEX "Calling on Science", Roma 30 agosto-3 settembre 2009. Atti del Congresso p. 17.
- Mezzanotte R. (2008) Attuazione del regolamento REACH in Italia. 14° Convegno AIDII "Le giornate di Corvara" Atti del Congresso p. 661-668.
- Okamura H, Watanabe T, Aoyama I, Hasobe M. (2002) Toxicity evaluation of new antifouling compounds using suspension-cultured fish cells. *Chemosphere* 46: 945-951.
- Russell WMS, & Burch RL. (1959) The principles of human experimental technique. 238 pp. London UK: Methuen.
- Saito H, Iwami S, Shigeoka T. (1991) In vitro cytotoxicity of 45 pesticides to goldfish GF-Scale (GFS) cells. *Chemosphere*, 23, 525-537.
- Saito H, Koyasu J, Yoshida K. (1993) Cytotoxicity of 109 chemicals to goldfish GFS cells and relationships with 1-octanol/water partition coefficients. *Chemosphere* 26, 1015-1028.
- Saito H, Koyasu J, Shigeoka T & Tomita I. (1994) Cytotoxicity of chlorophenols to goldfish GFS cells with MTT and LDH assays. *Toxicology in vitro* 8: 1107-1112.
- Scheers EM, Van der Wielen C, Dierickx PJ. (2002) Toxicological evaluation of waste-water samples to appropriately sensitized cultured fathead minnow cells compared with the Microtox assay. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 68: 253-260.
- Schirmer K, Chan AGJ, Greenberg BM, Dixon DG, Bols NC. (1997) Methodology for demonstrating and measuring the phototoxicity of fluoranthene to fish cells in culture. *Toxicology in vitro* 11: 107-119.
- Schirmer K, Dixon DG, Greenberg BM, Bols NC (1998) Ability of 16 priority PAHs to be directly cytotoxic to a cell line from the rainbow trout gill. *Toxicology* 127: 129-141.
- Schirmer K, Chan AGJ, Bols NC. (2000) Transitory metabolic disruption and cytotoxicity elicited by benzo[a]pyrene in two cell lines from rainbow trout liver. *Journal of Biochemical Molecular Toxicology* 14: 262-276.
- Schirmer K, Dayeh VR, Bopp SK, Russold S, Bols NC. (2004) Applying whole water samples to cell bioassays for detection dioxin-like compounds at contaminated sites. *Toxicology* 200: 211-221.
- Schirmer K. (2006) Proposal to improve vertebrate cell culture to establish them as substitutes for the regulatory testing of chemicals and effluents using fish. *Toxicology* 224: 163-183.

Segner H. (2004) Cytotoxicity assays with fish cells as an alternative to the acute lethality test with fish. *ATLA* 32: 375-382.

Seidel T, Stephens ML. (2009) Bringing toxicology into the 21st century: A global call to action. *Toxicology in vitro* 23: 1576-1579.

Shúilleabháin S. Ní et al. (2004) In vitro cytotoxicity testing of three zinc metal salts using established fish cell lines. *Toxicology in vitro* 18: 365-376.

Spielmann H, Muller L, Averbeck D, Balls M, Brendler-Schwaa S, Castell JV, Curren R, de silva O, Gibbs NK, Liebsch M, Lovell WW, Merk HF, Nash JF, et al. (2000) European Centre for Validation of Alternative Methods, 2000. The Second ECVAM Workshop on Phototoxicity Testing. The Report and Recommendations of ECVAM Workshop 42. *ATLA* 28: 777-814.

Statistics of Scientific Procedures on Living Animals Great Britain 2008. 21 Luglio 2009. HC 800. <http://scienceandresearch.homeoffice.gov.uk/animal-research/publications-and-reference/statistics/index.html>

Tan F. et al. (2008) Comparative evaluation of the cytotoxicity sensitivity of six fish cell lines to four heavy metals in vitro. *Toxicology in vitro* 22: 164-170.

Teneva I, Asparuhova D, Dzhambazov B, Mladenov R, Schirmer K. (2003) The freshwater cyanobacterium *Lyngbya aeruginosa-coerulea* produces compounds toxic to mice and to mammalian and fish cells. *Environmental Toxicology* 18: 9-20.

USDA (US Department of Agriculture): Annual Care Annual Report of Activities. Fiscal Year 2007. APHIS41-35-075. http://www.hsus.org/animals_in_research/general_information_on_animal_research/animal_use_statistics.html

Wang TH, Holland JW, Bols N, Secombes CJ. (2005) Cloning and expression of the first non-mammalian interleukin-11 gene in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. *Federation of European Biochemical Societies Journal* 272: 1136-1147.

Weighardt F. (2009) Alternative testing methods in Europe. Reducing animal testing needs in the era of REACH. *Household and Personal Care today* 2: 6-9. www.skinethic.com

Wichman G, Mühlenberg J, Fischäder G, Kulla G, Rehwagen M, Herbarth O, Lehmann I. (2005) An experimental model for the determination of immunomodulating effects by volatile compounds. *Toxicology in vitro* 19:685-693.

Wolf K, and Quimby MC. (1962) Established eurythermic line of fish cells in vitro. *Science* 135: 1065-1066.

Zou J, Bird S, Truckle J, Bols N, Horne M, Secombes CJ. (2004) Identification and expression analysis of an IL-18 homologue and its alternatively spliced form in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. *European Journal of Biochemistry* 271: 1913-1923.

Zurita JL. et al. (2007) Ecotoxicological assessment of bromobenzene using a test battery with five model systems. *Food Chem. Toxicol.*: 45: 575-584.

Voci bibliografiche aggiuntive non presenti nel testo

- Araújo C.S.A. et al. (2000) In vitro response of the brown bullhead catfish (BB) and rainbow trout (RTG-2) cell lines to benzo(a)pyrene. *Science of the Total Environment* 247:95.
- Babich H. et al. (1986) In vitro cytotoxicity testing of aquatic pollutants (cadmium, copper, zinc, nickel) using established fish cell lines. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 11: 91-99.
- Borenfreund E. and Puerner J. A. (1984) A simple quantitative procedure using monolayer cultures for cytotoxicity assays (HTD/NR-90). *Journal of Tissue Culture Methods* 9: 7-9
- Brandao JC, Bohets HHL, Van de Vyver IE, Dierickx PJ. (1992) Correlation between the *in vitro* cytotoxicity to cultured fathead minnow fish cells and fish lethality data for 50 chemicals. *Chemosphere* 25: 553-562
- Caminada D. et al. (2006) Cytotoxicity of pharmaceuticals found in aquatic systems: comparison of PLHC-1 and RTG-2 fish cell lines. *Aquatic toxicology* 79: 114-123
- Castaño A., Gomez-Lechon M. J.(2005) Comparison of basal cytotoxicity data between mammalian and fish cell lines: a literature survey. *Toxicology in vitro* 19: 695-705.
- Fernandez M. et al. (2006) Comparative cytotoxicity of Alachlor on RTG-2 trout and SH-SY5Y human cells. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 51: 515-520.
- Ferrero M. et al. (1998) Characterization of RTG-2 fish cell line by Random Amplified Polymorphic DNA. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 40: 56-64.
- Gülden M., Seibert H. (2003) In vitro-in vivo extrapolation: estimation of human serum concentrations of chemicals equivalent to cytotoxic concentrations in vitro. *Toxicology* 189: 211-222.
- Gülden M. et al. (2003) Serum albumin binding at cytotoxic concentrations of chemicals as determined with cell proliferation assay. *Toxicology Letters* 173: 159-168.
- Gülden M. et al. (2005) Comparison of mammalian and fish cell line cytotoxicity: impact of endpoint and exposure duration. *Aquatic Toxicology* 71: 229-236.
- Knauer K. et al. (2007) Comparison of in vitro and in vivo acute fish toxicity in relation to toxicant mode of action. *Chemosphere* 68: 1435-1441.
- Mazziotti I. (1990) Tecniche di preparazione e mantenimento delle cellule in coltura. *ISS Rapporti Istisan* 90/11 pag. 49-69.
- Nynke I. et al. (2009) The influence of modes of action and physicochemical properties of chemicals on the correlation between in vitro and acute fish toxicity data. *Toxicology in vitro* 23 (7): 1372-1379.
- O' Brien J. et al. (2000) Investigation of the Alamar Blue (resazurin) fluorescent dye for the assessment of mammalian cell cytotoxicity. *Eur. J. Biochem.* 267: 5421-5426.
- Pablos M. V. et al. (2009) Use of a novel battery of bioassays for the biological characterisa-

tion of hazardous wastes. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 72: 1594-1600

Picardo S. et al. (2007) Acute and subacute toxic effects produced by microcystin-YR on the fish cell lines RTG-2 and PLHC-1. *Toxicology in vitro* 21: 1460-1467.

Repetto G. and Sanz P. (1993) Neutral Red Uptake, cellular growth and lysosomal function: in vitro effects of 24 metals. *ATLA* 21: 501-507.

Sanchez-Fortun S. et al. (2008) Cytotoxic and genotoxic effects in RTG-2 cell line exposed to selected biocides used in the disinfection of cooling towers. *Ecotoxicology* 17: 273-279.

Sandbacka M. et al. (2000) The acute toxicity of surfactants on fish cells, *Daphnia magna* and fish. A comparative study. *Toxicology in vitro* 14: 61-68.

Schirmer K. et al. (2008) Developing a list of reference chemicals for testing alternatives to whole fish toxicity tests. *Aquatic Toxicology* 90: 128-137.

Segner H, Lenz D. (1993) Cytotoxicity assays with the rainbow trout R1 cell line. *Toxicology in Vitro*, 7:537-540.

Shaw AJ. (1994) Defining cell viability and cytotoxicity. *ATLA Alternatives Lab. Anim.* 22:124-126

Vevers W., Jha A. N. (2008) Genotoxic and cytotoxic potential of titanium dioxide (TiO₂) nanoparticles on fish cells in vitro. *Ecotoxicology* 17: 410-420.

GLOSSARIO

Aneuploide – Da aneuploidia. Mutazione cromosomica di tipo numerico. Condizione per cui vi è una variazione del numero di singoli cromosomi che determina un ineguale numero a carico di una coppia cromosomica. Ad esempio, l'assenza di un cromosoma dal complemento diploide determina una monosomia, la presenza di una copia ulteriore determina trisomia, mentre la presenza di due ulteriori copie dello stesso cromosoma determina tetrasomia.

Articolo - secondo il regolamento REACH è qualunque oggetto a cui sono dati, durante la produzione, una forma, una superficie o un disegno particolari che ne determinano la funzione in misura maggiore della sua composizione chimica. Gli articoli sono soggetti al Regolamento REACH in ragione delle sostanze in essi contenute. Le sostanze contenute negli articoli devono essere registrate dai rispettivi Produttori/Importatori.

Bioinformatica – disciplina scientifica dedicata alla risoluzione di problemi molecolari, con metodi informatici. Si occupa principalmente di: a) fornire modelli statistici validi per l'interpretazione dei dati provenienti da esperimenti di biologia molecolare e biochimica al fine di identificare tendenze e leggi numeriche; b) generare nuovi modelli e strumenti matematici per l'analisi di sequenze di DNA, RNA e proteine; c) organizzare le conoscenze acquisite a livello globale su genoma e proteoma in basi di dati al fine di rendere tali dati accessibili a tutti.

Biomarker (Biomarcatore) – rappresenta la misura di una variazione, indotta da un composto tossico o da altro fattore di stress, in componenti o processi biochimici, cellulari, strutturali o funzionali, valutabile in un sistema biologico e rilevante per il problema studiato. Un biomarcatore deve essere sensibile, misurabile con precisione e utilizzabile su specie differenti. Vi sono biomarcatori di esposizione, di effetto e di suscettibilità.

Citocromo P450 – E' il maggior complesso enzimatico dei vertebrati ed è costituito da monoossigenasi che catalizzano l'ossidazione di molte sostanze organiche. Le monoossigenasi citocromo P450 dipendenti, catalizzano l'introduzione di un atomo di O₂ nella molecola substrato, mentre l'altro atomo di O₂ viene ridotto ad H₂O dal cofattore enzimatico NADPH.

CSC (Centro Sostanze Chimiche) - costituito presso l'Istituto Superiore di Sanità per far fronte agli impegni internazionali legati all'applicazione del nuovo regolamento REACH. Per la descrizione delle sue attività consultare il sito <http://www.iss.it/spps/>

CYP1A – Monoossigenasi citocromo P450 dipendente.

Endpoint (= outcome) – evento misurato; risposta misurata; variabile misurata.

Helpdesk - Ai sensi dell'art. 124 del Regolamento REACH, l'Helpdesk è il servizio nazionale designato a fornire informazioni e assistenza tecnica a tutti i soggetti coinvolti dall'applicazione del Regolamento in merito agli obblighi da adempiere, alle responsabilità in cui

si incorre e alle procedure da seguire in caso di utilizzo, fabbricazione o importazione di sostanze chimiche.

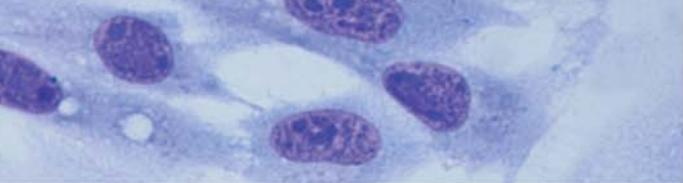
L'Helpdesk è attivato e gestito dal Ministero dello Sviluppo Economico.

Preparato - secondo il regolamento REACH è qualsiasi miscela o soluzione derivante dalla mescolazione di due o più sostanze. I preparati sono soggetti al Regolamento REACH in ragione delle sostanze in essi contenute. Le sostanze contenute nei preparati devono essere registrate dai rispettivi Produttori/Importatori.

SIEF - Forum per lo Scambio delle Informazioni sulle Sostanze. Strumento previsto dal Regolamento REACH per la condivisione dei dati ai fini della registrazione comune della stessa sostanza e per la ripartizione dei costi ed al fine di evitare la duplicazione di test, in particolare quelli sugli animali vertebrati.

Sostanza - secondo il regolamento REACH è un elemento chimico e i suoi composti, allo stato naturale o ottenuti per mezzo di un procedimento di fabbricazione, compresi gli additivi necessari a mantenerne la stabilità e le impurità derivanti dal procedimento utilizzato, ma esclusi i solventi che possono essere separati senza compromettere la stabilità della sostanza o modificarne la composizione. Per ogni sostanza fabbricata o importata in quantitativi pari o superiori a 1 tonnellata all'anno, i fabbricanti e gli importatori hanno l'obbligo di presentare all'Agenzia una registrazione. Ciò vale anche per le sostanze fabbricate o importate in quanto componenti di un preparato.

Utilizzatore a Valle - secondo il regolamento REACH, è ogni persona fisica o giuridica, che ha sede nella Comunità Europea, diversa dal Produttore o dall'Importatore che utilizza una sostanza, in quanto tale o in quanto componente di un preparato, nell'esercizio delle sue attività industriali o professionali.



ISBN 978-88-448-0440-4



9 788844 804404