

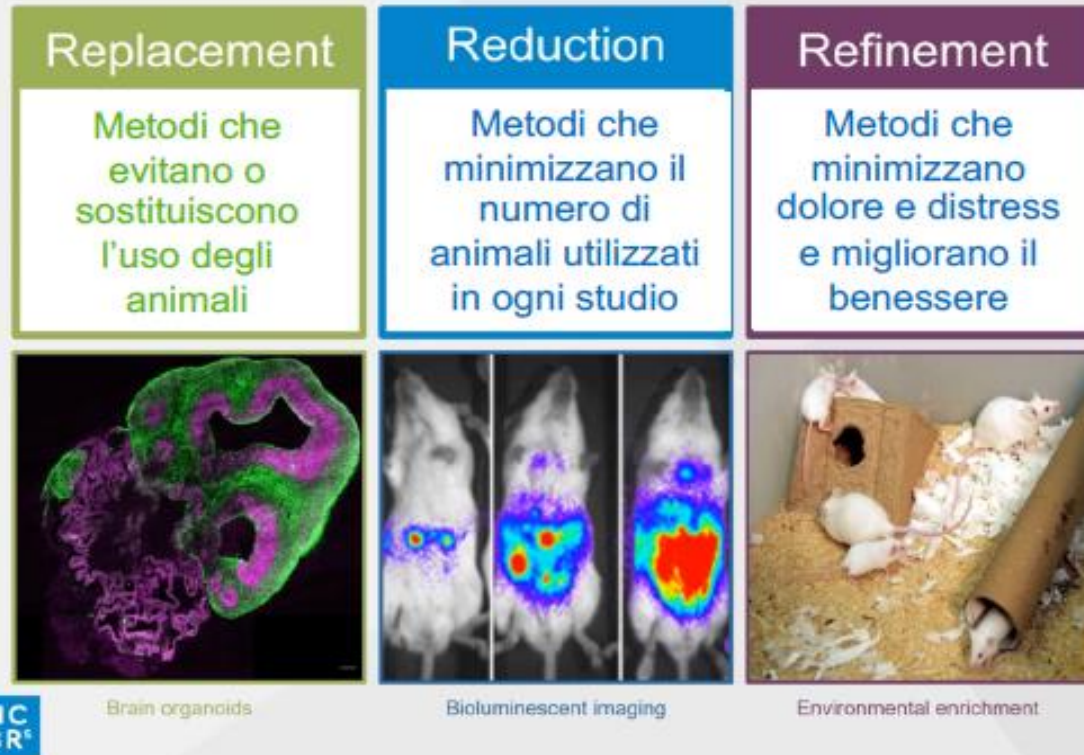
Farmacologia cellulare e molecolare

Prof. Patrizia Romualdi, PhD

Regola delle 3R e sperimentazione preclinica in modelli animali

Dott.ssa Laura Rullo

La Regola delle 3R



Il ricercatore deve essere cosciente che la regola delle 3R contribuisce al benessere dell'animale ma, in misura consistente, anche alla riuscita dell'esperimento scientifico



The Principles of Humane Experimental Technique

W.M.S. Russell and R.L. Burch , 1959

Replacement

“any scientific method employing non-sentient material which may, in the history of experimentation, replace methods which use conscious living vertebrates”

Totale



Evita completamente l'uso degli animali (metodi non-animal), include l'uso di volontari umani, cellule e tessuti, modelli matematici e informatici e linee cellulari immortalizzate

Parziale



include l'uso di animali che, basandosi sulle attuali conoscenze scientifiche, non sono capaci di provare sofferenza. Invertebrati quali Drosophila, vermi nematodi, amoebae, e forme immature di vertebrati. Spesso utilizzati come metodi alternativi per prove di pre-screening (Reduction)

METODI ALTERNATIVI

Vantaggi

- non solo per rispondere al “ *replacement*” ma anche perché:
- Esistono aspetti etici e rispetto dei diritti degli animali
- Basso costo rispetto all’uso di animali da laboratorio
- Meno complessi e più facilmente standardizzabili

Svantaggi

- La risposta in un sistema semplificato differisce dalla risposta di un sistema complesso
- Lunghi tempi ed estese ricerche per ottenere l’approvazione nella ricerca applicata da parte degli enti regolatori
- Necessità di unificare le linee guida e le direttive dei vari Paesi

EURL ECVAM

European Union Reference Laboratory for alternatives to animal testing

Costituito oltre 25 anni fa nella sede di Ispra (Lombardia), supporta le 3Rs con i Seguenti compiti:

- condurre ricerche e collaborare ad iniziative di ricerca nell'UE;
- coordinare ed intraprendere studi di validazione di metodi alternativi;
- disseminare informazioni e condividere conoscenze tra le diverse discipline;
- promuovere i metodi alternativi e le 3Rs nel contesto internazionale.

Eye irritation tests

In vitro

- Eye irritation:
 - HET-CAM (hen's egg chorio-allantoic membrane) test



- BCOP (bovine corneal opacity) test
- ICE (isolated chicken eye) test

In vivo

- Draize test in rabbit's eye



**Modelli alternativi nella sperimentazione
preclinica
(colture cellulari, cellule staminali , c. *elegans*,
zebrafish)**

2D vs 3D Cell Culture

Le tecniche di coltura cellulare sono impiegate da anni per:

- biologia dello sviluppo,
- scoperta di farmaci,
- medicina rigenerativa

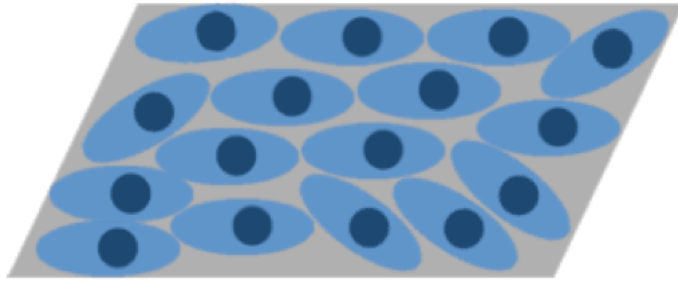
Dall'introduzione delle tecniche di coltura cellulare, le cellule sono state coltivate in due dimensioni.

Le cellule nell'ambiente fisiologico hanno un'interazione costante con la matrice extracellulare, regolando funzioni biologiche complesse come la migrazione cellulare, l'apoptosi, la regolazione trascrizionale e l'espressione del recettore.

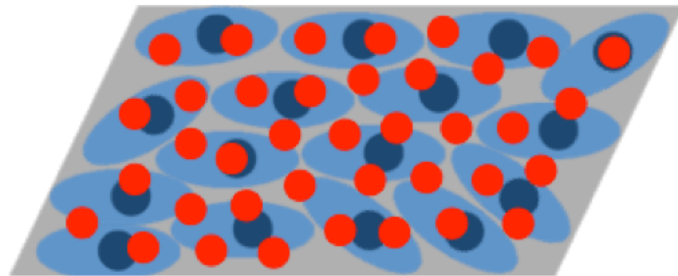
I dati sperimentali in-vitro non possono essere tradotti in studi clinici completamente quando le cellule vengono coltivate in condizioni 2D poiché non è possibile riprodurre complessi segnali cellulari tra le cellule e la sua matrice.

Le colture cellulari tridimensionali rappresentano un modello migliore che simula meglio le condizioni fisiologiche in vivo.

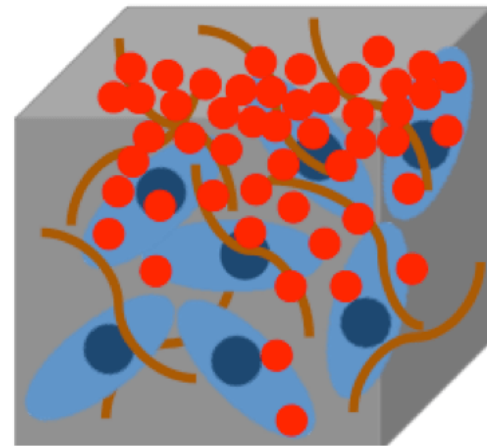
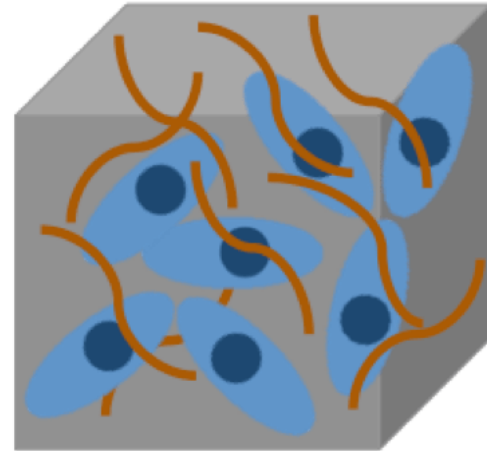
2D cell culture model



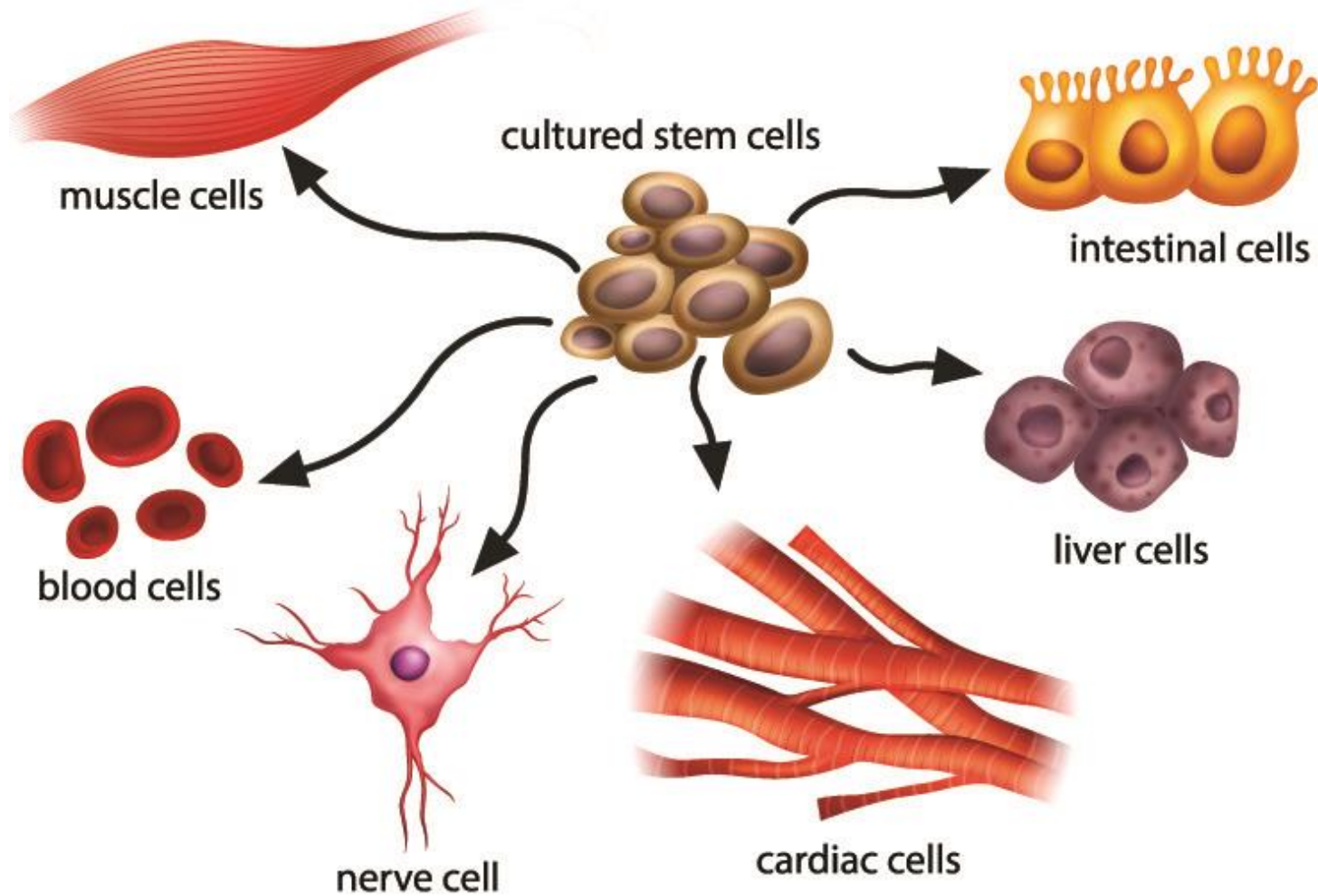
Add therapeutic agents
for analysis



3D cell culture model



Human Stem Cell Applications

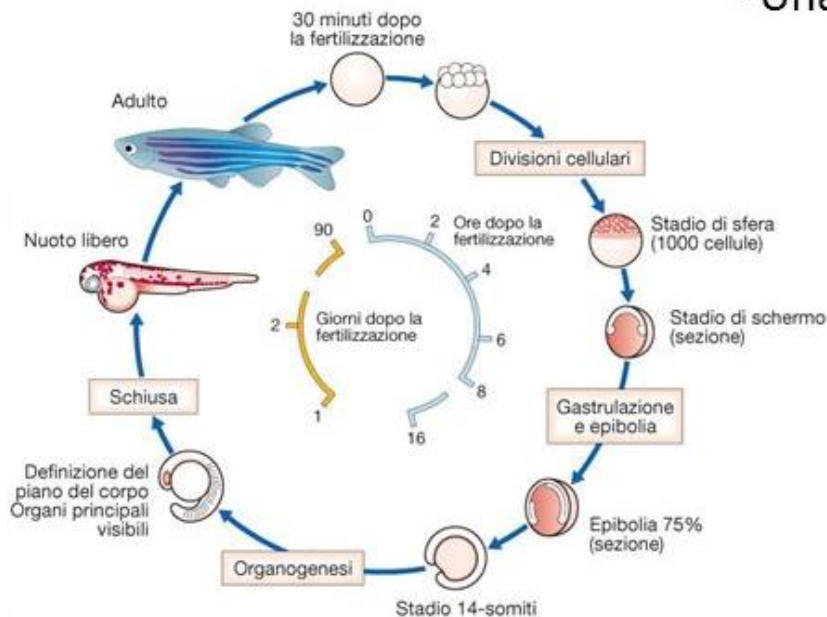


Zebrafish



Adulto = lunghezza 3 cm

- Acque tropicali India e Sud-Est Asia
- Fecondazione esterna, uovo ed embrione trasparenti
- Sviluppo molto rapido: dopo 24 h dalla fertilizzazione tutti gli organi sono formati
- Dopo 3 gg dalla fertilizzazione esce dall'uovo
- Dopo 3-4 mesi raggiunge maturità sessuale
- Una femmina produce fino a 200 uova/settimana

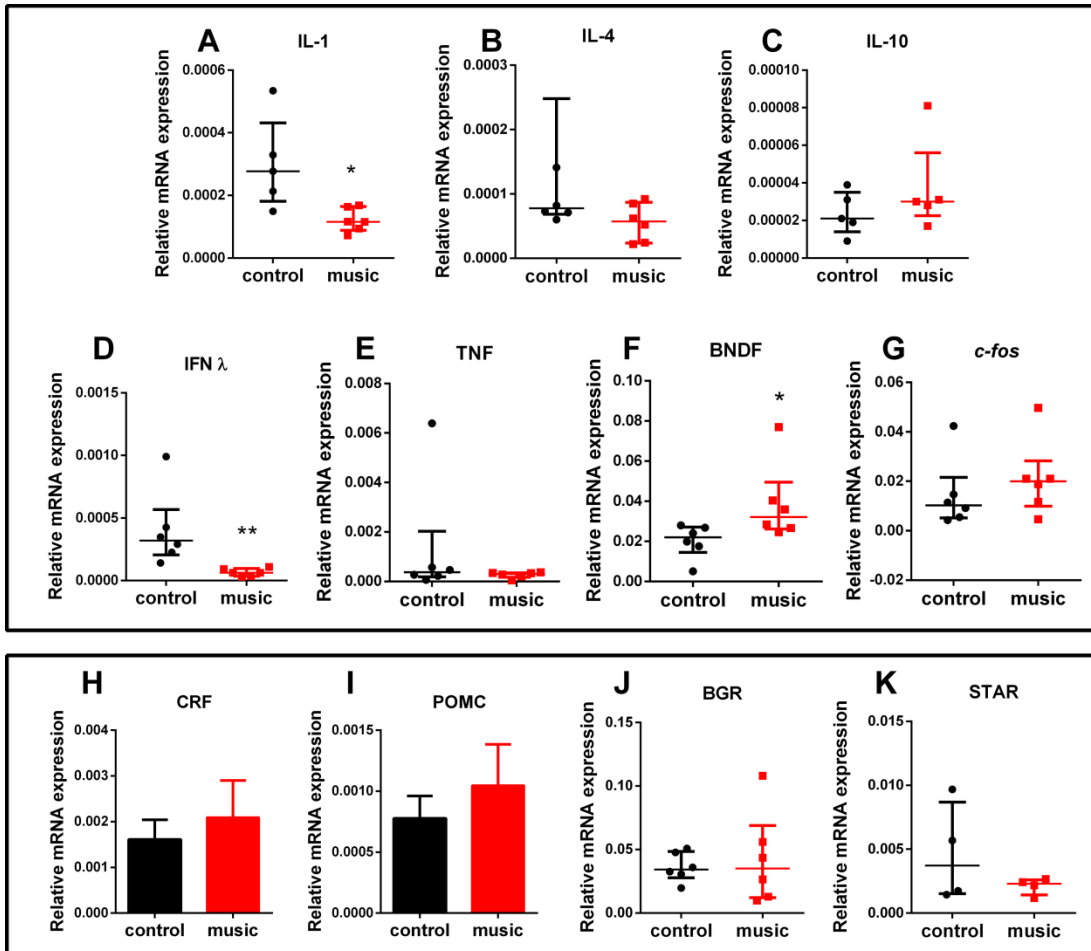


Uova fecondate a diversi stadi dello sviluppo



The effects of auditory enrichment on zebrafish behavior and physiology

Heloisa H. A. Barcellos^{1,2,*}, Gessi Koakoski^{3,*}, Fabiele Chaulet^{4,*},
Karina S. Kirsten^{3,*}, Luiz C. Kreutz^{2,3,*}, Allan V. Kalueff^{5,6,7,8,9,10,11,12,13,*}
and Leonardo J. G. Barcellos^{1,2,3,4,6}

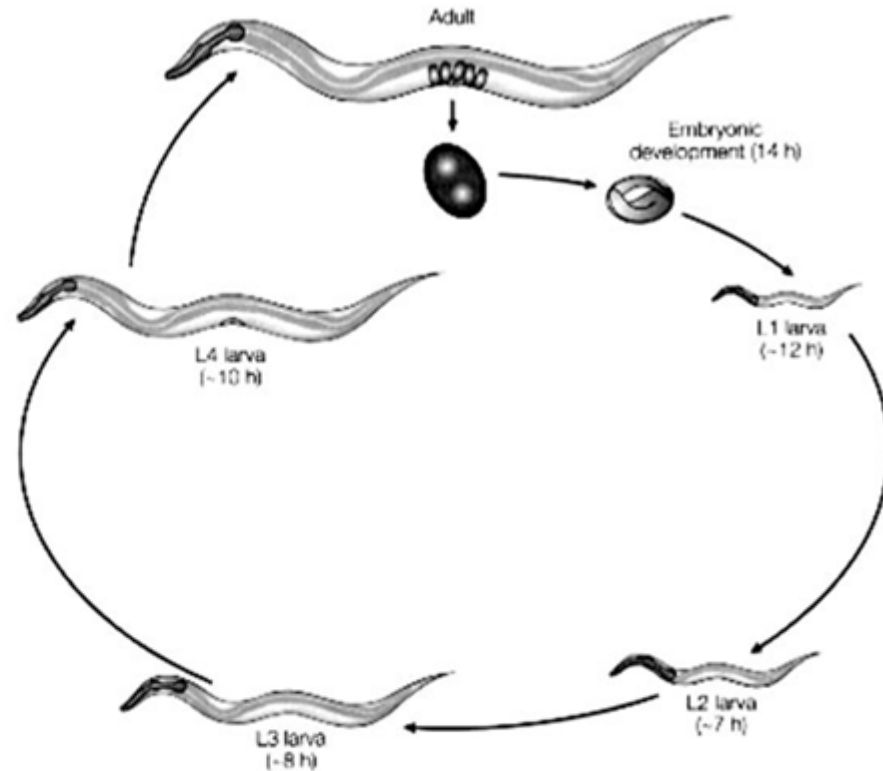


<https://www.jove.com/v/20178/novel-tank-diving-assay-method-to-study-innate-stress-responses>

Nematode *Caenorhabditis Elegans* (C. Elegans)



Sydney Brenner, born 1927,
La Jolla, CA, USA.

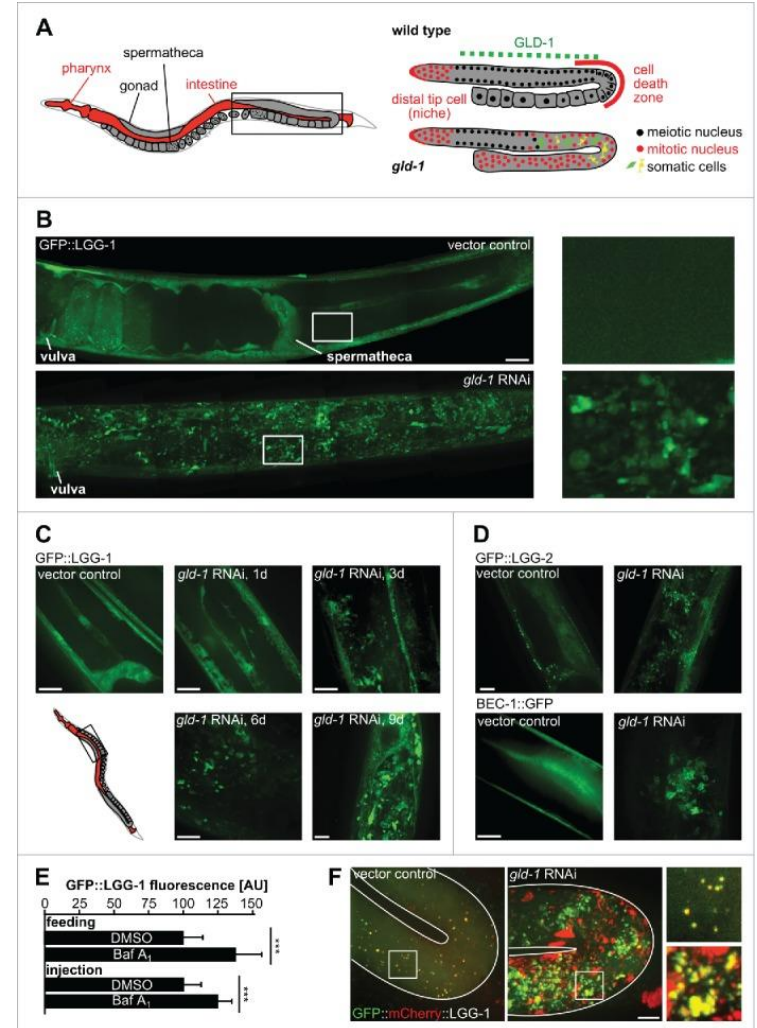


Introduzione di *Caenorhabditis elegans* come sistema modello, anni '60

- Trasparente, ciclo vitale breve
- Generazione di modelli genetici
- Primo genoma completamente sequenziato tra gli organismi pluricellulari

Autophagy and modular restructuring of metabolism control germline tumor differentiation and proliferation in *C. elegans*

Ligia C. Gomes^{a,b,#}, Devang Odedra^{a,b}, Ivan Dikic^{a,b,c}, and Christian Pohl^{a,b}



HHS Public Access

Author manuscript

Neurochem Int. Author manuscript; available in PMC 2017 September 01.

Published in final edited form as:

Neurochem Int. 2016 September ; 98: 122–128. doi:10.1016/j.neuint.2016.01.008.

Acute Blockade of the *C. elegans* Dopamine Transporter DAT-1 by the Mammalian Norepinephrine Transporter Inhibitor Nisoxetine Reveals the Influence of Genetic Modifications of Dopamine Signaling *In Vivo*

Daniel P. Bermingham¹, J. Andrew Hardaway¹, Chelsea L. Snarrenberg¹, Sarah B. Robinson¹, Oakleigh M. Folkes¹, Greg J. Salimando¹, Hussain Jinnah¹, and Randy D. Blakely^{1,2}

Quando non si può fare *replacement*,
allora *reduction* e *refinement* sono fondamentali

Animals Research Guidelines

ARRIVE
**(Animal Research:
Reporting of In
Vivo Experiments)**

PREPARE
**(Planning Research
and Experimental Procedures
on Animals:
Recommendations for
Excellence)**

ARRIVE

The ARRIVE guidelines , originally published in PLOS Biology, were developed in consultation with the scientific community as part of an NC3Rs initiative to improve the standard of reporting of research using animals.

<https://www.nc3rs.org.uk/arrive-guidelines>

PREPARE

Norecopa is a member of ecopa (European Consensus-Platform for Alternatives).

Norecopa has produced the PREPARE guidelines for planning animal research and testing and supports National Consensus Platforms for the 3Rs.

<https://norecopa.no/about-norecopa>

Reduction

“reduction in the number of animals used to obtain information of a given amount and precision”

- Definire un disegno sperimentale robusto
- Utilizzare analisi statistiche appropriate
- Utilizzare tecnologie che riducano i numeri
 - Controllare i fattori ambientali
- Standardizzare la popolazione animali

Refinement

"simply to reduce to an absolute minimum the amount of stress imposed on those animals that are still used"

“Any approach which avoids, alleviates or minimises the actual or potential pain, distress and other adverse effects suffered at any time during the life of the animals involved, or which enhances their well-being as far as possible.”

Buchanan-Smith et al., 2005

La Ricerca Oggi

**usare il metodo
scientifico**



**consapevoli dei
suoi limiti**

