



UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI PADOVA

FACOLTA' DI AGRARIA, MEDICINA E CHIRURGIA e MEDICINA VETERINARIA

Corso di Laurea magistrale interfacoltà in

BIOTECNOLOGIE PER L'ALIMENTAZIONE

TESI DI LAUREA

**EFFETTI DEL TEMPO DI COLTURA SULL'ESPRESSIONE DI ENZIMI
FARMACO-METABOLIZZANTI E RECETTORI NUCLEARI IN EPATOCITI DI
SUINO CRIOCONSERVATI**

Relatore: **Dott.ssa MERY GIANTIN**

*Dipartimento di Sanità Pubblica, Patologia Comparata e Igiene Veterinaria
Area di Farmacologia e Tossicologia*

Correlatore: **Prof. MAURO DACASTO**

*Dipartimento di Sanità Pubblica, Patologia Comparata e Igiene Veterinaria
Area di Farmacologia e Tossicologia*

Laureanda: **Chiara Baratto**

Matr. 623427

Anno Accademico 2010 / 2011

Alle mie care nonne Agnese e Bertilla
ricordandovi sempre con tanto affetto

RIASSUNTO

I metodi alternativi in vitro (MAV) vengono spesso utilizzati in sostituzione dei classici modelli animali e ricoprono un ruolo importante in campo tossicologico e farmacologico.

I MAV maggiormente impiegati negli studi del metabolismo biotrasformativo e della tossicità indotta sono le fettine di fegato, gli epatociti in coltura primaria, le linee cellulari stabilizzate, le frazioni subcellulari e le cellule ingegnerizzate.

Tra questi, gli epatociti in coltura primaria rappresentano un modello fisiologicamente rilevante del fegato per la valutazione del destino metabolico e degli effetti biologici degli xenobiotici (Li *et al.*, 1999); a conferma di ciò essi vengono spesso utilizzati negli esperimenti di farmacotossicologia e metabolismo biotrasformativo (Roymans *et al.*, 2005). Tuttavia si è visto che tutte le cellule coltivate *in vitro* tendono, in seguito ad un prolungato mantenimento in coltura, a cambiare o addirittura a perdere alcune delle loro caratteristiche originali (Zucco e Bianchi, 1994). Per questo motivo, con gli anni, si è sviluppata una tecnica di conservazione, denominata crioconservazione, in grado di mantenere gli epatociti in condizioni pressoché inalterate per tempi molto lunghi.

Nella seguente tesi sono stati utilizzati epatociti crioconservati di suino allo scopo di valutare l'effetto del tempo di coltura sull'espressione genica di alcuni citocromi P450 (CYP2B22, CYP2C e CYP3A: enzimi che giocano un ruolo molto importante nelle funzioni fisiologiche e nel metabolismo degli xenobiotici) e dei loro principali recettori nucleari (CAR, PXR, RXR α e GR α).

E' stato scelto di utilizzare proprio il suino come modello sperimentale in quanto, negli ultimi anni, è stato proposto come modello animale per studi di farmacologia e tossicologia a causa delle somiglianze anatomiche e fisiologiche con l'uomo (Swindle e Smith, 1998; Nannelli *et al.*, 2010).

Inizialmente sono state effettuate delle prove preliminari per individuare le condizioni ottimali di lavoro da applicare nel corso degli esperimenti successivi, quali determinazione del numero di cellule da piastrare e successivamente sottoporre ad isolamento dell'RNA totale, protocollo di estrazione dell'RNA, messa a punto dei test di citotossicità MTT e *Neutral Red*.

Successivamente sono state svolte quattro prove sperimentali dove l'approccio metodologico utilizzato ha visto prima lo scongelamento degli epatociti e la loro messa in coltura, quindi il loro arresto a tempi diversi (4, 24, 48, 72 e 96 ore e 10 giorni dal piastramento) ed infine l'estrazione dell'RNA dei monostrati e successiva analisi in *Real Time* PCR dei trascritti scelti.

In generale si è assistito ad una diminuzione dell'espressione genica dei CYPs e dei recettori nucleari all'aumentare del tempo di coltura. I risultati ottenuti per i CYP riflettono quanto dimostrato in letteratura in uomo, ratto e suino (George *et al.*, 1997; Skaanild e Friis, 2000; Binda *et al.*, 2003). Al contrario attualmente in letteratura non è presente alcuno studio relativo alla definizione del *time-course* dell'espressione dei recettori nucleari in coltura primaria di epatociti di suino. In questo studio è possibile osservare una brusca diminuzione dell'espressione di tutti i recettori nucleari a 24 e 48 ore dal piastramento ed un successivo recupero a T72 e T96 (fenomeno definito *crash and rise*). Diversamente dagli altri recettori analizzati, l'mRNA di CAR cala bruscamente già alle 24 ore e mantiene bassi livelli di espressione per tutta la durata della sperimentazione.

Nella seconda parte di questa tesi si è invece proceduto con la messa a punto di un protocollo per l'isolamento a fresco di epatociti primari di bovino. Sono state quindi applicate delle modifiche sostanziali al classico protocollo di isolamento di Seglen (1976). Purtroppo i risultati di questa seconda parte mostrano da una parte una scarsa resa di isolamento e bassa vitalità cellulare conseguente all'eccessivo tempo intercorso tra l'abbattimento dell'animale al macello ed il campionamento dell'organo ma dall'altra l'introduzione di importanti e valide modifiche al protocollo di isolamento degli epatociti.

INDICE

1. INTRODUZIONE	9
Metodi alternativi in vitro (MAV)	
Applicazione dei MAV in farmaco-tossicologia	
Fettine di fegato	
Le colture cellulari	
Linee cellulari stabilizzate	
Le cellule ingegnerizzate	
Le frazioni subcellulari	
La tossicogenomica	
Il metabolismo dei farmaci	
La superfamiglia del citocromo P450	
Classificazione delle reazioni metaboliche	
Induzione enzimatica	
La superfamiglia dei recettori nucleari (NRs)	
Famiglie del Citocromo P450 maggiormente coinvolte nel metabolismo degli xenobiotici	
2. SCOPO DALLA TESI.....	40
3. MATERIALI E METODI	41
PARTE PRIMA: Valutazione degli effetti del tempo di coltura sull'espressione degli enzimi farmaco- metabolizzanti e dei recettori nucleari in epatociti crioconservati di suino	41
PARTE SECONDA: Messa a punto di un protocollo per l'allestimento a fresco di colture primarie di epatociti di bovino.	71

4. RISULTATI E DISCUSSIONE	81
PARTE PRIMA: Valutazione degli effetti del tempo di coltura sull'espressione degli enzimi farmacometabolizzanti e dei recettori nucleari in epatociti crioconservati di suino.	81
PARTE SECONDA: Messa a punto di un protocollo per l'allestimento a fresco di colture primarie di epatociti di bovino.	102
5. CONCLUSIONI	111
6. BIBLIOGRAFIA	115
7. SITOGRAFIA	127
8. RINGRAZIAMENTI	129

1. INTRODUZIONE

Metodi alternativi in vitro (MAV)

L'adozione dei sistemi *in vitro* o sistemi alternativi alla sperimentazione animale rappresenta una parte fondamentale della naturale evoluzione scientifica, che ha coinvolto tutta la biologia durante il secolo scorso. Questi cambiamenti hanno permesso lo sviluppo di modelli sperimentali cellulari e subcellulari spingendo l'interesse della comunità scientifica verso lo studio di livelli di organizzazione (atomico, cellulare, molecolare) sempre più infinitesimali.

Nello sviluppo dell'utilizzo dei modelli *in vitro* hanno avuto un ruolo importante:

- gli aspetti legislativi riguardanti la necessità da parte degli organi competenti di regolamentare l'immissione nell'ambiente di sostanze inquinanti;
- quelli economici, importanti per le industrie costrette ad effettuare test di tossicità costosi e complessi utilizzando animali da laboratorio;
- quelli etici comprendenti l'avversione per l'uso di animali nella ricerca (Penco *et al.*, 2003).

In particolare si definisce metodo alternativo o MAV ogni metodo o procedura che conduca alla sostituzione di un esperimento sull'animale o alla riduzione del numero di animali richiesti, nonché all'ottimizzazione delle procedure sperimentali, allo scopo di limitare la sofferenza dell'animale (Zucco e Bianchi, 1994).

L'origine del dibattito sui metodi alternativi alla sperimentazione animale risale al 1959, momento in cui lo zoologo William Russel ed il microbiologo Rex Burch teorizzarono uno studio sull'impiego più "umano" degli animali usati nei laboratori. Le conclusioni del loro studio, presentato in occasione del meeting della *American Association of Laboratory Animal Science a Washington D.C.*, sono riassunte nel principio delle 3R (*Reduction, Replacement, Refinement*) così formulato: "un metodo alternativo è quella tecnica che Rimpiazza l'uso di animali *tout court (replacement)*, che Riduce il numero di animali normalmente usati in un particolare saggio (*reduction*), che Raffina ogni tecnica con lo scopo di ridurre le sofferenze sopportate dall'animale (*refinement*)".

La definizione di Russel e Burch fu adottata negli anni '80 dalla CEE nella direttiva sulla sperimentazione del 1986, dalla legge inglese (*Animal Act*) del 1986 e dall'OTA (*Office of Technology Assessment, USA*) nel 1988.

Più precisamente, *replacement* identifica la sostituzione, se possibile, degli animali con matrici biologiche caratterizzate da minor complessità (come batteri, colture cellulari, organi isolati), o con supporti informatici o bioingegneristici. Questa categoria è distinta tra “metodi sostitutivi biologici” (metodi *in vitro*) e “metodi sostitutivi non biologici” (metodi che si avvalgono dei contributi di altre scienze come l’informatica, la statistica, la matematica). *Reduction* comporta la massima riduzione possibile del numero di animali usati per un esperimento permettendo comunque di ottenere risultati di studio altrettanto precisi (Zucco e Bianchi, 1994). C’è da sottolineare comunque che nell’utilizzare un modello animale, non si può essere certi che i dati ottenuti siano applicabili alla specie umana, proprio perché ogni specie presenta caratteristiche intrinseche, oltre che variazioni intra-specifiche pertanto la riduzione può essere ottenuta standardizzando la popolazione animale per poter così ridurre la variabilità (Rahamani *et al.*, 1990).

Infine *refinement* è la ricerca di procedure sperimentali più specifiche e meno invasive per ridurre sofferenze e stress agli animali sottoposti ad esperimento.

Un nuovo approccio sperimentale, per essere considerato alternativo e magari innovativo rispetto alla sperimentazione animale tradizionale, deve essere riproducibile, affidabile, rapido e non più costoso di quello che si vuole sostituire. Il centro europeo preposto alla verifica del rispetto di questi parametri da parte del nuovo metodo è l’ECVAM (*European Centre for Validation of Alternative Methods*), istituito dalla Commissione Europea nel 1991. Questo centro coordina la validazione dei metodi alternativi a livello comunitario (si occupa di valutare la scientificità di un metodo al fine di poterlo inserire nella normativa comunitaria come metodo ufficiale) ed è il punto di riferimento per lo scambio di informazioni sullo sviluppo dei vari metodi per mezzo di una banca dati gestita dal centro stesso (ANON, 1991).

In Italia dal 2003 è nata l’IPAM (*Italian Platform on Alternative Methods*); questa Istituzione, creata per promuovere ed implementare i MAV, è costituita da rappresentanti di Istituzioni governative, del mondo scientifico (Università ed Enti di ricerca), dell’industria e delle associazioni animaliste (ENPA, LAV).

Nel corso di questi anni molti studi si sono concentrati sulla messa a punto di metodi *in vitro* capaci di sostituire o migliorare i classici test condotti su animali *in vivo*.

I test *in vitro* offrono vantaggi come la rapidità, la riproducibilità ed il controllo della variabilità intra-test (Cinelli *et al.*, 1991); inoltre, non devono rispondere ad alcuna normativa sul benessere

degli animali da esperimento, alle quali invece devono sottostare i test *in vivo* (Gruber e Hartung, 2004).

Uno svantaggio è rappresentato dal fatto che i MAV sono dei sistemi semplificati dell'organismo *in toto*, perciò difficilmente mimano i processi farmaco- o tossico cinetici che avvengono *in vivo*. *In vivo*, infatti, le barriere biologiche creano gradienti di permeabilità, mentre nei metodi *in vitro*, l'assorbimento degli xenobiotici e l'esposizione delle cellule a questi ultimi, può essere differente visto che non viene mantenuta l'integrità delle barriere biologiche (Freshney, 2001).

Altro limite nell'utilizzo dei MAV è rappresentato dal fatto che questi metodi non possono essere usati per studi di tossicità cronica in quanto non hanno una vitalità illimitata: per questo tipo di studi si è dunque ancora obbligati ad impiegare i metodi *in vivo*.

Applicazione dei MAV in farmaco-tossicologia

Nell'ambito tossicologico lo sviluppo dei MAV è stato molto più lento rispetto ad altri campi scientifici; infatti l'utilizzo di metodi *in vitro* nelle scienze farmacotossicologiche ha assunto un'importanza rilevante solo negli ultimi venti anni, seppur in presenza di un'ampia disponibilità di modelli semplificati (Zucco *et al.*, 2004).

Nell'industria farmaceutica, un dilemma affrontato da chi si occupa della valutazione della sicurezza dei farmaci ad uso umano consiste proprio nel fatto che la crescente sensibilizzazione della società riguardo l'uso degli animali da esperimento nei test di tossicità sta aumentando di pari passo con la domanda di messa a punto di nuove molecole ed una migliore sicurezza di quelle già in uso (Paine, 1996).

I metodi *in vitro* sono ideali per lo studio dei meccanismi molecolari e cellulari fisiologici nonché quelli alla base della tossicità indotta da xenobiotici, che altrimenti non sarebbero facilmente studiabili *in vivo* (Kniewald *et al.*, 2005). Attualmente i metodi *in vitro* sono prevalentemente usati nello *screening* preliminare dei farmaci nonché nella valutazione del rischio conseguente all'esposizione a xenobiotici tossicologicamente rilevanti (Eisenbrand *et al.*, 2002; Walum *et al.*, 2005).

I più importanti MAV utilizzati per lo studio dell'epatotossicità e dell'attività metabolica *in vitro* sono le fettine di fegato, gli epatociti primari, le cellule immortalizzate o linee stabilizzate di epatoma (LeCluyse, 2001), le frazioni subcellulari e le cellule ingegnerizzate con enzimi biotrasformativi (Gomez-Lechon *et al.*, 2010).

I modelli *in vitro* vanno scelti e valutati in base alle caratteristiche specifiche di ognuno, in relazione all'obiettivo che si vuole perseguire. A tale proposito qui di seguito verranno descritti nel dettaglio i MAV sopra citati.

Fettine di fegato

Le fettine di tessuto rappresentano un mini modello dell'organo oggetto di studio poiché contengono tutte le cellule del tessuto nel loro ambiente naturale, mantengono intatte le interazioni intercellulari e la matrice cellulare, e sono particolarmente appropriate per lo studio dei processi multicellulari rappresentando, per molti aspetti, un interessante sistema *in vitro* per lo studio della biotrasformazione dei farmaci e la tossicità organo specifica di xenobiotici (A. M. de Graaf *et al.*, 2010).

Le fettine vengono preparate in modo simile indipendentemente dalla specie o dall'organo, fornendo così un mezzo per valutare la biotrasformazione di un composto in varie specie così come in diversi organi. Le fettine di fegato, infatti, possono essere allestite da specie animali diverse, uomo compreso (Banczewski *et al.*, 2006). Inoltre, la preparazione delle fettine permette un uso efficiente del tessuto in quanto il tessuto rimanente a seguito della produzione delle fettine può essere utilizzato per la preparazione di microsomi, frazioni S9 e citosol: ciò aggiunge ulteriori informazioni sulle vie metaboliche coinvolte.

Le fettine di fegato vengono preparate a partire da un cilindro di fegato fresco mediante l'ausilio di un micrometro; per quanto riguarda il tessuto intestinale, invece, prima del taglio è necessaria l'incorporazione in cilindri di agarosio. Lo spessore scelto per le fettine dovrà garantire la preservazione dell'integrità dell'organo, nonché le sue funzioni, mantenendo quindi intatti i recettori di superficie ed i trasportatori (Vickers e Fisher, 2005).

Le fettine tagliate vengono mantenute in terreno *Waymouth* addizionato con siero fetale bovino al 10% e lasciate ad incubare (in maniera statica o dinamica) in piastre P6 o P12 a 37°C e 5% di CO₂ per un massimo di 24 ore. La vitalità infatti delle fettine intestinali è di 24 ore mentre arriva a 96 ore per quelle epatiche (A. M. de Graaf *et al.*, 2010). Un importante svantaggio di questo MAV è senz'altro la bassa vitalità così come l'insufficiente penetrazione del terreno di coltura nella fettina (Asha e Vidyavathi, 2010).

Nel fegato di un mammifero adulto, il 65-70% delle cellule è costituito da epatociti, mentre circa il 30-35% da cellule non parenchimali comprese le cellule stellate o di Ito, le cellule endoteliali

sinusoidali e le cellule di Kupffer. La maggior parte di questi tipi cellulari esprime il citocromo P450 (CYP) e pertanto possono biotrasformare gli xenobiotici: da qui l'utilizzo delle fettine di fegato per studi di inducibilità del CYP (Glockner *et al.*, 2002).

Questo MAV ci dà l'opportunità di studiare l'assorbimento dei composti da parte dei vari tipi cellulari di un particolare organo, le vie di biotrasformazione, così come il ruolo della biotrasformazione associato all'alterazione della funzione cellulare (Nahmias *et al.*, 2007).

Le fettine di tessuto sono diventate un affidabile e conveniente modello che riduce l'uso degli animali e fornisce una banca dati della risposta dell'uomo alle potenziali sostanze tossiche; è inoltre semplice, ripetibile e ha bassi costi. Gli svantaggi di questo MAV sono i tempi di incubazione brevi (i tempi di incubazione superiori alle 24 ore richiedono infatti particolare attenzione: Paine, 1996); è facilmente soggetto a contaminazioni batteriche e non permette la crioconservazione (Gomez- Lechon *et al.*, 2010).

Le colture cellulari

Le tecniche di coltura cellulare hanno permesso di studiare il comportamento delle cellule all'esterno dell'organismo vivente ed in condizioni artificiali che riproducano, quanto più fedelmente possibile, il microambiente del tessuto o dell'organo da cui derivano.

Le colture tissutali e cellulari interessano molteplici aree della ricerca scientifica.

Il primo esperimento di coltura tissutale risale al 1907, quando Ross Harrison (1870-1959) della *Yale University* prelevò un piccolo frammento di tessuto dal midollo spinale di un embrione di rana e lo depose in un coagulo di linfa. L'osservazione del tessuto al microscopio per diversi giorni permise a Harrison di scoprire che le cellule nervose si mantenevano vitali nel mezzo utilizzato. Poco tempo dopo, Alexis Carrel (1873-1944), Premio Nobel nel 1912 per la medicina e la fisiologia e considerato uno dei pionieri nella storia delle colture cellulari, dimostrò che si potevano mantenere le cellule al di fuori dell'organismo in condizioni di sterilità. Negli anni Cinquanta Harry Eagle diede un notevole impulso a questo settore di ricerca studiando le sostanze nutritive necessarie alle cellule in coltura. Dimostrò infatti che le cellule animali potevano crescere in un cocktail di sostanze a composizione chimica definita in presenza di siero (Eagle, 1955).

Le colture cellulari sono state e sono ancora uno strumento molto utile per lo sviluppo di vaccini. Nel 1949 venne mostrato che il poliovirus poteva crescere in colture di cellule umane. Il vaccino antipolio da virus disattivato divenne uno dei primi prodotti commerciali delle colture animali.

Un'altra pietra miliare nella tecnologia delle colture cellulari venne posta nel 1975 con la messa a punto di una tecnica per la produzione di cellule ibride, tra cui cellule in grado di produrre anticorpi, macromolecole che hanno un importante valore sia per la diagnostica che per la terapia (Rahmani *et al.*, 1990).

Le conoscenze e le tecniche nel campo delle colture cellulari accumulate nel tempo consentono oggi di coltivare in laboratorio moltissimi tipi cellulari. Da un piccolo frammento tissutale è possibile isolare, mediante specifiche procedure, singole cellule mantenute vitali grazie all'apporto di nutrienti forniti dal terreno di coltura. Grazie al processo della divisione, in coltura le cellule sono in grado di replicarsi originando nuove cellule identiche alla cellula madre per un numero definito di volte. Inoltre, sotto l'influenza di appropriati stimoli, possono andare incontro a differenziamento, cioè all'assunzione di una specifica forma e funzione.

Le cellule per essere coltivate *in vitro* devono però essere caratterizzate da un'intrinseca capacità proliferativa, non devono essere senescenti o prossime alla senescenza e devono essere microbiologicamente indenni.

I vantaggi di questo MAV sono senza dubbio la riduzione nel numero di animali uccisi, la possibilità di dimensionare gli esperimenti con finalità biotecnologiche, la semplicità nel riprodurre degli esperimenti, la facile disponibilità commerciale di terreni e fattori e di tutto il necessario per il mantenimento delle cellule in coltura e naturalmente la larga disponibilità di tipi di cellule.

Questi sono però dei metodi molto specializzati, laboriosi e abbastanza costosi (alto costo dei materiali richiesti come il siero ed i fattori di crescita); inoltre, in questo MAV è difficile correlare le concentrazioni *in vitro* con quelle *in vivo*, infatti le colture cellulari rappresentano dei sistemi semplificati rispetto ad un organismo integrato (Gomez- Lechon *et al.*, 2010).

In base a diversi aspetti le colture cellulari possono essere classificate in:

- COLTURE A BREVE ED A LUNGO TERMINE

Nel primo caso il numero di cicli cellulari cui vanno incontro le cellule è ridotto, mentre per le colture a lungo termine le cellule si dividono molte volte o addirittura illimitatamente nel caso delle linee cellulari stabilizzate.

- COLTURE IN MONOSTRATO O IN SOSPENSIONE

Generalmente le cellule quando crescono tendono ad aderire alla superficie del recipiente di coltura, e questa adesione è richiesta come segnale di sopravvivenza. Moltiplicandosi le cellule formano un monostrato, in quanto risentono dell'inibizione da contatto.

Le colture in sospensione contengono cellule che possono proliferare senza una superficie di adesione. Le cellule in sospensione raggiungono una densità per millilitro di terreno di coltura più elevata di quelle in monostrato.

- COLTURE CLONALI

In questi tipi di coltura le cellule vengono diluite prima della semina in modo tale da avere ogni cellula separata dalle altre e ciascuna di queste prolifera formando una colonia singola.

- CO-COLTURE

In questo tipo di colture vengono seminate cellule di tipo diverso per poter ricreare le interazioni che avvengono *in vivo* tra tessuti diversi.

Il ciclo di crescita che si verifica in tutti i tipi di coltura è convenzionalmente suddiviso in tre fasi.

1. **Lag phase:** è il periodo che segue la messa in coltura delle cellule durante il quale non si evidenzia un aumento del loro numero. Questa fase è costituita da un equilibrio tra cellule staminali multipotenti, cellule determinate (cioè non differenziate ma già programmate per il differenziamento) e cellule mature differenziate; questa popolazione manifesta tempi di raddoppiamento piuttosto lenti (Zucco e Bianchi, 1994).
2. **Log phase:** questo è il periodo caratterizzato dall'aumento esponenziale del numero di cellule, che segue la *lag phase* e termina una o due replicazioni dopo il raggiungimento della confluenza. La lunghezza di questa fase dipende dalla densità di semina. Nella *log phase* la frazione di crescita è alta (90-100%), la coltura è nella sua forma più riproducibile e la vitalità è alta.

Questa seconda fase è tipica delle linee cellulari ed è caratterizzata da una popolazione con tempi di raddoppiamento costanti e più accelerati (Zucco e Bianchi, 1994). Verso la fine della *log phase* la coltura diventa confluyente (tutta la superficie di crescita è occupata e tutte le cellule sono in contatto con le cellule circostanti) poi la proliferazione cellulare cessa quasi completamente e si passa alla terza fase di *plateau* (o fase stazionaria)
3. **Plateau phase:** A questo punto la crescita della coltura è ridotta (in alcuni casi raggiunge al massimo il 10%). Le cellule possono diventare meno mobili e le increspature della membrana cellulare diminuiscono. Tutti questi fenomeni vengono designati come "inibizione da contatto". La diminuzione della crescita delle cellule in seguito al

raggiungimento della confluenza non è dovuto soltanto al contatto, ma può anche coinvolgere una ridotta separazione cellulare e la deplezione di nutrienti e in modo particolare di fattori di crescita dal terreno di coltura (Zucco e Bianchi, 1994).

In questa terza fase le cellule presentano segni di senescenza, con tempi di raddoppiamento sempre più lunghi, fino ad andare incontro a degenerazione e morte, oppure a trasformazione.

Molti sono gli studi che dimostrano la solidità di questo MAV, rispetto ad altri metodi *in vitro*, riportando l'elevato utilizzo in particolare delle colture primarie di **EPATOCITI** umani negli esperimenti tossicologici, metabolici e farmacologici (Roymans *et al.*, 2005). In aggiunta, è stato comprovato che le colture di epatociti umani sono anche un affidabile modello *in vitro* per la valutazione delle nuove entità chimiche come induttori delle isoforme del CYP (Roymans *et al.*, 2005). Gli epatociti vengono, infatti, ben utilizzati per studiare il metabolismo, sia di fase I e sia di fase II, dei farmaci poiché essi rappresentano un'eterogeneità di espressione del CYP. Le colture di epatociti e le sospensioni di epatociti primari sono strumenti potenti per analizzare il profilo metabolico di una serie di farmaci con buone correlazioni *in vitro-vivo*. Gli epatociti coltivati però sono anche soggetti ad una perdita graduale delle funzioni epatiche specifiche con una diminuzione dell'espressione degli enzimi metabolizzanti i farmaci (Asha e Vidyavathi, 2010).

Per isolare gli epatociti generalmente si usa il metodo di Seglen, introdotto nel 1976, che si sviluppa nel seguente modo:

- perfusione del tessuto oggetto d'analisi in due fasi successive (la seconda prevede l'utilizzo della collagenasi);
- frazionamento meccanico e successiva purificazione effettuata con filtri in base alla densità cellulare;
- conta cellulare e messa in coltura.

Con questo metodo si possono ottenere un'elevata vitalità cellulare nonché una buona purezza di coltura. Tuttavia, dopo un periodo prolungato in coltura le cellule tendono a cambiare e a perdere le loro caratteristiche originali; è però possibile selezionare le cellule in un periodo di vita della coltura in cui la variabilità è minima e conservarle, in questo modo si lavora sempre con una popolazione omogenea (Zucco e Bianchi, 1994). Un metodo di conservazione è la crioconservazione.

La crioconservazione permette di mantenere inalterati gli epatociti nel tempo; nella condizione di ibernazione vengono ridotte al minimo le funzioni vitali ed il metabolismo si riduce. Per la crioconservazione generalmente si utilizza dell'azoto liquido che congela la cellula ad una temperatura di -196°C . In queste condizioni e controllando periodicamente la vitalità si riesce a mantenere le cellule anche per molti anni (Zucco e Bianchi, 1994).

Si può ricorrere all'utilizzo di epatociti crioconservati soprattutto quando la disponibilità di organi per l'isolamento di questi non è sempre così facile ed immediata. Gli epatociti più adatti alla crioconservazione sono quelli che vengono isolati da fegati che si presentano in buone condizioni (Li *et al.*; 1999). Infatti, conviene sempre avere una "riserva" di cellule per cominciare da capo se si verifica una mutazione genomica, se le cellule vanno in senescenza, se si trasformano, se il fenotipo cellulare cambia o se la coltura è contaminata .

Non esiste un solo protocollo, universalmente adottato, di crioconservazione degli epatociti appena isolati ma generalmente molte procedure utilizzano il dimetilsolfossido (DMSO) come crioprotettivo (Li *et al.*; 1999). I crioprotettivi possono essere di due tipi, penetranti o non penetranti. Il DMSO ed il glicerolo fanno parte dei primi e la loro funzione è quella di ridurre la temperatura di solidificazione, diminuendo di conseguenza la formazione di cristalli di ghiaccio; i secondi, come ad esempio l'amido idrossietilico, agiscono invece sulla permeabilità delle membrane. Prima della crioconservazione si è visto che è importante pre-incubare gli epatociti a 37°C per consentire il recupero delle cellule dopo il trauma subito con l'isolamento (questo passaggio migliora la vitalità post scongelamento e l'efficienza di adesione delle cellule) ed è consigliato aggiungere basse quantità di crioconservante per evitare uno shock osmotico delle cellule. Un punto cruciale di questa tecnica, infine, è dato dal congelamento che deve avvenire in maniera controllata così pure come il successivo scongelamento che deve essere effettuato il più rapidamente possibile per ridurre al minimo i danni cellulari e la formazione di cristalli di ghiaccio tra le cellule (Li *et al.*;1999).

Questa tecnica ha raggiunto negli anni degli ottimi progressi. In particolare sono migliorate le procedure di crioconservazione per consentire l'adesione cellulare ed estendere l'uso delle cellule crioconservate nelle analisi che richiedono di prolungare i tempi della coltura, come ad esempio gli studi di induzione enzimatica (Li, 2007). Un altro vantaggio è che la sperimentazione con epatociti crioconservati può essere pianificata, cosa che invece non si può fare con gli epatociti appena isolati poiché dipendono dalla disponibilità di un fegato per la ricerca. Con gli epatociti crioconservati c'è la possibilità inoltre di ripetere la sperimentazione; essi , poi, possono derivare

dallo stesso donatore o da combinazioni di più donatori e possono essere utilizzati in momenti diversi per permettere la realizzazione di studi di ripetibilità; cosa che invece non è di certo possibile effettuare con gli epatociti appena isolati (Li, 2007).

Linee cellulari stabilizzate

Durante la crescita della coltura primaria, quando le cellule hanno raggiunto la confluenza, si può provvedere a “splittare” le cellule (subcoltura) in un nuovo recipiente con terreno fresco. Quando si effettua una subcoltura si parla di linee cellulari. In particolare, dal primo al terzo *split* la coltura solitamente è eterogenea ma prendono via via il sopravvento gli elementi con attività proliferativa e resistenza alla tripsinizzazione, ossia all'azione dell'enzima proteolitico tripsina (intervento effettuato per dissociare il monostrato: Zucco e Bianchi, 1994); dopo il terzo passaggio la coltura è considerata stabile.

Nel corso delle subculture, la proliferazione cellulare continua a vantaggio di tutte quelle cellule caratterizzate da massima velocità proliferativa e si selezionano, così, linee cellulari immortali dotate di una capacità di crescita molto rapida, caratteristica molto differente se paragonata a molti tessuti normali di mammifero (Townsend *et al.*, 1999); per di più la selezione di cellule con elevata capacità proliferativa risulta un problema se si è interessati a studiare tipi cellulari meno atti a proliferare *in vitro*.

Le linee cellulari possono essere a vita finita, clonali o continue.

Le linee cellulari a vita finita resistono in coltura solo per un numero limitato di cicli cellulari, hanno un corredo cromosomico diploide e la maggior parte della popolazione cellulare ha lo stesso cariotipo, crescono in monostrato risentendo dell'inibizione da contatto e sono fortemente dipendenti da fattori di crescita presenti nel siero.

Le linee cellulari clonali, derivanti per mitosi da una singola cellula, servono per ottenere una popolazione il più possibile omogenea. Linee cellulari continue (trasformate) originano, invece, da mutazioni, spontanee o indotte, a partire dalle colture primarie, dalle linee cellulari a vita finita oppure ottenute direttamente da tumori (minor dipendenza da fattori di crescita del siero e minor inibizione da contatto: Zucco e Bianchi, 1994).

Per ottenere una linea cellulare capace di proliferare illimitatamente è necessario immortalizzare la coltura; per farlo si possono usare oncogeni derivanti da virus tumorali, che attivano meccanismi di trasformazione simili a quelli che determinano la proliferazione tumorale, o si può

introdurre il gene esogeno che codifica per l'attività catalitica della telomerasi (i telomeri, dopo un certo numero di duplicazioni delle cellule primarie, si accorciano e la cellula, così, non è più in grado di dividersi e va incontro a morte). Linee cellulari naturalmente immortalizzate sono cellule provenienti da tessuti tumorali.

La prima linea continua "HeLa" fu isolata e propagata, per la prima volta, dal Dott. George Otto Gey nel 1951: questa linea cellulare deriva da tessuto tumorale di cervice uterina della paziente Henrietta Lacks, dal cui nome deriva quello delle cellule.

Anche l'elevata capacità proliferativa delle cellule HeLa è data dalla presenza di una mutazione della telomerasi che previene l'accorciamento del telomero durante la replicazione garantendo di fatto la loro sopravvivenza.

Questo MAV tende ad essere un po' meno utilizzato per gli studi sul metabolismo dei farmaci e per gli studi di tossicità dei farmaci e loro metaboliti rispetto ad altri modelli *in vitro* in quanto non presenta una differenziazione cellulare e una completa espressione di tutte le famiglie degli enzimi metabolici (Donato, 2004; Asha e Vidyavathi, 2010). Requisito fondamentale delle linee cellulari infatti è quello di rappresentare il più possibile le normali condizioni fisiologiche dell'organismo di partenza (Asha e Vidyavathi, 2010, Gomez- Lechon *et al.*, 2010).

Le linee cellulari riescono a sopportare processi di scongelamento e congelamento senza perdita di vitalità e funzionalità. Normalmente vengono mantenute in coltura a 37°C in atmosfera controllata e il terreno di coltura utilizzato è quello modificato di Dulbecco (DMEM) addizionato con siero fetale bovino al 10% (Martin *et al.*, 2010); in queste condizioni le cellule mantengono un profilo fenotipico stabile. Per tutti questi motivi questo MAV è considerato un modello sperimentale illimitato, facilmente disponibile e di semplice realizzazione.

Per i ricercatori di tutto il mondo sono disponibili diverse collezioni di linee cellulari messe in commercio da strutture specializzate nella conservazione e propagazione di cellule su larga scala; qui di seguito vengono riportate alcune delle banche cellulari più importanti:

- *Health Protection Agency Culture Collections* (www.hpacultures.org);
- *American Type Culture Collection - USA* (www.atcc.org);
- *National Cell Culture Center – USA* (www.nccc.com);
- *German Collection of Microorganism and Cell Cultures* (www.dsmz.de).

Ciascuna banca cellulare fornisce oltre alla possibilità di acquistare la linea cellulare di interesse anche le informazioni sperimentali che riguardano sia il protocollo di mantenimento della linea in

coltura, sia la specie e il tessuto di provenienza, sia le modalità di isolamento ed altre notizie utili al ricercatore.

Le principali linee cellulari usate sono riportate nella seguente tabella.

Specie	Organo di provenienza	Nome della linea cellulare
Uomo	Apparato digerente	HT29, CACO-2 (adenocarcinoma)
	Fegato	HepG2 (epatoma)
	Ghiandola mammaria	MCF7 (carcinoma mammario)
Ratto	Apparato digerente	IEC17 (duodeno)
	Fegato	MH1C1, H4IIE (epatoma)
Cane	Apparato genitourinario	MCDK (rene)
Bovino	Apparato genitourinario	MDBK (rene)
Maiale	Apparato genitourinario	LLCPK1 (rene)

Tabella 1: Linee cellulari stabilizzate, più usate, di origine neoplastica (Tabella modificata: Zucco e Bianchi, 1994).

Le cellule ingegnerizzate

Le linee ingegnerizzate sono cellule trasfettate con un gene di interesse. La trasfezione genica è il trasferimento di DNA esogeno in cellule di mammifero per lo studio della funzione e dei meccanismi di controllo dei geni. Questa tecnica viene usata in ricerca sia nelle cellule in coltura che *in vivo*; nel primo caso oltre che per lo studio della struttura e funzione genica, viene impiegata anche per l'identificazione di sequenze regolatorie, per la produzione di proteine nonché nello studio dei farmaci con lo scopo di ottenere un'elevata espressione degli enzimi farmaco-metabolizzanti. *In vivo*, invece, la trasfezione viene impiegata per la produzione di animali transgenici usati come modelli per la comprensione delle basi molecolari di malattie umane.

Nel trasferimento genico non tutte le cellule possono essere trasfettate con successo; le più adatte ed utilizzate sono le linee cellulari immortalizzate che crescono in terreni di coltura chimicamente definiti per un tempo indefinito e sono caratterizzate da rapida duplicazione (Zucco e Bianchi; 1994).

Per la trasfezione si ricorre all'utilizzo di vettori di espressione virali o di origine plasmidica, comprendenti solo la sequenza richiesta per l'espressione.

Nell'utilizzare questa tecnica si può scegliere tra una trasfezione transiente o una stabile. Più precisamente, si parla di trasfezione transiente quando il DNA esogeno trasferito all'interno della cellula non viene integrato nel genoma della cellula ospite e non contiene un'origine di replicazione per cellule animali; la cellula sarà in grado di mantenere il DNA esogeno solo per un periodo di tempo limitato, prima di degradarlo o di perderlo durante le divisioni cellulari. Al

contrario nella trasfezione stabile il DNA esogeno inserito all'interno della cellula viene mantenuto in maniera stabile e propagato alle cellule figlie; questa trasfezione può essere ottenuta introducendo del DNA esogeno in vettori contenenti repliconi o integrando del DNA esogeno nel genoma della cellula ospite.

La trasfezione transiente ha il vantaggio di essere molto più efficiente rispetto a quella stabile. Inoltre, mentre quella stabile viene considerata una tecnica più adatta per gli esperimenti a lungo termine, la transiente è utile per gli esperimenti di breve durata. Nella scelta tra l'utilizzo della trasfezione transiente o stabile si deve anche tener presente che la prima è semplice e immediata da applicarsi, e comprende una popolazione cellulare disomogenea (poche cellule con molto plasmide) e la loro raccolta deve essere effettuata 48-72 h dopo la trasfezione. La seconda invece permette di isolare e propagare singoli cloni contenenti il DNA trasfettato, cioè con integrato casualmente il plasmide nel genoma; è una procedura senz'altro più lunga e laboriosa, necessita di un *marker* di selezione e la popolazione cellulare ottenuta è omogenea (molte cellule con poco plasmide).

I metodi di trasfezione possono essere chimici o fisici; i metodi chimici sono basati sulla precipitazione (es. CaPO_4 , dietilamino-etil destrano) ed utilizzano sostanze lipofile (neutre e cationiche); i metodi meccanici sfruttano invece l'elettroporazione.

Nella coprecipitazione con calcio fosfato i granuli di calcio fosfato associati al DNA entrano nella cellula per endocitosi e vengono poi trasportati al nucleo. Gli ioni bivalenti possono promuovere l'ingresso di acidi nucleici attraverso le membrane. Questo metodo generalmente conferisce un alto livello di espressione genica per trasformazioni a breve ed a lungo termine (Ham, 1984).

Il dietilamino-etil destrano è stato il primo metodo usato per l'introduzione di DNA nelle cellule eucariote; il destrano è un carboidrato policationico, idrosolubile, che favorisce l'interazione tra il DNA esogeno e il macchinario endocitico della cellula. Infine altro metodo chimico è quello dei liposomi costituiti da vescicole fosfolipidiche di origine sintetica (lipidi policationici e neutri). Questo metodo permette la formazione di vescicole liposomiali unilamellari che portano una carica netta positiva: la testa cationica del composto lipidico si associa ai gruppi P negativi dell'acido nucleico, quindi i complessi lipidi - DNA si fondono con le membrane cellulari e rilasciano spontaneamente il loro contenuto nelle cellule. Nel metodo fisico dell'elettroporazione, invece, le cellule vengono poste in una soluzione contenente DNA, e vengono esposte ad un breve impulso elettrico che produce transitoriamente dei pori nelle loro membrane (Zucco e Bianchi, 1994).

Nella seguente tabella sono riportati i vantaggi e le limitazioni dei metodi di trasfezione appena citati.

METODI di TRASFEZIONE	VANTAGGI	SVANTAGGI
Coprecipitazione con calcio fosfato	<ul style="list-style-type: none"> - Economico - Relativamente versatile 	<ul style="list-style-type: none"> - Tecnicamente delicato (influenzato da variazioni anche minime di pH) - Efficienza bassa - Elevata citotossicità - Non funziona con alcuni tipi cellulari
Dietilamino-etil destrano	<ul style="list-style-type: none"> - Molto semplice 	<ul style="list-style-type: none"> - Molto poco efficiente - Solo trasfezioni transienti
Liposomi	<ul style="list-style-type: none"> - Bassa tossicità 	<ul style="list-style-type: none"> - Difficile produrre liposomi - Alta variabilità
Elettroporazione	<ul style="list-style-type: none"> - Utile per quei tipi cellulari in cui non si ottengono risultati con i metodi classici - Il DNA entra direttamente senza passare attraverso il compartimento endosomiale dove può aver luogo la degradazione dell'acido nucleico 	<ul style="list-style-type: none"> - Necessità di ottimizzare le condizioni del campo elettrico - intensità e durata- - Elevato livello di tossicità (50%)

Tabella 2: *Vantaggi e svantaggi dei metodi chimici, fisici e meccanici di trasfezione (Ham, 1984).*

Applicando queste tecniche si sono prodotte da tempo molte cellule che esprimono stabilmente una singola forma di CYP di mammifero: queste sono state poi usate nei test di genotossicità e citotossicità. Inoltre, per aumentare la capacità metabolica di CYP eterologhi è stata messa a punto la co-espressione di CYP insieme ad altri componenti della catena monossigenasica. Infine, per ricostruire l'intero sistema di attivazione metabolica per alcune sostanze sono state prodotte linee cellulari che esprimono contemporaneamente una forma di CYP ed enzimi di fase II (Sawada e Kamataki, 1998).

Le frazioni subcellulari

Il frazionamento cellulare è il processo fisico che prevede l'utilizzo della forza centrifuga per separare gli organuli e le inclusioni cellulari in funzione del loro coefficiente di sedimentazione. Il coefficiente di sedimentazione di una particella dipende dalle sue dimensioni, forma e densità e dalla viscosità del mezzo. Se una cellula viene assoggettata ad una forza centrifuga adeguata, gli organuli in essa contenuti si distribuiranno in diversi strati (figura 1). In ogni strato si trova soltanto un tipo di organulo e la posizione che esso occupa entro la cellula dipende dal suo coefficiente di sedimentazione. Con la tecnica della centrifugazione differenziale è possibile isolare qualsiasi organulo cellulare e determinarne *in vitro* la composizione chimica e le funzioni.

La centrifugazione differenziale si effettua assoggettando una sospensione cellulare, ottenuta con un procedimento chiamato omogeneizzazione, all'azione di diverse forze centrifughe (figura 1).

Questo processo determina la produzione di frazioni pure contenenti organuli differenti che possono essere studiate sotto il profilo biochimico ed analizzate per quanto concerne la loro purezza al microscopio elettronico. L'isolamento dei componenti cellulari mediante la tecnica della centrifugazione differenziale ne permette uno studio dettagliato in condizioni di relativa purezza: ad esempio nuclei, nucleoli, mitocondri, reticolo endoplasmatico rugoso (RER), ribosomi, granuli di secreto e granuli di pigmento (Junqueira *et al.*, 1998).

Di seguito vengono elencati i vantaggi e gli svantaggi delle frazioni subcellulari.

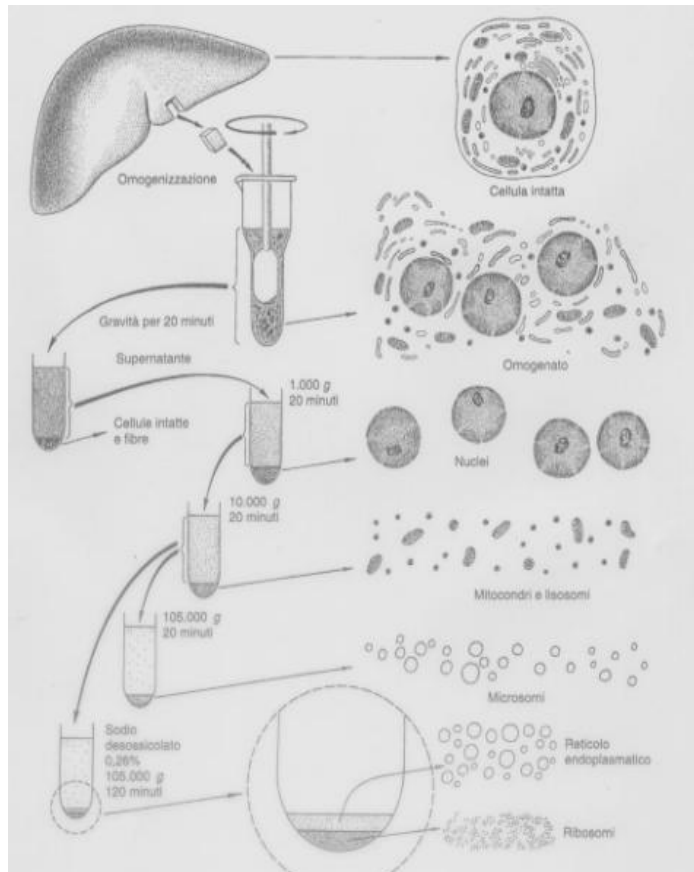


Figura 1: Isolamento dei componenti cellulari mediante centrifugazione differenziale (Junqueira *et al.*, 1998).

I vantaggi di questo MAV sono:

- metodo di facile applicazione;
- disponibilità illimitata che permette numerose ripetizioni;
- flessibilità delle condizioni di incubazione (pH, temperatura, tamponi);
- possibilità di conservare i campioni a -80°C;
- possibilità di produrre elevate quantità di metaboliti per l'analisi strutturale;
- possibilità di lavorare su tutte le specie e in diverse condizioni sperimentali;
- mantenuta attività catalitica degli enzimi farmaco-metabolizzanti.

Gli svantaggi invece sono:

- labilità di alcuni enzimi durante la preparazione;
- limitazione del metabolismo sequenziale che per essere completo necessita di cofattori (i.e., NADPH, GSH);
- perdita di eterogeneità cellulare quando gli organi sono composti da più tipi cellulari;
- impossibilità di studiare i fenomeni di regolazione.

Fra le frazioni subcellulari troviamo il citosol, la frazione post mitocondriale (S9) e i microsomi.

Il citosol o sostanza fondamentale solubile è la parte fluida del citoplasma. La sua consistenza viscosa è dovuta alla grande quantità di proteine disciolte in esso e alla presenza di altre piccole molecole come aminoacidi, zuccheri semplici, nucleotidi che fungono da riserve cellulari fondamentali per il corretto funzionamento degli organelli. Nel citosol sono presenti anche metaboliti, ioni inorganici, molecole ricche di energia come l'ATP e rappresenta circa il 50% del volume cellulare.

Le frazioni post mitocondriali (S9) vengono impiegate per aumentare la capacità biotrasformativa in colture cellulari. Per la loro preparazione si procede omogeneizzando il fegato, quindi si centrifuga per 10 minuti a 4°C a 9.000xg (da qui il nome S9).

Infine, i microsomi sono organelli cellulari simil-vacuolati distribuiti nel citoplasma e formati da doppia membrana plasmatica. Essi contengono molti enzimi deputati al metabolismo di lipidi, farmaci, alcool oltre che alla neutralizzazione dei radicali liberi mediante l'enzima catalasi. Le cellule dotate di maggior numero di microsomi sono gli epatociti che sono, infatti, specializzati nella biotrasformazione di numerosi farmaci. I microsomi rappresentano il primo modello epatico impiegato nel corso dello sviluppo di un nuovo farmaco. Questo MAV ha notevolmente semplificato e velocizzato l'identificazione dei CYP coinvolti nella produzione dei vari metaboliti (Donato, 2003).

I microsomi epatici si ottengono mediante centrifugazione (100.000 x g) di omogenato di fegato (figura 1) in tampone fosfato (0,1M pH 7.4), che permette una purificazione parziale delle membrane del reticolo endoplasmatico liscio unite al CYP e ad altri enzimi (Donato e O'Connor, 2004; Machala *et al.*, 2003). I microsomi epatici, in tutte le specie di mammifero, contengono numerosi CYP ed ognuno di essi ha la capacità di catalizzare differenti tipi di reazioni (Parkinson, 2001).

In commercio si trovano numerosi tipi di microsomi provenienti da varie specie, uomo compreso (Baranczewski *et al.*, 2006).

La tossicogenomica

Nella prima decade del ventunesimo secolo ha assunto notevole sviluppo l'utilizzo di tecniche che permettono un'analisi pressoché completa dei costituenti cellulari specifici quali RNA, DNA, proteine e metaboliti). Tali tecniche vengono definite tecnologie *-omics* ed includono principalmente la genomica, la proteomica, la metabonomica o metabolomica e la citomica.

Qui di seguito sono riportate le definizioni delle diverse tecniche *-omics*.

- GENOMICA: è lo studio della struttura e della funzione degli interi genomi. Esistono numerose applicazioni per questa tecnica e vanno tutte sotto il nome di post-genomica poiché dipendono tutte dalla precedente informazione genomica. In particolare, una sua grossa applicazione riguarda l'uso dei genomi per lo studio dell'evoluzione, mentre un'altra classe di applicazioni prende il nome di genomica funzionale poiché ha a che fare con la funzione o l'espressione dei genomi (Weaver, 2008).
- PROTEOMICA: comprende tutte le proteine espresse nello stesso momento in una cellula, incluse tutte le isoforme e le modificazioni post-traduzionali. Mentre il genoma è costante per una data cellula ed identico per tutte le cellule di un organismo, e non cambia molto all'interno della specie, il proteoma è molto dinamico nel tempo e in risposta a fattori esterni, e differisce in maniera sostanziale tra i diversi tipi cellulari; le proteine sono costantemente sottoposte a sintesi, degradazioni e modificazioni. Mentre il compito di analizzare il genoma di un organismo, o il suo trascrittoma è relativamente semplice, quello di analizzare il proteoma è tutt'altro che facile soprattutto per la complessità delle proteine rispetto agli acidi nucleici. In realtà, con le tecniche attuali, gli studi proteomici su

organismi complessi possono esaminare solo una porzione del proteoma totale (Weaver, 2008).

- METABONOMICA: è la misura quantitativa della risposta metabolica, multiparametrica e correlata con il tempo che il sistema vivente dà a stimoli pato-fisiologici ed a modificazioni genetiche. Essa è la determinazione del set completo di metaboliti/intermedi a basso peso molecolare, dipendenti dal contesto, che variano a seconda dello stato fisiologico, evolutivo o patologico della cellula, tessuto, organo o organismo (Gomez-Lechon *et al.*, 2010). Per applicare al meglio questa tecnica è necessario conoscere bene il metabolismo degli xenobiotici o sostanze endogene oggetto di studio. Tra le metodiche analitiche più usate troviamo: la risonanza magnetica nucleare (NMR), le tecniche cromatografiche (HPLC, GC) e la spettrometria di massa (MS). Purtroppo, un limite allo sviluppo dell'utilizzo della metabolomica è dato dalle scarse conoscenze specifiche concernenti il metabolismo in condizioni fisiologiche o patologiche (Weaver, 2008).
- CITOMICA: è un nuovo approccio alla biologia cellulare e viene definita come la citometria dei sistemi cellulari che mira a determinare il fenotipo molecolare di singole cellule. Così, la citomica può essere considerata come la scienza dell'analisi della singola cellula basata sulla genomica e proteomica con lo studio delle dinamiche di funzionamento delle cellule e dei tessuti, modulate da fattori esterni.

In tale contesto, ha preso piede una nuova disciplina definita tossicogenomica, la quale studia gli effetti, biologici avversi di agenti esogeni sulla struttura ed attività del genoma.

Le metodologie -omics hanno ampliato le conoscenze relative agli effetti degli xenobiotici sugli organismi viventi e vengono applicate sia come tecnica a se stante e sia combinate tra loro, con lo scopo di provvedere ad una più efficiente valutazione dei potenziali effetti collaterali di nuove entità chimiche (Gomez-Lechon *et al.*, 2010).

Queste tecniche ci danno informazioni globali durante lo sviluppo di processo di un farmaco e ridefiniscono le correnti pratiche di ricerca di nuovi biomarcatori (Gomez-Lechon *et al.*, 2010).

Secondo la *National Academy of Science* statunitense un biomarcatore è quella variazione, indotta da un contaminante o da una sostanza tossica, a livello delle componenti biochimiche o cellulari di un processo, di una struttura, di una funzione, che può essere misurata in un sistema biologico. In particolare in tossicologia, i biomarcatori, sono considerati dei "mezzi" per la valutazione dell'esposizione, dell'azione tossica e della risposta degli esseri viventi agli xenobiotici.

Il metabolismo dei farmaci

Il ruolo centrale del fegato nel metabolismo intermediario ed energetico e nel processo di biotrasformazione del farmaco, accanto alla sua vulnerabilità fanno di questo organo il maggior target per lo studio degli effetti tossici dei farmaci (Gomez-Lechon *et al.*, 2010).

Secondo l'Organizzazione Mondiale della Sanità si definisce farmaco: «*quel composto che, introdotto in un organismo vivente, può modificarne una o più funzioni*».

Il termine metabolismo significa “trasformazione” e nel parlare di metabolismo dei farmaci, intendiamo le trasformazioni a cui vanno incontro i farmaci nell'organismo. La “centrale metabolica” del nostro organismo è il fegato il quale può operare delle trasformazioni sui farmaci, grazie alla presenza di alcuni enzimi.

Molti dei farmaci che assumiamo non sono del tutto solubili in acqua, di fatto questa proprietà permette un loro assorbimento e distribuzione all'interno dell'organismo ma allo stesso modo è purtroppo un ostacolo per la loro escrezione. Infatti, ogni sostanza liposolubile filtrata o secreta nel rene o escreta con la bile viene riassorbita rispettivamente nei tubuli renali o nell'intestino. Solo la conversione in un composto più polare, e quindi meno liposolubile, ne permette l'escrezione (Palatini, 2010).

Tutti gli organismi viventi sono costantemente esposti a innumerevoli sostanze chimiche estranee, dette xenobiotici (farmaci, sostanze non nutritive contenute nei cibi, pesticidi, inquinanti di origine industriale o batterica). La capacità di biotrasformare composti lipofili in idrofili è quindi critica per la sopravvivenza di ogni organismo. Questa capacità è fornita da un gruppo di 30 enzimi, molti dei quali presenti in varie isoforme detti isoenzimi del citocromo P450, che si sono andati progressivamente formando nel corso dell'evoluzione (Palatini, 2010).

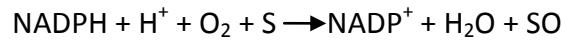
La superfamiglia del citocromo P450

Il citocromo P450 (CYP) rappresenta la più grande superfamiglia di enzimi coinvolti nel metabolismo ossidativo di composti lipofili, inclusi gli steroidi, gli acidi grassi, gli acidi biliari e le sostanze chimiche esogene come i farmaci e altri xenobiotici (Xie *et al.*, 2000; Goodwin *et al.*, 2002; Pascucci *et al.*, 2003; Akiyama e Gonzalez, 2003).

Questo enzima contiene un gruppo eme, il cui atomo di ferro può esistere in forma ossidata (Fe^{3+}) o ridotta (Fe^{2+}) ed il suo nome deriva dall'iniziale osservazione che, quando complessato in forma

ridotta con CO, esso presenta un massimo picco di assorbimento della luce a 450 nm: **Pigmento** che assorbe a **450 nm** (Danielson, 2002).

Da un punto di vista enzimatico il CYP è una monoossigenasi a funzione mista, poiché catalizza principalmente la seguente reazione generale di ossidazione:



nella quale una molecola di ossigeno viene divisa nei 2 atomi, di cui uno è incorporato nel substrato (S), mentre l'altro è

ridotto ad acqua. Il citocromo P450 può catalizzare tale reazione solo in coppia con un'altra proteina intrinseca, la NADPH- citocromo P450

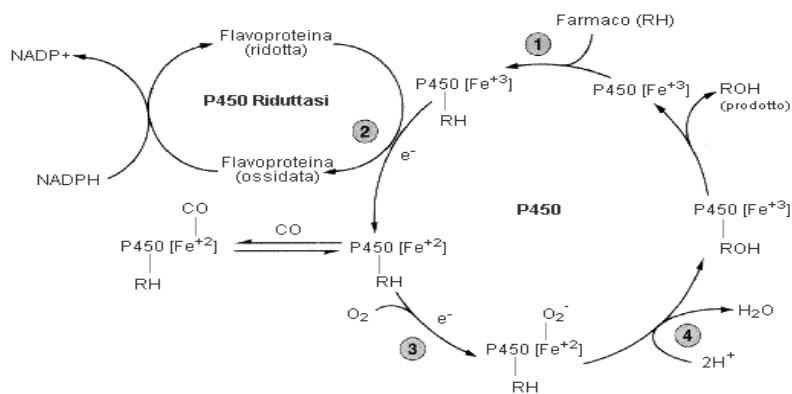


Figura 2: Ciclo catalitico del citocromo P450 (Palatini, 2010).

riduttasi, che funge da veicolo di elettroni dal NADPH al citocromo.

Per quanto il CYP sia in grado di ossidare un elevato numero di sostanze, le tipologie di reazioni ossidative che esso può catalizzare sono alquanto limitate (ad es. idrossilazione aromatica, epossidazione di doppio legame, deidrogenazione). In tutti i casi si forma un intermedio di reazione in cui l'ossigeno è legato al substrato, ma il prodotto finale può non contenere l'ossigeno; infatti, perché il ciclo catalitico del CYP (figura 2) si completi la presenza di ossigeno non è necessaria (Palatini, 2010).

La superfamiglia del CYP, per convenzione, viene suddivisa in famiglie formate dalle isoforme con sequenze aminoacidiche identiche per più del 40%, e sottofamiglie composte da isoforme con sequenze identiche per più del 55%.

Secondo la nomenclatura ufficiale ogni isoforma viene identificata con:

- la sigla CYP che sta ad indicare le parole **CY**tochrome **P**450;
- un numero che indica la famiglia di appartenenza (CYP3);
- una lettera per definire la sottofamiglia (CYP3A);
- e un ulteriore numero per designare la specifica isoforma (CYP3A4).

Questi enzimi sono capaci di metabolizzare un numero enorme di xenobiotici, in quanto hanno una specificità di substrato molto ampia, sono cioè in grado di agire su composti con la più diversa struttura ed inoltre alcuni di loro posseggono una certa specificità nei riguardi dei gruppi funzionali (Willson e Kliever, 2002). Altre caratteristiche comuni di questi enzimi sono la preferenza, seppur non assoluta, per molecole lipofile e l'inducibilità, ovvero l'organismo risponde all'esposizione a xenobiotici incrementando la sintesi degli enzimi che li metabolizzano (Bickel, 1988).

Con l'eccezione degli eritrociti e delle cellule muscolari striate, il CYP è presente in tutti i tipi di cellule dei vertebrati (compreso il sistema nervoso centrale), dove è localizzato nei mitocondri o nel reticolo endoplasmatico liscio, una rete di canalicoli presente nella maggior parte delle cellule. Gli enzimi sono inseriti nel doppio strato fosfolipidico che costituisce la parete di questi canalicoli, con il sito attivo rivolto verso l'interno o l'esterno (Neve e Ingelman-Sundberg, 2010). Questi enzimi sono detti anche microsomiali, perché, quando si preparano le varie frazioni subcellulari, il reticolo endoplasmatico liscio si spezza in vari frammenti che si risigillano formando piccole vescicole dette microsomi (piccoli corpi). Enzimi metabolizzanti sono pure presenti nella frazione solubile del citoplasma e, in minor quantità, nei lisosomi, mitocondri, perossisomi e membrana nucleare (Palatini, 2010). L'organo più ricco di enzimi metabolizzanti è il fegato poiché esso riceve tutto il sangue refluo dell'area splancnica, che porta con sé le sostanze assorbite dai cibi, maggior fonte di xenobiotici per l'organismo. In realtà anche altri organi e tessuti contengono gli enzimi metabolizzanti ma solo due concorrono in maniera significativa al metabolismo sistemico e pre-sistemico e sono rispettivamente fegato e mucosa intestinale (Akiyama e Gonzalez, 2003). A livello degli altri organi l'attività metabolica ha un significato prettamente locale, determinando l'inattivazione dei farmaci o la formazione di metaboliti reattivi (Palatini, 2010).

I citocromi P450 maggiormente coinvolti nel metabolismo degli xenobiotici appartengono alla famiglie 1, 2 e 3 (Dvorak *et al.*, 2003) e la loro composizione cambia, qualitativamente e quantitativamente, da individuo ad individuo; in particolare le proporzioni in cui i vari CYP sono presenti nel fegato e nella mucosa intestinale possono variare per fattori genetici e/o ambientali da individuo ad individuo.

Classificazione delle reazioni metaboliche

Il metabolismo dei farmaci, come quello degli altri xenobiotici, è un processo bifasico (figura 3) costituito da una reazione di funzionalizzazione detta Fase I e una reazione di coniugazione o Fase II (Goodwin *et al.*, 2002; Brandon *et al.*, 2006).

Generalmente, entrambe queste reazioni aumentano l'idrosolubilità delle molecole, favorendone l'escrezione; più precisamente nella Fase I possiamo avere processi di ossidazione, idrolisi e riduzione (introduzione od esposizione di un gruppo funzionale come -OH, -NH₂, -SH, -COOH) mentre nella Fase II avviene una reazione di coniugazione con acidi (glucuronico, solforico, acetico) o aminoacidi (Palatini, 2010).

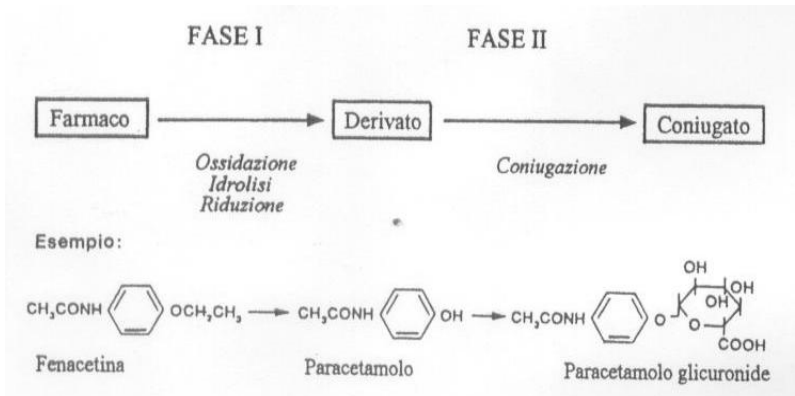


Figura 3: Le due fasi del metabolismo dei farmaci (Palatini, 2010).

Le reazioni di ossidazione e riduzione vengono distinte in microsomiali e non microsomiali, a seconda che l'enzima catalizzatore sia localizzato, o meno, nel reticolo endoplasmatico liscio (Nebbia, 2009).

La superfamiglia del CYP è il più ampio ed importante gruppo di enzimi di fase I e le sottofamiglie CYP3A, CYP2D e CYP2C sono responsabili, rispettivamente, del 50, 25 e 20% della biotrasformazione di tutti i farmaci (Wrighton e Stevens, 1992).

Gli enzimi maggiormente coinvolti nelle reazioni di fase II sono l'UDP-glucuroniltransferasi (UGT), la sulfotransferasi (SULT), l'N-acetiltransferasi (NAT) e il glutatione-S-transferasi (GST); questi enzimi catalizzano rispettivamente reazioni di coniugazione con gli acidi glucuronico, solforico e acetico, con aminoacidi e glutatione (Brandon *et al.*, 2006). Il meccanismo della reazione di ossidazione catalizzata dal CYP è illustrato in

figura 4.

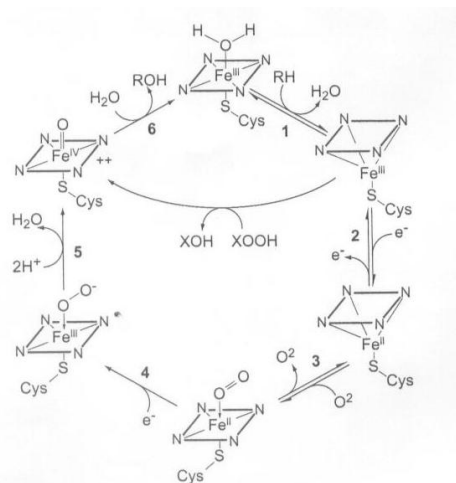


Figura 4: La reazione di ossidazione (Palatini, 2010).

Induzione enzimatica

L'induzione enzimatica è l'incremento dei livelli di alcuni enzimi che metabolizzano gli xenobiotici, in particolare quelli del CYP, a seguito dell'esposizione dell'organismo a certi composti tra cui farmaci, sostanze assunte con la dieta, inquinanti ambientali

Questo fenomeno porta ad un aumento della velocità di biotrasformazione delle sostanze metabolizzate dagli enzimi indotti.

Perché si verifichi un'induzione è necessaria un'esposizione continua all'induttore; inoltre, salvo poche eccezioni, l'induzione enzimatica è il risultato dell'attivazione della trascrizione e del conseguente aumento dell'espressione dei geni che codificano per gli enzimi metabolizzanti (Palatini, 2010). L'aumento della trascrizione è il risultato dell'attivazione di certi fattori di trascrizione appartenenti alla superfamiglia dei recettori intracellulari (recettori che mediano l'induzione di enzimi che metabolizzano sia xenobiotici che endobiotici).

Alcuni di questi recettori sono stati identificati molti anni fa, altri sono stati scoperti più recentemente, come per esempio pregnane X receptor (PXR) e constitutive androstane receptor (CAR) (Dvorak *et al.*, 2003).

La superfamiglia dei recettori nucleari (NRs)

I membri della superfamiglia dei recettori nucleari come i recettori per la vitamina D, i recettori per gli ormoni steroidei e i recettori orfani giocano un ruolo importante in quasi tutti gli aspetti dello sviluppo e la fisiologia dell'adulto; inoltre, sono modulari nella struttura e mostrano comuni domini (Akiyama e Gonzalez, 2003).

Il ruolo dei recettori nucleari consiste nel modulare l'espressione degli enzimi biotrasformativi (DMEs) e l'espressione di alcuni trasportatori; questi ultimi sono proteine di trasporto trans-membranarie che controllano l'assorbimento e l'escrezione di molti farmaci e loro metaboliti; ne sono un esempio i trasportatori ATP *binding cassette* (ABC) come la P-glicoproteina (PgP: Akiyama e Gonzalez, 2003; Martin *et al.*, 2010)

Essi sono in grado di svolgere la loro azione a seguito di legami con ligandi specifici (Akiyama e Gonzalez, 2003): questo legame porta ad un cambiamento conformazionale nel recettore, che facilita l'interazione con un coattivatore che a sua volta modula l'espressione del gene *target* (Pascussi *et al.*, 2003).

Più precisamente il processo complessivo di stimolazione della trascrizione avviene in 5 fasi, generalmente nella seguente sequenza:

1. Legame ligando-recettore, modificazione conformazionale con conseguente dissociazione del recettore da proteine accessorie; Traslocazione del complesso recettore-ligando nel nucleo;
2. Dimerizzazione per associazione con un altro fattore di trascrizione (nella quasi totalità dei casi con il *Retinoid X Receptor* (RXR α , recettore dell'acido 9-cis-retinoico);
3. Legame dell'eterodimero ad una o più regioni della sequenza regolatrice del DNA, dette "response elements" (XRE: *Xenobiotic Response Element*);
4. Reclutamento di altri fattori di trascrizione e di RNA polimerasi per formare un complesso di trascrizione.

I recettori nucleari contengono tre domini (Akiyama e Gonzalez, 2003): uno che agisce con il ligando attivatore (dominio C-terminale di legame al ligando: LBD), uno che interagisce con ligandi proteici (altri fattori di trascrizione, coattivatori) e uno che lega il DNA (dominio N-terminale di legame al DNA: DBD).

Questa superfamiglia è formata da tre sottoclassi (Pascussi *et al.*, 2003):

- classe I: i recettori nucleari di questa classe sono recettori per gli ormoni steroidei come il progesterone, androgeni, mineralcorticoidi, estrogeni e glucocorticoidi. In assenza di un ligando questi recettori sono associati con delle proteine chiamate Heat Shock proteins (HSPs);
- classe II: a questa classe appartengono i recettori per gli ormoni tiroidei e vitamina D3. Questi recettori sono presenti nel nucleo come eterodimeri con RXR sui promotori del gene target, in assenza di ligando;
- classe III: comprende i recettori orfani.

I recettori orfani sono così chiamati poiché all'inizio i loro ligandi non erano conosciuti e ad oggi su di loro ci sono note solo poche informazioni (Pascussi *et al.*, 2003). Questi recettori sono i principali responsabili del fenomeno dell'induzione, tre di questi in particolare sono anche detti xenosensori (Palatini, 2010) poiché stimolano la sintesi degli enzimi farmaco-metabolizzanti e sono: AhR (**aryl hydrocarbon receptor**), CAR e PXR.

Il recettore **AhR** viene attivato soprattutto dagli idrocarburi aromatici policiclici ossia composti che si formano per combustione incompleta di varie sostanze organiche, si trovano nel fumo dei prodotti del tabacco e in varie combustioni industriali; altri induttori di questo recettore sono gli idrocarburi aromatici alogenati tra cui la diossina. L'attivazione di questo recettore porta un incremento della sintesi dei citocromi CYP1A1 e CYP1A2.

Il recettore nucleare **CAR** deve invece il suo nome all'osservazione che i metaboliti del testosterone, androstano e androstenolo, inibiscono l'espressione genica da parte di questo recettore costitutivamente attivo. Esso è chiamato "costitutive" per la sua capacità di transattivare i "response elements" dell'acido retinoico (RAREs) e altri response elements in assenza di ligando.

CAR è maggiormente espresso nel fegato e intestino e i suoi attivatori sono il fenobarbitale (PB), altri barbiturici e varie sostanze industriali di struttura simile al PB e non, media l'induzione del CYP2B6, CYP3A4 e CYP2C9. Agisce in maniera diversa rispetto agli altri recettori, in quanto un passaggio chiave nella sua attivazione trascrizionale è la sua traslocazione nucleare; purtroppo però il meccanismo molecolare che sta alla base di questa traslocazione non è ancora del tutto chiaro (Pascussi *et al.*, 2003).

Varie sostanze che attivano CAR sono anche in grado di attivare PXR (ad esempio: il fenobarbitale), per cui risulta spesso difficile accertare se l'induzione sia specificamente dovuta ad uno dei due recettori o ad entrambi. Fortunatamente ci sono molti ligandi di PXR che non si legano a CAR come il desametazone (DEX), il pregnenolone-16 α -carbonitrile (PCN) e la rifampicina (Willson e Kliewer, 2002).

Il recettore nucleare **PXR** è stato identificato per la prima volta nel 1997 a partire da un frammento (recettore nucleare di topo) trovato presso il *Washington University Mouse Expressed Sequence Tag (EST) Database*; ed il suo nome è stato scelto in base all'osservazione che elevate concentrazioni di pregnano (steroidi con 21 atomi di carbonio) attiva questo recettore (Goodwin *et al.*, 2002; Willson e Kliewer, 2002).

Esso viene attivato da un gran numero di xenobiotici con struttura diversa; il suo attivatore prototipo è la rifampicina (antibiotico della classe dei macrolidi) ma generalmente lega anche il mifepristone (RU486), il clotrimazolo, gli ormoni steroidei e metaboliti come il progesterone, gli estrogeni, il corticosterone (Pascussi *et al.*, 2003). Viene prevalentemente espresso nel fegato, ma anche nello stomaco, piccolo intestino, colon e rene. Un simile profilo di espressione viene

osservato anche per il suo ortologo umano (SXR: *steroid and xenobiotic receptor*) con l'eccezione di stomaco e rene dove appunto SXR non è espresso (Goodwin *et al.*, 2002; Akiyama e Gonzalez, 2003).

PXR stimola l'attività di enzimi che giocano un ruolo importante nella detossificazione e nel metabolismo dei farmaci (Kliewer *et al.*, 2002); esiste infatti una stretta correlazione tra la distribuzione di PXR in un tessuto e l'espressione dei componenti della famiglia del citocromo 3A (Akiyama e Gonzalez, 2003).

Nell'uomo, PXR controlla l'induzione, xenobiotico-mediata del CYP3A4, CYP3A7, CYP2B6 e più recentemente si è visto anche di CYP2C8 e CYP2C9 (Pascussi *et al.*, 2003).

Molti sono gli studi effettuati sull'attivazione di PXR da parte del glucocorticoide desametasone (DEX): questo composto, infatti, è un potente induttore del CYP3A nei roditori e un moderato induttore nell'uomo. Più precisamente, DEX risulta essere un ligando di PXR solo se presente in concentrazioni superiori a 10 μ M (CYP3A aumenta in risposta ad elevate concentrazioni di DEX); una cinetica simile si può osservare con concentrazioni micromolari di rifampicina (Pascussi *et al.*, 2003; Martin *et al.*, 2010).

Un'interessante caratteristica di CAR e PXR è che entrambi mostrano una specificità di ligando specie-dipendente dovuta alle divergenze nei domini LBD tra le diverse specie.

Sempre secondo Pascussi (Pascussi *et al.*, 2003) esistono delle differenze di specie nella risposta dei CYPs e dei recettori nucleari ai vari xenobiotici; inoltre, c'è la possibilità che all'induzione dei geni CYP2s e CYP3A partecipi anche il recettore per i glucocorticoidi.

Il recettore dei glucocorticoidi (GR) è presente in quasi tutti i tipi di tessuto (Van der Laan e Meijer, 2008) e l'espressione di molti geni è regolata da GR nel suo stato attivo (Zanchi *et al.*, 2010).

Nelle colture di epatociti umani il GR appare costitutivamente espresso e i suoi livelli non dipendono dai glucocorticoidi e da altri xenobiotici; in queste colture inoltre, i glucocorticoidi (desametasone, idrocortisone, prednisolone) incrementano i livelli di espressione di CAR e PXR e loro proteine portando all'induzione, xenobiotico-mediata, delle isoforme CYP2B6, CYP2C8/9 e CYP3A4. Questo effetto viene probabilmente mediato attraverso la diretta attivazione trascrizionale di questi geni da parte del GR (Pascussi *et al.*, 2003).

Ci sono almeno tre distinti meccanismi di trascrizione attraverso i quali il GR controlla l'espressione dei CYPs (Dvorak e Pavek, 2010) e sono:

1. legame diretto del GR ad una specifica sequenza, localizzata nella regione promotoriale del gene, chiamata glucocorticoid responsive element (GRE);
2. legame indiretto del GR (non c'è un contatto diretto tra GR e il DNA promotore);
3. una sovra o sotto-regolazione di altri regolatori trascrizionali o recettori nucleari.

Altro recettore, appartenente sempre alla superfamiglia dei recettori nucleari, è il **retinoid X receptor (RXR)** il quale, insieme ad un altro recettore il retinoic acid receptor (RAR) media gli effetti dell'acido retinoico (RA), composto fondamentale per molti processi fisiologici.

Il retinoid X receptor, come accennato in precedenza, può formare dimeri con altri recettori nucleari come CAR e PXR (Pascussi *et al.*, 2001; Kliewer *et al.*, 2002; Dvorak e Pavek, 2010). Questi eterodimeri, in presenza di retinoidi, si legano ai RA response elements nel promotore dei geni target attivandone o bloccandone la trascrizione.

Famiglie del Citocromo P450 maggiormente coinvolte nel metabolismo degli xenobiotici

Le sottofamiglie analizzate in questo studio sono la CYP2 e CYP3.

La famiglia **CYP2** è composta da una serie di sottofamiglie (CYP2A, 2B, 2C, 2D e 2E) ma solo alcune isoforme sono espresse in maniera rilevante a livello epatico. In particolare nel fegato di ratto sono stati identificati il CYP2A1 e il CYP2A2, i quali riconoscono come substrati gli steroidi endogeni; nel fegato umano invece è particolarmente espresso il CYP2A6. Quest'ultimo è responsabile della reazione di ossidazione della nicotina e della bioattivazione di aflatossina B1 e nitrosamine (pre-cancerogeni).

Nell'uomo poi è stata identificata un'unica isoforma della sottofamiglia CYP2B: il CYP2B6. Questa, espressa a bassi livelli nel fegato, è responsabile per l'8% del metabolismo dei farmaci (Fahmi *et al.*, 2010). Un ruolo maggiore viene invece ricoperto dalla sottofamiglia CYP2C, la quale è responsabile del metabolismo di circa il 20% degli agenti terapeutici clinicamente prescritti (Ferguson *et al.*, 2005). Questa sottofamiglia nell'uomo è composta da almeno 4 distinti geni chiamati CYP2C8, CYP2C9, CYP2C18 e CYP2C19; essa costituisce circa il 30-40% del contenuto

epatico di CYP; l'isoforma maggiormente espressa è il CYP2C9, mentre la meno espressa è il CYP2C19. Queste due isoforme più il CYP2B6 sono indotte da rifampicina e da altri classici induttori del CYP3A4 (Fahmi *et al.*, 2010). Altro CYP importante nella biotrasformazione degli xenobiotici nell'uomo è il CYP2D6; anche questo è poco espresso a livello epatico ma risulta responsabile per circa il 30% del metabolismo dei farmaci. Si è visto che l'espressione di tutti questi geni è regolata sia da PXR che da CAR (Akiyama e Gonzalez, 2003).

Nella famiglia **CYP3** sono stati invece identificati 40 membri; in particolare, nell'uomo il maggiore CYP espresso a livello epatico e nel piccolo intestino è il CYP3A4 (Fahmi *et al.*, 2010). Esso è coinvolto nel metabolismo di circa il 60% dei farmaci ed è spesso coinvolto nelle interazioni tra farmaci. I maggiori substrati endogeni di questo isoenzima sono gli steroidi. Nel ratto i geni CYP3A, soprattutto l'isoforma CYP3A23, vengono indotti da molti composti, inclusi gli steroidi come il PCN, il DEX, il betametasone, l'idrocortisone ed il mifepristone (Goodwin *et al.*, 2002). Anche l'induzione del gene CYP3A4 nell'uomo è ben documentata; in particolare, l'induttore più importante dell'espressione di questo gene, sia *in vivo* che *in vitro*, è la rifampicina. Interessante è il fatto che sebbene i geni CYP3A4 e CYP3A6 nel ratto siano fortemente indotti da rifampicina, l'espressione di CYP3A23 non è sufficientemente attivata da questo farmaco. PCN, invece, è un efficiente attivatore dell'espressione di CYP3A nei ratti e topi ma non nell'uomo (Martin *et al.*, 2010). Due maggiori forme di CYP3A sono espresse nei tessuti di uomo adulto e sono: il CYP3A4 e il CYP3A5; quest'ultimo è polimorficamente espresso nel fegato e altri organi (Lin *et al.*, 2002; Burk e Wojnowski, 2004). Studi specifici hanno rivelato che alcuni composti (ma non tutti) induttori di CYP3A sono anche attivatori del gene CYP2B (Honkakoski e Negishi, 1997). La versatilità metabolica di CYP3A e CYP2B accompagnata alla loro inducibilità da xenobiotici costituisce le basi molecolari per lo studio clinico delle interazioni tra farmaci (Xie *et al.*, 2000).

Le caratteristiche più importanti delle principali isoforme di CYP coinvolte nel metabolismo di xenobiotici sono riassunte nella seguente tabella:

Citocromo P450	Ubicazione principale	Costitutivo/Inducibile	Esempi di sostanze metabolizzate	
			Farmaci	Procarcinogeni
CYP1A1	Vari tessuti	Inducibile	-	Idrocarburi policiclici aromatici
CYP1A2	Fegato	Costitutivo	Caffeina Lidocaina	Aflatossina B ₁ Amine aromatiche ed eterocicliche Nitrosamine
CYP2C9	Fegato Intestino	Costitutivo	FANS vari	-
CYP2C19	Fegato	Costitutivo	Omeprazolo	-
CYP2D6	Fegato	Costitutivo	Antidepressivi Antipsicotici Antiarritmici B-bloccanti	Nitrosamine
CYP2E1	Fegato Rene	Costitutivo	Paracetamolo	Etanolo Idrocarburi alogenati e non, a basso peso molecolare
CYP3A4	Fegato intestino	Costitutivo	Ciclosporina Eritromicina	Aflatossina B ₁ Idrocarburi policiclici aromatici Alcaloidi

Tabella 3: Caratteristiche delle principali isoforme CYPs metabolizzanti xenobiotici (Palatini, 2010).

La composizione dei CYP responsabili del metabolismo degli xenobiotici differisce da individuo a individuo, sia quantitativamente che qualitativamente, dato che non tutti sono sempre presenti inoltre, come si può ben notare anche dalla tabella 3, mostrano una diversa specificità di substrato. Infine, i CYP possono essere costitutivi o inducibili; si definiscono costitutivi quando sono comunque presenti mentre inducibili se sono presenti solo dopo induzione (la loro sintesi viene incrementata da un induttore). Comunque è bene sottolineare che un CYP costitutivo può essere anche inducibile.

ESPRESSIONE DEL CITOCROMO P450 NELLA SPECIE SUINO

Il suino è considerato un buon modello di studio di molte patologie ed è il migliore donatore di organi e tessuti utilizzati negli xenotrapianti; in particolare gli epatociti vengono ben impiegati per la costruzione di dispositivi bioartificiali importanti per tutti quei pazienti in attesa di trapianto (Donato *et al.*, 1999). In realtà è solo da pochi anni che la ricerca sta focalizzando la sua attenzione nello studio dell'espressione del CYP (Swindle e Smith, 1998).

In particolare, studi svolti in ambito farmacologico e tossicologico hanno portato a risultati analoghi tra la specie suina ed umana dimostrando che nel fegato di suino i principali CYP coinvolti nella biotrasformazione sono espressi con attività paragonabili a quelle umane (Soucek *et al.*, 2001; Skaanild, 2006).

Quindi a fronte dei sempre più frequenti trattamenti farmacologici impiegati in allevamento e dell'esposizione degli animali a contaminanti agricoli e industriali è importante approfondire anche in campo veterinario le conoscenze sulle capacità metaboliche degli animali utilizzati a scopo zootecnico (Nebbia, 2009).

Nonostante questa specie sia appunto un ottimo modello sperimentale le informazioni riguardanti l'espressione e le proprietà del CYP scarseggiano (Monshouwer *et al.*, 1998).

Qui di seguito sono riportate alcune caratteristiche delle principali sottofamiglie del CYP presenti in questa specie.

Nel suino l'enzima più studiato della **sottofamiglia CYP1A** è il CYP1A1 il quale ricopre un importante ruolo nel metabolismo di molte sostanze tossiche e farmaci; in particolare studi condotti su fegato di suino hanno permesso di misurare la specifica attività dell'enzima CYP1A1 attraverso l'azione enzimatica dell'*etossi-resorufina O-dealchilasi* (EROD) mostrando risultati simili a quelli ottenuti in uomo e topo (Nakajima *et al.*, 1990; Nishibe e Hirata, 1993).

L'attività del CYP1A nel suino è risultata inoltre inducibile dagli stessi induttori degli ortologi umani e di roditori; nello specifico, studi *in vitro* su colture primarie di epatociti di suino hanno indicato la capacità dell'omeoprazolo di indurre il CYP1A1, seppur con una minore efficacia rispetto all'uomo (Lu e Li, 2001).

Nella **sottofamiglia 2B** il CYP2B2 risulta essere l'unica isoforma finora identificata nel suino.

Per studiare l'espressione di questo enzima alcuni studi misurano la dealchilazione della 7-pentossiresorufina (PROD) mostrando risultati del valore della PROD nel suino simili a quelli riportati per l'uomo; valori che aumentano seppur di poco a seguito del trattamento con fenobarbitale, un potente induttore del CYP2B6 umano (Desille *et al.*, 1999).

Come nell'uomo, anche nel suino sono state identificate diverse isoforme della **sottofamiglia 2C**. Dato che nell'uomo la specificità catalitica di queste isoforme varia molto, risulta difficile indicare un'attività selettiva per le corrispondenti isoforme del suino. Recentemente a tal proposito è stato effettuato uno studio (Puccinelli *et al.*, 2010) sull'espressione e l'inducibilità dei CYP2C33, 2C42 e 2C49, insieme a CYP2B22, 3A22, 3A29 e 3A46; tutte queste isoforme sono state analizzate a livello pre-trascrizionale e di attività catalitica nel fegato e in altri organi come rene, duodeno, mucosa nasale respiratoria e mucosa nasale olfattiva di suini di controllo e trattati con fenobarbitale. I risultati di questo lavoro hanno dimostrato come la somministrazione di fenobarbitale nel suino induce almeno nel fegato (in aggiunta al CYP2B22 ed ai CYP3A) l'espressione dei CYP2C33, CYP2C42 e CYP2C49 a livello trascrizionale e di attività, così come è riportato nel fegato umano attraverso un meccanismo regolatorio che coinvolge PXR, CAR e HNF4.

Sempre in questo studio si è visto che le attività catalitiche ed i profili di inibizione dei CYP2C di suino sono diversi fra loro e rispetto all'uomo introducendo alcuni dubbi sull'utilizzo del suino come modello per l'uomo in studi con farmaci che siano substrati e/o induttori dei CYP2C.

Nel suino sono state identificate quattro isoforme della **sottofamiglia 3A**: 3A22, 3A29, 3A39 e 3A46. Le attività CYP-dipendenti sono indotte, come visto anche negli epatociti umani, dalla rifampicina, dal fenobarbitale ma non dal desametasone (Skaanild, 2006).

2. SCOPO DALLA TESI

Le colture primarie di epatociti rappresentano uno dei più validi ed utilizzati metodi alternativi *in vitro* per lo *screening* di molecole neosintetizzate, per lo studio del metabolismo biotrasformativo nonché per la valutazione degli effetti tossici degli xenobiotici. E' tuttavia noto come gli epatociti primari in coltura perdano progressivamente le loro caratteristiche intrinseche ed in particolare come vi sia una progressiva diminuzione sia del livello di trascritto sia del contenuto di proteina totale del CYP, il complesso enzimatico maggiormente coinvolto nel metabolismo biotrasformativo degli endo- e xenobiotici.

Scopo pertanto della prima parte di questa tesi è stato quello di valutare gli effetti del tempo di coltura sull'espressione genica degli enzimi biotrasformativi CYP2B2, CYP2C e CYP3A, e dei recettori nucleari CAR, PXR, RXR α e GR α in epatociti crioconservati di suino. La caratterizzazione del *time-course* degli enzimi deputati al metabolismo risulta infatti importante per l'uso previsto della coltura. L'approccio utilizzato in questo studio risulta essere innovativo in quanto in letteratura scarseggiano le informazioni concernenti l'espressione genica negli epatociti di suino crioconservati: ad oggi infatti gli studi in questo campo si sono concentrati sulla valutazione dell'espressione proteica o del metabolismo biotrasformativo (attività catalitiche specifiche).

Infine, nella seconda parte di questa tesi sono state effettuate delle prove per la messa a punto di un protocollo affidabile per l'isolamento a fresco di colture primarie di epatociti di bovino, allo scopo di permettere l'utilizzo di lobi epatici prelevati da vitelloni all'atto della macellazione e non da animali sacrificati *in situ*.

3. MATERIALI E METODI

PARTE PRIMA: Valutazione degli effetti del tempo di coltura sull'espressione degli enzimi farmaco-metabolizzanti e dei recettori nucleari in epatociti crioconservati di suino.

Epatociti crioconservati

Per la prima parte della sperimentazione sono stati usati epatociti di suino crioconservati gentilmente forniti dall'equipe del prof. Muraca del Dipartimento di Medicina di Laboratorio, IRCCS, Ospedale Bambino Gesù, Roma, Italia.

Gli epatociti erano contenuti in sacche da 100 mL circa protetti da scatole di acciaio e mantenuti in azoto liquido.

Per questo studio sono state utilizzate 5 sacche. Nella seguente tabella (n. 4) sono riportati per ciascuna sacca il numero di lotto, la data di produzione e di spedizione.

N° sacca	N° lotto	Data produzione	Data spedizione	Utilizzo
Valutazioni preliminary	99025	23/11/1999	01/11/2000	Confronto estrazione RNA <i>TRIZOL</i> [®] vs <i>Kit</i> , determinazione numerosità cellule per l'estrazione, messa a punto dei test di citotossicità
1	99025	23/11/1999	01/11/2000	1 [^] coltura
2	99016	14/09/1999	25/01/2000	2 [^] coltura
3	99025	23/11/1999	01/11/2000	3 [^] coltura
4	99025	23/11/1999	01/11/2000	4 [^] coltura

Tabella 4: Sacche di epatociti crioconservati utilizzate: informazioni e note.

Le sacche sono state scongelate una per volta, con intervalli di tempo di una settimana l'una dall'altra. La prima sacca, indicata come "Valutazioni preliminari", è stata utilizzata per definire il protocollo di estrazione dell'RNA (*TRIZOL*[®] reagent vs *Kit* commerciale in colonnina), la numerosità delle cellule da utilizzarsi nel corso dell'esperimento successivo, nonché la messa a punto dei test di citotossicità, mentre le altre sacche sono state usate per lo svolgimento della prova sperimentale vera e propria, la quale è stata ripetuta 4 volte.

Preparazione del terreno di coltura

Reattivi

- *Williams medium E* (Sigma Chemical Co., St.Louis, MO, USA)
- NaHCO₃ (Sigma Chemical Co., St.Louis, MO, USA)
- penicillina G (Sigma Chemical Co., St.Louis, MO, USA)
- streptomina solfato (Sigma Chemical Co., St.Louis, MO, USA)
- siero fetale bovino (Sigma Chemical Co., St.Louis, MO, USA)
- CaCl₂ 2H₂O (Sigma Chemical Co., St.Louis, MO, USA)
- MgCl₂ 6H₂O (Sigma Chemical Co., St.Louis, MO, USA)
- insulina umana isofano (Eli Lilly S.p.A., Sesto Fiorentino, FI, Italia)
- glutamina (Sigma Chemical Co., St.Louis, MO, USA)
- glucagone (Sigma Chemical Co., St.Louis, MO, USA)

Composizione del terreno *Williams' E* 1X completo:

Reagente	Concentrazione delle soluzioni madre	Quantità/1Lt
<i>Williams'E</i>	1X	Terreno liofilizzato per 1 Lt
NaHCO ₃	8.4%	26.6 mL
Penicillina/streptomina	6.329% / 1%	10 mL
Siero fetale bovino (FCS)	<i>tal quale</i>	100 mL
CaCl ₂	0.5 M	1 mL
MgCl ₂	0.5 M	1 mL
Insulina	100 U/mL	1.6 mL
Glutamina	200 mM	5 mL
Glucagone	140 µg/mL	100 µL

Tabella 5: *Composizione Williams'E completo*

Preparazione: sciogliere il terreno liofilizzato in 854.7 mL di acqua milliQ; aggiungere NaHCO₃, CaCl₂ e MgCl₂ secondo le quantità indicate in tabella 5; ossigenare per 10 min con carbogeno (95% O₂ e 5% CO₂) e scaldare in bagnetto termostato (37°C); portare a pH 7.4; filtrare con caraffa da 0.22µm (Millipore, Massachusetts, USA) e conservare a +4°C.

Il giorno stesso della coltura aggiungere al terreno le soluzioni di penicillina/streptomina, FCS, insulina, glucagone e glutamina secondo le quantità indicate in tabella 5.

Preparazione delle piastre Petri

Reattivi

- Collagene tipo I, *from rat tail* - 1 mg/mL (Sigma Chemical Co. St.Louis, MO, USA)
Preparazione: sciogliere il collagene nel volume di acqua richiesto e aggiungere 24 µL di HCl 4N ogni 5 mL di soluzione per aumentarne la solubilità; sterilizzare con filtri 0.22 µm e conservare a +4°C
- HCl 4N
- RPMI 1640 *medium* (Sigma Chemical Co. St.Louis, MO, USA)
- Terreno *Hanks*

Composizione:

Reagente	Molarità (mM)	Quantità in g /1Lt	Ditta produttrice
KCl	5.4	0.4	Tutti i reagenti sono stati forniti da Sigma Chemical Co. St.Louis, MO, USA
KH ₂ PO ₄	0.44	0.06	
NaCl	0.14	8	
NaHCO ₃	4	0.35	
Na ₂ HPO ₄	0.34	0.09	
MgSO ₄	---	0.1	

Tabella 6: *Composizione terreno Hanks.*

Preparazione: sciogliere le polveri in acqua milliQ; bubbolare per 10 min; scaldare alla temperatura d'uso (37°C) utilizzando un bagnetto termostato; portare a pH 7.2-7.3; portare a volume con acqua milliQ; filtrare con caraffa da 0.22µm (Millipore, Massachusetts, USA) e conservare a +4°C.

Procedimento:

- Aliquotare in ciascuna piastra Petri 150 µL di collagene e stendere con uno *scraper* per colture cellulari
- Riporre con cura le piastre nei loro sacchetti, al buio e conservarle a T° ambiente
- La mattina della coltura idratare le piastre con 4 mL di *Hanks* completo
- Attendere 20 min e aspirare il terreno con una pompa a vuoto
- Aggiungere 4 mL di RPMI 1640 *medium*
- Al momento del piastramento delle cellule aspirare il terreno.

Scongellamento delle sacche di epatociti

Procedimento:

- Rimuovere le sacche dal contenitore di azoto liquido
- Tenere a T° ambiente per 1-3 min
- Mettere le sacche in bagnetto termostato a 37°C per circa 2 min
- Una volta scongelato completamente, sterilizzare la superficie con alcool 70%
- Preparare 10 tubi Falcon da 50 mL e versare in ciascuno 40 mL di terreno completo *Williams'E*
- Versare il contenuto della sacca in un beacker ed aliquotare in ciascun tubo 10 mL di sospensione cellulare
- Centrifugare a 60xg, T° ambiente per 3 min quindi eliminare il surnatante
- Aggiungere circa 15 mL di terreno completo in ciascun tubo Falcon e risospendere il *pellet*
- Riunire il contenuto dei tubi in un beacker e porre in agitazione su un agitatore magnetico
- Prelevare un'aliquota necessaria per la conta cellulare.

Conta delle cellule

Per determinare il numero di cellule vive presente in una sospensione cellulare si utilizza il *Trypan blue dye exclusion test*.

Il *trypan blue* è un colorante, che se aggiunto ad una sospensione cellulare, è in grado di attraversare le membrane cellulari. Al microscopio a luce visibile le cellule danneggiate, la cui integrità è stata modificata in modo significativo, si presentano con un colore blu. Le cellule vitali, invece, riescono ad escludere la molecola e appaiono con citoplasma chiaro.

Reattivi:

- Soluzione di *Trypan Blue* (*Sigma Chemical Co. - St.Louis, MO, USA*)
- Soluzione fisiologica (NaCl al 9% in H₂O milliQ)

Procedimento:

- In un microtubo da 1.5 mL porre 200 µL di sospensione cellulare, 500 µL di *Trypan Blue* e 300 µL di soluzione fisiologica
- Mescolare bene, quindi prelevare 20 µL e posizionarli in un reticolo di *Bürker* per la conta
- Contare le cellule in almeno tre quadranti quindi applicare le seguenti formule:

Media cellule vive = Somma cellule vive dei 3 quadranti / 3

Media cellule morte = Somma cellule morte dei 3 quadranti / 3

Totale cellule: Media delle cellule vive + Media delle cellule morte

% VITALITÀ: (Media delle cellule vive / Totale cellule) x 100

Numero cellule per mL: Media cellule vive x 10⁴ x il fattore di diluizione (in questo caso è 5)

Piastramento

Per la prima prova sono state utilizzate sia piastre *multi-well* P6 sia piastre Petri.

Procedimento:

- Diluire la sospensione cellulare con *Williams'E* completo per ottenere una densità cellulare finale pari a 1.0×10^6 cellule/ml
- Aliquotare 2.5 mL (piastre P6) o 9 mL (piastre Petri) di sospensione cellulare (totale 2.5×10^6 cellule/pozzetto in piastre P6 o 9.0×10^6 cellule/piastra Petri)
- Porre le piastre in incubatore a 37°C e 5% di CO₂ e agitarle ogni 30 min per favorire l'adesione delle cellule in maniera omogenea su tutta la superficie della piastra
- Dopo 4 ore aspirare il terreno con pompa a vuoto, effettuare un lavaggio con tampone fosfato 0.1 M (pH 7.4) per eliminare le cellule che non hanno aderito al monostrato, aspirare ed aggiungere nuovo terreno *Williams'E*
- Cambiare il terreno ogni 24 ore fino all'arresto della coltura

Le altre quattro colture sono state invece allestite in piastre Petri; è stata utilizzata una sospensione cellulare con una densità pari a 1.5×10^6 cellule/ml e sono stati pertanto aliquotati in ciascuna piastra 6 mL di sospensione (totale 9.0×10^6 cellule/piastra).

Arresto della coltura

Valutazioni preliminari

Per quanto riguarda le cellule utilizzate per la prova comparativa di estrazione, si è provveduto all'arresto della coltura a 48 ore. Per ciascuno dei due metodi di estrazione, sono state raccolte le cellule piastrate in 1, 2, 3, 4, 5, 6 pozzetti (piastre P6) ed in una piastra Petri, corrispondenti rispettivamente a 2.5, 5.0, 7.5, 10.0, 12.5, 15.0 e 9×10^6 cellule totali.

Raccolta e stoccaggio dei campioni della prova:

- Aspirare il terreno
- Aggiungere 1 mL/pozzetto o 2 mL/piastra Petri di tampone fosfato 0.1 M (pH 7.4)
- Usando uno *scraper* per colture cellulari, staccare bene il monostrato cellulare
- Raccogliere la sospensione e trasferirla in tubi Falcon da 15 mL
- Effettuare un ulteriore lavaggio con i volumi sopra indicati per recuperare le cellule rimaste e trasferire nel tubo Falcon corrispondente
- Centrifugare a 413xg per 3 min a T° ambiente
- Eliminare il surnatante
- Risospendere il *pellet* in 1 mL di *TRIZOL*[®] reagent oppure in *Buffer RLT* (reattivo presente nel kit commerciale) secondo la seguente tabella 7:

Numero di cellule pellettate	Volume di Buffer RLT (μ L)
$< 5 \times 10^6$	350
$5 \times 10^6 - 1 \times 10^7$	600

Tabella 7: Concentrazione cellulare e corrispettivo volume di Buffer RLT.

- Stoccare i campioni a -80°C.

Prova sperimentale

Per le colture successive (1, 2, 3, 4) si è provveduto all'arresto della coltura ai seguenti tempi:

- Tempo 4h (arresto dopo 4 ore di coltura)
- Tempo 24h (arresto dopo 24 ore di coltura)
- Tempo 48h (arresto dopo 48 ore di coltura)
- Tempo 72h (arresto dopo 72 ore di coltura)
- Tempo 96h (arresto dopo 96 ore di coltura)
- Tempo 10 gg (arresto dopo 10 giorni di coltura, esclusivamente per le colture 1 e 2)

Raccolta e stoccaggio dei campioni ai diversi tempi di coltura:

- Aspirare il terreno da ciascuna piastra
- Aggiungere 2mL/piastra di tampone fosfato 0.1 M (pH7.4)
- Usando uno *scraper* per colture cellulari, staccare bene il monostrato cellulare
- Raccogliere i 2 mL di sospensione e metterli in microtubi RNAsi *free* da 2mL
- Centrifugare a 212xg per 3 min a T° ambiente
- Eliminare il surnatante e risospendere il *pellet* in 1 mL di *TRIzol*[®] *reagent*
- Stoccare a -80°C

Per l'arresto della coltura alle 4 ore si è proceduto come sopra, con l'unica eccezione che è stato eseguito un ulteriore lavaggio per rimuovere le cellule morte non adese al monostrato.

Test di citotossicità: MTT

E' un test colorimetrico che permette di stimare il numero di cellule vive presenti in coltura.

Il test si basa sulla capacità del composto MTT (sale di tetrazolio, *3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide*) di venire metabolizzato da un enzima mitocondriale, la succinato deidrogenasi. La riduzione dell'MTT porta alla formazione di cristalli di un prodotto blu, il formazano, insolubile in acqua. Le cellule vitali, a differenza di quelle non vitali, riducono l'MTT. La quantità di formazano prodotto è proporzionale al numero di cellule presenti. I cristalli che si formano vengono solubilizzati e i valori di assorbanza rilevati mediante lettura al lettore di micropiastre a 570 nm.

Soluzioni

- MTT - *Thiazolyl blue* (Sigma Chemical Co. - St.Louis, MO, USA): 25 mg in 5 mL di tampone fosfato 50 mM pH 7.3 (5 mg/mL)
- Isopropanolo acido: 0.9 mL di HCl 36% in 254.6 mL di isopropanolo (J.T. Baker, Mallinckrodt, Olanda)

Procedimento:

- Aspirare il terreno con pompa a vuoto
- Effettuare un lavaggio con tampone fosfato 0.1 M pH 7.4
- Aggiungere terreno di coltura e MTT secondo le quantità indicate in tabella 8:

Tipologia di piastra	Volume terreno (μL)	MTT (μL)	Volume totale (μL)
P96	130	20	150
P24	650	100	750
P12	975	150	1125

Tabella 8: Volumi terreno e MTT (μL/well).

- Risospendere con micropipetta
- Incubare 4 ore a 37°C e 5%CO₂
- Aspirare il terreno con pompa da vuoto (per la P96 aspirare con una pipetta)
- Aggiungere 200 μL di isopropanolo acido
- Incubare 20 min a 37°C e 5%CO₂
- Risospendere vigorosamente con pipetta per solubilizzare al meglio i cristalli di formazano
- Per le piastre P12 e P24 trasferire il contenuto di ciascun pozzetto in una piastra P96
- Leggere al lettore di micropiastre P96 a 570 nm e 650 nm (*REFERENCE*).

Test di citotossicità: incorporazione del Neutral Red

Questo test permette un'analisi della vitalità cellulare in base alla capacità delle cellule di trattenere il colorante all'interno dei lisosomi. Più le cellule sono colorate, più sono vitali.

Il *Neutral Red* (NR) è un colorante debolmente cationico che può rapidamente penetrare nelle cellule per diffusione non ionica, accumulandosi nei lisosomi dove si lega a siti anionici della matrice. Perturbazioni alla membrana cellulare o lisosomiale determinano fragilità dell'apparato lisosomiale e variazioni gradualmente irreversibili. In base alla diminuita captazione e legame del NR si può distinguere tra cellule vitali, danneggiate o morte.

Reattivi

- Soluzione di NR (*3-Amino-7-dimethylamino-2-methyl-phenazine hydrochloride* 50 µg/mL in terreno di coltura; conservare a 37°C *overnight*; centrifugare per 8 min a 3090xg per precipitare i residui non solubilizzati
- Soluzione fissante il NR: contiene aldeide formica al 4% e cloruro di calcio all'1% in H₂O.
Preparazione: sciogliere 0.5 g di CaCl₂ in acqua, aggiungere 5 mL di formalina 37% e portare ad un volume finale di 50 mL con acqua bidistillata.
- Soluzione rivelatrice del NR: contiene acido acetico glaciale all'1% ed etanolo assoluto al 50% in acqua.
Preparazione: aggiungere a 25 mL di etanolo assoluto 0.5 mL di acido acetico glaciale e portare ad un volume finale di 50 mL con acqua bidistillata.

Procedimento:

- Eliminare il terreno di coltura con pipetta
- Aggiungere 150 µL di soluzione di NR in ciascun pozzetto ed incubare per 3 ore a 37°C con 5% CO₂
- Centrifugare per 3 min a 1157xg ed eliminare il NR prima con pipetta e poi tamponando con carta assorbente
- Aggiungere 150 µL di soluzione fissante e risospendere vigorosamente le cellule
- Centrifugare per 3 min a 1157xg ed eliminare la soluzione prima con pipetta e poi con carta assorbente
- Aggiungere 150 µL di soluzione rivelatrice e risospendere energicamente le cellule

- Attendere 15-20 min a T° ambiente
- Trasferire in P96 a fondo piatto
- Leggere con il lettore di micropiastra a 540 nm e 650 nm (*REFERENCE*).

Estrazione dell'RNA

Questa fase è molto importante in quanto il suo risultato condiziona anche la buona riuscita delle fasi successive. È necessario cercare di ottenere del materiale integro, non contaminato e rappresentativo del reale *pattern in vivo* dei geni presenti nel campione, utilizzando le maggiori precauzioni possibili poiché durante l'estrazione l'RNA può venire facilmente degradato. Un ruolo chiave nella degradazione dell'RNA viene svolto dagli enzimi tissutali (*RNasi*) presenti nel campione stesso o sulla superficie delle mani dell'operatore; è consigliato pertanto l'utilizzo di guanti puliti con *RNase-Zap* (reagente che blocca le *RNasi*) e materiale *RNasi* e *DNase-free* (es. microtubi).

Per capire quale fosse il metodo ottimale per l'estrazione dell'RNA da epatociti, sono state messe a confronto due diverse metodiche di estrazione: un kit commerciale in colonnina (*RNeasy Mini Kit*, Qiagen, Germania) ed un protocollo sperimentale (*TRIzol*[®] reagent, Invitrogen, Milano, Italia).

Estrazione RNA mediante l'utilizzo di RNeasy Mini Kit (Qiagen)

Reattivi

- *Buffer RLT*
- *Buffer RW1*
- *Buffer RPE*
- *RNase-free water*

Procedimento:

- Scongellare in ghiaccio i campioni
- Vortexare per 1 min
- Aggiungere al campione un volume di etanolo 70% pari al volume di *buffer RLT* utilizzato per la fase di stoccaggio (350 μ L o 600 μ L) quindi rimescolare con pipetta
- Prelevare il contenuto di ciascun microtubo e trasferirlo su di una colonnina
- Centrifugare per 15 sec a 8000xg
- Eliminare il liquido di scarto presente nel microtubo
- Aggiungere alla colonnina 700 μ L di *Buffer RW1*

- Centrifugare per 15 sec a 8000xg
- Eliminare il liquido di scarto presente nel microtubo
- Trasferire la colonnina su un nuovo tubo collettore
- Aggiungere in ciascuna colonnina 500 µL di *Buffer* RPE
- Centrifugare per 15 sec a 8000xg
- Eliminare il liquido di scarto presente nel microtubo
- Aggiungere in ciascuna colonnina altri 500 µL di *Buffer* RPE
- Centrifugare per 2 min a 8000xg
- Trasferire la colonnina su un nuovo microtubo da 1.5 mL
- Aggiungere 50 µL di acqua *RNeasy-free*
- Centrifugare per 1 min a 8000xg
- Ripetere l'eluizione aggiungendo altri 50 µL di acqua *RNeasy-free*
- Centrifugare per 1 min a 8000xg
- Conservare l'eluato a -80°C

Estrazione RNA mediante l'utilizzo di TRIzol®reagent (Invitrogen)

Reattivi

- *TRIzol®reagent*: fenolo acido guanidina tiocianato (Invitrogen, Milano, Italia)
- Cloroformio, Isopropanolo ed Etanolo 70-75% (J.T. Baker, Mallinckrodt, Olanda)
- Acqua DEPC: acqua deionizzata trattata con dietilpirocarbonato e filtrata con membrana dalla porosità di 0.22 µm (AppliChem, Milano, Italia)

Procedimento:

- Scongellare i campioni in ghiaccio
- Risospendere bene il *pellet* nel *TRIzol®reagent*; vortexare se il *pellet* non si disgrega a sufficienza
- Incubare 5 min in ghiaccio
- Aggiungere 200 µL di cloroformio e agitare vigorosamente per inversione almeno 15 sec quindi incubare 5 min a T° ambiente.
- Centrifugare a 12000xg per 15 min a 4°C
- Trasferire la fase acquosa in un nuovo microtubo da 1.5 mL

- Aggiungere un ugual volume di isopropanolo, agitare per inversione ed incubare per 10 min a T° ambiente
- Centrifugare a 12000xg per 15 min a 4°C
- Eliminare il surnatante utilizzando una pompa a vuoto
- Riprendere il *pellet* in 1 mL di etanolo al 70-75% e vortexare fintanto che il *pellet* non si stacca dal fondo
- Centrifugare a 7500xg per 5 min a 4°C
- Eliminare il surnatante utilizzando una pompa a vuoto e lasciar asciugare il *pellet* all'aria
- Dissolvere il *pellet* in 250 µl di acqua DEPC ed attendere fino a completo scioglimento in ghiaccio e vortexare
- Aggiungere 2 volumi di etanolo assoluto (500 µL) e 1/10 di volume di Acetato di sodio 3 M pH 5.2 e mescolare
- Lasciar precipitare per 30 min a -20°C
- Centrifugare a 12000xg per 15 min a 4°C
- Eliminare il surnatante con pompa a vuoto
- Far seccare il *pellet* all'aria, al di sotto di una cappa aspirante
- Dissolvere l'RNA in acqua DEPC utilizzando un volume di 100 µL
- Conservare il campione a -80°C

Valutazione quantitativa e qualitativa dell'estratto – Lettura allo spettrofotometro NanoDrop

Per la quantificazione dell'RNA estratto abbiamo usato il *NanoDrop ND-1000* (*NanoDrop Technologies, Wilmington, UK*), uno strumento in grado di misurare tramite i raggi UV-Vis la quantità di RNA presente nel campione (con questo strumento si possono quantificare anche le proteine, DNA e cDNA). Questo metodo di quantificazione risulta assai semplice e preciso e per le quantità di campione usate nella lettura (1-2 μ l) anche molto pratico e conveniente oltre che veloce; inoltre riesce a ridurre le variazioni e le contaminazioni in quanto il campione bagna direttamente il sistema ottico; infatti per questo strumento non servono cuvette come per gli altri spettrofotometri e l'unico supporto è costituito da una punta di piramide dove viene adagiata la gocciolina di campione. Questo spettrofotometro in un'unica determinazione fornisce i dati di assorbanza nello spettro compreso tra i 220 e i 700 nm fornendoci così informazioni utili relative all'integrità dell'RNA o alla presenza di contaminanti chimici. In particolare, gli acidi nucleici assorbono alla lunghezza d'onda di 260 nm (determinazione della concentrazione di RNA estratto). Per la verifica della purezza dell'RNA estratto si deve invece calcolare sia il rapporto delle assorbanze ottenute a 260 nm e 280 nm ($A_{260}/280$: dà indicazioni sulla presenza di proteine), sia il rapporto delle assorbanze a 260 nm e 230 nm ($A_{260}/230$: dà indicazioni sulla presenza di sostanze interferenti quali carboidrati, sali, fenoli, peptidi e composti aromatici). Un RNA di buona qualità dovrebbe essere caratterizzato da un rapporto $A_{260}/280$ e $A_{260}/230$ compreso tra 1.8 e 2. L'unico svantaggio della quantificazione mediante NanoDrop è che lo strumento non è in grado di discriminare tra RNA e DNA genomico, poiché entrambi assorbono a 260 nm; quindi per valutare l'eventuale contaminazione dell'estratto da parte di DNA genomico, è importante confrontare i risultati con quelli ottenuti con l'elettroforesi in gel di agarosio.

Procedimento:

- Caricare sul sistema ottico 1.5 μ L di acqua DEPC per settare il sistema
- Pulire bene il sistema ottico con della carta assorbente quindi caricare 1.5 μ L di acqua DEPC e settare il bianco
- Pulire con della carta il sistema ottico, caricare 1.5 μ L del campione ed effettuare la misurazione

Valutazione qualitativa dell'estratto – Elettroforesi in gel di agarosio

Reattivi

- Agarosio (Sigma Chemical Co. - St.Louis, MO, USA)
- TAE 1X: 40mM TRIS-acetato e 1mM EDTA a pH 8 (Invitrogen, Milano, Italia)
- SYBR[®] Safe (Invitrogen, Milano, Italia)
- SSCP o *loading-dye* costituito da 0.1% di blu di bromofenolo, 0.1% di *xilene ciano*lo FF, formaldeide 98% ed EDTA 10 mM-pH 8 (Sigma Chemical Co. - St.Louis, MO, USA)
- *Ladder* 1000 bp (Invitrogen, Milano, Italia)

Preparazione gel di agarosio 1%:

- Sciogliere 1 g di agarosio in 100 mL di TAE 1X mediante l'utilizzo del forno a microonde
- Aggiungere SYBR[®] Safe 10000X (1 μ L ogni 10 mL di gel)
- Versare il gel di agarosio nella celletta, inserire il pettine e far solidificare
- Sfilare il pettine e porre il gel nella cameretta elettroforetica *RunOneTM Electrophoresis Cell* (Embi Tec, California)
- Immergere completamente il gel in TAE 1X.

Preparazione dei campioni per l'elettroforesi su gel:

- Diluire il campione di RNA con acqua DEPC per ottenere una concentrazione pari a 200 ng/ μ L
- In un microtubo aliquotare 1 μ L di denaturante SSCP 6X e 5 μ L di RNA diluito
- Denaturare i campioni ponendoli in un termoblocco a 70°C per 5 min e poi in ghiaccio per altri 5 min
- Caricare i campioni su gel e sottoporli ad elettroforesi a 100 V per 20 min
- Dopo la corsa, esaminare il gel mediante l'utilizzo del transilluminatore *Molecular Imager[®] GelDocTM XR System* (Bio-Rad Laboratories, Inc.).

Se l'RNA estratto è integro si dovranno vedere, dopo la corsa elettroforetica, tre bande corrispondenti alle componenti dell'RNA ribosomiale: 28S, 18S e 5S; in particolare la banda 28S deve mostrare un'intensità pari al doppio della banda 18S mentre la banda 5S deve essere poco o

per nulla evidente. Inoltre un buon RNA integro non dovrebbe presentare *smear*, ossia piccole bande intermedie indice di degradazione.

Infine è bene far migrare sul gel anche un marcatore di peso molecolare noto per poter valutare le dimensioni dei frammenti di RNA dei campioni caricati. In questo lavoro come marcatore è stato usato un *Ladder* 1000 bp.

Trascrizione inversa (RT)

La sintesi del cDNA a partire dall'RNA estratto avviene grazie all'uso di un particolare enzima definito trascrittasi inversa. Tale enzima comincia la sintesi di DNA a partire da un innesco, che può essere costituito da random esameri, oligo(dT) o primer specifici. In particolare gli oligo(dT) sono complementari alla coda di Poli(A) presente all'estremità 3' della maggior parte degli mRNA eucariotici, si legano ad essa all'estremità 3' dell'mRNA favorendo l'inizio della sintesi di DNA, utilizzando l'mRNA come stampo (Weaver, 2008).

Dopo che l'mRNA è stato copiato, si ha come prodotto un DNA a singolo filamento, l'mRNA viene quindi parzialmente degradato dall'enzima ribonucleasi H (RNasi H). Questo enzima degrada il filamento di RNA appaiato al primo filamento di cDNA; infine, i frammenti rimasti servono da innesco per la sintesi del secondo filamento utilizzando il primo come stampo. Il risultato finale è un cDNA a doppio filamento (Weaver, 2008).

Per la reazione è stato usato il *kit High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit* (Applied Biosystems, Foster City, California, USA); questo è in grado di convertire in cDNA un massimo di 2 µg di RNA totale in un volume di reazione di 20 µL.

Componenti del kit:

- 10X RT *Buffer*
- 10X RT *Random Primers*
- 25X dNTP Mix (100mM)
- *MultiScribe™ Reverse Transcriptase* 50 U/µL

Procedimento:

- Diluire il campione di RNA con acqua DEPC per ottenere una concentrazione pari a 200 ng/µL
- Lasciare scongelare i componenti del kit in ghiaccio

- Preparare la mix di reazione 2X secondo le quantità indicate in tabella 9 e mescolare:

N° reazione	Volume (μL) per 1 reazione
10X RT <i>Buffer</i>	2.0
25X dNTP Mix (100mM)	0.8
10X RT <i>Random Primers</i>	2.0
H ₂ O <i>Nuclease Free</i>	4.2
<i>MultiScribe</i> TM <i>Reverse Transcriptase</i>	1.0
Totale	10.0 μL

Tabella 9: Componenti Master Mix 2X RT.

- Preparare la *mix* per il controllo negativo RT *minus* (RT-) aggiungendo tutte le componenti del kit ad eccezione dell'enzima, al posto del quale viene aggiunta acqua nucleare-*free*. In questo controllo metteremo l'RNA di un campione; come risultato non dovremmo ottenere alcuna sintesi di cDNA poiché nella mix manca appunto l'enzima *MultiScribe*TM *Reverse Transcriptase*.
- Aliquotare 10 μL di mix in ciascun pozzetto della piastra P48
- Aliquotare 10 μL di RNA in ciascun pozzetto e mescolare bene con pipetta
- Chiudere la piastra con film adesivo e centrifugare a 542xg per 1 min.
- Tenere in ghiaccio fino al suo caricamento nel termociclatore (*Biometra*, Milano)
- Utilizzare il seguente protocollo termico (vedi tabella 10):

	Step 1	Step 2	Step 3	Step 4
Temperatura ($^{\circ}\text{C}$)	25	37	85	4
Tempo	10 min	120 min	5 sec	∞

Tabella 10: Protocollo termico.

Scelta dei geni target e housekeeping

I geni *target* sono stati scelti sulla base della loro funzione a livello cellulare e alle informazioni pubblicate in letteratura sul loro coinvolgimento nel metabolismo dei farmaci.

Nella tabella seguente (n. 11) sono riportati i geni *target* scelti:

Gene	Nome
CYP2B22	Citocromo P450 2B22
CYP2C	Citocromo P450 2C
CYP3A	Citocromo P450 3°
CAR	<i>Constitutive androstan receptor</i>
PXR	<i>Pregnane X Receptor</i>
RXR α	<i>Retinoid X Receptor</i> isoforma α
GR α	<i>Glucocorticoid Receptor</i> isoforma α

Tabella 11: *Geni target.*

Per la normalizzazione dei dati di *Real Time PCR* abbiamo scelto di utilizzare i seguenti tre geni *housekeeping* (tabella 12), sulla base delle informazioni riportate in letteratura:

Gene	Nome
ACTB	β -actina
GAPDH	Gliceraldeide 3-fosfato deidrogenasi
18S	Unità ribosomiale 18S

Tabella 12: *Geni reference.*

I geni *reference* sopra indicati corrispondono a quelli più usati e citati in letteratura; qui di seguito sono elencate le loro principali caratteristiche.

β -actina (ACTB): Questo gene è importante perché nell'uomo codifica per una delle sei diverse actine conosciute; le actine sono proteine altamente conservate coinvolte nella motilità, struttura ed integrità cellulare. La beta actina in particolare è il costituente principale dell'apparato contrattile e una delle due actine citoscheletriche non muscolari.

Gliceraldeide 3-Fosfato Deidrogenasi (GAPDH) è uno degli enzimi chiave coinvolti nella glicolisi; esso catalizza la fosforilazione ossidativa della gliceraldeide 3-fosfato. Il gene GAPDH è costitutivamente e stabilmente espresso ad elevati livelli in quasi tutti i tessuti e cellule, per questo viene considerato ed usato come gene *housekeeping*.

L'RNA 18S rappresenta negli eucarioti la componente essenziale contenuta nella subunità ribosomiale minore. Esso viene spesso utilizzato come gene *housekeeping* in quanto viene costantemente trascritto in tutti i tipi di cellule e tessuti (Radonić *et al.*, 2003); inoltre per la sua stabilità viene maggiormente utilizzato, come gene *reference*, per la normalizzazione nelle analisi comparative dei livelli di espressione dell'mRNA nei linfociti T umani (Bas *et al.*, 2004).

Analisi bioinformatica

Per la ricerca di informazioni relative ai geni coinvolti nel metabolismo epatico e nella sua regolazione abbiamo utilizzato diverse risorse bioinformatiche.

Per ogni gene oggetto di studio abbiamo effettuato una ricerca bibliografica nel sito del NCBI (Centro Nazionale per l'Informazione Biologica: <http://ncbi.nlm.nih.gov/>) che contiene un'ampia quantità di informazioni biologiche, compresi dati genomici e proteomici. In particolare di questo sito abbiamo usato principalmente due motori di ricerca:

- *Pubmed* con il quale abbiamo cercato per ogni gene informazioni sulle pubblicazioni relative
- *Nucleotide, Gene e Protein* per la ricerca di sequenze genomiche, dei trascritti e delle proteine.

Altro sito da noi utilizzato è stato *Ensembl Genome Browser* (<http://ensembl.org/index.html>), il quale consente la ricerca delle caratteristiche della sequenza stessa (i.e., struttura esone-introne) e la sua posizione cromosomica.

Oltre a questo, il sito *USCS Genome Browser* permette di effettuare un altro tipo di analisi: il *Blat*, ossia una ricerca di omologia tra una sequenza immessa ed il genoma di organismi noti e completamente sequenziati. Questa applicazione permette inoltre di verificare la presenza di splicing alternativi, isoforme geniche, polimorfismi ed avere informazioni sulla struttura tridimensionale della proteina codificata.

Per ottenere informazioni più precise sulla struttura del gene abbiamo preso in considerazione anche le corrispondenti sequenze della specie umana, in quanto rappresenta una delle specie più studiate e per questo motivo ci sono molte informazioni disponibili.

Per capire quale regione e/o quale sequenza considerare per disegnare il saggio, abbiamo inizialmente raccolto tutte le sequenze disponibili nelle banche dati e successivamente confrontate mediante l'utilizzo del programma di allineamento Multalin (<http://toulouse.inra.fr/multalin/multalin>); questo sito permette di visualizzare le identità, la similarità o le differenze tra le sequenze inserite in modo da poter scegliere quella più idonea per proseguire con l'analisi. In particolare per i geni CYP2C e CYP3A, per i quali nel suino sono disponibili diverse sequenze corrispondenti ad altrettante isoforme differenti, si è proceduto con l'allineamento delle sequenze disponibili in modo tale da individuare le regioni altamente conservate e permettere quindi il disegno di saggi sottofamiglia-specifici e non isoforma-specifici.

Scelta dei primers

I *primers* sono stati progettati per tutti i geni *target* e *housekeeping* grazie al software messo a disposizione dalla Roche (<http://www.roche-applied-science.com>).

Questo effettua autonomamente l'“*intron spanning*” per le specie a genoma noto (uomo e specie da laboratorio), ma permette anche di inserire manualmente le giunzioni “esone-esone”.

Per il disegno dei *primer* da utilizzarsi in *Real Time* PCR ci si è basati sulle seguenti linee guida:

- Almeno un *primer* della coppia dovrebbe essere disegnato su una giunzione esone-introne (la giunzione per essere in posizione ottimale dovrebbe essere compresa tra la metà e la quartultima base in 3’);
- Se i *primer* sono disegnati su esoni diversi l'introne è bene che sia maggiore di 1Kb;
- I *primer* devono possibilmente avere una lunghezza compresa tra le 18 e 22 basi;
- Nella scelta si devono scartare le sequenze palindromiche o complementari, sia presenti all'interno della stesso *primer* che tra i due *primer* di una coppia (*primer* senso: *Forward* e antisenso: *Reverse*);
- La temperatura di *Melting* (T_m) deve essere compresa tra i 52° e i 58°C e la differenza in T_m tra i due *primer* della coppia non deve essere mai maggiore a 5°C (si accetta una differenza al massimo di 2°C);
- La temperatura di *annealing* deve essere di 2-3 gradi inferiore alla T_m ;
- Il contenuto percentuale delle basi azotate GC (*GC-content*) di ciascun *primer* dovrebbe essere contenuto in un *range* del 40-60%;
- Il numero di GC nelle ultime 5 basi in 3’ per ciascun *primer* dovrebbe essere al massimo di 3G o 3C presenti nelle ultime 5 basi (meglio se l'ultima base è una G);
- Se è possibile è bene evitare le ripetizioni di singole basi o combinazioni di singole basi nella sequenza dei *primer*;
- La struttura primaria di ciascun *primer* deve essere tale da evitare appaiamenti intramolecolari per ridurre il più possibile la formazione di strutture a forcina (*hairpin*) e di dimeri tra i *primer* di ciascuna coppia.

I *primers* ottenuti sono stati quindi controllati tramite *Blastn* (presente sempre nel sito del NCBI) per verificare la corrispondenza degli oligonucleotidi e dell'amplicone con la sequenza scelta.

Una volta individuate una o più coppie di *primer* ottimali, sono stati effettuati altri controlli utilizzando il *software OligoAnalyzer*. Questo programma ha permesso di valutare per ciascun *primer* l'eventuale presenza di strutture secondarie (*hairpin*) o di omo-dimeri e etero-dimeri tra i *primer* della stessa coppia. In particolare per le *hairpin* si accettano valori di ΔG° (energia libera di Gibbs) $\geq -2 / -3$ kcal/mol, per gli omo- e gli etero-dimeri sono tollerati valori di $\Delta G \geq -5 / -6$ kcal/mol quando l'appaiamento riguarda l'estremità 3' mentre valori più negativi e fino a -10 kcal/mol sono accettabili quando la regione di appaiamento è interna.

Real-time RT-PCR

L'introduzione della *real-time* RT-PCR nel 1993 ha permesso di superare una serie di limiti legati alla tradizionale PCR quali scarsa precisione, bassa sensibilità e risoluzione. A differenza della *end-point* PCR, che permette di analizzare il prodotto solo al termine della reazione, la *real-time* RT-PCR consente infatti di seguire la reazione in tempo reale fin dalle prime fasi dell'amplificazione determinando, ad ogni ciclo, la quantità di amplificato ottenuto, grazie all'utilizzo di un marcatore (*reporter*) fluorescente. In particolare misura l'amplificazione durante la fase esponenziale della PCR, fase meno influenzata dalle variabili di reazione.

Dal grafico "fluorescenza vs numero del ciclo", che riporta il segnale del *reporter*, si possono distinguere quattro fasi principali: fase di crescita lineare (solitamente corrisponde ai primi 10-15 cicli) in cui il segnale è troppo debole per poter essere distinto dal rumore di fondo (*background*), fase esponenziale iniziale in cui la fluorescenza ha raggiunto la soglia ed è diventata significativamente più alta del livello di *background*, fase logaritmica in cui l'amplificazione diviene ottimale (la cinetica di reazione assume un andamento esponenziale nel quale, assumendo un'efficienza di reazione del 100%, ad ogni ciclo la quantità di amplificato raddoppia) e infine fase di *plateau*, raggiunta quando i reagenti iniziano a scarseggiare e l'intensità di fluorescenza non è più considerata per il calcolo dei dati (Wong e Medrano, 2005).

Per poter monitorare l'amplificazione in tempo reale si possono usare sonde fluorescenti (esempio sonde *Taqman*: sonde ad idrolisi, che si legano specificamente ad una sequenza di DNA) oppure specifici coloranti del DNA. In particolare in questo lavoro è stato utilizzato il *SYBR[®]Green*, un intercalante aspecifico del DNA che non possiede fluorescenza se libero in soluzione ma che emette un segnale fluorescente solo se legato al DNA a doppio filamento. Lo svantaggio dell'utilizzo di tale fluorocromo è dato dal fatto che emette un segnale fluorescente anche quando si lega a doppie eliche di *primer* (dimeri di *primer*) o a prodotti di amplificazione aspecifici. Quindi per distinguere eventuali interferenti ci si basa sull'analisi della curva di *Melting* del DNA che consiste nell'aumentare gradualmente la temperatura e, in funzione di essa, si misura il decremento di fluorescenza emessa dal fluoroforo; nel momento in cui viene raggiunta la temperatura di denaturazione dello specifico frammento di DNA (T_m) il doppio filamento si apre e il colorante si separa da esso con l'immediata caduta dell'immissione di fluorescenza; nella curva di *Melting* si registrerà un picco in corrispondenza di questa temperatura. Con questo metodo si

può osservare immediatamente la presenza di aspecifici rappresentati da un secondo picco (poiché ogni sequenza di DNA ha una T_m peculiare).

Il protocollo termico *standard* utilizzato è suddiviso nelle seguenti fasi:

- Attivazione dell'AmpliTaQ Gold Polimerase: 95°C per 10 min
 - Denaturazione: 95°C per 15 sec
 - Appaiamento e polimerizzazione: 60°C per 60 sec
- } Queste due fasi vengono
} ripetute per 40 cicli

Per normalizzare la fluorescenza del *SYBR[®]Green* viene solitamente utilizzato il ROX, un fluoroforo di riferimento interno, o *passive reference*.

Lo strumento per la *real-time* RT-PCR qui utilizzato è un termociclatore (*Agilent Technologies Stratagene MX3000P*) dotato di una sorgente luminosa (lampada al tungsteno o laser) che emette radiazioni elettromagnetiche, selezionate da filtri: quando il raggio incontra il campione eccita le molecole di fluoroforo, le quali emetteranno fluorescenza; l'intensità della fluorescenza verrà successivamente misurata dal rivelatore e trasmessa al computer per l'analisi dei dati. Il *software* (*Stratagen MXPro QPCR*) è successivamente in grado di elaborare per ogni reazione un grafico che descrive la cinetica di amplificazione e l'intensità della fluorescenza di ciascun campione a ogni ciclo. Come risultato si ottiene un aumento della fluorescenza man mano che procedono i cicli e che corrisponde all'aumento delle copie di DNA prodotte. Il vantaggio di utilizzare questa metodica al posto della PCR classica è senz'altro rappresentato dal fatto che si ottengono risultati più precisi, ma soprattutto quantitativi (quantificazione del DNA al ciclo *threshold* - C_t). Nel dettaglio il C_t indica il ciclo in corrispondenza del quale la curva di amplificazione del campione interseca la *threshold*, ossia la soglia di fluorescenza generalmente pari a dieci volte la deviazione standard della fluorescenza registrata nei primi cicli di amplificazione. Il valore di C_t è inversamente proporzionale alla quantità di DNA di partenza per cui più elevato è il titolo iniziale di DNA, prima salirà la curva e più basso sarà il C_t (Kubista *et al.*, 2006).

Allestimento della miscela di reazione

Reagenti

- *SYBR®Green PCR Master Mix*: contiene *Dimethyl Sulfoxide Glycerin Tris-HCl Sodium Azide* (Applied Biosystems, Foster City, California, USA)
- *Primer Forward e Reverse* di ciascun saggio
- Acqua DEPC

Procedimento:

- Allestire la miscela di reazione (volume finale 10 μ L) come segue:

Reagenti	Volume (μ L)
SYBR Green PCR Master Mix 2X	5.0
Combinazione primer F e R diluiti in acqua*	2.5
cDNA	2.5

Tabella 13: *Composizione miscela di reazione. * Primers diluiti in acqua a partire da madri 10 μ M per ottenere le concentrazioni finali dell'ordine del nM, messe a punto per ogni gene (300F-300R o 900F-300R o 300F-900R o 900F-900R).*

Messa a punto dei saggi

La messa a punto dei saggi di Real time PCR ha previsto le seguenti fasi successive: prova di funzionalità dei primer e verifica della specificità, scelta della diluizione di cDNA da utilizzare, scelta della combinazione dei primer, curva degli standard.

1. Prova di funzionalità dei primer

Per testare la funzionalità dei primer abbiamo preparato un *pool* di cDNA di tutti i campioni retrotrascritti, poi successivamente diluito 1:100 e 1:75. Inoltre come controllo negativo è stato preparato un *pool* di RT *minus*.

E' stata quindi effettuata l'amplificazione del pool di cDNA e del pool RT- utilizzando tutte le coppie di primer a disposizione ed utilizzando una concentrazione finale pari a 300-300 nM (primer F e R, rispettivamente).

2. Verifica specificità dei saggi

Per verificare l'esatta amplificazione della regione di interesse (lunghezza attesa dell'amplicone) e l'assenza di ampliconi aspecifici, sono state eseguite un'elettroforesi su gel di agarosio al 2% e l'analisi delle curve di melting per ciascun saggio considerato.

Reattivi

- Agarosio
- TAE 1X
- *SYBR[®] Safe*
- *Loading dye* composto da: glicerolo 60%, EDTA 60mM, acqua e blu di bromofenolo
- *Ladder 50 bp*

Procedimento:

- Preparare il gel di agarosio al 2% in TAE 1X
- Sotto cappa chimica al buio aggiungere al gel 1 μ L di *SYBR[®] Safe* ogni 10 mL di gel
- Colare il gel nella vaschettina e una volta solidificato porlo nella cameretta elettroforetica completamente immerso in TAE 1X
- Preparare i campioni: in un microtubo aliquotare 1.8 μ L di *Loading dye* e 5 μ L di prodotto di PCR ottenuto in *Real Time* RT-PCR
- Caricare i campioni su gel e sottoporli ad elettroforesi a 120 V per 75 min; caricare anche un marcatore di peso molecolare (50 Kb)
- Dopo la corsa visualizzare il gel al transilluminatore *Molecular Imager[®] GelDocTM XR System* (Bio-Rad Laboratories, Inc.)
- Confrontare la lunghezza delle bande ottenute rispetto a quella attesa.

3. Definizione della concentrazione ottimale dei primer

Per tutti i geni in studio sono state messe a punto le concentrazioni dei primers F e R che permettessero di ottenere la maggior efficienza di reazione possibile.

Per fare questo, sono state preparate delle combinazioni di primer a partire da madri 10 μ M per ottenere delle concentrazioni finali nella miscela di reazione pari a 300 nM o 600 nM. Sono pertanto state testate per ciascun gene le seguenti combinazioni: 300F-300R, 600F-300R, 300F-600R, 600F-600R.

L'amplificazione è stata effettuata in duplicato per ciascuna combinazione utilizzando il pool di cDNA alla concentrazione finale di 1:100.

E' stata scelta la combinazione di primers ottimale sulla base dell'analisi delle curve di amplificazione: plateau della curva di amplificazione più elevato e C_t più basso.

4. Costruzione delle curve *standard*

Le curve standard sono importanti per valutare l'efficienza dell'amplificazione e servono a correlare linearmente il C_t e la quantità iniziale di cDNA presente nel campione in analisi (Wong e Medrano, 2005).

Per tutti i saggi sono state costruite delle curve standard utilizzando la combinazione di primer ottimale e diluizioni seriali con fattore 5 a partire da una concentrazione 1:30 del pool di cDNA. Ogni diluizione è stata amplificata in triplicato. Nella tabella seguente (n. 14) sono riportate le diluizioni utilizzate per l'analisi:

Diluizioni seriali
1:30
1:150
1:750
1:3750
1:18750
1:93750
1:468750

Tabella 14: *Elenco diluizioni seriali usate.*

La curva standard è stata costruita riportando in ordinata la media dei C_t per ciascun triplicato ed in ascissa il logaritmo in base 10 delle diluizioni. Per tutti i saggi analizzati sono state quindi calcolate la pendenza della retta e quindi l'efficienza della reazione, il coefficiente di regressione lineare (R^2) ed il *range dinamico* (l'intervallo di cicli in cui c'è una correlazione lineare tra fluorescenza e logaritmo della concentrazione finale).

Analisi dei campioni

L'analisi dei profili di espressione dei geni target nei campioni è stata condotta amplificando il cDNA di tutti i campioni, per ciascun gene target e gene di riferimento.

Il cDNA dei campioni analizzati e del calibratore, ottenuti mediante retrotrascrizione di 2 µg di RNA, è stato diluito con acqua secondo il rapporto 1:100; in ogni pozzetto sono stati quindi caricati 2.5 ng di cDNA.

Le impostazioni del software sono state mantenute di default per tutti i geni; i dati sono stati analizzati utilizzando valori di *threshold* e *baseline* idonei ad ottenere dei buoni traccati di amplificazione per ciascun gene; tali parametri sono stati individuati durante la costruzione delle curve standard.

I valori di quantificazione relativa sono stati quindi calcolati mediante il metodo matematico del $\Delta\Delta C_t$ secondo la formula $2^{-\Delta\Delta C_t}$ di Livak e Schmittgen (2001) ed esprimendo i risultati come normalizzati sulla media del gruppo scelto come controllo (*fold change*).

Analisi statistica

L'analisi statistica dei dati ottenuti è stata effettuata utilizzando il programma *GraphPad InStat3*. In *primis* è stata effettuata un'analisi degli *outliers* mediante Test di Grubbs; con questo test si riescono ad individuare gli eventuali valori numericamente distanti (*outlier*) dal resto dei dati raccolti, quindi non appartenenti ad una popolazione caratterizzata da una tipica distribuzione normale, i quali se non eliminati possono inficiare la validità delle successive analisi.

Infine, sempre mediante il programma *GraphPadnStat3*, è stata applicata un'analisi parametrica con il Test ANOVA + post Test di Tukey. per evidenziare eventuali differenze statisticamente significative tra il gruppo di controllo e i nostri campioni in analisi. Eventuali differenze sono da considerarsi significative solo per valori di $p < 0.05$.

PARTE SECONDA: Messa a punto di un protocollo per l'allestimento a fresco di colture primarie di epatociti di bovino.

Lobi epatici

I lobi epatici utilizzati in questo lavoro ci sono stati gentilmente concessi dai macelli:

- CO.MA.CA Cooperativa Macellazione Carni Soc. Coop. R.l. (San Martino di Lupari-PD)
- Ossari Giovanni & F.lli (S.N.C.) - Commercio Carne (Cartura-PD)

Per ciascuna coltura è stato usato il processo caudato del lobo caudato di fegato proveniente dalle seguenti razze di vitelloni (tabella 15):

Coltura n°	Razza	Sesso	Mesi d'età	Peso del lobo prelevato (g)	Macello
1	<i>Limousine</i>	M	18	280	CO.MA.CA
2	<i>Limousine</i>	M	18	250	CO.MA.CA
3	<i>Salen</i>	M	23	250	CO.MA.CA
4	<i>Limousine</i>	F	21	150	CO.MA.CA
5	Incrocio francese	M	19	260	CO.MA.CA
6	Irlandese	M	20	350	CO.MA.CA
7	<i>Salen</i>	M	18	330	CO.MA.CA
8	Austriaco pezzato rosso	M	19	300	CO.MA.CA
9	<i>Charollais</i>	M	20	353	CO.MA.CA
10	<i>Limousine</i>	M	<20	375	CO.MA.CA
11	Incrocio <i>Limousine</i>	M	20	300	CO.MA.CA
12	Irlandese	M	18	250	CO.MA.CA
13	Non pervenuta	M	18	230	Ossari

Tabella 15: Caratteristiche specifiche dei bovini e dei lobi epatici usati per questo esperimento.

Preparazione della biomatrice (ECM)

Per la preparazione della biomatrice è stato utilizzato il processo caudato del lobo caudato di un fegato di vitellone, prelevato al macello CO.MA.CA e mantenuto a -20°C fino al momento dell'utilizzo.

Per la preparazione del *coating* è stato seguito il protocollo pubblicato in Rojkind *et al.*, 1980.

Soluzioni

- Tampone di omogenizzazione: EDTA 20 mM + *Phenylmethylsulfonyl Fluoride* (PMSF) 0.1 mM in acqua sterile.

Preparazione (1 L): sciogliere 0.871 g di PMSF in 50 mL di Isopropanolo e prelevarne 1 mL, aggiungere 39.96 mL di EDTA 0.5 M e portare a volume con acqua sterile

- NaCl 1 M

Preparazione: sciogliere 58.44 g di NaCl in acqua, portare a volume (1 L) e autoclavare

- DOC (*Deoxycholic acid sodium salt*) 1% (Sigma Chemical Co. - St.Louis, MO, USA)

Preparazione: sciogliere 10 g di DOC in 1 L di acqua sterile

- Soluzione di DNasi/RNasi (Roche, Mannheim, Germania)

Preparazione: sciogliere 2 mg di *DNase I from bovine pancreas grade II* e 10 mg di *RNase A from bovine pancreas* in 100 mL di NaCl 1 M sterile

Tutte le fasi devono essere effettuate in sterilità ed in ghiaccio.

Procedimento:

- Pesare il fegato (circa 150 g)
- Eliminare se possibile i pezzi di connettivo presenti
- Sotto cappa e in ghiaccio appoggiare il fegato su di un supporto sterile quindi con bisturi spezzettare il fegato in pezzi di 1 cm circa
- Mettere i pezzettini di fegato in un beacker da 2 L ed aggiungere 1 L di tampone di omogenizzazione
- Omogenizzare il tutto con *Ultra-turrax* (Janke & Kunkel GmbH & Co, Staufen, Svizzera)
- Filtrare con un filtro da 100 µm

- Raccogliere il filtrato in un beacker sterile, aggiungere 500 mL di tampone di omogeneizzazione, coprire con parafilm e porre in agitazione per 1 h a 4°C con ancoretta e agitatore magnetico
- Filtrare con un filtro da 100 µm
- Raccogliere il filtrato in un beacker sterile, aggiungere 500 mL di tampone di omogeneizzazione, coprire con parafilm e porre in agitazione per 1 ora a 4°C
- Ripetere la filtrazione e mettere in agitazione a 4°C per 1 ora con 1 L di NaCl 1 M
- Filtrare in un beacker da 500 mL, aggiungere la soluzione contenente DNasi e RNasi e lasciare in agitazione per 1 ora a T° ambiente
- Filtrare, aggiungere 1 L di DOC 1% e lasciare in agitazione per 1 ora a 4°C; a questo punto la biomatrice dovrebbe essere bianca e libera dalle impurità
- Filtrare e lavare per 1 ora a 4°C con 1 L di NaCl 1M
- Filtrare e lavare per 1 ora a 4°C con 1 L di H₂O sterile
- Filtrare e lavare per 1 ora a 4°C con 1 L di H₂O sterile
- Filtrare e lavare *overnight* a 4°C con 1 L di H₂O sterile
- Filtrare la biomatrice e trattenerla nel filtro
- Prendere un supporto sterile dove appoggiare la biomatrice (rimanere sempre in ghiaccio) e tagliarla in piccoli pezzettini di 1/2 cm circa
- Mettere 4-5 pezzettini di biomatrice in ciascuna *vials* sterile
- Chiudere le *vials* con un tappo sterile e parafilm
- Liofilizzare e conservare a 4°C per un massimo di 6 mesi.

Preparazione delle piastre con biomatrice

Reattivi

- Acido acetico glaciale (HAc) 0.5 M: 14.3 mL in 485.7 mL di H₂O sterile
- *Hanks* (pH 7.4): (vedi preparazione piastre Petri , materiali e metodi parte prima)
- *Williams'E* non completo: sciogliere il terreno liofilizzato in acqua milliQ, aggiungere 26.6 mL/L NaHCO₃, 1 mL CaCl₂ e 1 mL MgCl₂; ossigenare per 10 min con carbogeno, portare a 37°C e portare a pH (7.4). In alternativa è possibile utilizzare l'*RPMI 1640 medium*.

Procedimento:

- Pesare 32.40 mg di biomatrice liofilizzata e porla in un beacker sterile
- Con un paio di forbici sterili sminuzzare la biomatrice il più possibile
- Aggiungere 32.40 mL di HAc 0.5 M
- Omogeneizzare con *Ultraturrax* e sonicatore finchè la soluzione non si presenta torbida e biancastra
- Prelevare 2 mL e portarli a 10 mL con acqua sterile (diluizione 1:5): questa soluzione verrà denominata biomatrice diluita in HAc 0.1 M. Il rimanente non diluito (biomatrice in HAc 0.5 M) rappresenta la *stock solution*, conservabile a 4°C per non più di un mese
- Aliquotare 500 µL della biomatrice diluita in ciascun pozzetto P6 o 17 µL/*well* per P96
- Distribuire la biomatrice sul fondo delle piastre con movimento rotatorio
- Lasciar asciugare sotto cappa aspirante
- Riporre il coperchio, chiudere con parafilm e riporre capovolte a 4°C (tempo di conservazione 1 mese a 4°C).
- La mattina della coltura idratare le piastre con 2 mL di *Hanks* completo
- Attendere 20 min e aspirare il terreno con una pompa a vuoto
- Aggiungere 2 mL di *Williams'E* non completo o *RPMI 1640 medium*
- Verificare che non ci siano alterazioni di colore del medium, altrimenti aspirare il terreno e ripetere il passaggio precedente
- Al momento del piastramento delle cellule aspirare il terreno.

Tamponi di perfusione e terreno di coltura

Tamponi per la perfusione del lobo al macello e trasporto:

- Tampone *Eurocollins* (pH 7.4): KH_2PO_4 15 mM, K_2HPO_4 42 mM, KCl 15 mM, NaHCO_3 1mM, glucosio 0.2 M, EGTA 1 mM in acqua sterile
- Soluzione di *Wisconsin* (Bristol – Myers, LT, Italia) composta dai seguenti principi attivi:

Principi attivi	[] g/L	[] mmol/L
Poli (o-2-idrossietil) amido	50.0	-
0.40-0.50 moli di gruppi idrossietilici per moli di unità di glucosio anidro (MS)	-	-
Acido lattobionico	35.83	105
Potassio idrossido 56%	14.5	100
Sodio idrossido 40%	3.679	27
Adenosina	1.34	5
Allopurinolo	0.136	1
Potassio diidrogeno fosfato	3.4	25
Magnesio solfato $\times 7\text{H}_2\text{O}$	1.23	5
Raffinosio $\times 5\text{H}_2\text{O}$	17.83	30
Glutazione	0.922	3
Altri ingredienti come: sodio idrossido 20%, acido cloridrico 14.6% (regolatori di pH) ed acqua		

Tabella 16: Composizione della soluzione di *Wisconsin*.

Ad entrambe queste soluzioni va aggiunta l'eparina (Medic Italia S.r.l. Roma, Italia): 100 U/0.5 L di tampone o soluzione. L'eparina è un glicosaminoglicano con attività anticoagulante.

Tamponi per la fase di pre-riscaldamento del lobo in laboratorio (tutte le soluzioni vanno usate a 37°C):

- Soluzione fisiologica (NaCl al 9% in H_2O milliQ)
- Terreno *Hanks* (per la composizione vedi: preparazione piastre Petri prima parte materiali e metodi)

Tamponi per la perfusione del lobo:

- Tampone I e II (pH 7.4, 37°C): NaCl 142 mM, KCl 0.5 mM, HEPES 9.2 mM, EGTA 0.5 mM (da aggiungere solo al tampone I, prima della filtrazione) in acqua milliQ
- Tampone III (pH 7.2, 37°C): NaCl 66.7 mM, KCl 6.7 mM, CaCl_2 4.74 mM in acqua milliQ
- Tampone IV (pH 7.65, 4°C): HEPES 9.3 mM, BSA 2.5%, KCl 5.4 mM, KH_2PO_4 0.44 mM, NaCl 0.14 mM, NaHCO_3 4 mM, Na_2HPO_4 0.34 mM, glucosio 5.5 mM in acqua milliQ

I singoli tamponi sono stati ossigenati con carbogeno (95% O_2 e 5% CO_2), quindi portati a pH alla T° d'uso, sterilizzati con caraffa da 0.22 μm (Millipore, Massachusetts, USA) e conservati a +4°C.

Terreni per il lavaggio della sospensione cellulare:

- RPMI 1640 *medium* (Sigma Chemical Co., St.Louis, MO, USA) addizionato di Penicillina/streptomicina (6.329% / 1%) e FCS
- *Williams'E* (pH 7.4) per lavaggi composto da:

Reagente	Concentrazione delle soluzioni madre	Quantità/1Lt
<i>Williams'E</i>	1X	Terreno liofilizzato per 1 Lt
NaHCO ₃	8.4%	26.6 mL
CaCl ₂	0.5 M	1 mL
MgCl ₂	0.5 M	1 mL
Penicillina/streptomicina	6.329% / 1%	10 mL
Siero fetale bovino (FCS)	<i>tal quale</i>	100 mL

Tabella 17: *Composizione Williams'E per lavaggi.*

Il siero fetale bovino e la soluzione di penicillina/streptomicina vanno aggiunti solo al momento dell'utilizzo.

Terreno *Williams'E* completo (W'E) per la messa in coltura degli epatociti:

Reagente	Concentrazione delle soluzioni madre	Quantità/1Lt
<i>Williams'E</i>	1X	Terreno liofilizzato per 1 Lt
NaHCO ₃	8.4%	26.6 mL
Penicillina/streptomicina	6.329% / 1%	10 mL
Siero fetale bovino (FCS)	<i>tal quale</i>	100 mL
CaCl ₂	0.5 M	1 mL
MgCl ₂	0.5 M	1 mL
Insulina	1 nM	1mL
Gentamicina	50 mg/mL	1 mL
Idrocortisone	10 mM	100 µL

Tabella 18: *Composizione Williams'E completo*

Preparazione: sciogliere il terreno liofilizzato in 887.9 mL di acqua milliQ; aggiungere NaHCO₃, CaCl₂ e MgCl₂ secondo le quantità indicate in tabella 18; ossigenare per 10 min con carbogeno (95% O₂ e 5% CO₂) e scaldare in bagnetto termostato (37°C); portare a pH 7.4; filtrare con caraffa da 0.22 µm (*Millipore*) e conservare a +4°C.

Il giorno stesso della coltura aggiungere al terreno le soluzioni di penicillina/streptomicina, FCS, insulina, idrocortisone e gentamicina secondo le quantità indicate in tabella 18.

Protocollo di perfusione

AL MACELLO:

- Prelevare il lobo caudato nel minor tempo possibile, facendo in modo che sia anche il più pulito possibile (150 g-250 g)
- Eliminare il sangue dai principali vasi arteriosi e venosi perfondendo l'organo con 250-300 mL di *Eurocollins buffer* (+4°C, pH 7.4) o soluzione di *Wisconsin* contenenti l'eparina
- Mentre si perfonde massaggiare delicatamente per favorire una distribuzione omogenea della soluzione di perfusione;
- Immergere il lobo epatico in un barattolo sterile contenente 1 L di *Eurocollins buffer* o soluzione di *Wisconsin* sterile (+4°C)
- Raggiungere il laboratorio

IN LABORATORIO:

- Prima dell'arrivo del fegato in laboratorio, disinfettare il circuito di perfusione con alcool diluito e acqua sterile, quindi riempire il sistema con il primo litro di soluzione fisiologica
- Misurare con una cartina tornasole (Macherey – Nagel, Duren, Germania) il pH di ogni soluzione e se necessario, correggerlo con NaOH 4N e HCl 4N (il pH va misurato alla T° d'uso quindi a 4°C o 37°C)
- Una volta giunti in laboratorio mettere il fegato sul piatto traforato del sistema e inserire i cateteri (almeno 3 di calibro: 12-10 e 8 Ch)
- Pre – riscaldare il lobo con l'ausilio di una pompa peristaltica (Minipulse 3, Gilson Villiers Le Bel, Francia) ad una velocità di 80 ml/min per 5 min circa con i 2 L di soluzione fisiologica o terreno *Hanks*, ossigenati con carbogeno e riscaldati a 37-38°C in bagnetto termostato (Falc, Instruments S.r.l., Lurano, BG, Italia). E' importante controllare visivamente la qualità della perfusione, calcolare i tempi di perfusione dei vari tamponi e assicurarsi che i cateteri non escano dai vasi epatici
- Iniziare la perfusione mantenendo il flusso di 80 ml/min. I tamponi devono essere sterili, mantenuti a 37°C, saturati con carbogeno

- Perfondere con i tamponi I e II:

Tampone	QTÁ	Tempo
Tampone I	1 L	10 min
Tampone II	1 L	10 min

Tabella 19: Volumi e tempo di perfusione tamponi I e II.

- Sciogliere la collagenasi precedentemente pesata in 500 ml di Tampone III
- Perfondere con ricircolo il fegato con Tampone III addizionato di collagenasi alla velocità di 80 ml/min, per circa 15 – 20 min: il lobo epatico dovrebbe aumentare di volume e la glissoniana “sbiancarsi”
- Fermare la perfusione, prelevare il lobo e andare sotto cappa

Da questo punto in poi si lavora in ghiaccio

- Porre il lobo perfuso in una ciotola di vetro, aggiungere 400 mL di Tampone IV e incidere la glissoniana con bisturi sterile
- Disgregare con le mani il fegato aggiungendo pian piano il Tampone IV a +4°C (600 mL totali)
- Filtrare la sospensione cellulare con tre setacci (porosità 150, 250 e 450 µm, rispettivamente) impilati in modo decrescente sopra ad una ciotola di vetro
- Controllare la vitalità delle cellule con *Trypan blue dye exclusion test*
- Aliquotare 50 mL di filtrato mantenuto in agitazione in tubi sterili da 50 mL
- Centrifugare a 80xg per 2 min a +4°C
- Aspirare il surnatante con una pipetta Pasteur sterile, aggiungere 5 mL di W'E per lavaggi o RPMI 1640 *medium* per lavaggi a ciascun *pellet* e risospenderlo
- Controllare la vitalità delle cellule con *Trypan blue dye exclusion test*
- Riunire due *pellets* in un'unica Falcon da 50 mL e portare a volume (50 mL) con W'E per lavaggi o RPMI 1640 *medium* per lavaggi
- Centrifugare a 80xg per 2 min a +4°C
- Aspirare il surnatante e risospendere ciascun *pellet* in 5 mL di W'E completo e risospendere il *pellet*

- Riunire il contenuto dei tubi in un beacker e porre in agitazione su un agitatore magnetico
- Prelevare un'aliquota necessaria per la conta cellulare con *Trypan Blue exclusion test*

N.B. Dopo il secondo lavaggio potrebbe essere necessario un ulteriore lavaggio per rimuovere le cellule morte.

- Diluire la sospensione cellulare con *Williams'E* completo per ottenere una densità cellulare finale pari a 1.0×10^6 cellule/ml
- Aliquotare 2.5 mL per pozzetto P6
- Porre le piastre in incubatore a 37°C e 5% di CO₂ e agitarle ogni 30 min per favorire l'adesione delle cellule in maniera omogenea su tutta la superficie della piastra
- Dopo 4 ore aspirare il terreno con pompa a vuoto, effettuare un lavaggio con tampone fosfato 0.1 M (pH 7.4) per eliminare le cellule che non hanno aderito al monostrato, aspirare ed aggiungere nuovo terreno *Williams'E*
- Cambiare il terreno ogni 24 ore fino all'arresto della coltura

In figura 5 è riportata una fotografia relativa al sistema di perfusione utilizzato.

SISTEMA DI PERFUSIONE



Figura 5: *Sistema di perfusione.*

4. RISULTATI E DISCUSSIONE

PARTE PRIMA: Valutazione degli effetti del tempo di coltura sull'espressione degli enzimi farmaco-metabolizzanti e dei recettori nucleari in epatociti crioconservati di suino.

Valutazioni preliminari

La prima sacca è stata utilizzata come prova generale allo scopo di individuare le condizioni ottimali di lavoro da applicare nel corso degli esperimenti successivi, quali numerosità delle cellule da utilizzare e conseguente scelta della tipologia di piastra, protocollo di estrazione dell'RNA, messa a punto dei test di citotossicità MTT e *Neutral Red*.

Sono state quindi raccolte e stoccate quantità diverse di cellule per determinare la numerosità ottimale per lo svolgimento della fase di estrazione dell'RNA. In particolare, a tale scopo, sono stati usati i reagenti *TRizol[®] reagent* (Invitrogen) ed *RNeasy Mini Kit* (Qiagen). Il primo protocollo utilizza una soluzione mono-fasica di fenolo e Sali di guanidina in grado di lisare e solubilizzare i componenti cellulari, mantenendo l'integrità dell'RNA; il *kit* invece sfrutta l'affinità di legame dell'RNA nei confronti di una apposita membrana silicea contenuta in una colonnina. In entrambi i sistemi i contaminanti e le impurità vengono eliminate con procedure di lavaggio, mentre l'RNA viene eluito in 100 µL di H₂O *RNAsi free*.

L'arresto della coltura è avvenuto a 48 ore dal piastramento. La vitalità cellulare degli epatociti è stata valutata mediante *Trypan blue dye exclusion test* ed era pari all'87.6%. Il numero totale di cellule disponibili era pari a 1.87×10^9 .

Valutazione quali- quantitativa dei campioni di RNA estratto

A seguito dell'estrazione, l'RNA estratto è stato valutato quali- quantitativamente mediante lettura al Nanodrop ed elettroforesi in gel di agarosio.

In tabella 20 vengono riportati i dati di concentrazione e purezza (rapporto assorbanza a 260/280 e 260/230 nm) degli RNA estratti.

Campione	QTÁ cells	Metodo di estrazione	Abs 260/280 nm	Abs 260/230 nm	Concentrazione RNA (ng/ µL)
1 pozzetto P6	2.5×10^6	<i>TRIZOL</i> ® reagent	1.93	1.50	110.0
2 pozzetti P6	5.0×10^6		1.90	1.83	204.9
3 pozzetti P6	7.5×10^6		1.91	1.90	262.0
4 pozzetti P6	10.0×10^6		1.92	1.88	396.2
5 pozzetti P6	12.5×10^6		1.91	1.86	448.0
6 pozzetti P6	15.0×10^6		1.93	1.81	490.7
1 piastra Petri	9.0×10^6		1.97	1.96	516.5
1 pozzetto P6	2.5×10^6	<i>Kit Qiagen</i>	2.04	1.82	35.2
2 pozzetti P6	5.0×10^6		1.92	0.21	12.8
3 pozzetti P6	7.5×10^6		1.90	1.63	12.3
4 pozzetti P6	10.0×10^6		1.97	0.59	16.6
5 pozzetti P6	12.5×10^6		2.01	0.09	24.9
6 pozzetti P6	15.0×10^6		1.85	0.10	18.8
1 piastra Petri	9.0×10^6		1.86	0.07	17.9

Tabella 20: Dati di concentrazione e purezza dell'RNA estratto

I valori di concentrazione (ng/ µL) ottenuti con *TRIZOL*® reagent sono da considerarsi sufficienti già con la quantità minore di cellule testate (2.5×10^6): è stata infatti ottenuta una concentrazione di RNA pari a 110 ng/ µL. Inoltre, come si osserva in tabella, esiste una sorta di dipendenza lineare tra la concentrazione dell'RNA estratto e la quantità di cellule utilizzata fino ai campioni "5 e 6 pozzetti P6" (quantità maggiore di cellule testata), dove si assiste ad una fase di *plateau*, probabilmente dovuta al fatto che sono stati raggiunti i limiti di capacità di estrazione del protocollo sperimentale. Sono ottimi anche i rapporti di assorbanza a 260/280 nm e 260/230 nm, in quanto sono da considerarsi accettabili valori compresi tra 1.8 e 2.

A seguito dell'utilizzo del *kit* Qiagen invece sono stati ottenuti valori di concentrazione molto più bassi rispetto al primo protocollo e valori di purezza non accettabili. Non si assiste ad un aumento progressivo della quantità di RNA estratto all'aumentare della quantità di cellule utilizzata, bensì rimane pressoché costante. Sembra infatti che già a partire da 5.0×10^6 cellule il sistema vada incontro a saturazione, benché le specifiche del kit indichino come ottimale una quantità di cellule pari esattamente al doppio (10.0×10^6 cellule).

La qualità dell'RNA estratto è stata infine valutata mediante elettroforesi su gel di agarosio. Un RNA totale di buona qualità è solitamente caratterizzato dalla presenza delle tre bande ribosomiali 28S, 18S e 5S, e dall'assenza dell'effetto di *smear*; infine la banda corrispondente al 28S dovrebbe mostrare un'intensità pari al doppio della banda 18S, mentre la 5S (RNA di piccole dimensioni) dovrebbe essere poco o per nulla evidente.

In figura 6 viene riportata l'immagine relativa ai campioni estratti per la prova comparativa.

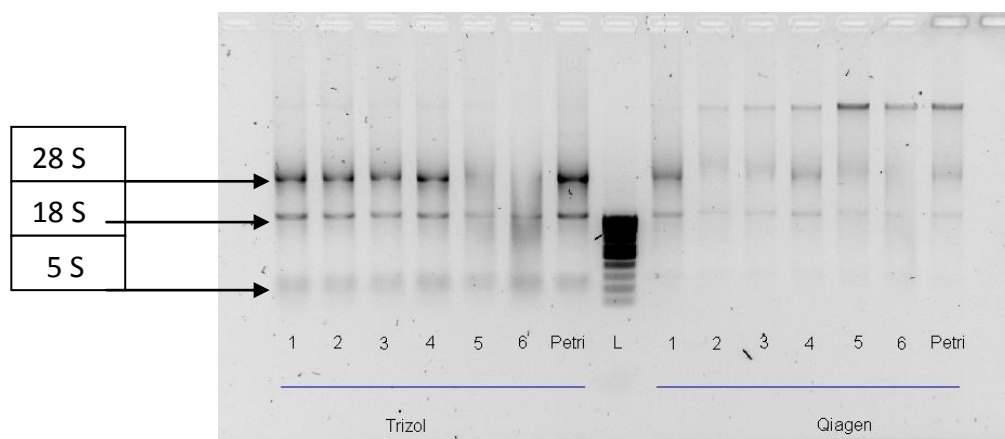


Figura 6: Elettroforesi RNA campioni, estratti da TRizol e con Kit Qiagen, in gel di agarosio 1%.

L: Ladder 100 bp (Invitrogen, Milano, Italia)

Dalla figura si può notare come la qualità dell'RNA estratto con TRizol® sia migliore dell'RNA estratto mediante *kit* Quiagen: il tipico aspetto di un RNA di buona qualità infatti è presente in tutti i campioni estratti con TRizol® ad eccezione dei campioni "5 e 6 pozzetti P6" dove invece le tre bande non sono apprezzabili, a causa probabilmente dell'eccessiva quantità di cellule processate con 1 mL di TRizol®.

Con il kit Qiagen, invece, l'RNA appare di buona qualità solo per il campione "1 pozzetto P6", mentre negli altri campioni vi è una predominanza di DNA genomico (banda più alta ben apprezzabile in tutti i campioni) rispetto all'RNA, dato che in qualche modo ha inficiato anche i risultati della quantificazione dei campioni. Si può pertanto ipotizzare che il kit Qiagen possa essere utilizzato per l'estrazione di al massimo 2.5×10^6 di epatociti.

A fronte di tutto ciò, per lo svolgimento dell'esperimento successivo, si è deciso di utilizzare quale reagente per l'estrazione dell'RNA *TRizol® reagent* e di utilizzare una quantità di cellule pari a 9×10^6 cellule (piastrabili in una piastra Petri), valore per il quale è stata evidenziata la massima resa, ma non a saturazione del sistema.

Test di citotossicità

Nel corso delle prove preliminari sono state messe a punto le condizioni ottimali di lavoro per lo svolgimento dei test di citotossicità MTT e NR. In particolare sono state effettuate delle prove per determinare la numerosità cellulare idonea nonché il supporto idoneo (piastra P12, P24 o P96) per lo svolgimento dei test.

A tale proposito è stato considerato un numero di cellule per pozzetto compreso tra 0.5×10^5 e 1.5×10^5 per le piastre P24, tra 0.5×10^5 e 2.0×10^5 per le piastre P24, tra 0.25×10^5 e 1.0×10^5 per le piastre P96.

L'utilizzo delle piastre P96 non si è rivelato essere ottimale in quanto i risultati ottenuti (qui non riportati) erano molto variabili e non ripetibili: la fase critica è probabilmente rappresentata dal cambio del terreno in quanto in tali pozzetti si incorre nel rischio di aspirare anche le cellule. Pertanto per una questione di praticità e manualità, nonché di ripetibilità dei risultati, si è preferito l'utilizzo di piastre P12 e P24. Nelle tabelle seguenti (21-22-23) vengono riportati i risultati delle diverse prove effettuate per il test MTT.

1^prova	P12				P24				
	Densità cellulare/well	0.5×10^5	1.0×10^5	1.5×10^5	2.0×10^5	0.5×10^5	0.75×10^5	1.0×10^5	1.25×10^5
Valori di assorbanza	0.425	1.060	1.748	2.458	0.390	0.563	0.852	0.824	0.829
	0.460	1.082	1.817	2.016	0.348	0.768	0.933	0.730	0.863
					0.361	0.626	0.956	1.029	0.833
Media	0.442	1.071	1.782	2.237	0.367	0.653	0.914	0.861	0.842
Deviazione Standard	0.025	0.016	0.049	0.313	0.022	0.105	0.055	0.153	0.019
CV%	5.6	9.3	2.7	14.0	6.0	16.0	6.0	17.7	2.2

Tabella 21: Valori di assorbanza della prima prova del test MTT utilizzando densità cellulari/pozzetto diverse in piastre P12 e P24. I valori di assorbanza sono corretti rispetto all'assorbanza del bianco assoluto.

2^prova	P12				P24				
	Densità cellulare/well	0.5×10^5	1.0×10^5	1.5×10^5	2.0×10^5	0.5×10^5	0.75×10^5	1.0×10^5	1.25×10^5
Valori di assorbanza	0,413	0,867	1,320	1,664	0,090	0,351	0,603	0,637	0,561
	0,423	0,925	1,327	1,532	0,147	0,492	0,668	0,858	0,951
					0,310	0,545	0,831	0,881	1,041
Media	0,418	0,896	1,323	1,598	0,182	0,463	0,701	0,792	0,851
Deviazione Standard	0,007	0,041	0,005	0,093	0,114	0,100	0,117	0,135	0,255
CV%	1.7	4.6	0.3	5.8	62.6	21.6	16.7	17.0	30.0

Tabella 22: Valori di assorbanza della seconda prova del test MTT utilizzando densità cellulari/pozzetto diverse in piastre P12 e P24. I valori di assorbanza sono corretti rispetto all'assorbanza del bianco assoluto.

3 ^a prova	P12				P24				
Densità 85cellular/well I	0.5x10 ⁵	1.0x10 ⁵	1.5x10 ⁵	2.0x10 ⁵	0.5x10 ⁵	0.75x10 ⁵	1.0x10 ⁵	1.25x10 ⁵	1.5x10 ⁵
Valori di assorbanza	0,349	0,638	0,751	0,887	0,181	0,321	0,574	0,675	0,885
	0,360	0,639	0,869	0,952	0,208	0,333	0,588	0,703	0,892
					0,186	0,302	0,552	0,735	0,845
Media	0,354	0,638	0,810	0,919	0,192	0,319	0,572	0,705	0,874
Deviazione Standard	0,008	0,001	0,083	0,046	0,014	0,016	0,018	0,030	0,025
CV%	2.3	0.2	10.2	5.0	7.3	5.0	3.1	4.2	2.9

Tabella 23: Valori di assorbanza della terza prova del test MTT utilizzando densità cellulari/pozzetto diverse in piastre P12 e P24. I valori di assorbanza sono corretti rispetto all'assorbanza del bianco assoluto.

Come si può notare dalle tabelle, i dati ottenuti in ogni singola prova sono risultati essere piuttosto ripetibili (in generale CV<17%, ad eccezione della seconda prova in P24) mentre piccole differenze in termini assoluti di assorbanza sono state invece ottenute tra le diverse prove. In generale però, si nota come i valori di assorbanza aumentino all'aumentare del numero di cellule piastrate. Infatti l'aumento dell'assorbanza è proporzionale alla quantità di formazano prodotto dalle cellule vitali e quindi indirettamente è proporzionale al numero di cellule vitali presenti.

Curiosamente, nel caso delle piastre P24, la dipendenza lineare assorbanza-numerosità delle cellule viene a mancare oltre 1×10^5 cellule/pozzetto: si può intuire infatti come il saggio raggiunga potenzialmente una fase di *plateau*.

Alla luce dei risultati ottenuti si può pertanto ipotizzare che l'utilizzo di 1×10^5 cellule/pozzetto in piastre P12 e $0.75-1.0 \times 10^5$ cellule/pozzetto in piastre P24 possa essere utile per eseguire il saggio MTT in epatociti di suino.

Per il NR è stata effettuata una singola prova utilizzando i medesimi *range* di densità cellulare.

I risultati ottenuti sono riportati in tabella 24.

1 ^a prova	P12				P24				
Densità cellulare/well	0.5x10 ⁵	1.0x10 ⁵	1.5x10 ⁵	2.0x10 ⁵	0.5x10 ⁵	0.75x10 ⁵	1.0x10 ⁵	1.25x10 ⁵	1.5x10 ⁵
Valori di assorbanza	0,015	0,024	0,046	0,088	0,017	0,028	0,031	0,055	0,081
	0,017	0,027	0,054	0,070	0,015	0,023	0,036	0,058	0,077
					0,019	0,031	0,037	0,060	0,063
Media	0,016	0,025	0,050	0,079	0,017	0,027	0,034	0,057	0,073
Deviazione Standard	0,001	0,002	0,006	0,013	0,002	0,004	0,003	0,003	0,009
CV%	6.3	8.0	12.0	16.5	11.8	14.8	8.8	5.3	12.3

Tabella 24: Valori di assorbanza della prova del test NR utilizzando densità cellulari/pozzetto diverse in piastre P12 e P24. I valori di assorbanza sono corretti rispetto all'assorbanza del bianco assoluto.

Anche con questo test è stata riscontrata una buona ripetibilità, oltre che un aumento progressivo dell'assorbanza all'aumentare del numero delle cellule testate nei vari pozzetti: il NR infatti viene accumulato nei lisosomi delle cellule con membrane integre, quindi maggiore è l'assorbanza maggiore saranno le cellule vive presenti.

Va tuttavia sottolineato che i valori di assorbanza ottenuti mediante l'utilizzo di questo saggio, in queste condizioni sperimentali, risultano essere piuttosto bassi in termini assoluti rispetto al test MTT, e quindi difficilmente impiegabili per studi di citotossicità in epatociti di suino.

In letteratura questi due test risultano essere i più comunemente utilizzati per la valutazione della vitalità cellulare (Barile, 1994; Fotakis *et al.*, 2006) e per questo motivo vengono spesso utilizzati insieme; dal loro confronto però il test MTT risulta essere più sensibile e quindi più affidabile nel rilevare la perdita di vitalità rispetto al NR (Fotakis *et al.*, 2006).

Alla luce di tutto ciò, per lo svolgimento di futuri studi di citotossicità in epatociti di suino abbiamo ritenuto più idoneo il test MTT per la sua ripetibilità, oltre che praticità, velocità (un minor numero di passaggi rispetto al NR) e minor possibilità di errore da parte dell'operatore.

Prova sperimentale

Indici di vitalità cellulare

Per valutare la vitalità cellulare degli epatociti è stato utilizzato il *Trypan blue dye exclusion test*: i dati relativi alla percentuale di vitalità cellulare dopo lo scongelamento ed il numero di cellule totali a disposizione sono riportati in tabella 25.

N° coltura	Vitalità cellulare	N°di cellule totali per sacca
coltura "prova"	87.6 %	1.87×10^9
1	72.80 %	1.18×10^9
2	77.90 %	1.24×10^9
3	79.15 %	1.63×10^9
4	79.93 %	1.56×10^9

Tabella 25: Risultati della conta cellulare con *Trypan blue dye exclusion test*

La vitalità registrata in questo studio è conforme a quanto riportato in letteratura: l'effettiva efficacia del metodo di crioconservazione è notoriamente stimata sulla percentuale di vitalità cellulare in seguito allo scongelamento ed in generale è riportata essere compresa tra il 40% e il 60% (Zaleski *et al.*, 1993; Swales *et al.*, 1996).

Morfologia

La morfologia delle cellule è stata valutata dopo 4 ore di piastramento e successivamente ogni 24 ore di coltura: è noto in letteratura infatti che frequenti osservazioni al microscopio sono molto utili poiché consentono di controllare le variazioni della morfologia cellulare, la quale spesso rappresenta la prima indicazione di uno stato generale di sofferenza di una coltura (Zucco e Bianchi, 1994).

In generale in tutte le colture è stata osservata l'adesione delle cellule al *coating* dopo appena 30 min dal piastramento (vedi figura 7); si è notato inoltre come con il passare delle ore le cellule si espandevano sulla superficie della piastra. Questa facilità di adesione, tipica degli epatociti di suino, è stata precedentemente ben documentata in letteratura (Loren *et al.*, 2005): gli autori affermano infatti che è assai noto che gli epatociti di suino aderiscano con facilità se piastrati immediatamente dopo l'isolamento.

E' stato notato come gli epatociti presentassero dapprima un aspetto rotondeggiante (prime ore) e successivamente per tutto l'arco di tempo della coltura un tipico aspetto poligonale. Non sono stati evidenziati indici di sofferenza cellulare come ad esempio la vacuolizzazione (presenza di un

citoplasma granuloso con vacuoli arrangiati intorno al nucleo) o estroflessioni della membrana plasmatica conseguenti a danni alla stessa, definiti *blebs*.

In particolare, intorno alla 24esima ora dal piastramento è stata osservata la presenza di alcune cellule binucleate, di canalicoli biliari e complessi giunzionali di collegamento tra cellula e cellula, caratteristiche riportate anche in letteratura ed indicative di un buono stato di salute delle cellule (Sidhu *et al.*, 2004, Yamamoto *et al.*, 2006). Le cellule in tali condizioni di benessere sono arrivate, entro la 48esima ora, a confluenza mostrando una completa aderenza in tutta la piastra (vedi figura 8).

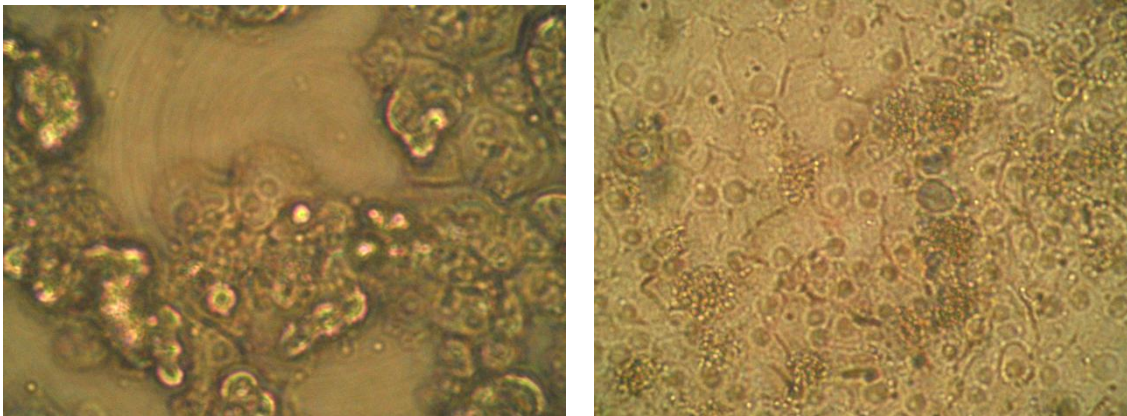


Figura 7 e 8: Epatociti di suino rispettivamente dopo 4 ore e dopo 48 ore dal piastramento.

Campioni

I monostrati raccolti sono stati denominati controlli assoluti (Kass) e classificati in base al numero della coltura, al tempo di arresto della coltura e al replicato biologico (quattro replicati definiti A-B-C-D); ad esempio Kass T4 1A indica il replicato biologico A della prima coltura il cui monostrato è stato raccolto dopo 4 ore di coltura.

Nella seguente tabella (n. 26) viene riportato l'elenco dei campioni analizzati:

Campione	N° coltura	Replicati
Kass T 4	1	A - B - C - D
Kass T 24		A - B - C - D
Kass T 48		A - B - C - D
Kass T 72		A - B - C - D
Kass T 96		A - B - C - D
Kass T 10 gg		A - B - C
Kass T 4	2	A - B - C - D
Kass T 24		A - B - C - D
Kass T 48		A - B - C - D
Kass T 72		A - B - C - D
Kass T 96		A - B - C - D
Kass T 10 gg		A - B - C
Kass T 4	3	A - B - C - D
Kass T 24		A - B - C - D
Kass T 48		A - B - C - D
Kass T 72		A - B - C - D
Kass T 96		A - B - C - D
Kass T 4	4	A - B - C - D
Kass T 24		A - B - C - D
Kass T 48		A - B - C - D
Kass T 72		A - B - C - D
Kass T 96		A - B - C - D

Tabella 26: Elenco dei campioni e loro denominazione.

Valutazione quali- quantitativa dell'RNA estratto

L'RNA è stato estratto dai campioni mediante l'utilizzo di *TRIzol®reagent* (Invitrogen), e prima di essere utilizzato per le reazioni successive è stato valutato sia qualitativamente che quantitativamente tramite quantificazione al NanoDrop ed elettroforesi in gel di agarosio all'1%.

Nella tabella seguente (n. 27) sono riportati ad esempio i dati di concentrazione e purezza di alcuni campioni di RNA totale.

Campione	Concentrazione (ng/ μL)	260/280	260/230
T4_1A	866,7	1,97	2,16
T24_1A	505,9	1,92	2,17
T48_1A	836,1	1,97	2,19
T72_1A	885,7	2,00	2,19
T96_1A	1108,3	1,99	2,14
T10GG_1A	885,9	1,98	2,16
T4_1B	853,3	1,98	2,15
T24_1B	409,3	1,92	2,22
T48_1B	787,4	1,97	2,19
T72_1B	946,4	1,98	2,16
T96_1B	1086,6	1,99	2,15
T10GG_1B	885,9	1,98	2,16
T4_1C	466,2	1,93	1,99
T24_1C	437	1,97	2,16
T48_1C	583	1,94	1,94
T72_1C	612,9	1,95	2,06
T96_1C	665,3	1,96	2,02
T10GG_1C	997,4	2,02	1,89
T4_1D	273,3	1,99	1,83
T24_1D	452,7	1,94	2,18
T48_1D	588,1	1,94	1,87
T72_1D	824,9	1,96	2,08
T96_1D	776,2	1,97	1,92

Tabella 27: Risultati Nanodrop prima coltura.

In generale, i campioni analizzati sono risultati essere ben concentrati e caratterizzati da buoni indici di purezza (rapporto assorbanze 260/280 e 260/230 compreso tra 1.8 e 2).

Successivamente la qualità dell'RNA è stata valutata anche mediante elettroforesi in gel di agarosio all'1%. In tutti i campioni l'RNA estratto presentava le caratteristiche tipiche di un RNA di buona qualità: subunità 28S di intensità doppia rispetto al 18 S, sub unità 5S poco visibile, mancanza di indici di degradazione o *smear*. A scopo esemplificativo, in figura 9 è riportata l'immagine relativa ai campioni Kass T10gg della 1^a e 2^a coltura.

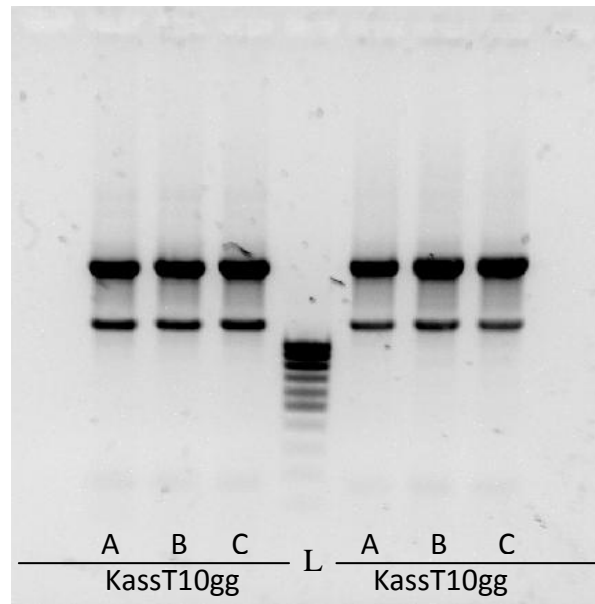


Figura 9: Elettroforesi in gel di agarosio 1% dei campioni di RNA (Kass 10gg A-B-C, 1[^] e 2[^] coltura rispettivamente).

L: Ladder 1000 bp (Invitrogen, Milano, Italia)

In conclusione l'RNA estratto dai campioni è risultato sempre di eccellente qualità e quindi idoneo per essere utilizzato nelle analisi successive.

Scelta dei Primer

Per tutti i geni scelti è stata disegnata una coppia di *primer* da utilizzare per le analisi in *Real Time* PCR, utilizzando le linee guida descritte in materiali e metodi.

Qui di seguito (tabella 28) sono riportate per ciascun saggio le sequenze e le caratteristiche dei *primer* utilizzati.

Saggio	Sequenza <i>PRIMER</i> (5'→3')	Lunghezza (bp)	T _m (°C)	%GC	Lunghezza amplicone (bp)
CYP2B22	F_TTCCAGACCTTTCTGTCATC	21	59	47.6	67
	R_TCAAGAAGGCGGAGTAGAGC	20	59	55.0	
CYP2C	F_AACGCGTTCAAGAGGAA	19	60	52.6	127
	R_CGATTGTGGAAAATGATGGA	20	60	40.0	
CYP3A	F_CAAGGACTCCATAAACCTTACA	23	59	43.5	69
	R_CTCATGCCGATGCAGTTG	18	59	55.6	
CAR	F_CAAGTCTCCGGGACAGGTT	19	60	57.9	61
	R_CTTCCGAGCTCAGCCAATA	19	59	52.6	
PXR	F_AAGGCCTACATCGAGTGCAA	20	60	50.0	66
	R_AGCCATGATCTTCAGGAACAG	21	59	47.6	
RXR α	F_GTCCTTTCAACCCGACT	19	58.8	57.9	79
	R_GGGACGCGTAGACCTTCTC	19	61.0	63.2	
GR α	F_CAGTGGGAAGGACAGCACAATTA	22	60	45.5	113
	R_TCCAGCTTGAAGACACTTTCTG	22	59	45.5	
GAPDH	F_CTTTAACTCTGGCAAAGTGGAC	23	59	43.5	78
	R_GGAACATGTAGACCATGTAGTGGA	24	60	45.8	
ACTB	F_GGATGCAGAAGGAGATCACG	20	60	55.0	84
	R_ACACGGAGTACTTGCGCTCT	20	60	55.0	
18S	F_TCGGGAGTGGGTAATTTGC	19	60	52.6	70
	R_GGAGAGGGAGCCTGAGAAAC	20	60	60.0	

Tabella 28: Primer utilizzati per le analisi in Real Time PCR: sequenze e caratteristiche.

Messa a punto dei saggi in Real Time PCR

Dopo aver verificato la funzionalità dei primer disegnati, si è proceduto con la verifica della specificità degli ampliconi e con l'analisi delle curve di melting, questo per assicurare che i saggi amplificassero specificatamente la regione di interesse e non prodotti aspecifici.

In figura 10 viene riportata l'immagine relativa all'elettroforesi in gel di agarosio al 2% di alcuni ampliconi ottenuti. Per tutti i saggi è stata ottenuta la lunghezza attesa degli ampliconi oggetto di studio.

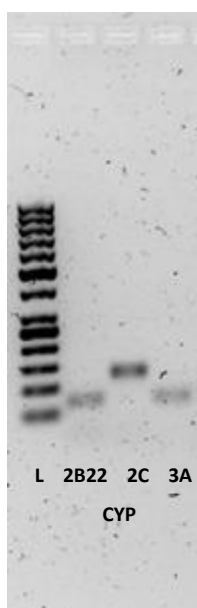


Figura 10: Elettroforesi su gel di agarosio al 2%: ampliconi dei geni CYP2B22, CYP2C e CYP3A. L: Ladder 50 bp

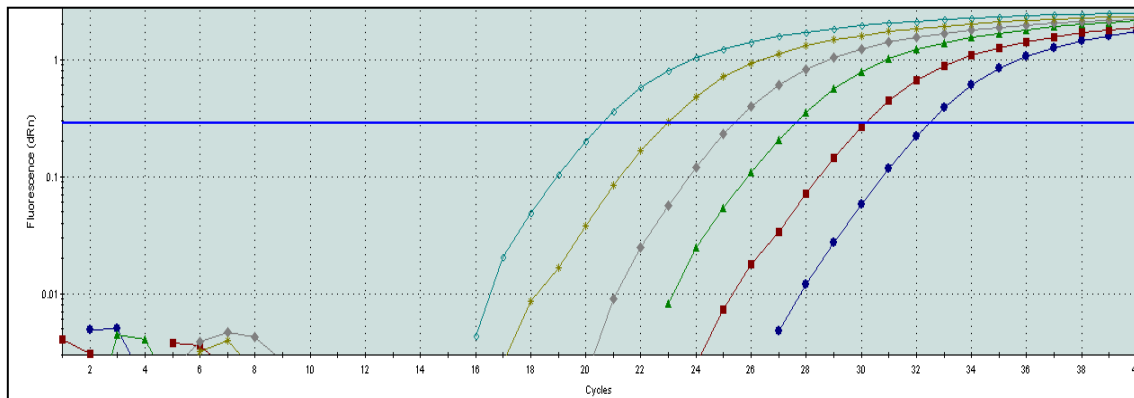
Si è poi passati alla definizione per ciascun saggio della migliore combinazione di primer forward (F) e reverse (R) in grado di permettere la maggior efficienza di amplificazione. In tabella 29 sono riportate le combinazioni dei primer scelte per ciascun saggio.

Gene	primer Forward nM	primer Reverse nM
ACTB	300	300
GAPDH	600	300
CYP2B22	600	600
CYP2C	600	600
CYP3A	300	600
CAR	300	600
PXR	600	300
RXR α	300	300
GR α	300	300

Tabella 29: Concentrazioni ottimali dei primer scelte per ogni saggio durante la fase di messa a punto.

L'efficienza di amplificazione di ogni singolo saggio è stata poi valutata mediante costruzione della curva degli standard, la quale mette in relazione il C_t ottenuto a seguito dell'amplificazione di ogni standard al logaritmo della concentrazione. Nelle figure 11 e 12 vengono riportati l'*amplification plot* (A) e la curva standard (B) elaborata dal software *Stratagen MXPro* QPCR rispettivamente per il gene *housekeeping* GAPDH e per il gene *target* PXR.

A)



B)

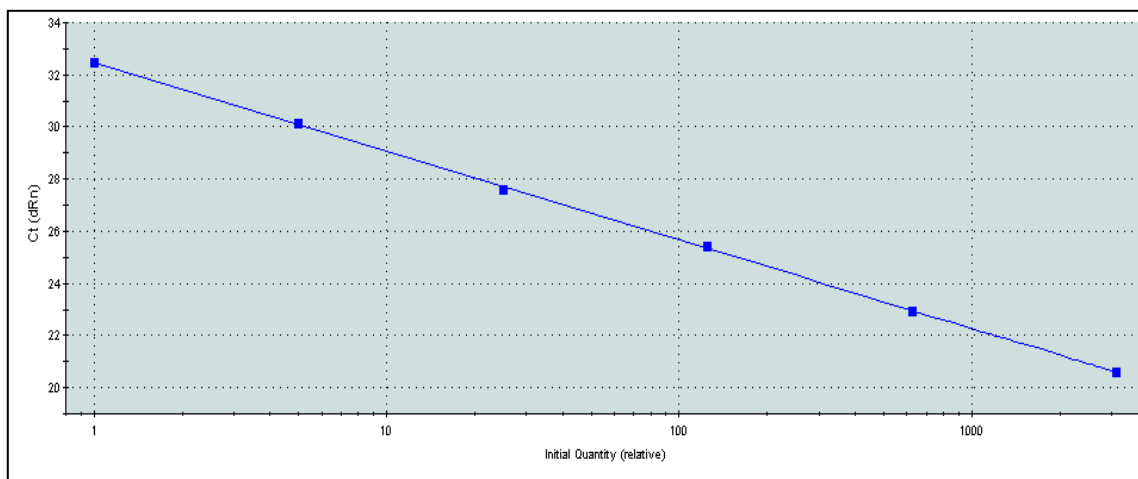
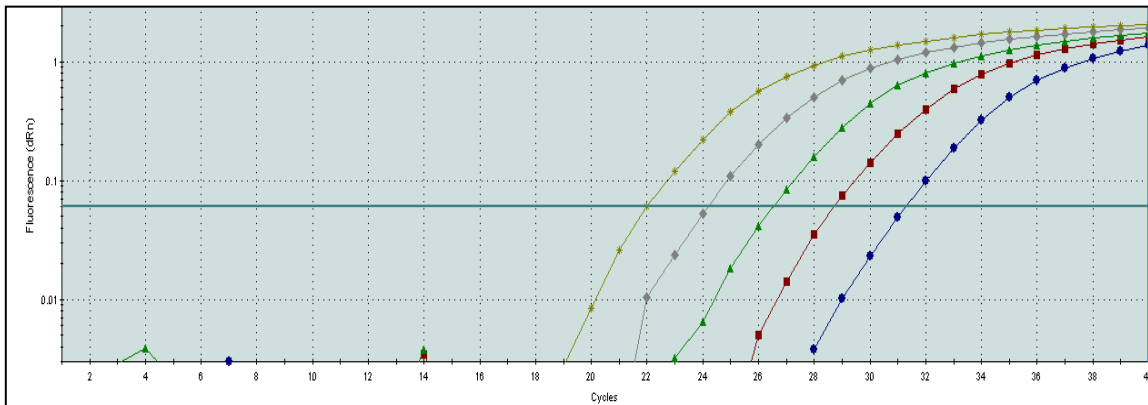


Figura 11 (A) e (B): Curva standard per il gene *housekeeping* GAPDH. (A) *Amplification plot* degli standard. In figura non è stato riportato lo standard 1, il più concentrato, in quanto presentava un fenomeno di inibizione da substrato e quindi non è stato considerato nella costruzione della curva standard. (B) Curva degli standard in cui vengono messi in relazione C_t e quantità iniziale di template. In ordinata sono riportati i valori di C_t di ciascuna diluizione seriale in triplicato, mentre in ascissa il corrispondente logaritmo della concentrazione iniziale di acido nucleico.

A)



B)

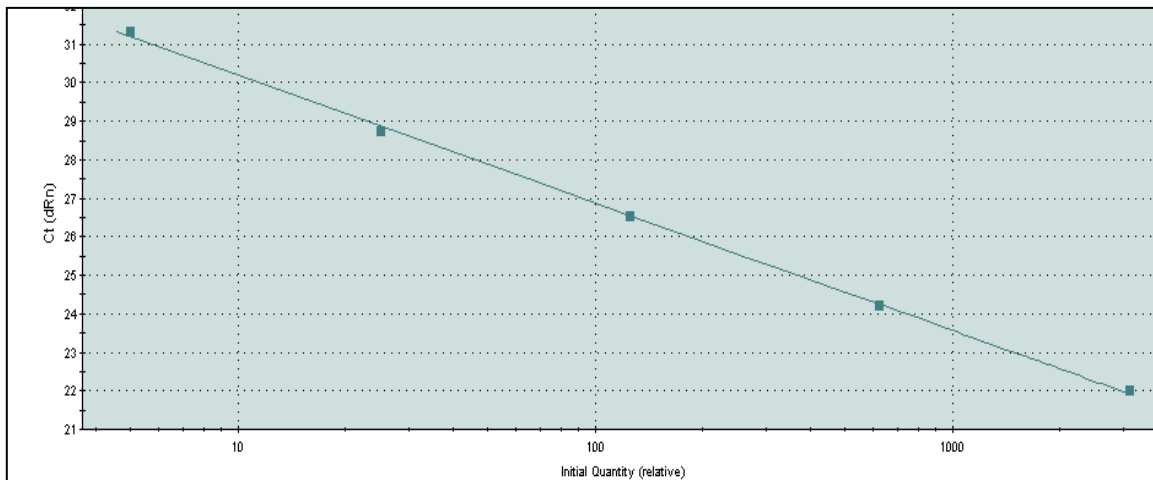


Figura 12 (A) e (B): Curva standard per il gene target PXR. (A) Amplification plot degli standard. In figura è stato eliminato lo standard 1, il più concentrato, in quanto presentava un fenomeno di inibizione da substrato e lo standard 7, il più diluito, perché la diluizione risultava troppo spinta. Quindi entrambi non sono stati considerati nella costruzione della curva standard. (B) Curva degli standard in cui vengono messi in relazione C_t e quantità iniziale di template. In ordinata sono riportati i valori di C_t di ciascuna diluizione seriale in triplicato, mentre in ascissa il corrispondente logaritmo della concentrazione iniziale di acido nucleico.

Come si può notare dagli *amplification plot* delle figure precedenti, la distanza tra le curve di amplificazione è costante, a conferma del fatto che gli standard differiscono tra loro sempre di un fattore pari a 5.

Lo stesso software oltre alla curva standard fornisce anche una serie di parametri fondamentali per la validazione dei saggi quali *Slope*, R^2 , Efficienza di amplificazione e *Range* dinamico, dopo aver individuato i valori di *threshold* idonei ad ottenere dei buoni tracciati di amplificazione per ciascun gene.

In tabella 30 sono riassunti i dati relativi alla messa a punto dei saggi.

Tabella 30: Parametri di messa a punto dei saggi Real Time e valori di Threshold applicati per ciascun gene.

Gene	R ²	Slope	Efficienza (%)	Range dinamico (C _t)	Threshold
ACTB	0.990	-3.347	99.0	17.42 - 26.76	0.221
GAPDH	1.000	-3.396	97.0	20.59 - 32.45	0.285
CYP2B22	0.996	-3.363	98.3	23.86 - 35.00	0.131
CYP2C	1.000	-3.449	95.0	20.33 - 33.18	0.210
CYP3A	0.998	-3.370	98.0	31.56 - 19.80	0.138
CAR	0.996	-3.385	97.4	26.58 - 33.69	0.211
PXR	0.997	-3.314	100.3	22.00 - 31.31	0.061
RXR α	0.999	-3.327	99.8	23.32 - 34.95	0.150
GR α	0.997	-3.333	99.5	24.51 - 33.75	0.192

Tutti i saggi si sono mostrati efficienti in quanto i parametri valutati rientrano nei *range* di accettabilità. Va ricordato infatti che per definire un saggio di *Real Time* PCR buono questo deve essere caratterizzato da un'efficienza compresa tra il 90% e il 110.2% e conseguentemente una *slope*, o inclinazione, compresa tra -3.6 e -3.1 (un valore di *slope* ideale per un'efficienza del 100% dovrebbe essere intorno al -3.322); infine deve mostrare un coefficiente di regressione lineare o R² il più possibile pari ad uno (tanto più la curva interpola bene i punti e assomiglia ad una retta tanto più R² si avvicina al valore ottimale 1); infine il *range* dinamico rappresenta l'intervallo di C_t all'interno del quale si trova la retta ottenuta, e rappresenta l'intervallo in cui è possibile quindi effettuare la quantificazione relativa: al di fuori di questo range i risultati non vengono considerati attendibili.

Il gene housekeeping 18S è stato eliminato dalla rosa dei geni analizzati in quanto i valori di C_t ottenuti a seguito dell'amplificazione degli standard erano bassi e si discostavano troppo dai valori ottenuti con gli altri geni; per questo motivo è stato ritenuto poco idoneo per le analisi successive. Per la normalizzazione dei risultati sono stati utilizzati quali geni housekeeping GAPDH e BACT.

Analisi dei campioni

A seguito della validazione dei saggi, sono stati analizzati tutti i campioni in esame. Sono stati acquisiti i valori di C_t di ciascun campione e sono poi stati calcolati i valori di quantificazione relativa (RQ) utilizzando il metodo matematico del $\Delta\Delta C_t$ secondo la formula $2^{-\Delta\Delta C_t}$ di Livak e Schmittgen (2001). Con questo metodo si attua una doppia normalizzazione dei risultati ottenuti con la PCR: la prima rispetto alla media dei valori di C_t dei geni *housekeeping* (ACTB e GAPDH) mentre la seconda rispetto ad un campione noto (calibratore) inserito in ogni piastra.

Sono stati quindi calcolati i valori medi di espressione (media delle quattro colture) di ciascun gene target per ciascun tempo di coltura. Per identificare eventuali differenze statisticamente significative tra i gruppi in analisi è stato applicato il Test parametrico ANOVA più il post Test di Tukey. Il Test di Grubbs è stato invece applicato per identificare potenziali *outlier*.

Saranno ora presentati e discussi in modo più dettagliato i risultati ottenuti dall'analisi dell'espressione genica dei campioni, trattando in primo luogo i profili di espressione dei CYPs e, successivamente, dei recettori nucleari. Per rendere più facile l'interpretazione dei dati, i risultati verranno presentati come *fold-change* (unità arbitrarie) rispetto al gruppo T4 per il quale è stato assunto un valore pari a 100.

Valutazione degli effetti del tempo di coltura sull'espressione degli enzimi biotrasformativi

L'espressione costitutiva degli enzimi di fase I CYP2B22, CYP2C e CYP3A, è stata valutata 4 ore (T4), 24 (T24), 48 (T48), 72 (T72), 96 (T96) ore e 10 giorni (T10 gg) dopo il piastramento degli epatociti crioconservati di suino. L'analisi statistica dei dati ha evidenziato nel caso del CYP2B22 una diminuzione statisticamente significativa ($p < 0.001$) dell'espressione a tutti i tempi nei confronti di T4 e, similmente a T48, T72, T96 e T10 gg nei confronti di T24. Per quanto riguarda il CYP2C e il CYP3A la riduzione dei livelli di mRNA risulta statisticamente significativa a tutti i tempi nei confronti di T4 con $p < 0.001$, tranne per T4 vs T24 con $p < 0.01$ in CYP2C (vedi figura 13).

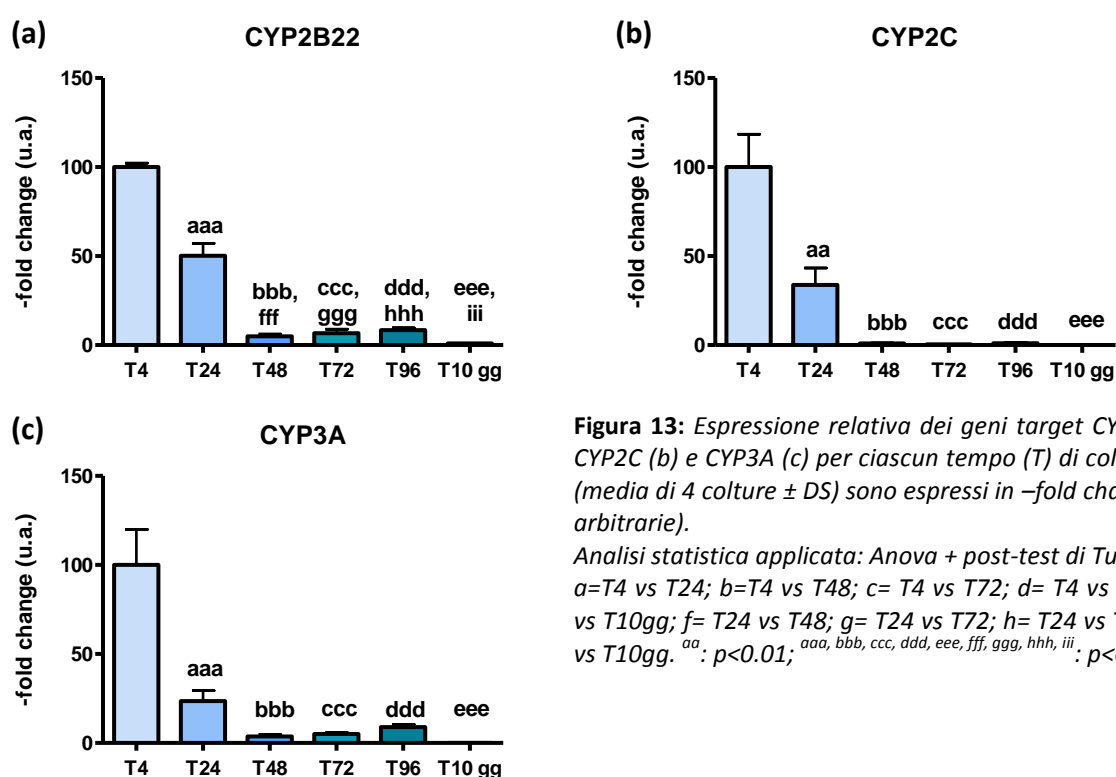


Figura 13: Espressione relativa dei geni target CYP2B22 (a), CYP2C (b) e CYP3A (c) per ciascun tempo (T) di coltura. I dati (media di 4 colture \pm DS) sono espressi in -fold change (unità arbitrarie).

Analisi statistica applicata: Anova + post-test di Tukey.

a=T4 vs T24; b=T4 vs T48; c= T4 vs T72; d= T4 vs T96; e= T4 vs T10gg; f= T24 vs T48; g= T24 vs T72; h= T24 vs T96; i= T24 vs T10gg. ^{aa}: $p < 0.01$; ^{aaa, bbb, ccc, ddd, eee, fff, ggg, hhh, iii}: $p < 0.001$.

Come precedentemente accennato, l'espressione genica dei CYPs tende generalmente a diminuire con l'aumentare del tempo in coltura anche se con tempi CYP-specifici; ad esempio, la famiglia 1 risulta modulata tra le 24-48 ore, la famiglia 2 lo risulta tra le 12-24 ore (Baker *et al.*, 2001).

Uno studio condotto da Kocarek e collaboratori (1992) riporta, relativamente a colture primarie di epatociti di ratto utilizzando come *coating* delle piastre Vitrogen (collagene di tipo I) e Matrigel, il *time-course* dell'espressione costitutiva delle principali isoforme delle famiglie dei CYP1, 2, 3 e 4. Analogamente a quanto dai noi osservato, l'espressione genica dei CYPs 2B e 2C mostra un *pattern* denominato "crash-rise" e cioè, una diminuzione dei livelli di mRNA seguita da un incremento degli stessi tra i 2-5 giorni in coltura. Tale effetto può essere apprezzato per il CYP2B22 nella figura

13a tra T48 e T96, mentre per il CYP2C, un lieve aumento dell'espressione è visibile solamente alle 96 ore. Infine, il *pattern* mostrato dal CYP3A (in questo caso diversamente da quanto riportato da Kocarek *et al.*, 1992) rispecchia quello precedentemente descritto per il CYP2B. Una progressiva diminuzione nella quantità di proteina microsomiale e di attività CYP-dipendente è stata dimostrata in uomo, ratto e suino (George *et al.*, 1997; Skaanild e Friis, 2000; Binda *et al.*, 2003). In epatociti primari di ratto a 96 ore dal piastramento l'attività CYP2B dipendente è risultata essere ridotta al 20% mentre quella CYP3A dipendente praticamente nulla (Binda *et al.*, 2003).

Specificatamente per il suino, gli studi di *time-course* effettuati su coltura primaria presenti in letteratura riguardano prevalentemente isoforme del CYP diverse da quelle da noi analizzate. Tali studi valutano solo l'attività e il contenuto in proteina dei CYPs, eccezion fatta per il CYP1A1 e CYP2E1, dei quali viene analizzata anche l'espressione genica (Schneider *et al.*, 2006; Baldini *et al.*, 2009). In epatociti primari di suino le attività CYP1A1 e 2B1 dipendenti (etossiresorufina-O-dietilasi e pentossiresorufina-O-dietilasi, rispettivamente) diminuiscono rapidamente durante le prime 28 ore di coltura, sino ad una percentuale del 25% rispetto a quelle misurate dopo 24 ore dal piastramento; nonostante la continua e progressiva perdita, tali attività risultano visibili fino a 8 giorni dall'inizio della coltura. Simile *pattern* è stato osservato per il trascritto del CYP1A1 (Schneider *et al.*, 2006).

Analogamente, Müller e collaboratori (2004) hanno dimostrato un decremento delle stesse attività CYP1A e 2B dipendenti in colture di epatociti primari di suino crioconservati, sino a valori del 10 – 20%, ma dopo 4 giorni. In quest'ultimo studio la longevità delle attività epato-specifiche è stata implementata grazie ad un medium condizionato, ottenuto precedentemente da cellule epatiche non parenchimali (che compongono quindi la matrice extracellulare). Tale medium è stato quindi considerato la possibile fonte di fattori ancora sconosciuti che contribuiscono al mantenimento delle funzioni degli epatociti differenziati. Altri studi condotti sia su epatociti crioconservati o a fresco di suino hanno dimostrato come anche l'attività CYP2A dipendente sia soggetta ad un decremento del circa 40% dopo 24 ore, e un'attività residua stimata del 5% in seguito alle 48 ore (Skaanil e Friis, 2000; Loren *et al.*, 2005).

Si può quindi affermare che il *time-course* degli enzimi biotrasformativi ottenuto in questo studio riflette quanto descritto in precedenza in epatociti crioconservati di suino e di altre specie. Inoltre conferma la possibilità di identificare l'espressione degli enzimi di fase I nelle stesse condizioni sperimentali (utilizzo di un rivestimento di collagene) fino ad un tempo massimo di 10 giorni (Naik *et al.*, 1996).

Valutazione degli effetti del tempo di coltura sull'espressione dei recettori nucleari

La modulazione dell'espressione genica in funzione del tempo in coltura è stata valutata anche per i NRs CAR, PXR, RXR α e GR α noti quali importanti fattori di trascrizione che regolano una vasta gamma di funzioni fisiologiche, tra le quali la differenziazione e l'omeostasi cellulare, l'espressione dei DMEs e dei trasportatori (Nishimura *et al.*, 2010). Tali geni risultano ben espressi a livello epatico ed in coltura sono anch'essi, unitamente ai geni del metabolismo, caratteristici dell'epatocita differenziato (Anniat *et al.*, 2006). In particolare i profili di espressione di CAR e PXR mostrano un'importante e significativa ($p < 0.001$) diminuzione del livello di mRNA in tutti i tempi analizzati rispetto a T4. Per quanto riguarda RXR α è stata osservata una riduzione statisticamente significativa del trascritto a T24 ($p < 0.01$), T48 ($p < 0.01$), T72 ($p < 0.05$) e T96 ($p < 0.01$) nei confronti di T4. Infine per GR α , nonostante l'analisi abbia rivelato un pattern di espressione simile ai precedenti NRs, la riduzione nel livello del trascritto risulta significativa solamente a T48 nei confronti di T4 ($p < 0.05$: vedi figura 14).

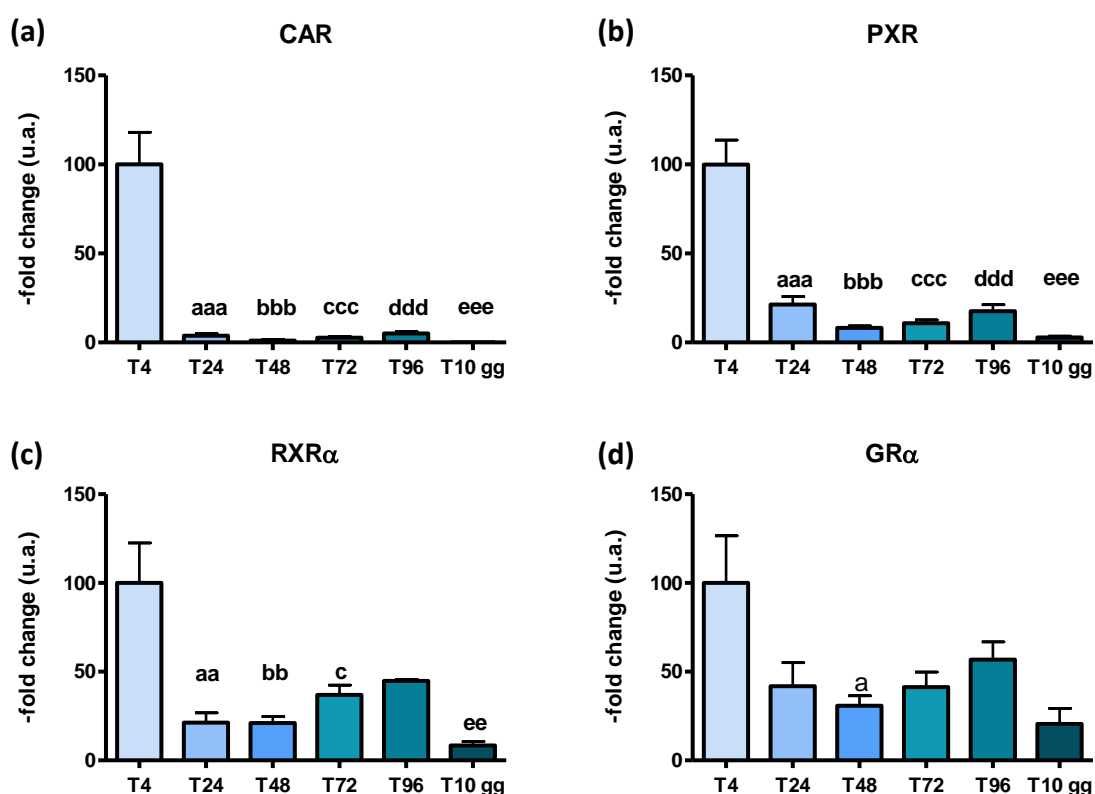


Figura 14: Espressione relativa dei geni target CAR (a), PXR (b), RXR α (c) e GR α (d) per ciascun tempo (T) di coltura. I dati (media di 4 colture \pm DS) sono espressi in -fold change (unità arbitrarie).

Analisi statistica applicata: Anova + post-test di Tukey.

a=T4 vs T24; b=T4 vs T48; c= T4 vs T72; d= T4 vs T96; e= T4 vs T10gg.

^{a,c}: $p < 0.05$; ^{aa,bb,ee}: $p < 0.01$; ^{aaa,bbb,ccc,ddd,eee}: $p < 0.001$.

Attualmente in letteratura non è presente alcuno studio in coltura primaria di epatociti di suino svolto allo scopo di definire il *time-course* dei summenzionati NRs. Nishimura e collaboratori (2010), all'interno di uno studio più esteso volto a comparare i livelli di espressione di DMEs, NRs e trasportatori in coltura primaria di epatociti umani crioconservati tra due diversi metodi di coltura (in piastra tradizionale vs tridimensionale), fornisce un risultato interessante per quanto riguarda l'espressione di CAR, PXR e RXR α dopo 120 ore dall'inizio della coltura. È stato infatti descritto come non ci siano differenze significative nei livelli dei trascritti di PXR e RXR α a 120 ore rispetto a quelli iniziali, mentre, meramente per CAR, viene riscontrata una diminuzione statisticamente significativa dell'espressione (Nishimura *et al.*, 2010). Tali evidenze supportano parzialmente il risultato da noi ottenuto. È possibile osservare infatti come tutti i NRs in analisi mostrino dapprima una brusca diminuzione dell'espressione a T24 e T48, ed in seguito un aumento della stessa a T72 e T96. Quindi, seppur non avendo a disposizione il dato dell'espressione in coltura dopo 120 ore, è ipotizzabile, osservando la figura 14, che ci sia una buona ripresa dell'espressione dei NRs a livelli simili di T4 (fenomeno osservabile per RXR α). L'eccezione è data da CAR che in questo studio così come riportato in Nishimura *et al.*, 2010 dimostra un basso livello di espressione del trascritto in tutti i tempi considerati fino alla completa scomparsa a T10 gg.

Per il recettore GR invece non sono riportati studi di questo tipo in bibliografia. Anche per questo recettore comunque, seppur con più basse significatività, si assiste ad una diminuzione della sua espressione nel tempo.

Infine l'aumento dell'espressione osservabile ai tempi T72 e T96 in tutti i geni in analisi, eccezion fatta per il CYP2C, può essere giustificata dal tempo di recupero necessario agli epatociti crioconservati per ristabilire la capacità ossidoriduttiva. A supporto di tale considerazione Swales e Utesch (1998) hanno evidenziato che, l'aggiunta di NADPH all'omogenato di epatociti di cane crioconservati, ha contribuito a ristabilire l'attività CYP3A dipendente testosterone 6 β -idrossilasi allo stesso livello degli epatociti isolati a fresco, dimostrando che la mancanza di NADPH era la causa della diminuzione di tale attività negli epatociti crioconservati.

PARTE SECONDA: Messa a punto di un protocollo per l'allestimento a fresco di colture primarie di epatociti di bovino.

Nel corso di questo secondo esperimento sono state eseguite diverse prove per la messa a punto di un protocollo sperimentale di isolamento di epatociti di bovino.

Questo approccio era stato utilizzato in precedenza in questo stesso laboratorio al fine di effettuare degli studi di metabolismo in epatociti primari di bovino. In tale occasione però il lobo epatico era stato prelevato mediante biopsia direttamente da vitelloni vivi: in queste condizioni sperimentali i risultati delle colture sono stati piuttosto soddisfacenti in quanto il tempo intercorso tra il prelievo e l'isolamento delle cellule è stato piuttosto breve. Tale approccio tuttavia è risultato essere costoso (acquisto dell'animale, biopsia, terapia antibiotica) e per ovvi motivi etico-legali ha richiesto l'autorizzazione al Ministero.

Per evitare quindi l'utilizzo di animali vivi, non creare quindi stress agli animali sottoposti all'intervento chirurgico o sacrificare animali a scopo sperimentale, si è pensato di ricorrere all'utilizzo di lobi epatici prelevati in sede di macellazione.

Nella tabella seguente (31) sono elencate le prove effettuate con indicati i risultati ottenuti ed i punti critici riscontrati.

Tabella 31: Elenco delle prove effettuate per l'isolamento di epatociti primari di bovino: parametri sperimentali, risultati e criticità.

1^ coltura				
Parametri sperimentali		Risultati		Problemi e Criticità
TP usato per perfusione al macello e trasporto	TP <i>Eurocollins</i>	Aspetto del lobo dopo perfusione	Parzialmente sbiancato, rigonfio e cedevole	Cellule mantenute in coltura fino a 4h dal piastramento Poche cellule adese e quasi tutte morte Tempi di perfusione troppo lunghi Probabile eccesso di collagenasi
Tempo intercorso macello-laboratorio	45 min	Vitalità cellular	Bassa	
TP usato per pre-riscaldamento organo	1 L di TP <i>Eurocollins</i>	Concentrazione cellulare	2.4 x 10 ⁶ cells/mL	
Tempo per perfusione totale e con TPIII in ricircolo	50 min (17-20 min)			
Concentrazione collagenasi	200 mL di TPIII con 43818 U.I. 300 mL di TP III con 49449U.I.			
2^ coltura				
Parametri sperimentali		Risultati		Problemi e Criticità
TP usato per perfusione al macello e trasporto	TP <i>Eurocollins</i> + eparina	Aspetto del lobo dopo perfusione	Parzialmente sbiancato, rigonfio e cedevole	Cellule mantenute in coltura fino a 4h dal piastramento Poche cellule adese e quasi tutte morte Tempi di perfusione troppo lunghi Eccessivo tempo di attesa per la reidratazione delle piastre TP virati a pH basico
Tempo intercorso macello-laboratorio	50 min	Vitalità cellular	1^conta: 80%; 2^conta: 80%; 3^conta: 50%	
TP usato per pre-riscaldamento organo	2 L di Soluzione fisiologica	Concentrazione cellulare	5.34 x 10 ⁶ cells/mL	
Tempo per perfusione totale e con TPIII in ricircolo	40 min (10-12 min)			
Concentrazione collagenasi	0.05%			
3^ coltura				
Parametri sperimentali		Risultati		Problemi e Criticità
TP usato per perfusione al macello e trasporto	TP <i>Eurocollins</i> + eparina	Aspetto del lobo dopo perfusione	Parzialmente sbiancato, rigonfio e cedevole	Cellule mantenute in coltura fino a 72h dal piastramento Bassa vitalità Tempi di perfusione troppo lunghi Probabile eccesso di collagenasi
Tempo intercorso macello-laboratorio	45 min	Vitalità cellular	1^conta: 70%; 2^conta: 62%	
TP usato per pre-riscaldamento organo	2 L di Soluzione fisiologica	Concentrazione cellulare	Dopo il 3^lavaggio: 5 x 10 ⁶ cells/mL A 4h di coltura molte cellule sono adese e vitali	
Tempo per perfusione totale e con TPIII in ricircolo	54 min (10 min)			
Concentrazione collagenasi	0.025%			

4 ^a coltura				
Parametri sperimentali		Risultati		Problemi e Criticità
TP usato per perfusione al macello e trasporto	TP <i>Eurocollins</i> + eparina	Aspetto del lobo dopo perfusione	Parzialmente sbiancato, rigonfio e abbastanza cedevole	Cellule mantenute in coltura fino a 4h dal piastramento Poche cellule adese e quasi tutte morte Eccessiva digestione dell'organo, lacerazione della glissoniana La perfusione dell'organo con il TPIV utilizzando il sistema di perfusione ha danneggiato le cellule
Tempo intercorso macello-laboratorio	50 min	Vitalità cellular	1 ^a conta: 47%; 2 ^a conta: 47%	
TP usato per pre-riscaldamento organo	2 L di Soluzione fisiologica	Concentrazione cellulare	3.3 x 10 ⁶ cells/mL	
Tempo per perfusione totale e con TPIII in ricircolo	46 min (8 min)			
Concentrazione collagenasi	0.0125%			
5 ^a coltura				
Parametri sperimentali		Risultati		Problemi e Criticità
TP usato per perfusione al macello e trasporto	TP <i>Eurocollins</i> + eparina	Aspetto del lobo dopo perfusione	sbiancato, ben rigonfio e cedevole	Le cellule sono tutte morte La perfusione dell'organo con il TPIV utilizzando il sistema di perfusione ha danneggiato le cellule e ha probabilmente determinato uno shock termico La collagenasi era troppo diluita TP virati a pH basico
Tempo intercorso macello-laboratorio	45 min	Vitalità cellular	1 ^a e 2 ^a conta: tutte morte	
TP usato per pre-riscaldamento organo	2 L di Soluzione fisiologica	Concentrazione cellulare	-	
Tempo per perfusione totale e con TPIII in ricircolo	47 min (10 min)			
Concentrazione collagenasi	6.25 x 10 ⁻³ %			
6 ^a coltura				
Parametri sperimentali		Risultati		Problemi e Criticità
TP usato per perfusione al macello e trasporto	Soluzione di <i>Wisconsin</i> + eparina	Aspetto del lobo dopo perfusione	Parzialmente sbiancato, rigonfio ma poco cedevole	Cellule mantenute in coltura fino a 96h dal piastramento Bassa vitalità La perfusione con collagenasi è stata troppo breve e non ha digerito a sufficienza l'organo Il pH dei TP era ottimale
Tempo intercorso macello-laboratorio	45 min	Vitalità cellular	Dopo i lavaggi: 58%	
TP usato per pre-riscaldamento organo	2 L di Soluzione fisiologica	Concentrazione cellulare	4.21 x 10 ⁶ cells/mL A 4h di coltura molte cellule sono adese e vitali	
Tempo per perfusione totale e con TPIII in ricircolo	46 min (6 min)			
Concentrazione collagenasi	0.0125%			

7 ^a coltura				
Parametri sperimentali		Risultati		Problemi e Criticità
TP usato per perfusione al macello e trasporto	Soluzione di <i>Wisconsin</i> + eparina	Aspetto del lobo dopo perfusione	Parzialmente sbiancato, rigonfio ma poco cedevole	Bassa vitalità Isolamento di poche cellule Cellule mantenute in coltura fino a 4h dal piastramento Insufficiente perfusione dell'organo con collage nasi Danno alle cellule conseguente alla disgregazione meccanica del tessuto Elevata temperatura ambientale
Tempo intercorso macello-laboratorio	45 min	Vitalità cellular	1 ^a conta: molte morte Dopo i lavaggi: 41%	
TP usato per pre-riscaldamento organo	2 L di Soluzione fisiologica	Concentrazione cellulare	5.8 x 10 ⁵ cells/mL	
Tempo per perfusione totale e con TPIII in ricircolo	55 min (15 min)			
Concentrazione collagenasi	0.0125%			
8 ^a coltura				
Parametri sperimentali		Risultati		Problemi e Criticità
TP usato per perfusione al macello e trasporto	Soluzione di <i>Wisconsin</i> + eparina	Aspetto del lobo dopo perfusione	Ben sbiancato, aspetto marmorizzato e rigonfio, in buona parte cedevole	Vitalità ottimale Cellule mantenute in coltura fino a 96h dal piastramento La fase di perfusione con la collagenasi poteva essere allungata per aumentare la resa cellulare
Tempo intercorso macello-laboratorio	72 min	Vitalità cellular	1 ^a conta: 87% 2 ^a conta: 86%	
TP usato per pre-riscaldamento organo	2 L di Soluzione fisiologica	Concentrazione cellulare	9.7 x 10 ⁶ cells/mL Alle 4h quasi tutte le cellule sono adese e vitali, alcune già poligonali	
Tempo per perfusione totale e con TPIII in ricircolo	53 min (14 min)			
Concentrazione collagenasi	0.025%			
9 ^a coltura				
Parametri sperimentali		Risultati		Problemi e Criticità
TP usato per perfusione al macello e trasporto	Soluzione di <i>Wisconsin</i> + eparina	Aspetto del lobo dopo perfusione	Ben sbiancato, aspetto marmorizzato e rigonfio, in buona parte cedevole	Vitalità ottimale Cellule mantenute in coltura fino a 24h dal piastramento Le cellule vanno incontro ad apoptosi Il pH dei TP era virato (pH più basso di 0.2 unità) Elevata temperatura ambientale
Tempo intercorso macello-laboratorio	55 min	Vitalità cellular	Dopo i lavaggi: 78%	
TP usato per pre-riscaldamento organo	2 L di Soluzione fisiologica	Concentrazione cellulare	7.42 x 10 ⁶ cells/mL A 24h dal piastramento presenza di blebs, vacuolizzazioni, cellule in apoptosi	
Tempo per perfusione totale e con TPIII in ricircolo	55 min (21 min)			
Concentrazione collagenasi	0.025%			

10 ^a coltura				
Parametri sperimentali		Risultati		Problemi e Criticità
TP usato per perfusione al macello e trasporto	Soluzione di <i>Wisconsin</i> + eparina	Aspetto del lobo dopo perfusione	Abbastanza sbiancato, rigonfio, in buona parte cedevole	Cellule mantenute in coltura fino a 24h dal piastramento Le cellule vanno incontro ad apoptosi Elevata temperatura ambientale (riprendere la sperimentazione dopo l'estate) Tempi probabilmente troppo lunghi tra morte animale e campionamento del fegato
Tempo intercorso macello-laboratorio	45 min	Vitalità cellular	1 ^a conta: 42% Dopo il 3 ^a lavaggio: 57.3%	
TP usato per pre-riscaldamento organo	2 L di Soluzione fisiologica	Concentrazione cellulare	2.8 x 10 ⁶ cells/mL	
Tempo per perfusione totale e con TP III in ricircolo	57 min (18 min)		A 24h dal piastramento presenza di blebs, vacuolizzazioni, cellule in apoptosi	
Concentrazione collagenasi	0.025%			
11 ^a coltura				
Parametri sperimentali		Risultati		Problemi e Criticità
TP usato per perfusione al macello e trasporto	Soluzione di <i>Wisconsin</i> + eparina	Aspetto del lobo dopo perfusione	Solo una piccola parte presentava un aspetto marmorizzato, quasi per nulla cedevole, poco perfuso	Tempo necessario per il trasporto troppo lungo Le cellule non sono state piastrate Tempi di perfusione troppo lunghi Tempi probabilmente troppo lunghi tra morte animale e campionamento del fegato
Tempo intercorso macello-laboratorio	80 min	Vitalità cellular	1 ^a e 2 ^a conta: tutte morte	
TP usato per pre-riscaldamento organo	2 L di Soluzione fisiologica	Concentrazione cellulare	-	
Tempo per perfusione totale e con TP III in ricircolo	45 min (18 min)			
Concentrazione collagenasi	0.025%			

12^a coltura				
Parametri sperimentali		Risultati		Problemi e Criticità
TP usato per perfusione al macello e trasporto	Soluzione di <i>Wisconsin</i> + eparina	Aspetto del lobo dopo perfusione	Aspetto marmorizzato in superficie, poco cedevole e ben compatto	Tempo necessario per il trasporto troppo elevato Cellule mantenute in coltura fino a 24h dal piastramento Le cellule vanno incontro ad apoptosi Eliminando la fase di pre-riscaldamento l'organo era freddo nella fase di perfusione con la collageneasi L'organo non era ben digerito Tempi probabilmente troppo lunghi tra morte animale e campionamento del fegato
Tempo intercorso macello-laboratorio	110 min	Vitalità cellular	1 ^a conta: molte morte 2 ^a conta: 65%	
TP usato per pre-riscaldamento organo	Eliminata fase di pre-riscaldamento	Concentrazione cellulare	1.17 x 10 ⁶ cells/mL	
Tempo per perfusione totale e con TP III in ricircolo	39 min (18 min)		A 24h dal piastramento presenza di blebs, vacuolizzazioni, cellule in apoptosi	
Concentrazione collagenasi	0.025%			
13^a coltura				
Parametri sperimentali		Risultati		Problemi e Criticità
TP usato per perfusione al macello e trasporto	Soluzione di <i>Wisconsin</i> + eparina	Aspetto del lobo dopo perfusione	Aspetto marmorizzato, rigonfio e cedevole	Cellule mantenute in coltura fino a 4h dal piastramento Ottenute poche cellule e quasi tutte morte Tempi probabilmente troppo lunghi tra morte animale e campionamento del fegato
Tempo intercorso macello-laboratorio	20 min	Vitalità cellular	Dopo i lavaggi: 53%	
TP usato per pre-riscaldamento organo	2 L di Tampone <i>Hanks</i>	Concentrazione cellulare	3.35 x 10 ⁶ cells/mL	
Tempo per perfusione totale e con TP III in ricircolo	45 min (16 min)			
Concentrazione collagenasi	0.025%			

I punti critici riscontrati in tutte le colture sono stati i seguenti:

1. il tempo trascorso tra il sacrificio dell'animale e l'isolamento degli epatociti;
2. il mantenimento della temperatura e del pH delle soluzioni utilizzate;
3. il tempo necessario alla perfusione dell'organo in laboratorio, i flussi applicati, la concentrazione della collagenasi.

Molte sono le informazioni presenti in letteratura a conferma delle sopracitate criticità.

A proposito del primo punto, alcuni lavori riportano che il tempo limite accettato, tra la morte dell'animale e l'isolamento degli epatociti, deve essere inferiore all'ora (Kuilman *et al.*, 1998; Kuilman *et al.*, 2000; Xianshi *et al.*, 2008). In questo studio purtroppo tale intervallo di tempo non è stato mai rispettato in quanto il campionamento del lobo epatico al macello era possibile solo dopo 20-30 minuti dall'abbattimento dell'animale (tempistica prevista in catena di macellazione) e la distanza chilometrica tra il macello ed il laboratorio non consentiva il trasferimento in laboratorio in tempi rapidi.

Per quanto riguarda invece il mantenimento della temperatura e del pH dei tamponi inizialmente sono state osservate le condizioni proposte da Kagawa-Tosa e collaboratori (Kagawa-Tosa *et al.*, 1993), i quali indicavano di utilizzare soluzioni a pH 7.5 e alla temperatura di 37°C. Infatti il pH ottimale per la crescita delle cellule animali è compreso tra 7.2 e 7.4 (Zucco e Bianchi, 1994). Tuttavia nel corso delle diverse prove ci si è resi conto che l'organo influisce notevolmente sul pH delle soluzioni utilizzate per la perfusione ed in particolare sul TPIII utilizzato in ricircolo, determinandone l'acidificazione. Per questo motivo risulta assolutamente fondamentale monitorare il pH nel corso della perfusione, nonché preparare già in partenza delle soluzioni a pH 7.6-7.7 in modo tale che a contatto con le cellule raggiungano un pH fisiologico.

Infine un ulteriore punto critico è dato dal flusso di perfusione adottato al macello ed in laboratorio: infatti da una parte un flusso elevato può determinare danni pressori agli epatociti, ma dall'altra un basso flusso può notevolmente influenzare i tempi necessari alla perfusione. A tal proposito in letteratura sono riportati pareri discordanti: alcuni autori infatti utilizzano un flusso di 50 mL/min per tutti i tamponi e per un tempo non indicato (Kagawa-Tosa *et al.*, 1993); altri utilizzano un flusso di 120 mL/min per 20-25 min usando un unico tampone contenente collagenasi (Xianshi *et al.*, 2008); Coldham *et al.* con lo stesso flusso perfondono l'organo con 2 L di tampone di perfusione e 400 mL di TPIII in ricircolo (Coldham *et al.*, 1995); Clouet e collaboratori invece utilizzano due flussi diversi per i primi tamponi (100 mL/min) e per il tampone contenente la collagenasi (< 50 mL/min in ricircolo: Clouet *et al.*, 1998). Nel nostro caso sono state adottate le

condizioni riportate da Clouet *et al.* (1998) ed in particolare è stato utilizzato un flusso pari a 80 mL/min per i primi tamponi ed uno pari a 55 mL/min per il TP111. Al macello invece non sono mai stati superati i 50 mL/min come riportato in Kagawa-Tosa *et al.* (1993).

E' importante sottolineare però che i flussi ed i tempi di perfusione dipendono anche molto dalla capacità del sistema di perfusione utilizzato.

Anche per la scelta del tipo e della quantità di collagenasi da utilizzare ci si è basati sulle informazioni disponibili in letteratura: le collagenasi più utilizzate sono quelle di tipo IA (Coldham *et al.*, 1995; Lemley *et al.*, 2010), di tipo II (Xianshi *et al.*, 2008) e di tipo IV (Clouet *et al.*, 1998). In generale si consiglia l'utilizzo di una concentrazione di collagenasi pari allo 0.01-0.1% (p/v: Zucco e Bianchi, 1996). In molti protocolli viene utilizzata la collagenasi allo 0.05 % (Kagawa-Tosa *et al.*, 1993; Larranoga *et al.*, 2000; Xianshi *et al.*, 2008), in altri viene specificato il numero di unità utilizzate (Clouet *et al.* 1998).

E' fondamentale però considerare che per non rischiare di danneggiare le cellule deve essere mantenuto un equilibrio tra la quantità di collagenasi utilizzata ed il tempo di azione (ricircolo). In particolare vengono riportati tempi che variano dai 10 ai 15 min (Kagawa-Tosa *et al.*, 1993), dai 20 ai 25 min (Xianshi *et al.*, 2008) ed anche 30 min (Larranoga *et al.*, 2000).

Nelle nostre condizioni sperimentali è stata utilizzata la collagenasi di tipo IV allo 0.025% per un tempo di 15-20 min.

L'unico metro di giudizio attualmente utilizzato per la stima della corretta digestione con collagenasi è la valutazione dell'aspetto del lobo e della glissoniana. I chiari segni di avvenuta digestione sono: il fegato appare rigonfio, lucido ed il liquido trasuda attraverso la capsula (Zucco e Bianchi, 1994). Tale approccio tuttavia è piuttosto soggettivo e non sempre facile da applicare: per capire quando la dissociazione è sufficiente è necessario pertanto avere un'ottima base di esperienza personale.

Nonostante i continui aggiustamenti del protocollo la coltura ha avuto buon esito solo in tre occasioni: nella coltura 3 gli epatociti sono rimasti in coltura fino alla 72esima ora mentre nelle colture 6 e 8 fino alla 96esima. In tutti e tre questi casi la vitalità di partenza era compresa tra il 58% e l'87% ed il numero era piuttosto esiguo, pertanto non si è potuto procedere con le analisi successive.

5. CONCLUSIONI

Le colture primarie di epatociti, sia umani, quanto provenienti da animali da laboratorio, rappresentano il sistema *in vitro* più utilizzato per lo studio del metabolismo di xenobiotici e lo *screening* di molecole sintetizzate *ex novo*. Gli epatociti primari, mantenendo infatti le caratteristiche metaboliche e di specializzazione riscontrabili *in vivo*, permettono la valutazione di parametri quali la capacità da parte degli xenobiotici di indurre o meno il CYP e altri enzimi di fase I e II, la tolleranza farmacocinetica ed eventuali fenomeni di “*drug-drug interaction*”. Gli svantaggi principali, tuttora associati all’uso delle colture primarie di epatociti umani, sono la scarsa quantità e la difficile reperibilità del tessuto, l’elevata variabilità individuale tra i donatori (Madan *et al.*, 1999), nonché la laboriosità e i costi elevati nella fase di messa a punto di protocolli ottimali per l’ottenimento. In risposta a tali problemi, la crioconservazione degli epatociti primari è stata proposta, ed accettata, dalla “*Food and Drug Administration*” come valida alternativa all’uso di epatociti a fresco. Tale decisione è supportata dalla dimostrazione che le colture di epatociti crioconservati, una volta a confluenza, mostrano una risposta al trattamento con molecole induttrici dei CYPs simile a quella delle colture provenienti da epatociti non crioconservati (Madan *et al.*, 1999; Silva *et al.*, 1999). Inoltre, la crioconservazione, è l’unico metodo che permette lo stoccaggio e la conservazione a lungo termine degli epatociti, riducendo le variazioni sperimentali osservabili tra i laboratori a differenze esclusivamente riconducibili al donatore o al metodo di ottenimento delle cellule stesse (Abadie-Villon *et al.*, 2010). In letteratura sono disponibili numerosi studi in cui la crioconservazione è stata applicata con successo sia a epatociti umani, sia ottenuti in primati, topo, ratto e suino. In quest’ultima specie, la crioconservazione, ha ricevuto particolare interesse considerata la possibilità di utilizzare gli epatociti primari come cellule donatrici per l’allestimento del “*bioartificial liver*”, il quale rappresenta l’unico supporto metabolico possibile per il paziente tra la condizione di insufficienza epatica acuta e la disponibilità del trapianto d’organo (Baldini *et al.*, 2009).

Nel presente studio è stata valutata la variazione del livello di espressione genica dei principali enzimi biotrasformativi (CYP2B2, CYP2C, CYP3A) e dei principali recettori nucleari (CAR, PXR, RXR α , GR α) coinvolti nella loro regolazione, in funzione del tempo in coltura in epatociti primari di suino crioconservati.

La vitalità ottenuta è stata, per tutte e quattro le colture, compresa tra il 72% e l'87%, indice dell'ottimale qualità delle cellule isolate e del protocollo di crioconservazione applicato. L'osservazione della morfologia delle cellule da noi impiegate non ha rivelato la presenza di *blebs* sulla superficie della membrana plasmatica, presenti invece in cellule mantenute a temperature troppo basse o soggette ad ipossia (Silva *et al.*, 1999). A conferma dell'eccellente stato vitale, erano sufficienti 30 minuti per notare l'adesione delle cellule al *coating*.

È ampiamente documentato come, in colture primarie di epatociti umani e di ratto, all'aumentare del tempo in coltura vi sia una progressiva diminuzione sia del livello di trascritto sia del contenuto di proteina totale del CYP (Bissell e Guzelian, 1980; Sidhu *et al.*, 1995; George *et al.*, 1997; Binda *et al.*, 2003). Analogamente, anche per gli epatociti di suino in coltura primaria è stato descritto l'effetto precedentemente riportato. Questa riduzione di espressione del CYP è stata attribuita a molteplici fattori tra i quali la distruzione dell'architettura del parenchima che a sua volta comporta la perdita della polarità cellulare, di importanti interazioni cellula-cellula, della matrice extracellulare e di specifici fattori all'interno del *medium* di coltura (George *et al.*, 1997). Per ovviare a tali limiti sono stati sviluppati metodi di coltura di tipo tridimensionale (es: Matrigel™, sferoidi di epatociti a partire da cellule in sospensione, *microcarrier* in bottiglie rotanti sui quali aderiscono gli epatociti) che mirano a mimare più fedelmente il microambiente presente *in vivo* (Nelson *et al.*, 2010).

La caratterizzazione del *time-course* degli enzimi deputati al metabolismo risulta quindi importante per l'uso previsto della coltura; ciò significa che, la diminuzione dell'espressione dei CYPs all'aumentare del tempo in coltura, non risulta essere un problema nel caso in cui si voglia mettere a punto uno studio *in vitro* che preveda la valutazione di molecole o potenziali composti induttori del CYP (Madan *et al.*, 1999).

Colture primarie di epatociti crioconservati di ratto hanno ampiamente dimostrato di mantenere, similmente agli epatociti isolati a fresco, le caratteristiche richieste per essere utilizzate in sistemi *in vitro* per studi di induzione. Gli epatociti crioconservati infatti, possono risultare meno efficienti rispetto a quelli isolati a fresco per il metabolismo degli xenobiotici e dei carboidrati, in quanto usano parte della loro energia per ristabilire l'ambiente cellulare e l'integrità di membrana originarie (Loven *et al.*, 2005).

Lo studio qui effettuato ha comunque dimostrato che gli epatociti di suino, mantenendo l'espressione degli enzimi biotrasformativi e dei recettori nucleari anche in seguito a crioconservazione, possono indiscutibilmente essere impiegati per successivi studi di induzione.

Considerando inoltre l'elevata qualità degli epatociti ottenuta a seguito dello scongelamento e la possibilità di sostituire il semplice *coating* di collagene con biomatrice epatica specie-specifica, in futuro potrà essere valutato l'utilizzo degli epatociti crioconservati anche per studi di metabolismo a breve termine.

Benché gli epatociti crioconservati offrano notevoli applicazioni diverse, gli epatociti primari isolati a fresco rimangono il modello fondamentale nel caso in cui si vogliono effettuare studi di metabolismo, in cui sono richiesti un completo corredo metabolico e inalterati *pathways* cellulari. Per questo motivo nella seconda parte di questa tesi si è cercato di mettere a punto un protocollo di isolamento di epatociti primari di bovino, ottenendo però dei risultati solo in parte soddisfacenti. Infatti, se da un lato, tutte le modifiche da noi attuate al protocollo sono da considerarsi fondamentali per il raggiungimento di un protocollo di isolamento ottimale, dall'altro i risultati ottenuti ci spingono alla ricerca di ulteriori migliorie. *In primis* il punto critico rilevato e, purtroppo, da noi non risolto, rimane quello legato al tempo troppo elevato che intercorre al macello tra l'abbattimento dell'animale ed il campionamento dell'organo. Per ovviare a questo problema, l'unica soluzione possibile risulta quella di isolare gli epatociti a partire da un lobo prelevato direttamente da un bovino sacrificato *in situ*. Questo ci permetterebbe sicuramente di ridurre drasticamente il tempo della fase che precede l'isolamento, evitando così la perdita di vitalità e la comparsa di alterazioni nella funzionalità degli epatociti.

6. BIBLIOGRAFIA

Abadie-Viollon, C., Martin, H., Blanchard, N., Pekthong, D., Bachellier, P., Mantion, G., Heyd, B., Schuler, F., Coassolo, P., Alexandre, E., Richert, L., 2010. Follow-up to the pre-validation of a harmonised protocol for assessment of CYP induction responses in freshly isolated and cryopreserved human hepatocytes with respect to culture format, treatment, positive reference inducers and incubation conditions. *Toxicol. In Vitro.* 24, 346-356.

Akiyama, T.E., Gonzalez, F.J., 2003. Regulation of P450 genes by liver-enriched transcription factors and nuclear receptors. *Biochim. Biophys. Acta* 1619, 223-234.

Aninat, C., Piton, A., Glaise, D., Le Charpentier, T., Langouet, S., Morel, F., Guguen-Guillouzo, C., Guillouzo, A., 2006. Expression of cytochromes P450, conjugating enzymes and nuclear receptors in human hepatoma HepaRG cells. *Drug Metab. Dispos.* 34, 75-83.

ANON. Establishment of an European Centre for the Validation of Alternative Methods (ecVAM). Communication from the commission and the parliament. SEC (91) 1794, Brussels, 1991, p 6.

Asha, S., Vidyavathi, M., 2010. Role of human liver microsomes in in vitro metabolism of drugs-a review. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 160, 1699-1722.

Baker, T.K., Carfagna, M.A., Gao, H., Dow, E.R., Li, Q., Searfoss, G.H., Ryan, T.P., 2001. Temporal gene expression analysis of monolayer cultured rat hepatocytes. *Chem. Res. Toxicol.* 14, 1218-1231.

Baldini, E., Cursio, R., Desousa, G., Margara, A., Honiger, J., Saint-Paul, M.C., Bayer, P., Raimondi, V., Rahmani, R., Mouiel, J., Gugenheim, J., 2009. Cryopreserved porcine hepatocytes: expression and induction of cytochrome P450, isoform CYP2E1. *Transplant. Proc.* 41, 1367-1369.

Baranczewski, P., Stanczak, A., Kautiainen, A., Sandin, P., Edlund, P.O., 2006. Introduction to early in vitro identification of metabolites of new chemical entities in drug discovery and development. *Pharmacol. Rep.* 58, 341-352.

Barile, F.A., 1994. Introduction to in vitro cytotoxicology. *Mechanisms and Methods*, p 24.

Bas, A., Forsberg, G., Hammarstrom, S., Hammarstrom, M.L., 2004. Utility of the housekeeping genes 18S rRNA, beta-actin and glyceraldehyde-3-phosphate-dehydrogenase for normalization in real-time quantitative reverse transcriptase-polymerase chain reaction analysis of gene expression in human T lymphocytes. *Scand. J. Immunol.* 59, 566-573.

Bickel, M.H., 1988. Adipose tissue storage of xenobiotics. In: Gorrod, J.W., Oelschlaeger, H. Caldwell Jeds Taylor & Francis "Metabolism of xenobiotics", London, pp 7-12.

Binda, D., Lasserre-Bigot, D., Bonet, A., Thomassin, M., Come, M.P., Guinchard, C., Bars, R., Jacqueson, A., Richert, L., 2003. Time course of cytochromes P450 decline during rat hepatocyte isolation and culture: effect of L-NAME. *Toxicol. In. Vitro.* 17, 59-67.

Bissell, D.M., Guzelian, P.S., 1980. Phenotypic stability of adult rat hepatocytes in primary monolayer culture. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 349, 85-98.

Brandon, E.F., Bosch, T.M., Deenen, M.J., Levink, R., van der Wal, E., van Meerveld, J.B., Bijl, M., Beijnen, J.H., Schellens, J.H., Meijerman, I., 2006. Validation of in vitro cell models used in drug metabolism and transport studies; genotyping of cytochrome P450, phase II enzymes and drug transporter polymorphisms in the human hepatoma (HepG2), ovarian carcinoma (IGROV-1) and colon carcinoma (CaCo-2, LS180) cell lines. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 211, 1-10.

Burk, O., Wojnowski, L., 2004. Cytochrome P450 3A and their regulation. *Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol.* 369, 105-124.

Cinelli, S., Falezza, A., Meli, C., Ciliutti, P., Vericat, J.A., 1991. Alternative methods in toxicology tests: in vitro toxicity. *Cytotechnology* 5 Suppl 1, 51-54.

Coldham, N.G., Moore, A.S., Dave, M., Graham, P.J., Sivapathasundaram, S., Lake, B.G., Sauer, M.J., 1995. Imidocarb residues in edible bovine tissues and in vitro assessment of imidocarb metabolism and cytotoxicity. *Drug Metab. Dispos.* 23, 501-505.

Coulet, M., Eeckhoutte, C., Larrieu, G., Sutra, J.F., Hoogenboom, L.A., Huveneers-Oorsprong, M.B., Kuiper, H.A., Castell, J.V., Alvinerie, M., Galtier, P., 1998. Comparative metabolism of thiabendazole in cultured hepatocytes from rats, rabbits, calves, pigs, and sheep, including the formation of protein-bound residues. *J. Agric. Food Chem.* 46, 742-748.

Danielson, P.B., 2002. The cytochrome P450 superfamily: biochemistry, evolution and drug metabolism in humans. *Curr. Drug Metab.* 3, 561-597.

de Graaf, I.A., Olinga, P., de Jager, M.H., Merema, M.T., de Kanter, R., van de Kerkhof, E.G., Groothuis, G.M., 2010. Preparation and incubation of precision-cut liver and intestinal slices for application in drug metabolism and toxicity studies. *Nat. Protoc.* 5, 1540-1551.

Desille, M., Corcos, L., L'Helgoualc'h, A., Fremont, B., Campion, J.P., Guillouzo, A., Clement, B., 1999. Detoxifying activity in pig livers and hepatocytes intended for xenotherapy. *Transplantation* 68, 1437-1443.

Donato, M.T., 2004. Que es el citocromo P-450 y como funciona. In: Angosto, M.C., Gomez-Lechon, M.J., "Citocromo P-450", Instituto de Espana, Real Academia Nacional de Farmacia, Madrid, 29-41, 320-321, 361.

Donato, M.T., Castell, J.V., 2003. Strategies and molecular probes to investigate the role of cytochrome P450 in drug metabolism: focus on in vitro studies. *Clin. Pharmacokinet.* 42, 153-178.

Donato, M.T., Castell, J.V., Gomez-Lechon, M.J., 1999. Characterization of drug metabolizing activities in pig hepatocytes for use in bioartificial liver devices: comparison with other hepatic cellular models. *J. Hepatol.* 31, 542-549.

Donato, M.T., O'Connor, J.E., 2004. Metodos de evaluacion del citocromo P450 y de s papel en el metabolism de los xenobioticos. In: Angosto, M.C., Gomez-Lechon, M.J., "Citocromo P-450", Instituto de Espana, Real Academia Nacional de Farmacia, Madrid, pp 29-41, 320-321,361.

Dvorak, Z., Modriansky, M., Pichard-Garcia, L., Balaguer, P., Vilarem, M.J., Ulrichova, J., Maurel, P., Pascussi, J.M., 2003. Colchicine down-regulates cytochrome P450 2B6, 2C8, 2C9, and 3A4 in human hepatocytes by affecting their glucocorticoid receptor-mediated regulation. *Mol. Pharmacol.* 64, 160-169.

Dvorak, Z., Pavek, P., 2010. Regulation of drug-metabolizing cytochrome P450 enzymes by glucocorticoids. *Drug Metab. Rev.* 42, 621-635.

EAGLE, H., 1955. Nutrition needs of mammalian cells in tissue culture. *Science* 122, 501-514.

Eisenbrand, G., Pool-Zobel, B., Baker, V., Balls, M., Blaauboer, B.J., Boobis, A., Carere, A., Kevekordes, S., Lhuguenot, J.C., Pieters, R., Kleiner, J., 2002. Methods of in vitro toxicology. *Food Chem. Toxicol.* 40, 193-236.

Fahmi, O.A., Kish, M., Boldt, S., Obach, R.S., 2010. Cytochrome P450 3A4 mRNA is a more reliable marker than CYP3A4 activity for detecting pregnane X receptor-activated induction of drug-metabolizing enzymes. *Drug Metab. Dispos.* 38, 1605-1611.

Ferguson, S.S., Chen, Y., LeCluyse, E.L., Negishi, M., Goldstein, J.A., 2005. Human CYP2C8 is transcriptionally regulated by the nuclear receptors constitutive androstane receptor, pregnane X receptor, glucocorticoid receptor, and hepatic nuclear factor 4alpha. *Mol. Pharmacol.* 68, 747-757.

Fotakis, G., Timbrell, J.A., 2006. In vitro cytotoxicity assays: comparison of LDH, neutral red, MTT and protein assay in hepatoma cell lines following exposure to cadmium chloride. *Toxicol. Lett.* 160, 171-177.

Freshney, I., 2001. Application of cell cultures to toxicology. *Cell Biol. Toxicol.* 17, 213-230.

- George, J., Goodwin, B., Liddle, C., Tapner, M., Farrell, G.C., 1997. Time-dependent expression of cytochrome P450 genes in primary cultures of well-differentiated human hepatocytes. *J. Lab. Clin. Med.* 129, 638-648.
- Glockner, R., Steinmetzer, P., Lupp, A., Danz, M., Muller, D., 2002. In vitro induction of cytochrome P450 2B1- and 3A1-mRNA and enzyme immunostaining in cryopreserved precision-cut rat liver slices. *Toxicology* 176, 187-193.
- Gomez-Lechon, M.J., Lahoz, A., Gombau, L., Castell, J.V., Donato, M.T., 2010. In vitro evaluation of potential hepatotoxicity induced by drugs. *Curr. Pharm. Des.* 16, 1963-1977.
- Goodwin, B., Redinbo, M.R., Kliewer, S.A., 2002. Regulation of cyp3a gene transcription by the pregnane x receptor. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 42, 1-23.
- Gruber, F.P., Hartung, T., 2004. Alternatives to animal experimentation in basic research. *ALTEX* 21 Suppl pp 1, 3-31.
- Ham, RG. 1984. Formulation of basal nutrient media. In: Barnes, DW., Sirbasku, DA., Sato, GH. EDS: "Cell culture methods for molecular and cell biology", New York, Alan Liss. Vol.1, pp 3-21.
- Honkakoski, P., Negishi, M., 1997. Characterization of a phenobarbital-responsive enhancer module in mouse P450 Cyp2b10 gene. *J. Biol. Chem.* 272, 14943-14949.
- Junqueira, L.C., Carniero, J., O.Kelley, R., 1998. Compendio di istologia- 4ª edizione italiana, PICCIN, Padova, Italia. Pp 11-12.
- Kliewer, S.A., Goodwin, B., Willson, T.M., 2002. The nuclear pregnane X receptor: a key regulator of xenobiotic metabolism. *Endocr. Rev.* 23, 687-702.
- Kniewald, J., Kmetec, I., Gaurina-Srcek, V., Kniewald, Z., 2005. Alternative models for toxicity testing of xenobiotics. *Arh. Hig. Rada. Toksikol.* 56, 195-204.

Kocarek, T.A., Schuetz, E.G., Guzelian, P.S., 1993. Expression of multiple forms of cytochrome P450 mRNAs in primary cultures of rat hepatocytes maintained on matrigel. *Mol. Pharmacol.* 43, 328-334.

Kubista, M., Andrade, J.M., Bengtsson, M., Forootan, A., Jonak, J., Lind, K., Sindelka, R., Sjoback, R., Sjogreen, B., Strombom, L., Stahlberg, A., Zoric, N., 2006. The real-time polymerase chain reaction. *Mol. Aspects Med.* 27, 95-125.

Kuilman, M.E., Maas, R.F., Fink-Gremmels, J., 2000. Cytochrome P450-mediated metabolism and cytotoxicity of aflatoxin B(1) in bovine hepatocytes. *Toxicol. In. Vitro.* 14, 321-327.

Kuilman, M.E., Maas, R.F., Judah, D.J., Fink-Gremmels, J., 1998. Bovine hepatic metabolism of aflatoxin B(1). *J. Agric. Food Chem.* 46, 2707-2713.

LeCluyse, E.L., 2001. Human hepatocyte culture systems for the in vitro evaluation of cytochrome P450 expression and regulation. *Eur. J. Pharm. Sci.* 13, 343-368.

Lemley, C.O., Wilson, M.E., 2010. Effect of cytochrome P450 and aldo-keto reductase inhibitors on progesterone inactivation in primary bovine hepatic cell cultures. *J. Dairy Sci.* 93, 4613-4624.

Li, A.P., 2007. Human hepatocytes: isolation, cryopreservation and applications in drug development. *Chem. Biol. Interact.* 168, 16-29.

Li, A.P., Gorycki, P.D., Hengstler, J.G., Kedderis, G.L., Koebe, H.G., Rahmani, R., de Sousas, G., Silva, J.M., Skett, P., 1999. Present status of the application of cryopreserved hepatocytes in the evaluation of xenobiotics: consensus of an international expert panel. *Chem. Biol. Interact.* 121, 117-123.

Lin, Y.S., Dowling, A.L., Quigley, S.D., Farin, F.M., Zhang, J., Lamba, J., Schuetz, E.G., Thummel, K.E., 2002. Co-regulation of CYP3A4 and CYP3A5 and contribution to hepatic and intestinal midazolam metabolism. *Mol. Pharmacol.* 62, 162-172.

Livak, K.J., Schmittgen, T.D., 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods* 25, 402-408.

Loven, A.D., Olsen, A.K., Friis, C., Andersen, B., 2005. Phase I and II metabolism and carbohydrate metabolism in cultured cryopreserved porcine hepatocytes. *Chem. Biol. Interact.* 155, 21-30.

Lu, C., Li, A.P., 2001. Species comparison in P450 induction: effects of dexamethasone, omeprazole, and rifampin on P450 isoforms 1A and 3A in primary cultured hepatocytes from man, Sprague-Dawley rat, minipig, and beagle dog. *Chem. Biol. Interact.* 134, 271-281.

Machala, M., Soucek, P., Neca, J., Ulrich, R., Lamka, J., Szotakova, B., Skalova, L., 2003. Inter-species comparisons of hepatic cytochrome P450 enzyme levels in male ruminants. *Arch. Toxicol.* 77, 555-560.

Madan, A., DeHaan, R., Mudra, D., Carroll, K., LeCluyse, E., Parkinson, A., 1999. Effect of cryopreservation on cytochrome P-450 enzyme induction in cultured rat hepatocytes. *Drug Metab. Dispos.* 27, 327-335.

Martin, P., Riley, R., Thompson, P., Williams, D., Back, D., Owen, A., 2010. Effect of prototypical inducers on ligand activated nuclear receptor regulated drug disposition genes in rodent hepatic and intestinal cells. *Acta Pharmacol. Sin.* 31, 51-65.

Martinez-Larranaga, M.R., Anadon, A., Fernandez-Cruz, M.L., Diaz, M.J., Martinez, M.A., Frejo, M.T., Martinez, M., Tafur, M., 2000. Cytotoxicity in pig hepatocytes induced by 8-quinolinol, chloramine-T and natamycin. *J. Vet. Pharmacol. Ther.* 23, 37-44.

Monshouwer, M., Van't Klooster, G.A., Nijmeijer, S.M., Witkamp, R.F., van Miert, A.S., 1998. Characterization of cytochrome P450 isoenzymes in primary cultures of pig hepatocytes. *Toxicol. In Vitro.* 12, 715-723.

Muller, P., Aurich, H., Wenkel, R., Schaffner, I., Wolff, I., Walldorf, J., Fleig, W.E., Christ, B., 2004. Serum-free cryopreservation of porcine hepatocytes. *Cell Tissue Res.* 317, 45-56.

Nahmias, Y., Berthiaume, F., Yarmush, M.L., 2007. Integration of technologies for hepatic tissue engineering. *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.* 103, 309-329.

Naik, S., Trenkler, D., Santangini, H., Pan, J., Jauregui, H.O., 1996. Isolation and culture of porcine hepatocytes for artificial liver support. *Cell Transplant.* 5, 107-115.

Nannelli, A., Chirulli, V., Longo, V., Gervasi, P.G., 2008. Expression and induction by rifampicin of CAR- and PXR-regulated CYP2B and CYP3A in liver, kidney and airways of pig. *Toxicol.* 252, 105-112.

Nakagawa-Tosa, N., Morimatsu, M., Mominoki, K., Nakatsuji, H., Syuto, B., Saito, M., 1994. Isolation and primary culture of bovine hepatocytes: albumin synthesis and adrenergic activation of glycogenolysis. *J. Vet. Med. Sci.* 56, 125-129.

Nebbia, C., 2009. Residui di farmaci e contaminanti ambientali nelle produzioni animali. *EdiSES, Napoli.* 1, pp 4-13.

Nakajima, T., Elovaara, E., Park, S.S., Gelboin, H.V., Hietanen, E., Vainio, H., 1990. Monoclonal antibody-directed characterization of benzene, ethoxyresorufin and pentoxyresorufin metabolism in rat liver microsomes. *Biochem. Pharmacol.* 40, 1255-1261.

Nelson, L.J., Walker, S.W., Hayes, P.C., Plevris, J.N., 2010. Low-shear modelled microgravity environment maintains morphology and differentiated functionality of primary porcine hepatocyte cultures. *Cells Tissues Organs* 192, 125-140.

Neve, E.P., Ingelman-Sundberg, M., 2010. Cytochrome P450 proteins: retention and distribution from the endoplasmic reticulum. *Curr. Opin. Drug Discov. Devel.* 13, 78-85.

Nishibe, Y., Hirata, M., 1993. Effect of phenobarbital and other model inducers on cytochrome P450 isoenzymes in primary culture of dog hepatocytes. *Xenobiotica* 23, 681-692.

Nishimura, M., Ejiri, Y., Kishimoto, S., Suzuki, S., Satoh, T., Horie, T., Narimatsu, S., Naito, S., 2010. Expression Levels of Drug-metabolizing Enzyme, Transporter and Nuclear Receptor mRNAs in a Novel Three-dimensional Culture System for Human Hepatocytes using Micro-space Plates. *Drug Metab. Pharmacokinet.* DOI:10.2133/dmpk.DMPK-10-RG-069

Paine, A.J., 1996. Validity and reliability of in vitro systems in safety evaluation. *Environmental Toxicol. Pharmacol.* 2, 207-212

Palatini, P., 2010. *Principi generali di farmacocinetica e farmacoterapia.* CLEUP, Padova, Italia. pp 91-137.

Parkinson, A., 2001. Biotrasformation of xenobiotics. 133-224. In: Klaassen, C.D., Casarett & Doull's "Toxicology, the basic science of poisons", 6th edition, Mc Graw Hill, New York, pp 133-224.

Pascussi, J.M., Drocourt, L., Gerbal-Chaloin, S., Fabre, J.M., Maurel, P., Vilarem, M.J., 2001. Dual effect of dexamethasone on CYP3A4 gene expression in human hepatocytes. Sequential role of glucocorticoid receptor and pregnane X receptor. *Eur. J. Biochem.* 268, 6346-6358.

Pascussi, J.M., Gerbal-Chaloin, S., Drocourt, L., Maurel, P., Vilarem, M.J., 2003. The expression of CYP2B6, CYP2C9 and CYP3A4 genes: a tangle of networks of nuclear and steroid receptors. *Biochim. Biophys. Acta* 1619, 243-253.

Penco, Mariottini, 2003. *Introduzione alle colture cellulari –metodiche relative.* Morgan, Edizioni Tecniche. pp 4-20

Puccinelli, E., Gervasi, P.G., La Marca, M., Befly, P., Longo, V., 2010. Expression and inducibility by phenobarbital of CYP2C33, CYP2C42, CYP2C49, CYP2B22, and CYP3As in porcine liver, kidney, small intestine, and nasal tissues. *Xenobiotica* 40, 525-535.

Radonic, A., Thulke, S., Mackay, I.M., Landt, O., Siegert, W., Nitsche, A., 2004. Guideline to reference gene selection for quantitative real-time PCR. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 313, 856-862.

Rahamani, R., de Sousa, G., Lacarelle, B., Rahamani-Jourdheuil, D., Placidi, M., Catalin, J., 1990. Use of human hepatic cellular and subcellular model for assessing drug transport, biotransformation and toxicity. In: Man and the laboratory animals-perspectives for 1992. Foundation Mérieux, Lyon. pp 539-43.

Rojkind, M., Gatmaitan, Z., Mackensen, S., Giambrone, M.A., Ponce, P., Reid, L.M., 1980. Connective tissue biomatrix: its isolation and utilization for long-term cultures of normal rat hepatocytes. *J. Cell Biol.* 87, 255-263.

Roymans, D., Annaert, P., Van Houdt, J., Weygers, A., Noukens, J., Sensenhauser, C., Silva, J., Van Looveren, C., Hendrickx, J., Mannens, G., Meuldermans, W., 2005. Expression and induction potential of cytochromes P450 in human cryopreserved hepatocytes. *Drug Metab. Dispos.* 33, 1004-1016.

Sawada, M., Kamataki, T., 1998. Genetically engineered cells stably expressing cytochrome P450 and their application to mutagen assays. *Mutat. Res.* 411:19-43.

Schneider, C., Aurich, H., Wenkel, R., Christ, B., 2006. Propagation and functional characterization of serum-free cultured porcine hepatocytes for downstream applications. *Cell Tissue Res.* 323, 433-442.

Seglen, P.O., 1976. Preparation of isolated rat liver cells. *Methods Cell Biol.* 13, 29-83.

Sidhu, J.S., Liu, F., Omiecinski, C.J., 2004. Phenobarbital responsiveness as a uniquely sensitive indicator of hepatocyte differentiation status: requirement of dexamethasone and extracellular matrix in establishing the functional integrity of cultured primary rat hepatocytes. *Exp. Cell Res.* 292, 252-264.

Silva, J.M., Day, S.H., Nicoll-Griffith, D.A., 1999. Induction of cytochrome-P450 in cryopreserved rat and human hepatocytes. *Chem. Biol. Interact.* 121, 49-63.

Skaanild, M.T., 2006. Porcine cytochrome P450 and metabolism. *Curr. Pharm. Des.* 12, 1421-1427.

Skaanild, M.T., Friis, C., 2000. Expression changes of CYP2A and CYP3A in microsomes from pig liver and cultured hepatocytes. *Pharmacol. Toxicol.* 87, 174-178.

Soucek, P., Zuber, R., Anzenbacherova, E., Anzenbacher, P., Guengerich, F.P., 2001. Minipig cytochrome P450 3A, 2A and 2C enzymes have similar properties to human analogs. *BMC Pharmacol.* 1, 11.

Swales, N.J., Luong, C., Caldwell, J., 1996. Cryopreservation of rat and mouse hepatocytes. I. Comparative viability studies. *Drug Metab. Dispos.* 24, 1218-1223.

Swales, N.J., Utesch, D., 1998. Metabolic activity of fresh and cryopreserved dog hepatocyte suspensions. *Xenobiotica* 28, 937-948.

Swindle, M.M., Smith, A.C., 1998. Comparative anatomy and physiology of the pig. *Scand. J. Lab. Anim. Sci. Suppl.* 25, 11-22

Townsend, A.J., Kiningham, K.K., St Clair, D., Tephly, T.R., Morrow, C.S., Guengerich, F.P., 1999. Symposium overview: Characterization of xenobiotic metabolizing enzyme function using heterologous expression systems. *Toxicol. Sci.* 48, 143-150.

van der Laan, S., Meijer, O.C., 2008. Pharmacology of glucocorticoids: beyond receptors. *Eur. J. Pharmacol.* 585, 483-491.

Vickers, A.E., Fisher, R.L., 2005. Precision-cut organ slices to investigate target organ injury. *Expert Opin. Drug Metab. Toxicol.* 1, 687-699.

Walum, E., Hedander, J., Garberg, P., 2005. Research perspectives for pre-screening alternatives to animal experimentation: on the relevance of cytotoxicity measurements, barrier passage determinations and high throughput screening in vitro to select potentially hazardous compounds in large sets of chemicals. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 207, 393-397.

Weaver, R.F., 2008. *Biologia molecolare* 2ª edizione, McGraw-Hill, Milano, Italia. pp 755-820.

- Willson, T.M., Kliewer, S.A., 2002. PXR, CAR and drug metabolism. *Nat. Rev. Drug Discov.* 1, 259-266.
- Wong, M.L., Medrano, J.F., 2005. Real-time PCR for mRNA quantitation. *BioTechniques* 39, 75-85.
- Wrighton, S.A., Stevens, J.C., 1992. The human hepatic cytochromes P450 involved in drug metabolism. *Crit. Rev. Toxicol.* 22, 1-21.
- Wu, X., Huang, K., Wei, C., Chen, F., Pan, C., 2010. Regulation of cellular glutathione peroxidase by different forms and concentrations of selenium in primary cultured bovine hepatocytes. *J. Nutr. Biochem.* 21, 153-161.
- Xie, W., Barwick, J.L., Simon, C.M., Pierce, A.M., Safe, S., Blumberg, B., Guzelian, P.S., Evans, R.M., 2000. Reciprocal activation of xenobiotic response genes by nuclear receptors SXR/PXR and CAR. *Genes Dev.* 14, 3014-3023.
- Yamamoto, N., Wu, J., Zhang, Y., Catana, A.M., Cai, H., Strom, S., Novikoff, P.M., Zern, M.A., 2006. An optimal culture condition maintains human hepatocyte phenotype after long-term culture. *Hepatol. Res.* 35, 169-177.
- Zaleski, J., Richburg, J., Kauffman, F.C., 1993. Preservation of the rate and profile of xenobiotic metabolism in rat hepatocytes stored in liquid nitrogen. *Biochem. Pharmacol.* 46, 111-116.
- Zanchi, N.E., Filho, M.A., Felitti, V., Nicastro, H., Lorenzetti, F.M., Lancha, A.H., Jr, 2010. Glucocorticoids: extensive physiological actions modulated through multiple mechanisms of gene regulation. *J. Cell. Physiol.* 224, 311-315.
- Zucco, F., Bianchi, V., 1994. *Colture cellulari in tossicologia*. Lombardo editore, Roma. pp 7-53, 99-116.
- Zucco, F., De Angelis, I., Testai, E., Stamatii, A., 2004. Toxicology investigations with cell culture systems: 20 years after. *Toxicol. In Vitro.* 18, 153-163.

7. SITOGRAFIA

<http://ncbi.nlm.nih.gov/>

<http://ensembl.org/index.html>

<http://toulouse.inra.fr/multelin/multalin>

<http://www.roche-applied-science.com>

<http://www.roche-applied-science.com>

8. RINGRAZIAMENTI

Il mio primo ringraziamento va ai miei cari genitori Alessandro ed Annamaria.

Grazie papà per aver creduto in me e per avermi sempre incoraggiata ad andare avanti, spero di non averti mai deluso, se oggi sono arrivata fin qui è soprattutto merito tuo. GRAZIE!!!

Grazie a te mamma perché mi hai sempre ascoltata e sopportata nelle mie lune e momenti no; con la tua dolcezza mi hai fatto sentire meno lontana da casa...le nostre mille telefonate ed i nostri messaggini della buonanotte sono stati linfa vitale in questi anni. GRAZIE!!!

Ricordatevi che vi voglio un gran bene!!!

Un grande Grazie alla mia relatrice Mery: per tutto quello che mi hai pazientemente insegnato in questo bellissimo anno, mi hai trasmesso sicurezza e tanta voglia di ricerca!!! Ti prometto che farò di tutto per non sottovalutarmi mai, tu però ricordati che le chiacchierate migliori si fanno sempre in compagnia di uno *scraper*!!! GRAZIE di cuore!!

Grazie al Prof. Dacasto per avermi messa alla prova scoprendo (spero) giorno dopo giorno che i SIAni non sono poi così terribili(o almeno non tutti)...grazie per la sua sincerità e trasparenza, e per tutte le volte che con Mery ha ascoltato le mie paranoie, aiutandomi a superare ogni momento di crisi. GRAZIE!!! (e W il TORO!! Mi sa che il mio ragazzo non sarà molto d'accordo su quest'ultimo punto 😊😊😊).

Un Grazie super speciale a Rosa perché è merito tuo se è iniziata la mia avventura lì con Voi...galeotto fu quel supermercato!!!! Grazie, grazie mille!!!

Un Grazie sentito a Vanessa per avermi seguita in tutti questi mesi...molto di quello che ho imparato lo devo a te...scusa se a volte combinando qualche pasticcio ti ho fatto perdere tempo prezioso...spero di essere stata comunque una buona allieva. Ti auguro di realizzarti al più presto nel lavoro e nella vita privata...te lo meriti!!!

Un Grazie alla Dott.^{ssa} Anna Granato per avermi insegnato alcuni buoni trucchi per ottenere tante belle cellule vitali e “sorridenti”!!! Grazie per l’aiuto prezioso e fondamentale che ci hai sempre dato!!!

Un grazie alle mie sorelle Stefania e Sabrina perché mi sono sempre state vicine aiutandomi ogni volta che ne avevo bisogno...grazie a voi e ai vostri buoni consigli da sorelle maggiori. Vi voglio bene!!!

Un grazie particolare va poi a mio cognato Luca per tutte le consulenze informatiche. Pazientemente mi hai risolto qualsiasi problema anche per telefono a 40 Km di distanza e sempre rigorosamente gratis!!! Grazie!!

Grazie alle mie amiche Elena, Elisa, Isabella, Lara e Silvia perché da 27 anni mi state vicino. Ormai abbiamo la certezza che non esiste crisi o problema che ci può dividere. Siete delle ragazze speciali e ognuna di voi è importantissima per me...le nostre chiacchierate infinite, le nostre uscite a ballare e a ridere a perdifiato o le nostre serate più tranquille trascorse a casa dell’una o dell’altra...i nostri mille pianti e, perché no, anche i tanti chiarimenti...tutto questo e molto di più ci rappresenta da tantissimi anni e così lo sarà per molto ancora...Grazie per ogni momento trascorso in vostra compagnia...Vi voglio bene!!!

Grazie a Roberta e Valentina le mie più care amiche SIAne, grazie perché la nostra amicizia continua a crescere nonostante la lontananza e le vie diverse che ognuna di noi ha intrapreso...ci basta una serata a chiacchierare sul lettone della Vane per capire quanto l’una è importante per l’altra...Grazie di tutto, siete le migliori, vi voglio bene!!!

Grazie a tutte le persone che hanno incrociato il mio cammino in questi ultimi anni alle mie colleghe di lavoro che ancor oggi mi esprimono la loro vicinanza ed il loro affetto..Grazie a Ornella, Betty, Stefy, Fabiola, Michela, Silvia...è stato un vero piacere lavorare con voi!!!

Grazie a Francesca, Floriana, Laura, Giorgia, Valentina, Emanuela, Lorenzo, Eleonora e Laura per le lezioni, appunti, consigli d’esame, chiacchierate e tanto altro vissuto in questi anni di BAL. Grazie.

Grazie alla mia cuginetta Alessandra che mi tiene sempre lì, in uno spazietto del suo cuore, sei come una piccola sorella minore (quella che non ho mai avuto), da buona madrina spero di darti sempre il buon esempio...ricordandoti che io per te ci sarò sempre...Ti voglio bene bella!!!

Infine, l'ultimo ma più importante Grazie va a VALENTINO, l'uomo della mia vita. Ti voglio ringraziare perché con amore mi sei sempre stato accanto per tutti questi nove anni e mezzo...Dedico questa mia laurea anche a te e al nostro futuro insieme augurandoci che tutti i nostri sogni si avverino al più presto...Ti amo!!!

PS: Grazie anche al mio cagnolone Togo: la mia ombra vivente...per la sua simpatica frenesia e per l'affetto che mi dimostra ogni volta che ritorno a casa!!! E a Stella per aver realizzato il mio sogno e per tutte le belle cavalcate...ora divertiti sui colli fiorentini!!!