

**SCHEMA PER LA PRESENTAZIONE DI UN PROGETTO DI RICERCA AI SENSI DEL
DECRETO LEGISLATIVO 116/92***

ID PROTOCOLLO: 18/79/2014

TITOLO DEL PROGETTO DI RICERCA:

Studi della plasticità neuronale e dei meccanismi di riparazione del danno infiammatorio in colture primarie di neuroni del plesso mienterico di cavia e ratto trattate con sovratananti di pazienti con sindrome dell'intestino irritabile (IBS)

RESPONSABILE DEL PROGETTO DI RICERCA:

COGNOME: DE PONTI

NOME: FABRIZIO

CODICE FISCALE: DPNFRZ58D05G388F RESIDENZA: Via Massarenti 9 - 40138 Bologna

STRUTTURA DI AFFERENZA: DIPARTIMENTO DI SCIENZE MEDICHE E CHIRURGICHE

RESPONSABILE DELL'ESECUZIONE DEGLI ESPERIMENTI:

COGNOME: VASINA

NOME: VALENTINA

CODICE FISCALE: VSNVNT73M62H199M RESIDENZA: Via Massarenti 9 - 40138 Bologna

STRUTTURA DI AFFERENZA: DIPARTIMENTO DI SCIENZE MEDICHE E CHIRURGICHE

RESPONSABILE DELLO STABULARIO:

COGNOME: HRELIA

NOME: PATRIZIA

CODICE FISCALE: HRLPRZ57P51B157H RESIDENZA: Via Imerio n. 48

UBICAZIONE STABULARIO: Dipartimento di Farmacia e Biotecnologie (FaBiT) (ex Dipartimento di Farmacologia), Via Imerio n. 48

* SE GLI ESPERIMENTI IMPLICANO DEROGA IN BASE ALL'ARTICOLO 8 E ALL'ARTICOLO 9 IL PRESENTE SCHEMA DEVE ESSERE ALLEGATO ALLA SPECIFICA DOMANDA

MEDICO VETERINARIO RESPONSABILE DEI CONTROLLI DI CUI ALL'ARTICOLO 6

DEL DECRETO LEGISLATIVO 116/92:

Servizio Veterinario Centralizzato per la protezione degli animali utilizzati ai fini sperimentali (Prof. Angelo Peli)

SI PREVEDE DI UTILIZZARE N.

90 Porcellini d'India (Cavia porcellus)()

90 Ratti (Rattus norvegicus)(Sprague Dawley)

GLI ANIMALI SARANNO STABULATI NEI LOCALI:

Dipartimento di Farmacia e Biotecnologie (FaBiT) (ex Dipartimento di Farmacologia), Via Imerio n. 48

GLI ANIMALI SARANNO UTILIZZATI NEI LOCALI:

DIPARTIMENTO DI FARMACIA E BIOTECNOLOGIE

FORNITORI:

Charles River Laboratories

OBIETTIVO DEL PROGETTO DI RICERCA:

- Caratterizzare il sistema nervoso enterico in colture primarie di neuroni mienterici sia in condizioni fisiologiche che in seguito a danno infiammatorio in vitro e studiare i principali mediatori di neuroplasticità.

- Studiare gli effetti di sovratananti ottenuti da pazienti con IBS in colture primarie di neuroni mienterici mediante l'utilizzo di tecniche bio-molecolari, ed immunocitochimiche.

DURATA DELLA SPERIMENTAZIONE:

36 mesi

PERSONALE CHE ATTENDE ALLA ESECUZIONE DEGLI ESPERIMENTI E/O AL

CONTROLLO DEGLI ANIMALI (COMPRESO IL RESPONSABILE DEGLI

ESPERIMENTI):

Cognome e Nome	Titolo di studio	Qualifica	Struttura di Afferenza
VASINA VALENTINA	Laurea in Scienze Biologiche, Dottorato in Farmacologia e Tossicologia	Responsabile dell'esecuzione degli esperimenti	DIPARTIMENTO DI SCIENZE MEDICHE E CHIRURGICHE
VASINA VALENTINA	Laurea in Sc. Biologiche, PhD Farmacologia e Tossicologia	Personale tecnico	DIPARTIMENTO DI SCIENZE MEDICHE E CHIRURGICHE
DOTHEL GIOVANNI	Laurea in Biotecnologie	Dottorando di ricerca	DIPARTIMENTO DI SCIENZE MEDICHE E CHIRURGICHE

DESCRIZIONE DEI FINI DELL'ESPERIMENTO (ARTICOLO 3 D.L.VO 116/92):

La ricerca è volta a promuovere il progresso della biologia, all'ottenimento di acquisizioni scientifiche di base ed alla valutazione, rilevazione e controllo delle modificazioni delle condizioni fisiologiche del sistema nervoso enterico in colture primarie di neuroni mienterici nel ratto e nella cavia.

I risultati della ricerca sono di potenziale impiego per lo sviluppo di farmaci per la terapia intestinale della sindrome dell'intestino irritabile (IBS).

METODOLOGIA E TECNICA DELL'ESPERIMENTO:

Cavie e ratti adulti verranno soppressi per decapitazione previa anestesia profonda (isofluorano); successivamente saranno prelevati organi del tratto gastroenterico (segmenti dell'apparato digerente) e verranno espianate specifiche aree tissutali, da cui verranno isolati neuroni del plesso mienterico, messi in coltura per una settimana ed utilizzati per analisi immunocitochimiche, saggi enzimatici e biochimici, analisi di biologia molecolare per lo studio della plasticità neuronale e dei fenomeni di adattamento. Tali neuroni verranno inoltre utilizzati per testare sovrantanti di pazienti con la sindrome del colon irritabile (IBS) e controlli sani. Si tratta di un modello sperimentale in vitro che permette di ridurre notevolmente l'utilizzo degli animali (Reduction); infatti da un animale è possibile ottenere grandi quantità di cellule (gangli mienterici) per studiare in vitro la plasticità dei neuroni e l'adattamento degli stessi a diversi stimoli infiammatori. Tuttavia, a differenza delle linee cellulari, le colture primarie non possono essere amplificate all'infinito a partire da cellule ottenute da un solo soggetto, pertanto per testare i sovrantanti di un numero di controlli sani e pazienti con IBS sufficiente ad ottenere delle informazioni scientificamente valide e trasferibili alla clinica, è necessario utilizzare più animali per ottenere un numero sufficiente di colture primarie (come riferimento della validità della metodica che viene applicata, si allegano riferimenti bibliografici del nostro gruppo di ricerca, nonché il lavoro di Nasser et al., 2014). La scelta delle due diverse specie è giustificata dalla necessità di ottenere informazioni il più ampie possibili, infatti l'apparato digerente della cavia è stato molto studiato dal punto di vista morfologico funzionale, ma il suo genoma è stato sequenziato in minima parte, mentre il genoma del ratto è stato completamente sequenziato e pertanto tale specie si presta meglio per studi di tipo biomolecolare (RT-PCR, Real Time PCR, ecc.).

Si prevedono di utilizzare circa 30 cavie e 30 ratti all'anno per tre anni per un totale di 90 cavie e 90 ratti.

1) CHE TIPO DI SOFFERENZA SI RITIENE DI INFLIGGERE AGLI ANIMALI?

Poca o nessuna sofferenza

Alcune sofferenze (di breve durata)

Estreme e intollerabili sofferenze in animali coscienti

Forti privazioni, mutilazioni o altri traumi

2) ANESTESIA SI NO

3) TIPO DI ANESTESIA

isoflurano

3) GLI ANIMALI SONO SOPPRESSI TRAMITE

isoflurano

AL TERMINE DELLE PROCEDURE SPERIMENTALI GLI ANIMALI SONO

RIUTILIZZATI?:

SI NO

4) MODALITA' DI SMALTIMENTO:

incenerimento

DICHIARAZIONE RIFERITA ALLE PRESCRIZIONI DI CUI ALL'ARTICOLO 4

(INEVITABILITA' DEL RICORSO AD ESPERIMENTI SU ANIMALI E NECESSITA' DEL

RICORSO AD UNA SPECIE DETERMINATA ED AL TIPO DI ESPERIMENTO DI CUI

ALL'ARTICOLO 5 (RISPETTO DELLE CONDIZIONI)):

Per il raggiungimento degli obiettivi di cui sopra, non è possibile utilizzare altro metodo scientificamente valido che non implichi l'impiego degli animali, in quanto è necessario valutare risposte biologiche ottenibili soltanto in tessuti ottenuti da un organismo vivente.

Si assicura il rispetto delle condizioni di cui all'art. 5 in ogni fase della sperimentazione.

DOCUMENTAZIONE A CORREDO (BIBLIOGRAFIA,PUBBLICAZIONI ECC):

1. B. Balestra,R. Vicini,C. Cremon,L. Zecchi,G. Dothel,V. Vasina,R. De Giorgio,A. Paccapelo,O. Pastoris,V. Stanghellini,R. Corinaldesi,F. De Ponti,M. Tonini,G. Barbara(2012)"Colonic mucosal mediators from patients with irritable bowel syndrome excite enteric cholinergic motor neurons"
2. C. Cremon, G. Carini, G. Dothel, V. Vasina, R. De Giorgio, V. Stanghellini, F. De Ponti, M. Tonini, D. Grundy, R. Corinaldesi, G. Barbara(2010)"Altered Serotonin Signaling and Extrinsic Sensory Neuron Activation in Irritable Bowel Syndrome"
3. Cremon C, Carini G, Wang B, Vasina V, Cogliandro RF, De Giorgio R, Stanghellini V, Grundy D, Tonini M, De Ponti F, Corinaldesi R, Barbara G.(2011)"Intestinal serotonin release, sensory neuron activation, and abdominal pain in irritable bowel syndrome."
4. De Giorgio R., Vasina V., Ursino M.G., Barbara G., Stanghellini V., De Ponti F., Corinaldesi R.(2006)"Neuroplasticity of the enteric nervous system induced by inflammatory conditions in the gut"
5. G. Barbara, L. Gargano, C. Cremon, V. Vasina, G. Dothel, G. Carini, R. De Giorgio, V. Stanghellini, R. Cogliandro, M. Tonini, F. De Ponti, R. Corinaldesi(2010)"Nerve Growth and Plasticity in the Colonic Mucosa of Patients With Irritable Bowel Syndrome"
6. Giovanni Dothel,
Valentina Vasina,
Giovanni Barbara,
Fabrizio De Ponti
(2013)"Animal models of chemically induced intestinal inflammation: Predictivity and ethical issues"
7. Vasina V., Barbara G., Talamonti L., Stanghellini V., Corinaldesi R., Tonini M., De Ponti F., De Giorgio R.(2006): "Enteric neuroplasticity evoked by inflammation". AUTONOMIC NEUROSCIENCE: BASIC & CLINICAL, 126-127: 9
8. De Giorgio R, Guerrini S, Barbara G, Stanghellini V, De Ponti F, Corinaldesi R, Moses PL, Sharkey KA, Mawe GM. Inflammatory neuropathies of the enteric nervous system. Gastroenterology. 2004 Jun;126(7):1872-83.

9. De Giorgio R, Bovara M, Barbara G, Canossa M, Sarnelli G, De Ponti F, Stanghellini V, Tonini M, Cappello S, Pagnotta E, Nobile-Orazio E, Corinaldesi R. Anti-HuD-induced neuronal apoptosis underlying paraneoplastic gut dysmotility. *Gastroenterology*. 2003 Jul;125(1):70-9.

10. Nasser Y, Boeckxstaens GE, Wouters MM, Schemann M, S. Vanner. Using human intestinal biopsies to study the pathogenesis of irritable bowel syndrome. *Neurogastroenterology and Motility* Article published online: 14 FEB 2014 DOI: 10.1111/nmo.12316

N.B.: Si richiedono gli articoli Bibliografici sopra citati per esteso.

Il responsabile dell'esecuzione dell'esperimento

VASINA VALENTINA

Data, 06/03/2014

Il Responsabile del progetto di ricerca

DE PONTI FABRIZIO

IL DIRETTORE

MARCO ZOLI

MZ

