



≈ **WEBINAR**



innovazione e ricerca



Con il patrocinio di:



La tracciabilità e la valorizzazione del prodotto agroalimentare

strumenti di tutela e tecnologie innovative

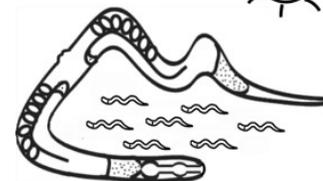
Una piattaforma tecnologica per saggi di tossicità e per l'implementazione delle proprietà nutrizionali degli alimenti

Scheda #1361: High Throughput Screening in vivo

25 Ottobre 2022

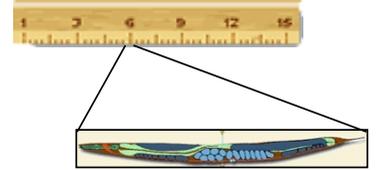
Elia Di Schiavi
IBBR, CNR
Napoli, Italia

Di Schiavi Lab 



Alcuni vantaggi nell'utilizzo di modelli non-vertebrati

- Sono piccoli (*C.elegans* = 1 mm) e prolifici (*C.elegans* = 300 figli), quindi «scalabili», si possono mettere su «chip» e possono essere «portatili»



- E' importante validare i risultati su molteplici specie animali



- In invertebrati si possono creare transgenici



- I test sono molto rapidi ed il costo molto più basso



Images from Google

La tracciabilità e la valorizzazione del prodotto agroalimentare

strumenti di tutela e tecnologie innovative

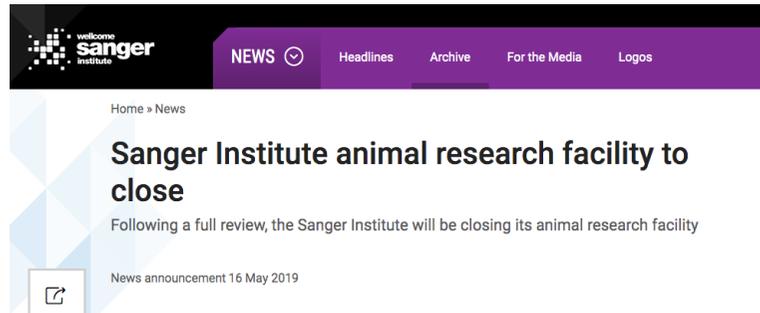
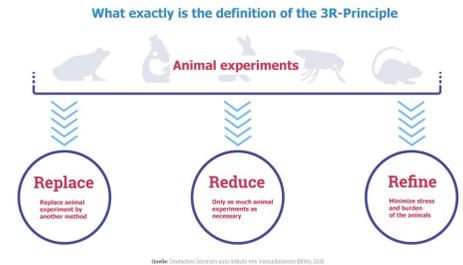


L'utilizzo di invertebrati è sempre più richiesto da vari stakeholders

La legge italiana (26/2014) e l'Unione Europea (Resolution 5/05/2009) ne incoraggiano l'uso.

C.elegans rispetta in pieno i principi delle 3R:

- Replacement/sostituzione** dei vertebrati con modelli alternativi;
- Riduzione** del numero di vertebrati utilizzati al massimo;
- Rifinire** il modo in cui gli esperimenti sono condotti.



Images from Google



- ✓ 20 times faster results with respect to testing on mice or rats
- ✓ No ethical constraints, 3R compliant solution, lower costs than mice

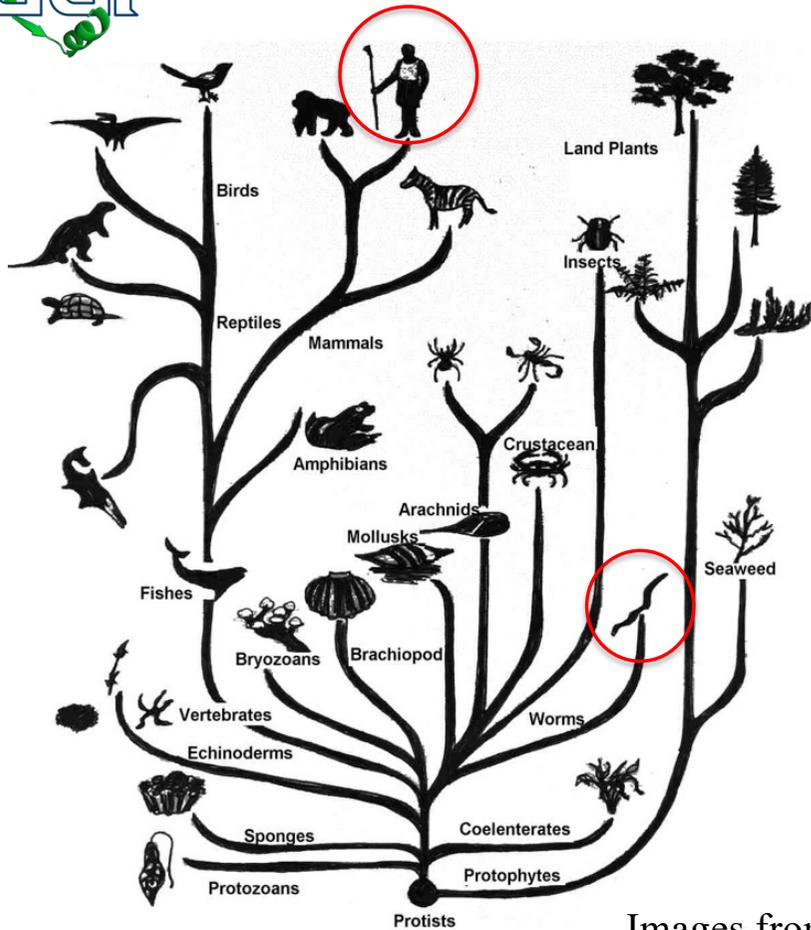


- ✓ Biological responses at cellular, tissular and organismal levels
- ✓ Research resources and genetic amenability at whole-organism level

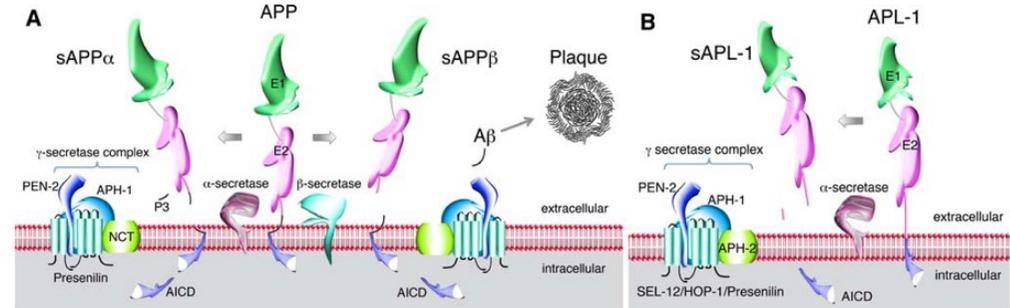
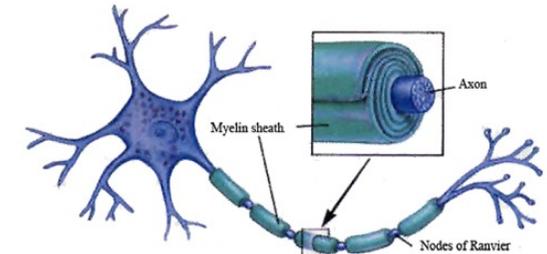
A complete **IN VIVO** model ... at the **IN VITRO** scale!

La tracciabilità e la valorizzazione del prodotto agroalimentare
strumenti di tutela e tecnologie innovative

Svantaggi di *C.elegans*



Images from Google



La tracciabilità e la valorizzazione del prodotto agroalimentare
 strumenti di tutela e tecnologie innovative

Che può fare *C. elegans* per voi?



La tracciabilità e la valorizzazione del prodotto agroalimentare
strumenti di tutela e tecnologie innovative



***C.elegans* è utilizzato per lo studio di contaminanti del cibo**

- Il *Center for Food Safety and Applied Nutrition* (CFSAN, FDA) è preoccupato per le miscele di metalli negli alimenti per bambini
- Per questo ha deciso di sviluppare test che utilizzano *C. elegans* per esaminare l'impatto dei metalli sulla neurotossicità dello sviluppo
- I test misurano i ritardi dello sviluppo e gli effetti sull'attività motoria
- I dati preliminari mostrano gli effetti dell'esposizione ad arsenico, cadmio, piombo e mercurio da soli e in miscele



(S.C. Fitzpatrick e A. Mattia, CFSAN/FDA NCTR/SAB 5 dicembre 2018)

La tracciabilità e la valorizzazione del prodotto agroalimentare

strumenti di tutela e tecnologie innovative



Consiglio Nazionale delle Ricerche

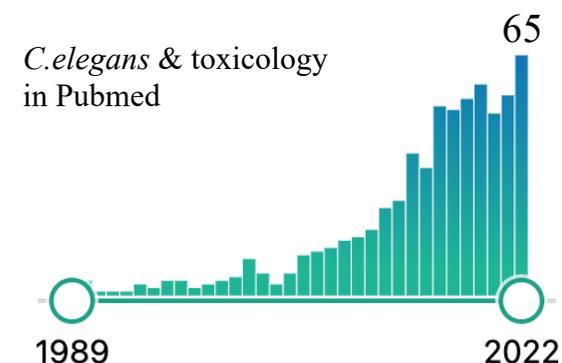
Meglio uno studio di tossicologia in topi o in *C.elegans*?



	Roditori	<i>C. elegans</i>
Numero di animali	10.000 – 20.000	100 – 200.000
Tempo	1 – 2 anni	3 – 5 giorni
Costo totale	2-3 milioni di \$	\$1000

J.H. Freedman (NIEHS, USA)

RESULTS BY YEAR



61.462 patents in Google patents

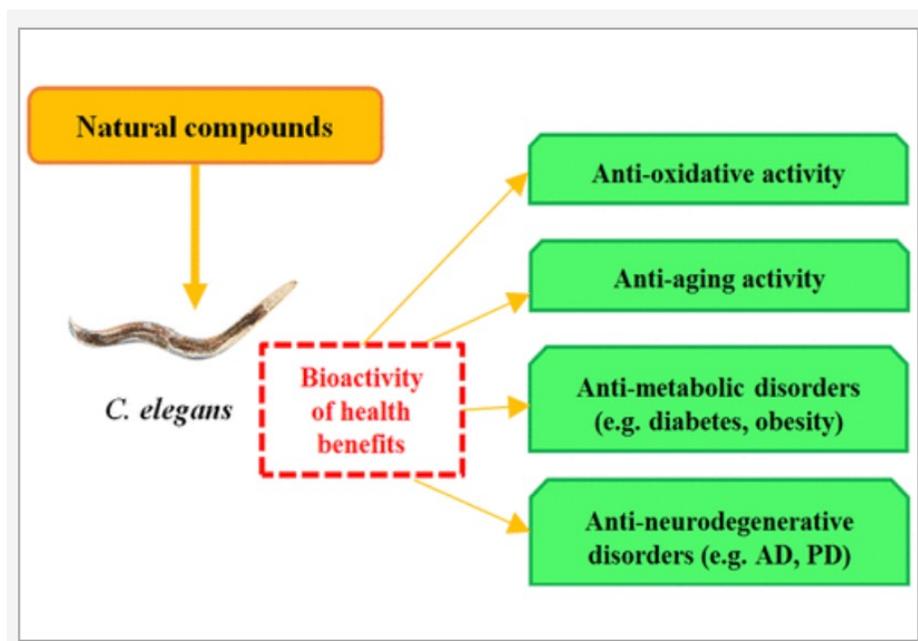
Il **costo al mese** di un progetto in *C.elegans* è simile d un laboratorio di microbiologia: **500/1000€** di reagenti più il personale (**1250/2000€**)

La correlazione della dose tossica in *C. elegans* e quella di ratto è simile a quella tra topo e ratto ($r = 0.879$). Questa correlazione è più alta che quella tra cellule NHK umane e ratto ($r = 0.844$).

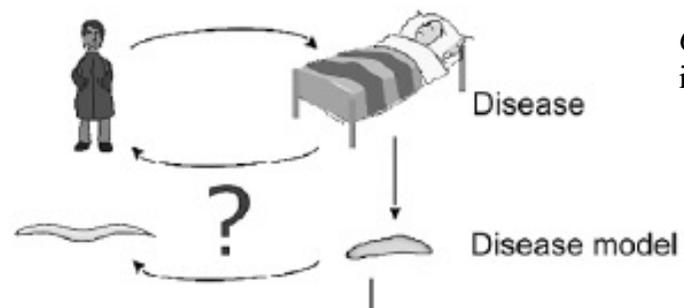
La tracciabilità e la valorizzazione del prodotto agroalimentare

strumenti di tutela e tecnologie innovative

C.elegans viene ampiamente utilizzato per individuare nuovi nutraceutici e farmaci

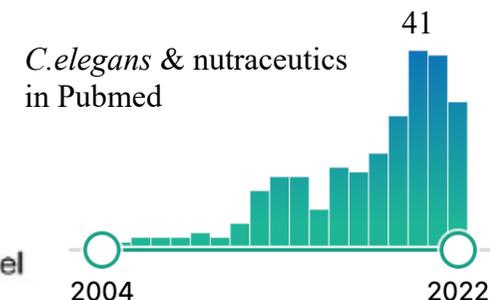


Liao, J. Agric. Food Chem. 2018

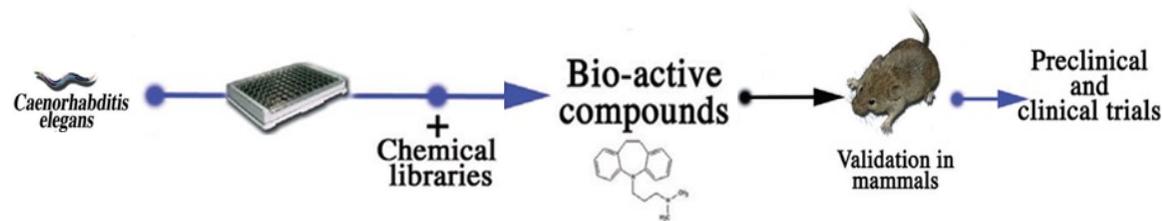


Artal-Sanz et al., Biotechn. J 2006

RESULTS BY YEAR



1.412 patents in Google patents



Giacomotto et al., BJ Pharma. 2010

La tracciabilità e la valorizzazione del prodotto agroalimentare

strumenti di tutela e tecnologie innovative



Il nostro contributo nella nutraceutica usando *C.elegans*

www.aging-us.com

AGING 2020, Vol. 12, Advance

Research Paper

Protective effect of *Vigna unguiculata* extract against aging and neurodegeneration

Farida Tripodi¹, Linda Lombardi¹, Lorenzo Guzzetti¹, Davide Panzeri¹, Riccardo Milanese¹, Manuela Leri^{2,3}, Monica Bucciantini², Cristina Angeloni⁴, Daniela Beghelli⁵, Silvana Hrelia⁶, Giada Onorato⁷, Elia Di Schiavi⁷, Ermelinda Falletta⁸, Simona Nonnis⁹, Gabriella Tedeschi⁹, Massimo Labra¹, Paola Cocchetti¹



Received: 8 February 2019 | Revised: 30 April 2019 | Accepted: 4 May 2019
DOI: 10.1002/fsn3.1078

ORIGINAL RESEARCH

Food Science & Nutrition 

Green kiwifruit extracts protect motor neurons from death in a spinal muscular atrophy model in *Caenorhabditis elegans*

Nadia Mazzarella | Ivana Giangrieco | Serena Visone | Pamela Santonicola |
Jannis Achenbach | Giuseppina Zampi | Maurizio Tamburrini | Elia Di Schiavi  |
Maria Antonietta Ciardiello 

ACS Chemical
Neuroscience

pubs.acs.org/chemneuro

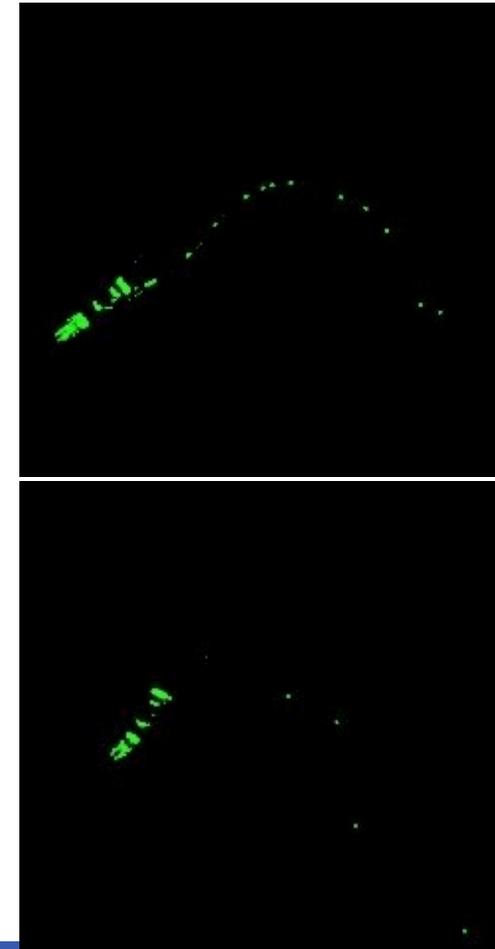
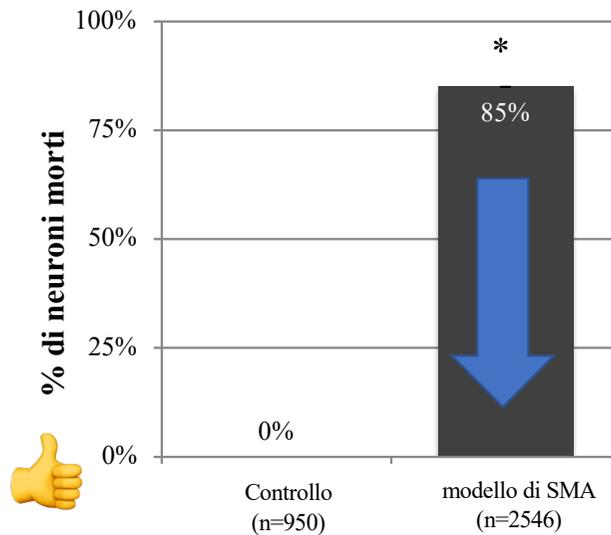
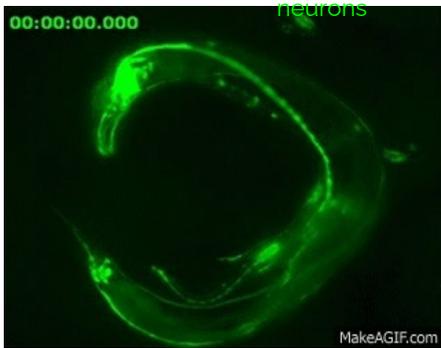
Research Article

Novel Curcumin-Diethyl Fumarate Hybrid as a Dualistic GSK-3 β Inhibitor/Nrf2 Inducer for the Treatment of Parkinson's Disease

Rita Maria Concetta Di Martino,[†] Letizia Pruccoli,[†] Alessandra Bisi, Silvia Gobbi, Angela Rampa, Ana Martinez, Concepción Pérez, Loreto Martinez-Gonzalez, Maria Paglione, Elia Di Schiavi, Francesca Seghetti, Andrea Tarozzi,* and Federica Belluti*

La tracciabilità e la valorizzazione del prodotto agroalimentare
strumenti di tutela e tecnologie innovative

Modelli di neurodegenerazione in *C.elegans* usando organismi interi e vivi



Controllo



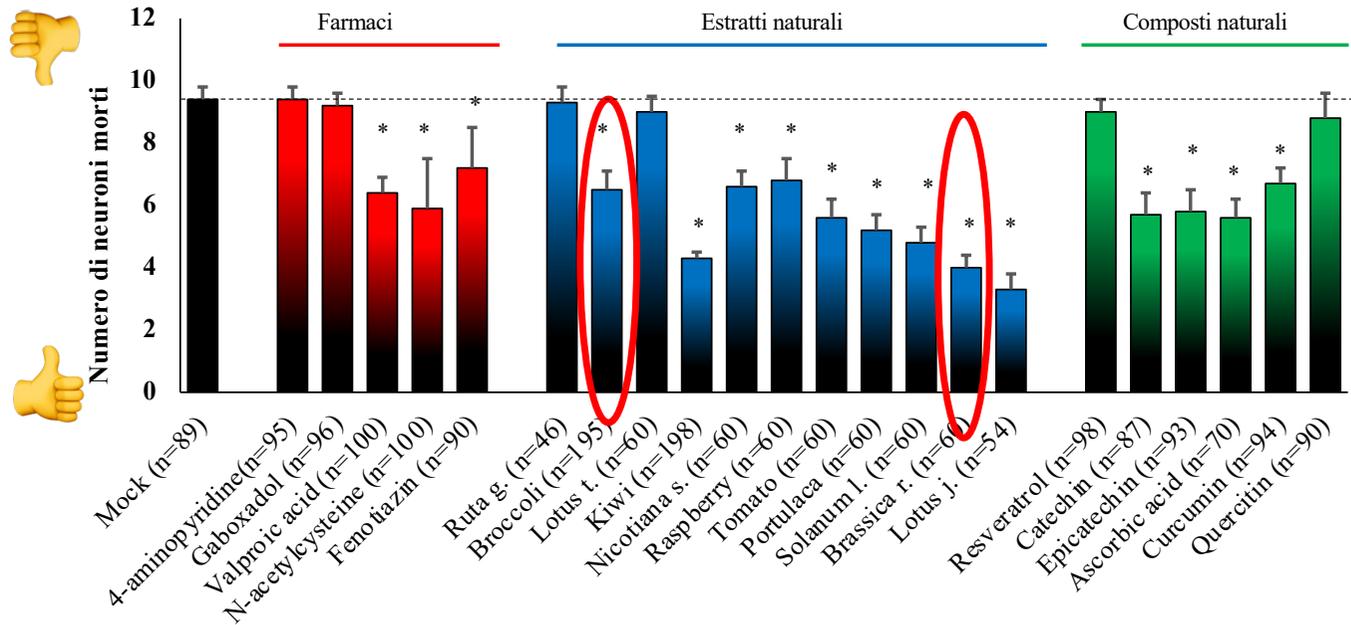
Modello di SMA

Gallotta *et al.*, HMG 2016

La tracciabilità e la valorizzazione del prodotto agroalimentare
strumenti di tutela e tecnologie innovative

Il mio estratto naturale è neuroprotettivo?

E quale parte della mia pianta è più efficace?



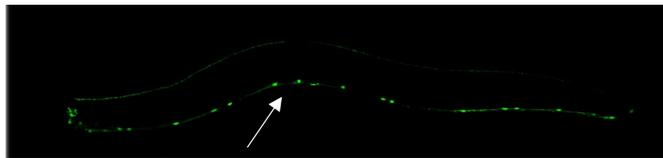
* p<0.02

Mazzarella et al., unpublished results

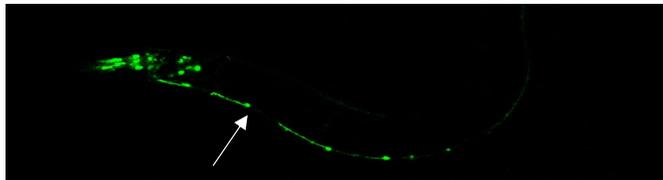
La tracciabilità e la valorizzazione del prodotto agroalimentare
strumenti di tutela e tecnologie innovative

Quale varietà della mia pianta è neuroprotettiva?

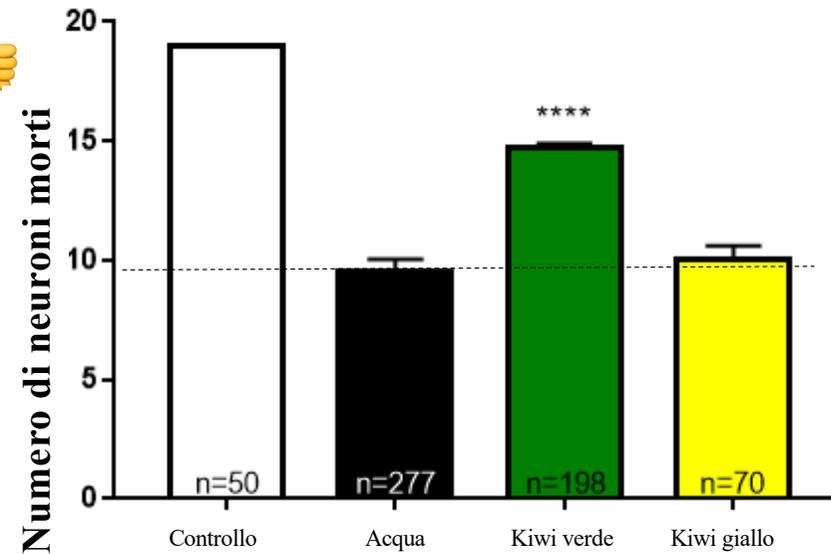
Neurodegenerazione



Controllo con 19 neuroni



Modello di SMA con pochi neuroni



modello di SMA

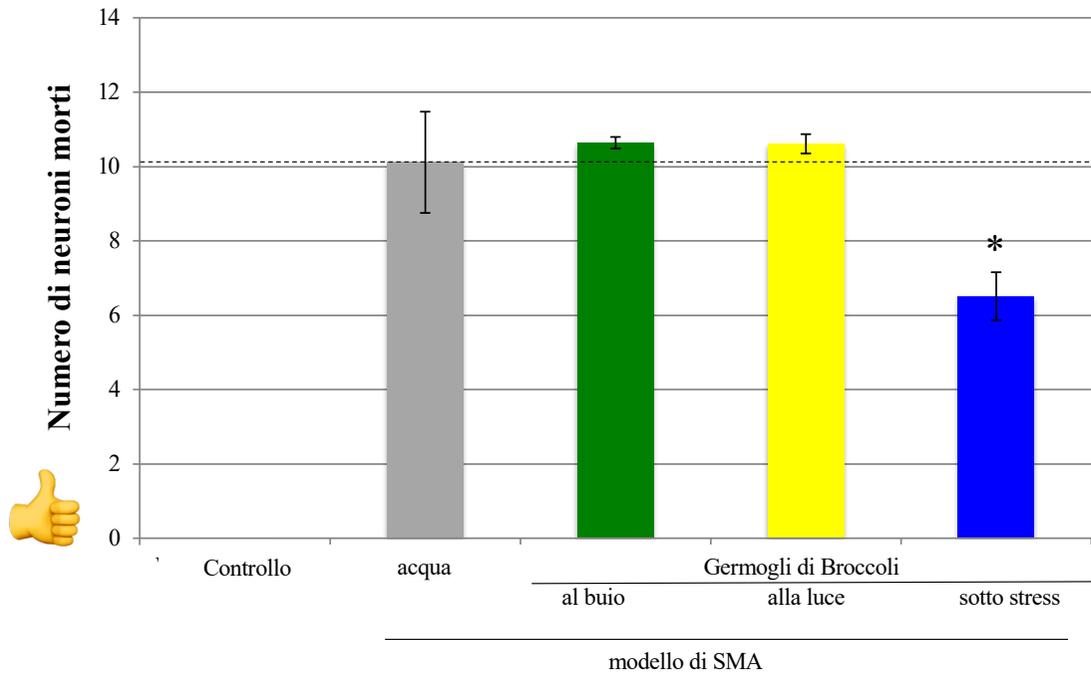


One-way ANOVA **** $p < 0.0001$

Mazzarella et al., Food Sci. Nutr. 2019

La tracciabilità e la valorizzazione del prodotto agroalimentare
strumenti di tutela e tecnologie innovative

In quali condizioni di crescita la mia pianta è neuroprotettiva?

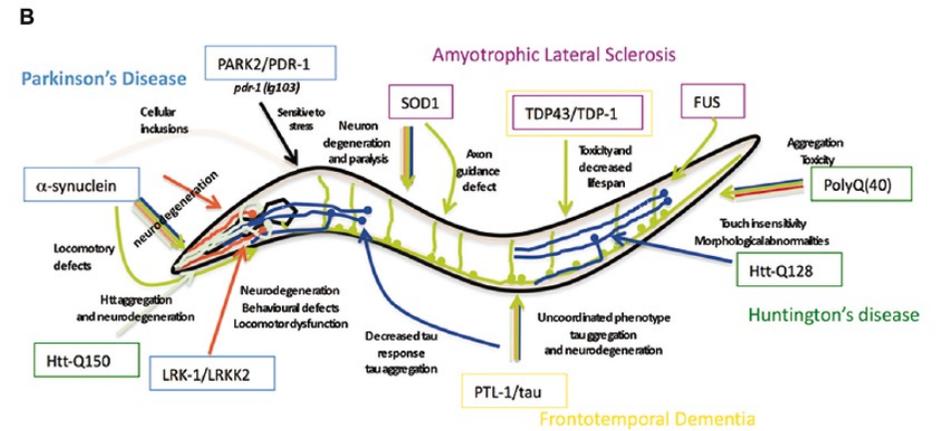


Mazzarella et al., unpublished results

La tracciabilità e la valorizzazione del prodotto agroalimentare
strumenti di tutela e tecnologie innovative

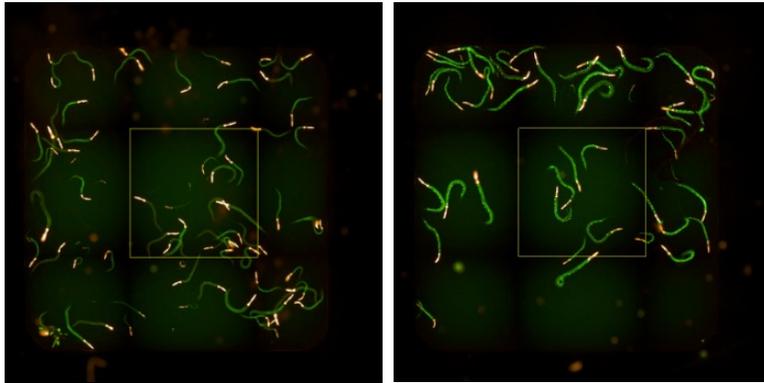
Modelli di malattie neurodegenerative in *C.elegans*

Disease	Strategy	Pathology and other findings	Reference
<i>Caenorhabditis elegans</i>			
AD	Pan neuronal expression of human A β 42	Deficits in odorant preference-associated learning behavior, serotonin-controlled behaviors, experience-dependent learning, and egg laying	(Dosanjh et al. 2010)
AD	Body wall muscle expression of human A β 42	Accumulation of amyloid deposits with fibrillary structure accompanied by progressive paralysis	(Link 1995)
AD	Inducible pan-neuronal expression of human A β 42	Neuronal amyloid deposits associated with subtle phenotypic changes	(Wu et al. 2006)
FTLD	Expression in dopaminergic neurons of wt or A53T mutant α -synuclein	Accumulation of insoluble phosphorylated tau, age-dependent neurodegeneration and neuronal loss, uncoordinated movement, and greater toxicity in worms expressing the FTLD-17 mutant tau than the wt form	(Kraemer et al. 2003)
FTLD/ALS	Pan neuronal expression of wt human TDP-43	Motor neuron dysfunction, abnormal motor neuron synapses, and uncoordinated phenotype	(Ash et al. 2010)
PD	Expression in dopaminergic neurons of wt or A53T mutant α -synuclein	Degeneration and loss of dopaminergic neurons including dendritic atrophy and accumulation of α -synuclein in perikarya	(Lakso et al. 2003; Settivari et al. 2009; Kuwahara et al. 2006; Harrington et al. 2010; Settivari et al. 2009)
HD	Expression of the polyglutamine repeat HT-Q150 in sensory neurons	Age-dependent neuronal dysfunction	(Faber et al. 1999)
HD	Genome wide RNAi screen for modifiers of YFP-polyQ aggregation	Identification of large set of genes involved in protein folding or degradation that increase polyQ aggregation when their expression is knocked down	(Nollen et al. 2004)



Alexander et al., Front Genet 2014

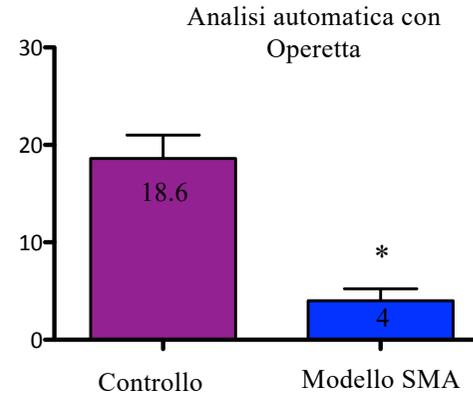
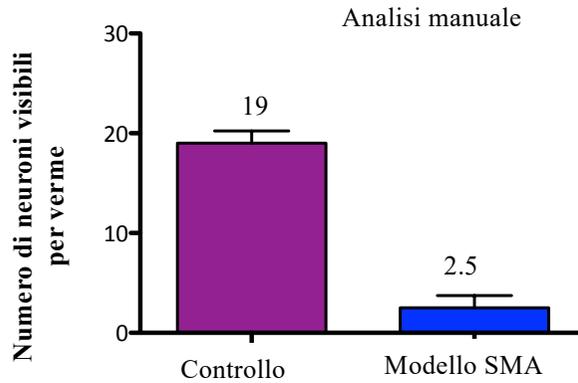
High Content Screening per individuazione di molteplici condizioni di neuroprotezione



Operetta (Perkin Elmer)
100.000€



Pochi composti al giorno
Volumi da 2 a 5 mL



Moltissimi composti al giorno
Volumi da 70µL

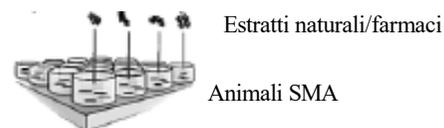
Santonicola et al., unpublished results

La tracciabilità e la valorizzazione del prodotto agroalimentare
strumenti di tutela e tecnologie innovative



High Content Screening per l'individuazione di molteplici estratti/condizioni di neuroprotezione

Screening primario con piastre da 384 pozzetti

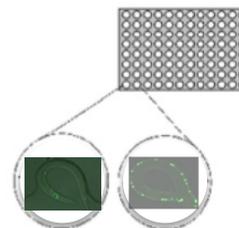


High content screening con Operetta (Perkin Elmer)



Identificazione di estratti con ruolo neuroprotettivo

Pochi neuroni:
nessun effetto



Molti neuroni: estratto neuroprotettivo

Santonicola et al., unpublished results
Patent under preparation

384 composti a settimana

La tracciabilità e la valorizzazione del prodotto agroalimentare
strumenti di tutela e tecnologie innovative

Mezzi segreti da microalghe, ma non da pomodori, aumentano la locomozione dell'animale

Microalghe

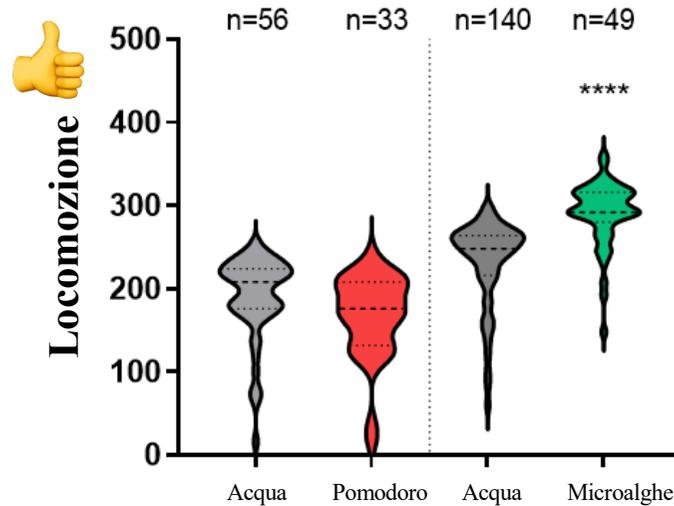


T. chuii

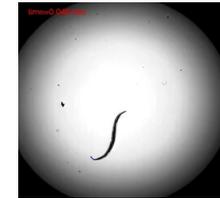
Pomodoro
Picadilly



Solanum l.



Locomozione



10.000€
Volumi da 50 µL

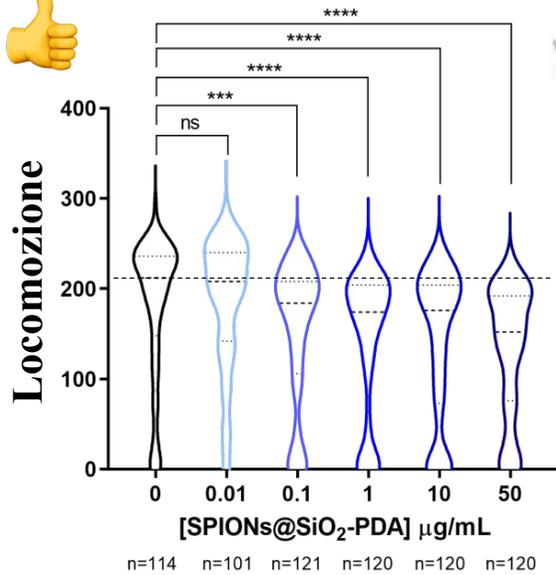
96 composti al giorno

Santonicola et al., unpublished results

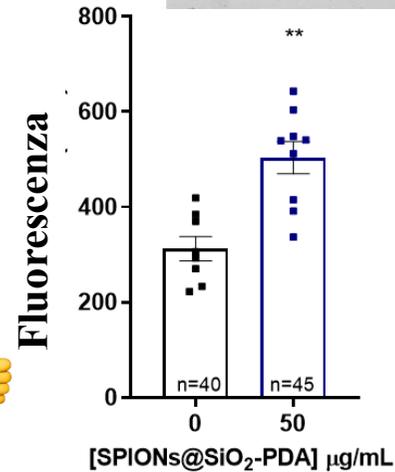
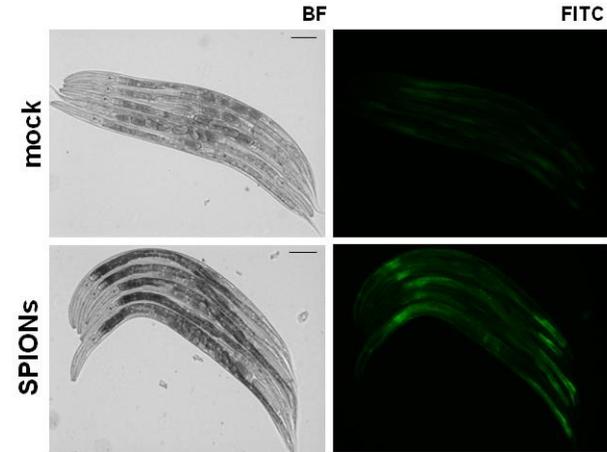
La tracciabilità e la valorizzazione del prodotto agroalimentare
strumenti di tutela e tecnologie innovative

Saggi di tossicità sulla locomozione e sullo stress ossidativo

Locomozione



96 composti al giorno

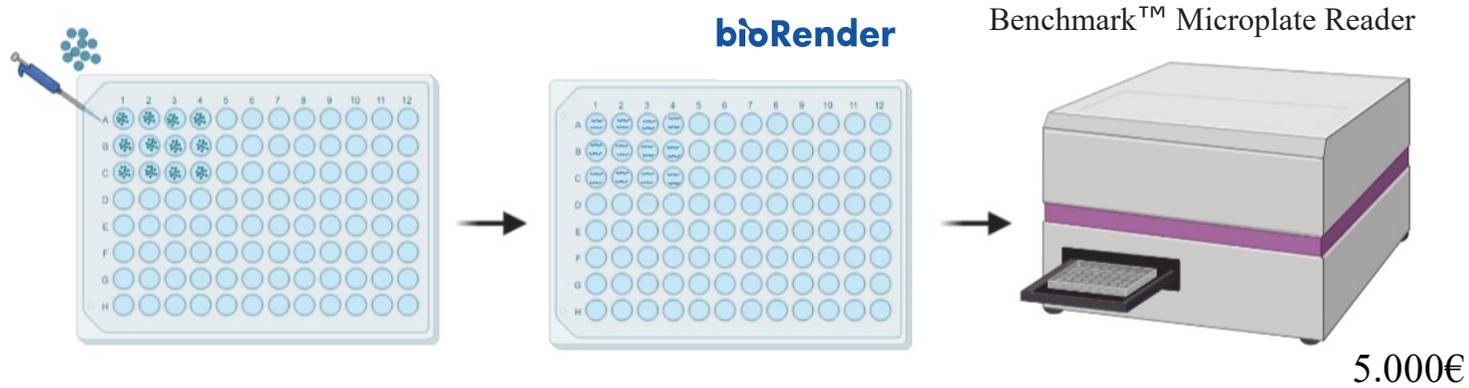


384 composti a settimana

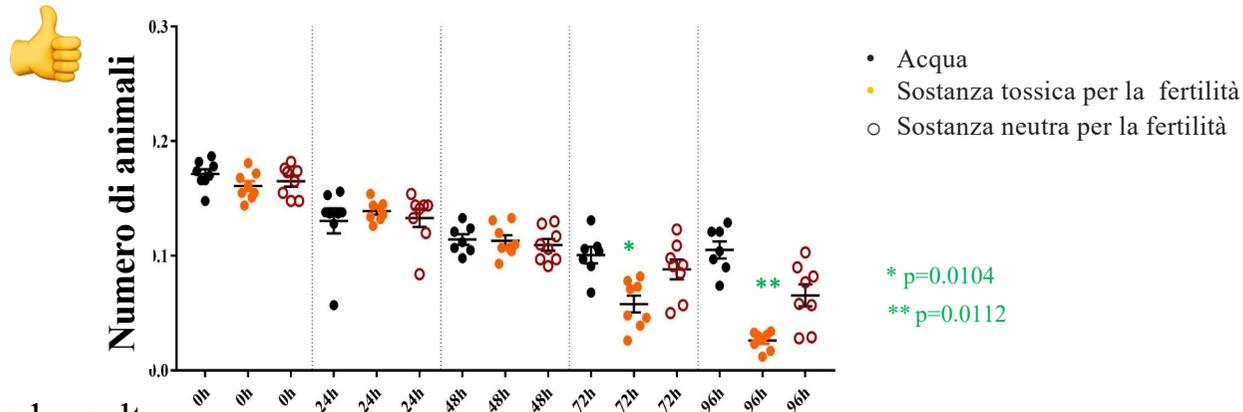
Romano et al., under review

La tracciabilità e la valorizzazione del prodotto agroalimentare
strumenti di tutela e tecnologie innovative

Saggi di tossicità sulla fertilità e sviluppo embrionale



Volumi da 50µL
45 composti ogni settimana



La Rocca et al., unpublished results

La tracciabilità e la valorizzazione del prodotto agroalimentare
 strumenti di tutela e tecnologie innovative

Conclusioni

- Abbiamo creato una **piattaforma tecnologica** per saggi di tossicità e per identificare proprietà nutrizionali degli alimenti basata su saggi scientifici consistenti, riproducibili, *in vivo* e rispettando le 3R
 - Questa piattaforma può essere utilizzata al momento come un **servizio** o implementata come **kit** da installare in house
 - Il livello di **throughput** va da poche molecole al giorno a 384 a settimana a seconda dell'investimento
 - Il **tipo di saggi** che abbiamo implementato sono:
 - Neuroprotezione
 - Miglioramento della locomozione
 - Neurotossicità
 - Tossicità per la locomozione
 - Tossicità con stress ossidativo
 - Tossicità per la fertilità
- Altri saggi:**
- Antinematodi/nematocidi
 - Antiossidanti
 - Anti-invecchiamento
 - Insulina resistenza
 - Glicemia
 - Probiotici
 -

La tracciabilità e la valorizzazione del prodotto agroalimentare

strumenti di tutela e tecnologie innovative