

Zebrafish come organismo modello



Dott.ssa Perugini Monia





Organismo modello per studi di cancerogenesi



1. Sviluppa tumori spontanei, che sono istologicamente e geneticamente simili a quelli dell'uomo.
2. Transgenesi su larga scala (impiegando centinaia di embrioni al giorno) consente una caratterizzazione funzionale delle alterazioni genetiche.
3. Trasparenza di embrioni e adulti per la visualizzazione in vivo di tumori e progressione alla risoluzione di una singola cellula

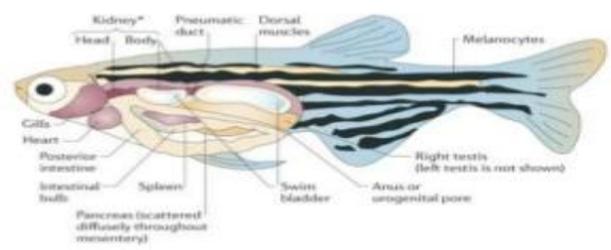


Organismo modello per studi di cancerogenesi



- Screening per identificare molecole e pathways rilevanti per lo sviluppo di tumori nell'uomo, e test di molecole che sono già in trial clinici.
- Screening su larga scala di fenotipi geneticamente mutati.
- Xenotrapianti

Cancer Research



- Shares most of their organs with mammalian counterparts
- Differently aged animals each offers distinct advantages for cancer-relevant phenotypes

Embryos: 1-4 days	Juveniles: 10-45 days	Adults: 2-24 months
Cancer-related developmental phenotypes <ul style="list-style-type: none"> • Cell cycle and genomic instability • Stem or progenitor specification programmes • Developmental effects of transplanted human cancer cells • Chemical and genetic screens 	Cancer imaging <ul style="list-style-type: none"> • In vivo imaging of cancer initiation and early progression • Embryo-adult cell type transitions • Transplantation of human cells 	Adult cancer models <ul style="list-style-type: none"> • Transgenic-, mutagen- and transposon-based penetrant cancers • Genetic modifier screens • Cross-species oncogenomics • In vivo imaging of cancer progression and metastasis

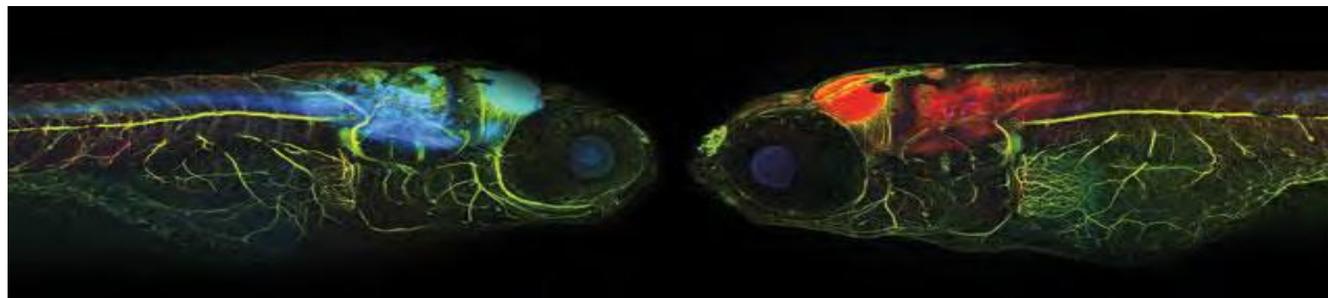


Organismo modello di malattie genetiche



1. Genoma completamente sequenziato
2. 69% dei geni ha un ortologo nel genoma umano e vi sono oltre 10.000 geni che sono condivisi tra uomo, *Danio*, topo e pollo
3. Zebrafish mutanti sono stati prodotti x studiare malattie umane quali

- Alzheimer
- Rene policistico
- Melanomi maligni
- Malattie cardiache congenite
- leucemie



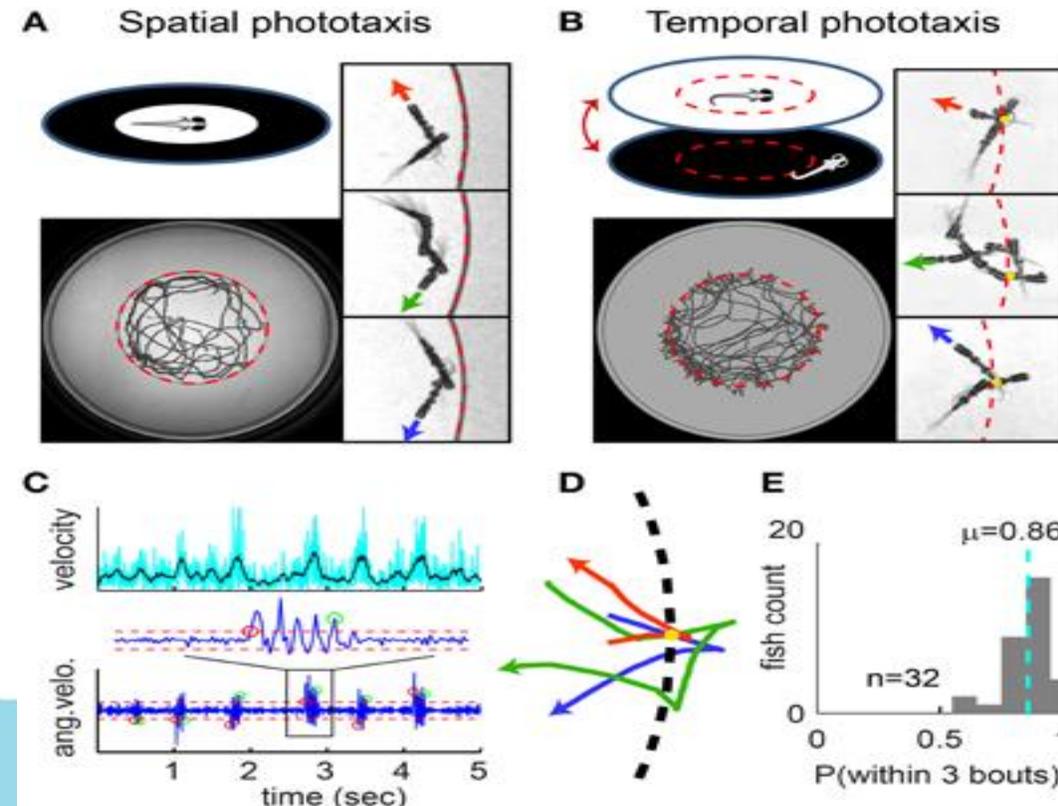
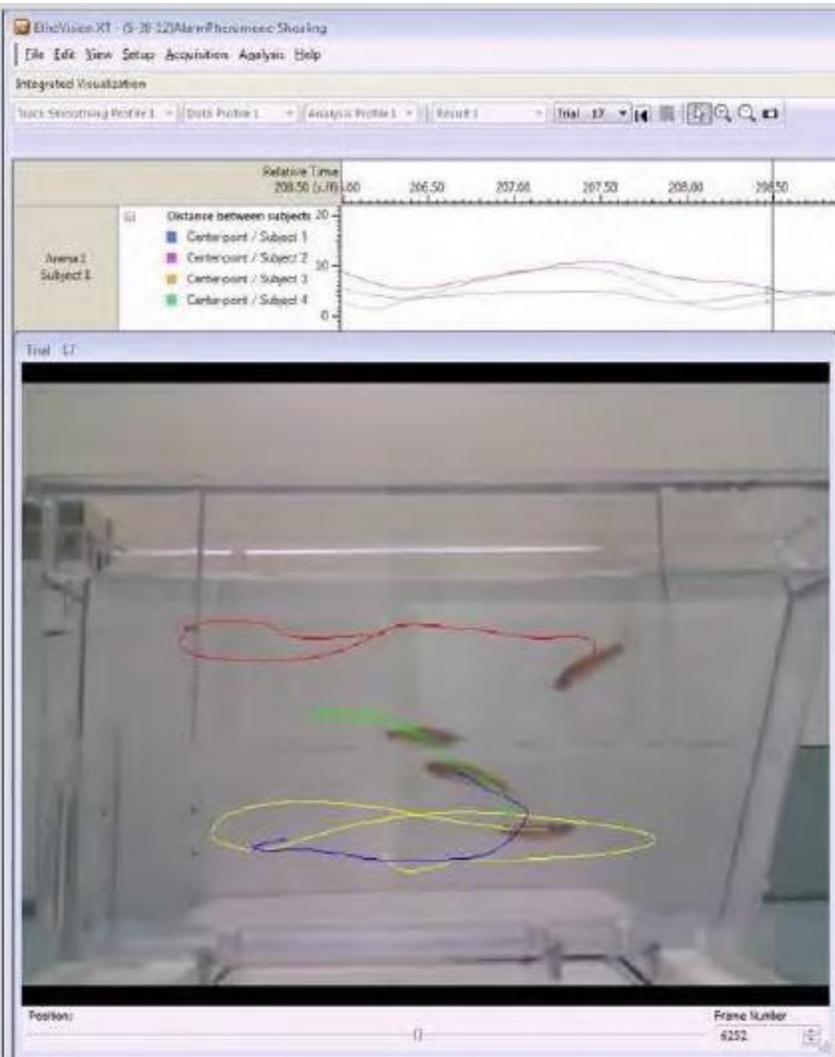
4. Utilizzando individui mutati in grado di esprimere proteine fluorescenti in determinati cellule/tessuti c'è la possibilità di seguire lo sviluppo di singole cellule e singoli neuroni.



Organismo modello in neuroscienze



Valutazione di comportamenti (semplici/complessi) sia di larve sia di adulti con specifici software





Organismo modello di drug discovery



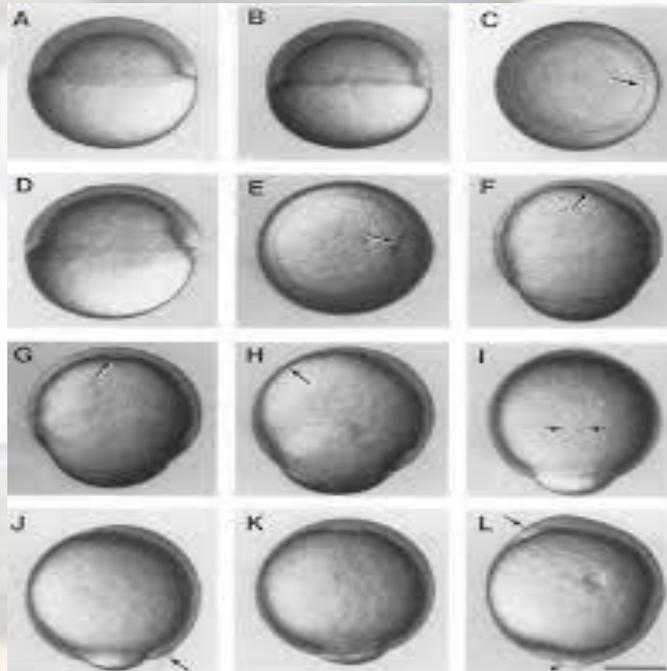
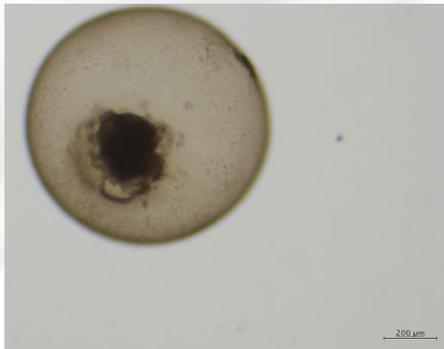
- In quanto vertebrato, possiede una fisiologia piuttosto complessa (organi escretori, sistema cardiocircolatorio, etc), benché adattata alla vita acquatica.
- Processi metabolici simili all'uomo
- Proteine ortologhe di zebrafish sono simili a quelle umane, soprattutto all'interno dei domini funzionali (es. recettori tiroidei di zebrafish sono 91% uguali a quelli dell'uomo).
- Numerose le molecole testate in zebrafish fino ad oggi.



Organismo modello per test di tossicità *in vivo*

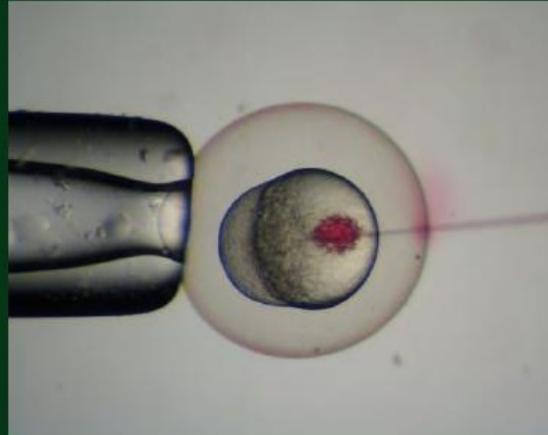
La trasparenza dell'embrione consente di valutare:

- la morfologia degli organi interni;
- processi necrotici, che determinano un'opacità nell'embrione;
- difetti di circolazione (edemi, emorragie)





Zebrafish può essere anche un modello nell'ottica del refinement



In alcuni campi di ricerca, come la biologia dello sviluppo, l'impiego di embrioni o forme larvali consente l'applicazione di tecniche o la visualizzazione di alcuni processi che sarebbero altrimenti molto invasivi o impossibili nel caso di embrioni intrauterini.



Zebrafish: i limiti del modello nella ricerca biomedica

Assenza di alcuni organi/tessuti

Scarsa caratterizzazione dei ceppi inbred rispetto ai roditori

Molecole liposolubili non possono essere somministrate per immersione in acqua fatta eccezione l'uso di solventi non sempre utilizzabili

ALLEVAMENTO E RIPRODUZIONE



Fonte: Braunbeck *et al.* (2004)



The habitat in the lab...





Lab habitat: physico-chemical properties

Found in two recent studies:

Temperature: 12.3 - 38.6 °C

pH: 5.9 - 9.8

Conductivity: 10 - 271 μS

In the lab:

26-29 °C

6.5-8.0

250-600 μS



Quite tolerant – in line to what was observed in the laboratory

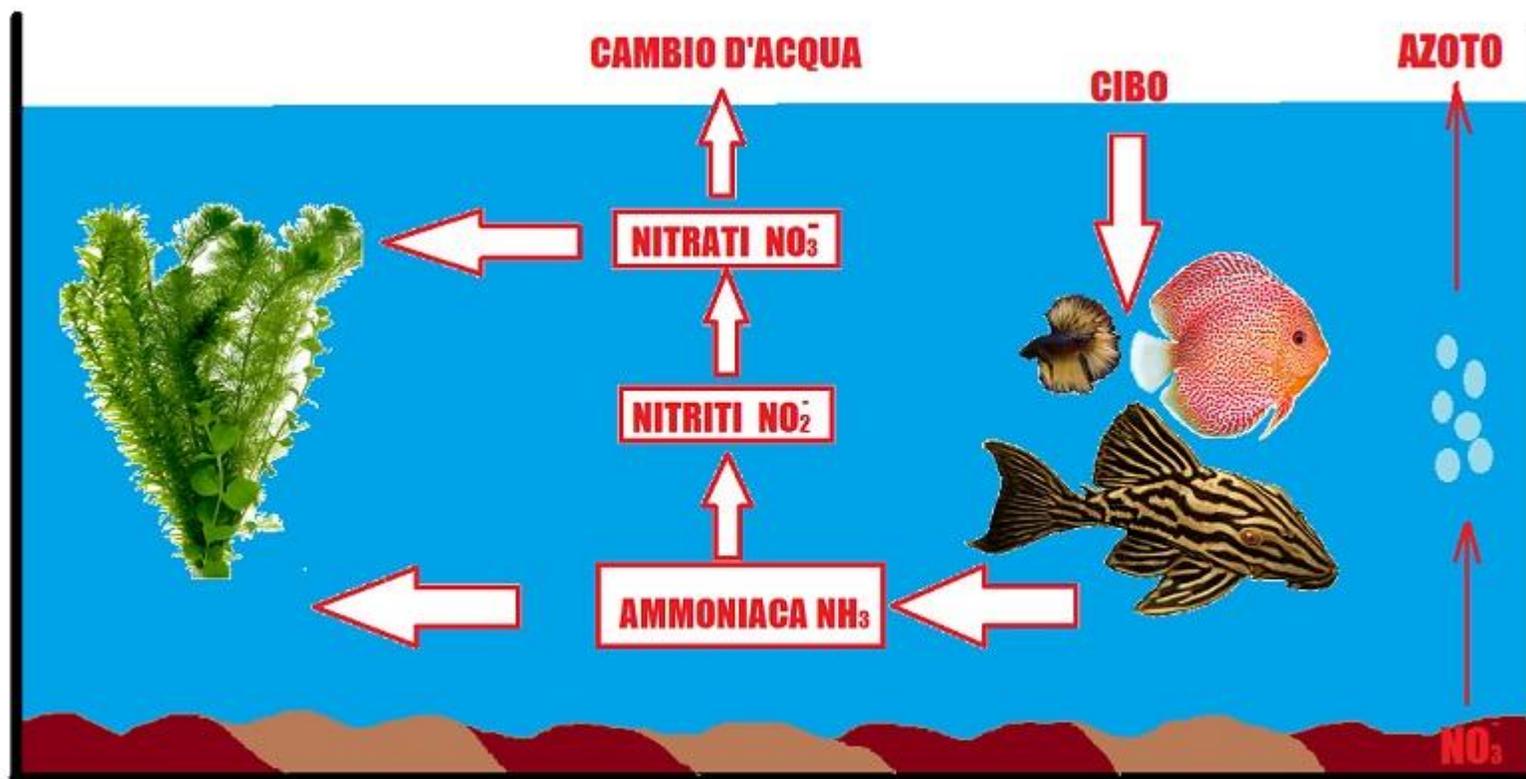
Targeted values: $\text{NO}_3^- < 2.5 \text{ mg/l}$, $\text{NO}_2^- < 0.025 \text{ mg/l}$



Water Quality
Temperature
pH
Ammonia (NH₃/
NH₄)
Nitrite (NO₂)
Nitrate (NO₃)
Dissolved Oxygen
(DO)
Conductivity



Il ciclo dell'azoto

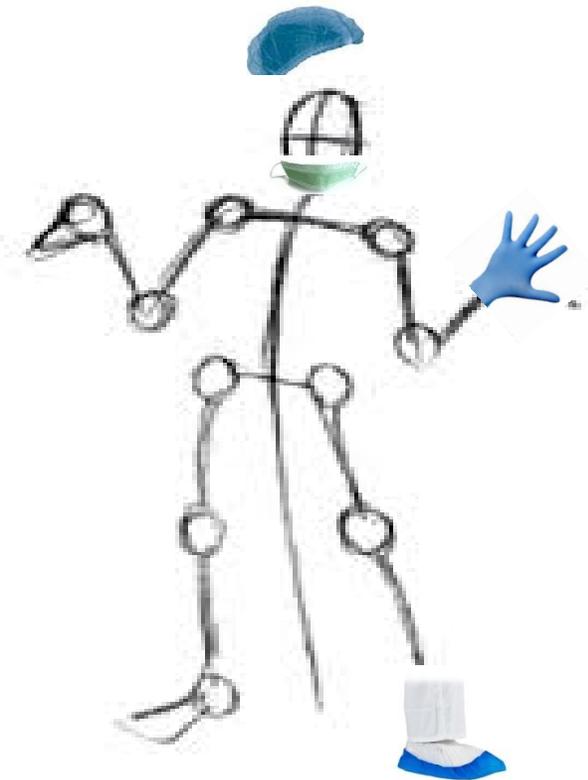




Caratteristiche principali di uno stabulario zebrafish

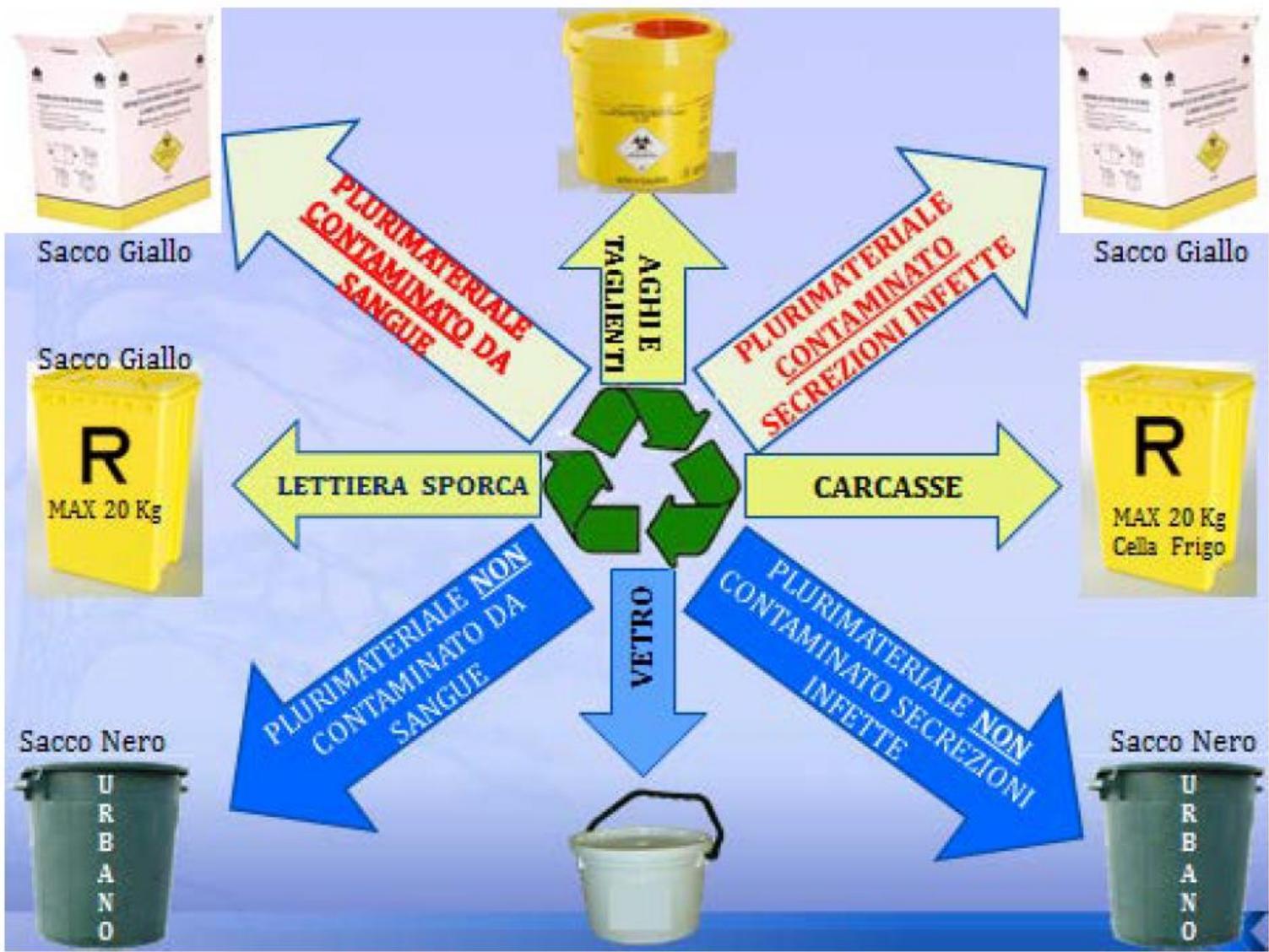


- Temperatura della stanza e ricambi aria
- Illuminazione temporizzata della stanza
 - Linee elettriche stabilizzate
- Finiture e banchi da lavoro idonei
- Manutenzione attrezzature
 - DPI adeguati





Smaltimento Rifiuti - Procedura





Aspetti comportamentali

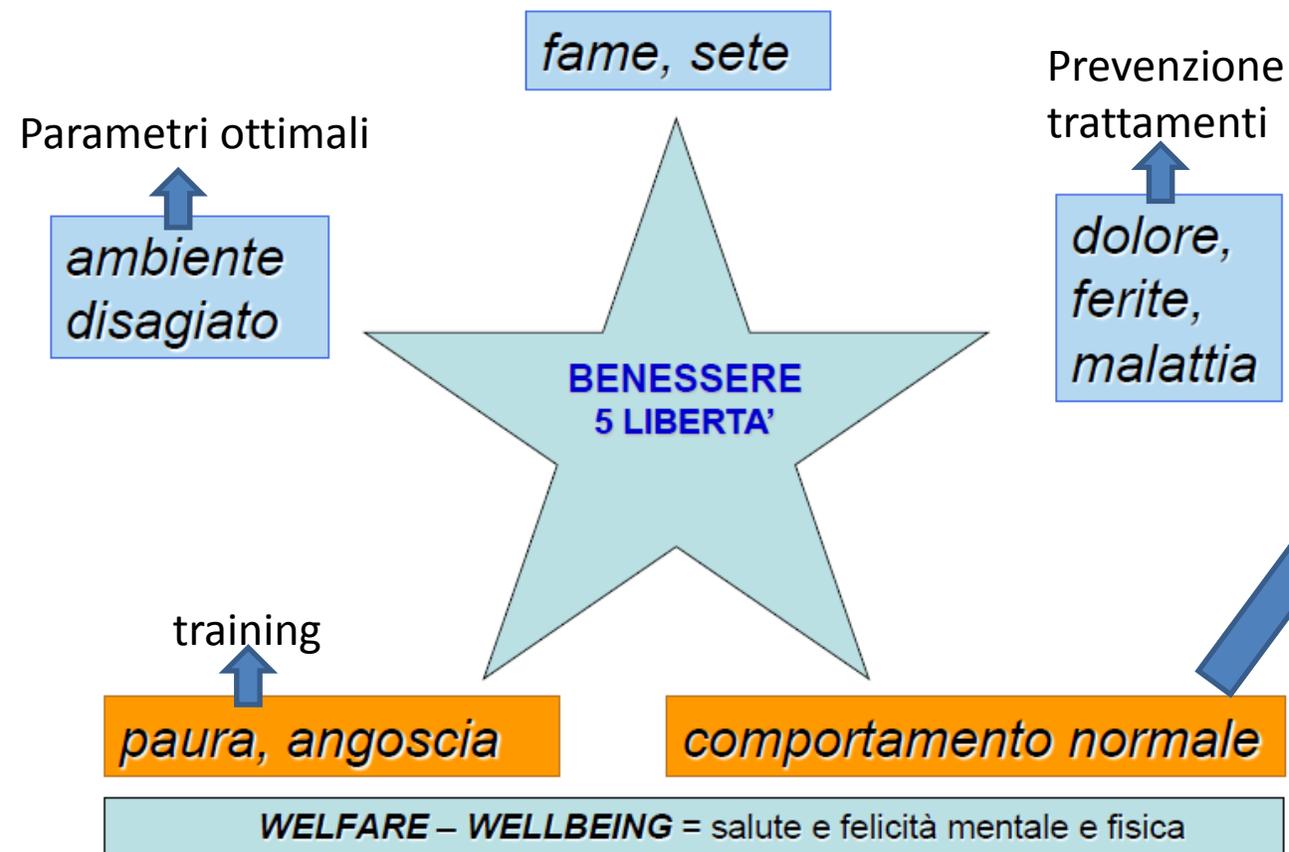


In natura sono pesci onnivori e diurni
Ottimi nuotatori che rimangono nella
parte alta della colonna d'acqua
Gregari e territoriali
Gerarchici e aggressivi
Possiedono una serie di recettori
cutanei meccanosensoriali x la
percezione di movimenti e vibrazioni
nell'acqua importanti per il
comportamento sociale, predatorio, di
orientamento e di fuga

https://www.youtube.com/watch?v=F7JNB2k_S00



Benessere animale: arricchimento ambientale



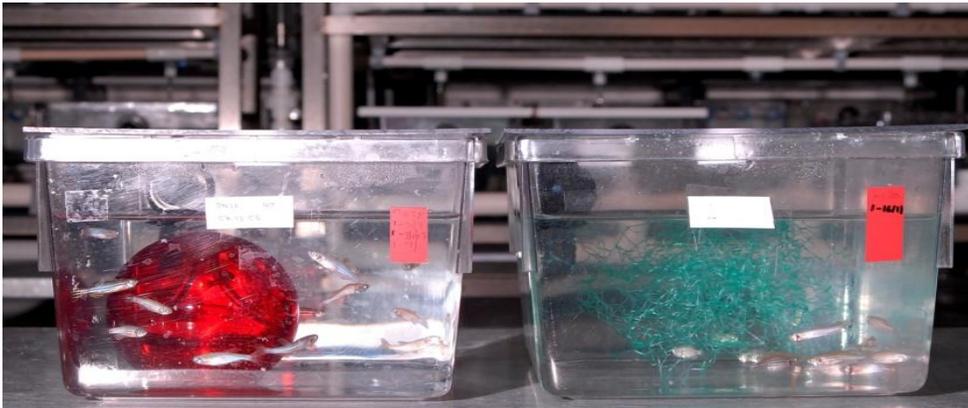
Tutti gli animali devono disporre di spazio sufficientemente complesso che consenta loro di esprimere un ampio repertorio di comportamenti normali. Essi dispongono di un certo grado di controllo e di scelta rispetto al proprio ambiente per ridurre comportamenti indotti da stress.



Arricchimento ambientale



- Migliora la qualità della vita.
- Stimola comportamenti naturali.
- Riduce le stereotipie.



Non devono alterare la qualità dell'acqua non devono essere tossici!!!



Diet of zebrafish



Food in the nature

Food in the lab

Insects (like ants) that have fallen into the water

crustacean larvae and other zooplankton and phytoplankton



prefer to feed at surface – upward gaping mouth

but chase prey also across the water
Artemia larvae as live food = tank enrichment!



RIPRODUZIONE



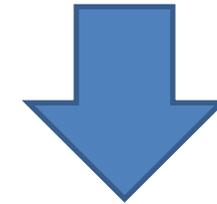
- Zebrafish è a fotoperiodo negativo
- La deposizione avviene 15/30 minuti dopo l' accensione della luce
- Fondamentali gli stimoli tattili, olfattivi e soprattutto visivi
- Fondamentale lasciare insieme i pesci dal pomeriggio
- Presenza di un ambiente tranquillo
- Vaschette da riproduzione idonee
- Tecniche diverse : 1:1 o 2:1 o accoppiamento di massa



Tecniche di accoppiamento



- Pesci lasciati insieme nel tardo pomeriggio del giorno precedente.....non è possibile sapere quando avviene la deposizione puoi avere uova a diversi stadi
- Accoppiamento nello stesso giorno subito dopo l'accensione delle luci.....poco produttivo ma è possibile raccogliere uova fertilizzate da poco
- Pesci lasciati insieme nel pomeriggio del giorno precedente ma utilizzando un separatore..... è possibile raccogliere uova fertilizzate in mattinata e tutte allo stesso stadio.



Metodo migliore

RIPRODUZIONE



Set up fish late in the afternoon – they will wait with mating until the next morning

Or

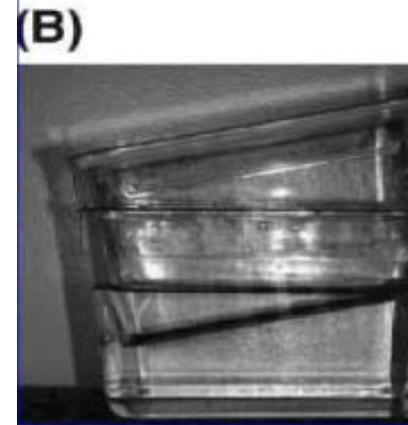
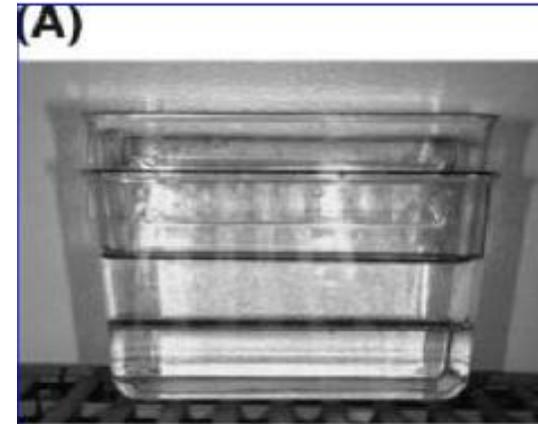
Separate male and female, put them together early next morning – generates precisely dated eggs

Typical breeding cage for single couple

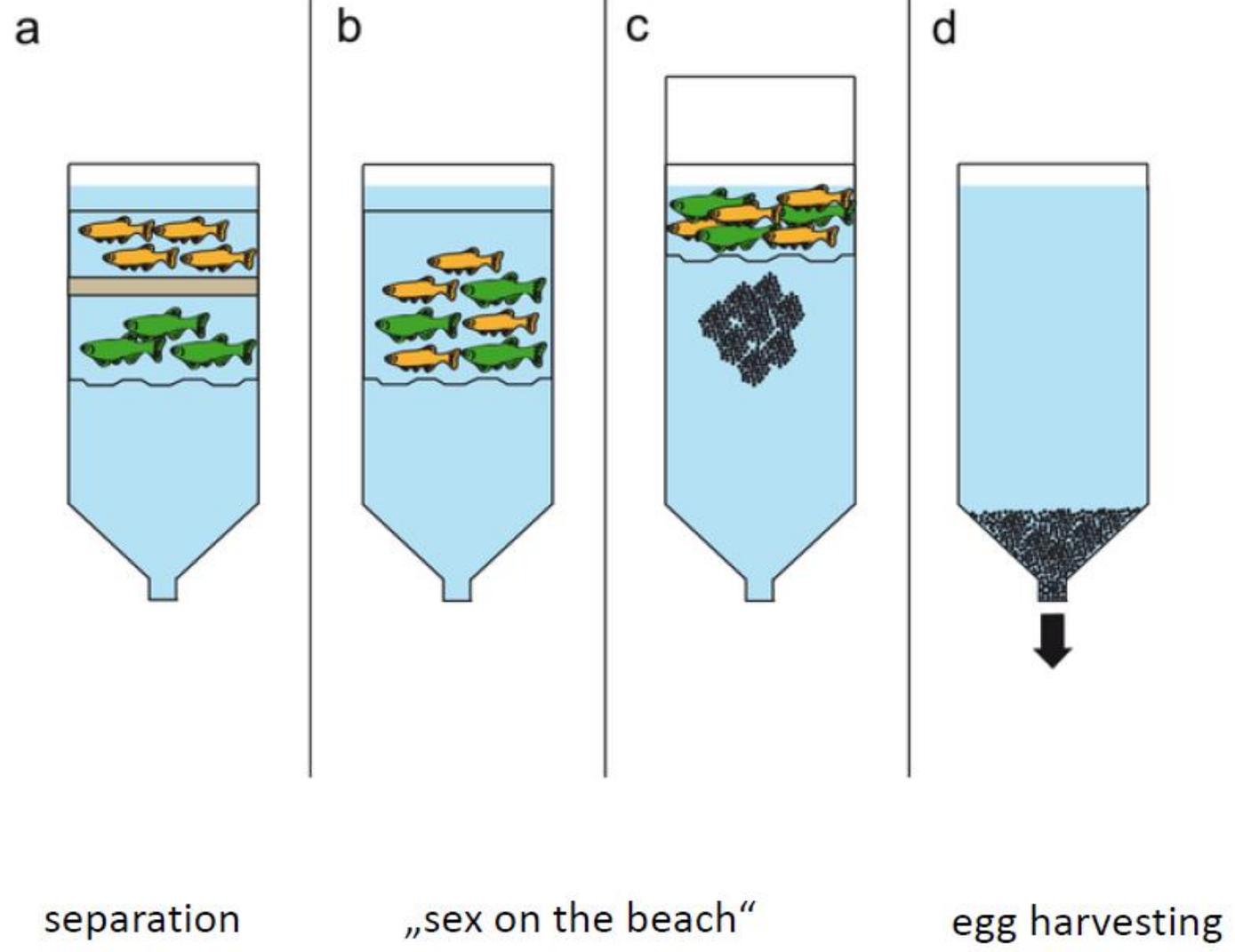
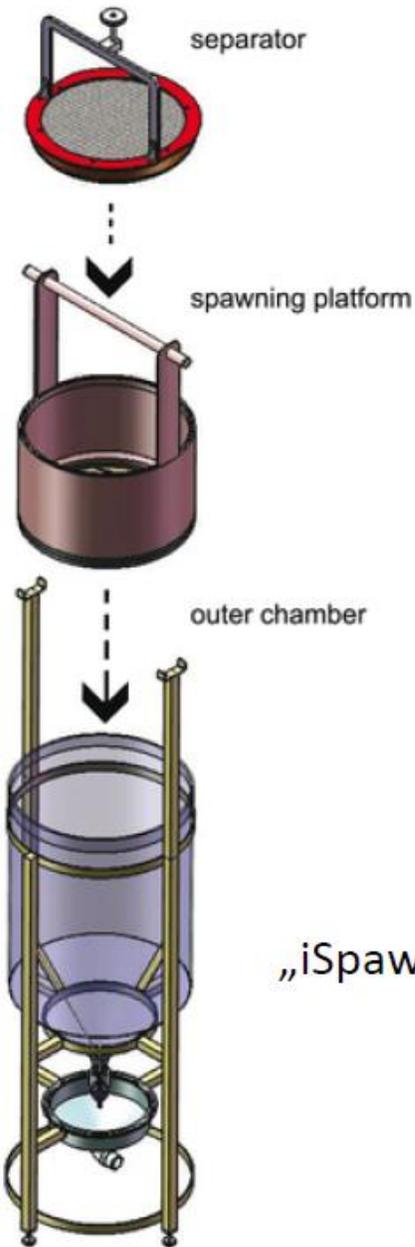
<https://www.youtube.com/watch?v=Wb1mEfACpY4>

<https://www.youtube.com/watch?v=PUNN7YzC4Zo>

<https://www.youtube.com/watch?v=-aecw9Hx3DU&t=5s>



Mating – practical part





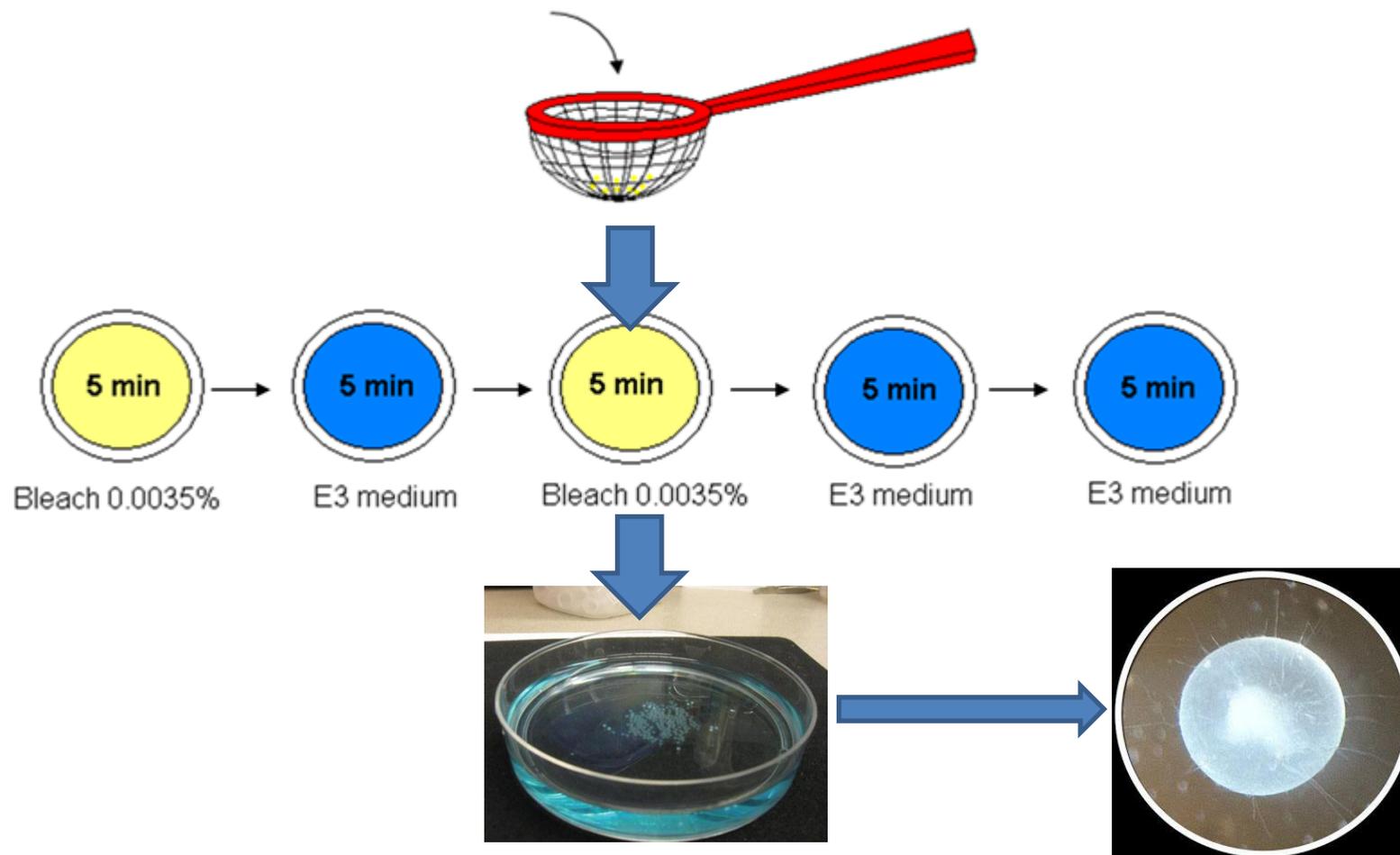
Stress



- As a result of:
 - handling,
 - disturbance,
 - poor water quality,
 - overcrowding,
 - aggression from other fish
 - loud sudden noise

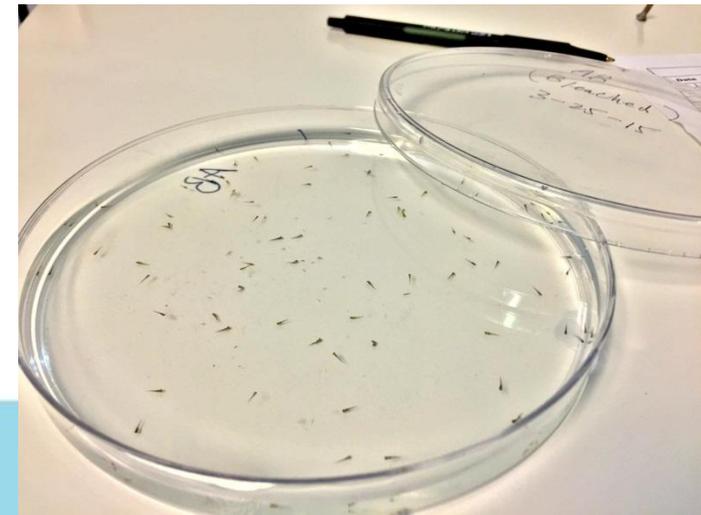
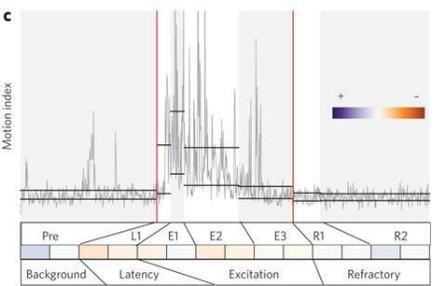
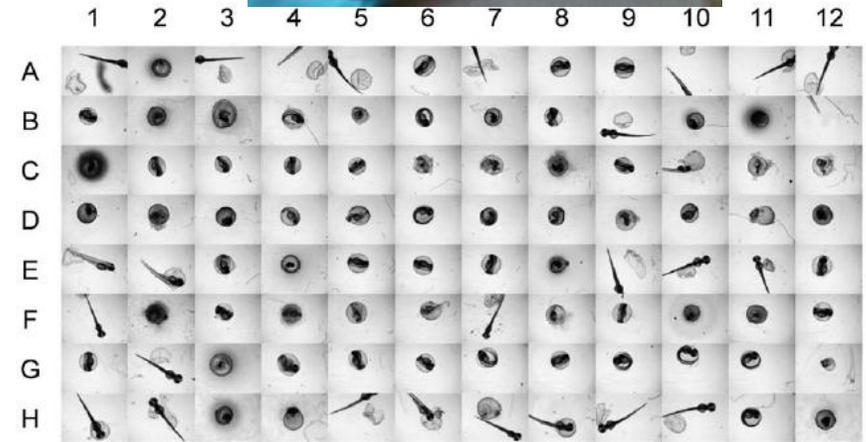
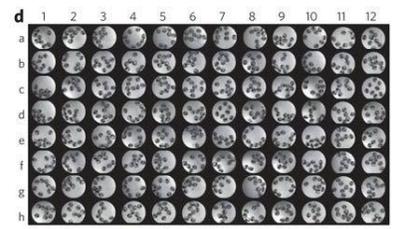
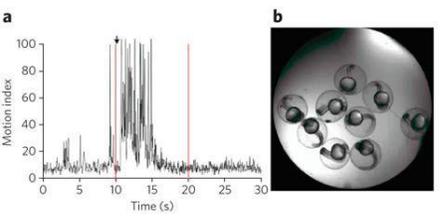
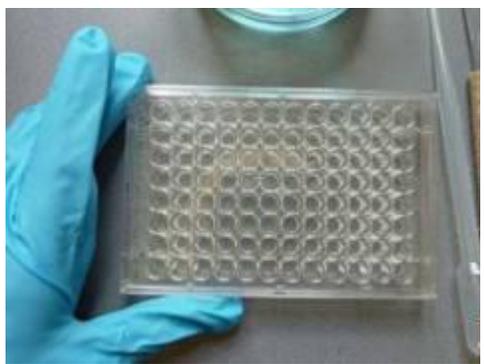


Raccolta uova



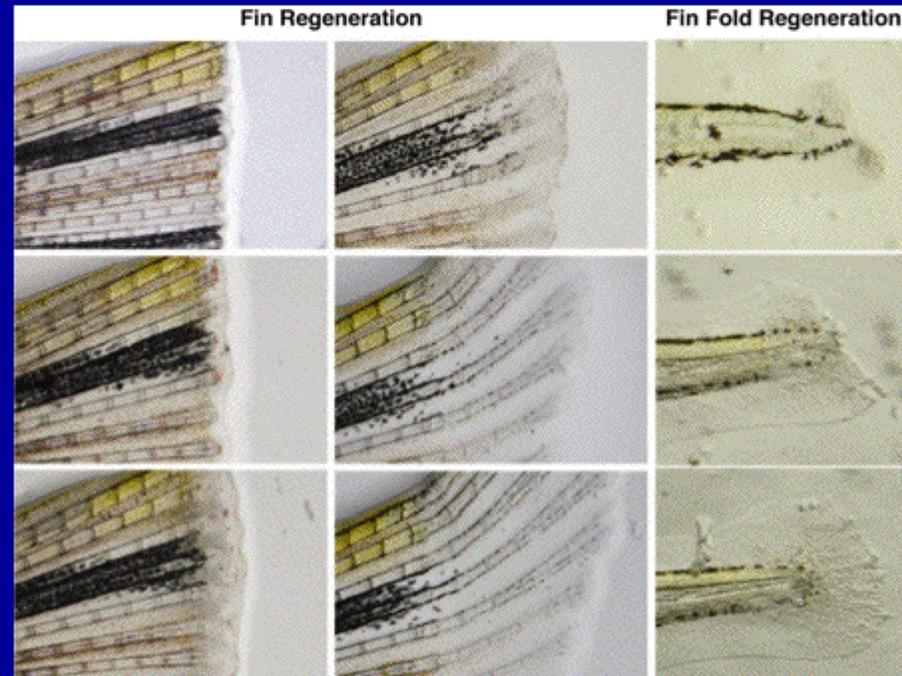


Utilizzi delle uova/embrioni





Regeneration!



Pinne
Squame
Muscolo cardiaco
Fegato
Midollo spinale



UNIVERSITÀ
DEGLI STUDI
DI TERAMO

GRAZIE DELL'ATTENZIONE

