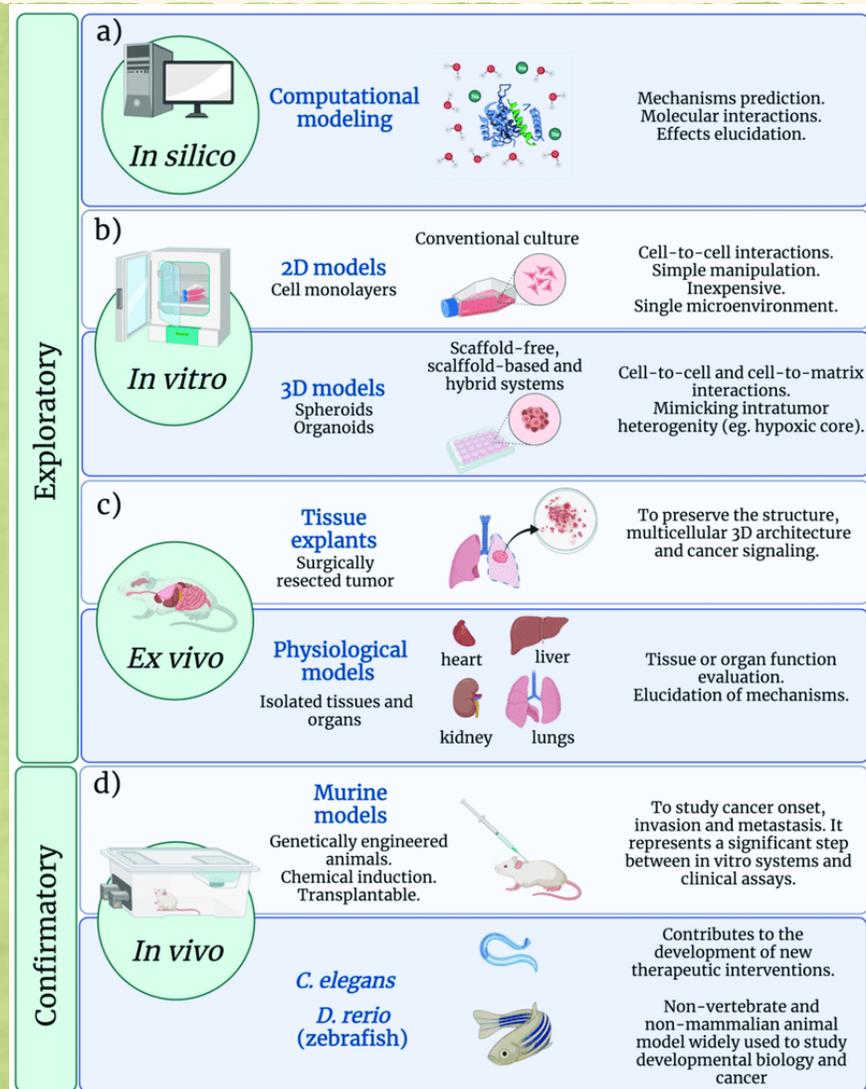


Ecotossicologia

Saggi ecotossicologici: principi di base
Dr. Carmine Merola, DVM, PhD

Modelli sperimentali *in vivo*, *in vitro* e *in silico*

Modello	Definizione	Vantaggi	Svantaggi
<i>In vivo</i>	Modello sperimentale che utilizza l'intero organismo	Maggiore accuratezza dei risultati e del potenziale traslazionale	Costosi, richiedono tempi lunghi
<i>In vitro</i>	Modello sperimentale che utilizza colture cellulari	Facilità nello studio di specifici effetti tossici	Non riescono a mimare la complessità dell'organismo (ADME)
<i>In silico</i>	Modelli sperimentali basati sull'utilizzo dell'informatica e di modelli matematici computazionali	Economici, rapidi e permettono di analizzare in breve tempo una vasta categoria di sostanze	Necessitano di essere integrati da test <i>in vitro</i> e/o <i>in vivo</i>



Saggio ecotossicologico: definizione

- Esperimento biologico atto a verificare se un composto potenzialmente tossico, o un campione ambientale, causa una risposta biologica rilevante negli organismi utilizzati per il test.
- La tipologia di risposta che si vuole misurare viene definita **ENDPOINT**.

Ecological endpoint	Toxicological endpoint
Survival	Survival Mortality
Growth	Growth Body mass
Reproduction	Productivity Egg hatching success
Behavioral	Altered behavioral patterns Altered activity budgets Impaired motor co-ordination
Subclinical	Altered glutathione metabolism Oxidative stress Antibody suppression Lymphoid depletion Altered neurochemical receptor levels Altered corticosterone

^a Ecological endpoints were ranked in order of ecological relevance from highest (survival) to lowest (subclinical) by the authors following the framework of Suter [28].



Saggio ecotossicologico: acquatici e terrestri



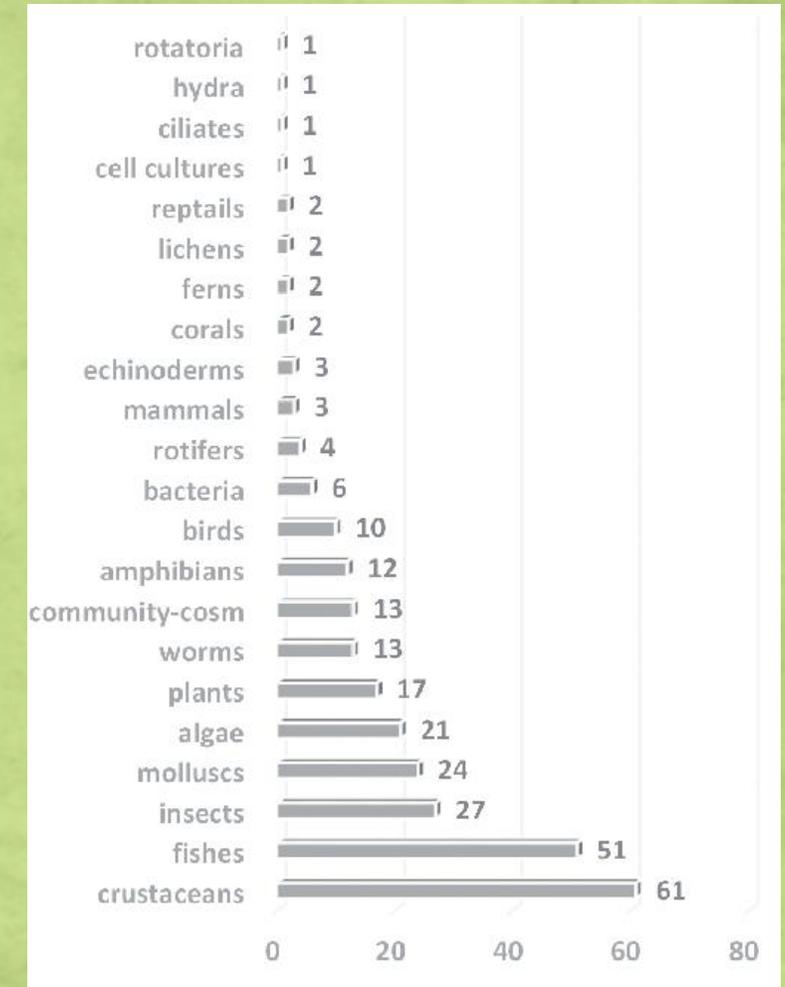
- Nei saggi di tossicità acquatica l'organismo in esame assume in contaminante, che si trova in soluzione nel mezzo, per respirazione (attraverso le branchie) o attraverso la membrana cellulare dell'epidermide. Attraverso meccanismi di ripartizione di equilibrio tra l'acqua e i comparti di assorbimento si ha un progressivo aumento della concentrazione dall'esterno dell'organismo all'interno. Una volta assorbito il destino del tossico dipende dai meccanismi di **ADME**, pertanto è convenzione quantificare la tossicità in termini di **CONCENTRAZIONE** della sostanza nel mezzo.

- Nei saggi di tossicità terrestre i sistemi di esposizione sono strettamente legati alla via d'ingresso nell'organismo che può avvenire per ingestione, contatto o inalazione. A differenza dei test di tossicità acquatica il tossico è veicolato da strutture complesse che influenzano l'assorbimento della sostanza. Ad esempio il suolo è costituito da numerosi comparti (gassoso, liquido e solido) dunque esistono numerose interazioni suolo-tossico che influenzano notevolmente la biodisponibilità del tossico.

Saggio ecotossicologico: introduzione

▪ Possono essere eseguiti su:

1. Microrganismi (batteri, alghe, protozoi)
2. Invertebrati (crostacei, rotiferi)
3. Piante superiori
4. Vertebrati (pesci, piccoli mammiferi)



Anni 2010-2016

Saggio ecotossicologico: motivazioni

- Tutela ambientale: giudizi di accettabilità di effluenti di cui non è nota la composizione.
- Motivazioni legali: controllo qualità delle acque superficiali, sedimenti, suoli ecc...
- Soddisfare i criteri di qualità per l'immissione in commercio di nuove sostanze chimiche (Regolamento 1907/2006, REACH).

REGOLAMENTO (CE) N. 1907/2006 DEL PARLAMENTO EUROPEO E DEL CONSIGLIO
del 18 dicembre 2006

concernente la registrazione, la valutazione, l'autorizzazione e la restrizione delle sostanze chimiche (REACH), che istituisce un'agenzia europea per le sostanze chimiche, che modifica la direttiva 1999/45/CE e che abroga il regolamento (CEE) n. 793/93 del Consiglio e il regolamento (CE) n. 1488/94 della Commissione, nonché la direttiva 76/769/CEE del Consiglio e le direttive della Commissione 91/155/CEE, 93/67/CEE, 93/105/CE e 2000/21/CE

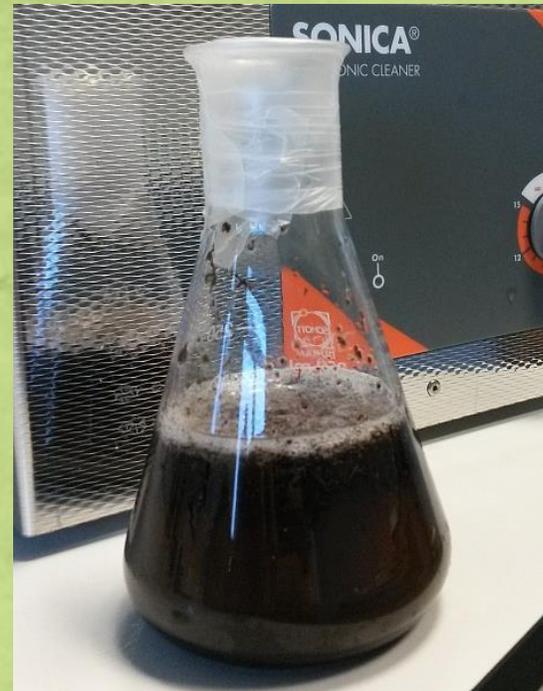
(Testo rilevante ai fini del SEE)

Obiettivi:

1. Mappare e accrescere le conoscenze sulle sostanze chimiche prodotte/importate o utilizzate in UE, attraverso la valutazione delle loro caratteristiche e l'adozione di adeguate misure di gestione del rischio.
2. Sostituire le sostanze «estremamente preoccupanti» con sostanze o tecnologie meno pericolose.

Saggio ecotossicologico: matrici di applicazione

- **Matrice liquida**: acque superficiali (dolci, marine o salmastre), acque sotterranee, scarichi civili o industriali
- **Matrice solida**: sedimenti tal quali
- **Elutriati**: estratti acquosi ottenuti da matrice solida come rifiuti o sedimenti.
- **Soluzioni o composti chimici** tal quali.



Saggio ecotossicologico: vantaggi e svantaggi

Vantaggi:

1. Valutazione dell'impatto di miscele naturali di inquinanti/contaminanti
2. Quantificazione degli effetti tossici
3. Semplici, economici, e veloci
4. Condotti in condizioni controllate e standardizzate

Svantaggi:

1. Condizioni di campo diverse da quelle sperimentali
2. Non permettono di testare tutte le specie ambientali esposte, né di testare tutte le potenziali vie di esposizione

Saggio ecotossicologico: durata del saggio

SAGGI A BREVE TERMINE

Sono quei saggi che coprono un arco temporale ridotto rispetto al ciclo vitale dell'organismo saggiato

Esempi:

1. Esposizione di 96 h per i pesci
2. Esposizione di 48 h per invertebrati
3. Esposizione di 2-4 h per microrganismi

SAGGI A LUNGO TERMINE

Sono quei saggi che coprono una parte significativa del ciclo vitale o l'intero ciclo vitale o più cicli vitali dell'organismo saggiato

Esempi:

1. Esposizione di 96 h per le alghe
2. Esposizione di per 21-28 gg per crostacei invertebrati
3. Fino a 2 anni per i vertebrati

Saggio ecotossicologico: tipo di saggio

SAGGI ACUTI

Nei saggi di tossicità acuta viene misurato l'effetto letale di una sostanza tossica, viene quindi misurata la mortalità degli individui di una popolazione. Solitamente gli esemplari sono esposti a concentrazioni elevate della sostanza chimica in esame per un breve periodo di tempo.

SAGGI CRONICI

Nei saggi di tossicità cronica viene misurato l'effetto subletale della sostanza in esame. Generalmente hanno una durata prolungata e si osservano effetti diversi dalla morte (esempio: accrescimento, replicazione, % di schiusa delle uova ecc..)

Saggio ecotossicologico: modalità

Vie di somministrazione

1. Via orale (se gli organismi si alimentano autonomamente)
2. In acqua/medium all'interno del quale vivono gli organismi (assorbimento per contatto/ingestione/inalazione)

Tipologia di approcci

1. Statico: sono utilizzati per saggi di breve durata
2. Semi-statico (con rinnovo): cambio periodico della soluzioni contaminante, solitamente ogni 24 h
3. A flusso continuo: la soluzione del test viene mantenuta in stato stazionario mediante un sistema di alimentazione dell'acqua. Sono i più utilizzati per gli esperimenti a lungo termine. Possono essere molto costosi e a difficili da attuare per la necessità di apparecchiature predisposte.

Saggio ecotossicologico: piano sperimentale

- Nel caso siano testate sostanze con proprietà tossicocinetiche e tossicodinamiche sconosciute è opportuno effettuare un saggio preliminare per individuare l'intervallo di concentrazione efficace in grado di produrre l'effetto (dose-range finding test) oppure ci si può appoggiare a dati già presenti in **letteratura**

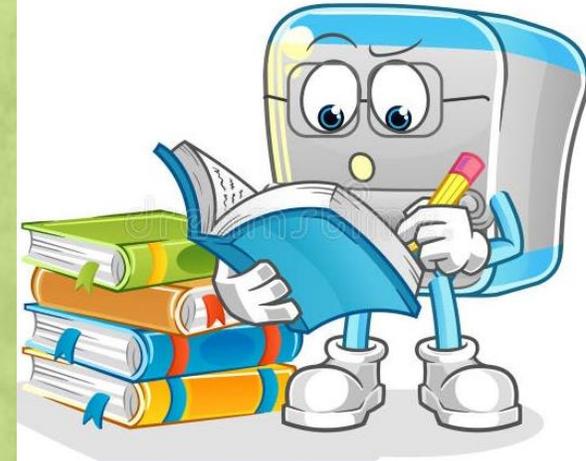


Importanza della
standardizzazione
delle procedure

- Nel caso siano testati campioni ambientali è necessario determinare le singole molecole presenti nella miscela

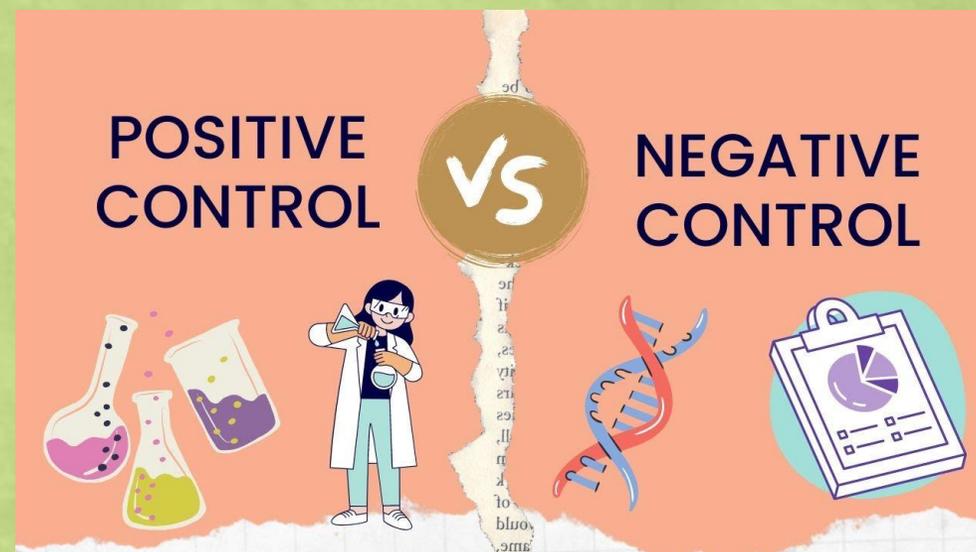
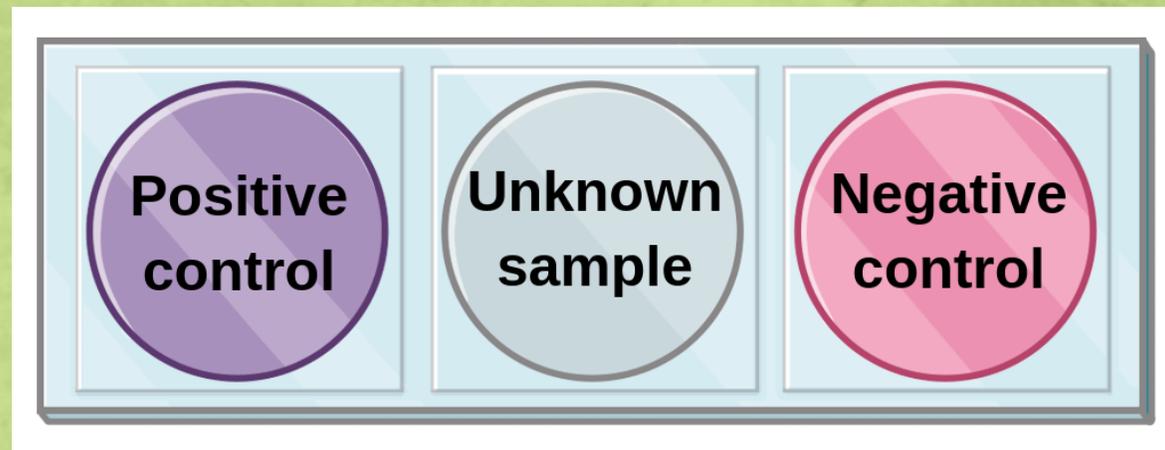


Importanza dei
metodi analitici



Saggio ecotossicologico: piano sperimentale

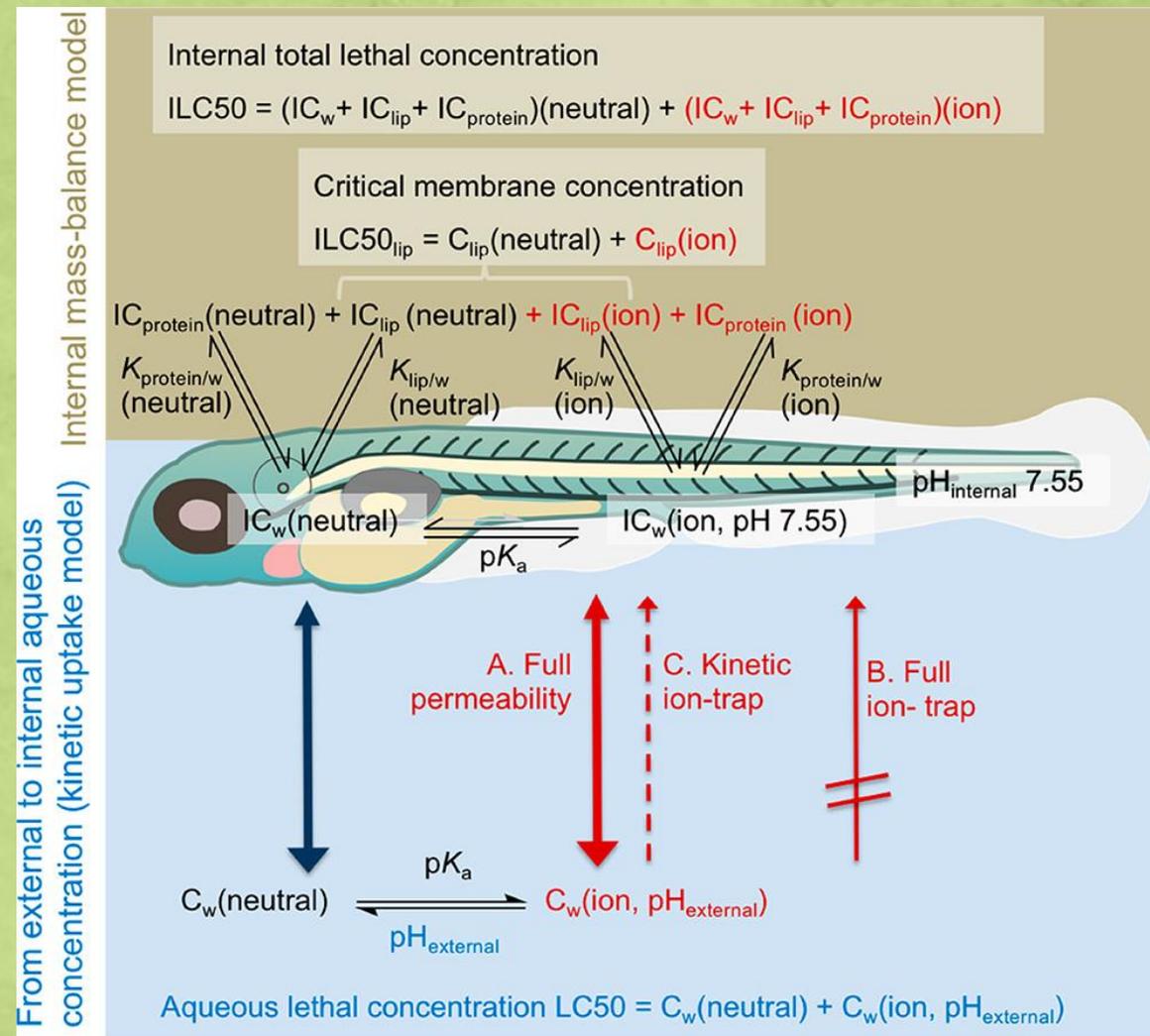
- Il campione di individui da esporre alle sostanze deve essere sufficientemente numeroso.
- I test devono essere eseguiti in più replicati in settimane diverse.
- È sempre indispensabile la presenza di un controllo positivo e negativo:
 1. **CONTROLLO NEGATIVO:** organismi esposti ad una matrice di controllo non contenente la sostanza tossica al fine di valutare la comparsa di effetti che non dipendono dall'esposizione al tossico ma da altri fattori.
 2. **CONTROLLO POSITIVO:** organismi esposti ad una matrice di cui si conosce già l'effetto tossico, al fine di saggiare la rispondenza del nostro sistema.



Saggio ecotossicologico: piano sperimentale

○ Durante il saggio devono essere tenuti sotto controllo parametri ambientali che potrebbero influenzare l'esito del test e che sono specifici per ogni test, come ad esempio:

1. pH
2. Temperatura
3. Salinità
4. Ossigeno disciolto
5. Fotoperiodo



Saggio ecotossicologico: linee guida

- Esistono una serie di saggi che standardizzati secondo procedure normate a livello nazionale, europeo o internazionale:



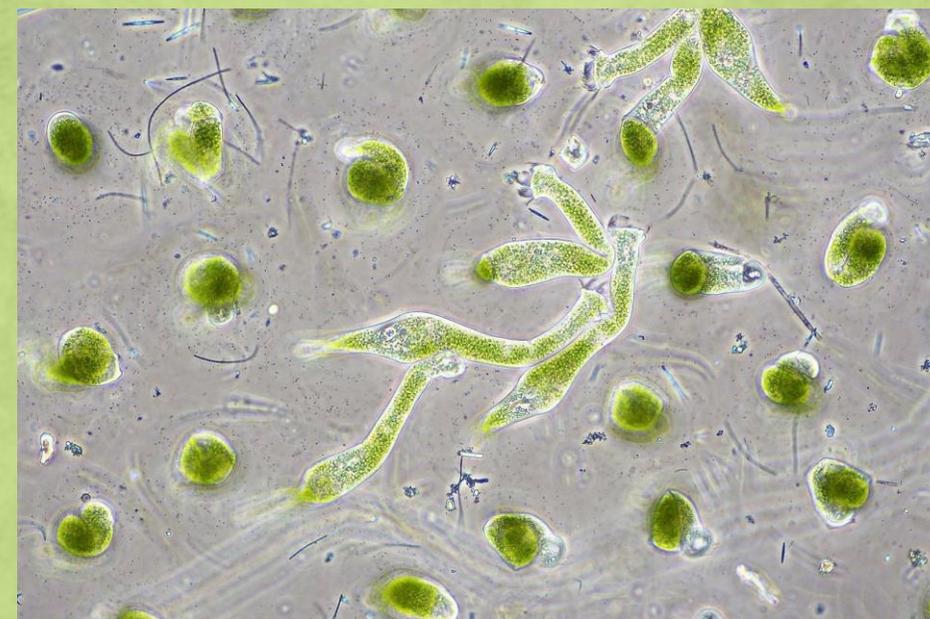
Saggi ecotossicologici: saggi algali

OECD GUIDELINES FOR THE TESTING OF CHEMICALS

PROPOSAL FOR UPDATING GUIDELINE 201

Freshwater Alga and Cyanobacteria, Growth Inhibition Test

- Le microalghe sono organismi autotrofi presenti al primo livello della catena trofica e vengono pertanto indicati come produttori primari (producono O₂, degradano CO₂, fotosintesi, sono fonte di energia).
- La loro importanza ecologica è molto rilevante dal momento che alterazioni nella loro crescita si ripercuotono inevitabilmente sulla vitalità di altre specie.
- Solitamente l'endpoint misurato è l'inibizione della crescita (algostasi).



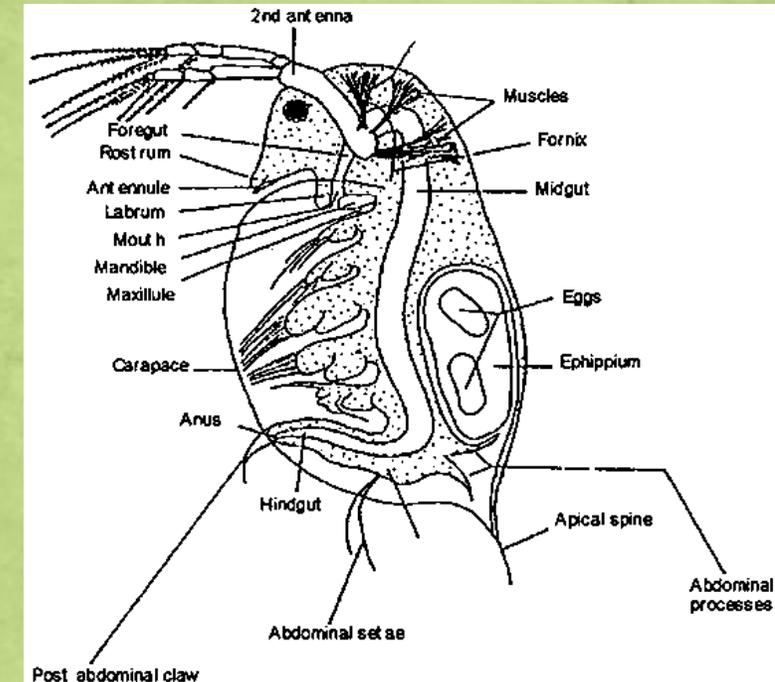
- *Selenastrum capricornutum*
- *Scenedesmus subspicatus*
- *Chlorella vulgaris*

Saggi ecotossicologici: invertebrati

- Il crostaceo cladocero planctonico *Daphnia magna* è uno degli invertebrati più utilizzati in ecotossicologia.
- Sono state adattate diverse linee guida nella forma di saggi acuti e cronici che vanno a valutare diversi endpoints come ad esempio il tasso di riproduzione (OECD guideline 211/2012, 21 giorni di esposizione semistatica) oppure il grado di immobilizzazione di giovani individui (<24 h) (OECD guideline 202/2004, 48 ore di esposizione)

OECD GUIDELINE FOR TESTING OF CHEMICALS

Daphnia sp., Acute Immobilisation Test



IMMOBILIZATION is the condition in which the organism can no longer propel itself through the water, yet still may have a heartbeat. It is important to differentiate between death and immobility because each response may provide information on the mode of action of the toxicants being tested. Many chemicals, for example, act on the nervous system, immobilizing the organism without immediately killing, even though the animal may perish from starvation or from some other cause in the wild. In some cases the organism may recover if it is transferred to "clean" water.

Saggi ecotossicologici: pesci (zebrafish, *Danio rerio*)

Perché zebrafish?

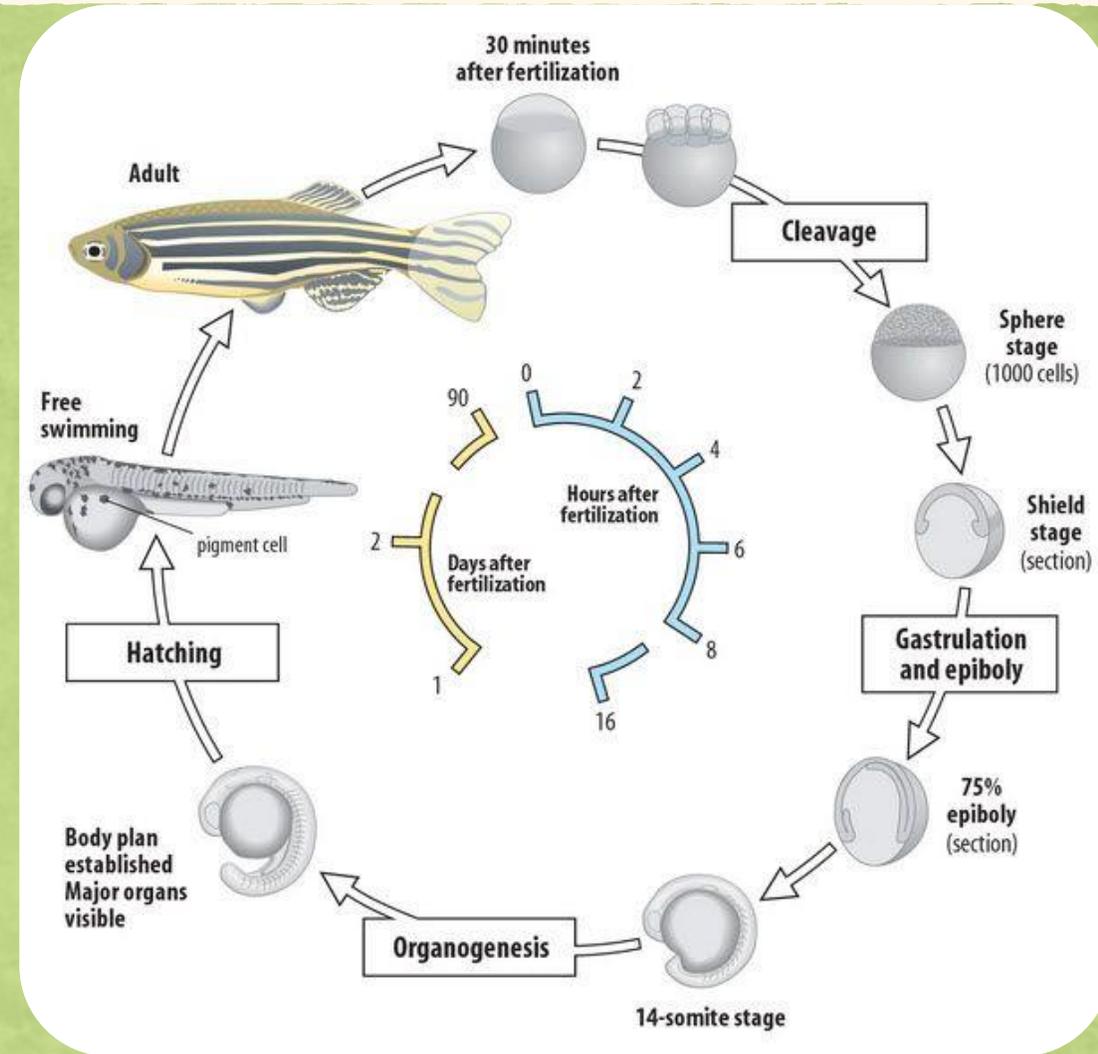


Embrione e larva



Adulti

- Sviluppo rapido
- Trasparenza
- «Flessibilità» genetica
- Non necessita di cure parentali
- Costi ridotti e facilità di mantenimento
- Alta fecondità e tassi di fertilizzazione
- 70% di omologia genetica con l'uomo
- 82% dei geni coinvolti in patologie umane hanno un gene ortologo in zebrafish



Saggi ecotossicologici: pesci (zebrafish, *Danio rerio*)

Decreto legislativo n°26 del 4 Marzo del 2014: attuazione della direttiva 2010/63/UE sulla protezione degli animali utilizzati a fini scientifici.

ARTICOLO 1: OGGETTO E AMBITO DI APPLICAZIONE

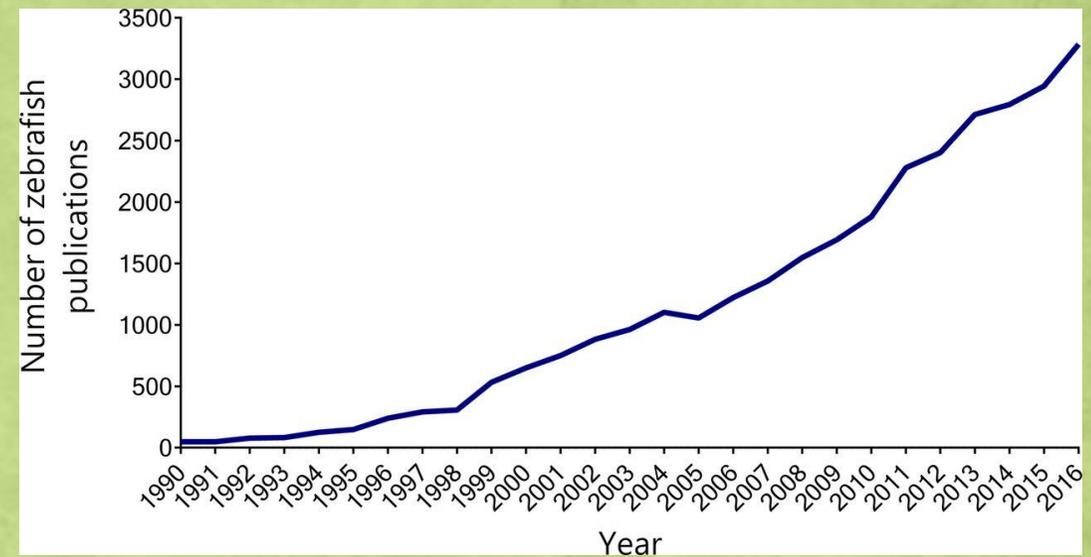
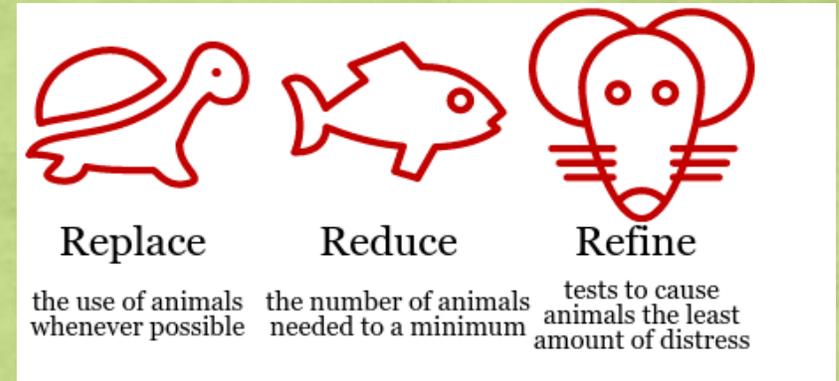
Il presente decreto si applica ai seguenti animali:

a) animali vertebrati vivi non umani, comprese:

1. forme larvali capaci di alimentarsi autonomamente

2. forme fetali di mammiferi a partire dall'ultimo terzo del loro normale sviluppo;

b) cefalopodi vivi.



Saggi ecotossicologici: pesci (zebrafish, *Danio rerio*)

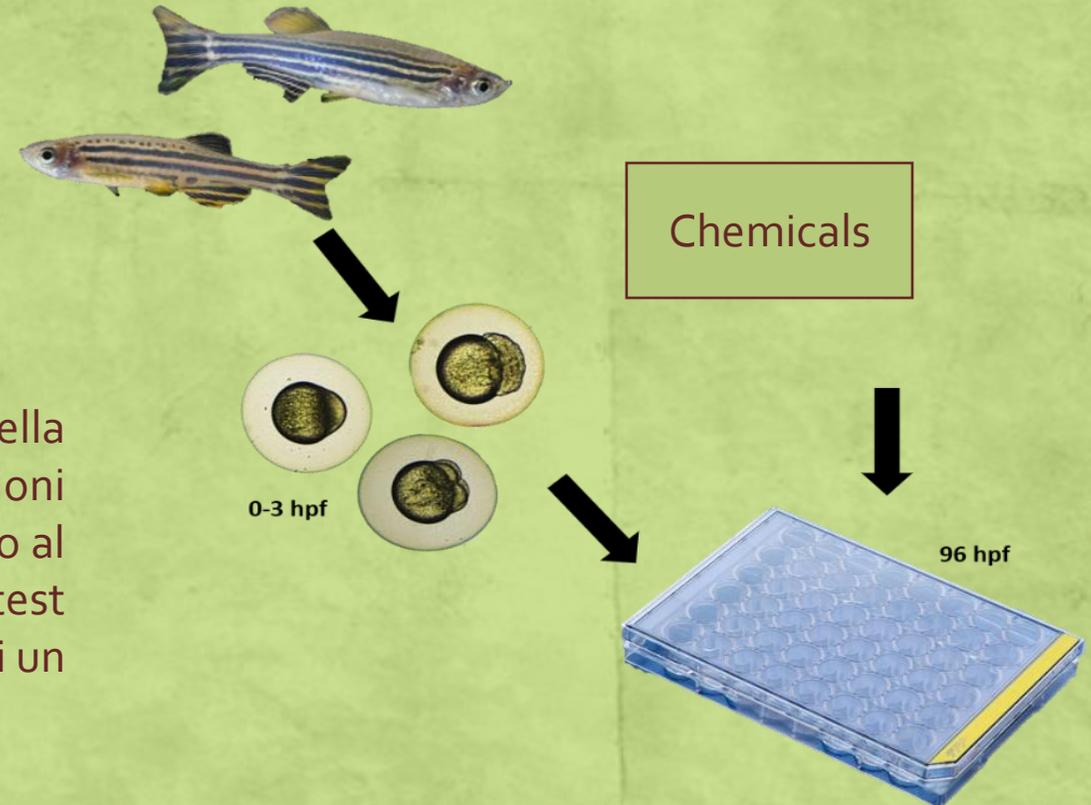


Introduzione

Il test è eseguito al fine di determinare la **tossicità ACUTA** di una sostanza chimica su forme embrionali e larvali di zebrafish.

Principio del test

Esporre uova fertilizzate di zebrafish alla concentrazione della sostanza da testare per un periodo di 96 ore. Ogni 24 ore le soluzioni di contatto vengono rinnovate e gli embrioni valutati al microscopio al fine di evidenziare la presenza di **alterazioni letali**. Al termine del test viene determinata la Concentrazione letale 50 (CL₅₀) con l'ausilio di un software.



Saggi ecotossicologici: pesci (zebrafish, *Danio rerio*)

- **I pesci adulti** vivono in un sistema a ricircolo (ZebTEC) costituito da vaschette (5 pesci per litro)
- I parametri fisici dell'acqua vengono quotidianamente registrati (T°, pH, Conducibilità)
- I parametri chimici vengono monitorati con spettrofotometro settimanalmente (ammoniaca, nitrati e nitriti)



Saggi ecotossicologici: pesci (zebrafish, *Danio rerio*)

Come vengono alimentati gli esemplari adulti?

Vengono alimentati tre volte al giorno con alimento vivo (larve di *Artemia salina*) e mangime secco



Saggi ecotossicologici: pesci (zebrafish, *Danio rerio*)

Come si ottengono gli embrioni?

Il pomeriggio prima dell'inizio del test i pesci vengono messi in accoppiamento: si separano i maschi dalle femmine e vengono messi in vaschette per l'accoppiamento (sistema di accoppiamento statico)



La vaschetta è costituita da un contenitore, da una griglia concentrica, da un separatore e da un coperchio.

La griglia serve ad evitare che i pesci adulti predino gli embrioni.



Saggi ecotossicologici: pesci (zebrafish, *Danio rerio*)

Come si ottengono gli embrioni?

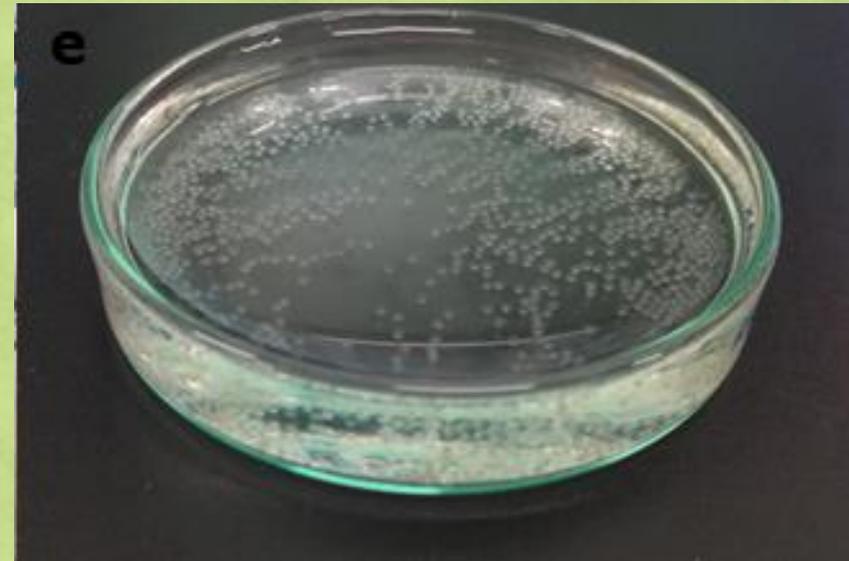
La mattina dell'inizio del test il separatore viene tolto e la vaschetta inclinata per garantire l'accoppiamento



Saggi ecotossicologici: pesci (zebrafish, *Danio rerio*)

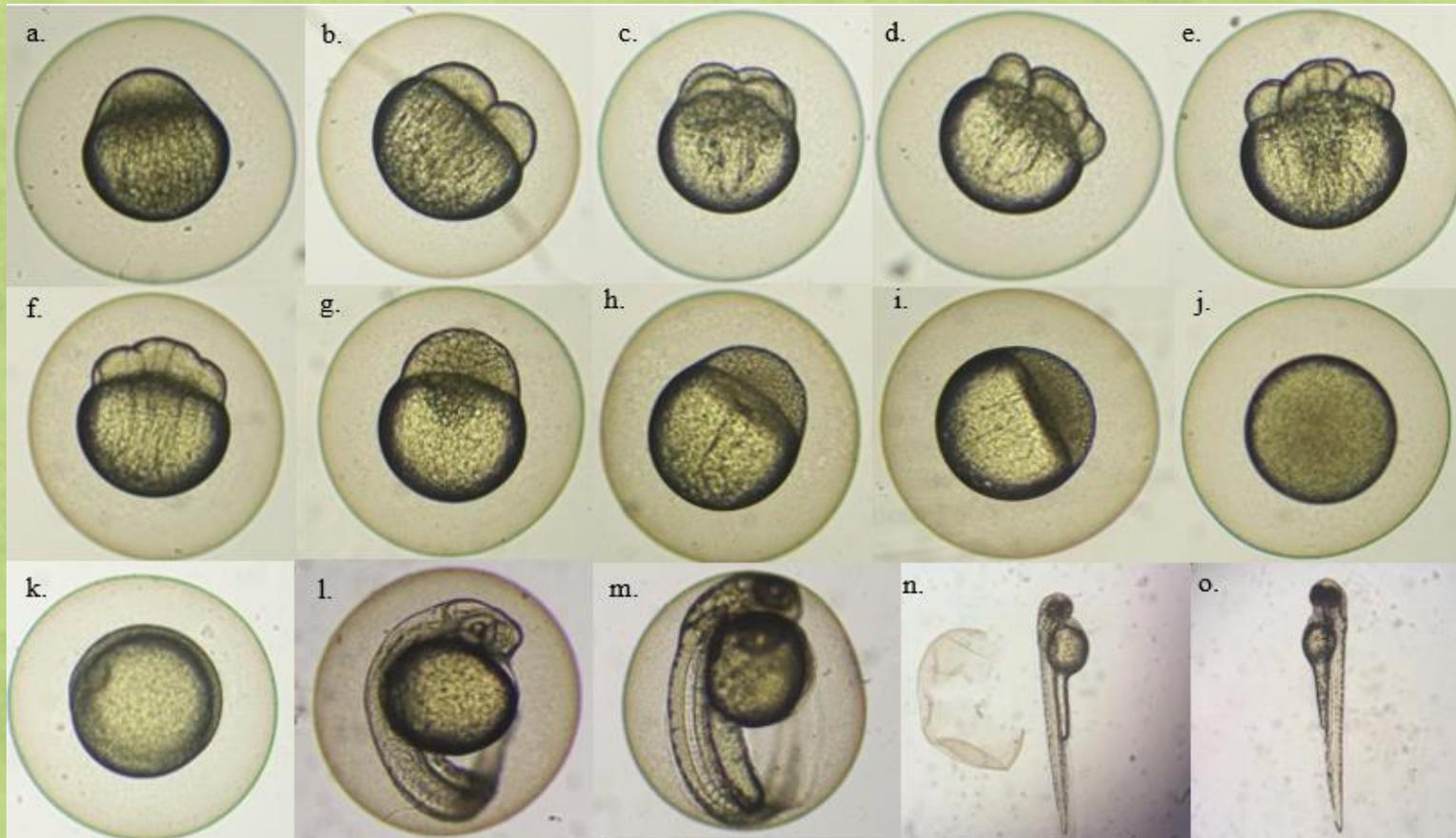
Come si ottengono gli embrioni?

Gli embrioni vengono «raccolti» e risciacquati con acqua deionizzata e medium e poi selezionati macroscopicamente e microscopicamente



Saggi ecotossicologici: pesci (zebrafish, *Danio rerio*)

Embrioni: vanno selezionati embrioni entro 1-3 ore post fertilizzazione senza irregolarità o lesioni

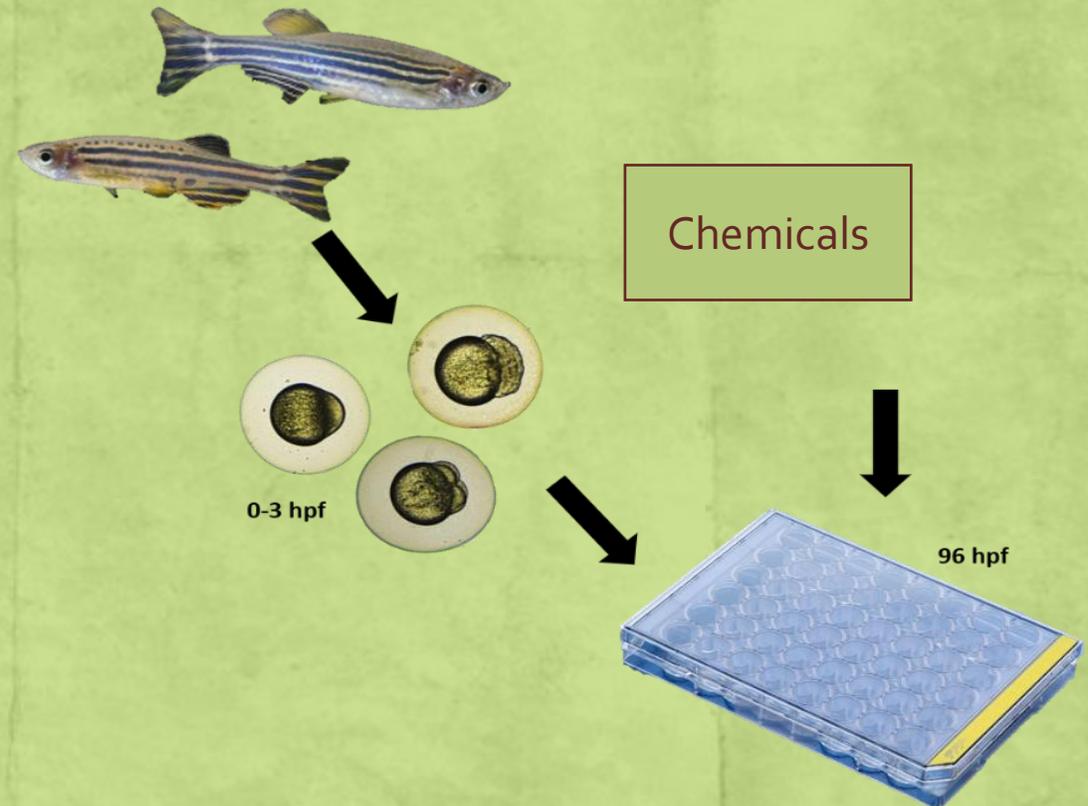


- a) 1-cell stage (0.2 hpf)
- b) 2-cell stage (0.75 hpf)
- c) 4-cell stage
- d) 8-cell stage (1.5 hpf)
- e) 32-cell stage (1.75 hpf)
- f) 64-cell stage (2 hpf)
- g) High stage (3 hpf)
- h) Oblong stage (3.5 hpf)
- i) Sphere stage (4 hpf)
- j) Germ ring stage (5.5 hpf)
- k) 70% epiboly stage (7.5 hpf)
- l) Prim-5 stage (24 hpf)
- m) Long-pec stage (48 hpf)
- n) Protruding-mouth stage (72 hpf)
- o) Early larval period (96 hpf)

Saggi ecotossicologici: pesci (zebrafish, *Danio rerio*)

Condizioni di esposizione:

20 embrioni per concentrazione (1 embrione per pozzetto) sono esposti alla concentrazione della sostanza in esame. Le «working solution» vengono rinnovate quotidianamente prestando attenzione a non prelevare l'embrione durante la fase di aspirazione. L'embrione rimane lo stesso per tutta la durata del test!!!!!!!



Saggi ecotossicologici: pesci (zebrafish, *Danio rerio*)

Osservazioni: alterazioni letali



Coagulazione
dell'embrione



Mancato distacco della
coda dal sacco vitellino



Mancata formazione
dei somiti



Assenza di battito
cardiaco (48 ore)

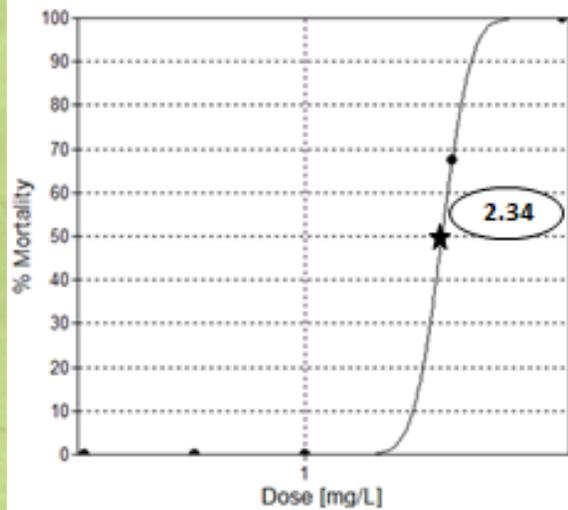
Saggi ecotossicologici: pesci (zebrafish, *Danio rerio*)

Criteri di accettazione del test (vanno eseguiti 3 replicati indipendenti):

- ✓ Tasso di fertilizzazione degli embrioni superiore al 70%
- ✓ Temperatura delle «working solution» mantenuta a $26 \pm 1^\circ\text{C}$
- ✓ La sopravvivenza degli embrioni nel controllo negativo e nel controllo solvente superiore o al massimo uguale al 90% alla fine del test
- ✓ Nel controllo positivo una mortalità almeno del 30% al termine del test
- ✓ Tasso di schiusa almeno uguale o superiore all'80% nel controllo negativo a 96 hpf
- ✓ Concentrazione dell'ossigeno disciolto almeno uguale o superiore all'80% al termine del test

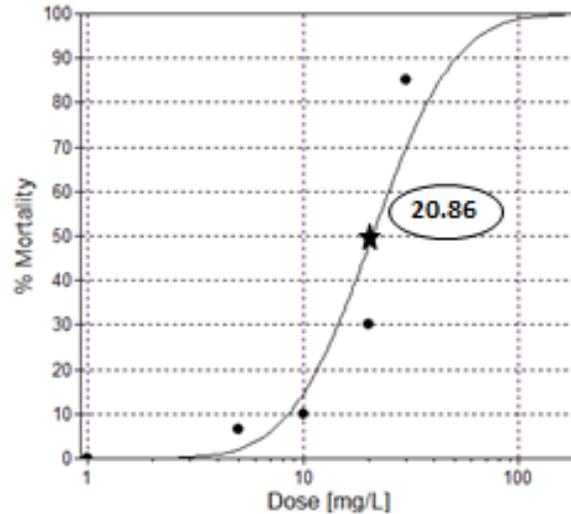
Saggi ecotossicologici: pesci (zebrafish, *Danio rerio*)

A)



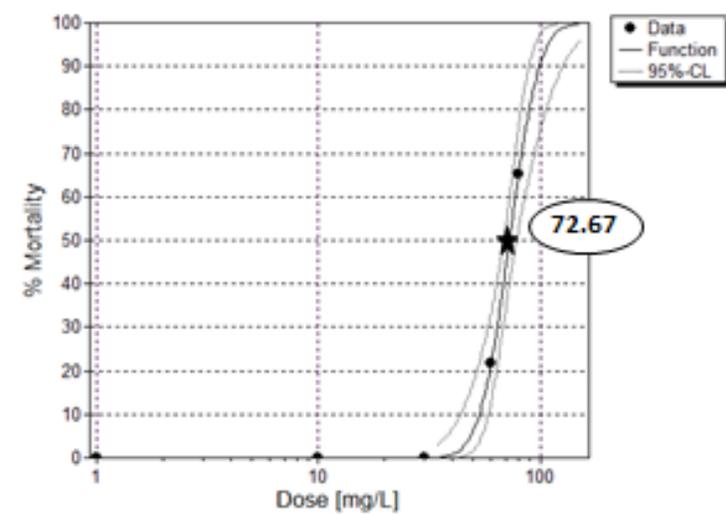
Concentrations (mg/L)	LC50 (mg/L)	LC20 (mg/L)	LC10 (mg/L)
0.25-0.5-1-2.5-5	2.34	1.98	1.87

B)



Concentrations (mg/L)	LC50 (mg/L)	LC20 (mg/L)	LC10 (mg/L)
1-5-10-20-30	20.86	11.61	8.55

C)



Concentrations (mg/L)	LC50 (mg/L)	LC20 (mg/L)	LC10 (mg/L)
1-10-30-60-80	72.67	59.17	53.15

Quale sostanza è più tossica?

Referenze

- Linee guida OECD (disponibili on-line)
- Trattato di farmacologia e terapia-Ecotossicologia, Paoletti, Nicosia, Clementi e Fumagalli, a cura di Vighi e Bacci, UTET pagine 23-39