

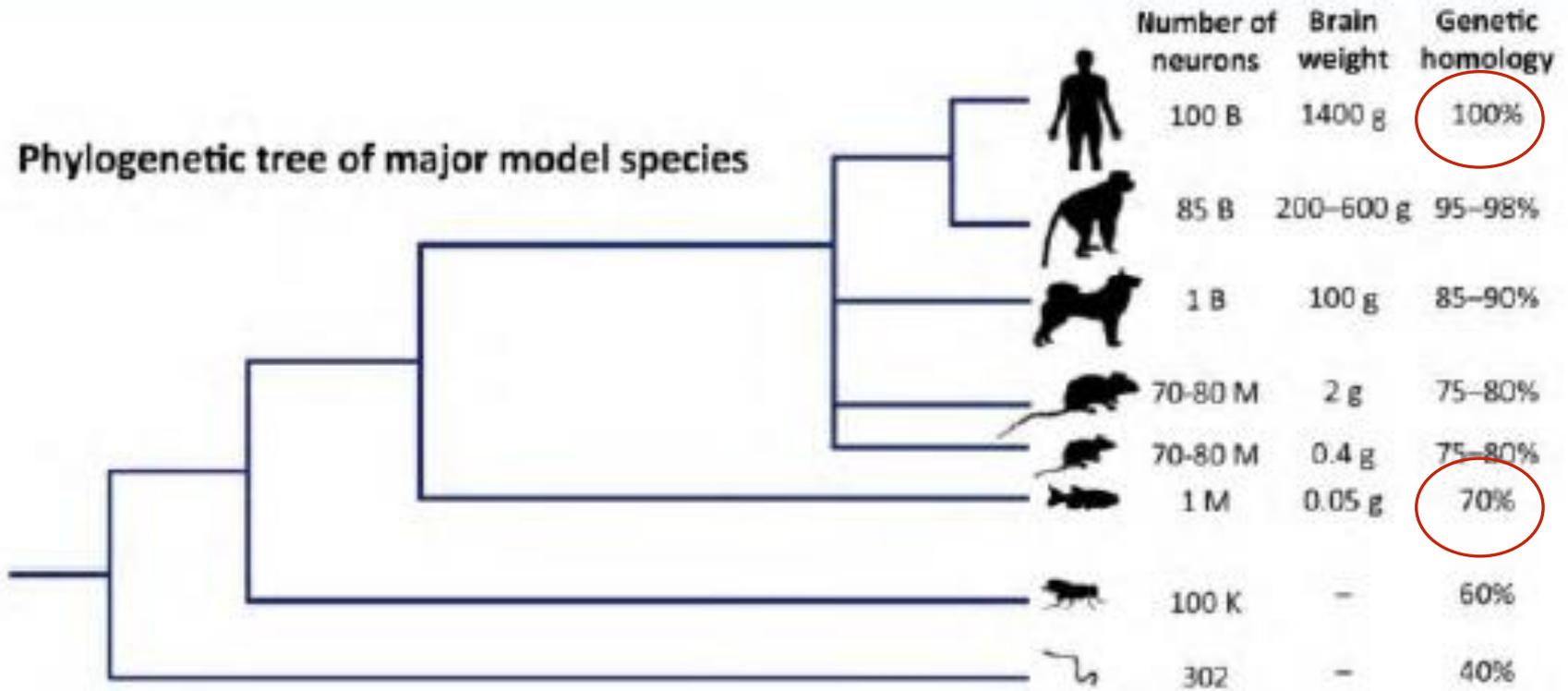
Zebrafish: un modello nella ricerca



- **condivide comuni pathways molecolari con i mammiferi**
 - **prole numerosa**
 - **sviluppo extrauterino**
 - **corion trasparente**
 - **crescita rapida**
- **tempi di generazione molto rapidi**
 - **bassi costi di gestione**



Phylogenetic tree of major model species



adapted by Stewart et al., Trends Neurosci., 2014

Zebrafish è davvero il “nuovo” roditore da laboratorio?



1980

primo topo
transgenico

2002

genoma
sequenziato

ATTUALMENTE

E

Principale modello
impiegato
nella ricerca
biomedica.



2001

progetto
genoma
“zebrafish”

2013

genoma
sequenziato

ATTUALMENTE

E

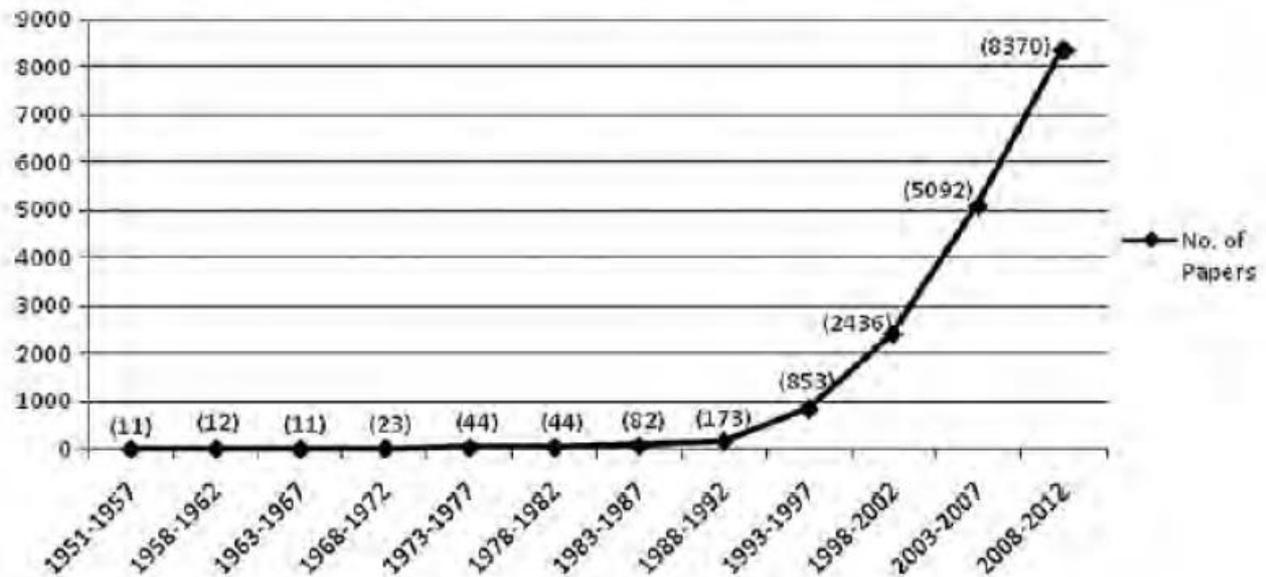
Numerosissime
linee transgeniche
disponibili.

Mapping of Zebrafish Research: A Global Outlook

Priyamvadah Kinth, Gopalakrishnan Mahesh, and Yatish Panwar

- map significant publication patterns in zebrafish research;
- list research performance on multiple perspectives, such as author, institution, country, journal, and keywords;
- and present a supplementary evaluation of research development.

MAPPING OF ZEBRAFISH RESEARCH: A GLOBAL OUTLOOK



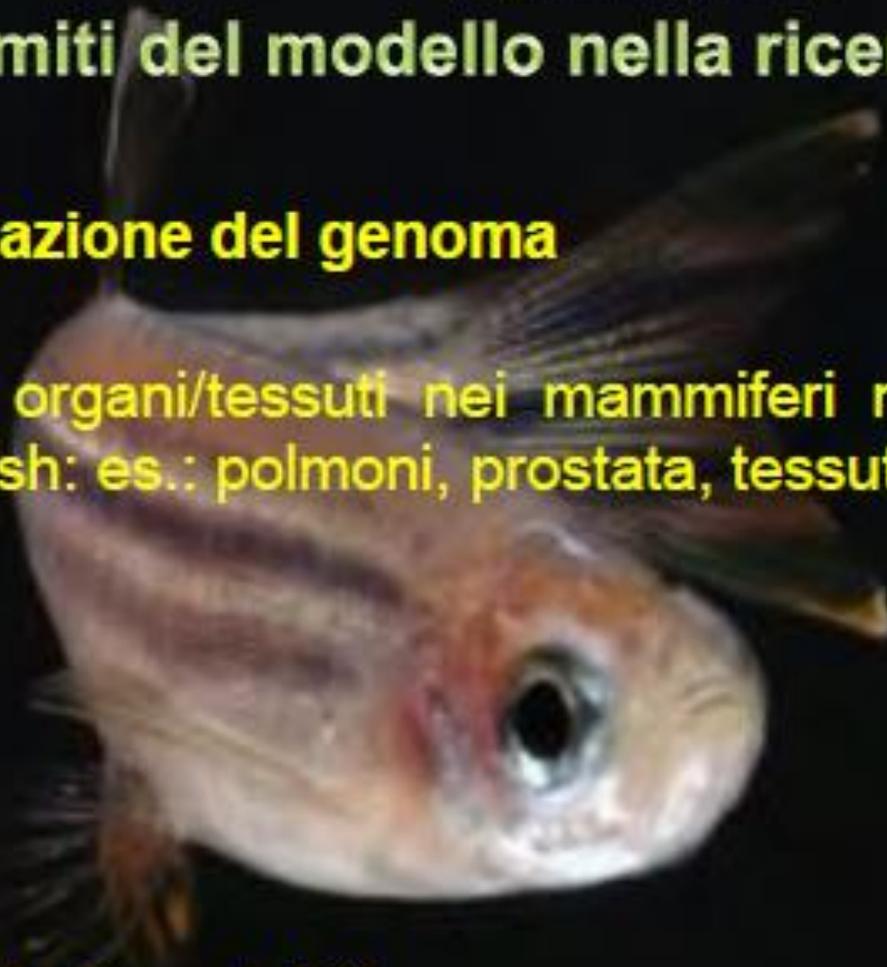
Zebrafish : **i limiti del modello nella ricerca biomedica**

Duplicazione del genoma

Alcuni organi/tessuti nei mammiferi non sono presenti in zebrafish: es.: polmoni, prostata, tessuto mammario.

**Scarsa
caratterizzazione
dei ceppi inbred
rispetto ai roditori**

Molecole liposolubili non possono essere somministrate per immersione in acqua a meno che non siano associate a solventi



* ZEBRAFISH (*Danio rerio*)

* Famiglia *Cyprinidae*

* Pesce d'acqua dolce, tropicale, originario continente asiatico

* Vive in pozze e canali in 5-20 banchi di individui

* Da adulto dimensioni fino a 4-5 centimetri

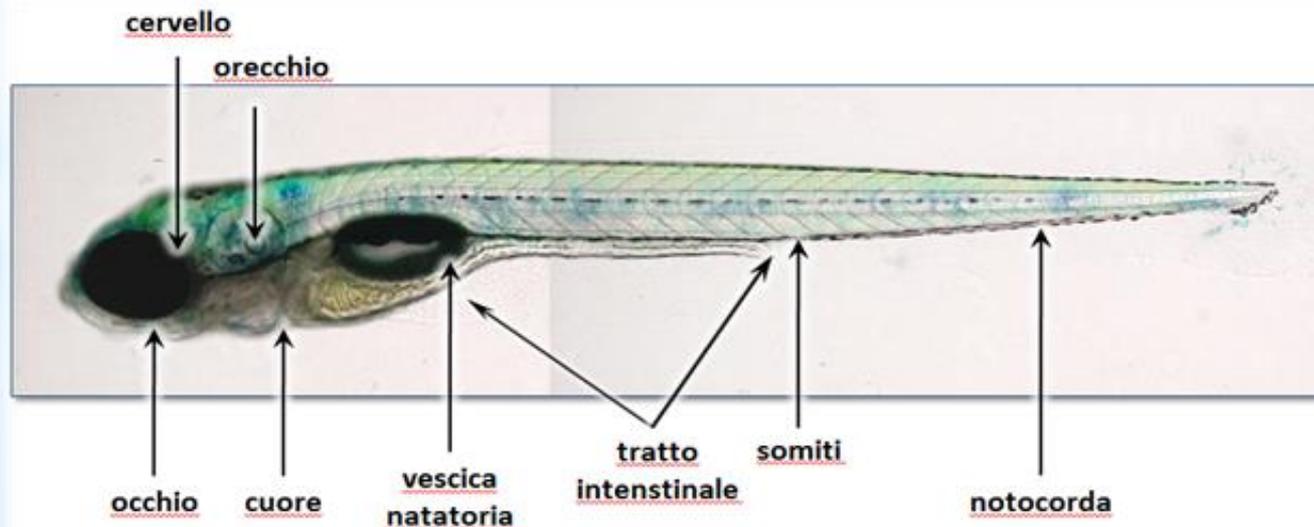
* Animale a sessi separati con lieve dimorfismo sessuale

* Livrea con dorso olivastro e ventre bianco argenteo, corpo con quattro linee orizzontali blu e quattro linee bianche



* ZEBRAFISH: biologia

- * Sistema circolatorio semplice, a ciclo chiuso
- * Sistema digerente semplice (pesce agastrico)
- * Sistema respiratorio archi branchiali (4 paia bilaterali)
- * Orecchio interno (otoliti utili per l'orientamento)
- * Vescica natatoria, dorsalmente all'intestino, organo idrostatico con miscela di gas (O_2 , CO_2 , N_2) necessario per i movimenti del pesce in acqua



* Allevamento/vantaggi

Facilità manipolazione embrioni per creare linee transgeniche

Alta densità di allevamento

Taglia piccola e resistente

Elevata produzione di uova

In laboratorio

Longevo (2 anni)

Uova facilmente manipolabili

Bassi costi di mantenimento

Disponibilità di oltre 1000 linee transgeniche

17/04/2013 Genoma sequenziato viene reso pubblico



* ZEBRAFISH: alimentazione

- dieta naturale costituita da zooplancton e insetti
- in Facility utilizzo di mangime secco pellettato o a fiocchi con aggiunta di “live diets” come

Vantaggio nutrizionale live diets

Artemia

- profilo amminoacidico per sostenere la crescita del pesce
- fonte digeribile e biodisponibile della nutrizione
- determinazione di un comportamento di predazione per il pesce
- additivati per personalizzare il profilo nutrizionale (con vitamina C e amminoacidi)

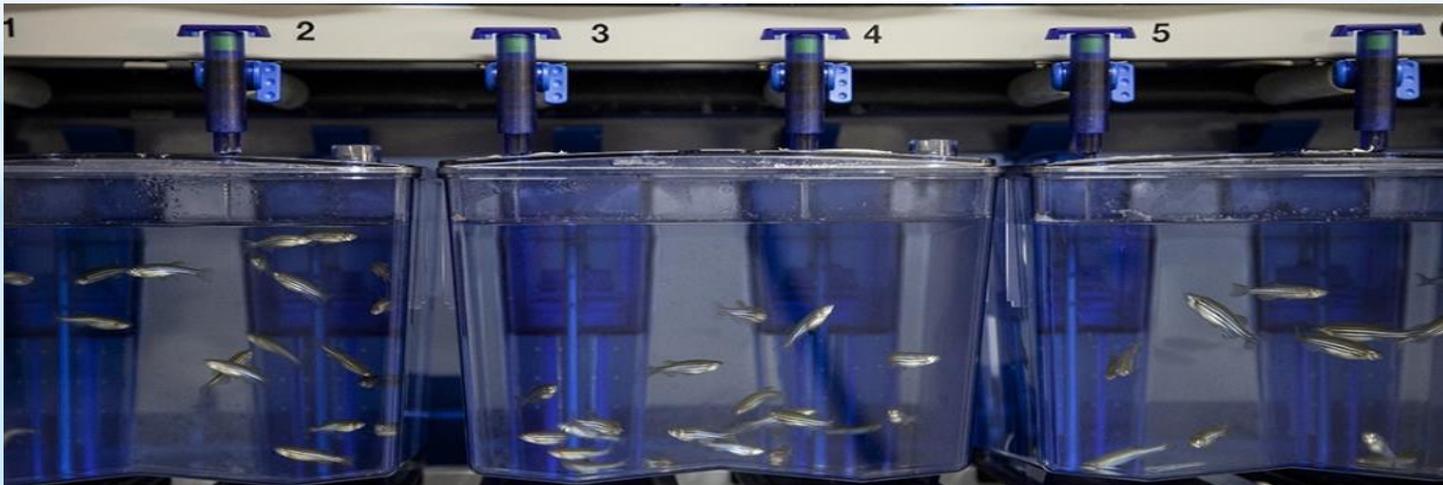


* GESTIONE E MANAGEMENT IN FACILITY

In Italia Dir. 2010/63/UE “sulla protezione degli animali utilizzati a fini scientifici” con **D.lgs 4 marzo 2014, n.26** (elenco animali art. 10 comma 1)

Allegato III «cura e management degli animali»

- colonie da 10-15 pesci in vaschette per assicurare il benessere animale
- sistema a gocciolamento per ricambio giornaliero continuo e lento dell'acqua



* GESTIONE E MANAGEMENT IN FACILITY



PARAMETRI OTTIMALI

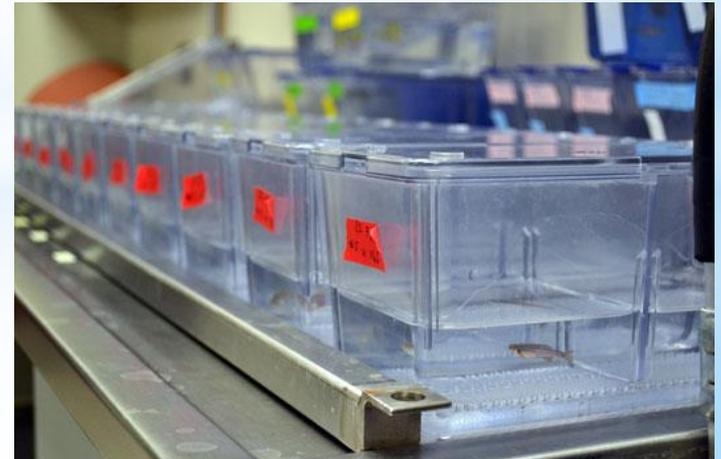
Temperatura H ₂ O	28±1°C
Ossigeno disciolto	~ 7.8 mg/L a 28 °C
Scorie azotate	NH ₃ e NO ₂ = 0 ppm, NO ₃ =10 ppm
pH	tra 7.3 ed 8
Salinità	0,35 a 0,7 ppt di sali
Fosfati	0,02 e 0,50 mg/l
Fotoperiodo	12/12 o 14/10 luce/buio

sistema di filtri (meccanico, a carbone, microbiologico) e raggi per assicurare una buona qualità delle acque

(Zebtec, Tecniplast, Italy) sistema “stand alone”

* ZEBRAFISH: breeding

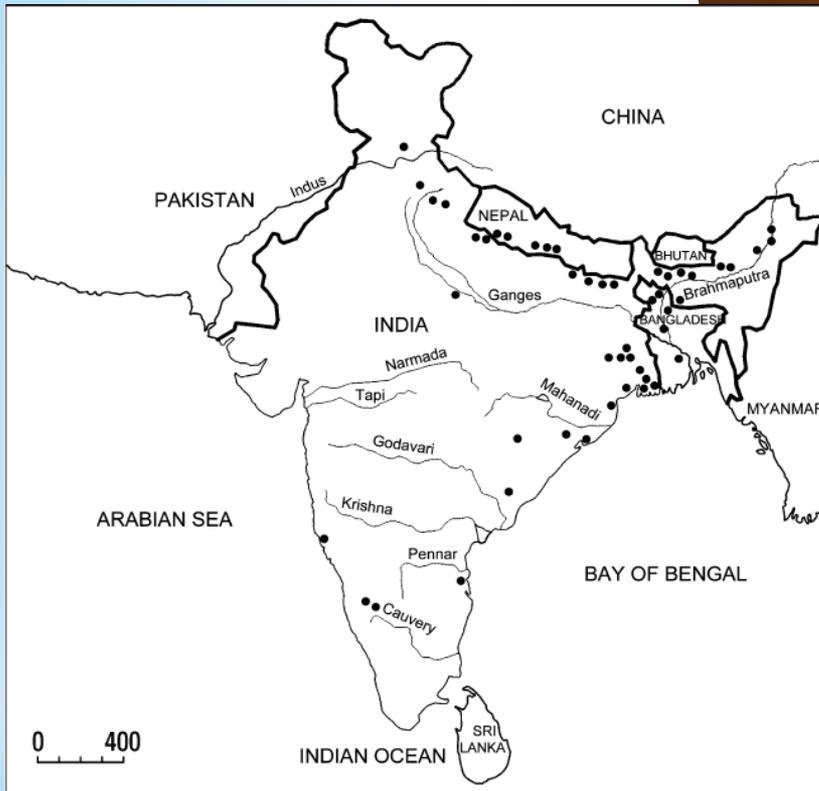
- * Riproduzione in natura con arrivo delle piogge
- * Riproduzione in Facility tutto l'anno
- * Riproduzione in natura con arrivo delle piogge
- * Raggiungimento forma adulta in 3 mesi
- * Fertilizzazione esterna (in acqua)
- * Assenza di cure parentali degli embrioni



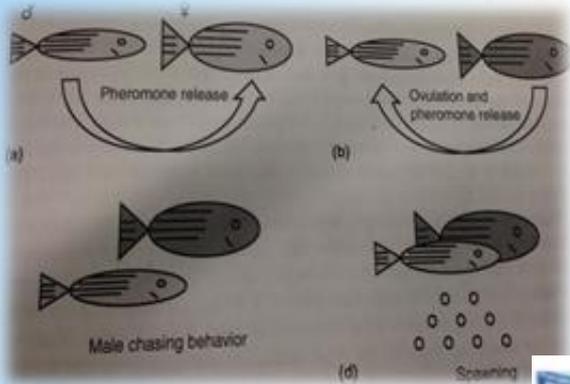
Breeding - stimoli scatenanti la riproduzione:

- Ambientali
- Olfattivi
- Contatto fisico



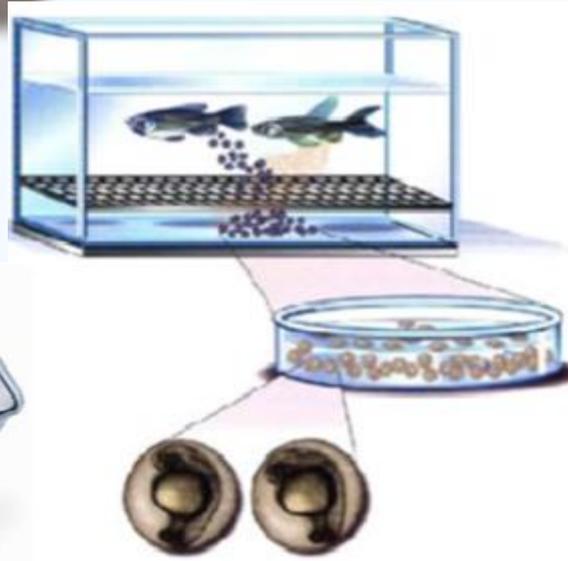


Breeding
Stimoli scatenanti la riproduzione: stimoli ambientali



Comportamento riproduttivo dello zebrafish:

- (a) Rilascio dei feromoni maschili;
- (b) Ovulazione e rilascio feromoni femminili;
- (c) Esibizione del comportamento di corteggiamento del maschio;
- (d) Deposizione delle uova con fecondazione esterna



Breeding

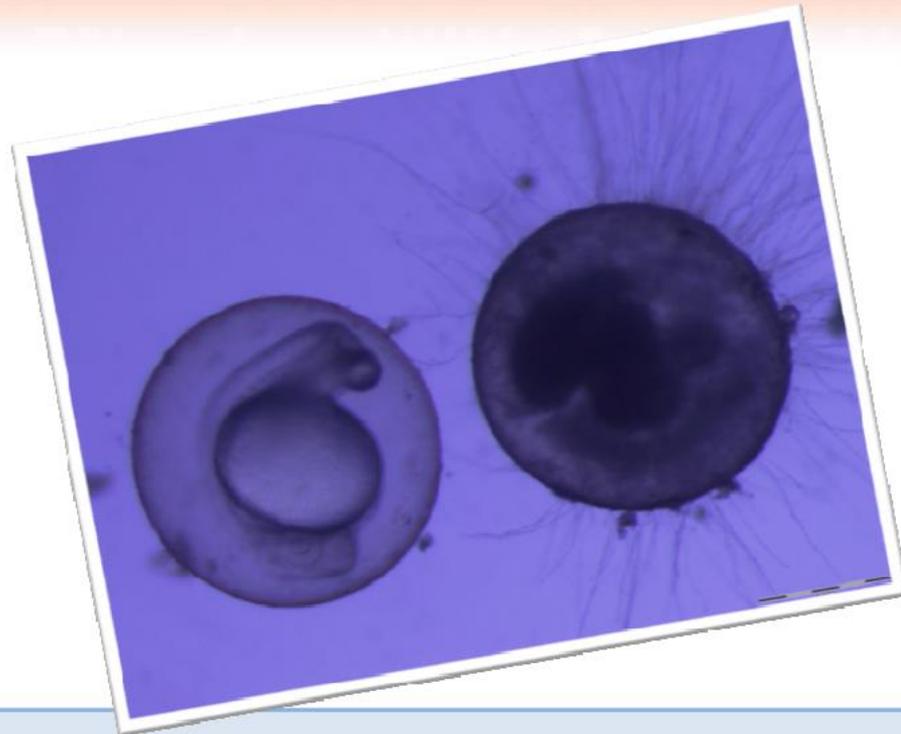
Stimoli scatenanti la riproduzione: stimoli olfattivi (Ref: C. Lawrence) e contatto fisico.



Breeding
Raccolta degli embrioni

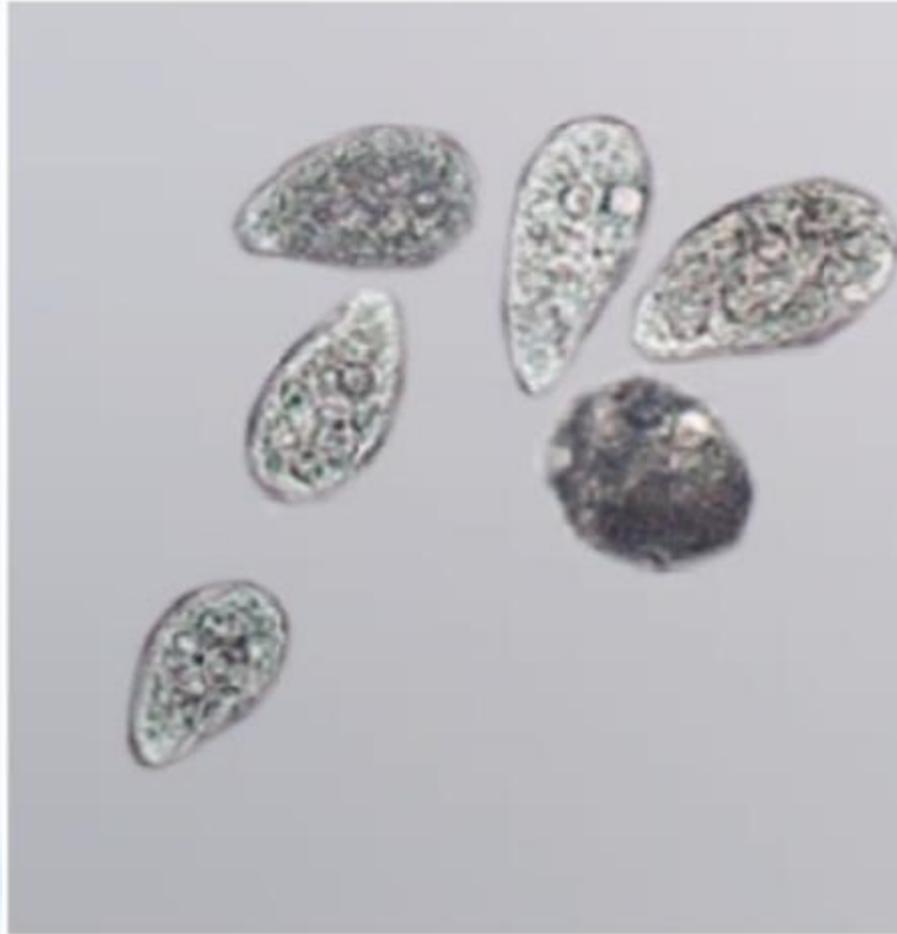


Incubazione degli embrioni
Passaggio fondamentale spesso sottovalutato

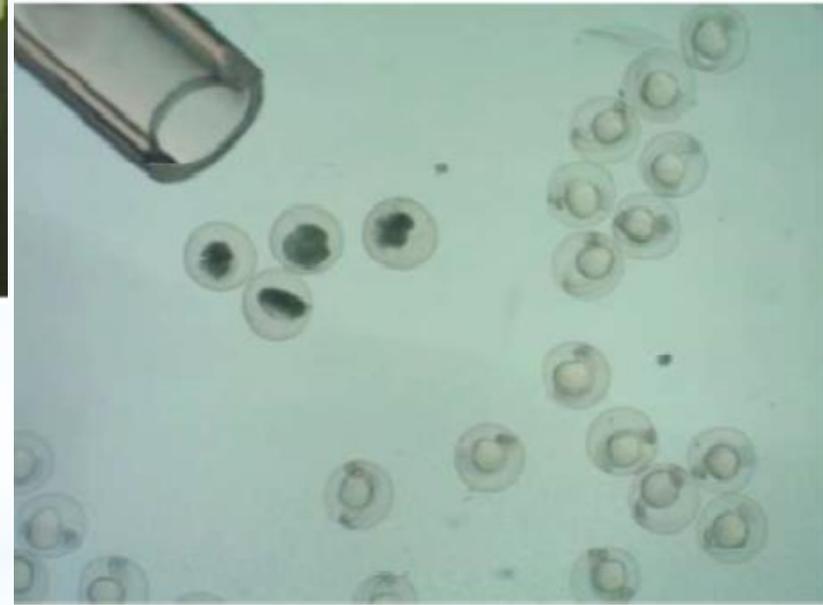
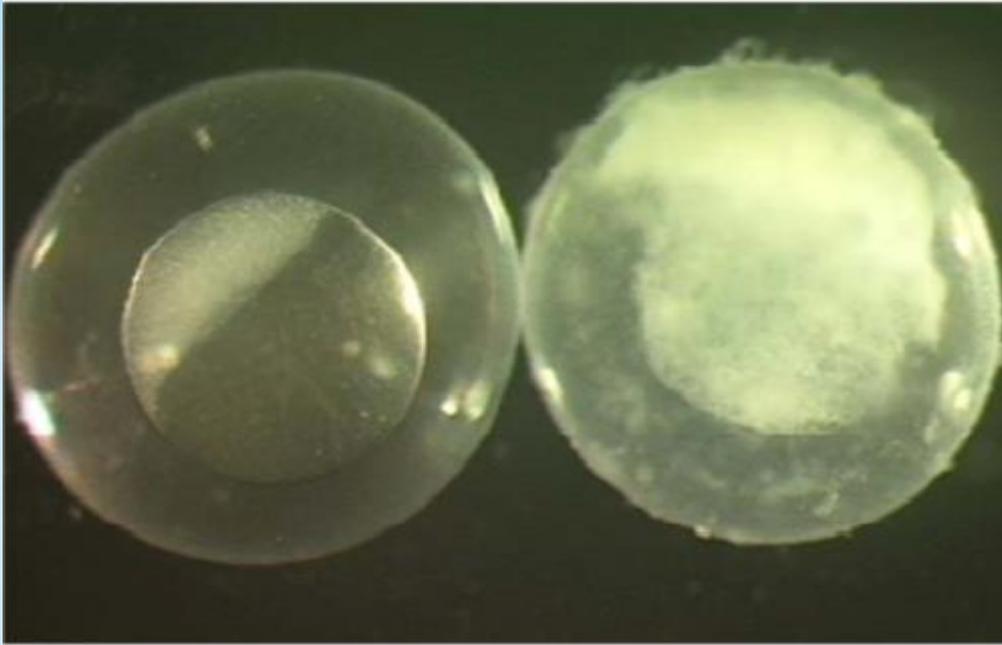


Incubazione degli embrioni

La loro cura è cruciale: infezioni fungine (saprolegnia)

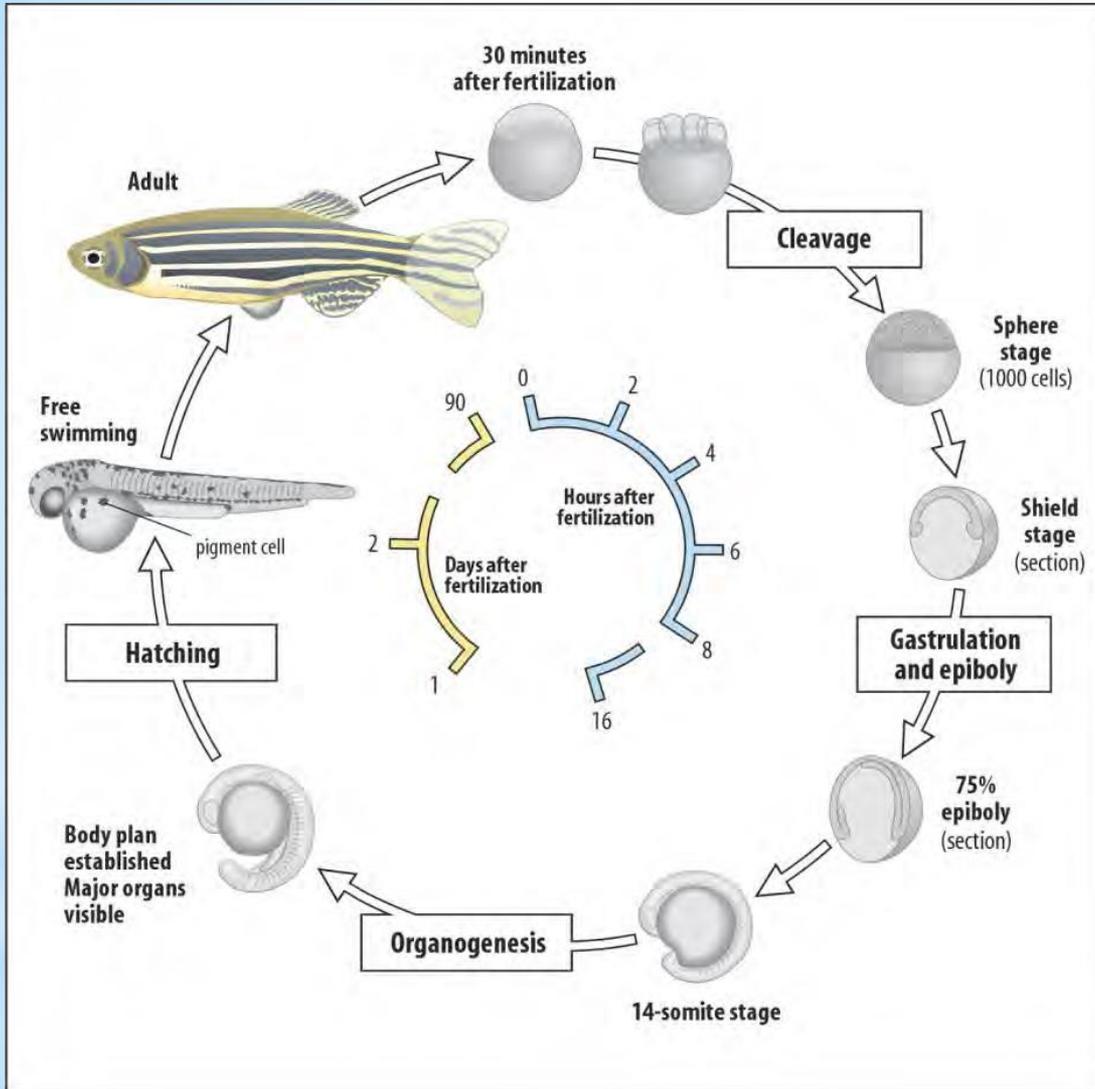


Incubazione degli embrioni
La loro cura è cruciale: protozoi (*tetrahymena*)



Incubazione degli embrioni
La loro cura è cruciale: Ipossia

Datare gli embrioni di zebrafish:



h.p.f.:
hours post fertilization

d.p.f.:
days post fertilization

...dopo 90 d.p.f. è un adulto!!!!

fry phase

Embryos (0 to 72 h.p.f.)

Early larvae (72 h.p.f. to 13 d.p.f.)

Mid larvae (14 d.p.f. to 29 d.p.f.)

juvenile phase

(30 d.p.f. to 90 d.p.f.)

adult phase

(> 90 d.p.f. up to 2 years)



Fasi dello sviluppo
Classificare in modo univoco

**A partire dal 5° giorno dopo la schiusa
è in grado di alimentarsi autonomamente**

ORGANISMO MODELLO PER TEST DI TOSSICITA' IN VIVO

La trasparenza dell'embrione consente di valutare :

- ❑ la morfologia degli organi interni, senza dover ricorrere a tecniche chirurgiche (necessarie invece per i mammiferi);
- ❑ processi necrotici, che determinano un'opacità nell'embrione;
- ❑ difetti di circolazione che sono evidenziabili come piccole emorragie.

Fish Embryo Toxicity Test - FET Test

Test di tossicità acuta

OECD/OCDE

236

Adopted:
26 July 2013

OECD GUIDELINES FOR THE TESTING OF CHEMICALS

Fish Embryo Acute Toxicity (FET) Test

INTRODUCTION

1. This Test Guideline (TG) 236 describes a Fish Embryo Acute Toxicity (FET) test with the zebrafish (*Danio rerio*). This test is designed to determine acute toxicity of chemicals on embryonic stages of fish. The FET-test is based on studies and validation activities performed on zebrafish (1)(2)(3)(4)(5)(6)(7)(8)(9)(10)(11)(12)(13)(14). The FET-test has been successfully applied to a wide range of substances exhibiting diverse modes of action, solubilities, volatilities, and hydrophobicities (reviewed in 15 and 16).

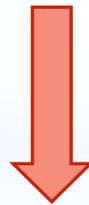
Cosa significa validazione di un test



La validazione è

la valutazione della predittività ed affidabilità di un test per lo scopo per cui è stato concepito

I test a **scopo regolatorio** (per valutare ad esempio la tossicità di farmaci e sostanze chimiche) devono essere sottoposti a lunghe e laboriose **procedure di validazione** portate avanti e valutate da **enti indipendenti**



una volta validato il test viene inserito nelle linee guida internazionali (OECD)

Che cosa si valuta in una procedura di validazione?

- * La riproducibilità del test, ovvero il grado di concordanza tra una serie di misure di una stessa grandezza presso laboratori e condizioni diverse
- * La sensibilità e la specificità del test, ovvero la capacità rispettivamente di vedere i veri positivi sulla totalità dei positivi e i veri negativi sulla totalità dei negativi
- * La concordanza, che unisce sensibilità e specificità, ovvero fornisce la percentuale dei risultati corretti (positivi o negativi che siano) sulla totalità delle prove effettuate



Fish Embryo Toxicity Test - FET Test

Test di tossicità acuta

PRINCIPIO DEL TEST (OECD n. 236)

esporre individualmente uova fertilizzate di zebrafish (max 16 cellule) per 96 h a sostanze chimiche. Al termine dell'esposizione, la tossicità acuta è determinata dalla somma delle 4 lesioni apicali (indicatori di letalità) osservate in 96h.

Viene così calcolato:

- ***LC50**: lethal concentration 50
- ***NOEC**: no observed effect concentration
- ***LOEC**: lowest observed effect concentration

Definizioni:



❖ LC50: concentrazione letale 50

è concentrazione in grado di provocare la morte del 50% degli organismi utilizzati in prova. Si ha una LC 50 quando la metà degli esposti muore.

❖ NOEC: concentrazione senza effetti osservabili

è la concentrazione alla quale non si osservano effetti

❖ LOEC: minima concentrazione con effetto

è la più bassa concentrazione testata di una sostanza in esame alla quale si osserva un effetto significativo ($p < 0,05$) rispetto alla sostanza di controllo

Concentrazioni espresse in: **mg/kg**

Fish Embryo Toxicity Test

FET Test

- ✓ minimo 5 concentrazioni per sostanza da testare
- ✓ 20 embrioni per concentrazione da testare
- ✓ 20 embrioni per C NEGATIVO + C POSITIVO
- ✓ piastre da 24 pozzetti (2mL soluzione)
- ✓ 4 embrioni per C.I. (controllo interno alla piastra)



C POSITIVO: 3,4-dichloroaniline 4mg/L

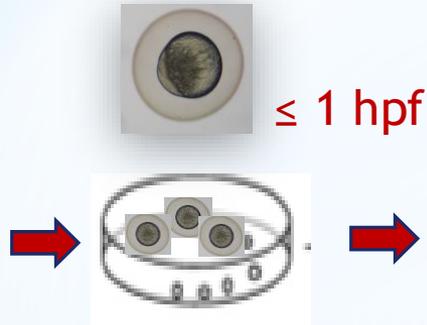
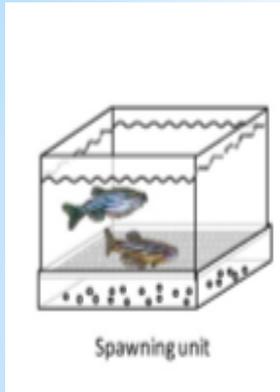
DMSO: dimetilsolfossido, composto organico appartenente alla categoria dei solfossidi;

Utilizzato come solvente per miscelare le sostanze chimiche da testare.

	1	2	3	4	5	6
A	C.I.					
B	C.I.					
C	C.I.					
D	C.I.					

FET Test - procedura

≤ 3
hpf



raccolta e lavaggio



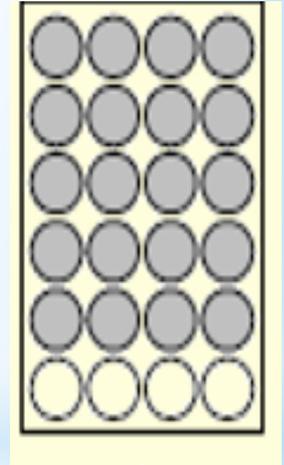
controllo fertilizzazione ≤ 1 hpf.
irregolarità di sviluppo
malformazioni e alterazioni.



20 embrioni per
concentrazione e C+
e C-
4 embrioni per C.I.



eliminate



Condizioni di validità:

Fecondazione delle uova raccolte ≥ 70%

T = 26 ± 1 °C

Mortalità embrioni nel controllo < 10% a 96h

Controllo positivo: mortalità > 30% a 96h

Schiusa nel controllo ≥ 80% a 96h

Ossigeno disciolto ≥ 80% satur. a 96h (nella max concentrazione e controllo)

OECD guidelines no. 236

FET Test - tempi di incubazione e osservazioni

Gli embrioni vengono incubati a 26 ± 1 °C per 96h

Cura degli embrioni:

- ✓ controllo giornaliero dello sviluppo
- ✓ annotazione su appositi fogli di lavoro
- ✓ ricambio giornaliero delle soluzioni a contatto



data 14/06/16 Concentrazione test						data 14/06/16 Concentrazione test						data 14/06/16 Concentrazione test							
lettura a 24 h						lettura a 24 h						lettura a 24 h							
alterazioni	1	2	3	4	IC	alterazioni	1	2	3	4	5	IC	alterazioni	1	2	3	4	5	IC
A						A							A						
B						B							B						
C						C							C						
D						D							D						
data 15/06/16						data 15/06/16						data 15/06/16							
lettura a 48 h						lettura a 48 h						lettura a 48 h							
alterazioni	1	2	3	4	IC	alterazioni	1	2	3	4	5	IC	alterazioni	1	2	3	4	5	IC
A						A							A						
B						B							B						
C						C							C						
D						D							D						
data 16/06/16						data 16/06/16						data 16/06/16							
lettura a 72 h						lettura a 72 h						lettura a 72 h							
alterazioni	1	2	3	4	IC	alterazioni	1	2	3	4	5	IC	alterazioni	1	2	3	4	5	IC
A						A							A						
B						B							B						
C						C							C						
D						D							D						
data 17/06/16						data 17/06/16						data 17/06/16							
lettura a 96 h						lettura a 96 h						lettura a 96 h							
alterazioni	1	2	3	4	IC	alterazioni	1	2	3	4	5	IC	alterazioni	2	3	4	5	IC	
A						A							A						
B						B							B						
C						C							C						
D						D							D						

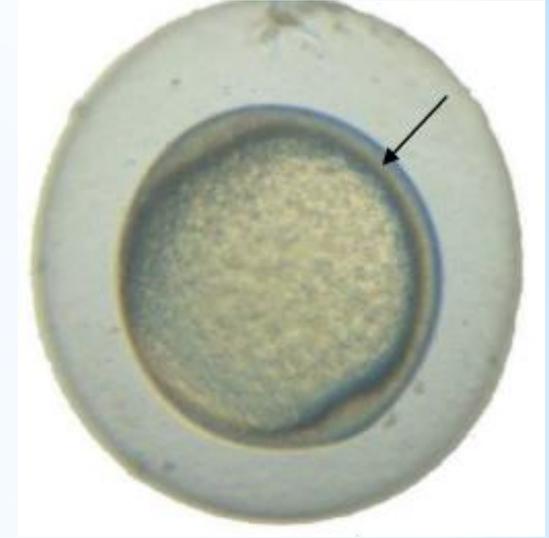
A=coagulazione embrioni
B=hatching
C=not hatching
D=anomalie di sviluppo

FET Test: endpoints - indicatori di letalità

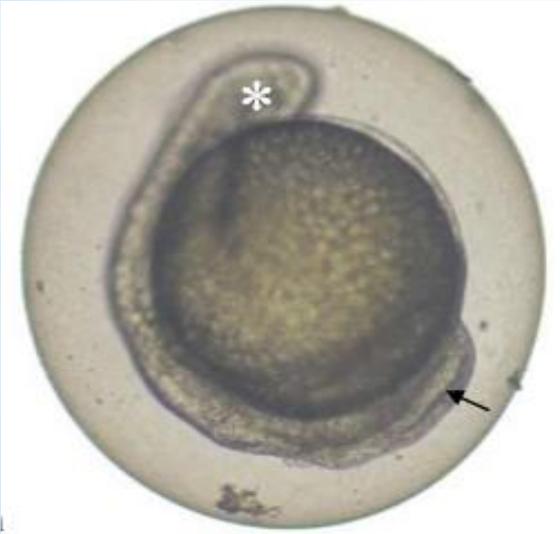
✓ coagulazione



✓ mancata formazione dei somiti



✓ mancato distacco della coda dal sacco vitellino

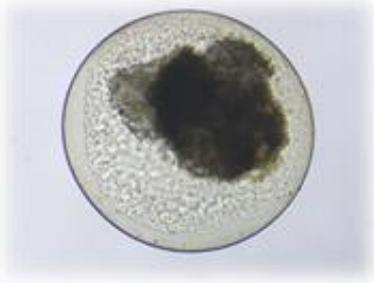


✓ assenza di battito cardiaco



EFFETTI LETALI

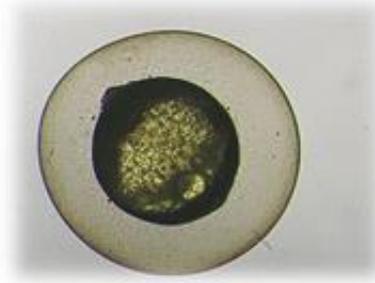
LD 50 (Lethal Dose 50)



Coagulazione
dell'embrione



Mancato distacco della
coda (Acido Valproico)



Mancata formazione dei
somiti (Acido Valproico)

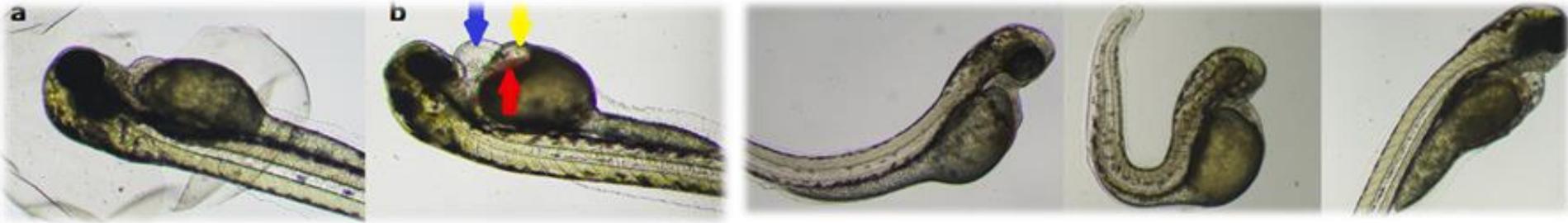


Assenza di battito cardiaco
(valutabile a 48 hpf tramite sistema video,
Triclosan)

LOEC (Lowest Observed Effect Concentration)

NOEC (No Observed Effect Concentration)

EFFETTI SUBLETALI



a) Controllo (larva schiusa a 72 hpf)

b) Larva esposta (Triclosan):

- Riduzione dimensione della testa
- Depigmentazione dell'occhio
- Edema del pericardio (freccia blu)
- Edema dello yolk (freccia gialla)
- Stasi ematica (freccia rossa)

Alterazioni della colonna vertebrale (Prodotti per la cura personale: Triclosan, Triclocarban)

EFFETTI SUBLETALI

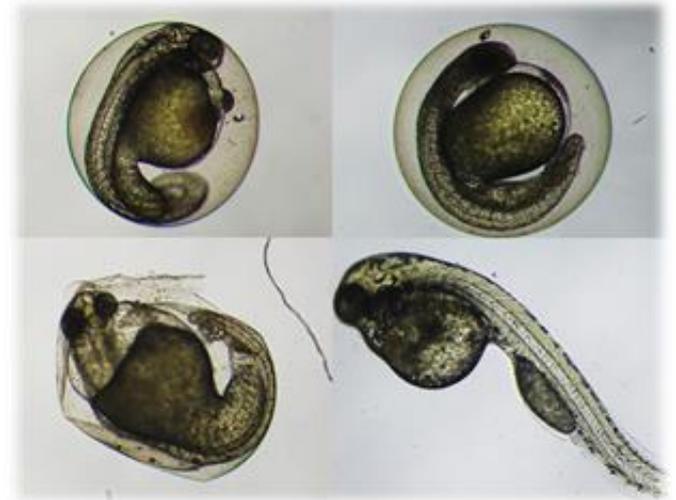


Alterazioni nella dimensione della testa:

A) Microcefalia (prodotti per la cura personale: Triclosan, Triclocarban)

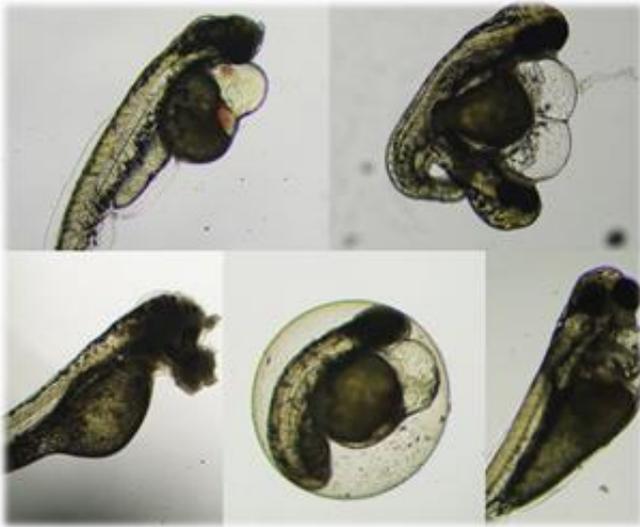
B) Controllo

C) Macrocefalia (Acido valproico)



Deformità ed aumento di volume dello yolk (Propylparabene).

EFFETTI SUBLETALI



Testa deformata (più altre alterazioni subletali, prodotti per la cura personale: Triclosan, Triclocarban; alterazioni dello sviluppo)

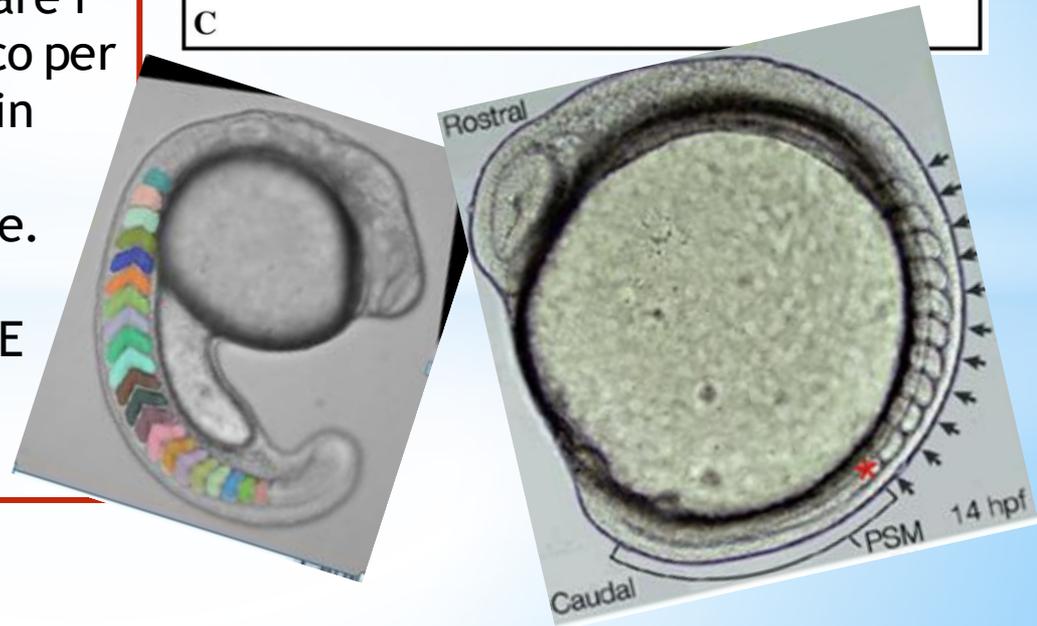
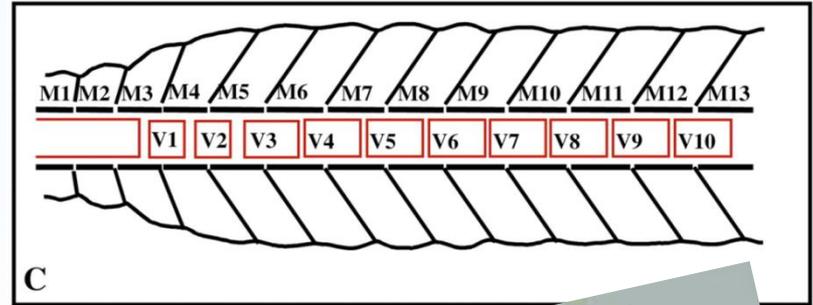
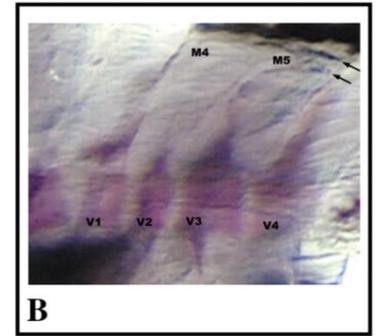
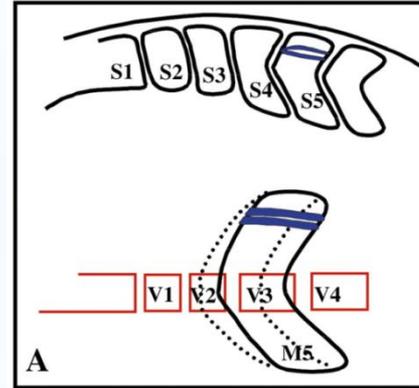


Deformità della coda (prodotti per la cura personale: Triclosan, Triclocarban).

Somiti...questi sconosciuti !!!

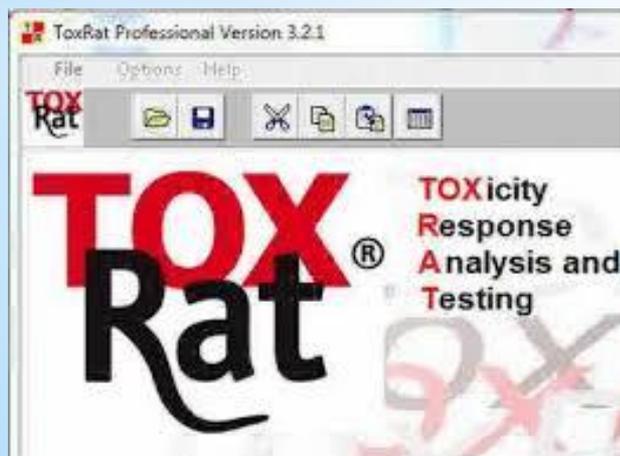
Masse metameriche di origine mesodermica distribuite a coppie lungo l'asse anteroposteriore ai lati del tubo neurale e della notocorda nell'embrione dei Vertebrati. Si originano da due cordoni simmetrici di mesoderma parassiale, che durante la gastrulazione si organizzano in masse non compatte di cellule chiamate somitomeri. Grazie a cambiamenti nell'espressione di molecole di adesione, i somitomeri si compattano in un tessuto di natura epiteliale e si separano a formare i somiti. Il numero dei somiti è specifico per ogni specie e i somiti si differenziano in strutture diverse a seconda della loro posizione lungo l'asse anteroposteriore.

FONTE: ENCICLOPEDIA DELLA SCIENZA E DELLA TECNICA- TRECCANI



ToxRat Software Version 3.3

- LD 50 (Lethal Dose 50)
- LOEC (Lowest Observed Effect Concentration)
- NOEC (No Observed Effect Concentration)



OECD n° 236

ANALISI DEL RISCHIO



* **Valutazione di rischio**

Identificazione del pericolo: indagine preliminare

Caratterizzazione del pericolo: valutazione dose-risposta

Determinazione della sicurezza: definizione della TDI

Caratterizzazione del rischio: valutazione dell'esposizione in confronto con i limiti soglia

* **Gestione del rischio:** concentrazioni massime tollerabili

* **Comunicazione del rischio**

CARATTERIZZAZIONE DEL PERICOLO

NOAEL - LOAEL : No (Lowest)-observed-adverse-effect-level)

BMD= Benchmark dose (BMDL)= BMDLower limit

* Valutazione quantitativa che utilizza una curva dose-probabilità per determinare il livello di dosaggio equivalente al NOAEL (sotto del rischio di background).

EHDI= (Equivalent – Human - Daily - Intake) per sostanze bioaccumulabili:

* Dose che l'uomo deve assumere giornalmente per lunghi periodi per arrivare (all'equilibrio) ad avere un carico corporeo come quello che negli animali ha prodotto un NOAEL o un LOAEL

DETERMINAZIONE DELLA SICUREZZA

ESTRAPOLAZIONE DELLA DOSE SOGLIA ALL'UOMO

$$\text{LIMITE SOGLIA} = \frac{\text{NOAEL o LOAEL o BMDL o EHDI}}{\text{Fattore di incertezza/sicurezza (UF/SF)}}$$

NOAEL o LOAEL	10 - variabilità interspecifica 10 - variabilità individuale
BMDL	< 10 - variabilità individuale
EHDI	< 10 - variabilità individuale

Contaminazioni volontarie (additivi, pesticidi, residui di farmaci)

ADI: (Acceptable Daily Intake)

Contaminazioni involontarie (contaminanti ambientali)

TDI: Tolerable Daily Intake (Dose Giornaliera Tollerabile)

ToxRat Version 3.3

Fish, Embryo Acute Aquatic Toxicity (FET) Test (OECD 236 - 2013)

General:

(Fill in: grey = optional; green = obligatory, yellowish = added by program; red = don't change!!)

Test Identification/Project No.	Carmine PhD
Test Item	MethylPARABENE
Unit of Test Item Concentration	mg/L
Start of Experiment on Day	
Date and Time of the Evaluation	21/01/2019; 15:03:11
(User area; add further items)	

Test design:

Number of Treatments (incl. Control(s))	7
Duration of the Test	96 h
Measurement Intervals	24h
Measurement Variable	Survival
Test System	<i>Danio rerio</i>
Design (ECx, NOEC/ECx, Limit, Dilution)	NOEC/ECx

Statistics:

# Decimals Data	
# Decimals for Concentrations (Ec _x , NOEC)	3
# Decimals Time	0

Comments:

--

Raw Data		Embryo Survival						if a solvent control exists, insert in column E	
Time	Treatment								
0.0 h	Control	Solvent	1	10	30	60	80		
1	24	20	20	20	20	20	20		
2	0	0	20	20	20	20	20		
3	0	0	20	20	20	20	20		
#Replicates	1	1	3	3	3	3	3		
#Introduced	24.00	20.00	60.00	60.00	60.00	60.00	60.00		
24.0 h									
1	23	20	20	20	20	15	6		
2	0	0	20	20	20	18	10		
3	0	0	20	18	20	15	11		
#Replicates	1	1	3	3	3	3	3		
#Survived	23.00	20.00	60.00	58.00	60.00	48.00	27.00		
48.0 h									
1	23	20	19	20	20	15	6		
2	0	0	20	20	20	18	10		
3	0	0	20	18	20	15	11		
#Replicates	1	1	3	3	3	3	3		
#Survived	23.00	20.00	59.00	58.00	60.00	48.00	27.00		
72.0 h									
1	23	20	19	20	20	14	5		
2	0	0	20	20	20	18	10		
3	0	0	20	18	20	15	10		
#Replicates	1	1	3	3	3	3	3		
#Survived	23.00	20.00	59.00	58.00	60.00	47.00	25.00		
96.0 h									
1	23	20	19	20	19	13	4		
2	0	0	20	20	20	17	8		
3	0	0	20	18	20	15	8		
#Replicates	1	1	3	3	3	3	3		
#Survived	23.00	20.00	59.00	58.00	59.00	45.00	20.00		

Fish, Embryo Acute Aquatic Toxicity (FET) Test (OECD 236 - 2013): Carmine PhD

Summary of Results for all Endpoints

Summary of Results for all Endpoints: Critical effect and threshold dose as observed at end of experimental time; LD: Effective dose for xx% reduction; 95%-CL: 95% Confidence limits; LOED: Lowest observed effect dose; NOED: No observed effect dose.

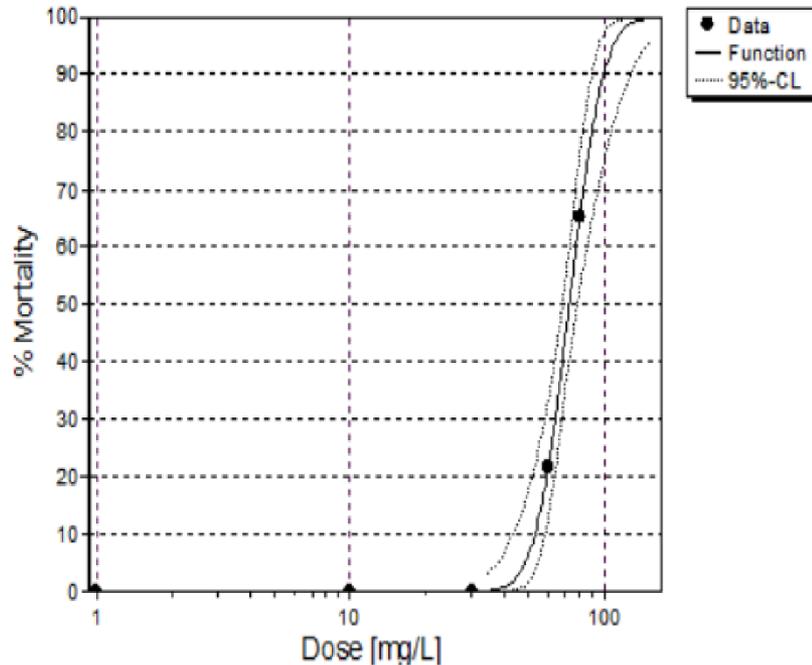
Critical Doses [mg/L]		0-24 h	0-48 h	0-72 h	0-96 h
Survival					
	LD10	55,269	55,269	54,364	53,148
95%-CL	lower	44,442	44,442	43,848	43,705
	upper	60,783	60,783	59,838	58,333
	LD20	62,287	62,287	61,130	59,174
95%-CL	lower	54,430	54,430	53,299	51,811
	upper	66,868	66,868	65,659	63,483
	LD50	78,293	78,293	76,508	72,672
95%-CL	lower	73,179	73,179	71,718	68,491
	upper	87,979	87,979	84,661	78,182
Survival	LOED	>80,000	>80,000	>80,000	>80,000
	NOED	>=80,000	>=80,000	>=80,000	>=80,000

n.d.: not determined due to mathematical reasons or inappropriate data

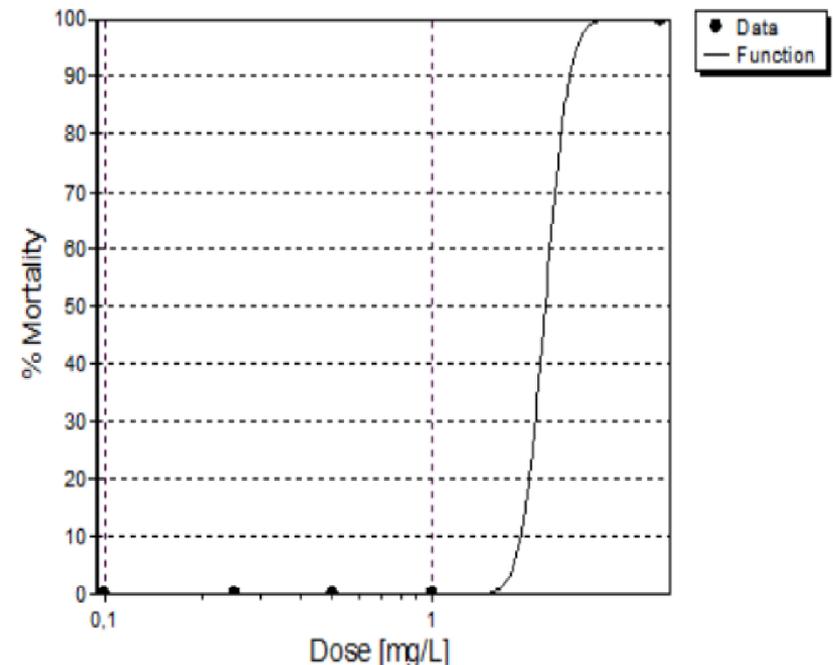
To be a valid test, the mortality of fish embryos in the negative control after 96 h must not exceed 10% and the mortality in the positive control (3,4-dichloroaniline) must be at least 30%.

In the present test the mortality of control embryos was 4,2% and the mortality under presence of 3,4-dichloroaniline was 60,0%. The test fulfills both criteria and thus is valid.

Dose-effect curves at 96 hpf



MeP



BuP

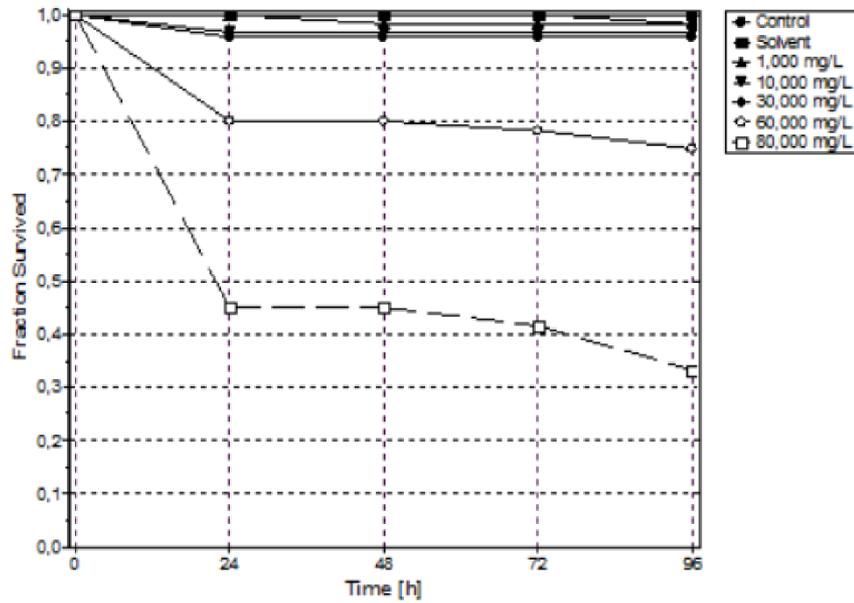
Methylparabene (MeP):

1 mg/L-10 mg/L-30 mg/L-60 mg/L-80 mg/L

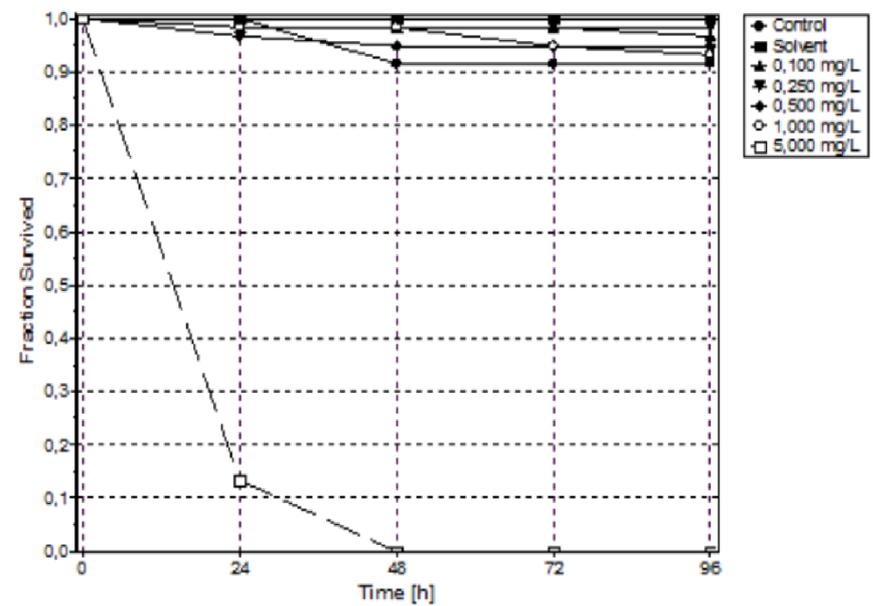
Butylparaben (BuP):

0.1 mg/L-0.25 mg/L- 0.5 mg/L-1 mg/L-5 mg/L

Survival rate at 96 hpf

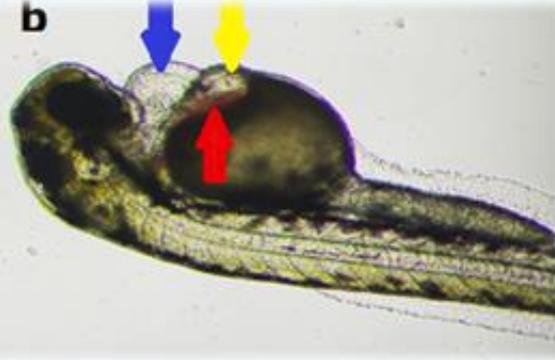


MeP



BuP

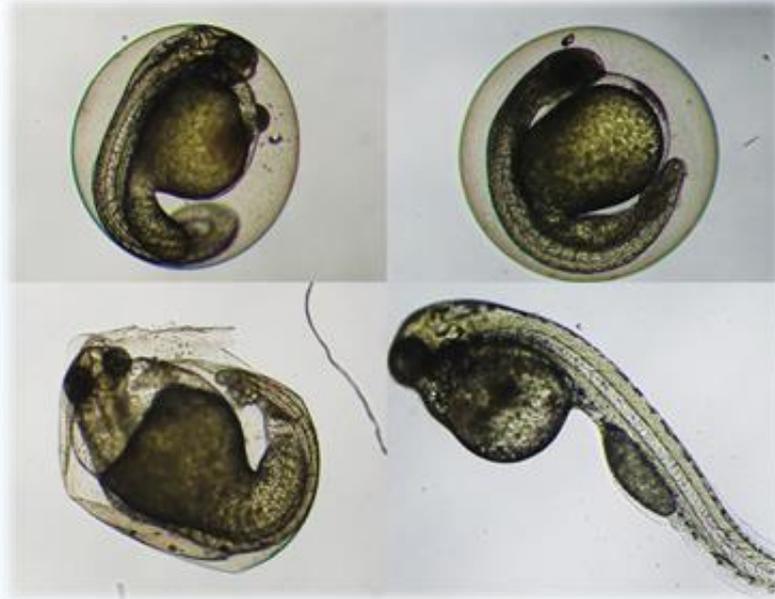
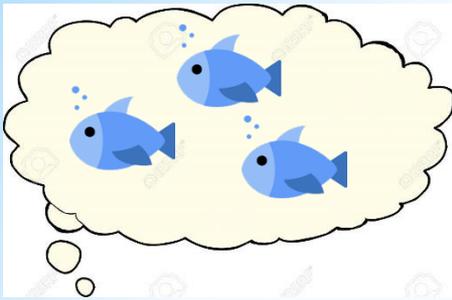
Effetti subletali



- a) Controllo (larva schiusa a 72 hpf)
b) Larva esposta (Triclosan):
- Riduzione dimensione della testa
 - Depigmentazione dell'occhio
 - Edema del pericardio (freccia blu)
 - Edema dello yolk (freccia gialla)
 - Stasi ematica (freccia rossa)



Alterazioni della colonna vertebrale (Prodotti per la cura personale:
Triclosan, Triclocarban)



Deformità ed
aumento di volume
dello yolk
(Propylparabene).

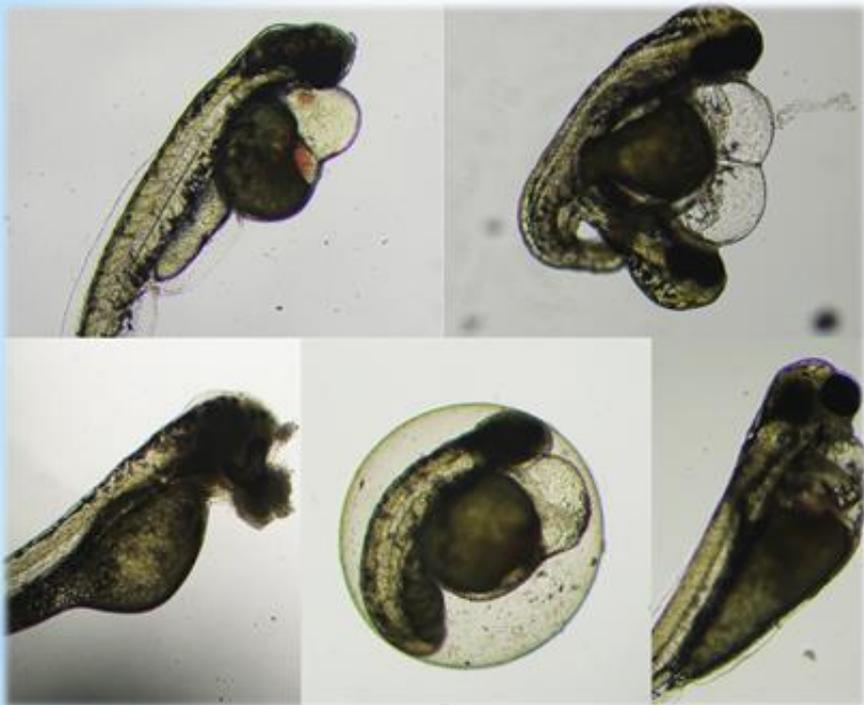


Alterazioni nella dimensione della testa:

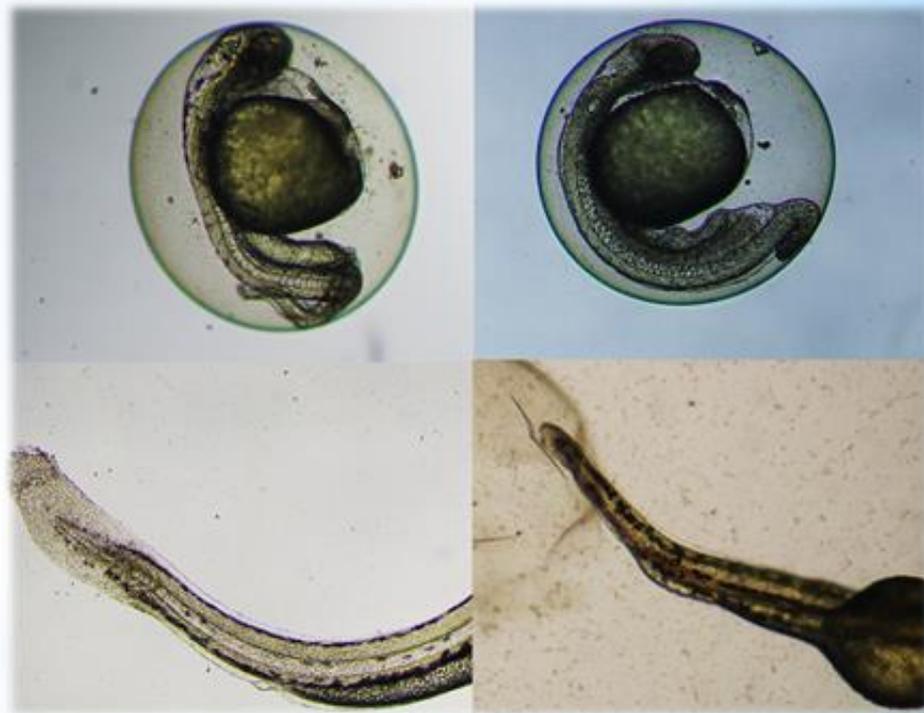
A) **Microcefalia** (prodotti per la cura personale: Triclosan, Triclocarban)

B) **Controllo**

C) **Macrocefalia** (Acido valproico)



Testa deformata (più altre alterazioni subletali, prodotti per la cura personale: Triclosan, Triclocarban; alterazioni dello sviluppo)



Deformità della coda (prodotti per la cura personale: Triclosan, Triclocarban).