

FISH EMBRYO ACUTE AQUATIC TOXICITY (FET) TESTS

DOTT. CARMINE MEROLA





OECD GUIDELINE n°236

Da dove nascono?



OECD 203 - Fish, acute toxicity test è una linea guida dell' *Organisation for Economic Co-operation and Development* (OECD) per l'esecuzione di saggi acuti su specie ittiche dulciacquicole. Con gli opportuni adattamenti è applicata anche per test su specie ittiche marine. Utilizzati per la classificazione delle sostanze chimiche in accordo a "*Globally Harmonised System (GHS) of Classification, Labelling and Packaging of Chemicals*" e per il monitoraggio delle acque.

Nel 2007 entra in vigore il Regolamento REACH (Registrazione, Valutazione, Autorizzazione e Restrizione delle sostanze chimiche)

Il REACH è un regolamento dell'Unione europea, adottato per migliorare la protezione della salute umana e dell'ambiente dai rischi che possono derivare dalle sostanze chimiche, aumentando al contempo la competitività dell'industria chimica dell'UE. **Esso promuove anche metodi alternativi per la valutazione dei pericoli che possono derivare dalle sostanze, allo scopo di ridurre il numero delle sperimentazioni condotte sugli animali.**

PERCHÉ LO ZEBRAFISH?



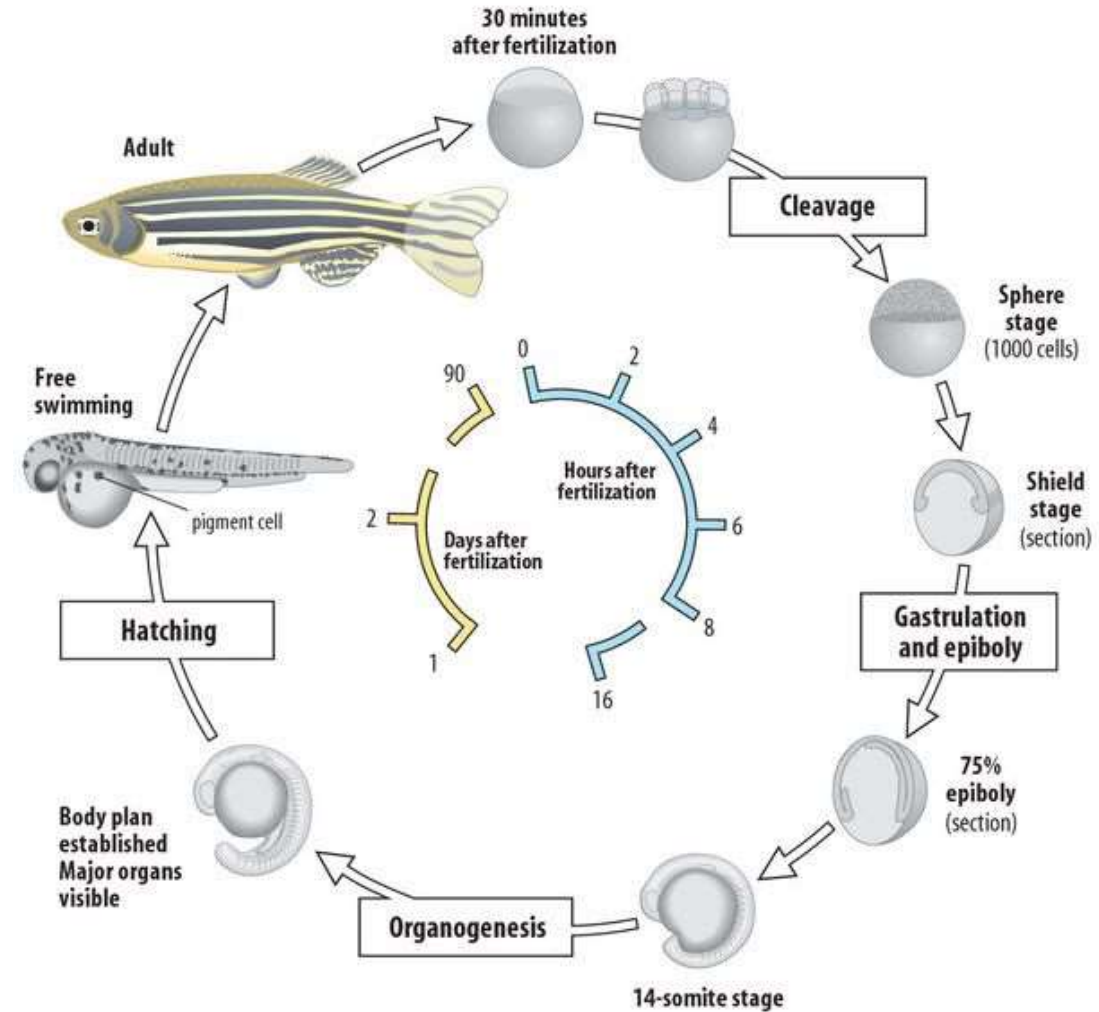
Embrione e larva

- Sviluppo rapido
- Trasparenza
- «Flessibilità» genetica
- Non necessita di cure parentali



Adulti

- 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



Decreto legislativo 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

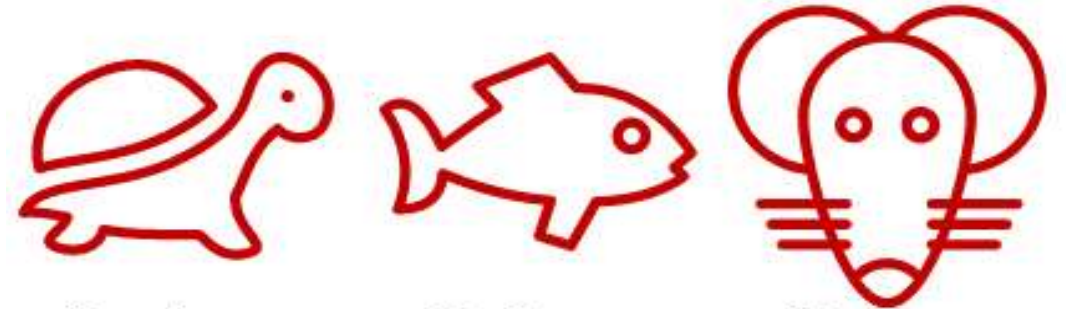
Il presente decreto si applica ai seguenti animali:

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.



Replace

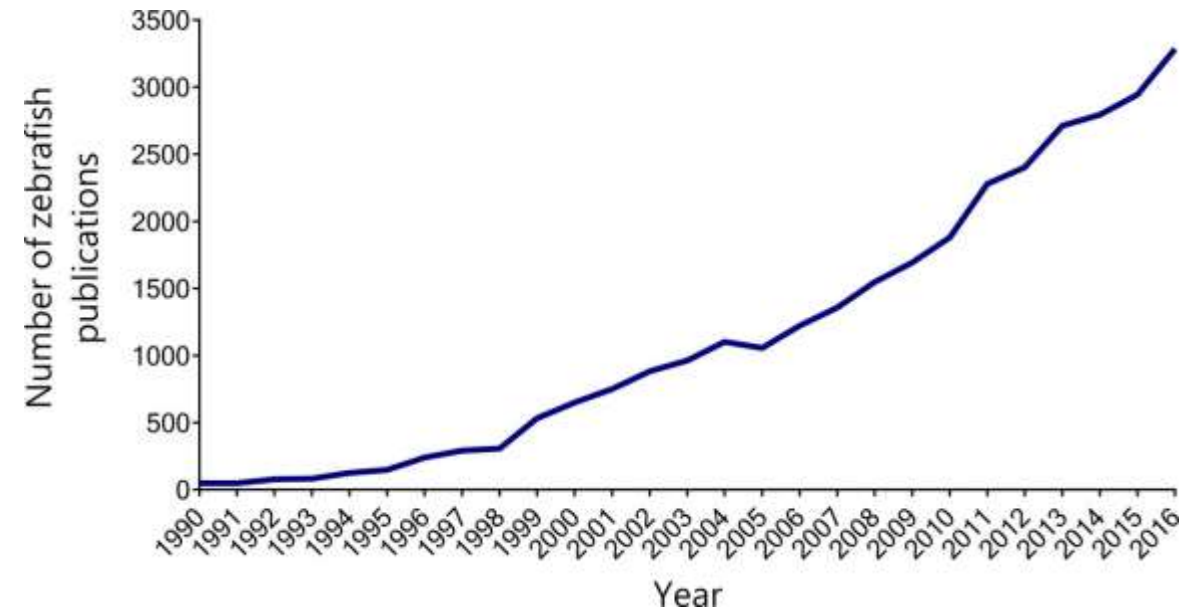
the use of animals whenever possible

Reduce

the number of animals needed to a minimum

Refine

tests to cause animals the least amount of distress



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.



Piastre da utilizzare e medium per diluizione

- Piastre in polistirene da 2,5-5 mL, le piastre vanno pre-condizionate con la *working solution* della concentrazione da testare il giorno prima dell'inizio del test.
- *Dilution water*: preparata in accordo alla linea guida OECD n°203, contiene CaCl₂, MgSO₄, NaHCO₃, KCl, viene fatta ossigenare per 30 minuti e portata a pH di 7,75 (6,5-8,5).



OECD GUIDELINE n°236



- 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)



OECD GUIDELINE n°236

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



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.



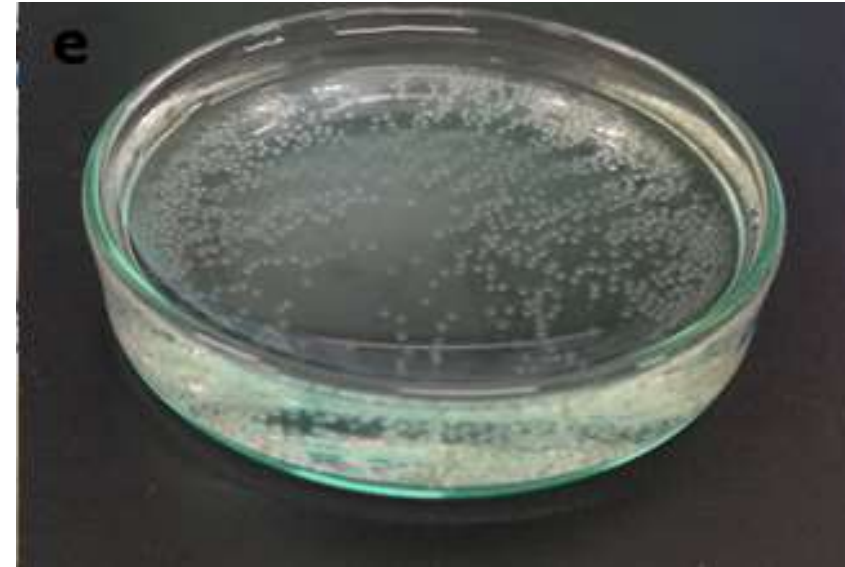
Come si ottengono gli embrioni?

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

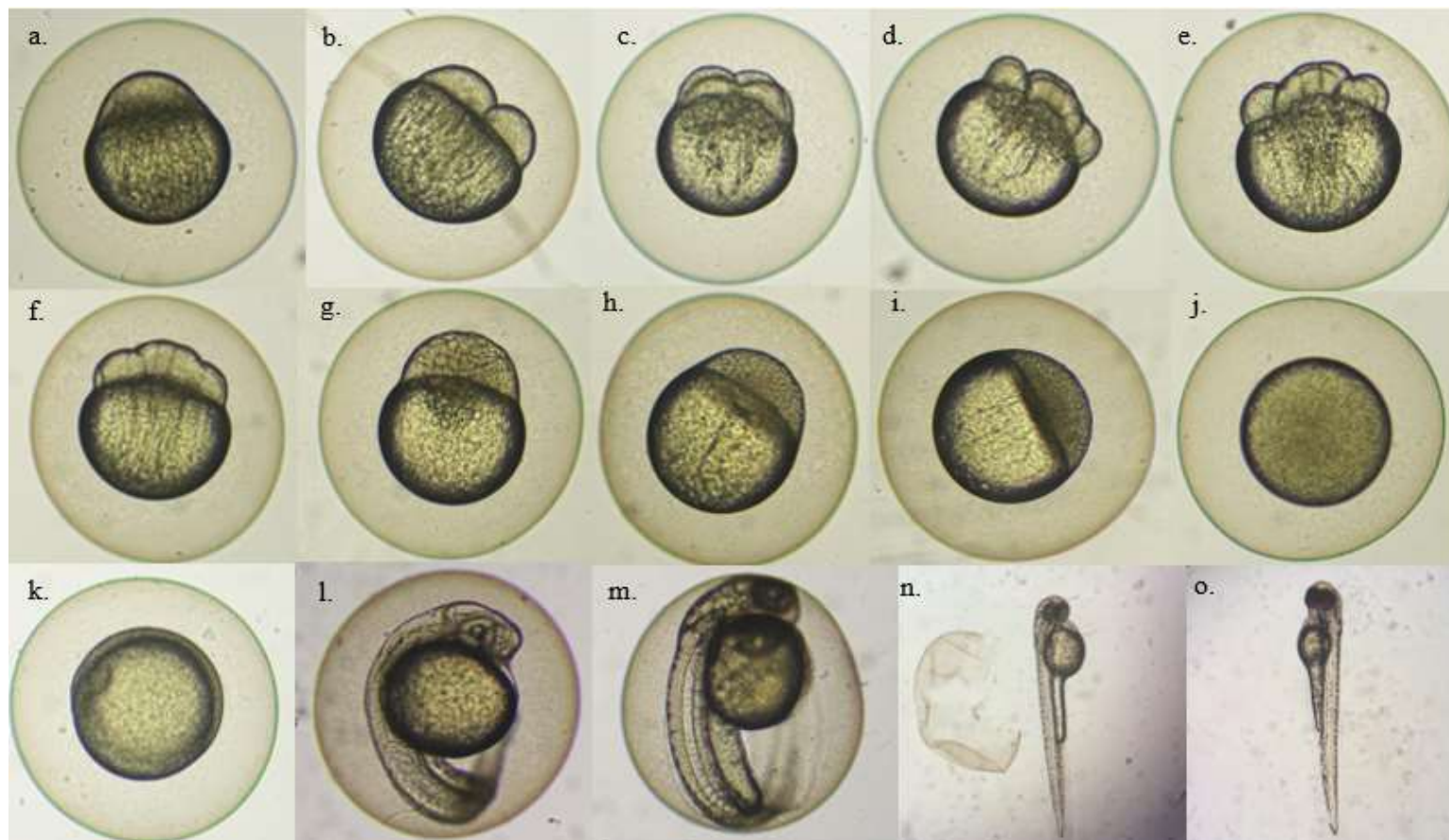


Come si ottengono gli embrioni?

Gli embrioni vengono «raccolti» e risciacquati con acqua deionizzata e *Dilution water* e poi selezionati macroscopicamente e microscopicamente



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)

Procedura

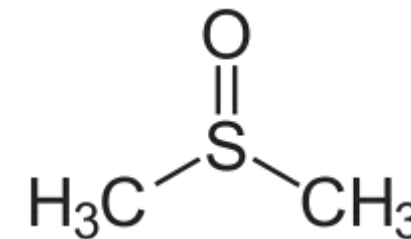
- Concentrazioni da testare:

Almeno 5 concentrazioni della sostanza in esame, con un fattore costante di proporzionalità non eccedente 2,2. La concentrazione più alta di esposizione dovrebbe portare ad una letalità del 100% degli embrioni esposti, la concentrazione più bassa invece non dovrebbe indurre nessun effetto evidenziabile macroscopicamente. **(1 piastra per ogni concentrazione)**

- Scelta delle concentrazioni da testare:

- Letteratura scientifica
- Range-finding test

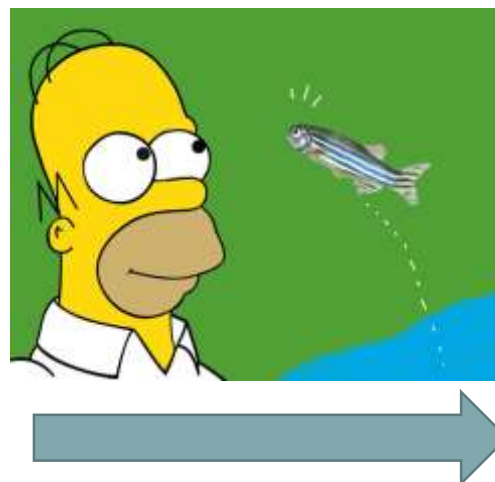




Test solutions:

- Le «*working solution*» vengono preparate quotidianamente a partire da una soluzione madre più concentrata ($C_i \times V_i = C_f \times V_f$).

- Lo standard chimico della sostanza in esame da testare viene sciolto in acqua (*Dilution water*) o in solvente (dimetilsolfossido, DMSO) per le sostanze non solubili in acqua.



Controllo solvente:

La concentrazione di DMSO deve essere livellata per tutte le concentrazioni e non eccedere in ogni caso i 100 ug/L (0,01%).

DMSO:

Induce effetti subletali a concentrazioni di 2-2,5%.

Aumenta il passaggio di sostanze attraverso il corion alla concentrazione di 0,1%.

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!!!!!!!**



Gruppi Controllo:

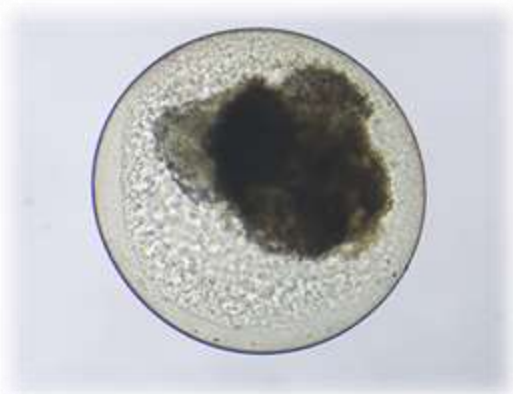
- Controllo negativo (*Dilution water*) sia come controllo interno che come piastra intera
- Controllo solvente (DMSO) se la sostanza non è sciolta in acqua
- Controllo positivo: 4mg/L di 3,4 dichloroaniline per valutare la sensibilità degli embrioni e del ceppo utilizzati



Distribuzione degli embrioni:

- 20 embrioni in ogni piastra dei trattati (ogni concentrazione ha una sua piastra, 5 piastre in totale)
- 20 embrioni nella piastra controllo solvente
- 20 embrioni nella piastra controllo positivo
- 24 embrioni nella piastra controllo negativo
- 4 embrioni in Dilution water per ogni piastra (trattati e controlli solvente e positivo)

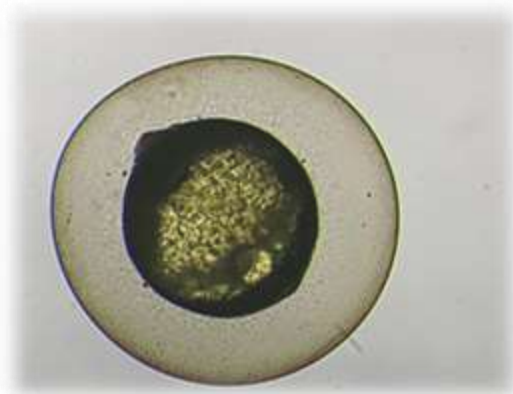
Osservazioni: alterazioni letali



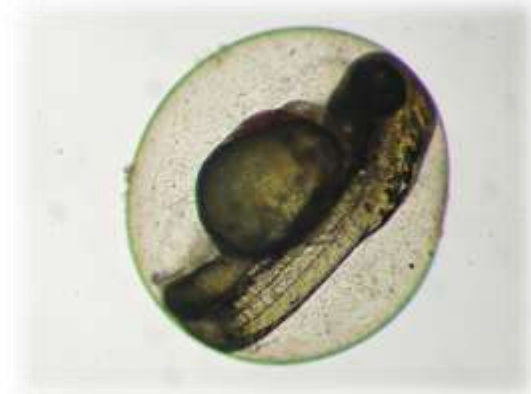
Coagulazione dell'embrione



Mancato distacco della coda dal sacco vitellino



Mancata formazione dei somiti



Assenza di battito cardiaco (48 ore)

Indagini analitiche: pH, conducibilità, ossigeno disciolto valutati nel gruppo controllo negativo e nel gruppo esposto alla concentrazione più alta; determinare le concentrazioni nelle «working solution» con metodiche analitiche

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



OECD GUIDELINE n°236

Come analizzare i dati?



TOXRAT VERSION 3.3

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)	
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/Ex
Statistics:	
# Decimals Data	
# Decimals for Concentrations (Ecx, NOEC)	3
# Decimals Time	0
Comments:	



Come analizzare i dati?



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

Come analizzare i dati?



Sketching Science

Summary of Results for all Endpoints: Critical effect and threshold dose as observed at end of experimental time; LD: Effective dose for x x % 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					
95%-CL	LD10	55,269	55,269	54,364	53,148
	lower	44,442	44,442	43,848	43,705
	upper	60,783	60,783	59,838	58,333
95%-CL	LD20	62,287	62,287	61,130	59,174
	lower	54,430	54,430	53,299	51,811
	upper	66,868	66,868	65,659	63,483
95%-CL	LD50	78,293	78,293	76,508	72,672
	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
		<u>NOED</u>	<u>>=80,000</u>	<u>>=80,000</u>	<u>>=80,000</u>

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

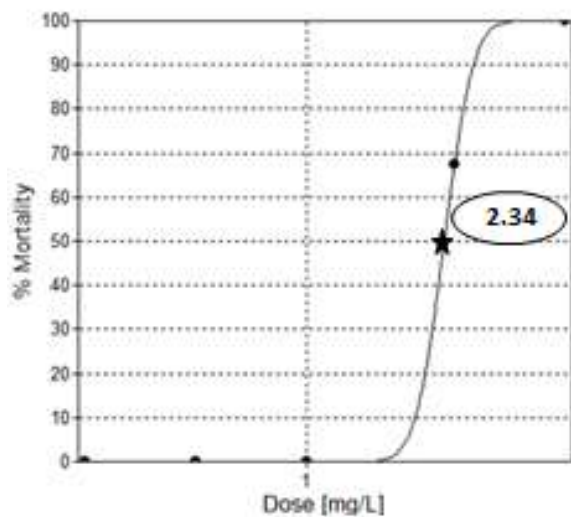
To be a valid test, the mortality of fish embryos in the negative control after 96 h must not exceed 10% and the mortality in the positive control (3,4-dichloroaniline) must be at least 30%.

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.



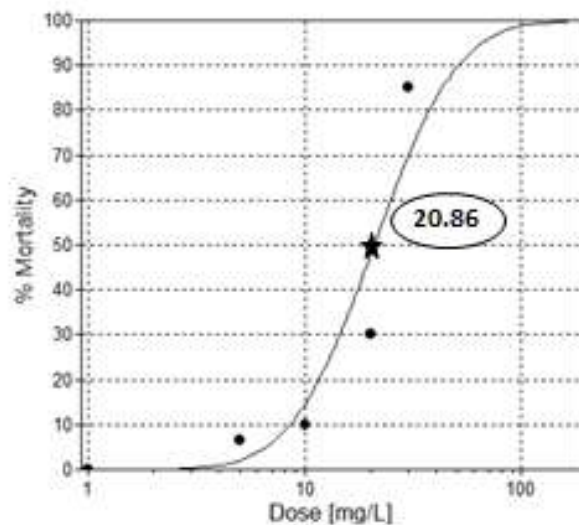
OECD GUIDELINE n°236

Butylparaben (BuP)



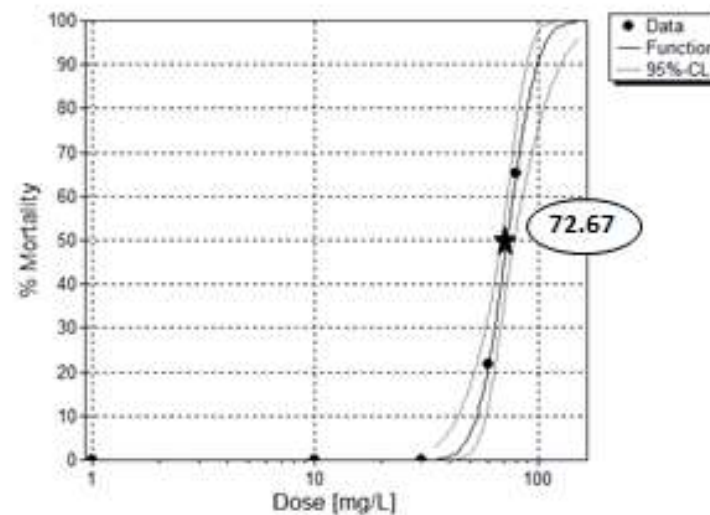
Concentrations (mg/L)	LC50 (mg/L)	LC20 (mg/L)	LC10 (mg/L)
0.25-0.5-1-2.5-5	2.34	1.98	1.87

Ethylparaben (EtP)



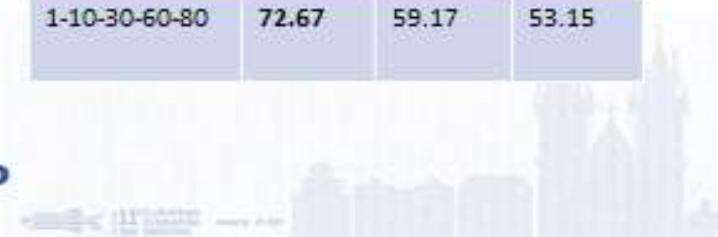
Concentrations (mg/L)	LC50 (mg/L)	LC20 (mg/L)	LC10 (mg/L)
1-5-10-20-30	20.86	11.61	8.55

Methylparaben (MeP)



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

Acute toxicity: BuP > EtP > MeP





OECD GUIDELINE n°236

von Hellfeld et al. 2020

Studio delle alterazioni sub-letali

- Vengono valutate nel corso delle osservazioni giornaliere
- Variabilità degli end-points valutati
- Variabilità nella nomenclatura utilizzata per definire le alterazioni
- Necessità di **ARMONIZZAZIONE**

Tremor (> 96 hpf)

Craniofacial malformation

Otolith malformation

Eye malformation

Spinal cord malformation

Lordosis

Kyphosis

Scoliosis

Formation of oedemata

Delayed development

Delayed hatching

Impaired/missing pigmentation

Reduced yolk resorption

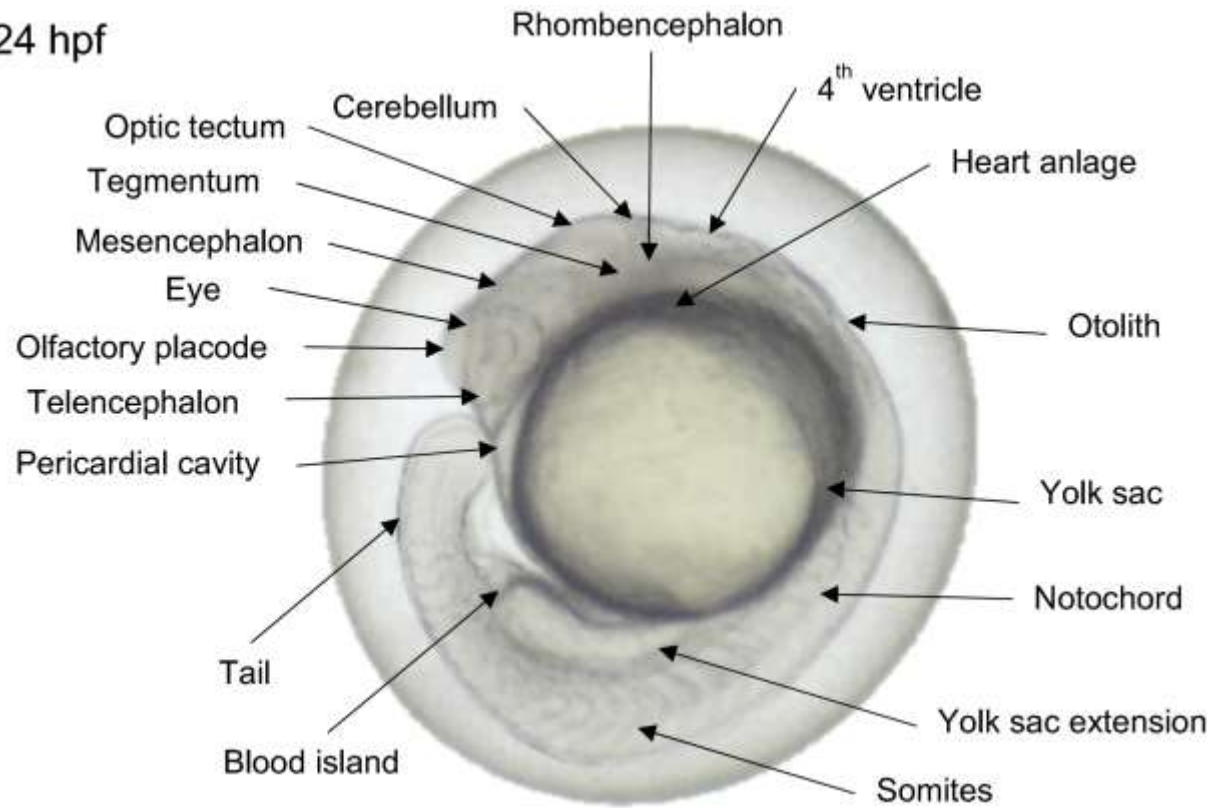
Yolk deformation

Impaired fin development

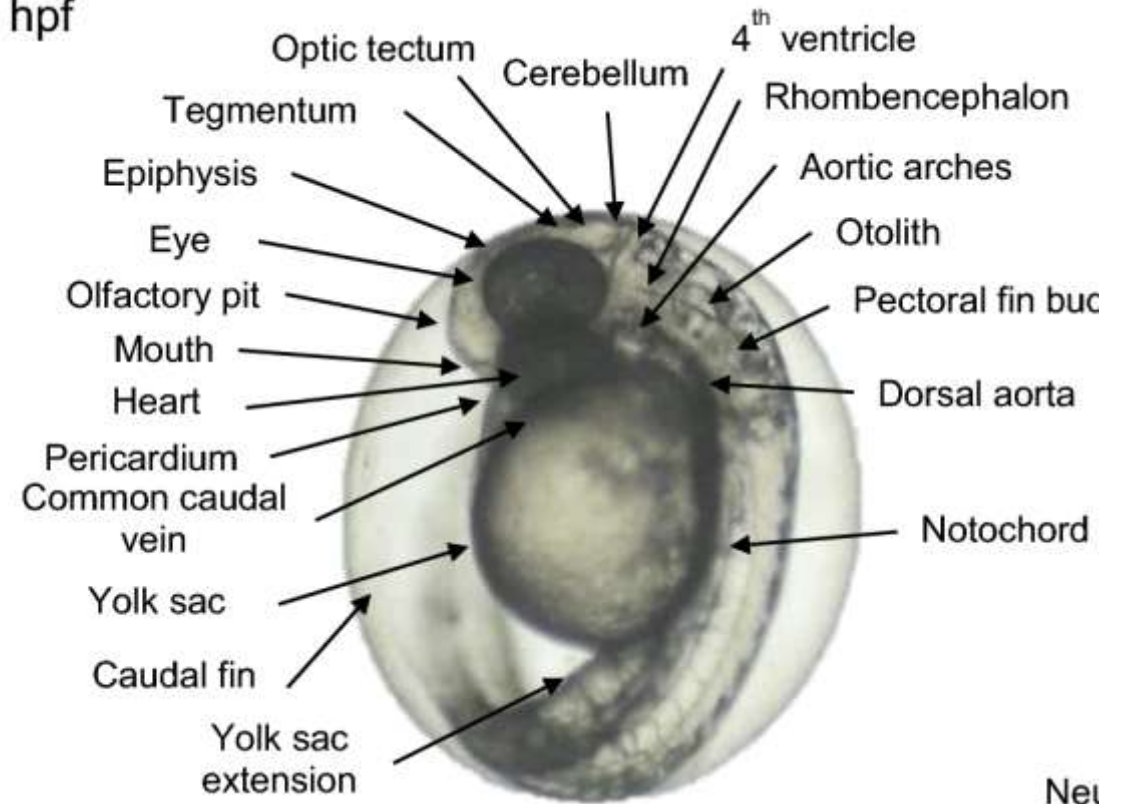
Altered spontaneous movement

Normale sviluppo embrionale

24 hpf



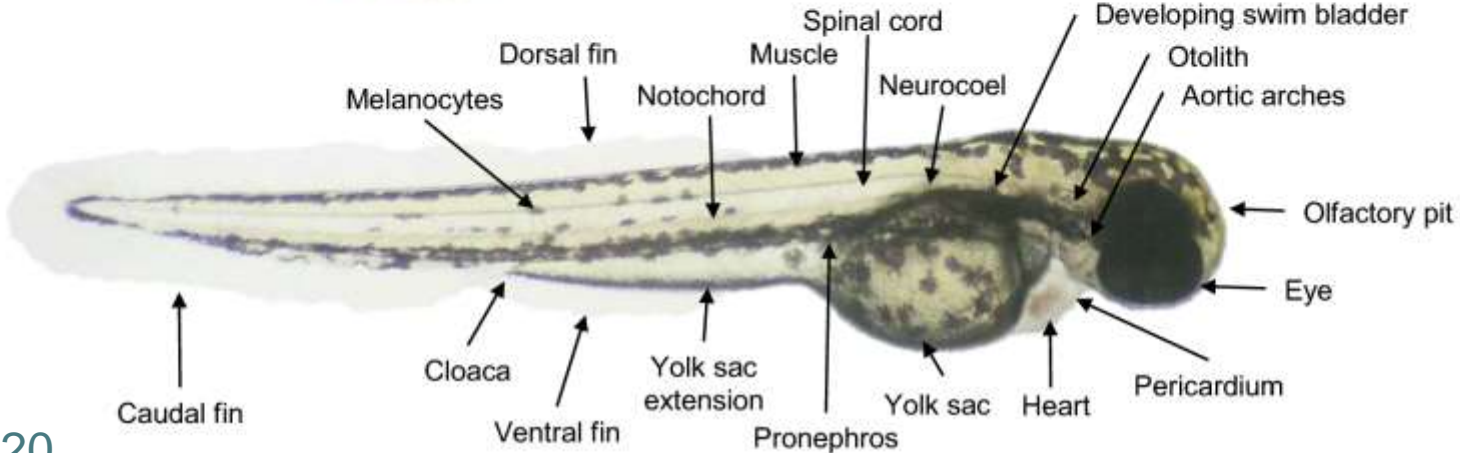
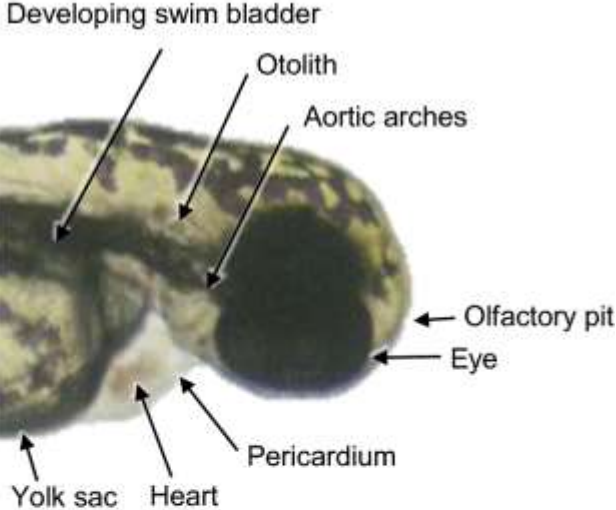
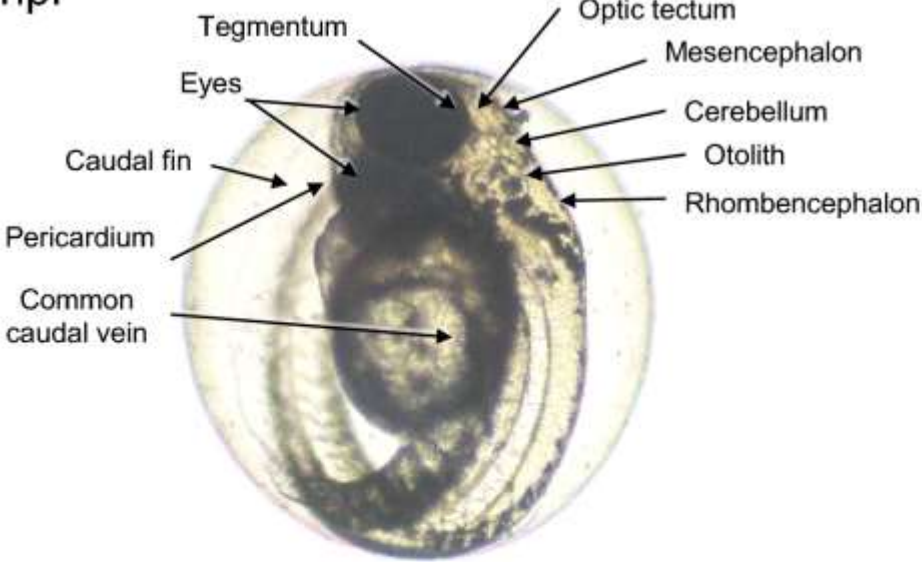
48 hpf



Net

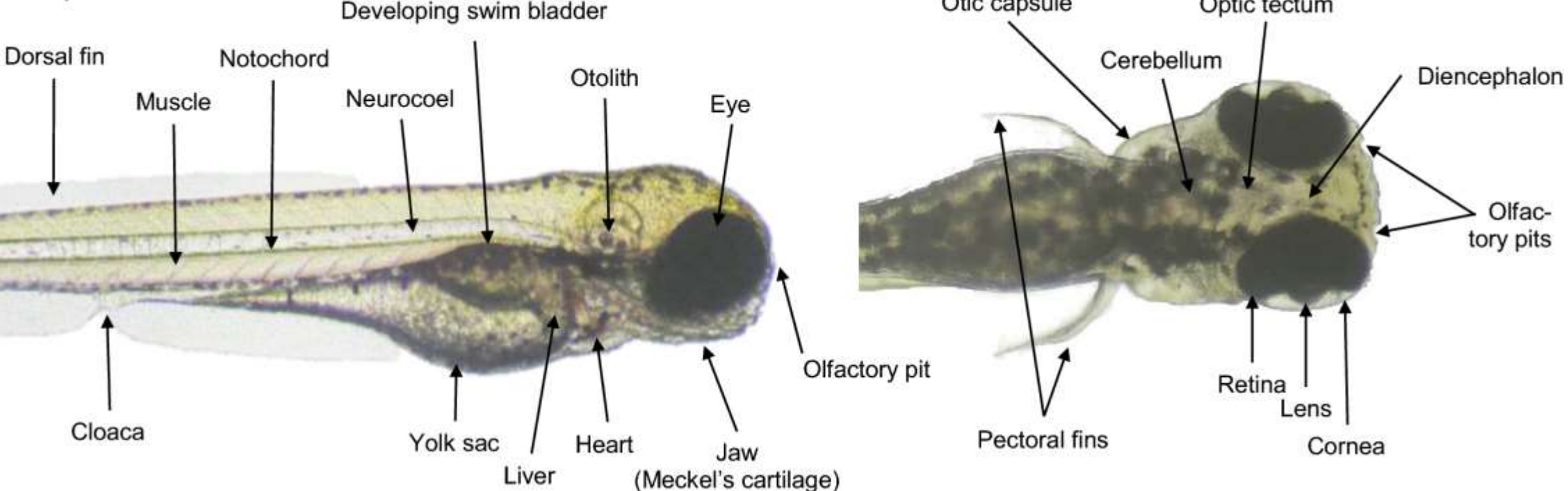
Normale sviluppo embrionale

72 hpf



Normale sviluppo embrionale

96 hpf



Alterazioni sub-letali cardiache: ASPECIFICHE

24 hpf

48 hpf

72 hpf

96 hpf

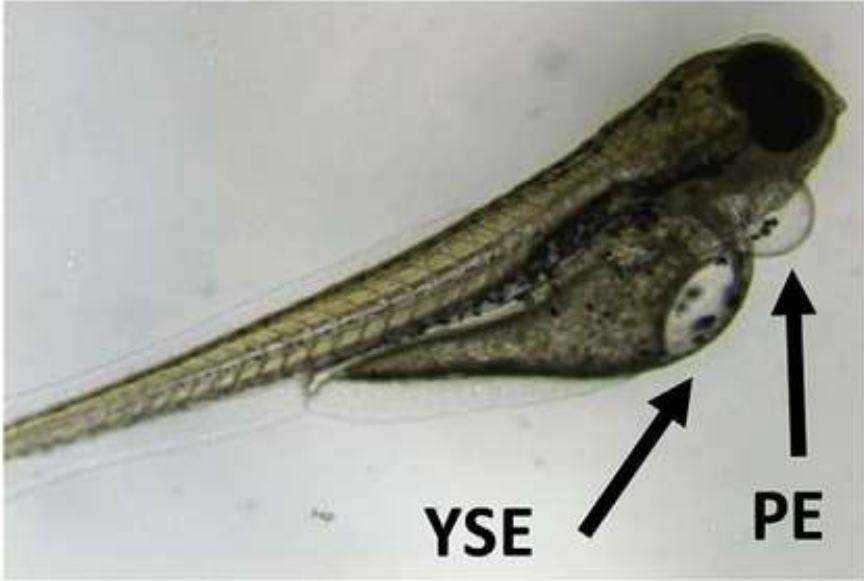


Stasi ematica



Edema del pericardio

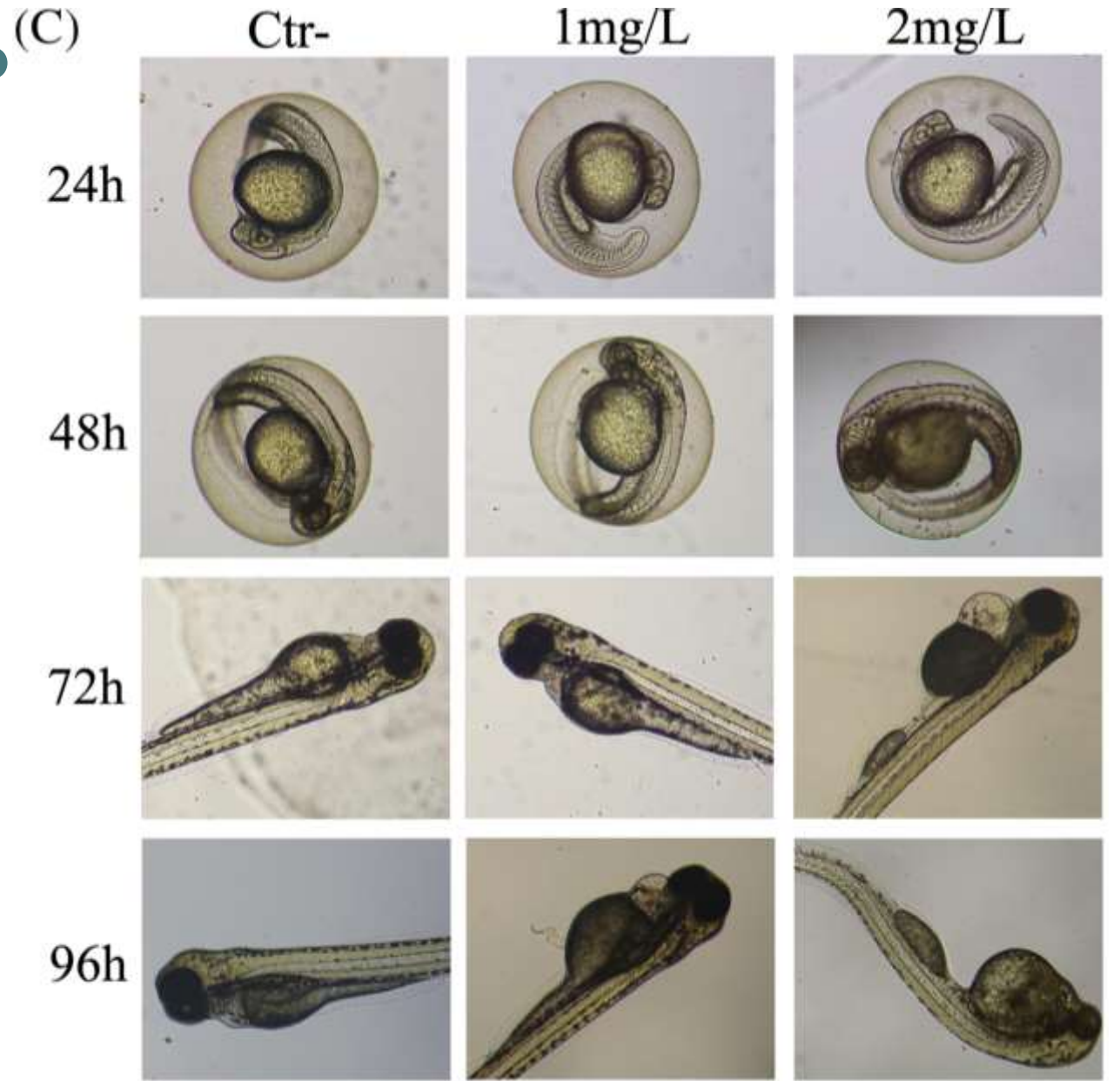
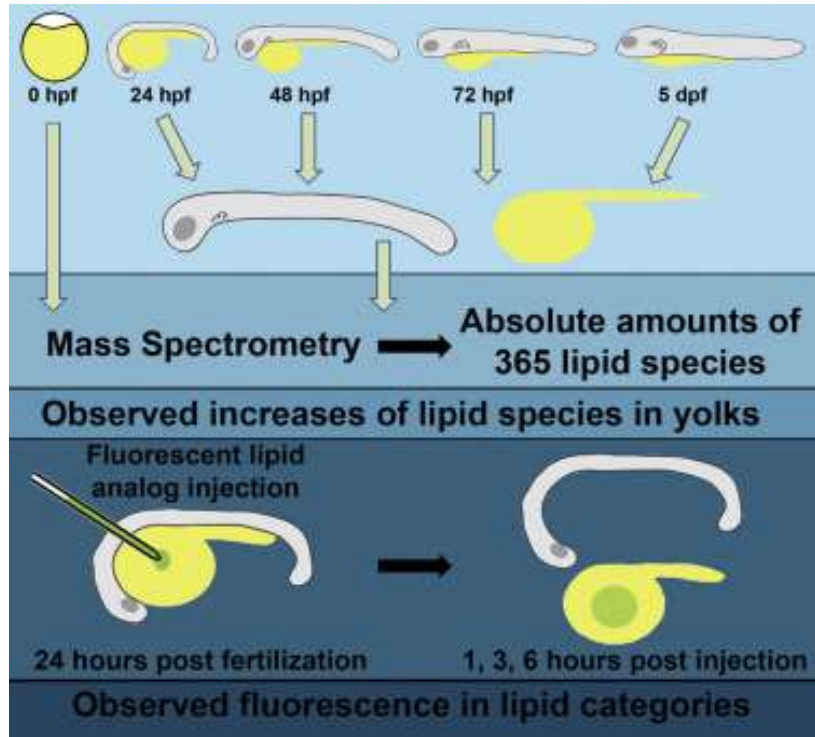
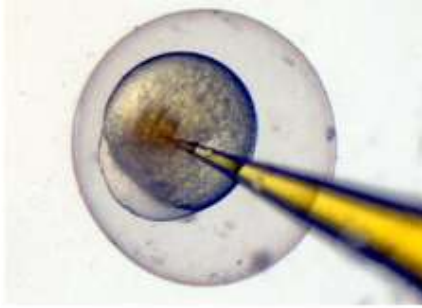
Edema del pericardio ed edema del sacco vitellino



Alterazioni cardiache visibili con sistema video:

VIDEO 1 e VIDEO 4

Malassorbimento del sacco vitellino (C)



Frequent sublethal observations with little or no potential for regeneration

Lordosis, kyphosis & scoliosis

a - 120 hpf, 58 mg/L Valproic acid



Lordosis

b - 72 hpf, 200 µg/L 2-Ethylhexanoic acid



Kyphosis

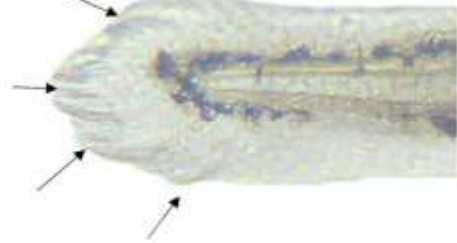
c - 120 hpf, 104 mg/L 2,2-Dimethylvaleric acid



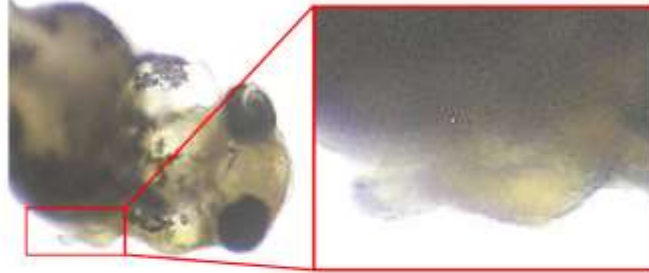
Scoliosis

Impaired fin development

d - 96 hpf, 70 mg/L 2-Methylpentenoic acid



e - 120 hpf, 9 mg/L 2-Propylheptanoic acid



Eye & otolith malformation

f - 72 hpf, 52 mg/L 4-Pentenoic acid



No eye

g - 72 hpf, 285 mg/L 2,2-Dimethylvaleric acid



Small eye

h - 96 hpf, 13 mg/L 2,2-Dimethylvaleric acid



Deformed otolith

Craniofacial malformation

i - 120 hpf, 58 mg/L 2,2-Dimethylvaleric acid



j - 120 hpf, 17 mg/L 2-Propylheptanoic acid



Lordosi, cifosi e scoliosi

Alterazioni nello sviluppo delle pinne

Malformazioni dell'occhio

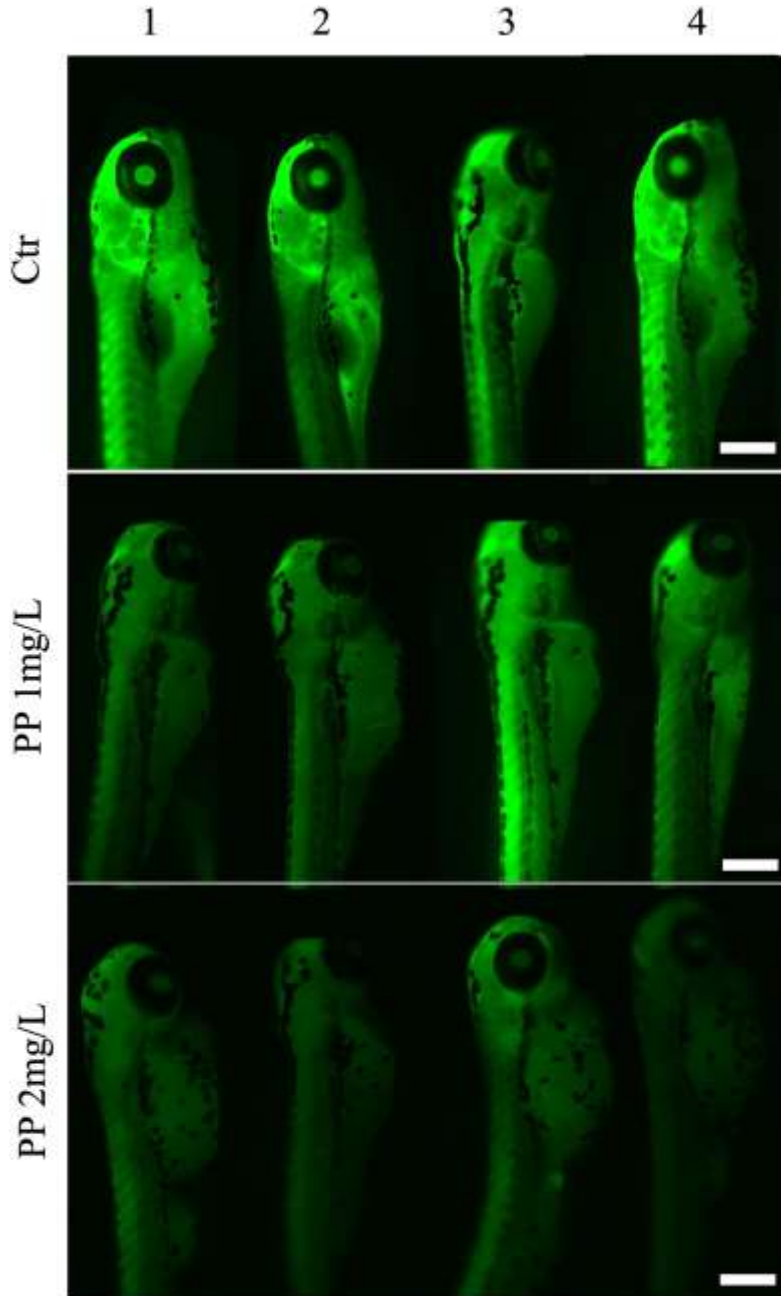
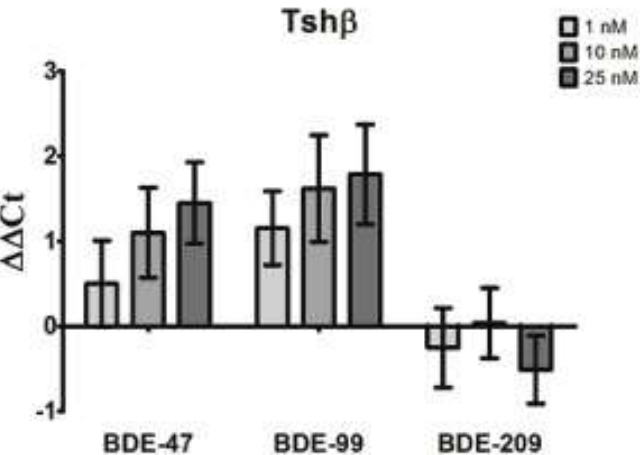
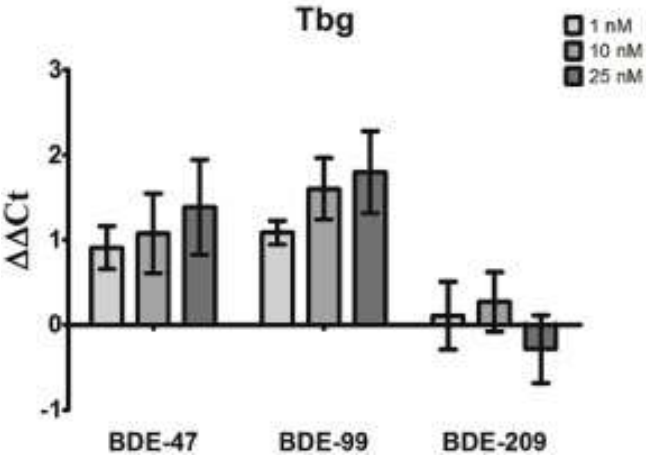
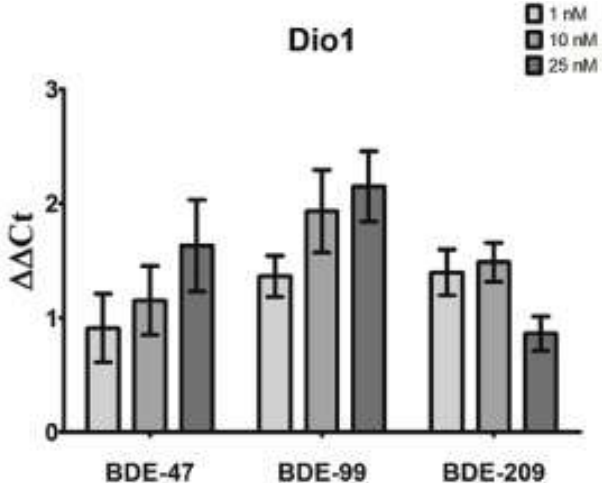
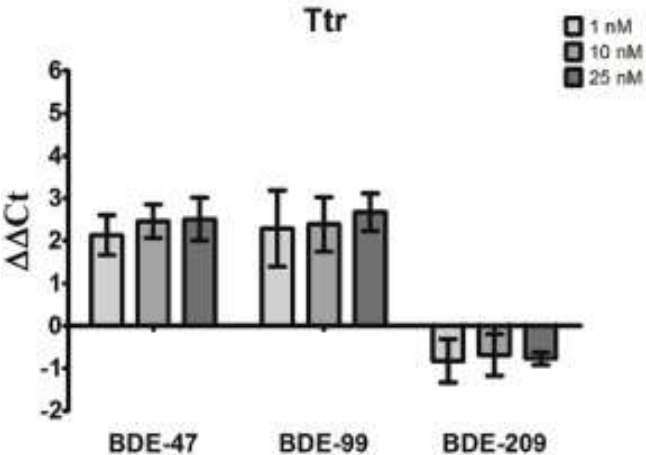
Malformazioni cranio-facciali

von Hellfeld et al. 2020

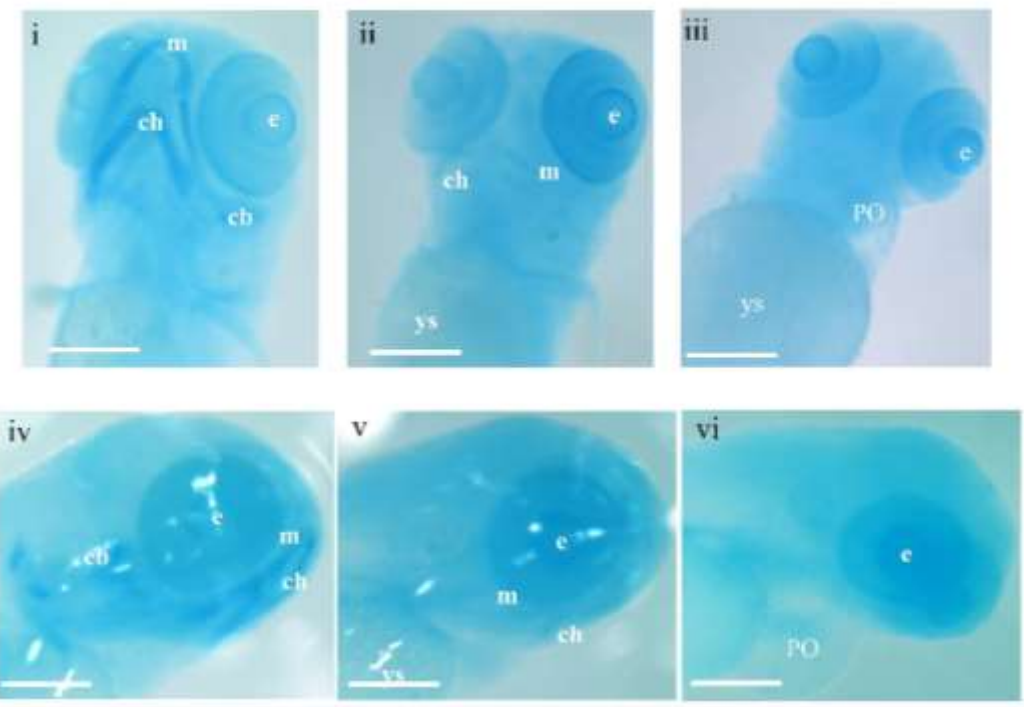
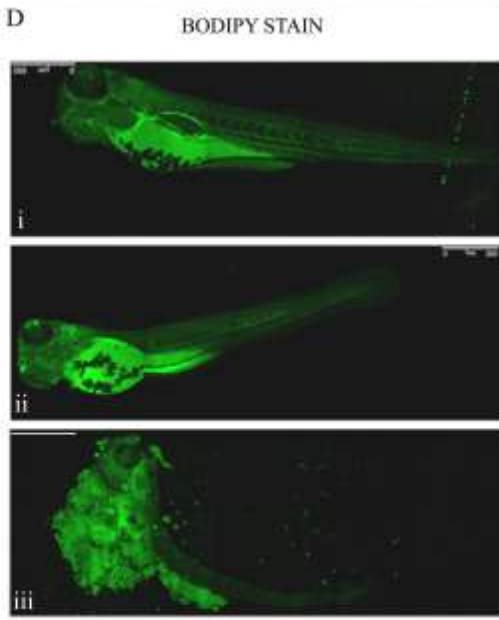
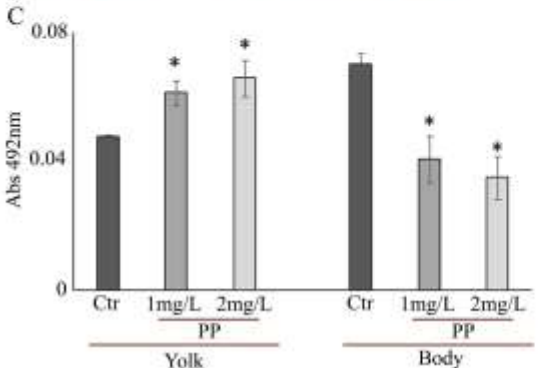
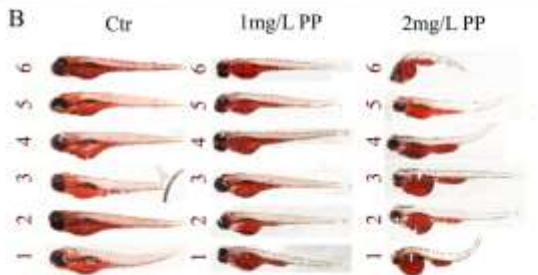
Alterazioni comportamentali visibili nei FET tests:

VIDEO 1 e VIDEO 3

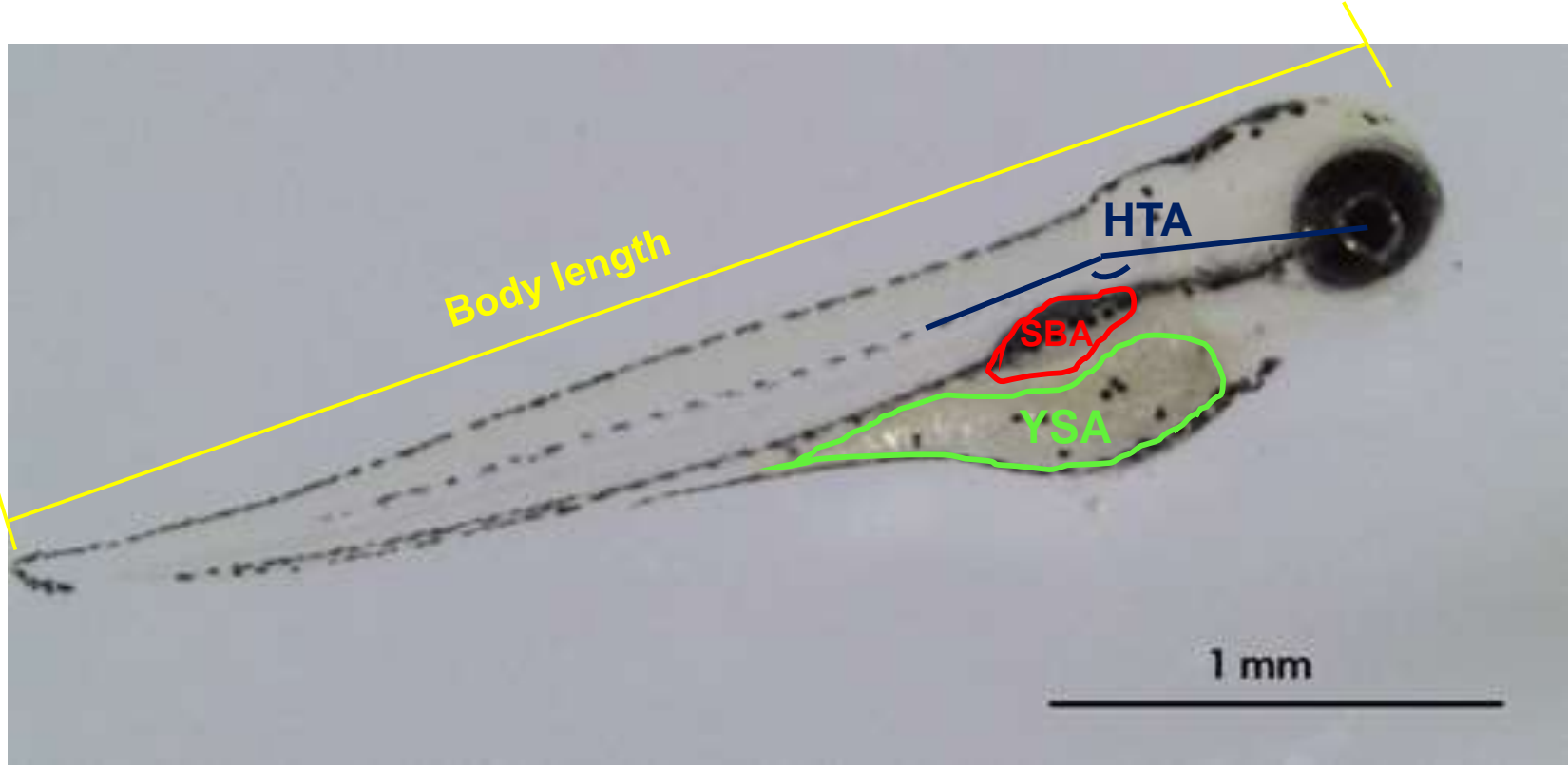
Cosa si può fare dopo i FET tests? Real time PCR, PED6 assay



Cosa si può fare dopo i FET tests? Colorazioni (Oil Red O, Alcian Blue)

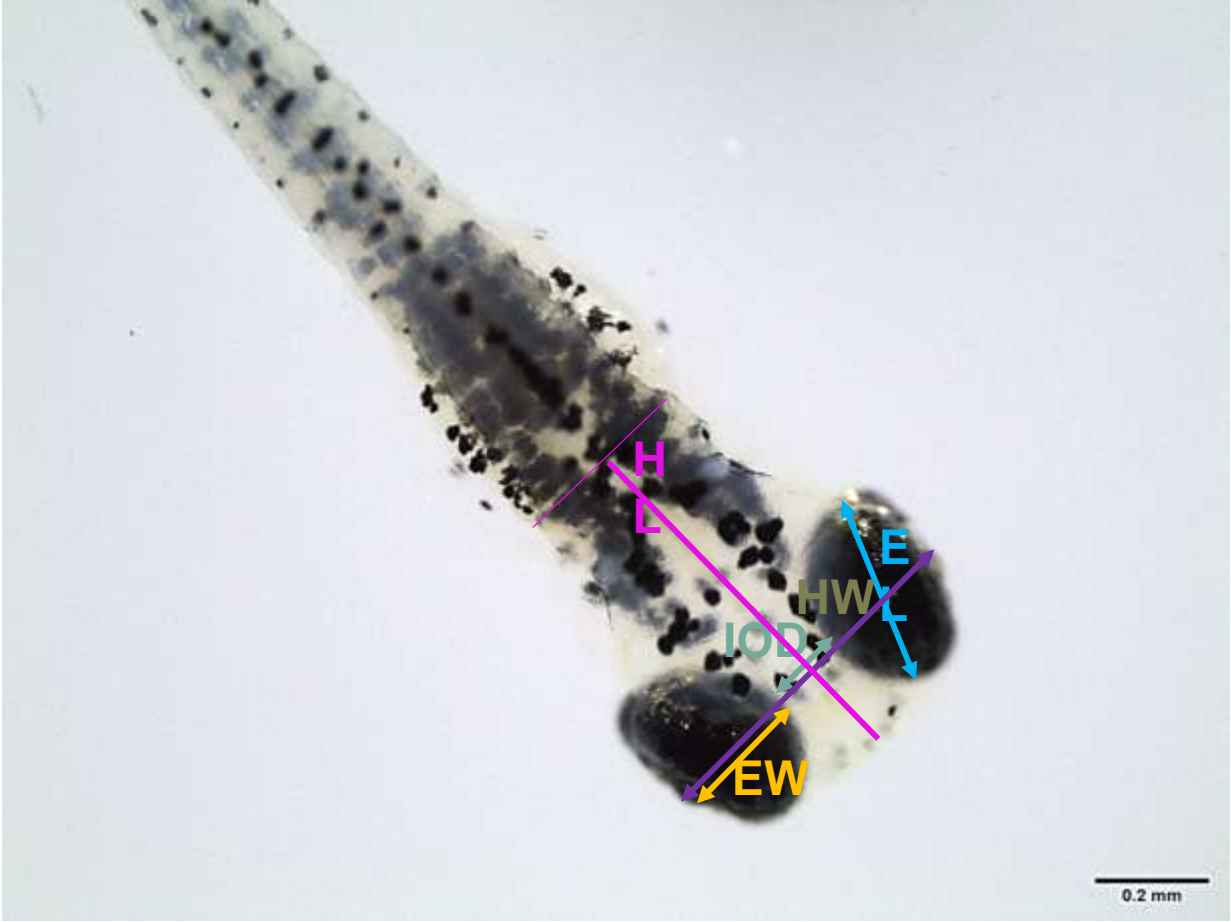


Cosa si può fare dopo i FET tests? Analisi morfometriche



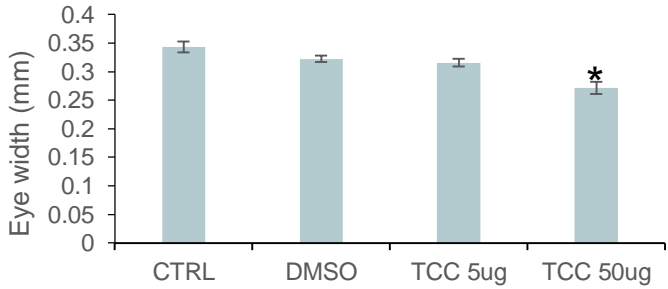
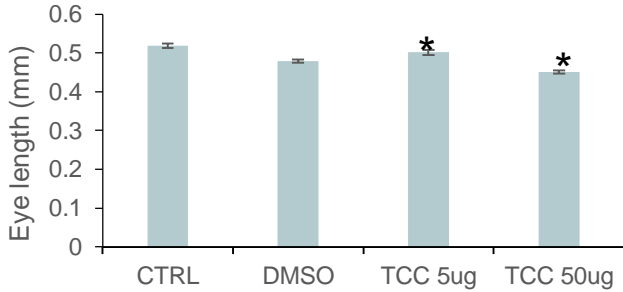
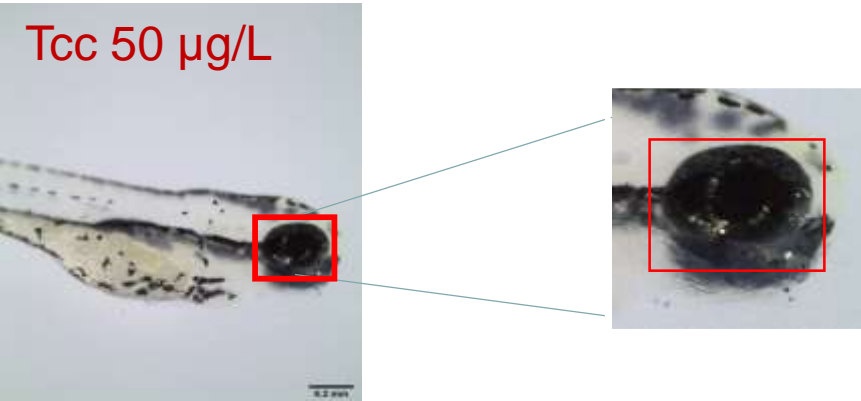
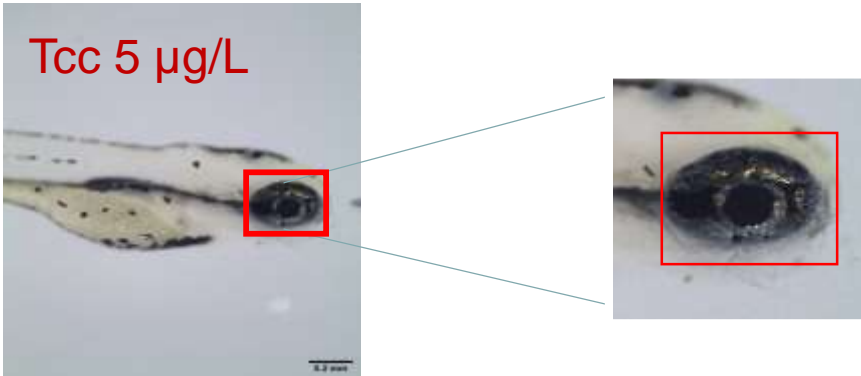
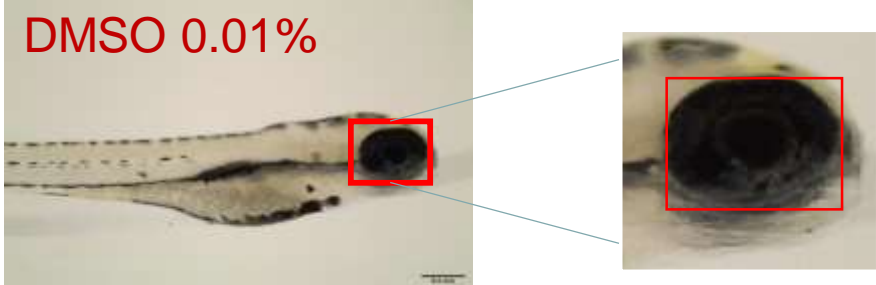
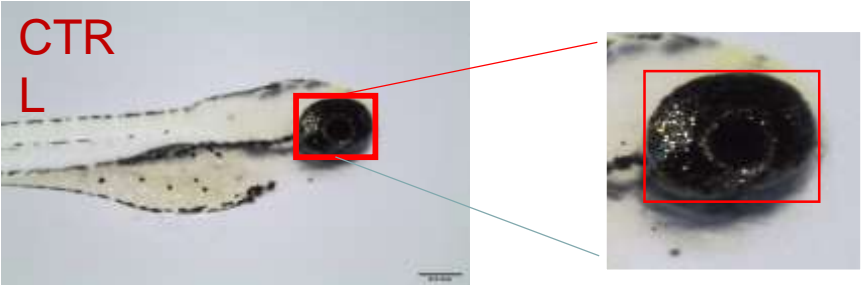
HTA= head- trunk angle
SBA= swimming bladder area
YSA= yolk salk area

Cosa si può fare dopo i FET tests? Analisi morfometriche

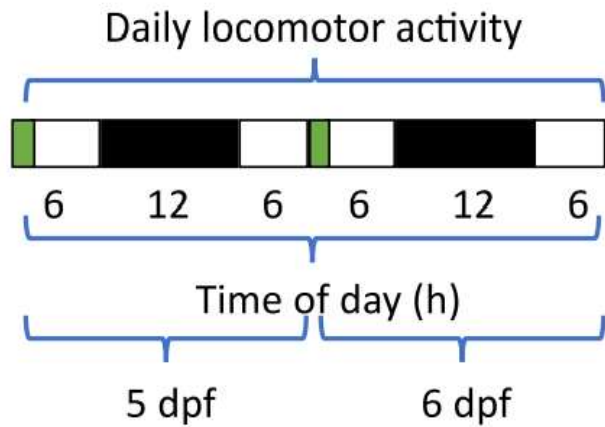
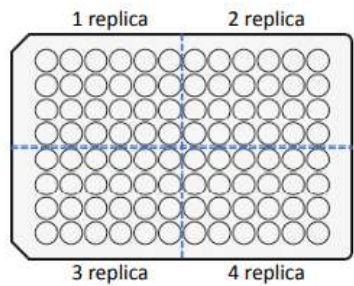
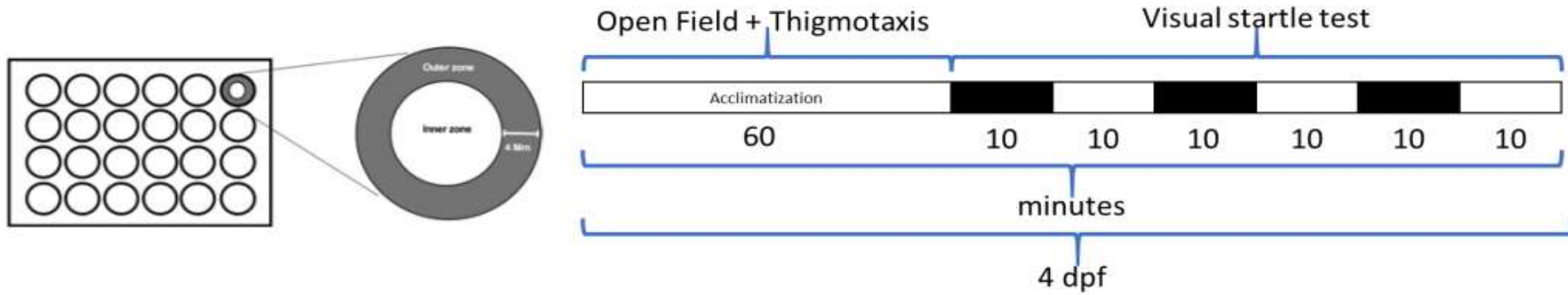


- IOD**= interocular distance
- EL**= eye length
- EW**= eye width
- HW**= head width
- HL**= head length

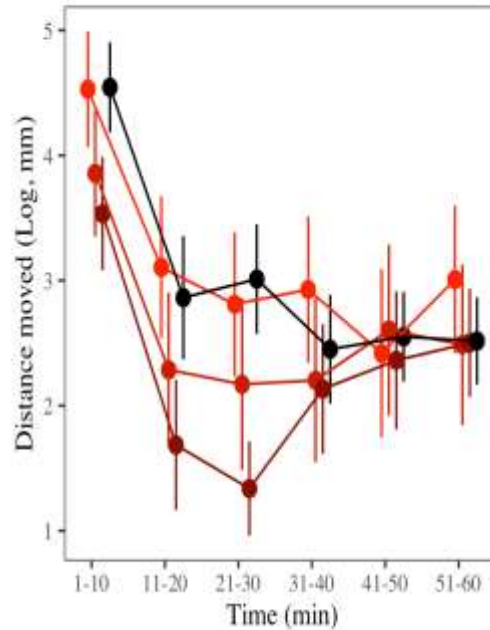
Cosa si può fare dopo i FET tests? Analisi morfometriche



Cosa si può fare dopo i FET tests? Test comportamentali

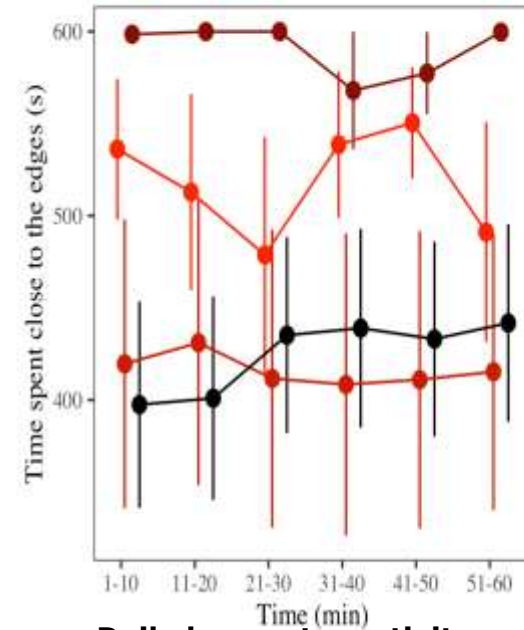


Open field test



Startle test

Thigmotaxis



Daily locomotor activity

- Treatment
- BuP 0.005 mg/L
 - BuP 0.05 mg/L
 - BuP 0.5 mg/L
 - Solvent control

GRAZIE PER L'ATTENZIONE

He's not just a fish.
He's hope.

