

# FISH EMBRYO ACUTE AQUATIC TOXICITY (FET) TESTS

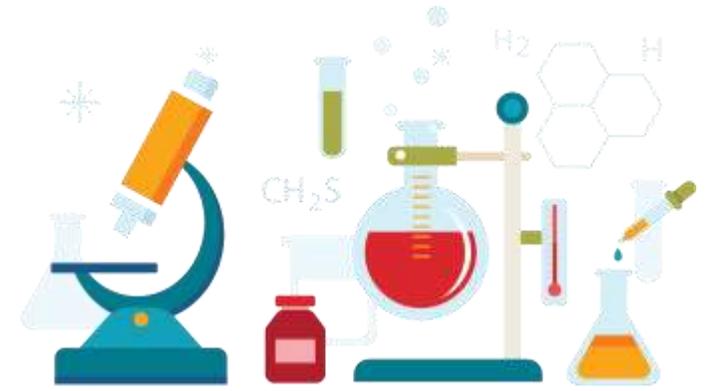
DOTT. CARMINE MEROLA





# 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

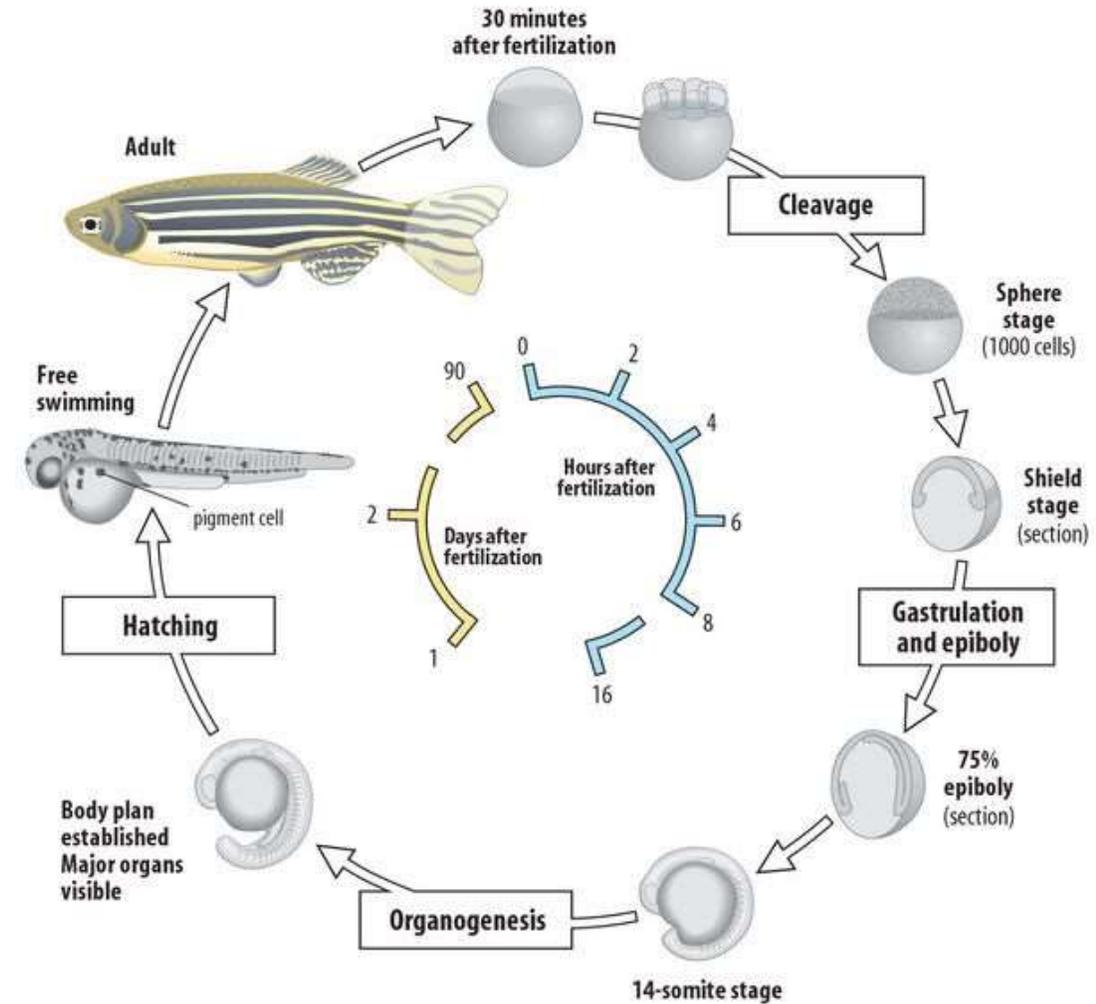


- Sviluppo rapido
- Trasparenza
- «Flessibilità» genetica
- Non necessita di cure parentali



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

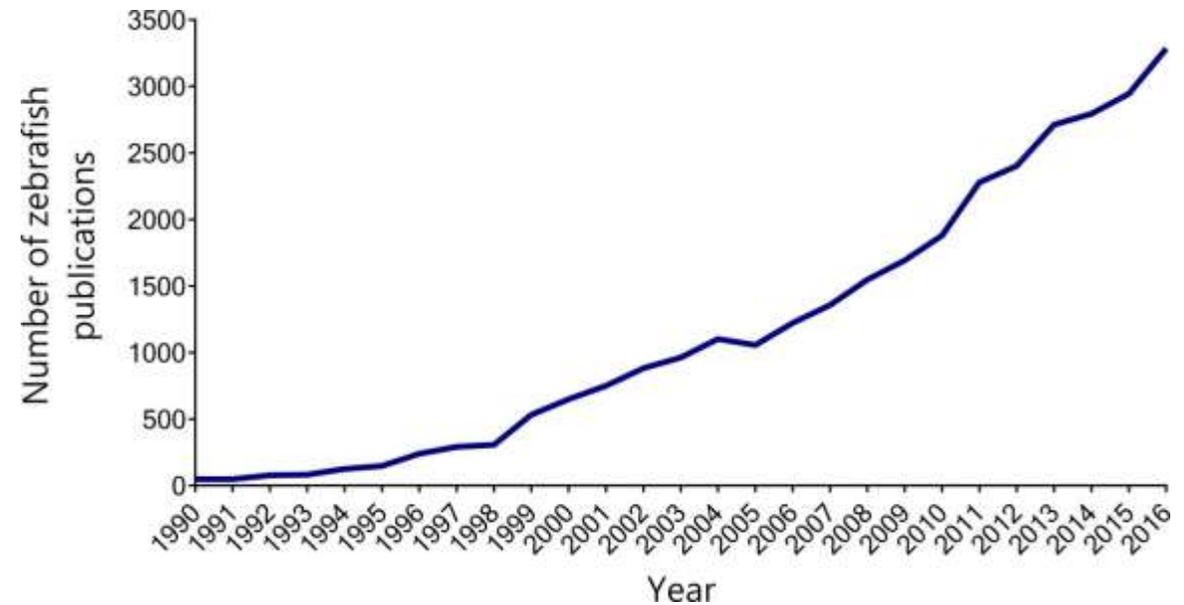
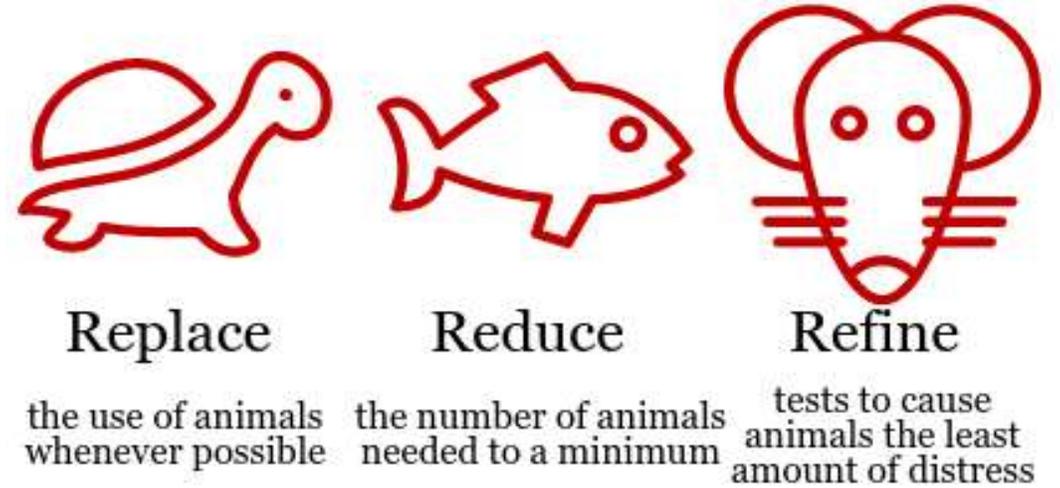
Il presente decreto si applica ai seguenti animali:

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.



## 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 CaCl<sub>2</sub>, MgSO<sub>4</sub>, NaHCO<sub>3</sub>, 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

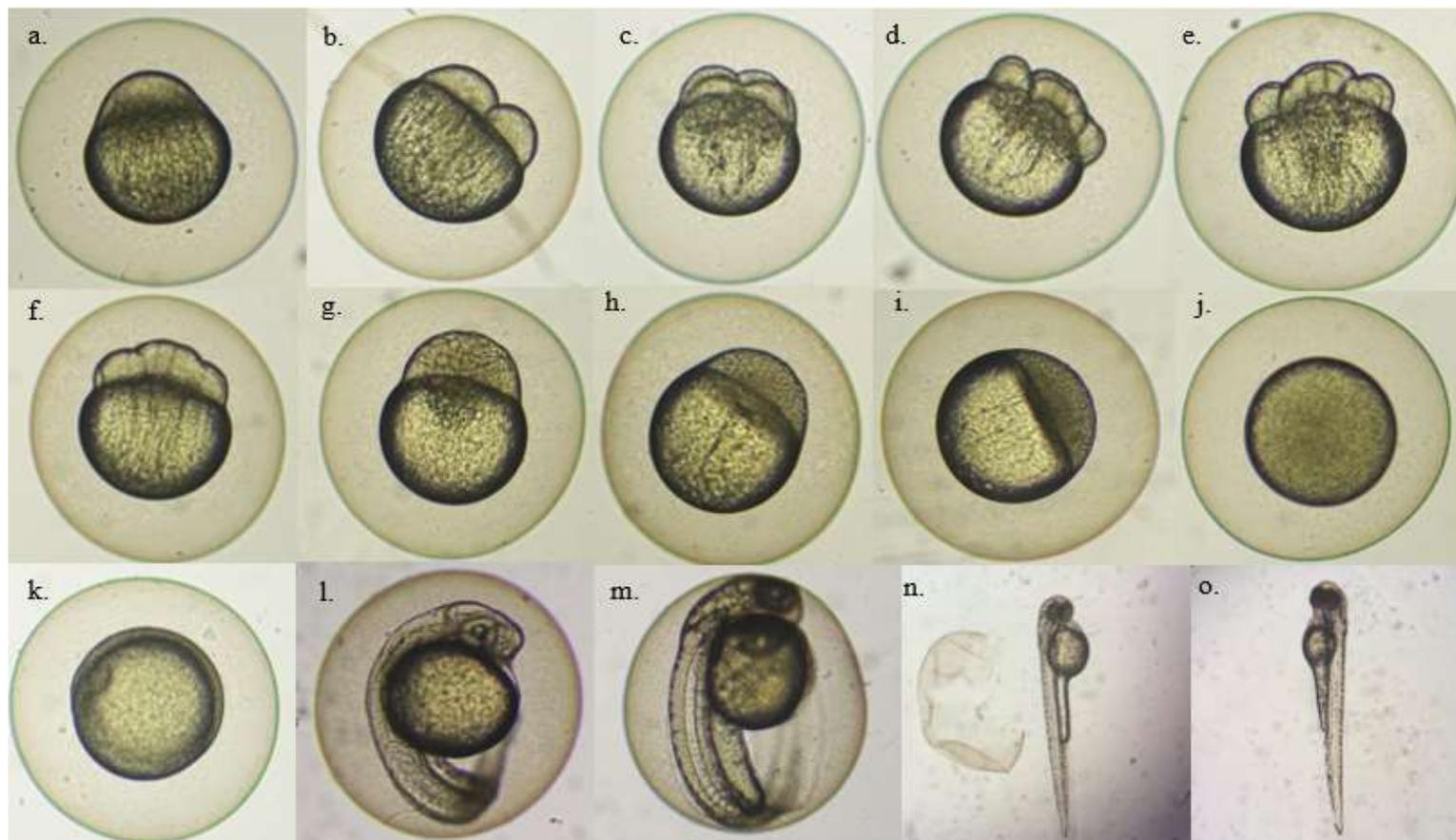


## Come si ottengono gli embrioni?

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

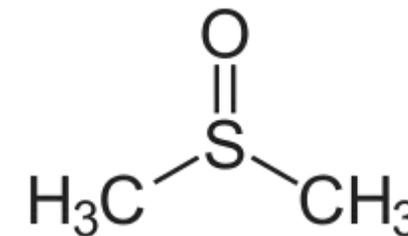
### - Concentrazioni da testare:

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

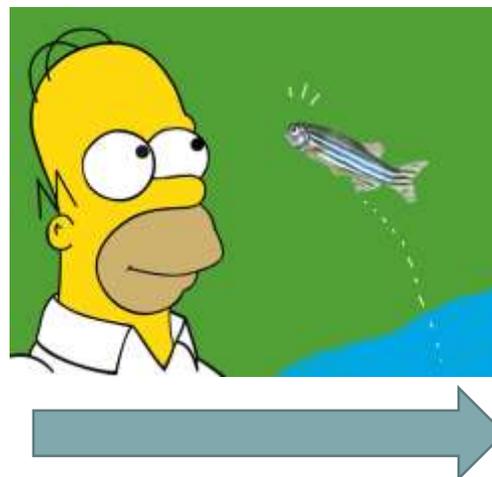




## Test solutions:

- 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:

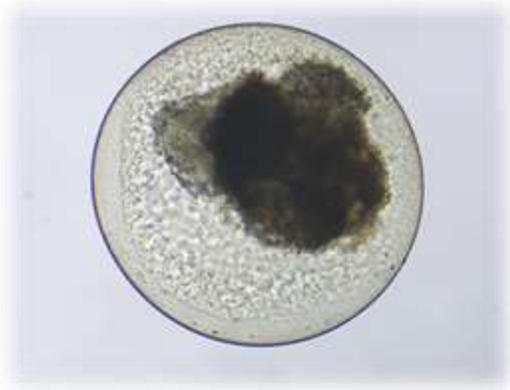
- Controllo negativo (*Dilution water*) sia come controllo interno che come piastra intera
- Controllo solvente (DMSO) se la sostanza non è sciolta in acqua
- Controllo positivo: 4mg/L di 3,4 dichloroaniline per valutare la sensibilità degli embrioni e del ceppo utilizzati



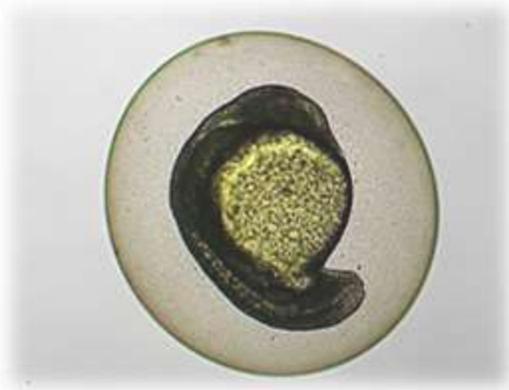
## Distribuzione degli embrioni:

- 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



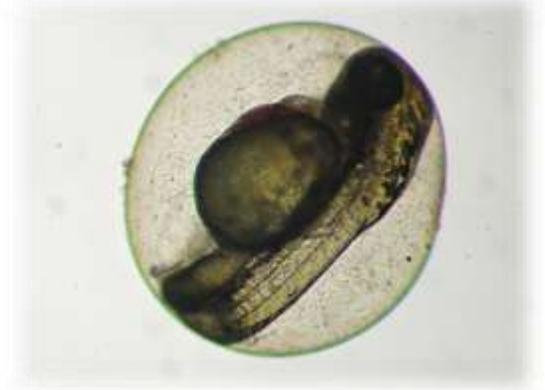
Coagulazione dell'embrione



Mancato distacco della coda dal sacco vitellino



Mancata formazione dei somiti



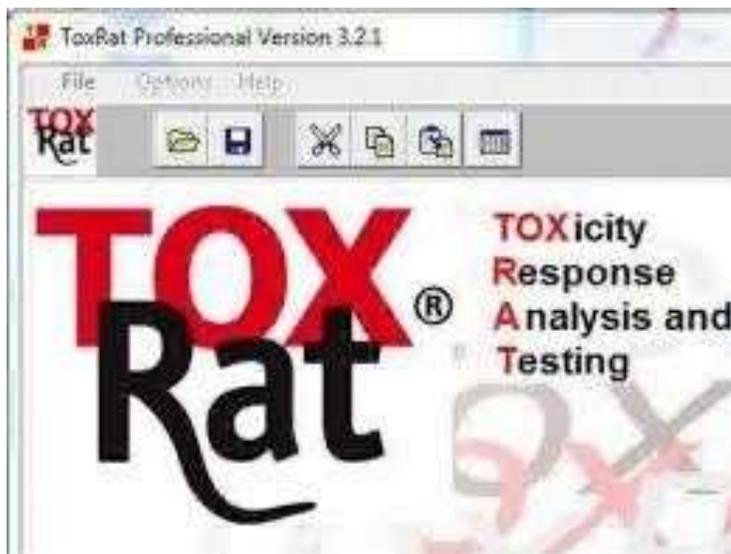
Assenza di battito cardiaco (48 ore)

**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

## Come analizzare i dati?

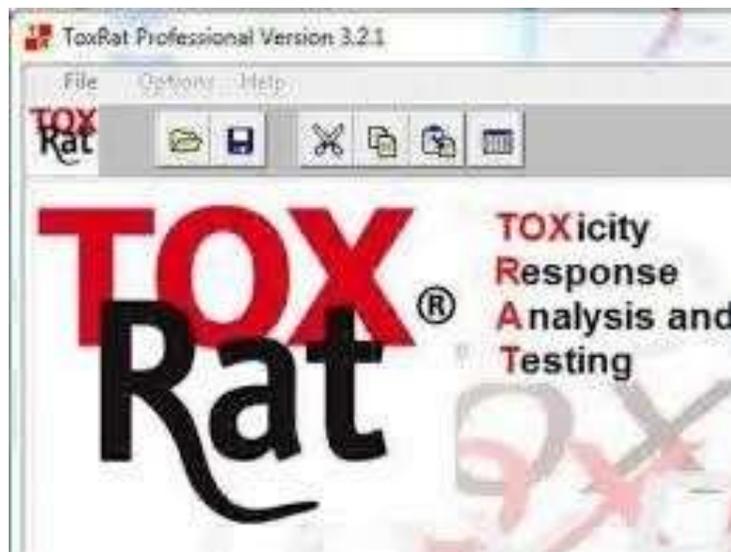


## TOXRAT VERSION 3.3

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



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
<b>#Replicates</b>	1	1	3	3	3	3	3
<b>#Introduced</b>	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
<b>#Replicates</b>	1	1	3	3	3	3	3
<b>#Survived</b>	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
<b>#Replicates</b>	1	1	3	3	3	3	3
<b>#Survived</b>	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
<b>#Replicates</b>	1	1	3	3	3	3	3
<b>#Survived</b>	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
<b>#Replicates</b>	1	1	3	3	3	3	3
<b>#Survived</b>	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	<b>LD50</b>	78,293	78,293	76,508	<b>72,672</b>
	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>&gt;=80,000</u>	<u>&gt;=80,000</u>	<u>&gt;=80,000</u>

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

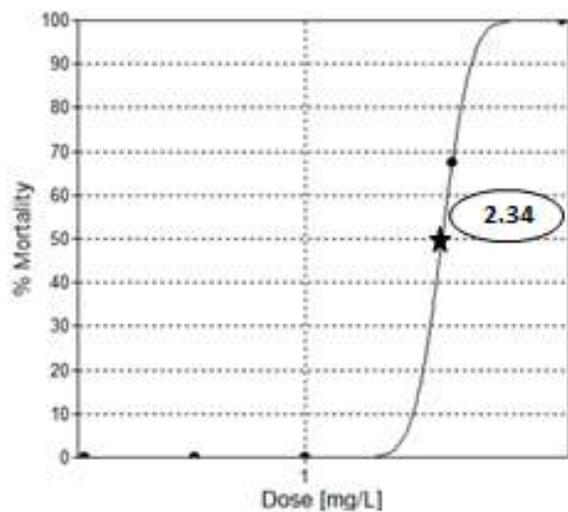
To be a valid test, the mortality of fish embryos in the negative control after 96 h must not exceed 10% and the mortality in the positive control (3,4-dichloroaniline) must be at least 30%.

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.



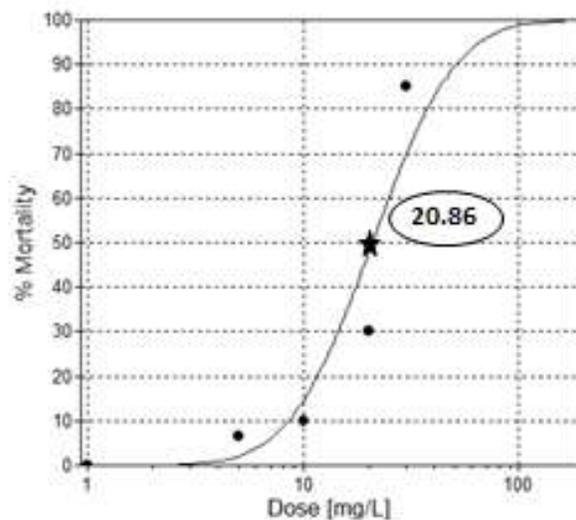
# OECD GUIDELINE n°236

## Butylparaben (BuP)



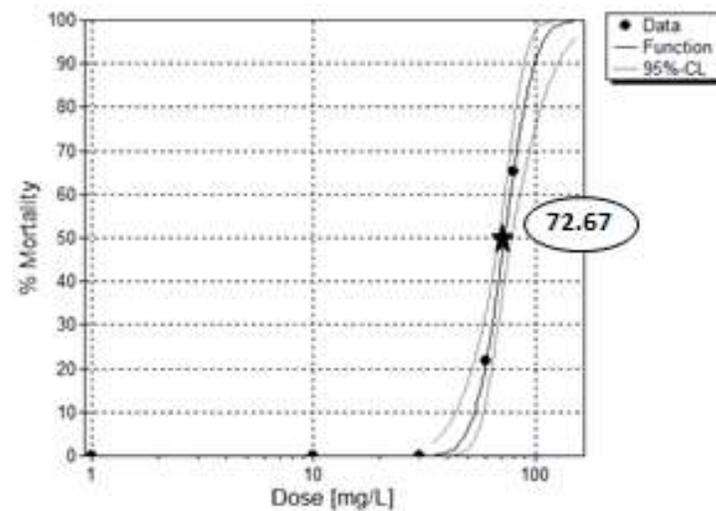
Concentrations (mg/L)	LC50 (mg/L)	LC20 (mg/L)	LC10 (mg/L)
0.25-0.5-1-2.5-5	2.34	1.98	1.87

## Ethylparaben (EtP)



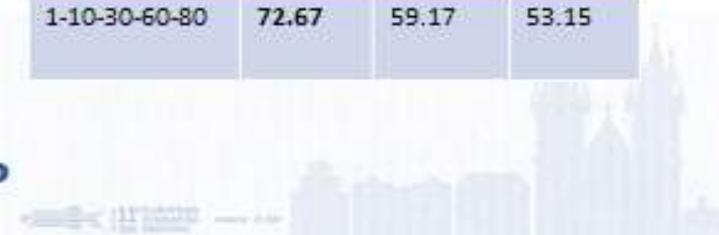
Concentrations (mg/L)	LC50 (mg/L)	LC20 (mg/L)	LC10 (mg/L)
1-5-10-20-30	20.86	11.61	8.55

## 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

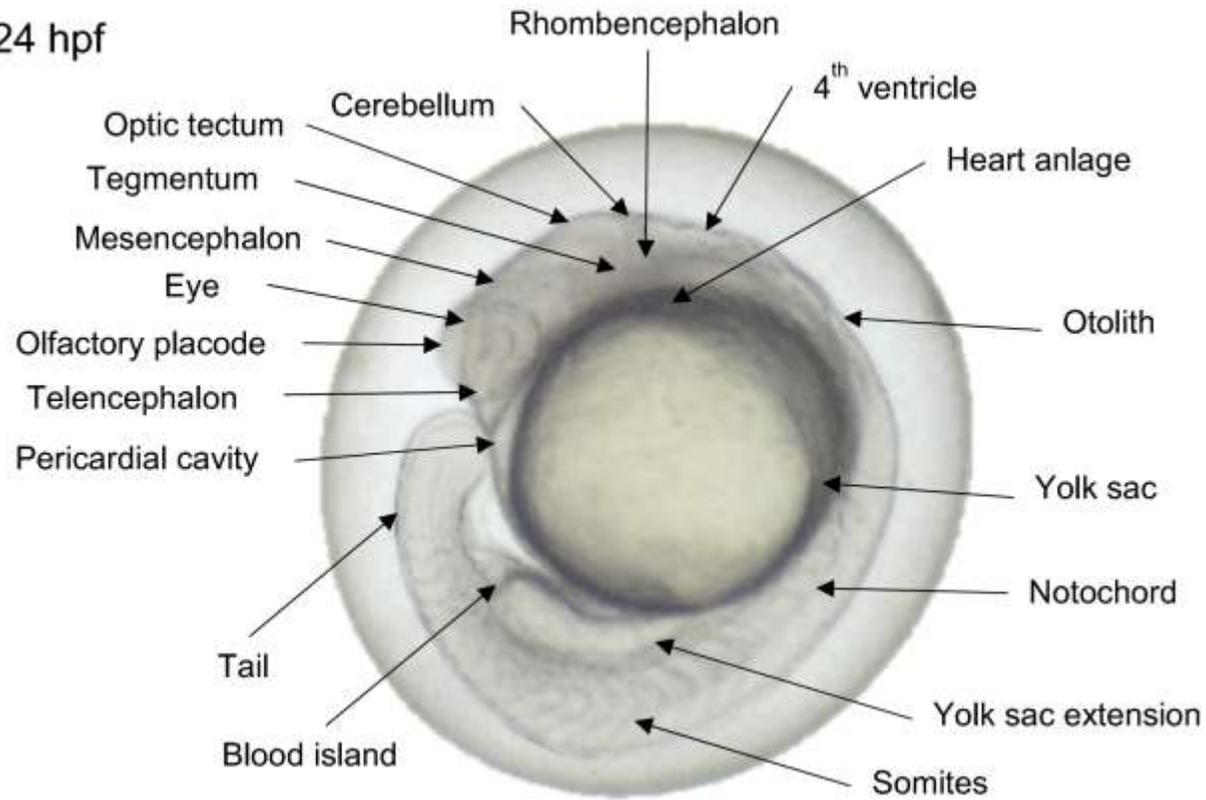
Yolk deformation

Impaired fin development

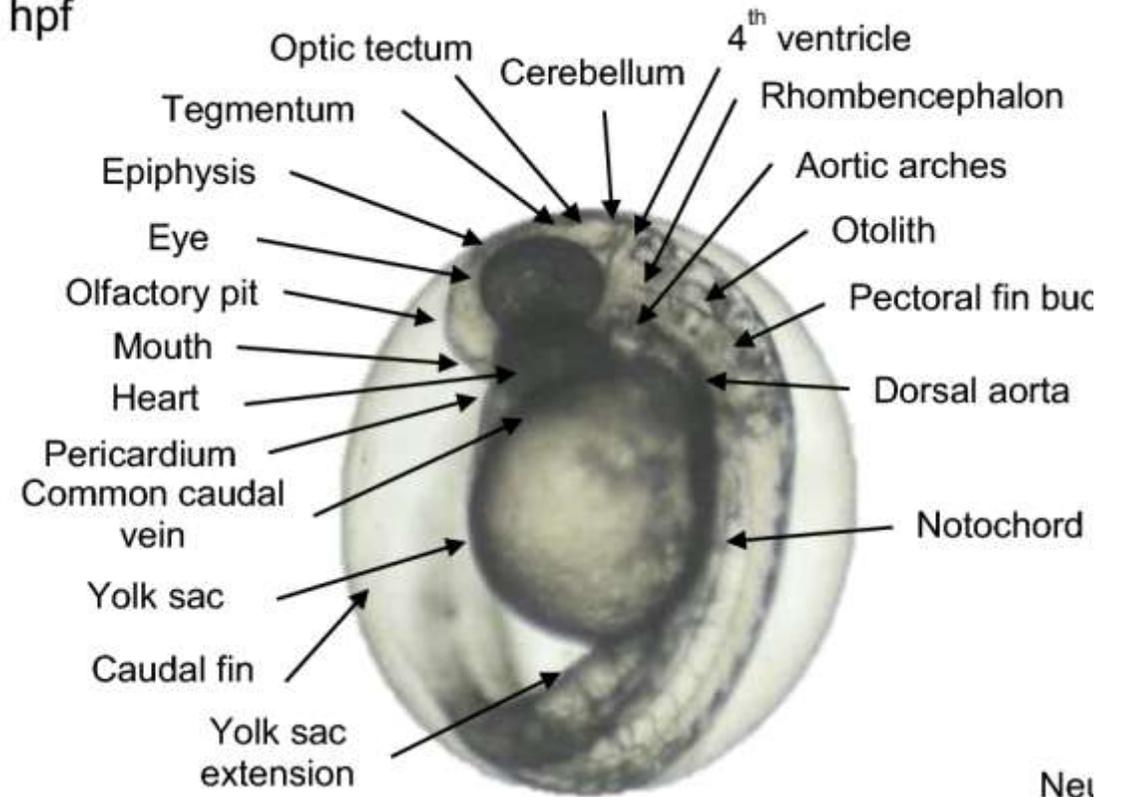
Altered spontaneous movement

# Normale sviluppo embrionale

24 hpf



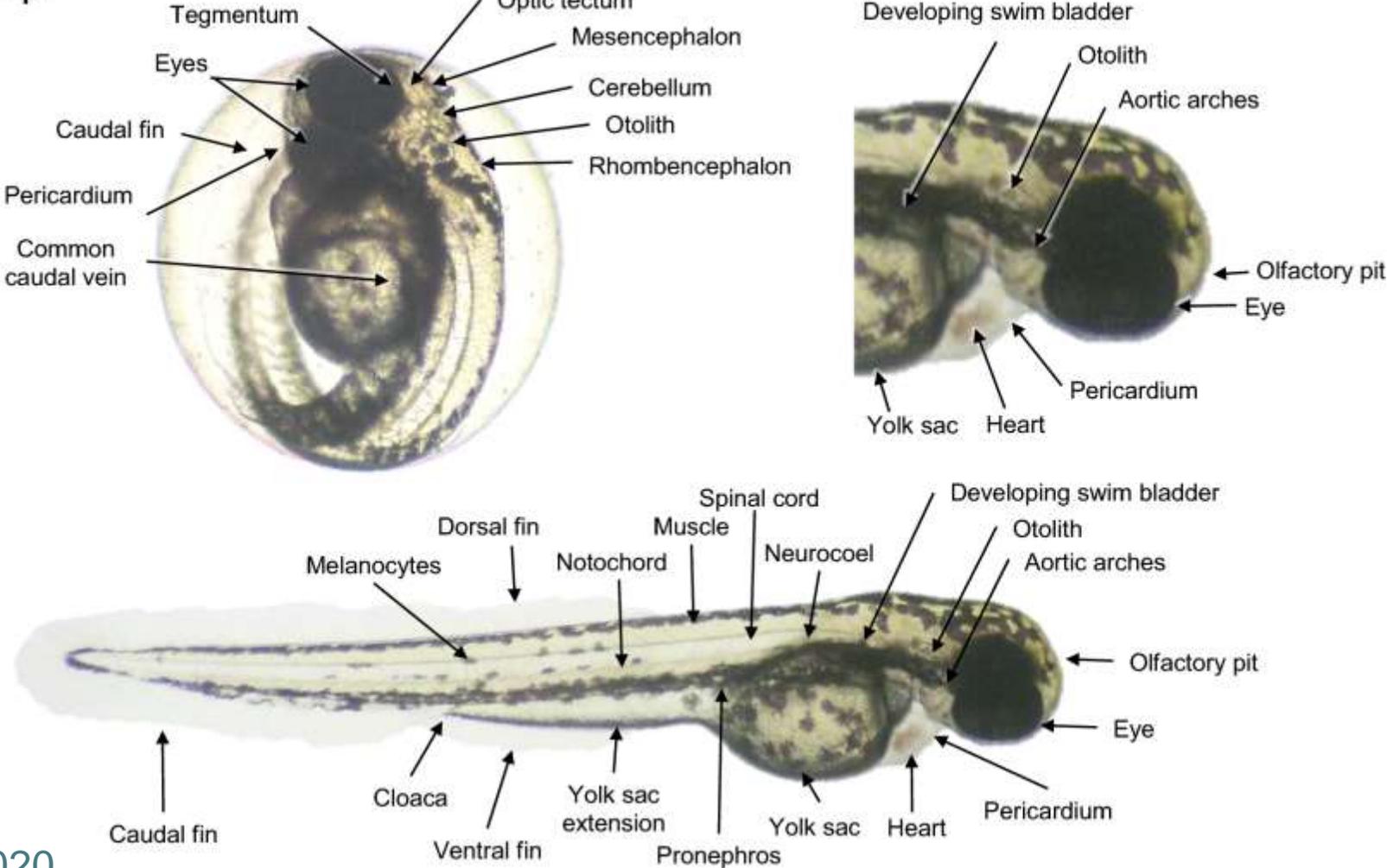
48 hpf



Net

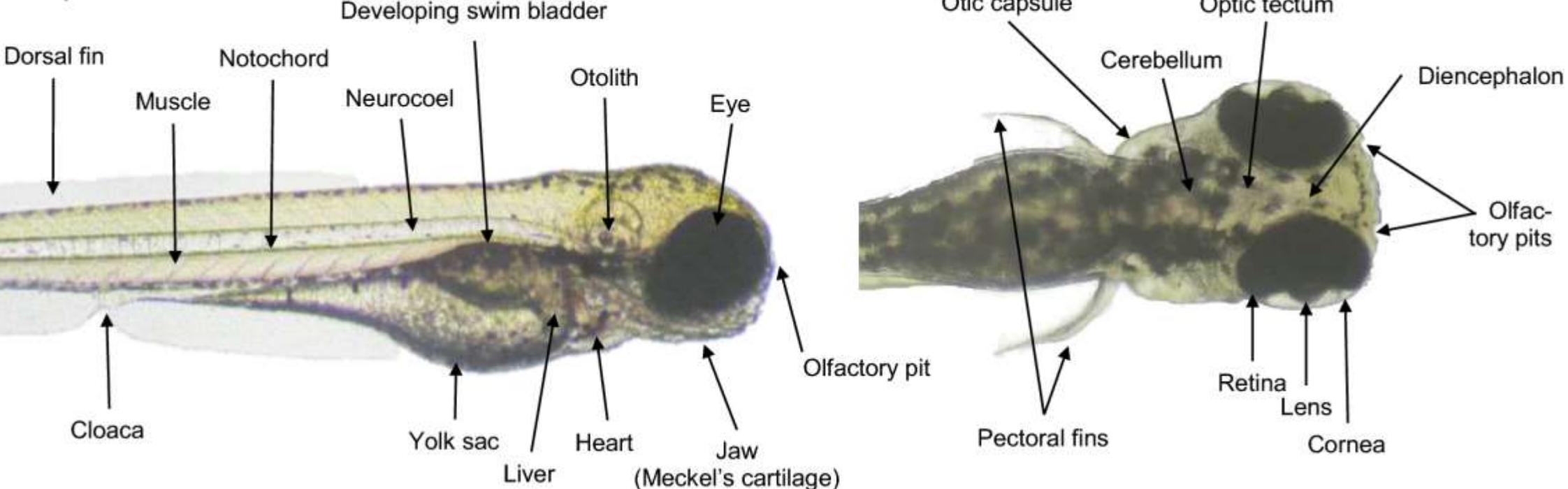
# Normale sviluppo embrionale

72 hpf



# Normale sviluppo embrionale

96 hpf



# Alterazioni sub-letali cardiache: ASPECIFICHE

24 hpf

48 hpf

72 hpf

96 hpf

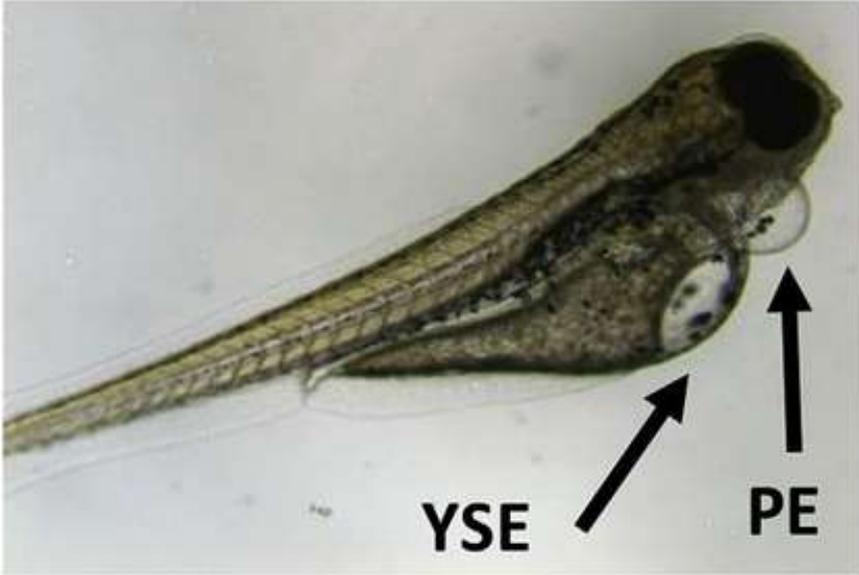


Stasi ematica



Edema del pericardio

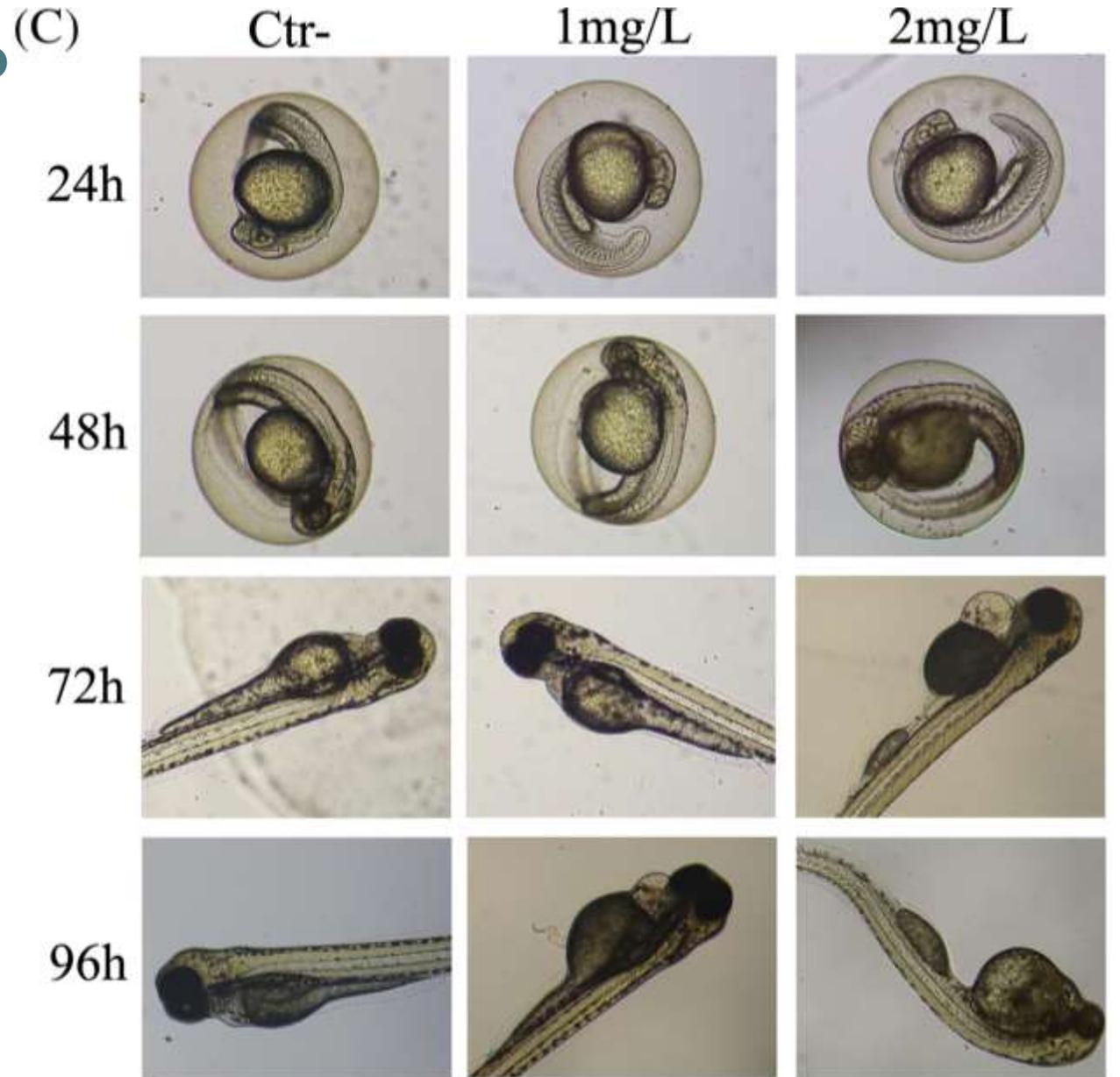
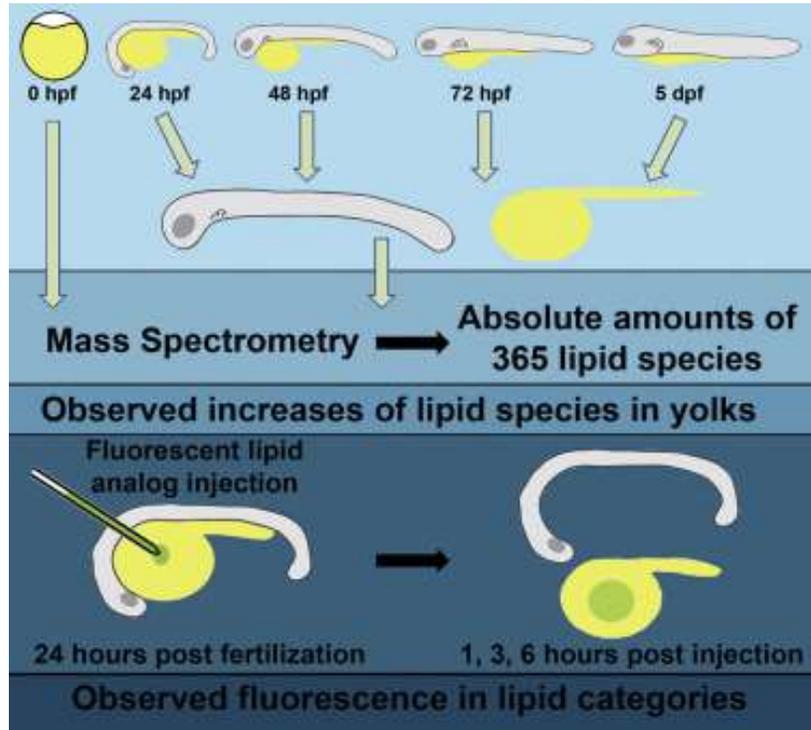
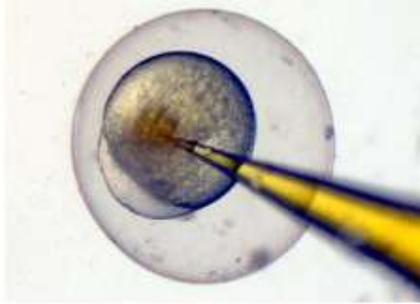
# Edema del pericardio ed edema del sacco vitellino



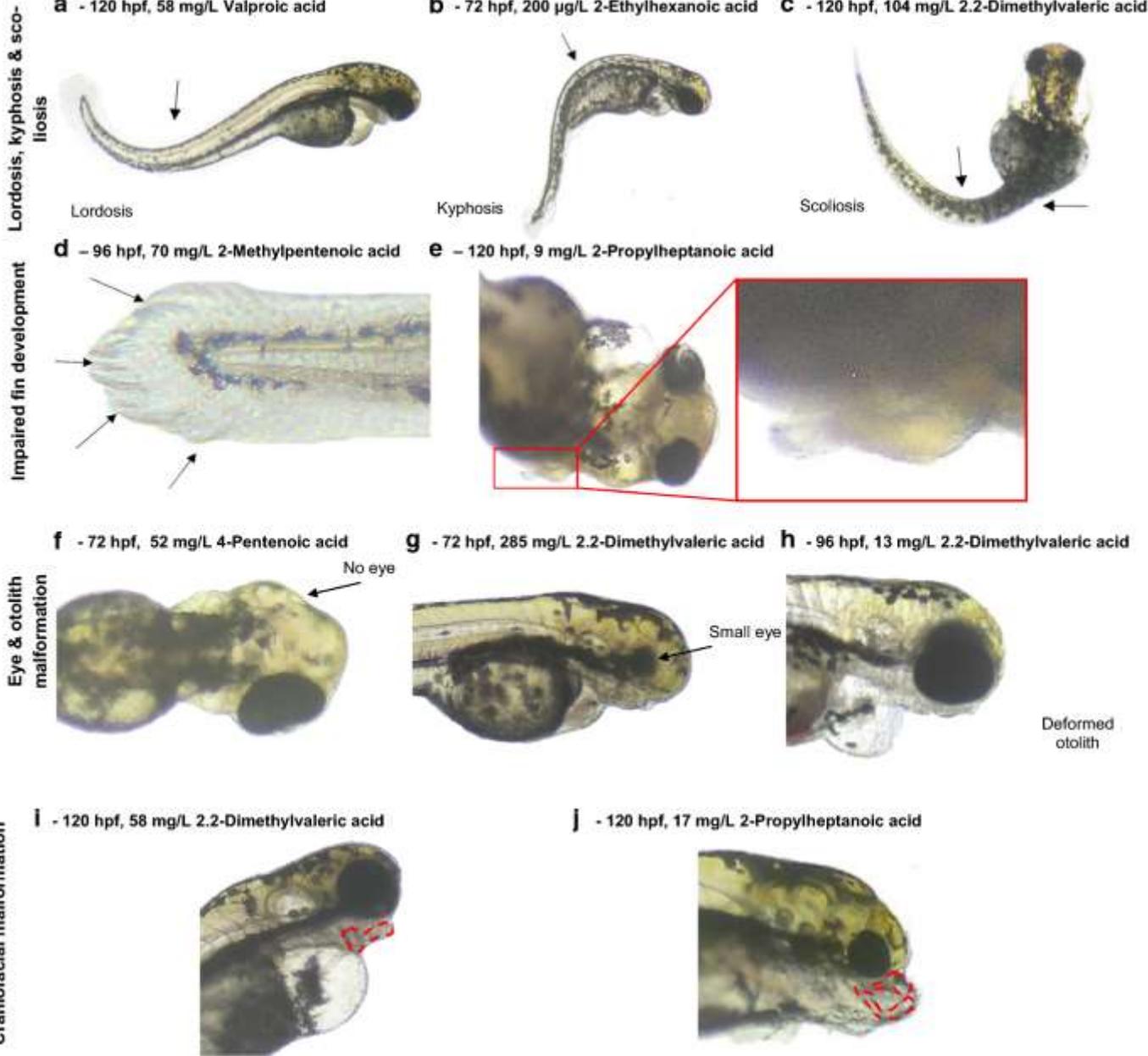
**Alterazioni cardiache visibili con sistema video:**

**VIDEO 1 e VIDEO 4**

# Malassorbimento del sacco vitellino (C)



Frequent sublethal observations with little or no potential for regeneration



Lordosi, cifosi e scoliosi

Alterazioni nello sviluppo delle pinne

Malformazioni dell'occhio

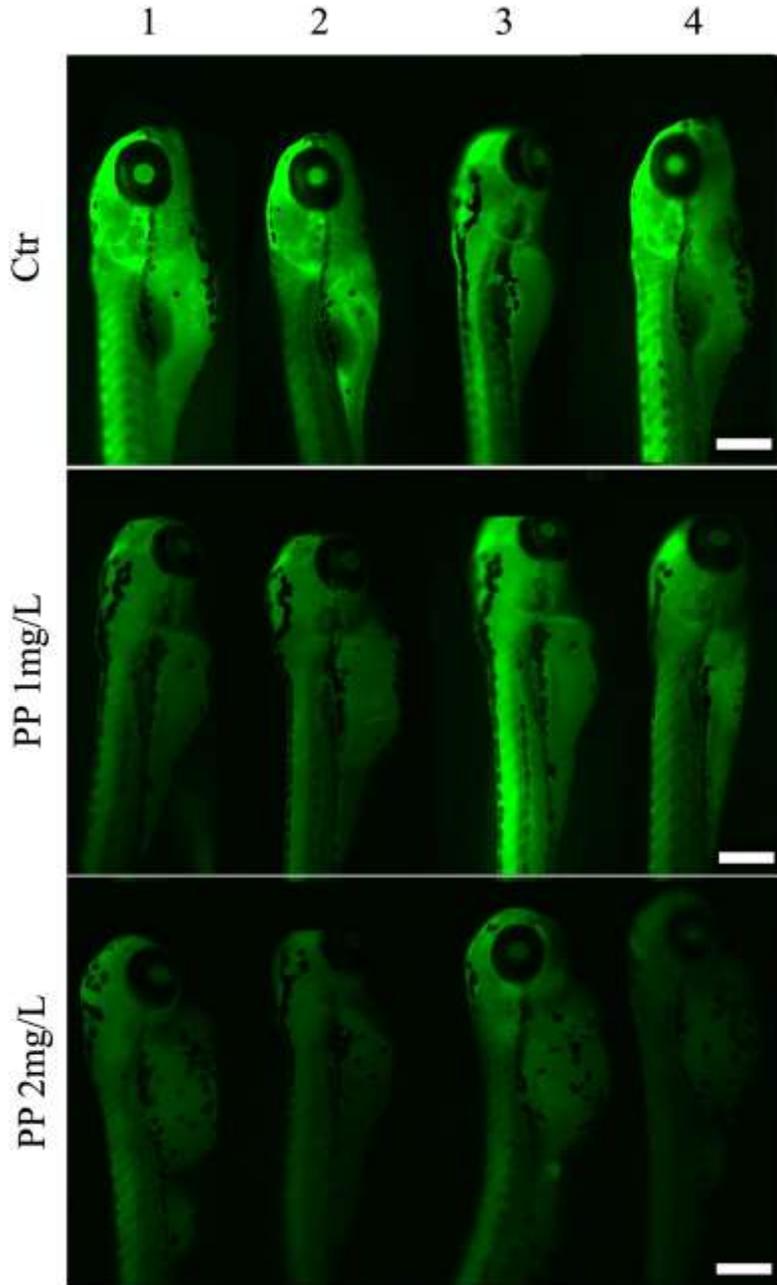
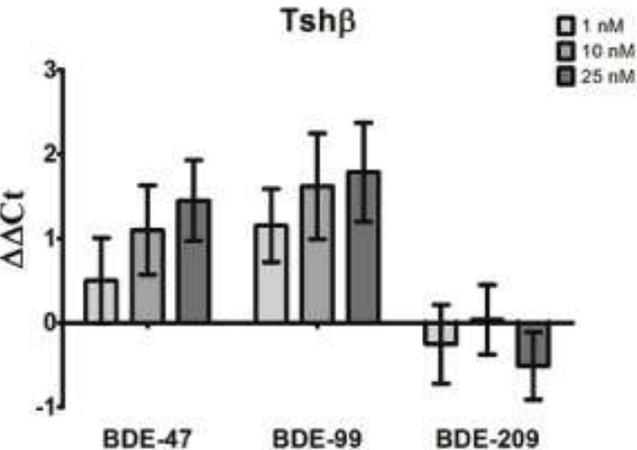
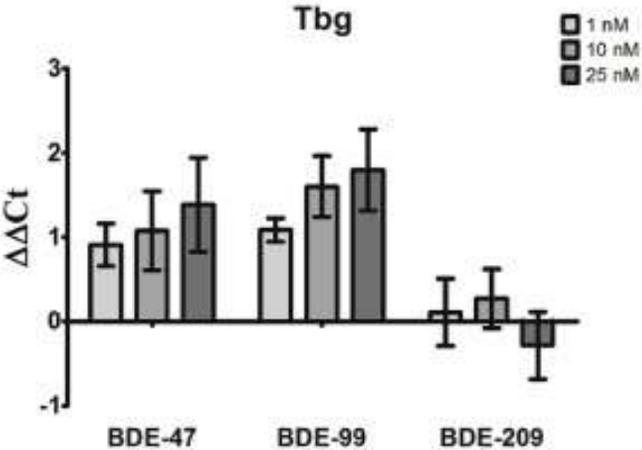
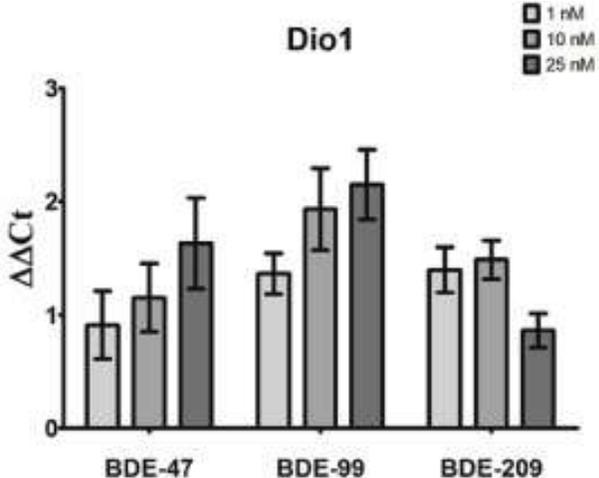
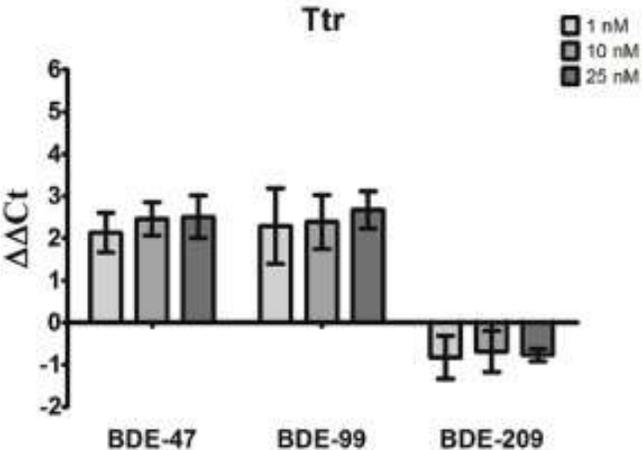
Malformazioni cranio-facciali

von Hellfeld et al. 2020

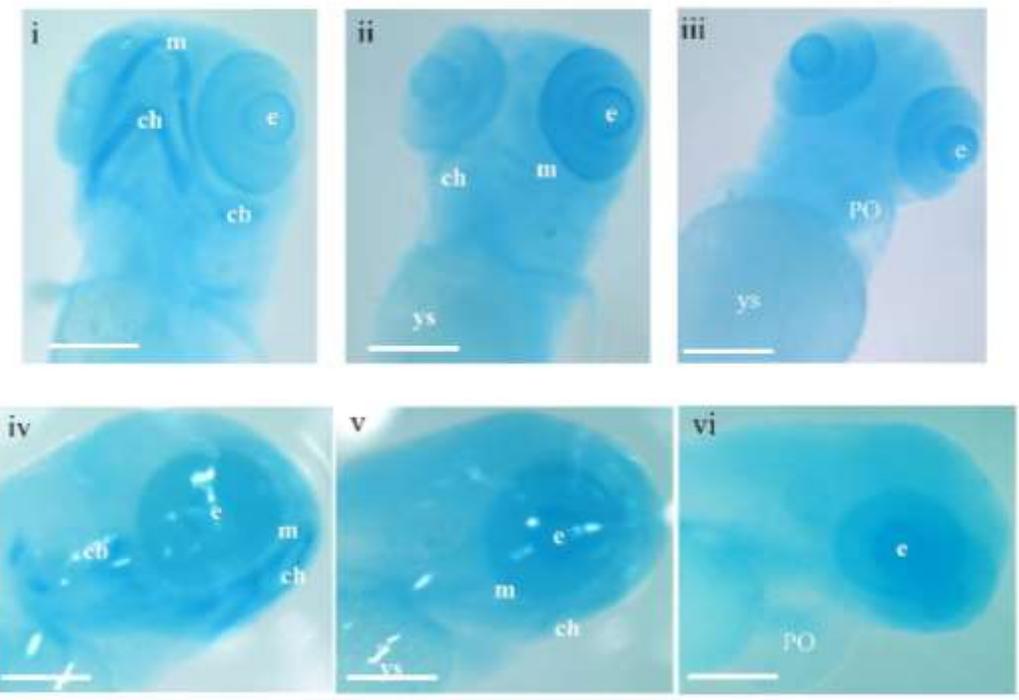
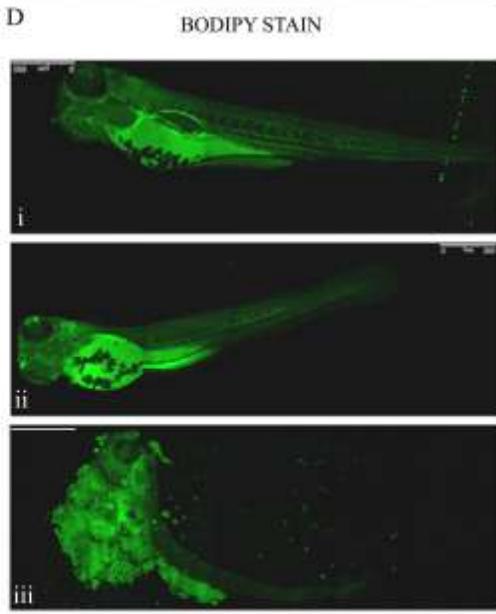
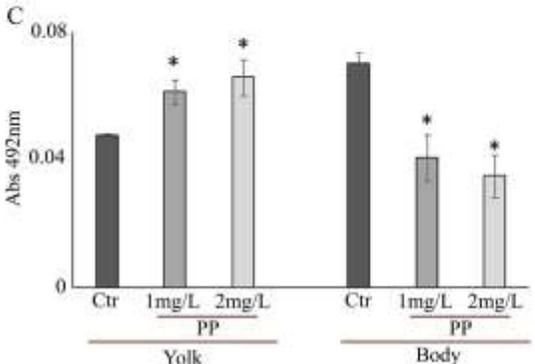
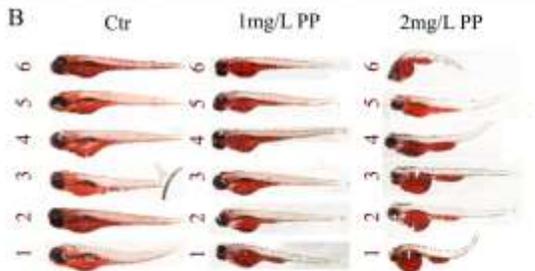
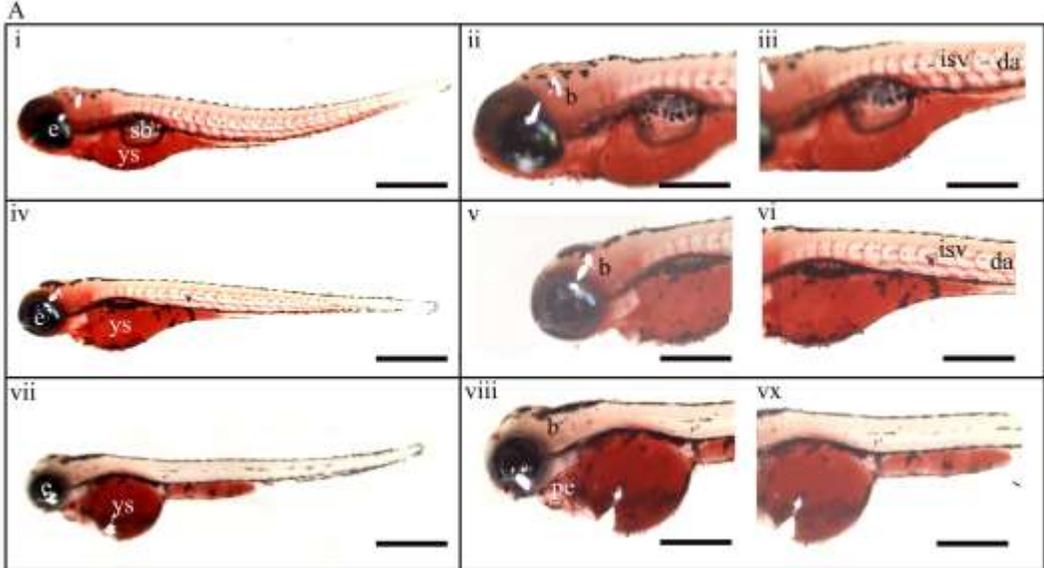
**Alterazioni comportamentali visibili nei FET tests:**

**VIDEO 1 e VIDEO 3**

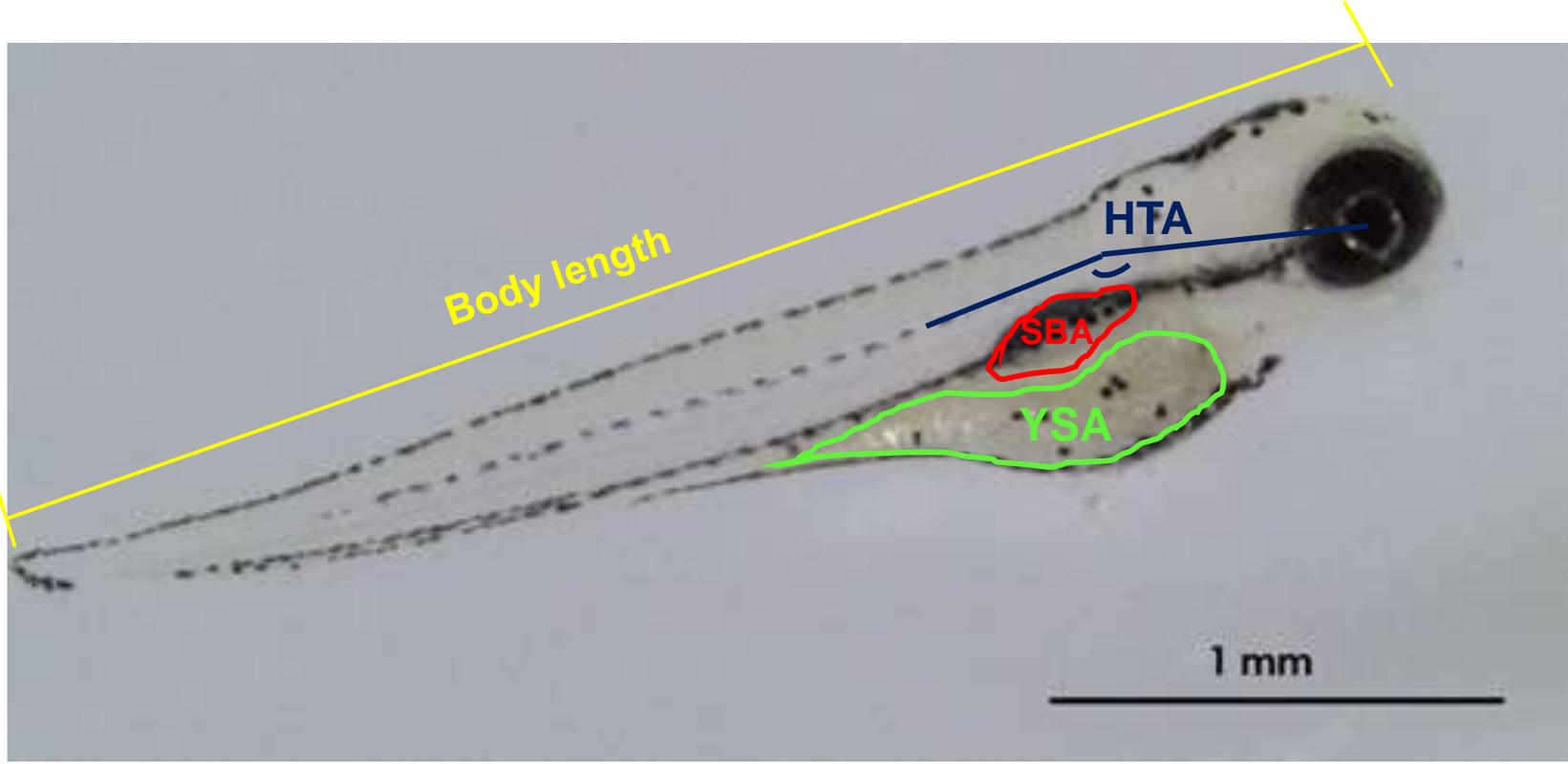
# Cosa si può fare dopo i FET tests? Real time PCR, PED6 assay



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

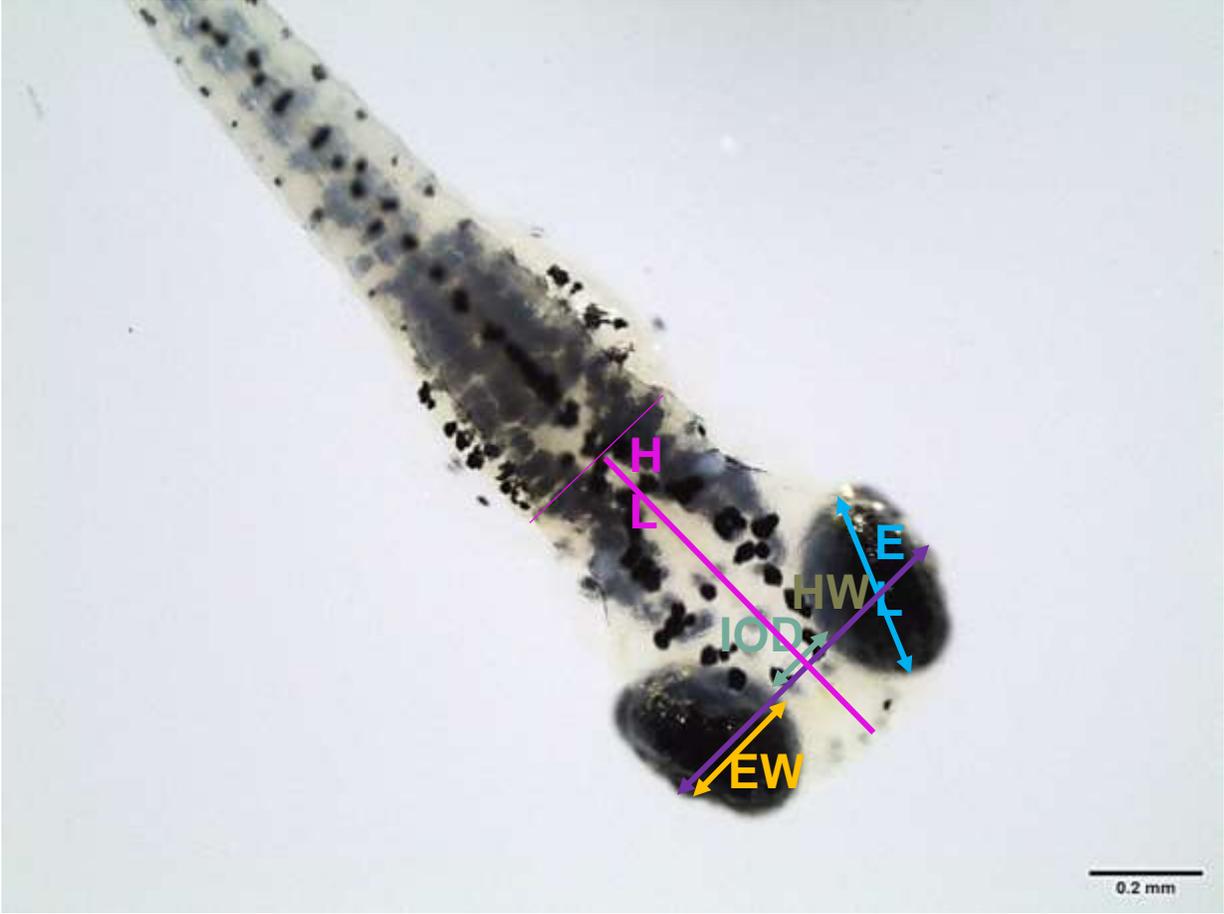


# Cosa si può fare dopo i FET tests? Analisi morfometriche



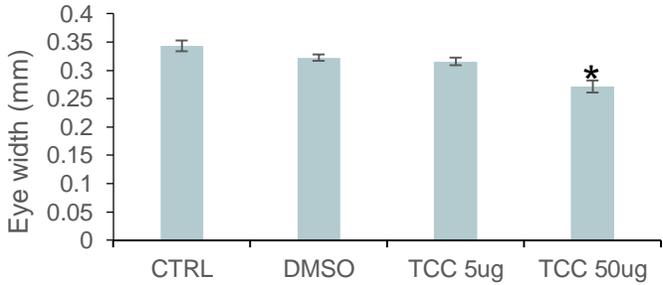
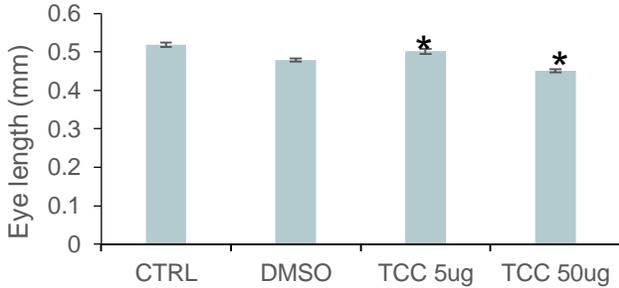
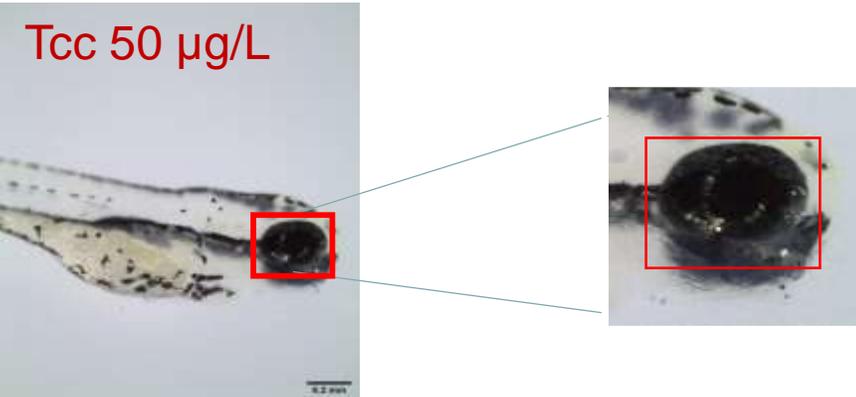
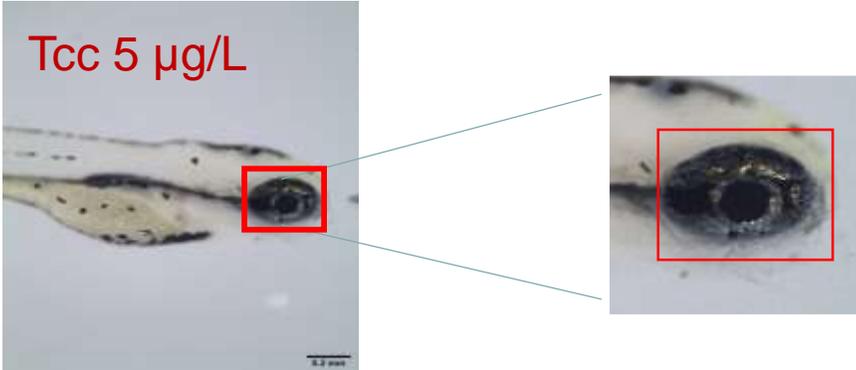
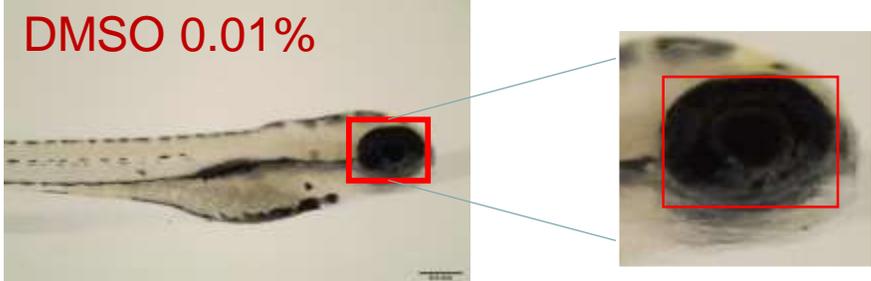
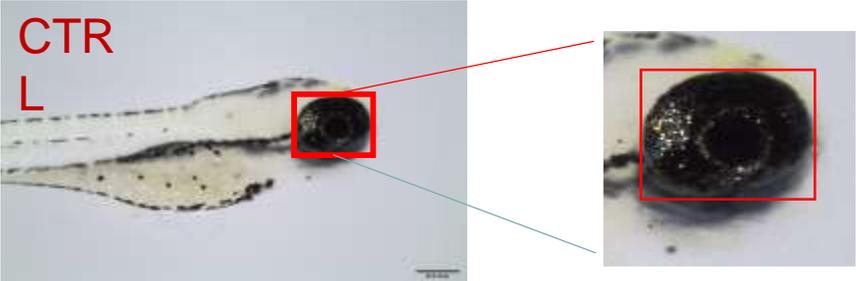
**HTA**= head- trunk angle  
**SBA**= swimming bladder area  
**YSA**= yolk salk area

# Cosa si può fare dopo i FET tests? Analisi morfometriche

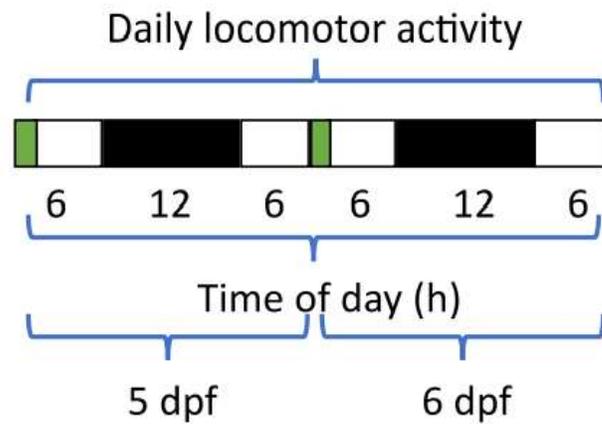
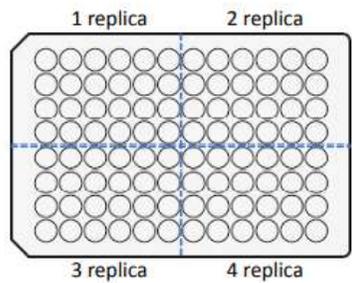
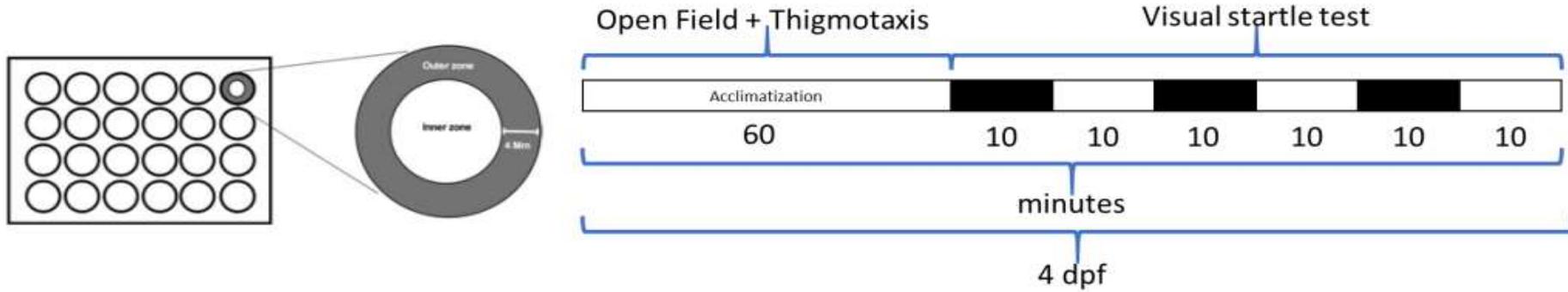


- IOD**= interocular distance
- EL**= eye length
- EW**= eye width
- HW**= head width
- HL**= head length

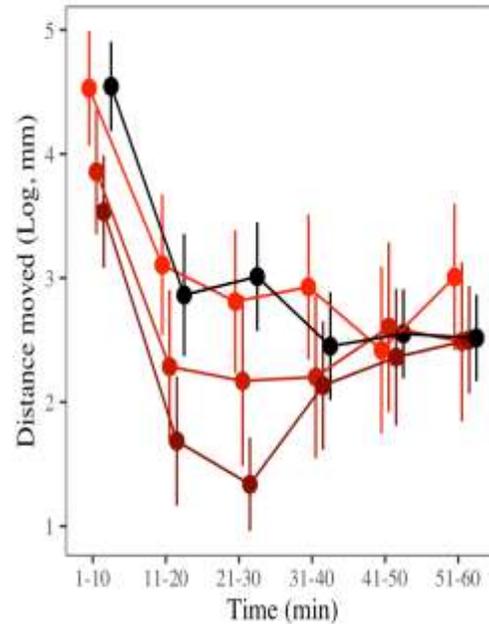
# Cosa si può fare dopo i FET tests? Analisi morfometriche



# Cosa si può fare dopo i FET tests? Test comportamentali

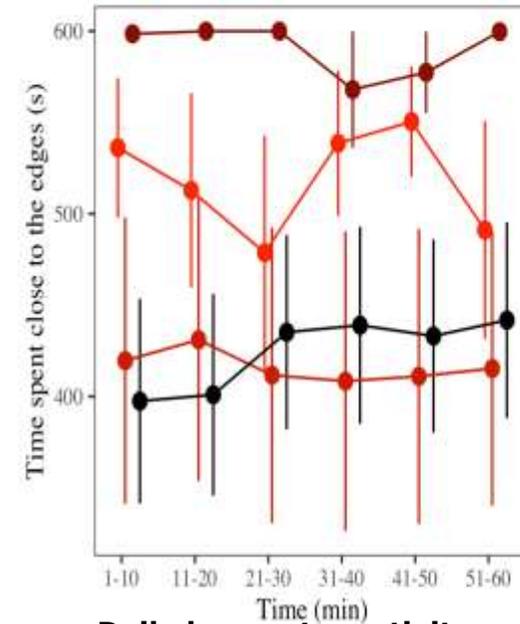


Open field test



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.

