

DMV Antonino Algozino

Cremona, 21 Ottobre 2010



Il biomonitoraggio ambientale e sanitario delle acque attraverso la fauna ittica e previsione delle patologie sullo Zebrafish

Con la collaborazione del Prof. Antonino Germanà

Direttore dello Zebrafish Neuromorphology Laboratory
Facoltà di Medicina Veterinaria - Dipartimento Mo.Bi.Fi.P.A.
Sezione di Morfologia



BIOMONITORAGGIO

Il **biomonitoraggio** è il monitoraggio degli effetti dell'inquinamento mediante organismi viventi e parametri biologici. Le tecniche di biomonitoraggio non misurano l'inquinamento presente, ma stimano l'alterazione rispetto alla norma di componenti degli ecosistemi reattivi.

I biomonitors permettono di identificare lo stato di alcuni parametri ambientali sulla base degli effetti da essi indotti su organismi sensibili.

I rischi per l'uomo e per l'ambiente possono essere valutati studiando l'attività tossica di sostanze inquinanti, alle concentrazioni ambientali, su sistemi sperimentali di colture di cellule umane e di zebrafish.

I fenomeni di bioconcentrazione e biomagnificazione delle sostanze inquinanti osservati nella fauna ittica (che rappresentano l'apice della catena alimentare degli ambienti acquatici), vengono direttamente trasferiti all'uomo mediante le specie che sono oggetto di consumo alimentare.

Isolando i contaminanti presenti nella fauna ittica, è possibile studiare e quindi prevedere la loro attività tossica a lungo termine nell'uomo su sistemi sperimentali di colture di cellule di zebrafish.

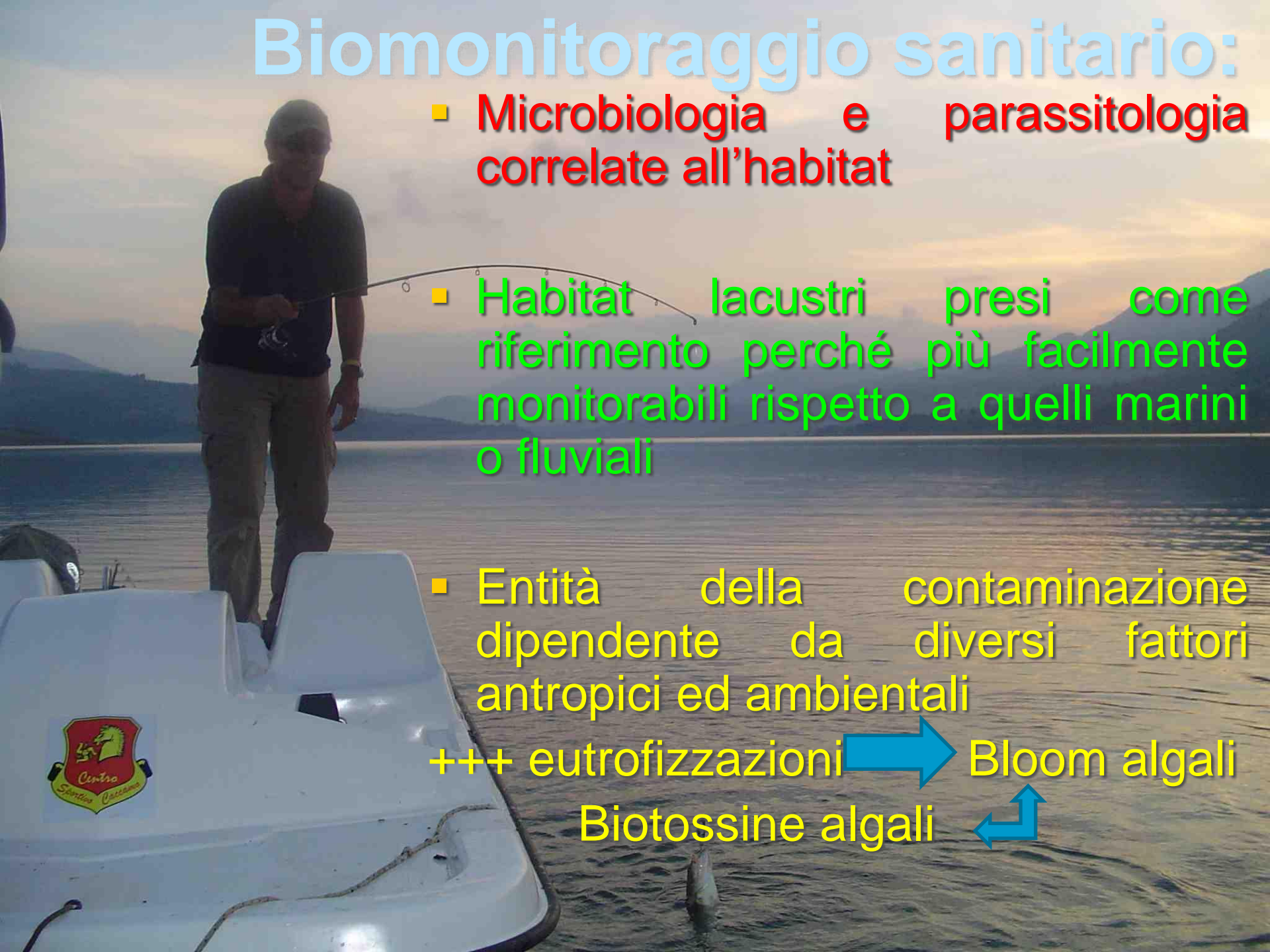
Biomonitoraggio sanitario:

- **Microbiologia e parassitologia correlate all'habitat**

- **Habitat lacustri presi come riferimento perché più facilmente monitorabili rispetto a quelli marini o fluviali**

- **Entità della contaminazione dipendente da diversi fattori antropici ed ambientali**

+++ eutrofizzazioni → Bloom algali
Biotossine algali ↺



Entità della contaminazione

1) Fattori antropici:

- **polluzione chimico-tossica (bioaccumulazione, biomagnificazione, immunodepressione)**
- **inquinamento da reflui urbani non depurati sversati direttamente sui corpi idrici**
- **immissione incontrollata di pesce infetto**

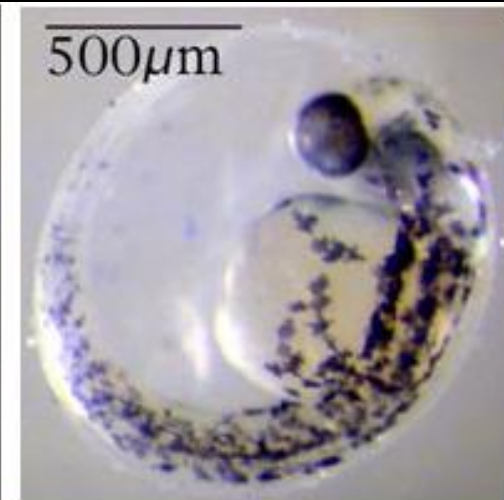
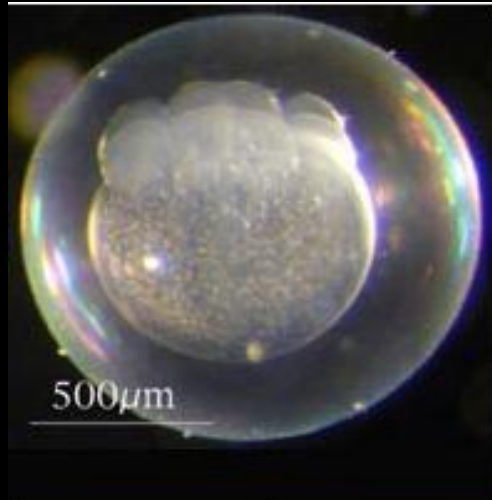
2) Fattori ambientali:

- **grado di eutrofizzazione delle acque (> patologie da Vibrionaceae ed Enterobacteriaceae)**
- **fluttuazioni stagionali di temperatura, ricambio idrico, etc. (> stress e > recettività alle malattie)**

ESPERIMENTI CLASSICI DI TOSSICOLOGIA

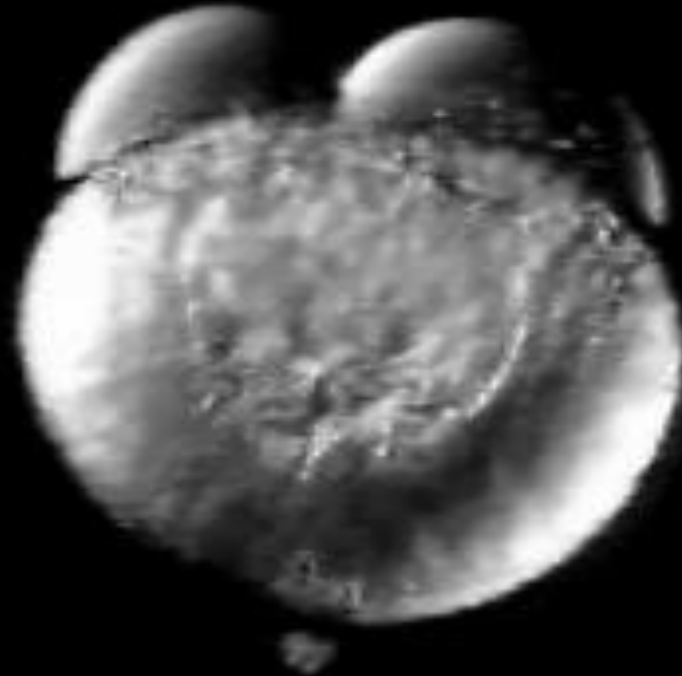
VALUTAZIONE DEL RISCHIO BIOLOGICO
ATTRAVERSO L'UTILIZZO DELLO ZEBRAFISH

Zebrafish (*Danio rerio*)



E ancora.....

- **Sviluppo embrionale rapido**
- **Trasparenza dell'embrione**
- **Possibilità di manipolare geneticamente l'embrione**
- **Creazione di zebrafish transgenici**
- **Zebrafish knock-down (sonde morpholino)**
- **Preferibile bioeticamente**





C.I.S.S.

CENTRO DI ITTIOPATOLOGIA SPERIMENTALE DELLA SICILIA





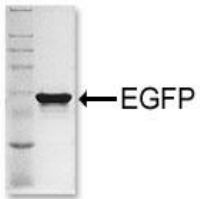
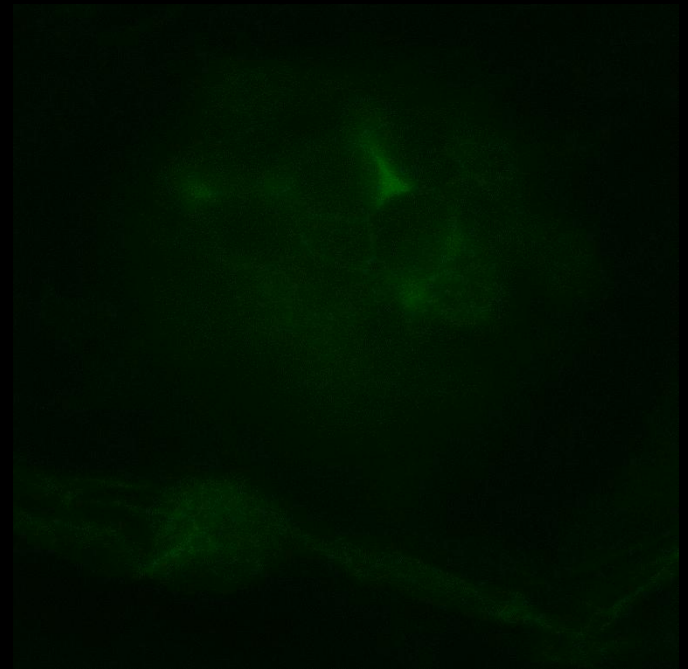
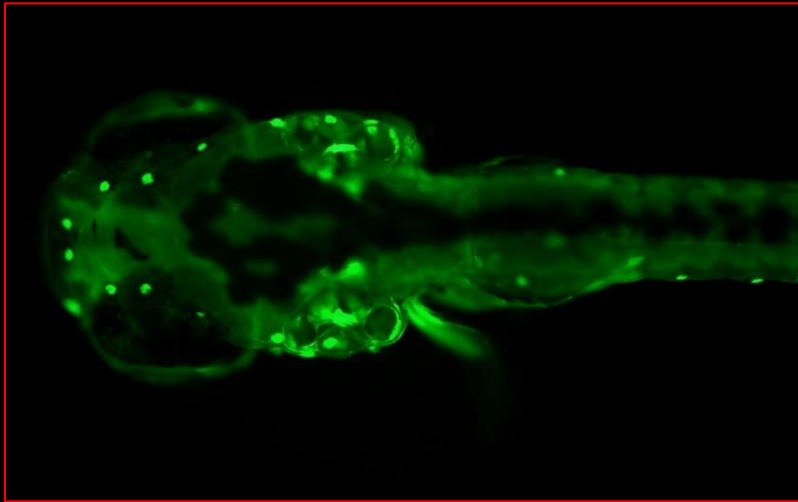
**Decreto legislativo n. 116 del 27/01/1992
(in Suppl. ordinario alla Gazz. Uff. n. 40, del 18 febbraio).**

**Regolamento per il funzionamento degli stabilimenti utilizzatori e di
allevamento di animali per la sperimentazione**

**Attuazione della direttiva (CEE) n. 609/86 in materia di protezione degli animali
utilizzati a fini sperimentali o ad altri fini scientifici.**

Zebrafish transgenics

In collaborazione con
Howard Hughes Medical Institute and Laboratory of
Sensory Neuroscience, The Rockefeller University, New
York, USA.

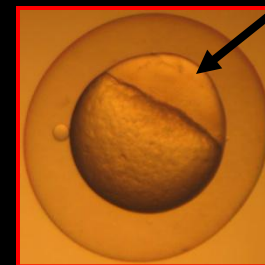
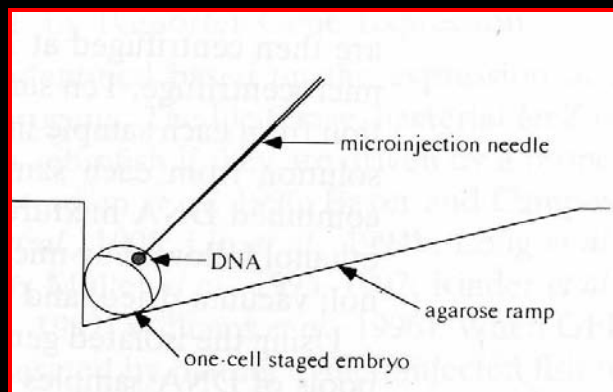
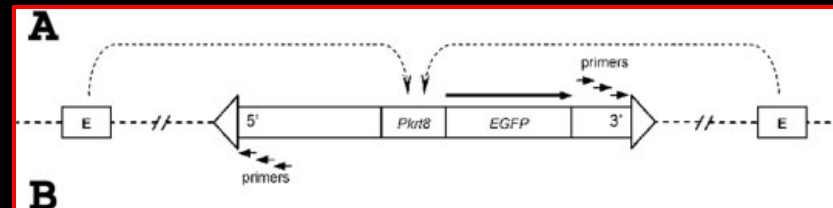


29 kDa recombinant protein

TECHNIQUES

Toi2 Transposon-Mediated Enhancer Trap to Identify Developmentally Regulated Zebrafish Genes In Vivo

Serguei Parinov, Igor Kondrichin, Vladimir Korzh,* and Alexander Emelyanov



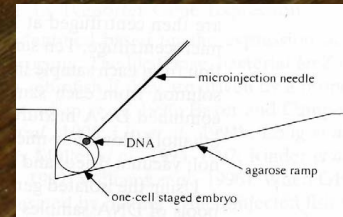
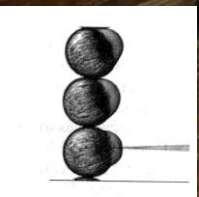
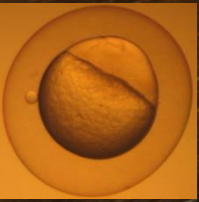
Zebrafish transgenics

ET 4: GFP fish

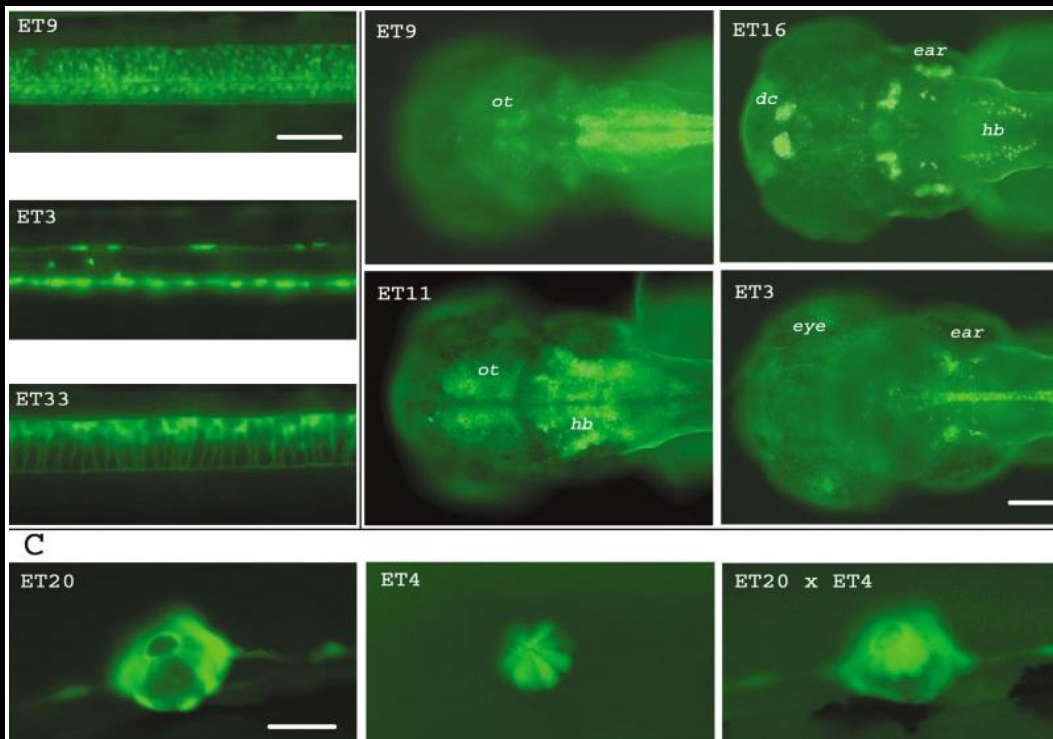
Islet 1: GFP fish

HuC: GFP fish

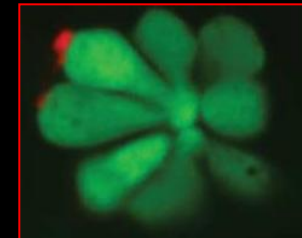
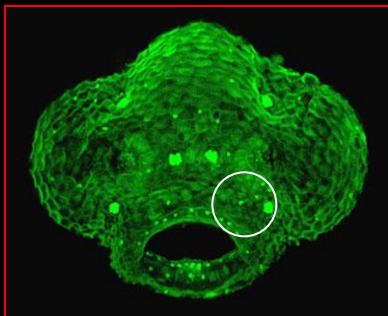
Brn3c: gap43-GFP fish



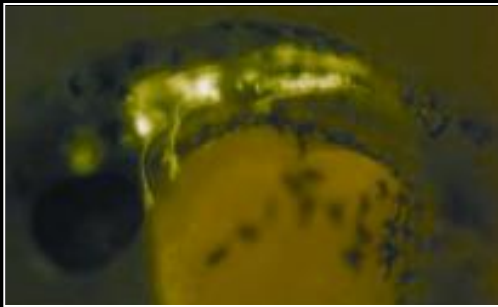
ET 4: GFP fish



Espressione a livello delle cellule sensoriali dei neuromasti della linea laterale, delle cellule sensoriali dell'orecchio interno e della bocca, dei somiti e delle cellule che tappezzano il sacco vitellino

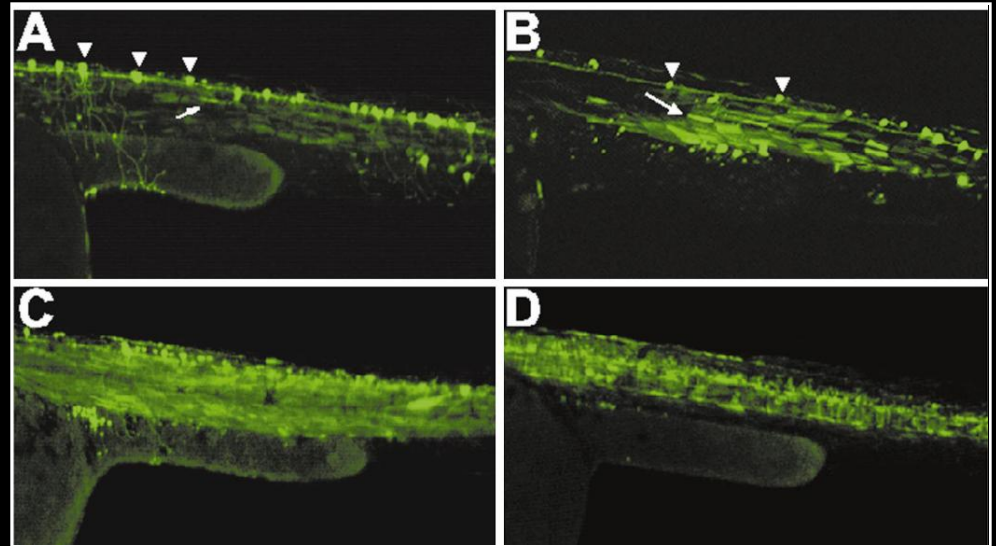
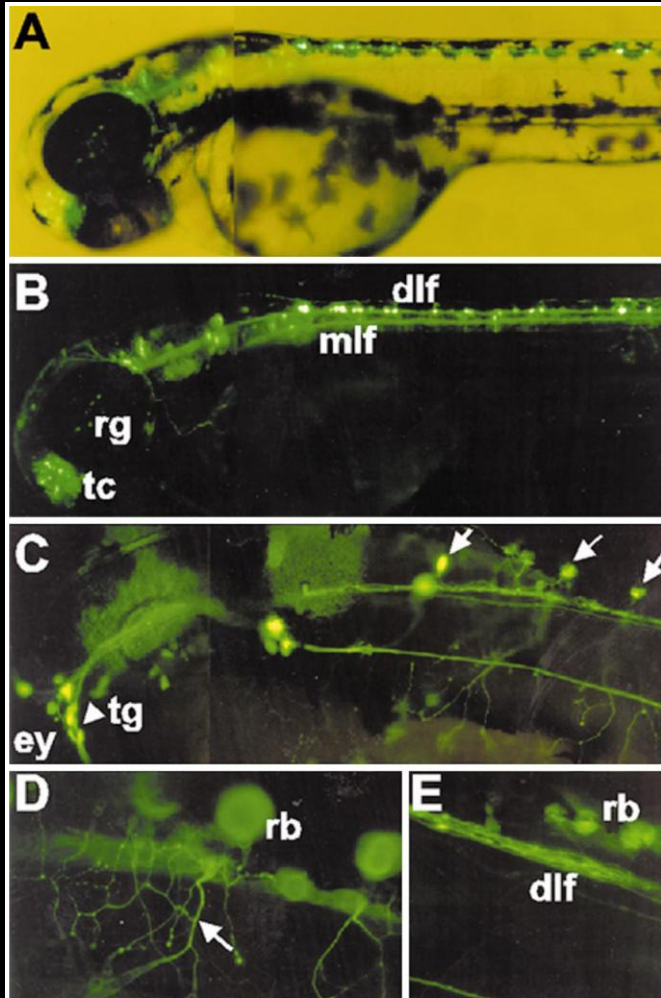


Islet 1: GFP fish



Espressione a livello dei neuroni motori craniali (Higashijima 2008)

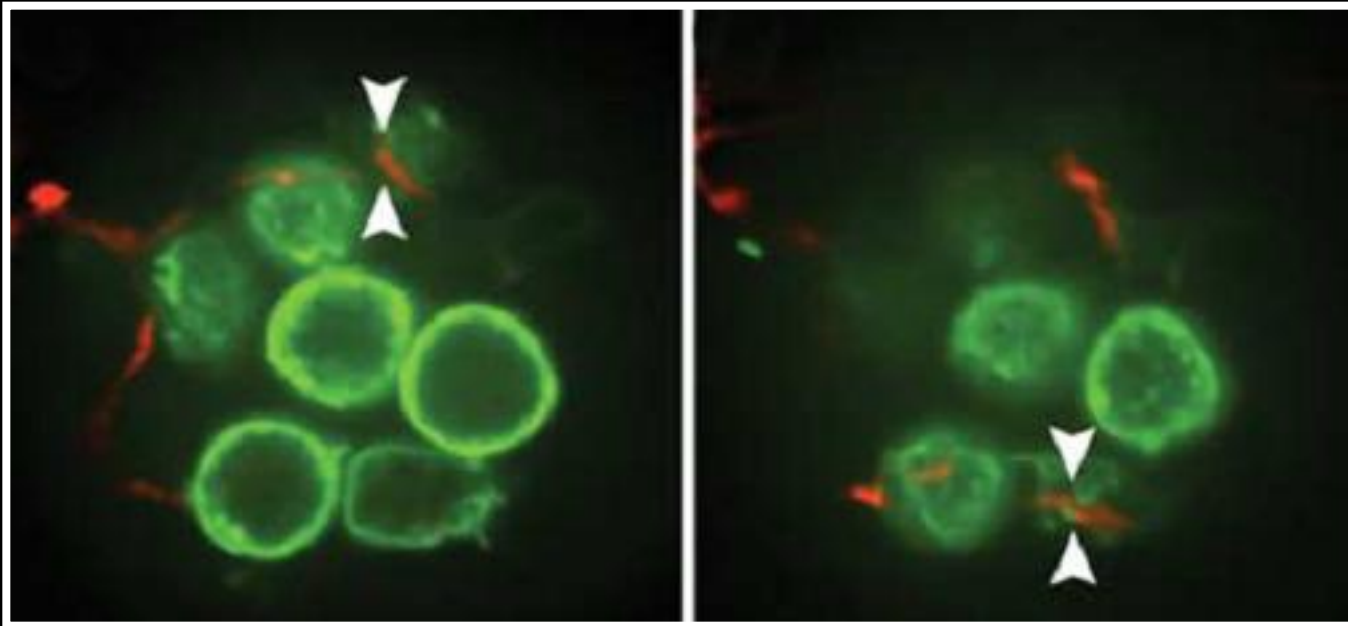
HuC: GFP fish



HuC codifica per “RNA-binding protein” espressa esclusivamente a livello dei neuroni (Park et al., 2000)

L’espressione della HuC-GFP rappresenta un marker molto precoce di differenziazione neuronale.

Brn3c: gap43-GFP fish

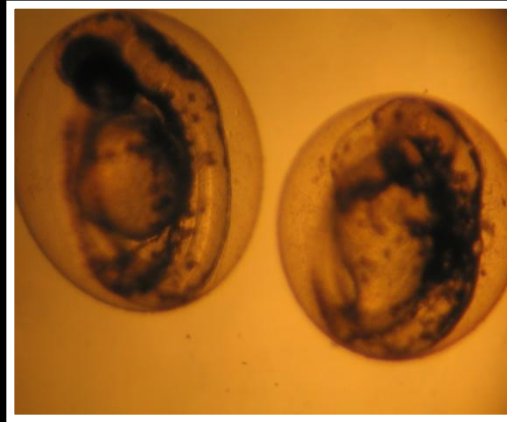


Espressione nelle cellule ganglionali della retina (Nagiel et al., 2008)

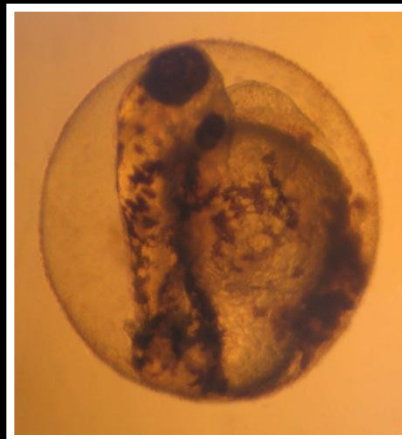
Zebrafish wild-type

Anomalie dell'organo della vista

- Eyeless (2%)

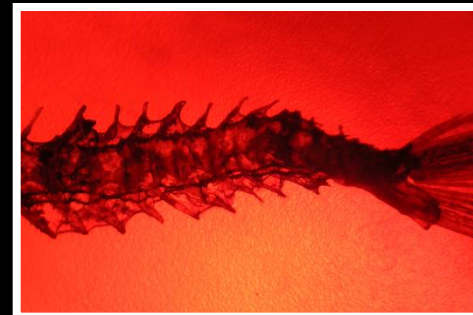
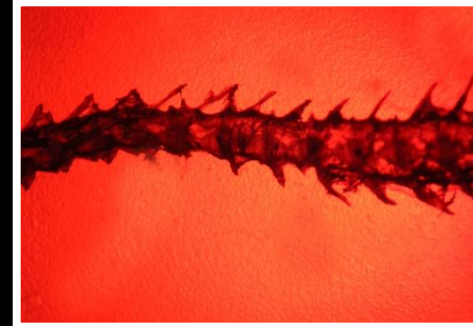
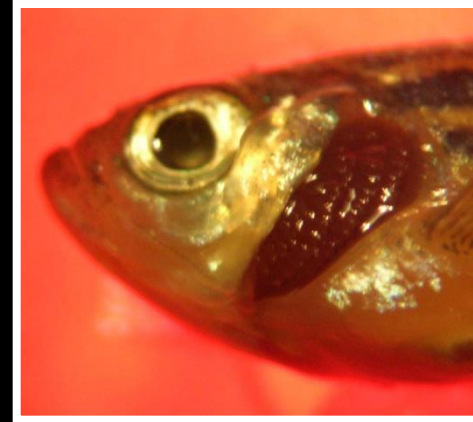


- Ipoplasi del bulbo oculare unilaterale (8%)



Zebrafish wild-type

- **Anomalie del complesso opercolare**
Monolaterale (10%)
Bilaterale (3,3%)
- **Anomalie dell'asse vertebrale**
Regione delle vertebre pre-emali e caudali



Zebrafish wild-type

Anomalie dell'asse vertebrale

sviluppo corporeo insufficiente (nanismo)



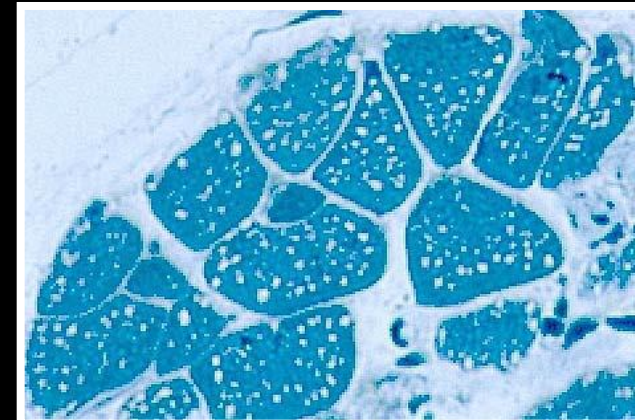
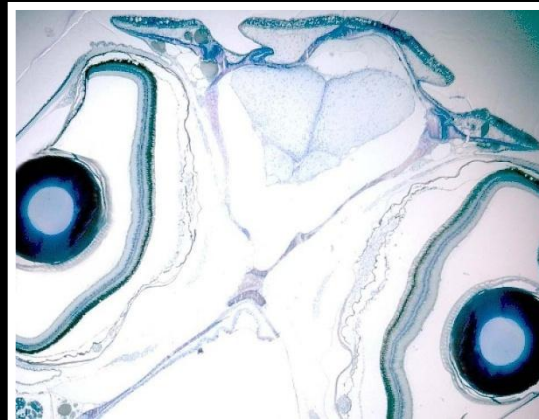
Anomalie delle ossa craniche

sviluppo anomalo delle ossa premascellare e dentale

agenesia della piastra opercolare monolaterale

deformazione della scatola cranica

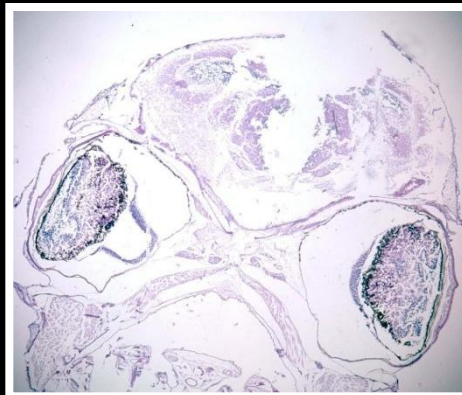
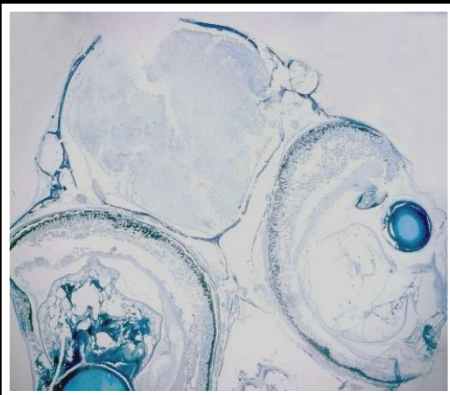
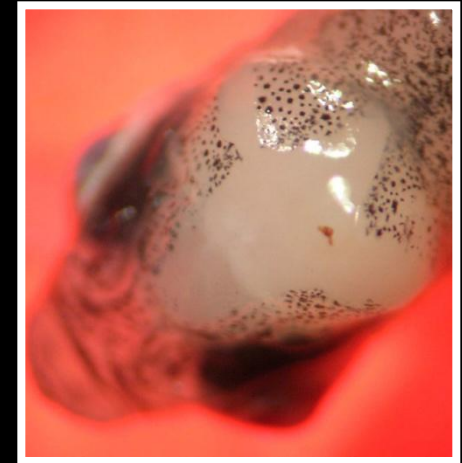
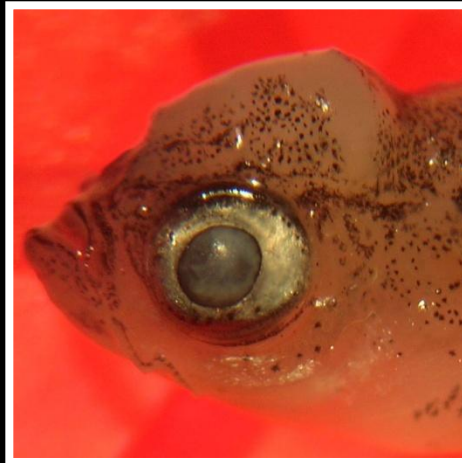
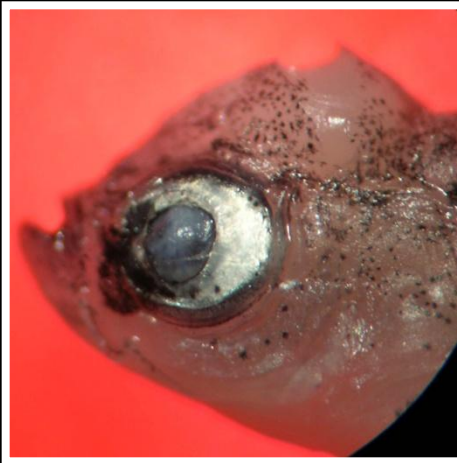
degenerazione muscolare di tipo vacuolare



Zebrafish transgenici

Islet 1: GFP fish

Cranioschisi con encefalocele (6%)





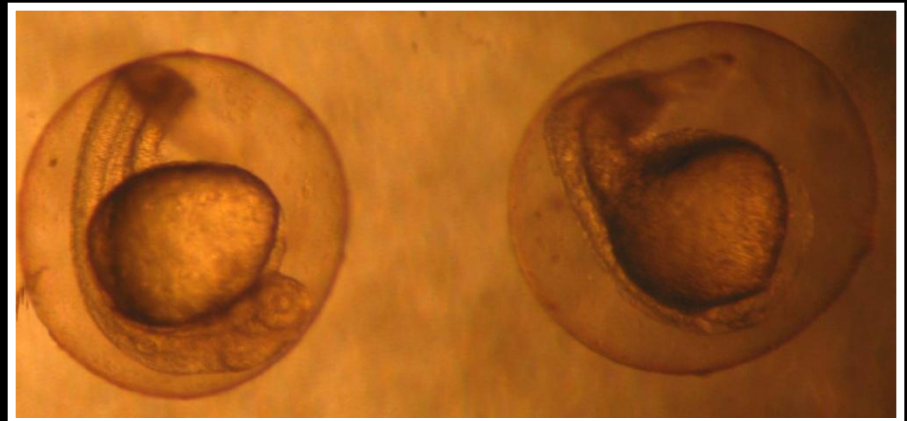
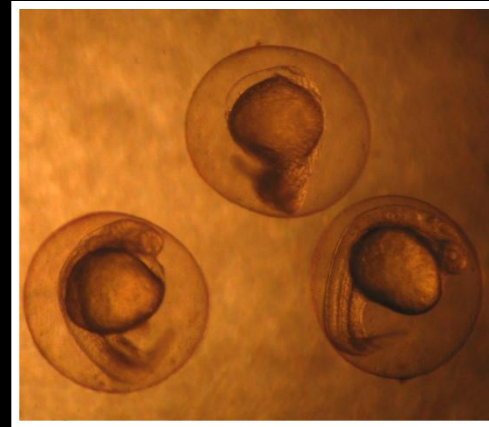
Lamason et al., 2005

Zebrafish transgenici

HuC: GFP fish

albinismo (13%)

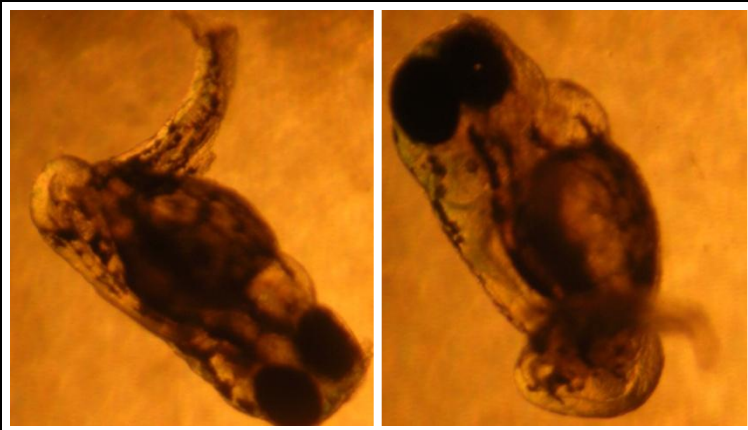
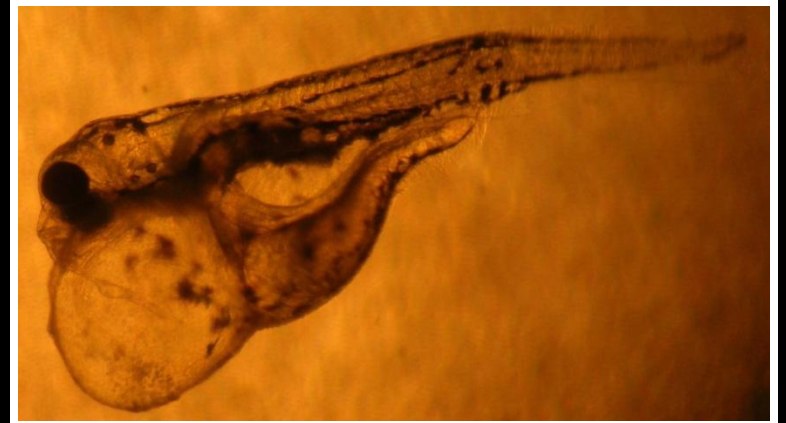
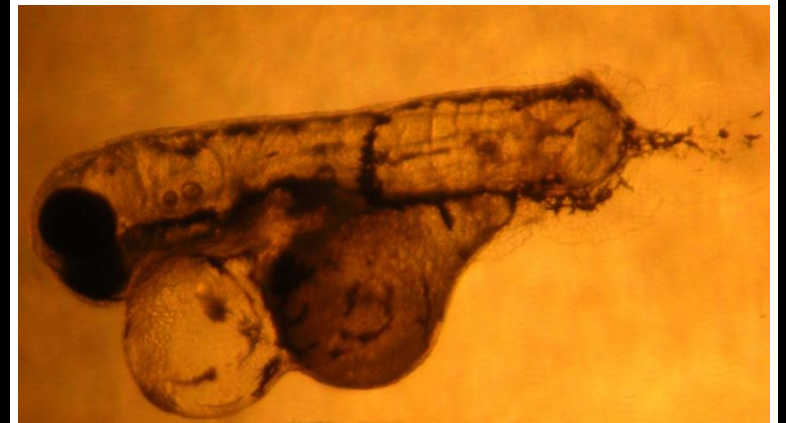
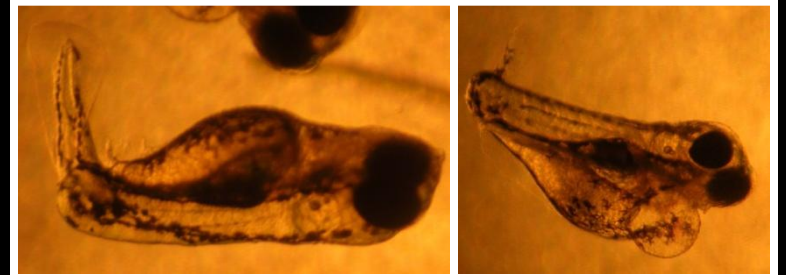
microcefalia- microftalmia (2,5%)



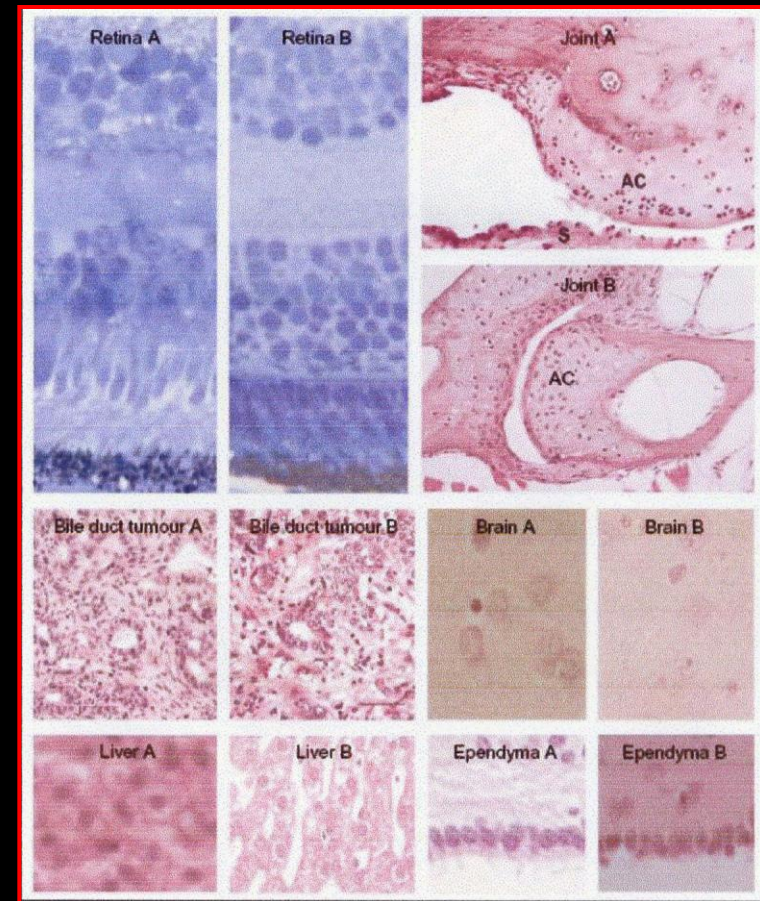
Zebrafish transgenici

Brn3c: gap43-GFP fish

- *Anomalie scheletriche - vertebre pre-emali, emali e caudali (20%)*
- *Anomalie delle pinne*
- *Mostro doppio parassita (Onfalosita xifopago)*



- Il coinvolgimento dei geni responsabili di tali malformazioni è in fase di accertamento
- Le linee transgeniche stabilmente modificate sono utili per lo studio di patologie umane che vedono coinvolti geni connessi ai processi di differenziamento cellulare.



ECOTOSSICOGENOMICA

- Screening tossico per la valutazione genetica di contaminatori ambientali.
 - Implicazioni sulla salute e sull'ambiente

Base di partenza

In Germania, il test sugli embrioni zebrafish è stato introdotto come test standard ISO per la verifica della qualità delle acque e la determinazione della tossicità delle acque reflue, sostituendo le tradizionali prove di tossicologia su pesce adulto.

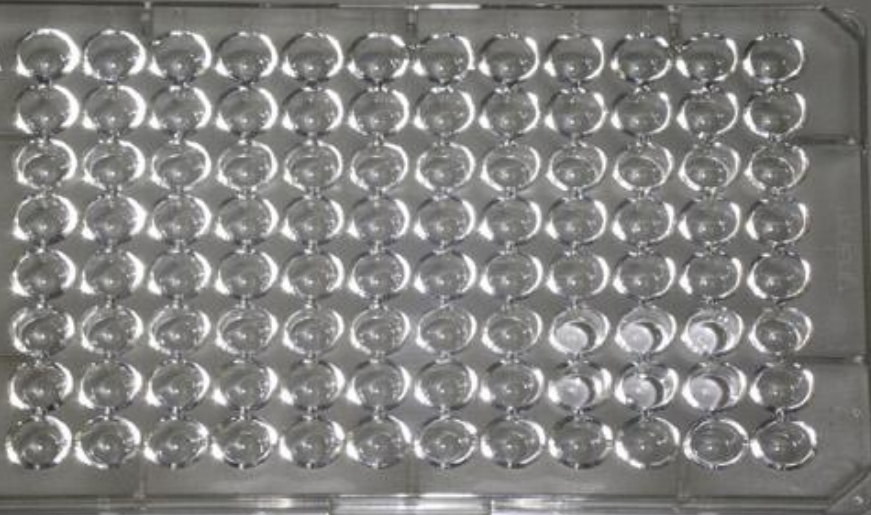
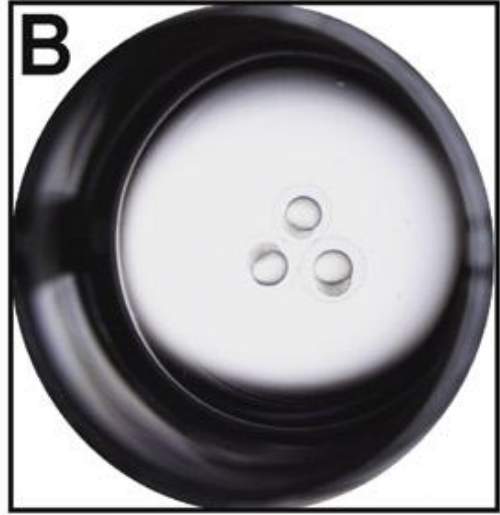
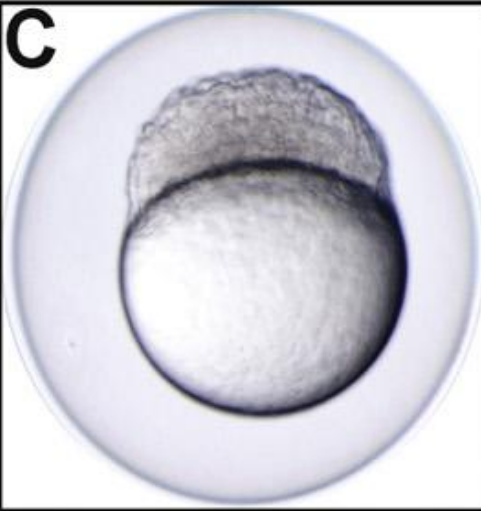
Proposta operativa

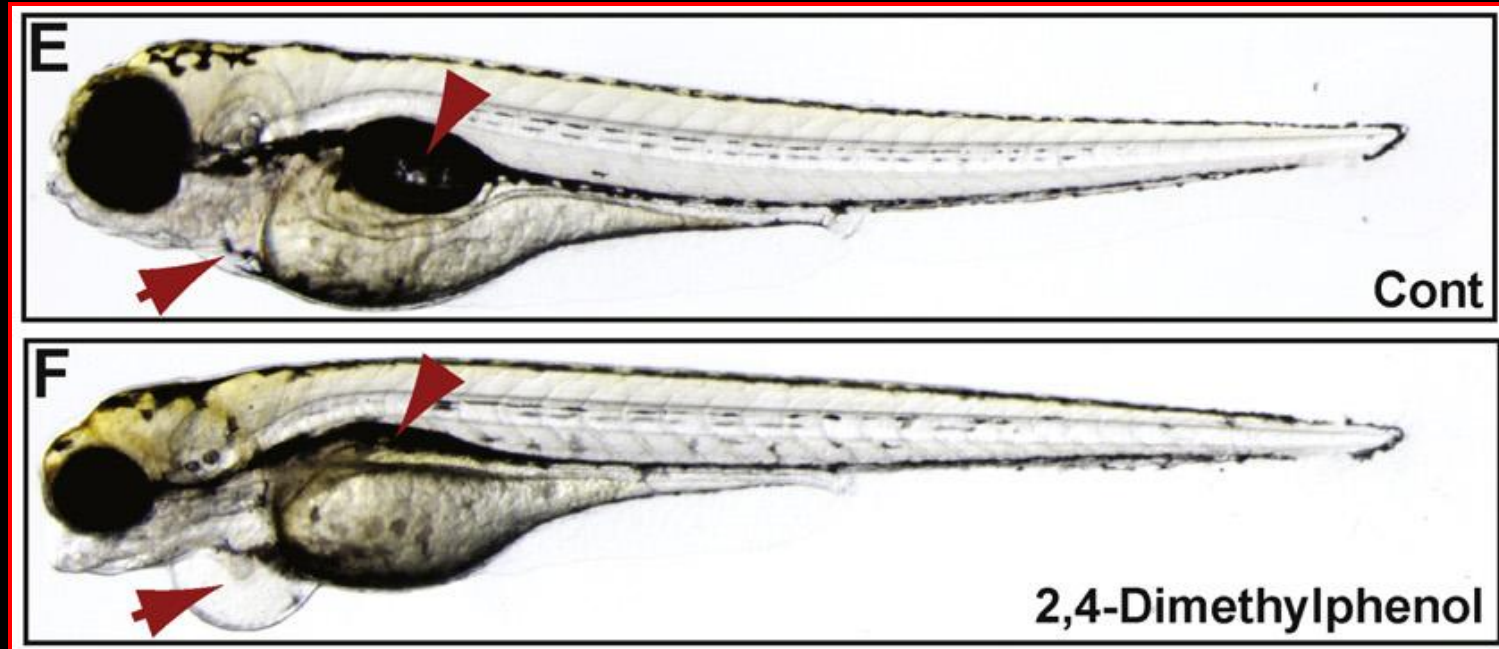
Questa metodica potrebbe essere introdotta anche in Italia ed utilizzata da EFSA, ISS, ISPRA, LSP ed IZS tramite apposita convenzione con il Laboratorio Zebrafish di Neuromorfologia della Facoltà di Medicina Veterinaria di Messina

La genetica ha permesso di comprendere la complessità dei processi che controllano lo sviluppo. Se applicata al campo della biotossicologia favorirà la spiegazione dei meccanismi molecolari che stanno a monte dei fenomeni tossici, in questo modo si avrà la possibilità di identificare molecole e geni suscettibili direttamente coinvolti nei processi genotossici e tale conoscenza potrebbe avere rilevanza anche in campo umano.

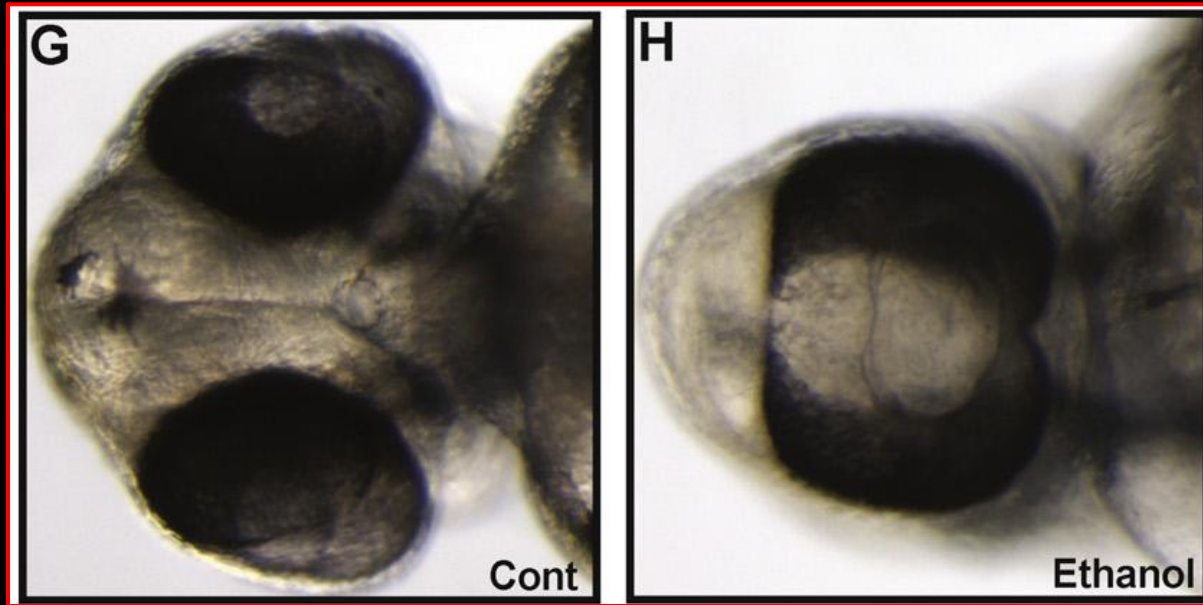
- Uno studio recente sull'esposizione di embrioni di zebrafish a sostanze tossiche a basso dosaggio ha messo in evidenza l'alterazione dell'espressione di centinaia di geni senza esprimere alcuna alterazione morfologica macroscopica o effetti comportamentali particolari

- Un altro obiettivo di questa analisi è l'identificazione di geni biosensori potenziali che rispondono alle biotossine. I biosensori possono indicare l'esposizione del pesce in ambienti contaminati e consentire un rapido screening

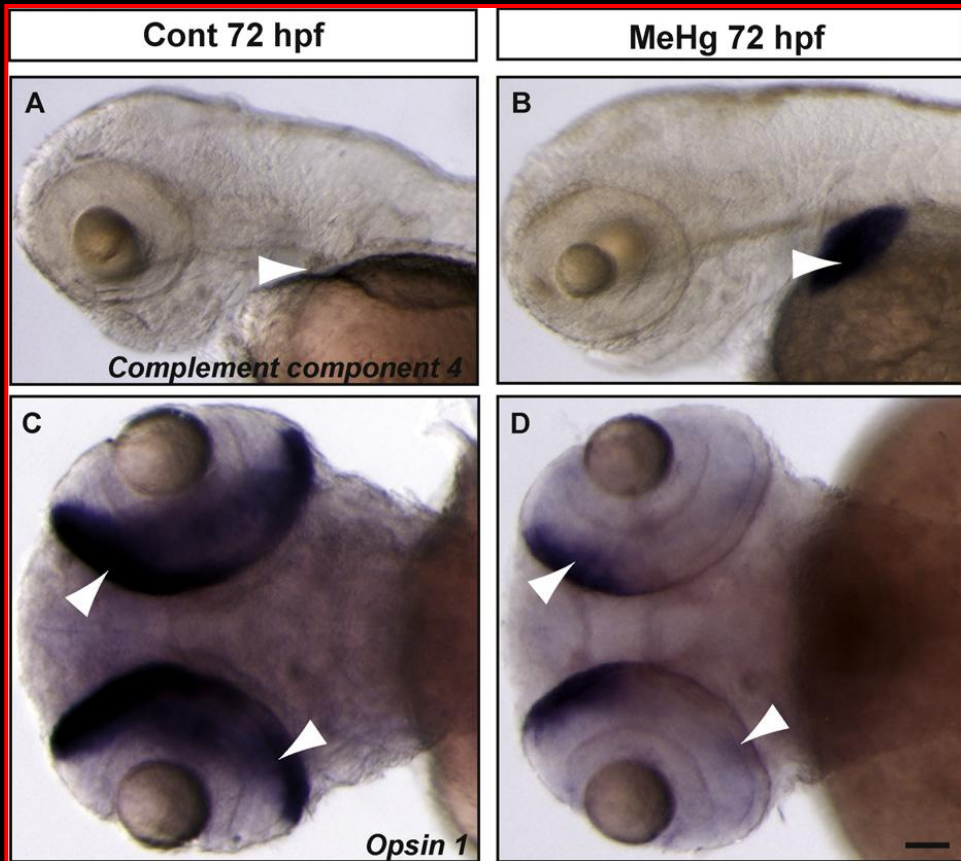
A**B****C****D**



Il 2,4-Dimetilfenolo (24-48 hpf) induce edema pericardico (freccia) e impedisce lo sviluppo della vescica natatoria (testa di freccia).



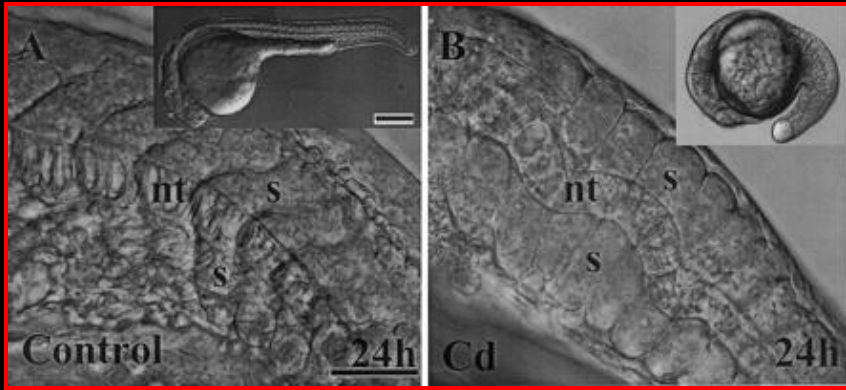
L'esposizione all'etanolo durante le prime fasi di sviluppo (4-48 hpf) induce malformazioni craniofaciali.



Esempi di risposta genica tessuto specifica in risposta al trattamento con metilmercurio.

Complement component 4 è up-regolato nel fegato (testa di freccia) in risposta al trattamento con MeHg.

Opsin1 è fortemente espresso nella retina del controllo (C, punte di freccia), mentre la sua espressione è limitata alla metà nasale della retina in embrioni trattati con MeHg (D, punte di freccia), suggerendo un ritardo nella differenziazione della retina.



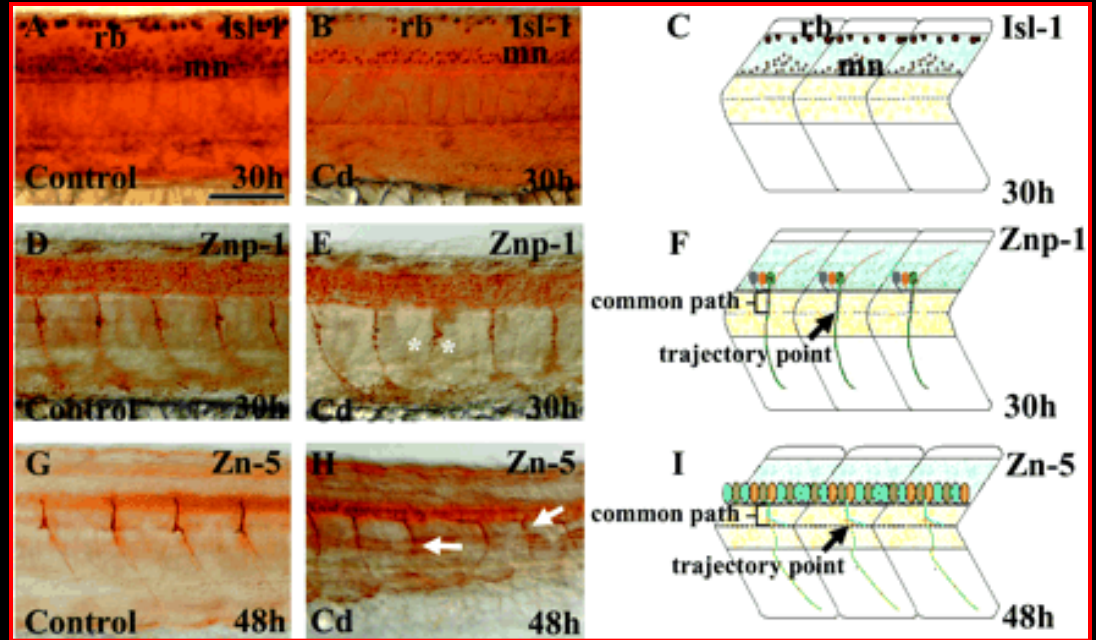
Embrioni 24 hpf

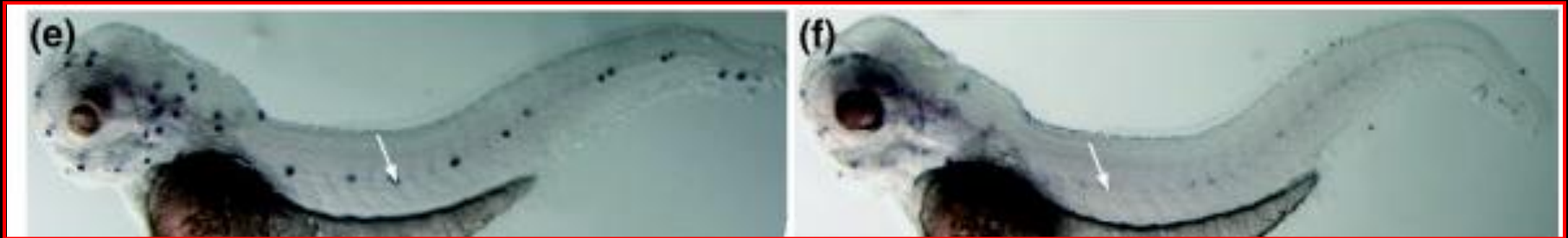
Notare nel soggetto esposto al cadmio le alterazioni a carico della notocorda e dei somiti .

Isl-1 motoneuroni primari

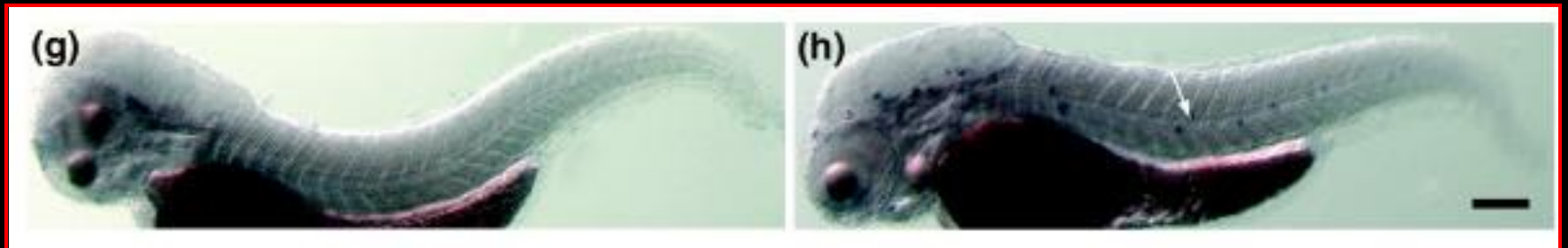
Znp-1 motoneuroni primari e loro assoni

Zn-5 motoneuroni secondari e loro assoni

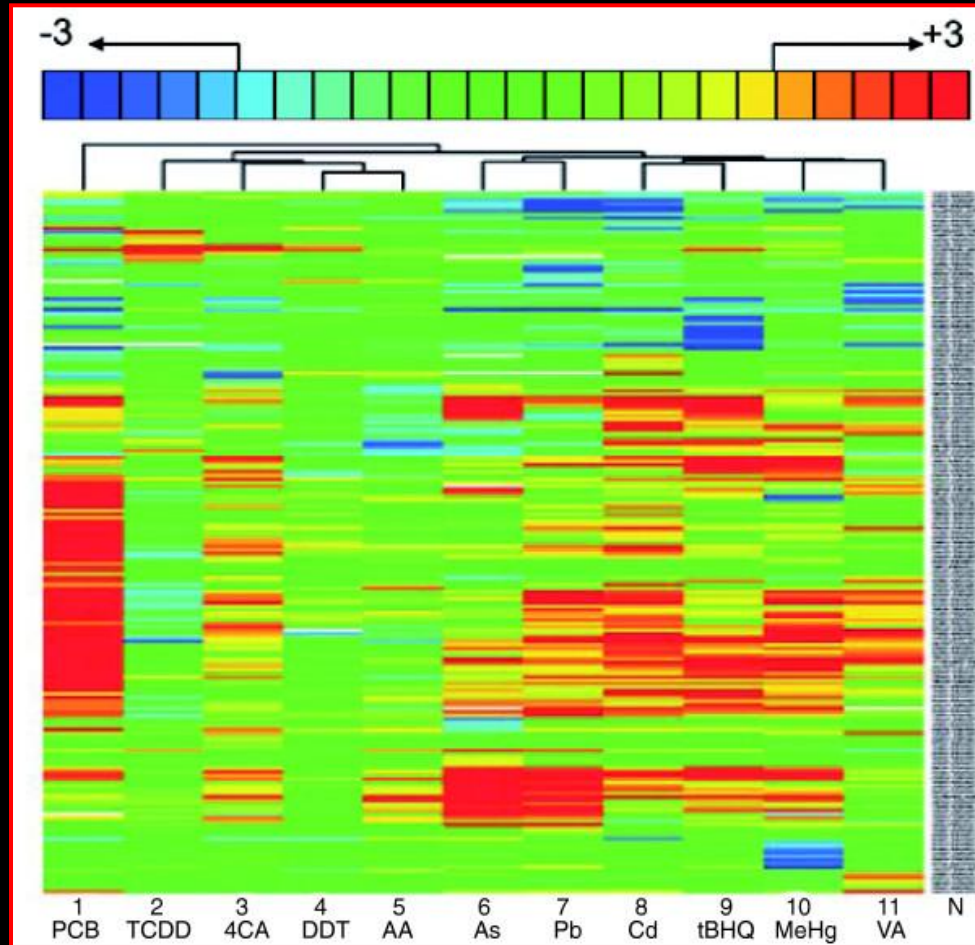




Down-regulation del gene dell'**Oncomodulina A**, espresso nelle hair-cell della linea laterale (freccie), indotta dall'esposizione al Cd.



Up-regulation del gene della **Thioredoxina** nelle hair-cell dei neuromasti (freccia), indotta dall'esposizione al Cd.



Cluster delle risposte geniche in embrioni trattati tra le 96 e 120 HPF. Le sostanze tossiche inducono profili tossicogenomici altamente specifici.

Toxicants	Gene ID	Gene name	Fold change	cycle numbers	Cont	Treat
TCDD	AI397347	Similarity to keratin type 1 (human)	-2.6	30		
	AF057713	Danio rerio cytochrome p 4501A	37.7	25		
DDT	BI533854	Weakly similar to c-type lectin	-2.1	25		
Cd	BE201681	Danio rerio Oncomodulin A	-4.4	25		
	AW174507	Danio rerio materix metalloproteinase 9	8.8	25		
	AF210640	Danio rerio HSP 70	8.2	20		
	AW305943	Danio rerio materix metalloproteinase 13	7.5	30		
Hg	BI864190	Similarity to thioredoxin	4.3	25		
	AW232474	Danio rerio glutathione peroxidase 1	-4.7	25		
	BI980610	Similarity to natural killer cell enhacning factor	3.9	25		
	BI864190	Similarity to thioredoxin	3.8	25		
	BG727181	unknown	3.2	30		
VA	AY050500	Danio rerio cone transducin alpha subunit	-2.4	25		
	AW422296	Similarity to transcription factor ATF-3	4.2	25		
4 CA	BI843145	unknown	-2.8	30		
	BI980610	Similarity to natural killer cell enhancin g factor	3.9	30		
As	BI864190	Similarity to thioredoxin	11.4	30		
Embryo medium	β -actin		ND	30		



Analisi con RT-PCR

Conclusioni



“L’uomo è ciò che mangia”

Il biomonitoraggio ambientale e sanitario delle acque attraverso la fauna ittica e lo studio degli effetti dei contaminanti ambientali attraverso amplificazione sullo Zebrafish rappresentano di sicuro una nuova frontiera per la ricerca scientifica a vantaggio della salute pubblica ed a tutela della sicurezza dei consumatori.



**Il biomonitoraggio ambientale e sanitario
delle acque attraverso la fauna ittica e
previsione delle patologie sullo Zebrafish**

Grazie per la cortese Attenzione