



**ISTITUTO ZOOPROFILATTICO SPERIMENTALE
DELLA LOMBARDIA E DELL'EMILIA ROMAGNA**

“BRUNO UBERTINI”

(ENTE SANITARIO DI DIRITTO PUBBLICO)

Sede Legale: Via Bianchi, 9 – 25124 Brescia

Tel 03022901 – Fax 0302425251 – Email info@izsler.it

C.F. - P.IVA 00284840170

N. REA CCIAA di Brescia 88834

RELAZIONE FINALE PROGETTO DI RICERCA CORRENTE PRC 2018001

Lo zebrafish come metodo alternativo per studi tossicologici e messa a punto di un protocollo di crioconservazione embrionale

Responsabile scientifico del progetto: Silvia Dotti

Telefono 030/2290248 Fax 030/2290392

E-mail: silvia.dotti@izsler.it

Ente di appartenenza dell'Unità Operativa Coordinatrice:

Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia Romagna

Data di inizio del progetto: 18/12/2018

Data di fine del progetto: 17/05/2021

Ricerca finanziata dal Ministero della Salute, Dipartimento della Sanità Pubblica Veterinaria, della Sicurezza Alimentare e degli Organi Collegiali per la Tutela della Salute

Data di stampa della relazione: 11 maggio 2021

INDICE GENERALE ED ELENCO DEGLI ALLEGATI

1. ELENCO DEI COLLABORATORI	3
2. RELAZIONE FINALE.....	3
2.1 SINTESI	3
2.2 SUMMARY	4
2.3 INTRODUZIONE	5
2.4 MATERIALI E METODI	8
2.4.1 <i>Produzione e raccolta delle uova.....</i>	8
2.4.2 <i>Screening endocrine disruptors</i>	8
2.4.3 <i>Crioconservazione</i>	10
2.4.4 <i>Valutazione della tossicità acuta di tossine botuliniche tramite FET test.....</i>	13
2.5 RISULTATI.....	15
2.5.1 <i>Screening endocrine disruptors</i>	15
2.5.2 <i>Crioconservazione</i>	17
2.5.3 <i>Valutazione della tossicità acuta di tossine botuliniche tramite FET test.....</i>	18
2.6 DISCUSSIONE E CONCLUSIONI.....	19
2.6.1 <i>Screening endocrine disruptors</i>	19
2.6.2 <i>Crioconservazione</i>	20
2.6.3 <i>Valutazione della tossicità acuta di tossine botuliniche tramite FET test.....</i>	21
2.7 BIBLIOGRAFIA	22
3. DIVULGAZIONE DEI RISULTATI.....	24
4. ALLEGATI.....	25

1. ELENCO DEI COLLABORATORI

Nome	UO	Ruolo
Silvia Dotti	1	Dirigente veterinario; responsabile scientifico
Erika Molica Colella	1	Borsista veterinario, attività di ricerca
Maria Sampieri	1	Borsista biologo, attività di ricerca
Manuela Vassalini	1	Tecnico di Laboratorio

2. RELAZIONE FINALE

2.1 SINTESI

Negli ultimi anni è notevolmente aumentato l'utilizzo dell'embrione di zebrafish (*Danio rerio*) come modello sperimentale. La scelta è dettata da molteplici caratteristiche: analisi su organismo *in toto*, rapidità di sviluppo, elevata fecondità e dimensioni e trasparenza degli embrioni. Inoltre, il pesce zebra rappresenta un'ottima alternativa rispetto all'utilizzo di vertebrati a maggiore sviluppo neurologico e le sopracitate proprietà lo rendono un valido modello per studi di *screening*, in particolare in tossicologia, ambito nel quale è già ampiamente utilizzato.

Gli scopi del presente progetto erano i seguenti:

1. Indagare le potenzialità offerte da metodiche alternative per lo studio di *disruptors* endocrini che agiscono sulla tiroide
2. Applicare e ampliare le conoscenze attualmente disponibili nell'ambito della crioconservazione di embrioni di zebrafish.
3. Determinare la capacità del FET test nel valutare la tossicità della tossina A prodotta dal microrganismo *Cl. botulinum*.

Il primo punto indagato è stato quello correlato alla potenziale azione interferente degli *endocrine disruptors* con il sistema endocrino. Tra queste molecole vi sono molteplici contaminanti ambientali che agiscono sulla tiroide con meccanismi riproducibili nell'embrione di zebrafish. Numerose evidenze scientifiche supportano la sensibilità di questo sistema biologico a tossine di origine batterica. A tale proposito, è stata indagata la messa a punto di due sistemi *in vitro*, utilizzo di embrioni di zebrafish e una coltura cellulare ingegnerizzata sottoposta ad analisi mediante luminometria. Inoltre, il diffuso utilizzo di questo modello animale nella ricerca scientifica rende necessario lo sviluppo di metodiche finalizzate a conservare e preservarne gli embrioni, problema ad oggi tuttora irrisolto: attualmente le metodiche disponibili per alcune specie acquatiche sono il congelamento a bassa velocità e la vitrificazione con soluzioni altamente concentrate di agenti crioprotettori.

La conservazione refrigerata di embrioni di pesce può risultare una tecnica interessante in campo scientifico, con il fine di sincronizzare lo sviluppo embrionale in base alle esigenze pratiche di laboratorio. La disponibilità di embrioni crioconservati avrebbe, quindi, un impatto importante non solo sulla preservazione di linee geneticamente modificate, ma anche su possibili scambi commerciali.

Da ultimo, in accordo con le linee guide OECD 236 (2013) per la valutazione della tossicità di sostanze su embrioni di zebrafish, è stata provata la fattibilità di valutare la LC₅₀ della tossina A prodotta dal *Clostridium botulinum*.

Pertanto, l'ottimizzazione di un protocollo volto alla preservazione degli embrioni di zebrafish e la valutazione degli effetti sia delle tossine batteriche sia di interferenti endocrini mediante embrioni di zebrafish e la linea cellulare PathHunter® CHO-K1 TRHR β-Arrestin, che esprime stabilmente il TRHR, hanno lo scopo di implementare le informazioni disponibili relative a questo modello

sperimentale. Tali metodiche hanno, potenzialmente, numerose applicazioni soprattutto in campo eco-tossicologico, dove l'esigenza sia economica che etico-scientifica richiede la riduzione dell'impiego di animali da laboratorio. L'utilizzo di embrioni di pesce rappresenta, quindi, un'alternativa eticamente, oltre che legalmente, accettata rispetto all'impiego di vertebrati che provano maggior dolore, sofferenza o danno prolungato.

2.2 SUMMARY

In recent years, the use of the zebrafish embryo (*Danio rerio*) as an experimental model has greatly improved. The choice is dictated by multiple characteristics of this animal: analysis of the whole organism, rapidity of development, high fertility and size and also transparency of the embryos. Furthermore, the zebrafish represents an excellent alternative to the use of greater neurological development vertebrates and in fact the aforementioned properties make zebrafish a valid model for screening studies, in particular in toxicology, an area in which it is already widely used.

The aims of this project were the following:

- 1 Investigate the potential offered by alternative methods for the study of endocrine disruptors the act on the thyroid
- 2 Apply and delve the knowledge currently available in the cryopreservation of zebrafish embryos
- 3 Determine the ability of the FET test to assess the toxicity of toxin A produced by *Cl. Botulinum*.

The first point investigated was that related to the potential interfering action of endocrine disruptors with the endocrine system. Among these molecules there are multiple environmental contaminants that act on the thyroid with reproducible mechanisms in the zebrafish embryo. Numerous scientific evidences support the sensitivity of this biological system to toxins of bacterial origin. In this regard, the development of two in vitro systems was investigated, the use of zebrafish embryos and an engineered cell culture subjected to analysis by luminometry, respectively.

Multiple scientific evidence supports the sensitivity of zebrafish embryos to toxins of bacterial origin. In accordance with the guidelines provided by the OECD 236 (2013) for the evaluation of the toxicity of substances on zebrafish embryos, the LC₅₀ of the toxin A produced by *Clostridium botulinum* was determined.

Another development area concerning *Danio rerio* is that of the so-called endocrine disruptors, substances that carry out their toxic action by interfering with the endocrine systems. Among these molecules there are multiple environmental contaminants that act on the thyroid with reproducible potentials in the zebrafish embryo.

Furthermore, the widespread use of this animal model in scientific research makes it necessary to develop methods aimed at conserving and preserving the embryos, a problem still unsolved today: currently, the methods available for some aquatic species are freezing at low speed and vitrification with highly concentrated solutions of cryoprotective agents.

The refrigerated storage of fish embryos can be an interesting technique in the scientific field, with the aim of synchronizing embryonic development according to the practical needs of the laboratory. The availability of cryopreserved embryos would therefore have an important impact not only on the preservation of genetically modified lines, but also on possible commercial exchanges.

The optimization of a protocol aimed at the conservation of zebrafish embryos and the evaluation of the effects of both bacterial toxins and endocrine disruptors using zebrafish embryos and the PathHunter® CHO-K1 TRHR β-Arrestin, which stably expresses TRHR aim to implement the available information related to this experimental model. These methods have potentially several applications, especially in the eco-toxicological field, where both economic and ethical-scientific requirements state the reduction of the use of laboratory animals. The use of fish embryos therefore represents an ethically, as well as legally, accepted alternative to the use of vertebrates that experience greater pain, suffering or prolonged damage.

2.3 INTRODUZIONE

In base al Decreto Legislativo n. 26 del 4 marzo 2014 sulla protezione degli animali utilizzati a fini scientifici, gli stadi larvali di zebrafish non rientrano in quadri normativi riguardanti la sperimentazione animale. In accordo al principio delle 3Rs (*Replacement, Reduction, Refinement*), infatti, gli embrioni/larve di pesce sono considerati come metodi di sostituzione o di perfezionamento, poiché a questo stadio di sviluppo l'animale fino al quinto giorno post fecondazione non è in grado di alimentarsi in modo autonomo, inoltre prova minor dolore, sofferenza o danno prolungato rispetto a vertebrati più sviluppati. La rapidità di sviluppo, l'elevato numero di uova deposte per evento riproduttivo e la trasparenza degli embrioni, permettono una facile manipolazione dello zebrafish. Inoltre, la scelta dell'embrione del pesce zebra come modello sperimentale è dettata non solo dalle implicazioni normative, ma anche da molteplici e vantaggiose caratteristiche, quali la possibilità di analisi su organismo *in toto*, rapidità di sviluppo, elevata fecondità della specie, dimensioni e trasparenza degli embrioni; tutte proprietà che lo rendono un valido modello animale per studi di *screening* e lo caratterizzano come particolarmente vantaggioso in relazione alle necessità e ai costi di gestione.

Nello specifico, il principale ambito di ricerca che impiega i pesci come modello sperimentale è la tossicologia e si basa sulle somiglianze che questi animali condividono con i mammiferi in processi quali la risposta metabolica a tossine ambientali.

Nel presente progetto sono state sviluppate metodiche che utilizzano l'embrione di zebrafish come modello sperimentale al fine di studiare differenti processi inerenti:

- Possibilità di crioconservazione degli embrioni
- Studio delle possibili alterazione da *endocrine disruptors*
- Applicazione del modello per la valutazione di tossina botulinica

La refrigerazione di embrioni di pesce ha attirato di recente l'attenzione della comunità scientifica, in quanto procedura utile ad arrestare lo sviluppo e conservare gli embrioni in una specifica fase di differenziamento per periodi di tempo prolungati. Ad oggi, infatti, lo sviluppo di nuove metodologie finalizzate alla conservazione degli embrioni resta un problema irrisolto.

Pertanto, non ritrovando in letteratura un unico protocollo funzionale ed efficace per la conservazione refrigerata di embrioni di pesce zebra mirato a preservarne struttura, funzionalità e morfologia, l'individuazione di una procedura pratica utilizzabile in differenti laboratori potrebbe allargare nuovi orizzonti nel contesto conoscitivo e condiviso tra diverse realtà di laboratorio.

Inoltre, la disponibilità di embrioni conservati costituirebbe un valore aggiunto per la comunità scientifica e potrebbe avere un impatto importante non solo sulla conservazione delle linee geneticamente modificate, ma anche sul commercio.

Per tale ragione, nel presente studio si è voluto identificare la temperatura ideale per arrestare lo sviluppo dell'embrione, indagare l'agente crioprotettore più adatto ed efficace, infine il miglior periodo di incubazione refrigerata, con il fine di determinare un protocollo adeguato alla conservazione ottimale degli embrioni di pesce zebra.

A tale scopo sono state effettuate delle prove con due differenti soluzioni di conservazione per andare a verificare la capacità del *Danio rerio* nel mantenimento di determinate caratteristiche di vitalità embrionale post incubazione refrigerata. Gli embrioni sono stati esposti a tre condizioni diverse, che corrispondono a tre differenti sostanze quali: Embryo Medium, utilizzato come controllo negativo, Metanolo (MeOH) e Dimetilsolfossido (DMSO), entrambi utilizzati come soluzioni di conservazione per preservare la struttura e la vitalità embrionale.

In parallelo, è stato poi approfondito lo studio degli endocrine *disruptors*, sostanze che esplicano la loro azione tossica sui sistemi endocrini, con particolare *focus* sulla ghiandola tiroidea di embrioni di zebrafish e su un sistema basato sulla luminometria.

Le conoscenze ad oggi disponibili sui *disruptors* endocrini hanno evidenziato come molti contaminanti ambientali agiscano sulla tiroide, causando un'alterazione nella secrezione degli ormoni tiroidei negli esseri umani e negli animali, con una conseguente ripercussione sull'intero metabolismo.

L'azione potenzialmente patogena svolta da queste sostanze è stata oggetto di valutazione mediante due metodiche *in vitro*, una che ha utilizzato la chemiluminescenza e l'altra il sistema embrione zebrafish.

La prima ha previsto l'impiego di una cultura cellulare ingegnerizzata PathHunter® CHO-K1 TRHR β -Arrestin. La stessa è progettata per esprimere stabilmente il TRHR accoppiato a GPCR-PK e la proteina di fusione β -Arrestina accoppiata a β -gal. A seguito del legame TRHR-ligando, GPCR-PK viene attivato inducendo il reclutamento di β -Arrestina- β -gal che va a legarsi al complesso GPCR-PK. Questo forza la complementazione dei due frammenti enzimatici PK e β -gal con conseguente formazione di un enzima β -galattosidasi attivo. Questa azione porta ad un aumento dell'attività enzimatica che può essere misurata usando la chemiluminescenza. L'attività del recettore per il TRH è stata valutata testando due sostanze agoniste del recettore, TRH e Taltirelina, e due sostanze antagoniste, Midazolam e Clordiazepossido.

La seconda metodica ha previsto l'impiego del sistema zebrafish. Nello specifico, dalla similarità di origine e sviluppo della ghiandola tiroidea tra lo zebrafish e i vertebrati superiori deriva la possibilità di sviluppare metodi alternativi che utilizzino meccanismi potenzialmente riproducibili nell'embrione di zebrafish. Queste particolari sostanze, infatti, vanno ad interferire con i sistemi endocrini sia dal punto di vista morfologico sia funzionale. Tra di esse, vi sono contaminanti ambientali che interferiscono con la funzionalità della tiroide mediante meccanismi potenzialmente riproducibili nell'embrione di zebrafish. Pertanto, sfruttando questa caratteristica è stato allestito un metodo che utilizza tale sistema per la valutazione di potenziali interferenti tiroidei umani. Gli embrioni di zebrafish sono stati esposti a tre diverse sostanze di interesse quali: Metimazolo (MMI), Potassio perclorato (KClO₄) e Linurone (Lin) e ai rispettivi controlli (è stata scelta l'acqua del sistema dell'acquario come controllo negativo e, come controllo del solvente, acqua e Dimetilsolfossido (H₂O+DMSO)). A seguito dell'esposizione alle sostanze per un periodo di 66 ore, sono state eseguite prove di immunofluorescenza sulle larve. L'analisi è stata eseguita utilizzando un anticorpo primario anti-tiroxina e un anticorpo secondario fluorescente. Successivamente, i soggetti sono stati analizzati mediante microscopia volta all'acquisizione di immagini della regione ventrale delle larve per poter visualizzare l'eventuale presenza dei follicoli tiroidei post esposizione alle sostanze di interesse.

Infine, è stato misurato l'impatto di sostanze potenzialmente tossiche sugli embrioni mediante un saggio di tossicità acuta (FET test), in accordo con le linee guida OECD 236 per la valutazione di tossine batteriche. Nello specifico, si è messo a punto un protocollo sperimentale per la valutazione degli effetti delle tossine batteriche prodotte dal microrganismo patogeno *Cl. botulinum*. Questo batterio è particolarmente pericoloso per la salute umana ed animale e oggetto di indagini diagnostiche degli alimenti; le stesse, si basano sull'inoculo in cavità peritoneale di topo del campione sospetto. La prova ha come *endpoint* la morte del soggetto in caso di positività (*mouse test*).

Il microrganismo è un batterio anaerobio, gram-positivo e sporigeno che possiamo trovare sulle piante, nell'acqua e nel tratto intestinale di molti animali. Negli anni, sono stati identificati diversi ceppi di *Cl. botulinum* produttori di 8 distinti sierotipi (tipo A-H). Essi sono formati dalla tossina botulinica vera e propria, un polipeptide a catena doppia di 150 kDa, e da proteine complessanti (NAPs) ad essa legate. La ricerca in questione si è focalizzata sullo studio della tossicità acuta della neurotossina botulinica di tipo A. Quest'ultima è una delle tossine botuliniche, insieme a quelle di tipo B ed E, che riveste maggior importanza nella patologia umana. I protocolli oggi in uso per la valutazione della presenza di tossina botulinica, come sopra brevemente descritto, prevedono la prova biologica sul topo "mouse test". In accordo con il principio delle 3Rs, si è pensato di utilizzare il FET (Fish Embryo Acute Toxicity) test come metodica alternativa alla prova *in vivo*.

In conclusione, lo scopo di questo progetto è così riassumibile:

1. Indagare le potenzialità offerte da metodiche alternative per lo studio di *disruptors* endocrini che agiscono sulla tiroide
2. Applicare e ampliare le conoscenze attualmente disponibili nell'ambito della crioconservazione di embrioni di zebrafish.
3. Determinare la capacità del FET test nel valutare la tossicità della tossina A prodotta dal microrganismo *Cl. botulinum*.

2.4 MATERIALI E METODI

2.4.1 Produzione e raccolta delle uova

Ai fini della produzione delle uova sono state utilizzate apposite vasche di accoppiamento dotate di fondo grigliato e separatore. Lo zebrafish ha un fotoperiodo ottimale di 14 ore di luce e 10 di buio e inizia il corteggiamento alle prime luci del giorno in cui viene effettuato il test. Il giorno precedente a quello del test gli animali riproduttori sono stati introdotti nelle apposite vasche, tenendo maschi e femmine divisi con separatore dedicato. Il giorno stabilito per l'esecuzione del test, al mattino, è stata rimossa la barriera divisoria per consentire agli animali di iniziare il rituale di corteggiamento e la successiva deposizione delle uova. Trascorsi 40 minuti sono state raccolte le uova.

Occasionalmente alcuni pesci potrebbero non produrre uova o deporre un numero esiguo, pertanto sono state utilizzate in parallelo almeno 3 vasche, con un rapporto maschi/femmine di 2:1, al fine di garantire un congruo numero di embrioni da impiegare nei test.

2.4.2 Screening endocrine disruptors

Per la valutazione degli endocrine *disruptors*, l'attività della ghiandola tiroidea è stata esaminata *in vitro*.

Come descritto nell'introduzione, si è previsto di utilizzare due metodiche per la valutazione delle sostanze con attività potenzialmente interferente con la tiroide:

- a. Coltura cellulare ingegnerizzata
- b. Embrioni di zebrafish

Valutazione dell'attività del recettore TRH. Per la valutazione dell'attività del recettore TRH è stato allestito un saggio con le sostanze agoniste e uno con le sostanze antagoniste. I composti sono stati precedentemente preparati alla concentrazione di 100 nM nel loro solvente appropriato; nello specifico TRH in metanolo, Taltirelina in etanolo e Midazolam e Clordiazepossido in DMSO.

Per il saggio dei composti agonisti, la linea cellulare PathHunter® CHO-K1 TRHR β -Arrestin è stata seminata in piastra da 96 well; è stata preparata una curva di diluizioni seriali 1:3 di TRH e Taltirelina, partendo da una concentrazione rispettivamente di 33 μ M e 330 μ M. Gli agonisti così preparati sono stati distribuiti in triplicato nella piastra e lasciata 90 minuti a 37 ° C e al 5% di CO₂.

Per il saggio dei composti antagonisti invece le curve di diluizioni seriali 1:3 di Midazolam e Clordiazepossido sono state preparate partendo da una concentrazione di 660 μ M. Gli antagonisti così preparati sono stati distribuiti in triplicato nella piastra e lasciata 30 minuti a 37°C e al 5% di CO₂; successivamente, è stato aggiunto l'agonista TRH alla concentrazione di 10 nM e la piastra lasciata 90 minuti a 37°C e al 5% di CO₂.

Per entrambi i saggi, al termine dei 90 minuti di incubazione, è stata aggiunta la reazione di rilevamento e dopo un'ora è stata misurata la luminescenza al luminometro eseguendo 10 letture al secondo da 0,1 a 1 secondo/pozzetto.

Valutazione della tiroxina (*Thyroxine-Immunofluorescence Quantitative Disruption Test - TIQDT*). È stato eseguito un saggio che prevede l'esposizione di embrioni di zebrafish a contaminanti ambientali, così come viene descritto nelle linee guida OECD 236 FET test, a cui è seguito lo studio mediante analisi quantitativa a immunofluorescenza di valutazione della tiroxina (*Thyroxine-Immunofluorescence Quantitative Disruption Test - TIQDT*).

La funzionalità della ghiandola tiroidea è stata valutata andando a misurare il contenuto intrafollicolare di T4 (IT4C) in larve di zebrafish usando un saggio a immunofluorescenza chiamato TIQDT. A livello esecutivo è stata utilizzata un'intera piastra a 24 pozzetti, per un totale di 24 embrioni per ciascuna sostanza selezionata (MMI, KClO₄, Lin, H₂O e H₂O + DMSO): la prova così descritta è stata replicata 3 volte (per un totale di 360 embrioni analizzati con metodica TIQDT).

Nello specifico, a 24 ore dopo la fecondazione (hpf, *hours post-fertilization*) le uova sono state valutate mediante osservazione al microscopio per registrare i parametri di vitalità e scartare gli embrioni morti o non fecondati. Successivamente, a 54hpf sono stati selezionati solo gli zebrafish che fossero già fuoriusciti dal corion, in quanto il *timepoint* di 54hpf è considerato un parametro discriminatorio per la schiusa dell'embrione, che in questo preciso momento temporale dovrebbe essersi già verificata.

A seguire, il giorno stesso, gli embrioni schiusi sono stati incubati per 66 ore nelle diverse soluzioni nel numero di un embrione per pozzetto, contenente 2 ml di soluzione.

Sono state esaminate 3 sostanze che hanno diverse potenzialità di interferenza nota sullo sviluppo morfologico della tiroide, le quali erano state confermate mediante pregresse prove *in vivo* da letteratura:

- MMI: attività fortemente inibente la tiroide
- KClO₄: attività moderatamente inibente sulla tiroide
- Lin: nessuna attività di interferenza tiroidea

Come controllo negativo sono state utilizzate:

- H₂O
- H₂O + DMSO, quest'ultimo utilizzato per diluire le sostanze in esame

Trascorse le 66 ore di esposizione alle sostanze chimiche, a 120 ore post-fecondazione, gli embrioni di zebrafish sono stati raccolti e successivamente fissati e disidratati, per poi essere conservati in metanolo a -20°C fino al momento di utilizzo per la fase seguente del test (**Figura 1**).

In seguito allo scongelamento delle larve, la fase successiva di analisi ha previsto reidratazione in scala alcolica degli embrioni, i quali sono stati poi sottoposti a depigmentazione, quest'ultima seguita da due fasi di permeabilizzazione mediante collagenasi. I campioni così ottenuti sono stati esaminati mediante immunofluorescenza per la valutazione dell'ormone tiroideo T4 (tiroxina): dopo apposito trattamento per il blocco di legami non specifici, i campioni sono stati incubati con l'anticorpo primario anti-tiroxina ed in seguito con l'anticorpo secondario fluorescente. Infine, è stata effettuata l'acquisizione delle immagini al microscopio a fluorescenza e relative analisi di intensità tramite il *software* apposito Image J[®] (immagini in allegato che mostrano i follicoli tiroidei di tre diverse larve analizzate: **Figura 2, 3, 4, 5, 6**).

2.4.3 Crioconservazione

Il protocollo che si è studiato e sviluppato, prende spunto principalmente dal lavoro di Desai e colleghi (Desai et al., 2014), e, nonostante non vi siano numerosi studi sulla refrigerazione dell'embrione di zebrafish *in toto*, è stato possibile individuare un possibile protocollo funzionale allo scopo ipotizzato.

Diverse e numerose variabili entrano in gioco nell'identificazione di un protocollo di raffreddamento per embrioni di pesce zebra:

1. Lo stadio di sviluppo dell'embrione, estremamente importante per la sua corretta conservazione;
2. La finestra temporale di esposizione alle soluzioni;
3. La temperatura di conservazione, la quale può essere fissa per tutto il periodo di incubazione o al contrario decrescere in maniera più o meno costante;

4. Il trattamento post-esposizione refrigerata;
5. L'ulteriore possibile aggiunta di saccarosio alle soluzioni;
6. La soluzione di conservazione (in questo lavoro definita anche come agente crioprotettore).

Al fine di impostare il protocollo sperimentale si è deciso di partire sulla base di quanto riportato in letteratura e di modificare il documento di volta in volta, adeguando i test sulla base dei risultati ottenuti dalle prove precedenti. I valori riportati di seguito sono i parametri che sono stati selezionati dopo aver consultato la bibliografia riportata nel presente documento:

- Fase di sviluppo dell'embrione utilizzata: 24 ore dopo la fecondazione
- Agenti crioprotettori selezionati: DMSO e MeOH
- Intervallo di concentrazione delle soluzioni impiegato: 1 - 0,025M
- Controllo negativo: Embryo Medium
- Saccarosio: sì, utilizzato dal secondo esperimento in avanti
- Tempo di esposizione: 24 ore di raffreddamento; verificata la vitalità embrionale a 24 ore e 96 ore post-trattamento
- Temperatura di esposizione: $+ 4^{\circ}\text{C}\pm 1$
- Sopravvivenza post-raffreddamento, tassi di deformità e possibili malformazioni strutturali: registrati.

In totale sono state effettuate 5 prove di crioconservazione utilizzando embrioni allo stadio di sviluppo di 27 hpf (non conteggiando la prova preliminare).

Come esperimento preliminare, era anzitutto necessario capire se utilizzare embrioni provvisti di corion o decorionati. In questa prova la vitalità degli embrioni di zebrafish è stata valutata in Dimetilsolfossido (DMSO) e metanolo (MeOH) entrambi a una concentrazione di 1M, mentre come controllo negativo è stato selezionato l'*Embryo Medium* (EM).

A tale proposito, 24 embrioni per ciascuna condizione (DMSO, MeOH e EM) sono stati decorionati con Pronasi a una concentrazione di 50 mg/mL. In seguito, le uova sono state incubate nella numerosità di un embrione per pozzetto, quest'ultimo contenente 2 ml di soluzione. Gli embrioni utilizzati con il corion sono stati 72 ed altrettanti trattati con Pronasi al fine di rimuoverlo, per un totale, quindi, di 144 embrioni utilizzati per l'esperimento preliminare.

Successivamente, le piastre sono state incubate per 24 ore a una temperatura di $4^{\circ}\text{C}\pm 1$. Trascorse le 24 ore di refrigerazione, le piastre sono state portate a temperatura ambiente e sono stati trasferiti gli

embrioni in nuove piastre con EM fresco, per poi riportare queste ultime alla temperatura di sviluppo ottimale di $28^{\circ}\text{C} \pm 1$ per tutta la durata del test.

In due momenti chiave (a 24 ore post-trattamento -hpt- e a 96 hpt) le uova sono state controllate visivamente al microscopio per valutare qualsiasi segno di malformazione o anomalia nello sviluppo post-raffreddamento.

Le osservazioni al microscopio sono state effettuate 24 ore dopo l'incubazione con l'obiettivo di monitorare lo sviluppo dell'embrione e per registrarne la vitalità. Gli embrioni sono stati analizzati al microscopio ottico a tempi stabiliti per verificare la presenza degli indicatori di letalità embrionali (come da FET test OECD 236: coagulazione embrionale, mancata formazione somiti, mancata distacco della coda dal sacco vitellino e assenza battito cardiaco).

Inoltre, è stato fatto un secondo controllo a 96 ore dall'incubazione: si è infatti tenuto conto per quanto riguarda i risultati ottenuti, dalle sole osservazioni effettuate 96 hpt per due ragioni sostanziali:

1. La lettura delle piastre 24 ore dopo il trattamento ha mostrato nella maggior parte dei casi un corretto e fisiologico sviluppo del pesce zebra. Pertanto, ai fini di un'analisi approfondita per valutare se lo sviluppo dell'animale fosse realmente avvenuto correttamente, si è scelto di considerare come scientificamente valido ed efficiente il risultato registrato a 96 hpt.
2. Inoltre, per lo scambio di materiale interlaboratorio con l'obiettivo ultimo di rendere disponibili risorse da utilizzare nella ricerca scientifica, ma anche in un'ottica di possibili scambi commerciali, si è scelto di valutare e prendere in considerazione il parametro più lontano dal trattamento (in questo caso, il raffreddamento) e cioè l'osservazione a 96 ore. Immaginando un possibile trasporto a lungo raggio dove l'embrione verrebbe trasportato al freddo -finestra temporale nel quale lo sviluppo dell'animale è interrotto- si è andati a verificare sia se l'embrione potesse tollerare lunghi periodi di raffreddamento sia se variasse l'andamento dello sviluppo con il passare del tempo fino a 120 hpf, che corrisponde alle 96 hpt.

Per quanto riguarda gli embrioni decorionati, dopo i risultati ottenuti dalla prova preliminare, a 96hpt è stata osservata un'elevata mortalità per tutte le condizioni, registrando un solo animale vivo nell'intera prova. Inoltre, anche per gli embrioni provvisti di corion la mortalità era piuttosto elevata.

Pertanto, dopo aver preso visione dei risultati ottenuti dalla prova preliminare, si è proceduto a modificare le condizioni sperimentali della prova successiva (Test 1) nel seguente modo.

Test 1: Si è scelto di utilizzare da quel momento in avanti solo embrioni di zebrafish con corion. Inoltre, le concentrazioni delle sostanze utilizzate sono state modificate riducendole di dieci volte, come si legge di seguito:

- Metanolo 0,1M
- DMSO 0,1M
- Embryo Medium

E' stata poi ripetuta l'incubazione con le medesime modalità e fasi consequenziali dell'esperimento preliminare.

Test 2: A seguire, prendendo spunto dalla letteratura indicata nel presente documento e tenendo conto dei risultati ottenuti dal Test 1, abbiamo deciso di utilizzare il saccarosio alla concentrazione di 0,1M in aggiunta alle soluzioni, mantenute alla concentrazione 0,1M. Il saccarosio, difatti, è ampiamente usato come crioprotettore extracellulare e gli zuccheri vengono spesso aggiunti ai terreni crioprotettivi in combinazione con gli agenti crioprotettori intracellulari perché svolgono un'azione protettiva attraverso la disidratazione osmotica delle cellule in quanto previene la formazione di cristalli di ghiaccio all'interno dell'organismo.

Test 3: In questa prova si è dimezzata la concentrazione delle soluzioni conservanti (da 0,1 a 0,05M), lasciando al contrario invariata quella del saccarosio (0,1M).

Test 4: Dai risultati ottenuti si è deciso di mantenere la concentrazione di agenti crioprotettori invariata a 0,05M e di aumentare quella di saccarosio a 0,2 molare.

Test 5: In ultimo, si è scelto di dimezzare la concentrazione delle soluzioni di conservazione a 0,025M e lasciare invariata quella di saccarosio a 0,2 molare.

2.4.4 *Valutazione della tossicità acuta di tossine botuliniche tramite FET test*

Una coltura di ceppo liofilizzato di *Clostridium botulinum* produttore di tossina A conservato nella Biobanca dell'IZSLER, è stata fatta crescere nel terreno di arricchimento Triptone Peptone Glucose Yeast extract broth (TPGY) tamponato seguendo le linee guida previste dal metodo di prova di origine interna di IZSLER. Come previsto dal FET test, la brodocoltura contenente la tossina botulinica, è stata diluita 5 volte serialmente con fattore di diluizione 2.

La tossicità acuta della tossina botulinica è stata valutata adattando le linee guida OECD 236 FET test alle esigenze specifiche del disegno sperimentale. Il protocollo consiste nell'esposizione di embrioni di zebrafish alla sostanza oggetto di ricerca e la successiva valutazione della sua tossicità considerando 4 criteri di letalità:

- Coagulazione delle uova fecondate
- Mancanza di formazione dei somiti
- Mancato distacco della coda dal sacco vitellino
- Assenza del battito cardiaco

Dopo 24 ore dalla fecondazione delle uova, sono state eliminate le uova non vitali, mentre quelle vive sono state trasferite in una nuova Petri con acqua filtrata, per un totale di circa 250 uova.

Seguendo lo schema in **Figura 1**, sono stati aggiunti 2 ml della soluzione corrispondente nei pozzetti di ogni piastra. Si è iniziato aggiungendo le 5 diluizioni della tossina botulinica in cinque piastre differenti, escludendo in ciascuna piastra l'ultima fila di pozzetti, adibita al controllo interno della piastra.

L'acqua utilizzata per diluire la brodocoltura è stata aggiunta nei pozzetti corrispondenti al controllo negativo e al controllo interno.

Successivamente, è stata allestita la piastra del controllo positivo, con l'aggiunta della 3,4-dicloroanilina ad una concentrazione di 4 mg/L, che è tossica per lo zebrafish così come dimostrato dalle linee guida del FET test.

In un'ulteriore piastra è stato aggiunto il controllo del terreno colturale utilizzato per far crescere il microorganismo di interesse, al fine di escludere la possibilità di effetti tossici della brodocoltura sugli embrioni di zebrafish.

Per le diluizioni, per i controlli interni delle piastre, per il controllo negativo e come solvente per la 3,4-dicloroanilina è stata utilizzata l'acqua del sistema delle vasche degli zebrafish. Questa è l'acqua che circola nell'acquario prodotta a partire da acqua demineralizzata e addizionata di soluzioni tampone fino al raggiungimento dei parametri di pH e conducibilità impostati dall'operatore.

Nello specifico, utilizzando una micro-pipetta ed un puntale con la punta leggermente tagliata, perché non si danneggiasse l'embrione prelevato, si è posizionato un embrione in ogni pozzetto. L'embrione doveva risultare totalmente sommerso dalla soluzione per escludere la possibilità di essiccamento dell'embrione e la sua morte. Conclusa questa fase, le piastre sono state incubate a 28°C per 96 ore. A distanza di 24 ore, le piastre sono state osservate al microscopio ottico e si sono registrati eventuali criteri di letalità.

Al termine del periodo di esposizione la tossicità acuta è stata determinata sulla base di un risultato positivo per ognuna delle osservazioni registrate e calcolata poi la LC₅₀ (concentrazione alla quale si osserva una letalità del 50% dei soggetti).

Come descritto nelle relative linee guida, il test si considera valido se vengono rispettati i seguenti parametri:

- Tasso di fertilità \geq al 70%
- Sopravvivenza degli embrioni nel controllo negativo e nel controllo del brodo di coltura maggiore o uguale al 90% del totale degli embrioni testati per quella condizione sperimentale
- Tasso di schiusa delle uova nel controllo negativo e nel controllo del brodo di coltura superiore o uguale all'80% fino alla fine delle 96 ore di esposizione
- Mortalità nei controlli positivi di almeno il 30% del totale alla fine delle 96 ore.

2.5 RISULTATI

2.5.1 Screening endocrine disruptors

Sono state valutate le 3 sostanze descritte al paragrafo 2.4.2; la prova è stata eseguita in triplicato al fine di garantire la riproducibilità ed attendibilità del risultato ottenuto.

Ciascuna di queste sostanze è stata scelta sulla base delle caratteristiche di interferenza sul sistema endocrino, in quanto il Metimazolo, dalla ricerca bibliografica effettuata, è risultato essere il composto con maggior potere inibente, il Linurone, al contrario, è stato selezionato come non interferente tiroideo ed infine il KClO₄ poiché mostrava un moderato potere interferente.

In allegato, si possono osservare le immagini in fluorescenza dei follicoli tiroidei in triplicato (A, B, C) per ciascuna sostanza, di cui poi i valori di fluorescenza sono stati elaborati ed ottenuti grazie al *software* Image J[®].

Come si può osservare in **Figura 2**, le tre larve incubate con il Metimazolo mostrano una ridotta fluorescenza dei follicoli tiroidei rispetto ai controlli (**Figura 5 e 6**) dovuta al potere inibente della sostanza sullo sviluppo dei follicoli tiroidei. Il dato ottenuto mediante microscopia a fluorescenza è confermato dal risultato come valore numerico di densità integrata (*Integrated Density*, ID) ottenuto, che permette di valutare quantitativamente la fluorescenza follicolare rispetto a quella di fondo.

In **Figura 3** è evidente che l'azione del KClO₄ non è così intensa come quella del Metimazolo, ma comporta comunque un'inibizione dello sviluppo morfo-funzionale della tiroide rispetto alle larve non trattate (**Figura 5 e 6**).

In **Figura 4** è mostrato l'effetto del Linurone (scarsamente inibente): i follicoli tiroidei sono ben delineati e ben visibili, a conferma di un normale sviluppo della ghiandola tiroidea in paragone ai controlli negativi in **Figura 5** e **Figura 6**.

Infine, le larve trattate con H₂O e H₂O+DMSO mostrano un'intensa fluorescenza follicolare, ad evidenza del corretto sviluppo della ghiandola tiroidea nelle larve.

Per tutte le larve analizzate sottoposte a TIQDT sono stati generati valori di ID intesi come contenuto intrafollicolare di T4 (IT4C): ID è il parametro di riferimento grazie al quale è stato possibile confrontare l'effetto delle sostanze sugli embrioni di zebrafish.

In tutte le prove effettuate è stato adottato un approccio quali/quantitativo per l'interpretazione dei dati; la media dei valori ID ottenuti per ciascuna sostanza è stata confrontata con quella ricavata a seguito dell'esposizione degli organismi alle soluzioni controllo (Grafico 1).

Nel dettaglio, i bassi valori di tutte le medie di ID registrati nelle larve di zebrafish esposte alle sostanze MMI e KClO₄ sono il risultato di un chiaro declino dell'immunoreattività di T4 nei soggetti trattati. Pertanto, il risultato che scaturisce da queste prove può essere interpretato come positivo e le sostanze in questione sono classificabili come potenziali *thyroid disruptors*.

Le larve esposte al Linurone, invece, mostrano un contenuto di tiroxina simile alle larve esposte alle soluzioni di controllo.

In conclusione, da queste informazioni si può evidenziare che la tiroide non abbia subito alcun effetto avverso a seguito dell'esposizione alla sostanza, pertanto il Linurone si può considerare come una sostanza NON *thyroid disruptor*.

Inoltre, questo primo approccio al metodo utilizzato, consente una possibile ed utile applicazione dell'embrione/larva di zebrafish come sistema alternativo nello *screening* di sostanze interferenti sulla funzionalità della tiroide.

Valutazione dell'attività del recettore del TRH. L'analisi dei dati è stata eseguita utilizzando il software di analisi statistica GraphPad Prism. Per il saggio dei composti agonisti la stimolazione dose-risposta è stata calcolata impostando $\log(\text{agonist})$ vs. $\text{response} - \text{Variable slope (four parameters)}$ mentre per il saggio dei composti antagonisti è stata impostata l'analisi $\log(\text{inhibitor})$ vs. $\text{response} - \text{Variable slope (four parameters)}$.

In base all'andamento della curva, è possibile valutare se l'elemento in esame è un agonista o un antagonista del recettore del TRH.

In **Figura 7** sono mostrate le curve ottenute dal saggio dei composti agonisti eseguito in doppio. Le curve mostrano che l'effetto di TRH e del suo analogo Taltirelina sono direttamente proporzionale al grado di occupazione del recettore e quindi alla concentrazione del complesso farmaco-recettore.

Le curve mostrate in **Figura 8** sono quelle ottenute dal saggio dei composti antagonisti eseguito anch'esso in doppio. Dal grafico non è possibile osservare un chiaro effetto dei composti antagonisti sul recettore del TRH.

Questa prima valutazione nell'utilizzo della metodica sopra descritta, necessita di un ulteriore approfondimento, al fine di delineare la sua possibile applicazione nell'ambito dei metodi alternativi nello studio di screening di sostanze interferenti con la funzionalità tiroidea.

2.5.2 *Crioconservazione*

Diverse prove sperimentali sono state allestite con il fine di ricercare la temperatura ideale e lo stadio di sviluppo embrionale più idoneo alla crioconservazione. Inoltre, sono state effettuate osservazioni al microscopio a tempi stabiliti per controllare la presenza dei parametri di vitalità (coagulazione dell'embrione, presenza del battito cardiaco, ecc) ed eventuali alterazioni morfologiche dello sviluppo.

Nella prova preliminare, dove si sono utilizzati sia embrioni con corion che senza, è stata osservata un'elevata mortalità, pari al 100% degli embrioni; per questo motivo, gli zebrafish decorionati, sono stati sottoposti ad un test successivo (Test 1), nel quale gli agenti crioprotettori sono stati utilizzati con una concentrazione a maggior diluizione.

Test 1: I risultati ottenuti dal primo test hanno mostrato un alto tasso di mortalità per tutti e tre i gruppi sperimentali. In questa prova, seppure la mortalità è risultata comunque inferiore al test preliminare, il numero di soggetti malformati è rimasto elevato, registrando anche animali che presentavano malformazioni multiple e di diverso tipo, come si può vedere nella **Tabella 1**. Le deformità registrate più facilmente sono state: curvature spinali ed edema sia nel sacco vitellino che nella regione cardiaca.

Test 2: Rispetto all'esperimento precedente il tasso di mortalità registrato è risultato inferiore, ma allo stesso tempo nel Test 2 è stato osservato un numero considerevole di pesci zebra che mostravano anomalie dello sviluppo e malformazioni (anche di ulteriori tipologie diverse da quelle registrate in precedenza), in una forma persino più grave rispetto al Test 1. Le deformità registrate in questa prova sono descritte in **Tabella 2**.

Test 3: I risultati generati da questa prova hanno fatto ipotizzare un miglioramento delle condizioni di esposizione; infatti non si sono evidenziati embrioni con malformazioni. Inoltre, anche la vitalità registrata era aumentata rispetto al Test 2.

Test 4: Sebbene la mortalità riscontrata in un grande numero di zebrafish, si è potuto osservare che anche in questo test non sono stati registrati embrioni che presentassero malformazioni. Inoltre, per il Metanolo si è osservato a 96hpt un considerevole aumento di embrioni vitali (rispetto alla prova precedente), mentre per l'EM la vitalità è risultata essere ridotta.

Test 5: In questa prova, di cui si allegano i relativi grafici della vitalità e della mortalità registrata in seguito all'esposizione refrigerata con le tre sostanze utilizzate (DMSO, MeOH e EM), grazie al continuo affinamento dei parametri sperimentali e al costante aggiornamento e confronto con le prove precedenti, si sono registrati dati che dimostrano come le condizioni si siano con il tempo e con la pratica sempre più perfezionate. Infatti, come si può osservare dai grafici di DMSO e MeOH, la vitalità embrionale è risultata essere particolarmente elevata (anche se non nella totalità dei campioni presi in esame), ancor di più se confrontata con il Test 4. Per quanto riguarda l'EM, invece, la maggioranza degli embrioni è stata registrata come vitale, ma con una percentuale consistente di mortalità embrionale.

2.5.3 Valutazione della tossicità acuta di tossine botuliniche tramite FET test

Uno degli obiettivi della ricerca è stato valutare l'affidabilità del Fish Embryo Acute Toxicity test nel rivelare la tossicità di tossine di origine batterica, in particolare la tossina A prodotta dal *Cl. botulinum*. Per confermare l'effetto potenzialmente tossico della sostanza, durante le osservazioni a 48h e a 96h dopo l'esposizione, sono stati registrati 4 criteri di letalità: coagulazione delle uova fecondate, mancanza di formazione dei somiti, mancato distacco della coda dal sacco vitellino e assenza del battito cardiaco. Alla fine delle 96h, si è calcolata la LC₅₀, ovvero la concentrazione della tossina che è risultata essere letale per almeno il 50% degli embrioni, sulla base di un risultato positivo per ognuna delle osservazioni registrate. Nell'esperimento, i pozzetti di ciascuna piastra in esame sono stati considerati delle repliche indipendenti per il calcolo della LC₅₀. I dati così ottenuti sono stati riportati in forma grafica, mettendo in relazione la percentuale di mortalità e la concentrazione alla quale si è registrato quel risultato.

Dopo 48 ore di esposizione alla tossina botulinica, gli embrioni sono stati osservati al microscopio ottico. Nella piastra del controllo negativo si è osservata una vitalità superiore al 90%. Gli embrioni presentavano battito cardiaco e flusso sanguigno nella coda regolari. La mancanza di sviluppo dei somiti, il distacco della coda dal sacco vitellino e la coagulazione dell'embrione, considerati come criteri di letalità, erano assenti. Inoltre, l'80% dei pozzetti presentava uova schiuse.

Nella piastra del controllo positivo, riempita con la soluzione di 3,4-dicloroanilina, tutti gli embrioni presentavano degli edemi nella cavità pericardica, segno che lo sviluppo embrionale non era avvenuto

in modo ottimale. Inoltre, diversi embrioni non presentavano battito cardiaco e flusso sanguigno caudale.

La piastra con il controllo del terreno di coltura e le piastre con le 5 concentrazioni di tossina botulinica testate presentavano un'elevata torbidità che non ha permesso di osservare in modo chiaro gli embrioni. La torbidità presente nel terreno di coltura e nelle diluizioni della tossina, probabilmente, è da collegare alla presenza di microrganismi presenti nell'acqua di sistema delle vasche, non sterile e utilizzata per preparare le diluizioni di tossina, la cui crescita è stata favorita dal terreno di coltura in cui è cresciuto il *Cl. botulinum*.

Tale problematica non ha consentito una corretta valutazione dell'attendibilità del FET test come sistema alternativo rispetto al *mouse test* attualmente in uso e previsto dalla normativa vigente. Infatti, è necessario tracciare una curva concentrazione-vitalità embrionale che spieghi il valore LC50 come previsto all'inizio dello studio. Pertanto, è necessario un ulteriore approfondimento per la messa a punto della metodica in modo che fornisca informazioni corrette ed esaustive.

2.6 DISCUSSIONE E CONCLUSIONI

In conclusione, i risultati ottenuti dallo sviluppo differenti metodiche hanno permesso di evidenziare quanto di seguito descritto.

2.6.1 Screening endocrine disruptors

La metodologia sviluppata mediante embrione di zebrafish, è risultata idonea alla valutazione di potenziali interferenti tiroidei.

Il TIQDT permette, tramite valutazione in fluorescenza, di discriminare il potenziale interferente esercitato dalle sostanze in esame sullo sviluppo morfo-funzionale della tiroide.

Inoltre, data l'elevata omologia anatomo-fisiologica dello sviluppo della ghiandola tiroidea fra l'essere umano e il *Danio rerio*, le caratteristiche delle sostanze esaminate con il TIQDT sono potenzialmente trasferibili all'ambito umano.

I risultati ottenuti dalle tre sostanze esaminate hanno confermato la validità del saggio utilizzato nel rappresentare l'effetto a livello tiroideo indotto dai composti chimici selezionati. Sia i dati di ID sia le immagini ottenute in seguito ad incubazione con Metimazolo (**Figura 2**) dimostrano il forte potere inibente dell'attività endocrina esercitato da questa sostanza. Per il KClO₄, l'effetto di interferenza a livello tiroideo è risultato essere inferiore (**Figura 3**) a quello osservato con il MMI, ma comunque di interferenza con la ghiandola tiroidea; infine, per quanto riguarda il Linurone (**Figura 4**) non si

evidenzia alcun effetto inibente dell'attività tiroidea così come nei controlli negativi (**Figura 5 e Figura 6**).

Pertanto, le sostanze utilizzate si possono confermare come:

- Metimazolo: attività fortemente inibente la tiroide
- Potassio perclorato: attività moderatamente inibente sulla tiroide
- Linurone: nessuna attività di interferenza tiroidea

Altro importante parametro emerso da questi risultati è la corrispondenza esistente tra l'osservazione al microscopio in fluorescenza dei follicoli tiroidei (indagine qualitativa) ed il dato numerico ottenuto dall'analisi effettuata tramite *software* (indagine quantitativa), espresso come densità integrata, corrispondenza che consente di affermare l'attendibilità dei dati ottenuti.

La prova preliminare sulla linea cellulare ingegnerizzata PathHunter® CHO-K1 TRHR β -Arrestin, per la valutazione dell'attività del recettore del TRH, ha confermato l'effetto agonista dei composti TRH e del suo analogo Taltirelina.

L'attività recettoriale a seguito del trattamento con composti antagonisti, invece, non si è dimostrata chiaramente interpretabile. Questo probabilmente è dipeso dall'utilizzo di una concentrazione di antagonisti e di agonista non idonea per la generazione di una curva dose-risposta chiara.

A tal fine verranno eseguite ulteriori prove per definire le concentrazioni più adatte per l'analisi di ulteriori composti con effetto agonista o antagonista sul recettore del TRH e il conseguente esito sull'attività tiroidea.

2.6.2 Crioconservazione

Dai dati ottenuti è risultato cruciale, per la metodologia di crioconservazione, non solo gli agenti crioprotettori impiegati e la relativa concentrazione di utilizzo, ma anche lo stadio di sviluppo degli embrioni scelto (24hpf). In aggiunta, l'addizione di saccarosio alle soluzioni di conservazione e la relativa concentrazione d'uso, si è dimostrata essere estremamente decisiva nella conservazione degli embrioni e nel mantenimento della vitalità post-trattamento.

In conclusione, il protocollo sviluppato si è dimostrato essere efficiente come modalità di crioconservazione degli embrioni. Ulteriori perfezionamenti della procedura messa a punto, potrebbero essere utili per rendere sempre più performanti le modalità di conservazione degli embrioni, con maggiori benefici in termini di condivisione di campioni e materiale biologico.

2.6.3 Valutazione della tossicità acuta di tossine botuliniche tramite FET test

Come sopra descritto, la torbidità presente nella piastra di controllo del terreno di coltura e nelle piastre con le diluizioni della tossina botulinica ha impedito di osservare gli embrioni al microscopio. La mancanza di risultati significativi, quindi, non è riconducibile all'incapacità del FET test di valutare la tossicità della tossina, bensì all'impossibilità di portare a termine le osservazioni già dopo le 48 ore e, quindi, dimostrare l'affidabilità del metodo in esame. Per tale ragione, ci si propone di approfondire le condizioni che non hanno permesso il prosieguo dell'esperimento, di migliorarle ed applicare le dovute modifiche ai futuri FET test.

Per quanto concerne il problema della torbidità, si potrebbe pensare di diluire maggiormente la soluzione iniziale della tossina rispettando il limite del fattore di diluizione pari a 2, indicato dalle linee guida FET test, ed esporre gli embrioni a diluizioni superiori a quelle finora testate. Inoltre, sarà indispensabile per non incorrere in ulteriori contaminazioni, sterilizzare l'acqua di sistema utilizzata per le diluizioni.

Inoltre, grazie ai risultati ottenuti mediante l'esperimento dedicato alla crioconservazione, si è pensato di modificare ulteriormente il FET test, applicando un decorionamento degli embrioni prima della loro esposizione alla tossina, al fine di migliorare la metodica da applicare.

Ringraziamenti: si ringrazia Luigi Bornati del Reparto Controllo degli Alimenti, dirigente di riferimento dr Guido Finazzi, per la collaborazione nell'allestimento della coltura batterica di *Cl. Botulinum*.

2.7 **BIBLIOGRAFIA**

- Connolly MH, *et al.*: “A preliminary study of osmotic dehydration in zebrafish embryos: Implications for vitrification and ultra-fast laser warming”. *Criobiology* 2017 Oct; 78:106-109
- Desai K, *et al.*: “Short-term chilled storage of zebrafish (*Danio rerio*) embryos in cryoprotectant as an alternative to cryopreservation”. *Zebrafish*. 2015 Feb; 12(1):111-20. doi: 10.1089/zeb.2013.0961. Epub 2014 Dec 29. PMID: 25545702.
- Do Carmo Faria Paes, M., & Satiko Okada Nakaghi, L. (2018). Post-cooling survival, growth and deformity rates in zebrafish embryos (*Danio rerio*). *Zygote*, 26(1), 76-88. doi:10.1017/S0967199417000715
- Farago B., *et al.*: “Stimulus-triggered enhancement of chilling tolerance in zebrafish embryos”. *PLoS One*. 2017 Feb 6;12 (2): e0171520
- Hagedorn, M., Hsu, E. W., Pilatus, U., Wildt, D. E., Rall, W. R. and Blackband, S. J. (1996) 'Magnetic resonance microscopy and spectroscopy reveal kinetics of cryoprotectant permeation in a multicompartmental biological system', *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 93(15), 7454-7459.
- Higaki S, *et al.*: “Cryopreservation of primordial germ cells by rapid cooling of whole zebrafish (*Danio rerio*) embryos”. *J Reprod Dev*. 2010 Apr; 56(2):212-8. doi: 10.1262/jrd.09-136e. Epub 2009 Dec 9. PMID: 19996550.
- OECD 236:2013-“OECD Guidelines for the testing of chemicals. Test no.236: Fish Embryo Acute Toxicity (FET) test.” Paris, France: Organization for Economic Cooperation and Development.
- Raldúa D *et al.* *Reprod Toxicol*. 2012 Apr; 33(2):188-97
- Rossetto, O., Pirazzini, M. & Montecucco, *Cl. Botulinum* neurotoxins: genetic, structural and mechanistic insights. *Nat Rev Microbiol* **12**, 535–549 (2014). <https://doi.org/10.1038/nrmicro3295>
- Thienpont B *et al.* *Toxicol Appl Pharmacol*. 2013 Jun 1;269(2):169-75
- Tsai, S., Lin,C. (2012) ‘Advantages and applications of cryopreservation in Fisheries science’ *Braz.arch.biol.technol*.
- Westerfield M., Recipes In: “The Zebrafish Book. A Guide for the Laboratory Use of Zebrafish (*Danio rerio*)”. Eugene: the University of Oregon Press; 2007: 10.1–10.20.
- Zhang J *et al.* *Exp Dermatol*. 2015 Aug; 24 (8):605-10

- Zhang, T. and Rawson, D. M. (1995) 'Studies on Chilling Sensitivity of Zebrafish (*Brachydanio rerio*) Embryos', *Cryobiology*, 32(3), 239-246
- Zhang, T. and Rawson, D. M. (1996) 'Permeability of the vitelline membrane of zebrafish (*Brachydanio rerio*) embryos to methanol and propane-1,2-diol', *Cryoletters*, 17, 273-280.
- Zhang, T. and Rawson, D. M. (1998) 'Permeability of Dechorionated One-Cell and Six-Somite Stage Zebrafish (*Brachydanio rerio*) Embryos to Water and Methanol', *Cryobiology*, 37(1), 13-21.
- Zhang, T. and Rawson, D.M. (1996), 'Feasibility studies on vitrification of intact zebrafish (*Brachydanio rerio*) embryos'. *Cryobiology*, 33, 1-13
- Zhang, T., Rawson, D. M. and John Morris, G. (1993) 'Cryopreservation of prehatch embryos of zebrafish (*Brachydanio rerio*)', *Aquatic Living Resources*, 6(02), 145-153

3. DIVULGAZIONE DEI RISULTATI

Durante l'ultima fase è stata effettuata la rielaborazione dei dati ottenuti. Si è proceduto ad una stesura dettagliata della relazione finale.

La diffusione dei risultati generati dal presente progetto è stata concretizzata mediante l'elaborazione di due poster e l'esposizione e presentazione orale a webinar e congressi internazionali di seguito citati, svolti tutti in modalità telematica:

- Poster al congresso Virtual 11th European Zebrafish Meeting 2020: **“Zebrafish embryo cryopreservation: a promising tool for alternative methods”**;
- Intervento orale al congresso IAT Congress 2021 – virtual event: **“Chilled storage of zebrafish embryos: development and evaluation of a promising tool”**;
- Intervento orale al congresso 13th Swiss Zebrafish Society Annual Meeting 2021– virtual event: **“Development of a chilled storage protocol to preserve zebrafish embryos”**.

4. ALLEGATI

Figura 1: Schema utilizzato per allestire le piastre da 24 pozzetti. Si possono osservare le 5 piastre allestite con le 5 diluizioni scalari in ragione 2, il controllo negativo corrispondente all'acqua utilizzata per le diluizioni, la piastra del controllo positivo nella quale è stata aggiunta la 3,4- dicloroanilina ad una concentrazione di 4 mg/L, il controllo del terreno di coltura sul quale è stato fatto crescere il microorganismo e i pozzetti del controllo interno (Ci) delle piastre, riempiti con l'acqua utilizzata per le diluizioni.

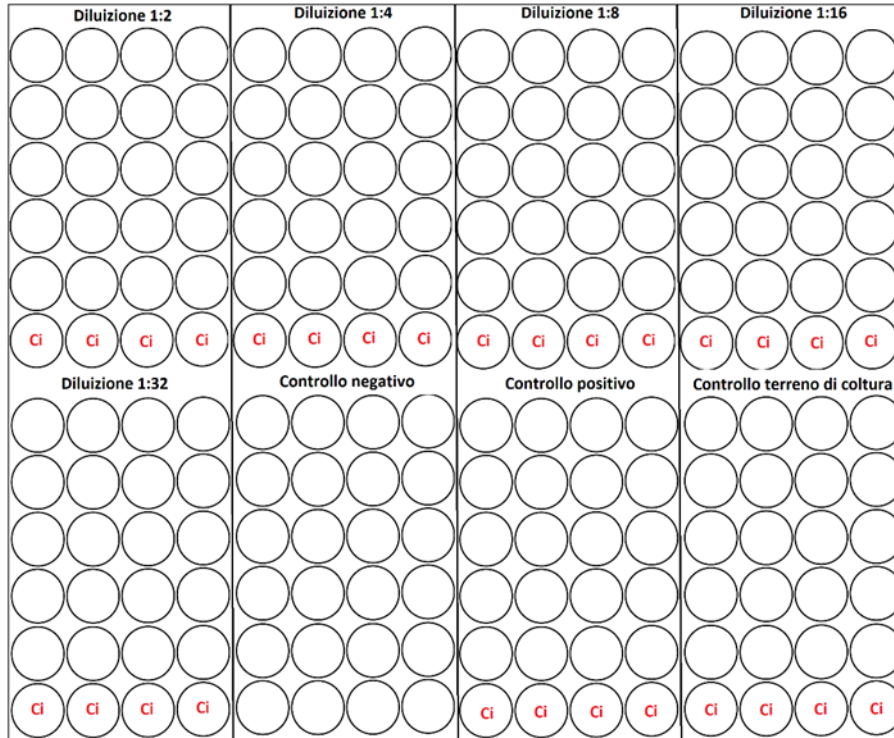


Figura 2. Immagini in fluorescenza di follicoli tiroidei di tre campioni di larve di zebrafish (A, B, C) a 120 hpf in seguito a trattamento con Metimazolo

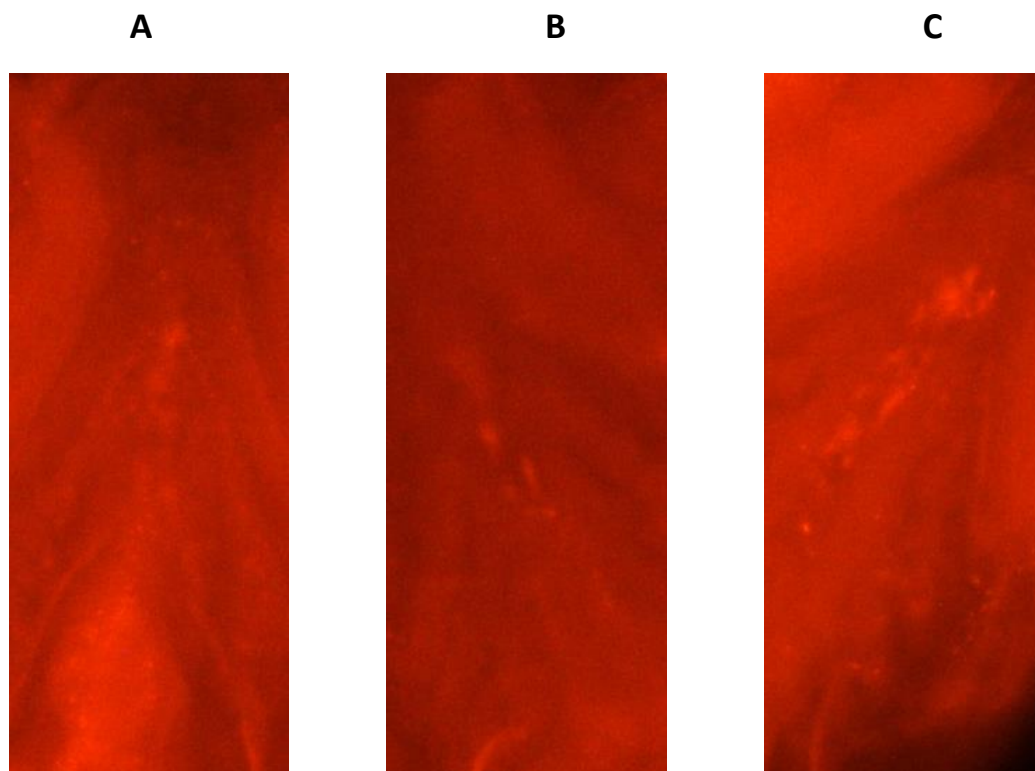


Figura 3. Immagini in fluorescenza di follicoli tiroidei di tre campioni di larve di zebrafish (A, B, C) a 120 hpf in seguito a trattamento con KClO₄

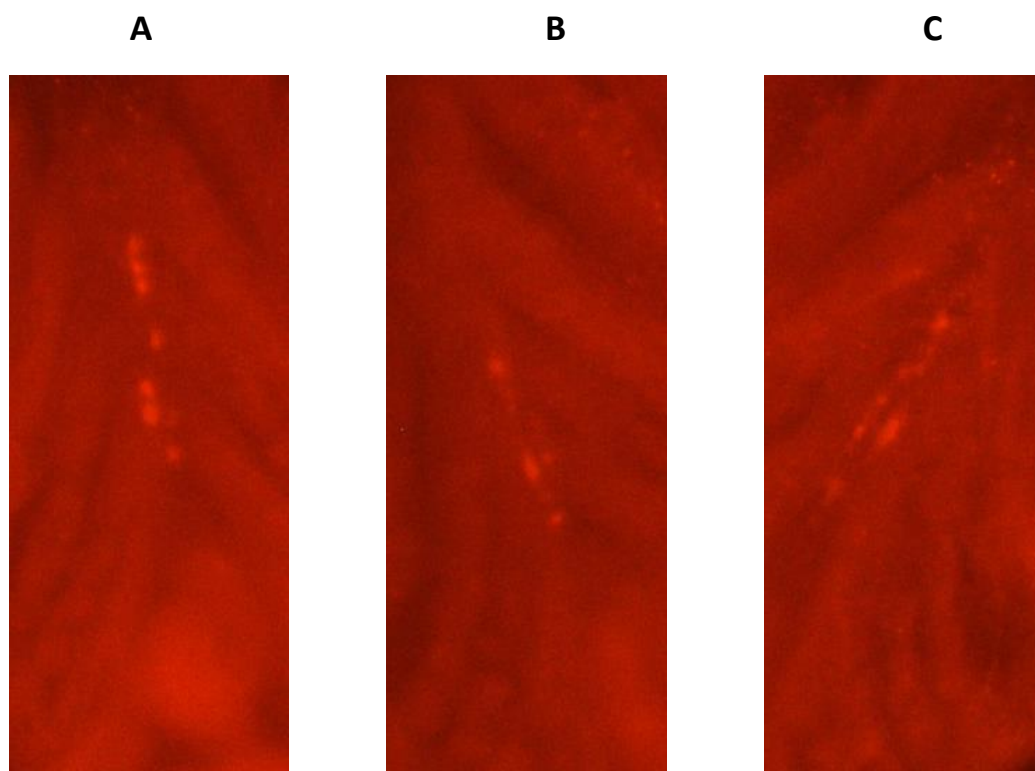


Figura 4. Immagini in fluorescenza di follicoli tiroidei di tre campioni di larve di zebrafish (A, B, C) a 120 hpf in seguito a trattamento con Linurone

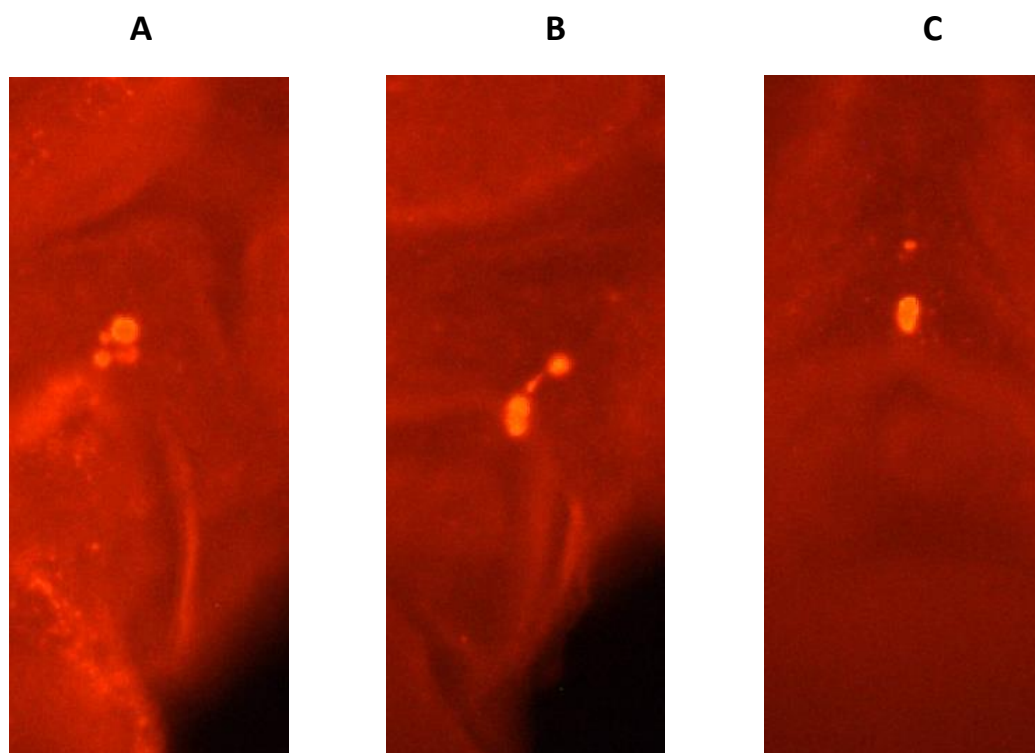


Figura 5. Immagini in fluorescenza di follicoli tiroidei di tre campioni di larve di zebrafish (A, B, C) a 120 hpf in seguito a incubazione in H₂O

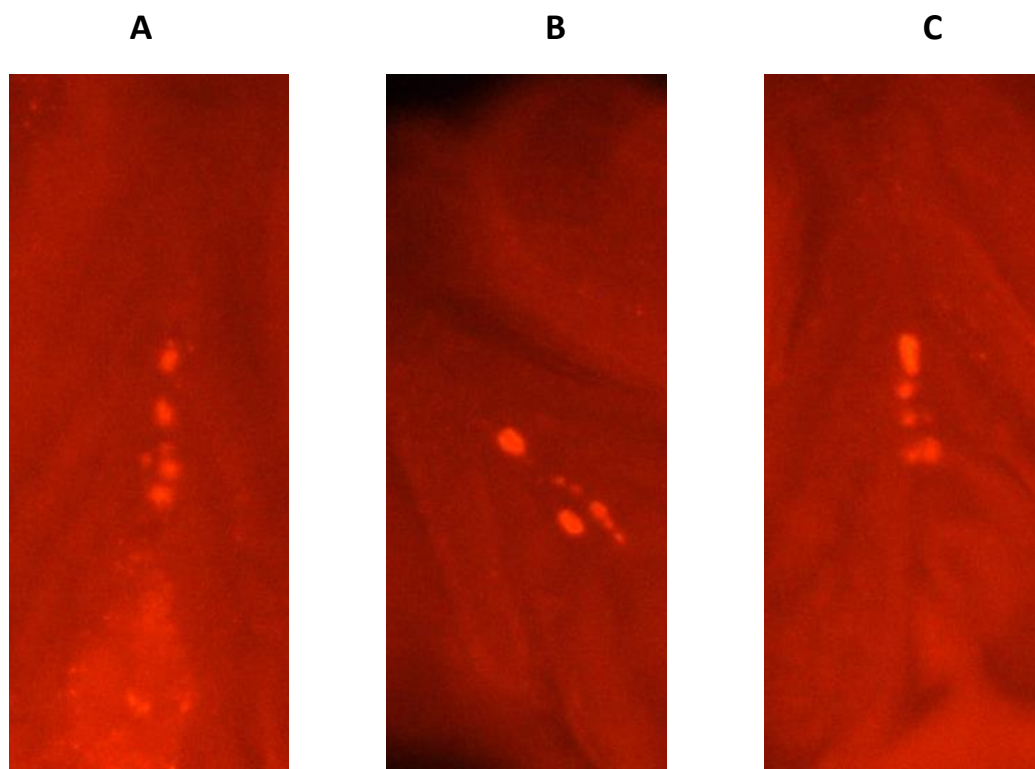


Figura 6. Immagini in fluorescenza di follicoli tiroidei di tre campioni di larve di zebrafish (A, B, C) a 120 hpf in seguito a incubazione in H₂O+ DMSO

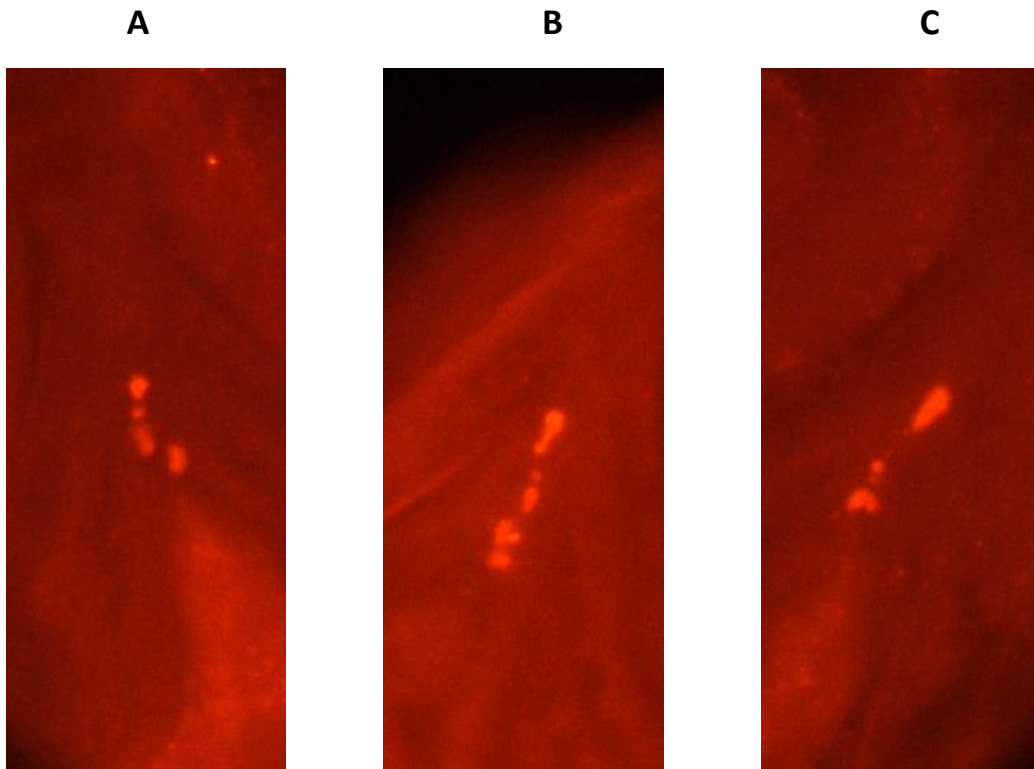


Figura 7. Curve dose-risposta ottenute dal saggio con i composti agonisti TRH e Taltirelina. Le curve sono state ottenute mediante analisi dei valori di chemiluminescenza con il software GraphPad Prism.

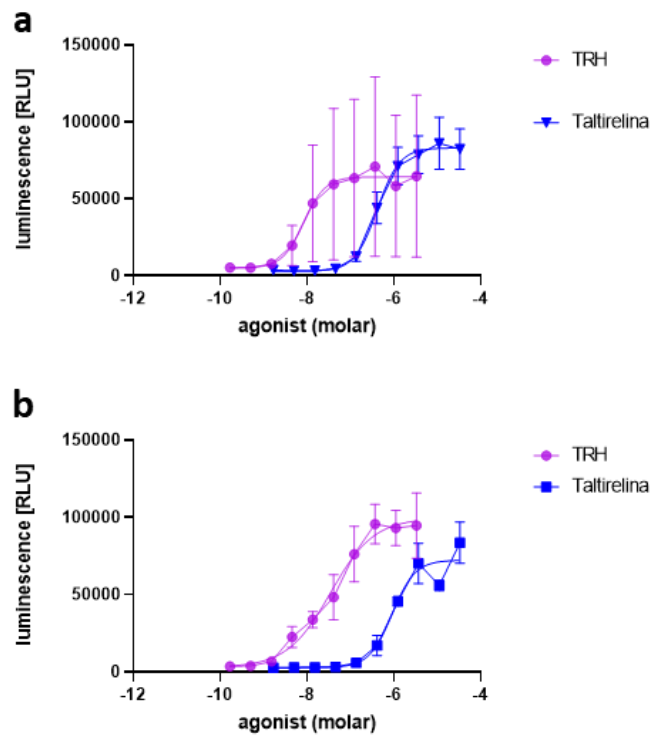


Figura 8. Curve dose-risposta ottenute dal saggio con i composti antagonisti Midazolam e Clordiazepossido. Le curve sono state ottenute mediante analisi dei valori di chemiluminescenza con il software GraphPad Prism.

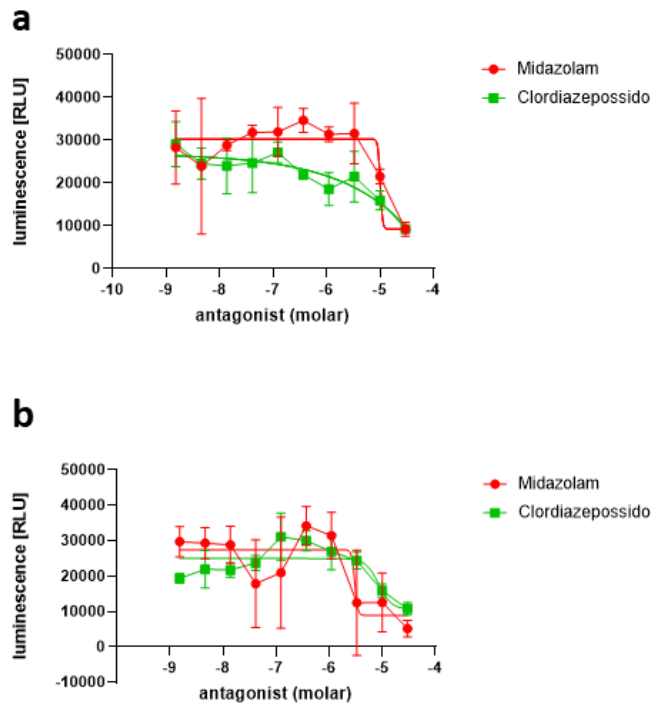
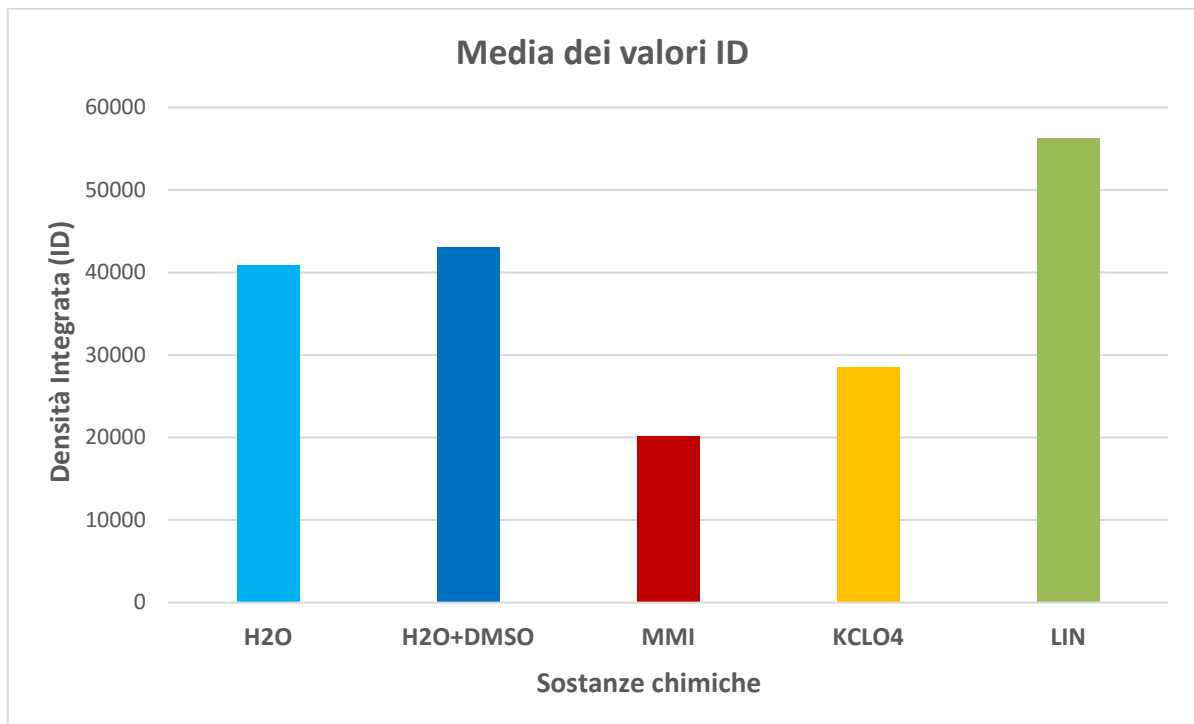


Grafico 1: grafico delle medie dei valori ID. Effetti di H₂O, H₂O+DMSO, MMI, KClO₄ e Linurone sulla funzionalità della ghiandola tiroidea. Nel grafico è riportata la media dei valori ID per ciascuna sostanza, che corrisponde al contenuto intrafollicolare di T₄ (IT₄C) successivamente al trattamento.



Grafici 2, 3, 4: grafici riportanti, in percentuale, i valori di mortalità e vitalità riscontrati nel Test 5 con 0,025M di concentrazione per DMSO e MeOH a cui è stato aggiunto Saccarosio alla concentrazione di 0,2M. **Nessun embrione che mostrava segni ascrivibili ad anomalità dello sviluppo o malformazioni è stato registrato.**

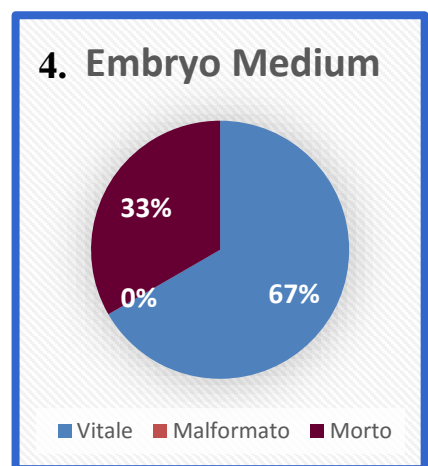
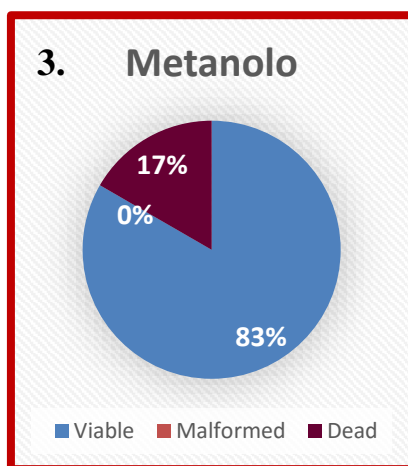
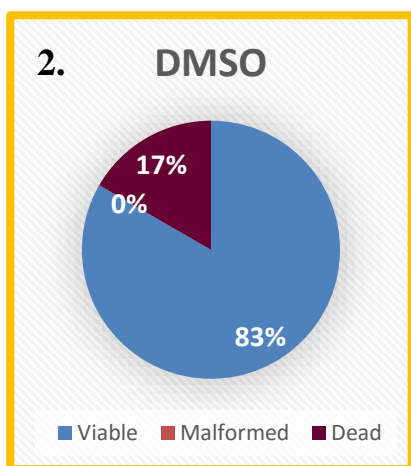


Tabella 1: Tipi di deformità osservate e loro relativa comparsa nel trattamento con agenti crioprotettori (0,1M) e nel controllo.

Tipo di deformità	24 hpt	96 hpt	Gruppo di controllo
<i>Edema pericardico</i>	-	+	-
<i>Edema del sacco vitellino</i>	-	+	-
<i>Deviazione colonna vertebrale</i>	-	+	-
<i>Bradycardia</i>	-	-	-
<i>Tachycardia</i>	-	+	-
<i>Malformazioni cefaliche</i>	-	-	-
<i>Pinna caudale assente o malformata</i>	-	+	+
<i>Tremori</i>	-	-	-
<i>Nuoto alterato</i>	-	-	-

Tabella 2: Tipi di deformità osservate e loro rispettiva comparsa nel trattamento con CPA (0,1M + saccarosio 0,1M) e nel controllo.

Tipo di deformità	24 hpt	96 hpt	Gruppo di controllo
<i>Edema pericardico</i>	-	+	-
<i>Edema del sacco vitellino</i>	-	+	-
<i>Deviazione colonna vertebrale</i>	-	+	+
<i>Bradycardia</i>	-	+	-
<i>Tachycardia</i>	-	+	-
<i>Malformazioni cefaliche</i>	-	+	-
<i>Pinna caudale assente o malformata</i>	-	+	-
<i>Tremori</i>	-	+	-
<i>Nuoto alterato</i>	-	+	-

Brescia, 11 Maggio 2021

Il Responsabile Scientifico del Progetto

Dr.ssa Silvia Dotti