

APPROCCI ECOTOSSICOLOGICI INNOVATIVI AI FINI DELLA PROTEZIONE AMBIENTALE E DELLA SALUTE UMANA

Ines Lacchetti, Walter Cristiano, Kevin Di Domenico, Margherita Corti
Dipartimento Ambiente e Salute, Istituto Superiore di Sanità, Roma

Premessa

È ormai noto che i cambiamenti globali in atto possono alterare l'esposizione umana agli inquinanti in modo diretto o indiretto. Il rilascio e l'immissione nell'ambiente di miscele di contaminanti, possono generare fattori di stress multipli a diversi livelli dell'ecosistema. La loro diffusione, interazione ed effetti sulla salute umana, inoltre, sono spesso ignoti o poco conosciuti, tanto da essere necessaria l'individuazione di approcci e metodologie innovative in una ottica di prevenzione per la salute umana (Mancini *et al.*, 2017).

In questo contesto il ruolo dell'ecotossicologia diventa fondamentale per la gestione e la comprensione di potenziali effetti avversi derivanti dall'esposizione multipla a contaminanti considerati emergenti.

La conoscenza e il rilevamento degli impatti sugli ecosistemi, attraverso gli studi ecotossicologici, rappresentano un elemento chiave di prevenzione primaria nell'ottica di protezione dell'ambiente e della salute umana, attraverso la comprensione e l'individuazione delle modalità di azione dei diversi contaminanti.

In Italia l'ecotossicologia viene riconosciuta anche a livello normativo come valido supporto alle analisi chimiche. Ad esempio viene prevista la conduzione di saggi ecotossicologici per la classificazione dei rifiuti (HP14), per la valutazione delle acque reflue, per la classificazione dei materiali di dragaggio, per la derivazione di valori limite (es. standard di qualità ambientali), nonché nel testo unico ambientale Legge 152/2006 per la qualità delle acque superficiali.

In Europa l'interesse e la consapevolezza crescente verso le potenzialità dell'ecotossicologia si stanno concretizzando con la formazione di gruppi di esperti ad hoc e attraverso la ricerca di metodi validi e affidabili che nel contempo risultino di facile applicazione. Tutto ciò sta indirizzando i ricercatori verso la scelta di batterie integrate di biosaggi che prevedano sia la valutazione di effetti di tossicità acuta e cronica ma anche effetti genotossici.

Modello “zebrafish” in ecotossicologia: il *Fish Embryo Acute Toxicity* test

Nei progetti europei che si rivolgono in particolare alla qualità delle acque superficiali, viene inserito tra i saggi il *Fish Embryo Acute Toxicity* (FET) test, poiché sembra essere molto promettente anche in sostituzione del saggio di tossicità acuta su pesci adulti.

Tale saggio è stato adottato il 26 luglio 2013 dall'*Organisation for Economic Co-operation and Development* (OECD) e inserito come linea guida per il Test di sostanze chimiche (OECD, 2013) ed è già utilizzato in Europa per testare farmaci, pesticidi e prodotti chimici, in particolare in Germania è stato reso obbligatorio dal 2005 per la sorveglianza delle acque reflue urbane e

industriali. Al fine di ridurre il numero di test sugli animali, il FET test è stato recentemente suggerito dal regolamento europeo REACH (*Registration, Evaluation, Authorisation and restriction of Chemicals*) che promuove metodi alternativi per la valutazione dei pericoli delle sostanze, come uno dei metodi alternativi ai test di tossicità nei pesci adulti (ECHA, 2016).

Il FET test prevede l'utilizzo di embrioni di pesci tra questi la specie *Danio rerio* (Hamilton-Buchanan, 1822) più conosciuto come zebrafish. Zebrafish è considerato il modello animale probabilmente designato a sostituire il modello "roditore" in particolare negli studi sanitari. Negli ultimi anni, infatti, si è registrato un forte e crescente utilizzo di zebrafish nella ricerca biomedica soprattutto dopo l'intero sequenziamento del suo genoma e in seguito alla dimostrazione di una correlazione esistente tra le risposte fisiologiche dei pesci con i vertebrati superiori quali l'uomo.

I principali vantaggi nell'utilizzo di zebrafish rispetto ad altri vertebrati, come ad esempio i roditori, è senza dubbio il suo facile allevamento in laboratorio e la trasparenza dell'embrione. Sono ugualmente da ricordare anche altri fondamentali aspetti che fanno di zebrafish l'organismo sempre più utilizzato negli studi scientifici: ciclo vitale breve, elevata produzione di uova (circa 100 uova a deposizione), fecondazione esterna, trasparenza dell'embrione, rapido sviluppo embrionale, costi e spazi ridotti, assenza di alimentazione per l'intera durata del test, semplicità e rapidità del metodo, quantità di scarti prodotti contenuta (~ 200mL), risorse impegnate e costi ridotti, non rientra nella Direttiva 2010/63/UE del Parlamento e del Consiglio dell'Unione Europea.

Le prime ricerche con zebrafish risalgono agli anni '60 del secolo scorso in cui *Danio rerio* venne utilizzato in studi pionieri di biologia dello sviluppo dal ricercatore George Streisinger, Università dell'Oregon.

Negli anni '80 vengono condotti studi di carcinogenesi indotta da agenti chimici e a partire dagli anni '90, grazie alla messa a punto di metodologie di transgenesi, zebrafish diviene modello sperimentale affermato per studi sul cancro, infatti lo sviluppo di tumori in *Danio rerio* è quasi sempre comparabile a quello umano, sia dal punto di vista istologico che genetico e/o genomico (Ceol *et al.*, 2008; Kaufman *et al.*, 2016).

Negli ultimi anni l'utilizzo di organismi mutanti (fluorescenti) chimicamente indotti e di ablazioni funzionali ha permesso l'impiego di zebrafish nello studio di diverse malattie umane, ad esempio per modellizzare il sistema ematopoietico, cardiovascolare, studi sul sistema visivo, disordini renali, in studi sull'angiogenesi e sulla sordità. È considerato, inoltre, un modello emergente per lo studio di modelli neurodegenerativi e neuromuscolari come la malattia di Alzheimer (Newman *et al.*, 2014; Pu *et al.*, 2017).

Più recentemente il modello zebrafish è utilizzato anche nei monitoraggi ambientali e in ecotossicologia, poiché si è dimostrato un organismo molto sensibile a differenti contaminanti anche presenti in miscele ed è considerato un valido indicatore della presenza di inquinanti emergenti e sostanze neurotossiche (Hollert *et al.*, 2015).

Il test acuto con zebrafish ha recentemente avuto un crescente aumento di impiego dopo la pubblicazione della linea guida dell'OECD per il test delle sostanze chimiche, che utilizza embrioni di *Danio rerio* fino a 96 ore, periodo in cui il pesce non è in grado di alimentarsi autonomamente. Questo aspetto è fondamentale per gli studi scientifici che lo utilizzano poiché li svincola dall'autorizzazione alla sperimentazione animale, garantendo comunque risultati sovrapponibili con il corrispondente test acuto su pesci adulti (OECD, 2013; EURL ECVAM, 2014).

Come funziona il FET test

Il principio del FET test si basa sull'esposizione di singole uova di *Danio rerio* poste in piastre da 24 pozzetti per valutare l'eventuale embriotossicità del campione.

Il test, che deve iniziare entro 90 minuti dopo la fecondazione delle uova, viene condotto in triplo su cinque concentrazioni del campione. È previsto l'allestimento di anche di un controllo positivo ad una concentrazione fissa di 4 mg/L di 3,4-dicloroanilina per ogni gruppo di uova utilizzate. Le piastre multipozzetto contenenti per ciascuna concentrazione 20 uova e 4 per il controllo negativo interno alla piastra, vengono incubate a $26 \pm 1^\circ\text{C}$ con ciclo luce-buio, per 96 ore.

Eventuali malformazioni dell'embrione vengono registrate attraverso l'osservazione ogni 24 ore, di quattro distinti *endpoint*:

- *Coagulazione dell'embrione*
Può verificarsi anche entro poche ore dall'inizio esposizione e indica effetto tossici acuti generico.
- *Mancanza di formazione del somite*
Il somite dovrebbe essere visibile dopo 12 ore dalla fecondazione e se assente, l'embrione non si svilupperà ulteriormente determinandone la morte;
- *Mancato distacco della coda*
Il distacco della coda dal tuorlo si osserva dopo 24 ore dalla fecondazione, indicando la normale crescita dell'embrione.
- *Assenza di battito cardiaco*
Il battito è facilmente rilevabile dopo 30 ore dalla fecondazione e la sua assenza indica la morte dell'embrione.

Al termine del periodo di esposizione, la tossicità acuta è determinata sulla base di un risultato positivo di una delle quattro osservazioni apicali registrate e espressa come LC_{50} (*Lethal Concentration, 50 percent*).

Attraverso l'impiego di questo metodo, inoltre, è possibile l'osservazione anche di diversi *endpoint* subletali che possono fornire importanti informazioni sui “modes of action” delle possibili sostanze tossiche presenti nei campioni. Attraverso lo studio di questi *endpoint*, quindi, si possono rilevare effetti di neurotossicità, cardiotoxicità, teratogenicità, genotossicità, immunotossicità e interferenti endocrini dovuta alla presenza di contaminanti anche a basse concentrazioni e si rivelano spesso più sensibili se paragonati ai corrispondenti *endpoint* acuti (Velki *et al.*, 2017). Un elenco dei possibili *endpoint* subletali rilevabili su embrioni e larve di zebrafish sono riportati nella Tabella 1 (Lammer *et al.*, 2009).

Tra i possibili *endpoint* rilevabili sono da menzionare ad esempio la deformità, la frequenza cardiaca, l'attività embrionale che possono essere facilmente registrati e analizzati attraverso sistemi video, associati a software specifici, semplificando in tal modo le misure di correlazione degli effetti di differenti sostanze contaminanti.

Il comportamento delle larve, inoltre, è considerato uno strumento molto efficace nella descrizione dei “modes of action” di molteplici sostanze (Weichert *et al.*, 2017). Anche per questo *endpoint* esistono attualmente in commercio sistemi di videotracking che permettono di tracciare e analizzare simultaneamente il percorso dei singoli individui alloggiati in piastre multipozzetto.

Al fine di poter valutare gli effetti sulla salute umana esercitata da una miscela di contaminanti presenti nell'ambiente, il Reparto “Ecosistemi e salute” dell'Istituto Superiore di Sanità sta conducendo studi di ricerca sperimentale su embrioni di zebrafish con l'obiettivo di individuare un segnale precoce di allerta di contaminazione e, conseguentemente, di rischio per l'uomo.

Tabella 1. Endpoint letali e subletali per il FET test con *Danio rerio*

Endpoint	Tempo di esposizione				
	8h	24h	48h	96h	108/120h
<i>Endpoint di letalità</i>					
Coagulazione	+	+	+	+	
Mancato distacco della coda		+	+	+	
Assenza di battito cardiaco		+	+	+	
Mancata formazione dei somiti			+	+	
Mancanza di schiusa					+
<i>Endpoint subletali di sviluppo</i>					
Completamento della gastrula	+				
Formazione dei somiti		+			
Sviluppo degli occhi		+	+	+	
Movimenti spontanei		+	+	+	
Battito/flusso cardiaco			+	+	
Frequenza cardiaca			+	+	
Pigmentazione			+	+	
Formazione di edema			+	+	
<i>Endpoint di teratogenicità</i>					
Malformazione della testa	+	+	+	+	
Malformazione otoliti	+	+	+	+	
Malformazione della coda	+	+	+	+	
Malformazione del cuore	+	+	+	+	
Modificazione della struttura della corda	+	+	+	+	
Scoliosi	+	+	+	+	
Rachitismo	+	+	+	+	
Deformazione del sacco vitellino	+	+	+	+	
Ritardo generale di accrescimento	+	+	+	+	
Lunghezza coda					+

Gli studi sono condotti attraverso l'integrazione dei risultati degli endpoint letali e degli endpoint subletali con i risultati di genotossicità-Comet Assay applicati sulle stesse larve. Zebrafish, infatti, è considerato un ottimo modello multi-endpoint (Pham *et al.*, 2016) e viene utilizzato in diversi studi anche di genotossicità (Babic *et al.*, 2017).

L'obiettivo, pertanto, è quello di acquisire maggiori e informazioni più dettagliate in breve tempo sul potenziale tossico di un campione ambientale nell'ottica della prevenzione della salute umana. A tal fine, inoltre, si sta elaborando una scala di tossicità integrata con lo scopo finale di formulare, insieme alle nuove conoscenze acquisite, una futura proposta normativa a supporto del legislatore.

Bibliografia

- Babic S, Barisi J, Visi H, Klobucar RS, Topic Popovic N, Strunjak-Perovic I, Coz-Rakovac R, Klobucar G. Embryotoxic and genotoxic effects of sewage effluents in zebrafish embryo using multiple endpoint testing. *Water Research* 2017;115:9-21.
- Ceol CJ, Houvras Y, White RM, Zon LI. Melanoma biology and the promise of zebrafish. *Zebrafish* 2008;5(4):247-55.
- ECHA. *Analysis of the relevance and adequateness of using Fish Embryo Acute Toxicity (FET) Test Guidance (OECD 236) to fulfil the information requirements and addressing concerns under REACH*. Helsinki: European Chemicals Agency; 2016. (Report ECHA-UFZ contract ECHA/2014/341).

- Disponibile all'indirizzo: https://echa.europa.eu/documents/10162/13639/fet_report_en.pdf; ultima consultazione 27/05/2019).
- Europa. Direttiva 2010/63/UE del Parlamento Europeo e del Consiglio del 22 settembre 2010 sulla protezione degli animali utilizzati a fini scientifici (Testo rilevante ai fini del SEE). *Gazzetta ufficiale dell'Unione europea* L 276/33 del 20.10.2010.
- European Union Reference Laboratory for Alternatives to Animal Testing. *EURL ECVAM Recommendation on the Zebrafish Embryo Acute Toxicity Test Method (ZFET) for Acute Aquatic Toxicity Testing*. Luxembourg: Publications Office of the European Union; 2014. (Report EUR 26710). Disponibile all'indirizzo: http://publications.jrc.ec.europa.eu/repository/bitstream/JRC91098/eur%2026710_eurl%20ecvam%20zfet%20recommendation__online.pdf; ultima consultazione 27/5/2019.
- Hollert H, Keiter SH. *Danio rerio* as a model in aquatic toxicology and sediment research. *Environ Sci Pollut Res* 2015;22:16243-6.
- Italia. Decreto legislativo n. 152 - 3 aprile 2006. Norme in materia ambientale. *Gazzetta Ufficiale* n. 88, 14 aprile 2006. *Supplemento. Ordinario* n. 96.
- Italia. Decreto legislativo n. 26 – 4 marzo 2014. Attuazione della direttiva 2010/63/UE sulla protezione degli animali utilizzati ai fini scientifici. *Gazzetta Ufficiale Serie Generale* n. 61, 14 marzo 2014.
- Kaufman CK, Mosimann C, Fan ZP, Yang S, Thomas AJ, Ablain J, Tan JL, Fogley RD, van Rooijen E, Hagedorn E, Ciarlo C, White RM, Matos DA, Puller AC, Santoriello C, Liao EC, Young RA, Zon LI. A zebrafish melanoma model reveals emergence of neural crest identity during melanoma initiation. *Science* 2016;351(6272):aad2197.
- Lammer E, Carr GJ, Wendler K, Rawlings JM, Belanger SE, Braunbeck T. Is the fish embryo toxicity test (FET) with the zebrafish (*Danio rerio*) a potential alternative for the fish acute toxicity test? *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol* 2009;149(2):196-209.
- Mancini L, Marcheggiani S, Puccinelli C, Lacchetti I, Carere M, Bouley T. Global environmental changes and the impact on ecosystems and human health. *Energia, ambiente e innovazione* 2017;3:98-105.
- Newman M, Ebrahimie E, Lardelli M. Using the zebrafish model for Alzheimer's disease research. *Front Genet* 2014;5:189.
- OECD. *Test No. 236: Fish Embryo Acute Toxicity (FET) test. OECD Guidelines for the Testing of Chemicals Section 2*. Paris: Organisation for Economic Co-operation and Development Publishing; 2013.
- Pham DH, De Roo B, Nguyen XB, Vervaele M, Kecskés A, Ny A, Copmans D, Vriens H, Locquet JP, Hoet P, de Witte PA. Use of zebrafish larvae as a multi-endpoint platform to characterize the toxicity profile of silica nanoparticles. *Sci Rep* 2016;6:37145.
- Pu YZ, Liang L, Fu AL, Liu Y, Sun L, Li Q, Wu D, Sun MJ, Zhang YG, Zhao BQ. Generation of Alzheimer's disease transgenic zebrafish expressing human APP Mutation under control of zebrafish appb promotor. *Curr Alzheimer Res.* 2017; 14(6): 668-679.
- Strähle U, Scholz S, Geisler R, Greiner P, Hollert H, Rastegar S, Schumacher A, Selderslaghs I, Weiss C, Witters H, Braunbeck T. Zebrafish embryos as an alternative to animal experiments: a commentary on the definition of the onset of protected life stages in animal welfare regulations. *Reproductive Toxicology* 2012; 33: 128-132.
- Velki M, Di Paolo C, Nelles J, Seiler TB, Hollert h. Diuron and diazinon alter behavior of zebrafish embryos and larvae in the absences of acute toxicity. *Chemosphere* 2017; 180: 65-76.
- Weichert FG, Floeter Carolin, Meza Artmann AS, Kamman U. Assessing the ecotoxicotoxicity of potentially neurotoxic substances – Evaluation of behavioural parameter in the embryogenesis of *Danio rerio*. *Chemosphere* 2017; 186: 43-50.