

Università degli Studi di Brescia
Dipartimento di Medicina Molecolare e Traslazionale
UOC Servizi Ricerca
Piattaforma Zebrafish

Zebrafish: dall'acquario un valido aiuto alla ecotossicologia

A cura di:

Dott.ssa Chiara Tobia,
Dott.ssa Roberta Giuliani,
Dott.ssa Stefania Maccarini,
Sig.ra Cristina Mattana,
Sig.ra Francesca Raffelli

Obiettivi della valigia

La finalità dell'esperienza proposta è quella di avvicinare gli studenti degli istituti superiori al mondo della scienza e della ricerca fornendo nello specifico nozioni elementari riguardanti l'utilizzo in laboratorio del modello animale zebrafish.

Lezione introduttiva: nella lezione introduttiva verranno illustrate le caratteristiche di un organismo modello, le potenzialità del modello zebrafish nella ricerca biomedica con un breve excursus relativo alle sue caratteristiche biologiche e un esempio pratico di come embrioni e larve possano essere impiegati nella valutazione della ecotossicità di sostanze presenti nei corsi d'acqua.

Virtual tour della Facility: un breve video spiegherà il funzionamento di una Facility di zebrafish.

In laboratorio: saggio di colorazione delle cartilagini con Alcian blue.

Qualche premessa e alcune nozioni relative al modello animale zebrafish

Un organismo modello è un esemplare di una specie che viene utilizzato per studiare fenomeni biologici. Tutti gli organismi modello devono avere delle caratteristiche precise: dimensioni piccole, tempi brevi di riproduzione, accessibilità e possibilità di manipolazione del genoma. La scelta dell'organismo modello dipende dal tipo di ricerca condotta. Cosa ci consente di traslare le informazioni ricavate mediante l'impiego di un modello ad altri organismi evolutivamente più complessi? Il fatto che i fenomeni biologici di base, come ad esempio il metabolismo, il ciclo cellulare, lo sviluppo embrionale, e alcuni geni fondamentali per il controllo di questi processi sono altamente conservati durante l'evoluzione.

L'organismo modello di cui tratteremo è Zebrafish (*Brachydanio rerio* o *Danio rerio* Fig.1), un piccolo pesce tropicale d'acqua dolce. Appartenente alla famiglia dei *Cyprinidae*, originario del bacino del Gange, è diffuso nella regione himalayana sud-orientale (Pakistan, India, Bangladesh Nepal e Myanmar). In natura, vive generalmente in acque calde, lente o ferme, stagni, risaie, ruscelli e canali. Benché sia in grado di adattarsi bene a un ampio range di condizioni ambientali, quelle ottimali prevedono acqua con un valore di pH compreso tra 7.0-8.0, conducibilità attorno ai 500 μ S e temperatura compresa tra i 26-28° C.

Il nome di zebrafish deriva dalle cinque strisce orizzontali, pigmentate di blu, che decorrono sul lato

del corpo fino alla pinna caudale. La forma del corpo è affusolata; il maschio presenta un profilo più longilineo, mentre la femmina si riconosce generalmente per l'addome prominente. Il sesso si riconosce anche grazie alla colorazione delle strisce chiare, generalmente dorate nel maschio e argentate nella femmina, alternate a quelle blu. La femmina inoltre presenta una piccola papilla genitale anteriormente alla pinna anale. Una curiosità: in zebrafish non esistono dei veri e propri cromosomi sessuali, ma i geni che sono coinvolti nella determinazione del sesso si trovano sparsi su diversi cromosomi. Lo zebrafish adulto può raggiungere una lunghezza di 6 cm. È onnivoro e, in natura, si nutre prevalentemente di *fitoplancton* e *zooplancton*, larve di insetti, piccoli crostacei e vermi.

Zebrafish è un animale “fotoperiodico” e viene mantenuto con un ciclo luce-buio di 14-10 ore. L'accoppiamento avviene generalmente al mattino, la femmina depone le uova e il maschio le feconda, la fecondazione è quindi esterna.

Normalmente i pesci vengono accoppiati nel tardo pomeriggio dopo essere stati nutriti. Per l'accoppiamento i maschi e le femmine vengono trasferiti in una vasca dedicata, in cui è presente una vaschetta più piccola dotata di una “griglia” necessaria per la raccolta delle uova che vengono deposte e quindi fecondate. Le uova vengono raccolte con una pipetta di plastica, trasferite in una piastra (circa 100 uova/per piastra) e “lavate” con “H₂O pesci”; le uova non fecondate, facilmente riconoscibili, vengono allontanate e le piastre poste in un incubatore a 28°C. Nell' incubatore le uova fecondate (da questo momento embrioni) possono essere mantenute fino a 5 giorni durante i quali i ricercatori condurranno i loro esperimenti. Lo sviluppo embrionale che avviene nei primi tre giorni dopo la fecondazione procede in modo molto veloce; a 24 hpf (hour post fertilization) iniziano ad apparire i pigmenti che caratterizzeranno “le strisce” presenti nell'animale adulto e a 72 ore zebrafish ha completato in larga parte l'organogenesi ed è in grado di “nuotare”; dopo 6-7 giorni le larve sono in grado di nutrirsi e possono essere trasferite nelle vasche per allevamento. I vari stadi embrionali sono ben visibili al microscopio e fino alle 48 ore gli embrioni sono avvolti da una “membrana” chiamata *chorion*. Dopo 48-72 ore dalla fecondazione zebrafish “esce” spontaneamente dal *chorion*. Tuttavia, è possibile rimuovere gli embrioni dal *chorion* in modo meccanico o chimico anche prima della normale fuoriuscita, operazione delicata che i ricercatori eseguono quotidianamente.

Duplicazione genica ed evoluzione del genoma

Il progetto di sequenziamento del genoma di zebrafish iniziato nel 2001 dal *Sanger Institute* è giunto oggi al suo undicesimo aggiornamento e ha rivelato diverse caratteristiche peculiari di questo organismo.

I dati emersi hanno identificato che il genoma di zebrafish ha una grandezza di 1.4 gigabasi ed è distribuito su 25 cromosomi. La comparazione tra il genoma di zebrafish ed il genoma di altri vertebrati ha messo in evidenza che circa il 70% dei geni di zebrafish ha almeno una controparte (in gergo tecnico definita “gene *ortologo*”) nel genoma umano e di altri vertebrati. In zebrafish inoltre, esistono due copie di molti geni a causa di una parziale duplicazione del genoma specifica dei teleostei.

Zebrafish come organismo modello

L'utilizzo dello zebrafish come modello animale per gli esperimenti in laboratorio si deve al lavoro pionieristico del Dr. George Streisinger all'inizio degli anni '80.

Negli ultimi decenni lo zebrafish si è affermato come un organismo modello per lo studio dello sviluppo dei vertebrati e della funzione di numerosi geni. Gli studi effettuati nel pesce possono infatti affiancare, integrare e talvolta sostituire quelli condotti nel topo o al ratto.

Ricerche basate sull'utilizzo dello zebrafish hanno permesso di acquisire nuove conoscenze in diversi campi: biologia dello sviluppo, genetica, oncologia, tossicologia, farmacologia, biochimica, riproduzione e teratologia, neurobiologia, cellule staminali e medicina rigenerativa, scienze

ambientali, teorie evolutive. Tra i principali vantaggi dell'utilizzo di questo organismo come modello sperimentale vi è sicuramente l'ampia conoscenza e la facile manipolabilità del genoma. Molti geni dello sviluppo responsabili di malattie nell'uomo, oppure geni coinvolti nello sviluppo del sistema cardiaco e vascolare possiedono un gene simile in zebrafish. Poiché gli organi di zebrafish sono funzionalmente e morfologicamente simili a quelli dell'uomo, il fenotipo di molte alterazioni indotte nel genoma di zebrafish riproduce il fenotipo e la manifestazione clinica di diverse malattie umane. Tra le malattie studiate vi sono le malattie neurodegenerative e neuromuscolari come la sindrome di Alzheimer, la malattia di Parkinson, la Corea di Huntington e la distrofia muscolare di Duchenne. L'embrione di zebrafish è molto utilizzato anche per lo studio di diversi tipi di tumori. Tutti i modelli mutanti che mimano patologie umane possono essere utilizzati oltre che per lo studio delle basi patologiche della malattia anche per lo studio di nuove terapie farmacologiche.

Esiste un sito internet dedicato al modello Zebrafish, lo *ZebraFish Information Network (ZFIN)*; tale sito è un database che fornisce informazioni aggiornate e dettagliate sui principali ceppi di *Danio rerio* e vi sono inoltre depositate informazioni complete riguardanti il genoma, l'anatomia, il mantenimento e le tecniche utilizzate per la ricerca in laboratorio. Tale sito oltre ad essere un punto di riferimento per i ricercatori è anche "un punto di contatto", un'occasione di scambio d'informazioni per i vari gruppi di ricerca che utilizzano lo zebrafish come organismo modello.

Ricapitolando: Perché Zebrafish?

Take-Home Messages:

- è di piccole dimensioni, poco costoso da mantenere e non necessita di allevamenti di grosse dimensioni;
- ogni femmina può produrre fino a 100-200 uova per accoppiamento;
- la maturità sessuale è raggiunta in circa 3-4 mesi, permettendo di ottenere diverse generazioni successive in tempi brevi;
- le uova sono relativamente grandi, trasparenti e vengono fecondate dopo essere state deposte dalla femmina;
- lo sviluppo embrionale è molto rapido: gli organi sono già abbozzati 24 ore dopo la fecondazione; la fuoriuscita dell'embrione dal *chorion* (involucro esterno) avviene tra le 48 e le 72 ore dopo la fecondazione. A 72 ore tutti i principali organi (cuore, reni, cervello, intestino, sistema vascolare, occhi, branchie, pinne) e tessuti sono già sviluppati;
- l'embrione è trasparente nei primi stadi dello sviluppo, e quindi facilmente osservabile al microscopio;
- l'embrione può assorbire piccole molecole (esempio farmaci o sostanze da testare) direttamente dall'acqua in cui è immerso;
- è un vertebrato e, rispetto ad altri modelli come *D. melanogaster* e *C. elegans*, è caratterizzato da uno sviluppo e strutture anatomiche più simili all'uomo;
- il suo genoma è stato completamente sequenziato ed è facilmente manipolabile per ottenere animali transgenici che esprimono ad esempio proteine fluorescenti sotto il controllo di geni tessuto-specifici.

Avete effettuato la colorazione Alcian blue su embrioni fissati a 120 ore di sviluppo che vi ha permesso di visualizzare le cartilagini embrionali.

Cenni sullo sviluppo embrionale di zebrafish

(Kimmel et al.1995)

Con il termine di sviluppo embrionale si intende il processo che consente allo zigote di accrescersi, differenziarsi e acquisire le caratteristiche della specie a cui appartiene. Le uova deposte dalla femmina di zebrafish presentano un diametro di circa 0,7 mm. Attorno all'uovo è presente un involucri acellulare detto *chorion*. Le principali fasi di sviluppo embrionale di zebrafish possono essere distinte in:

zigote (0 – 45 min dopo la fecondazione)	1° giorno
divisione cellulare (45 min - 2h 15 min dopo la fecondazione)	1° giorno
blastula (2 h 15 min - 5h 15 min dopo la fecondazione)	1° giorno
gastrula (5 h 15 min - 10 h dopo la fecondazione)	1° giorno
segmentazione e organogenesi (10 h – 24 h dopo la fecondazione)	1° giorno
pharyngula (24 h – 48 h dopo la fecondazione)	2° giorno
hatching period (uscita dal <i>chorion</i> 48 h-72 h dopo la fecondazione)	3° giorno

Tra il momento della fecondazione e la fuoriuscita dal *chorion* trascorrono circa tre giorni.