FONDAZIONE INIZIATIVE ZOOPROFILATTICHE E ZOOTECNICHE
BRESCIA

SPECIE ACQUATICHE NELLA RICERCA SCIENTIFICA

ATTI DEL CONVEGNO

Brescia, 19 marzo 2020

1¹2

EDITO A CURA DELLA
FONDAZIONE INIZIATIVE ZOOPROFILATTICHE
E ZOOTECNICHE - BRESCIA

SPECIE ACQUATICHE
NELLA RICERCA SCIENTIFICA
Atti del Convegno

FONDAZIONE INIZIATIVE ZOOPROFILATTICHE E ZOOTECNICHE
- BRESCIA -
Responsabile scientifico: Prof. MARIO COLOMBO

SPECIE ACQUATICHE NELLA RICERCA SCIENTIFICA

Atti del Convegno

Brescia
19 marzo 2020

EDITO A CURA DELLA
FONDAZIONE INIZIATIVE ZOOPROFILATTICHE
E ZOOTECNICHE - BRESCIA
Via Istria, 3/b - 25125 Brescia

ISBN 978-88-97562-26-9

© Fondazione Iniziative Zooprofilattiche e Zootecniche - Brescia, febbraio 2020

Litos s.r.l. - Gianico (BS) 2020

INDICE

Presentazione ..... pag. VII
M. COLOMBO

Prefazione IX
G. GRIGNASCHI, F. LUZI

L'allevamento e management dello Zebrafish 1
M. VASCONI

Zebrafish, il pesce scienziato 13
L. DEL GIACCO, A. GHILARDI

L'allevamento e management dei cefalopodi e loro utilizzo nella ricerca scientifica 21
A. DI COSMO, G. POLESE, V. MASELLI

Il controllo dell'ambiente acquatico: una sfida per il microbiologo 35
DOTT.SSA P. ANNA MARTINO

Allevamento di Xenopus laevis*: principii generali* 43
E. MENEGOLA, S. CAMERONI, R. BACCHETTA, F. DI RENZO

Xenopus laevis *nella ricerca dalla biologia dello sviluppo allo studio di proteine eterologhe* 51
E. BOSSI, R. CINQUETTI, C. ROSETI, F. VACCA

PRESENTAZIONE

Quando si parla di sperimentazione animale, solitamente si pensa a specie superiori, quali: vacche, maiali, conigli, ratti, cavie, cani, primati (generalmente macachi), o comunque animali con cui l'uomo ha instaurato nei millenni una certa familiarità. La sensibilità soprattutto verso alcune delle specie citate, è andata via via crescendo nel corso degli anni, prevalentemente nei Paesi occidentali. Ciò ha determinato una reazione sociale collettiva, concretizzatasi in alleanze associative, contrarie all'uso nella sperimentazione animale, prevalentemente di suddette specie, per motivi etici e morali.

In realtà, per scelte opportunistiche o conseguenti a quanto scritto, la ricerca, da tempo ha rivolto la propria attenzione verso strumenti alternativi a quelli animali, riuscendo a volte a soddisfare gli obiettivi sperimentali e quindi a perseguire gli scopi stessi della indagine scientifica. In altri casi però, anziché fare affidamento sulle specie "consuete" o a metodi alternativi, è stata privilegiata la strada che prevede l'impiego di altre specie, meno "tradizionali". In questo quaderno monografico, gli Autori riportano alcuni esempi nell'ambito di Cefalopodi, Anfibi e Pesci.

Paradossalmente, con queste scelte, è stato possibile, per le caratteristiche loro particolari, avere riscontri scientifici più attendibili e attinenti alla tematiche della ricerca. Infatti le specificità fisiologiche e/o etologiche calzano perfettamente a misura, per dare riscontri precisi ai quesiti posti dalle sperimentazioni.

La Fondazione Iniziative Zooprofilattiche e Zootecniche, organizzando un Evento su questo argomento e dando alle stampe la pubblicazione dei lavori presentati, intende favorire la conoscenza nell'ambito dei Ricercatori e non solo, della possibilità di impiegare specie sostitutive a quelle tradizionali. Anche in questo modo, la Fondazione persegue gli obiettivi di informare, comunicare e fare crescere il mondo della ricerca e di coloro che utilizzano i suoi prodotti. Nella fattispecie, lo scopo è anche quello di informare quel mondo che intrattiene con gli animali un rapporto di particolare sensibilità e "umanità".

Il Responsabile Scientifico
Prof. MARIO COLOMBO

PREFAZIONE

L'utilizzo dei modelli animali per la ricerca scientifica è in continua evoluzione in ottemperanza al principio delle 3R (Replacement, Reduction, Refinement), criterio fondante della normativa europea (Direttiva EU 63/2010) e di quella italiana (D.Lvo 26/2014). In questa ottica quindi l'utilizzo delle specie acquatiche rappresenta una importante occasione di Refinement poiché consente di sostituire l'utilizzo di specie a più elevato sviluppo del Sistema Nervoso Centrale mantenendo però inalterata la validità scientifica del risultato. In accordo con questo principio l'utilizzo di modelli acquatici è in continuo aumento in tutto il mondo. Scopo del presente Convegno è quello di presentare e discutere le migliori procedure per l'utilizzo delle specie acquatiche maggiormente utilizzate nella ricerca scientifica sia di base, sia applicata.

Nei primi due interventi, verrà preso in considerazione l'allevamento dello zebrafish (*Danio Rerio*) che nell'ultimo trentennio ha avuto un forte sviluppo come modello animale, in molti settori della ricerca biomedica. La prolificità elevata, la trasparenza del suo embrione, la possibilità di applicazione delle più svariate tecniche di transgenesi insieme alla versatilità del suo utilizzo e ai bassi costi di gestione hanno portato alla sua adozione in numerosi campi della ricerca scientifica in sostituzione dei modelli murini.

In seguito si tratterà dei Cefalopodi, la classe di molluschi più complessa e meno rappresentata come numero di specie presenti. La Direttiva EU 63/2010, amplia per la prima volta anche ai Cefalopodi l'ambito di applicazione delle normative sulla protezione degli animali utilizzati a fini scientifici, fino a prima limitato ai solo vertebrati non umani, definendo linee guida per le pratiche di allevamento e mantenimento come animali da laboratorio. I Cefalopodi sono considerati da tempo come modelli sperimentali in molte aree di ricerca, principalmente in neuroscienze e fisiologia.

Un altro grande capitolo che accomuna tutte le specie acquatiche è il controllo della qualità dell'acqua per mezzo di un corretto campionamento, di tecniche diagnostiche definite e infine di modalità di intervento per un controllo microbiologico capillare e routinario dell'ambiente.

Infine verrà presa in considerazione la specie *Xenopus Laevis*, un anfibio anuro utilizzato già alla fine del XIX secolo per gli studi di embriologia e principalmente, negli ultimi 30 anni, negli studi di biologia dello sviluppo. Nel presente compendio si descrivono le caratteristiche della specie e le condizioni considerate ideali per l'allevamento e i principali utilizzi nella ricerca biomedica, nel rispetto del benessere animale.

Si ringrazia per la collaborazione la Fondazione Iniziative Zooprofilattiche e Zootecniche di Brescia che ha aderito con entusiasmo al progetto, realizzando anche la stampa del presente volume.

GIULIANO GRIGNASCHI
Responsabile Benessere Animale
Università degli Studi di Milano

FABIO LUZI
Responsabile Formazione Animali
da Laboratorio
Università degli Studi di Milano

L'ALLEVAMENTO E MANAGEMENT DELLO ZEBRAFISH

MAURO VASCONI
Dipartimento di Medicina Veterinaria – Università degli Studi di Milano
mauro.vasconi@unimi.it

L'allevamento dello Zebrafish (*Danio rerio*) ha avuto nell'ultimo trentennio un enorme sviluppo, legato all'utilizzo della specie come modello animale implicato in numerosi rami della ricerca biomedica. La specie ha preso il sopravvento su molte altre specie utilizzate come modello animale grazie alla versatilità del suo utilizzo e per essere il modello animale vertebrato con il minore costo di gestione. I numerosi vantaggi dell'utilizzo dello Zebrafish rispetto ad altre specie animali, e i molteplici utilizzi a cui la specie può essere destinata, verranno trattati in un altro capitolo del presente volume.

L'allevamento dello Zebrafish ha origini ben precedenti al suo utilizzo in ricerca scientifica, essendo tale specie ittica utilizzata da molto più tempo come animale ornamentale, per cui la specie è stata ben domesticata e si è perfettamente adattata alla vita in cattività. La gestione dell'animale è quindi molto semplice e alla portata di personale di laboratorio anche con una minima esperienza nella gestione di organismi acquatici. Per comprendere i parametri ambientali ottimali per l'allevamento dello Zebrafish è opportuno conoscere l'ambiente naturale in cui la specie si è evoluta e quindi prospera.

DISTRIBUZIONE E HABITAT

L'areale di distribuzione originale della specie comprende le zone poste a sud della catena dell'Himalaya, quindi le acque dolci di Pakistan, India, Nepal, Bhutan e Bangladesh. Lo Zebrafish ama vivere in piccoli corsi d'acqua con corrente moderata o in acque ferme di piccoli laghi, stagni e lanche fluviali. La specie è anche molto diffusa nelle risaie e nelle pozze d'acqua di abbeverata del bestiame. Lo Zebrafish negli ambienti in cui è presente occupa un po' tutte le nicchie ecologiche, vivendo sia nei pressi della vegetazione sommersa od emergente, sia in acque aperte, che nelle zone nei pressi dei fondali, i quali possono essere sia ghiaiosi che sabbiosi o con abbondante limo. Questa versatilità ambientale si riflette anche nell'ampia versatilità alimentare. Studi che hanno analizzato il contenuto gastrico di Zebrafish raccolto nei suoi ambienti naturali, hanno dimostrato come la specie si adatti a vari substrati alimentari, ritrovando sia componenti vegetali che animali e tra la componente animale sia organismi bentonici, che zooplancton, che organismi volatili predati sulla superficie dell'acqua. La specie è quindi a suo agio sia a nutrirsi sul fondo che in superficie, rendendo molto semplice la somministrazione di alimento artificiale nella pratica di laboratorio. Nel tempo sono stati anche analizzati i parametri qualitativi delle acque in cui lo Zebrafish è naturalmente presente. Lo Zebrafish vive in una zona caratterizzata da un clima monsonico, in cui si alternano periodi di siccità ad altri in cui abbondanti precipitazioni trasformano in acquitrini estese porzioni di territorio. Vivendo in ambienti molto vari, e in alcuni casi sopravvivendo anche per periodi limitati in acque di scarsa qualità chimica, come ad esempio i casi in cui nella stagione secca esemplari di Zebrafish sopravvivono in pozze dove per evaporazione l'acqua ha concentrato i vari elementi e composti chimici in essa disciolti, lo Zebrafish è una specie tollerante a varie condizioni ambientali, non risentendo di periodi in cui l'acqua si discosta dai valori ottimali. Bisogna però sottolineare che, se esemplari di Zebrafish vengono allevati con acque ricche di composti azotati o con valori di minerali elevati, la specie vie-

ne sottoposta a uno stress latente cronico, il quale ha un influsso negativo sia sullo status immunitario dell'animale, favorendone quindi l'insorgenza di patologie, sia sullo stato riproduttivo, causando inizialmente una perdita di fertilità che può esitare in un arresto del ciclo riproduttivo, se le condizioni non tornano a dei valori ottimali. Questo comportamento è sempre riconducibile all'ambiente naturale in cui l'animale si è evoluto, in cui la popolazione si riproduce con maggior vigore nei periodi monsonici, quando le copiose piogge portano acqua pure all'habitat della specie e gli ambienti potenzialmente abitabili si espandono notevolmente, grazie alle piene dei fiumi e all'espandersi delle acque stagnanti. La concentrazione dei soluti in acqua è quindi il segnale chimico che lo Zebrafish recepisce per dar vita allo stimolo riproduttivo che porta la popolazione di questa specie ad espandersi notevolmente in un breve periodo. L'estrema adattabilità ambientale e la facilità di allevamento ha reso questa specie una delle specie preferite agli acquariofili principianti, adatta ad essere allevata in acquari di piccole dimensioni e anche da persone non ancora perfettamente formate alla gestione di organismi acquatici. Questa versatilità, associata a molti altri fattori positivi, è stata la spinta all'utilizzo dello Zebrafish nei laboratori di ricerca biomedica. Ciononostante occorre avere la consapevolezza che l'estrema resistenza a condizioni ambientali sfavorevoli non può essere usata come escamotage per non prestare le massime attenzioni nella gestione di allevamenti di Zebrafish utilizzati a scopo di ricerca. Affinché i risultati ottenuti da un ricercatore siano confrontabili con quelli avuti da altri studiosi nel medesimo campo di ricerca, occorre che il modello animale utilizzato si trovi nelle condizioni ottimali. Ciò richiede quindi una standardizzazione dei metodi di allevamento dello Zebrafish, in modo che tutti i laboratori in cui l'animale viene utilizzato si trovino nelle medesime condizioni operative. La ricerca moderna infatti non si può permettere il lusso di utilizzare modelli animali senza produrre risultati corretti, quindi non vi può essere nessun fattore esterno alla ricerca che potenzialmente ne possa alterare i risultati, soprattutto nei casi in cui per ottenere tali risultati sono stati sacrificati degli animali. L'etica applicata all'utilizzo di essere viventi nella ricerca biomedica ha imposto una tendenza a ridurre al minore numero possibile gli animali che devono essere utilizzati e sacrificati per favorire il progresso delle conoscenze, ed è altresì necessario fornire le migliori condizioni possibili agli esemplari impiegati.

La specie raggiunge la maturità sessuale già verso i tre mesi di età, mentre per quello che riguarda la sua longevità, lo Zebrafish vive in media 18 mesi. Nelle condizioni ideali che si possono ottenere in laboratorio si sono registrati casi di esemplari che hanno raggiunto anche i 3 anni di età, ma questi episodi sono delle eccezioni. Bisogna sottolineare come comunque pesci di età superiori all'anno e mezzo non vengono più utilizzati come riproduttori in quanto le loro performances riproduttive sono scarse.

STRUTTURE DI ALLEVAMENTO

Impianto

Lo Zebrafish viene allevato in speciali strutture a lui dedicate e progettate per questo scopo. In commercio sono disponibili numerose soluzioni adattabili a tutte le esigenze e disponibilità economiche. Esistono sia soluzioni stand alone, dove in un'unica unità sono presenti sia le vasche di allevamento che la componentistica dedicata alle strumentazioni necessarie per il mantenimento delle ottimali condizioni dell'acqua di allevamento, sia soluzioni che prevedono delle unità di allevamento da connettere a un circuito idrico che si occupa poi separatamente di fornire acqua depurata alle vasche e filtrare l'acqua reflua. Entrambe le soluzioni hanno la medesima validità e la scelta tra l'una o l'altra dipende più che altro da questioni di spazio e budget. Concettualmente uno stabulario per Zebrafish ha lo stesso schema di funzionamento di un acquario domestico, ovvero una parte in cui sono presenti gli animali

e una parte di filtro che si occupa di garantire il corretto smaltimento dei cataboliti prodotti dal metabolismo animale e riportare l'acqua utilizzata a delle caratteristiche chimiche ottimali per la vita degli organismi acquatici. La filtrazione in acquariologia si basa su sistemi che comprendono tre vie per ottenere la depurazione dell'acqua, ovvero una filtrazione di tipo meccanica, una filtrazione biologica e una filtrazione chimica. La filtrazione meccanica si basa sulla capacità di alcuni materiali di trattenere i solidi sospesi presenti in acqua. Tale filtrazione è rappresentata solitamente in acquario da spugne di differente porosità, mentre i più sofisticati sistemi di allevamento per Zebrafish sono dotati di filtro a cartuccia in grado di trattenere particelle di dimensione variabile a seconda della cartuccia usata. Solitamente i sistemi prevedono un doppio filtro, il cui primo è più permeabile (120-150 micron), seguito da uno più selettivo (50 micron). Tali filtri a cartuccia sono dotati di manometro per il controllo della pressione interna e quindi per avere sempre sott'occhio la necessità di pulizia/sostituzione della cartuccia installata. Nei sistemi di maggior dimensioni, dove l'impianto di filtrazione è indipendente dalle vasche di allevamento, la filtrazione meccanica può essere effettuata tramite filtri a tamburo. Tali filtri hanno una maglia di rete rotante che può avere dimensioni di filtrazione diverse; a tali setacci sono collegati dei sensori di pressione, i quali, quando la maglia è sporca, registrano un aumento di pressione dell'acqua e azionano un sistema di contro lavaggio, che, spruzzando acqua in pressione in senso opposto al normale senso di circolazione dell'acqua in impianto, elimina il particolato imprigionato nelle rete e lo allontana tramite un sistema di scarico. Una volta che l'acqua si è depurata delle particelle in sospensione, passa attraverso il filtro biologico. Tale unità è deputata alla trasformazione di composti azotati tossici per i pesci, prodotti dal loro stesso metabolismo, in composti dalla tossicità minore e che quindi si possono accumulare in acqua senza apportare danno al pesce medesimo. Nello specifico il catabolismo proteico, molto attivo nei pesci per la produzione di energia necessaria al loro sostentamento, porta tali animali a produrre un significativo quantitativo di ammonica, la quale, data la sua piccola dimensione e permeabilità alle membrane cellulari, viene liberata tal quale dall'apparato branchiale dei pesci nell'ambiente circostante. In acqua l'ammoniaca può rimanere tale o passare nella forma di ammonio. Ammoniaca e ammonio sono due forme diverse dell'azoto. Il fattore più importante per determinare il rapporto tra ammoniaca e ammonio nell'acqua è il pH. È importante ricordare che l'NH_3 non ionizzato può essere pericoloso per gli organismi acquatici, in quanto, come precedentemente detto, attraversa facilmente le membrane cellulari, mentre l'ammonio ionizzato è sostanzialmente innocuo. La relazione fra ammoniaca e ammonio è controllata dalla seguente equazione chimica:

$$NH_3 + H_2O <-> NH_4^+ + OH^-$$

In condizioni di acidità, la reazione è diretta verso destra, mentre quando è basico è diretta verso sinistra. In generale, a una temperatura prossima alla temperatura ambiente, per un pH inferiore a 6,0 la proporzione tra ammonio-N più ammoniaca-N sotto forma di NH^3 è molto bassa, mentre quella sotto forma di NH_4^+ è molto alta. A un pH di circa 8,0, la proporzione di NH3 è minore o uguale al 10%, mentre per un pH lievemente superiore a 9,0 tale proporzione è attorno al 50%. Per questo motivo solitamente è molto più rischioso gestire pesci in acque basiche piuttosto che acide.

La trasformazione dell'ammoniaca in un composto meno dannoso avviene attraverso due passaggi distinti. Il primo prevede l'ossidazione dell'ammoniaca a nitrito NO_2 mentre nel secondo il nitrito viene ossidato a nitrato NO_3. Entrambi questi passaggi sono eseguiti da particolari popolazioni batteriche (*Nitrobacter e Nitrosomonas*). La comparsa di ossigeno nei prodotti di queste reazioni rende evidente come per una corretta funzione del filtro biologico, il quale non è altro che un ambiente ricco dei batteri nitrificanti, sia indispensabile avere un'acqua correttamente ossigenata, pena la mancata trasfor-

mazione dell'ammoniaca. Per questo motivo è meglio predisporre, prima del filtro biologico, una stazione di ossigenazione dell'acqua, che, visti gli scarsi consumi di ossigeno che si hanno nei sistemi di allevamento degli Zebrafish, può essere semplicemente costituita da una vasca in cui sono presenti pietre porose che insufflano aria ambientale in acqua. Lo scambio gassoso tra la superficie delle bollicine di aria immesse in acqua consente sia di apportare ossigeno in quantità vicine ai livelli di saturazione, che di allontanare gas disciolti nocivi alla salute dei pesci, come il diossido di carbonio prodotto dai pesci medesimi. Il filtro biologico strutturalmente è molto semplice, essendo costituito solamente da un substrato che offre la maggior superficie possibile, colonizzabile quindi dai batteri che ne garantiscono il funzionamento, nel minor volume. Sono stati studiati dei supporti plastici sferoidali con molti anfratti, che sviluppano il miglior rapporto tra superficie sviluppata nell'unità di volume, i quali garantiscono ottime prestazioni di trasformazione dell'ammoniaca anche in volumi ristretti. È necessario precisare, nel momento in cui si descrive la funzione di un filtro biologico, che tale sistema di filtraggio, basandosi su un fattore biotico, ovvero una popolazione batterica, non è subito attivo al momento della sua messa in opera, ma sarà necessario un periodo di fisiologica maturazione del filtro prima che esso raggiunga la piena funzionalità. Tale periodo può essere notevolmente accorciato grazie a degli starter disponibili in commercio che forniscono al sistema di filtraggio una notevole quantità di colonie batteriche vitali che potranno quindi rapidamente colonizzare il filtro e renderlo pienamente efficiente. Risulta evidente che nel tempo i sistemi di allevamento a ricircolo, tenderanno ad accumulare il prodotto finale delle reazioni viste pocanzi in acqua, ovvero i nitrati. Per tenere sotto controllo il valore di questi ultimi, che comunque causano stress e possono quindi compromettere lo status sanitario degli Zebrafish solamente a concertazioni elevate, si pratica un ricambio parziale di acqua costante, che può essere quantificato in una percentuale che può andare da 5 al 10% del volume totale. In questo modo il valore dei nitrati in acqua non salirà mai sopra i valori stressanti e si manterrà costante nel tempo. Il filtro biologico, a differenza dei filtri di altre

Tab. 1. – Diversa percentuale di presenza di ammoniaca in acqua a seconda del pH e temperatura.

	Temperature (°C)														
pH	**4**	**6**	**8**	**10**	**12**	**14**	**16**	**18**	**20**	**22**	**24**	**26**	**28**	**30**	**32**
7.0	0.11	0.13	0.16	0.18	0.22	0.25	0.29	0.34	0.39	0.46	0.52	0.60	0.69	0.80	0.91
7.2	0.18	0.21	0.25	0.29	0.34	0.40	0.46	0.54	0.62	0.82	0.83	0.96	1.10	1.26	1.44
7.4	0.29	0.34	0.40	0.46	0.54	0.63	0.73	0.85	0.98	1.14	1.31	1.50	1.73	1.98	2.26
7.6	0.45	0.53	0.63	0.73	0.86	1.00	1.16	1.34	1.55	1.79	2.06	2.36	2.71	3.10	3.53
7.8	0.72	0.84	0.99	1.16	1.35	1.57	1.82	2.11	2.44	2.81	3.22	3.70	4.23	4.82	5.48
8.0	1.13	1.33	1.56	1.82	2.12	2.47	2.86	3.30	3.81	4.38	5.02	5.74	6.54	7.43	8.42
8.2	1.79	2.10	2.45	2.86	3.32	3.85	4.45	5.14	5.90	6.76	7.72	8.80	9.98	11.29	12.72
8.4	2.80	3.28	3.83	4.45	5.17	5.97	6.88	7.90	9.04	10.31	11.71	13.26	14.95	16.78	18.77
8.6	4.37	5.10	5.93	6.88	7.95	9.14	10.48	11.97	13.61	15.41	17.37	19.50	21.78	24.22	26.80
8.8	6.75	7.85	9.09	10.48	12.04	13.76	15.66	17.73	19.98	22.41	25.00	27.74	30.62	33.62	36.72
9.0	10.30	11.90	13.68	15.65	17.82	20.18	22.73	25.46	28.36	31.40	34.56	37.83	41.16	44.53	47.91
9.2	15.39	17.63	20.08	22.73	25.58	28.61	31.80	35.12	38.55	42.04	45.57	49.09	52.58	55.99	59.31
9.4	22.38	25.33	28.47	31.80	35.26	38.84	42.49	46.18	49.85	53.48	57.02	60.45	63.73	66.85	69.79
9.6	31.36	34.96	38.38	42.49	46.33	50.16	53.94	57.62	61.17	64.56	67.77	70.78	73.58	76.17	78.55
9.8	42.00	46.00	50.00	53.94	57.78	61.47	64.99	68.31	71.40	74.28	76.92	79.33	81.53	83.51	85.30
10.0	53.44	57.45	61.31	64.98	68.44	71.66	74.63	77.35	79.83	82.07	84.08	85.88	87.49	88.92	90.19
10.2	64.53	68.15	71.52	74.63	77.46	80.03	82.34	84.41	86.25	87.88	89.33	90.60	91.73	92.71	93.58

(Da Emerson K., R.C. Russo, R.E. Lund and R.V. Thurston. 1975. Aqueous ammonia equilibrium calculations: effect of pH and temperature. J. Fish. Res. Board Can., 32:2379-2383).

tipologie, non richiede molta manutenzione, basandosi su un ciclo vitale di batteri che si rinnova di continuo. Esso deve essere pulito una volta ogni sei mesi, o ad ogni svuotamento dell'impianto. Una manipolazione più frequente del filtro biologico ne può compromettere la funzionalità.

Lo step successivo alla filtrazione biologica comprende una filtrazione di tipo chimico. Alla base di questo tipo di filtrazione vi è la necessità di eliminare dall'acqua composti disciolti che non vengono mitigati dall'opera del filtro biologico. La filtrazione chimica può ad esempio eliminare composti quali i fosfati, anche essi presenti negli scarti metabolici legati all'alimentazione dei pesci, e che, se presenti in eccesso in acqua, possono causare sia stress all'animale, sia la proliferazione di alghe acquatiche con conseguente scadimento delle condizioni ambientali delle vasche di allevamento dei pesci. Per rimuovere questi composti si può ricorrere a diverse sostanze, che possono svolgere una filtrazione chimica selettiva o meno. Il più classico esempio di materiale filtrante non selettivo è il carbone attivo, un carbone vegetale attivato tramite repentino riscaldamento termico associato ad un altrettanto repentino raffreddamento. Questo processo crea microfratture nella struttura del carbone e rende disponibili sulla superficie del medesimo siti di legame a diversa affinità chimica. Molte sostanze presenti in acqua andranno quindi a legarsi ai siti di legame venendo quindi trattenuti dai carboni. Il carbone attivo è quindi molto efficiente nel trattenere sostanze, ma non è in grado di scegliere cosa eliminare dall'acqua, potendo quindi causare un depauperamento di composti utili al metabolismo dei pesci. Esistono altre sostanze studiate per eliminare specifici composti dall'acqua, il cui esempio migliore è la zeolite, una sostanza minerale formata da un micro reticolo, al cui interno le molecole da eliminare vengono selettivamente intrappolate. Sia carbone attivo che zeolite hanno la necessità di venire periodicamente sostituite una volta che la loro efficacia cala a causa dell'esaurimento dei siti di legame che le varie sostanze dispongono.

L'ultimo step che l'acqua compie, prima di ritornar nel circuito che alimenta le vasche di allevamento dei pesci, comprende il passaggio da una unità di sterilizzazione, formata da lampade UV, i quali denaturando il DNA hanno effetto germicida. È importante che le lampade UV siano poste nel punto in cui l'acqua risulti già priva di corpuscolato in sospensione, in quanto la presenza di eventuali particelle può schermare l'azione dei raggi UV e non colpire eventuali microorganismi dannosi che possono essere presenti sulla superficie dei corpi sospesi non esposta ai raggi. Il sistema descritto fino ad ora può essere considerato come base per un impianto di allevamento di Zebrafish a scopo di ricerca. Negli impianti più sofisticati sono presenti altre strutture in grado di controllare altri parametri dell'acqua di allevamento. Ad esempio si possono inserire delle sonde di pH collegate a serbatoi di soluzione tampone in grado di erogare tali soluzioni in caso di scostamento del valore di pH rispetto a quello programmato. Un altro accessorio con cui si può implementare la funzionalità dell'impianto di allevamento comprende un serbatoio in cui viene riversata acqua ultrapura ottenuta da un impianto ad osmosi inversa, alla quale in automatico vengono aggiunte soluzioni saline in grado di riportare l'acqua alla concentrazione osmotica ottimale. Tale serbatoio si connette al sistema e fornisce il ricambio idrico visto precedentemente in grado sia di compensare le perdite dovute alla eventuale fuoriuscita di acqua dall'impianto, quale ad esempio l'acqua persa durante le operazioni di pulizia delle vasche di allevamento o quella che si perde con i contro lavaggi dei filtri a tamburo, sia di ricambiare il volume di acqua giornaliero necessario per il controllo dei livelli di nitrati. All'interno del sistema di filtraggio è solitamente posto anche il controllo della temperatura dell'acqua. Tale strumento non è implicato nella pulizia dell'acqua ma serve solamente a mantenere alla corretta temperatura l'acqua di allevamento. Essendo lo Zebrafish un pesce sviluppatosi in un clima tropicale, il sistema servirà essenzialmente a scaldare l'acqua dell'impianto e sarà costitu-

ito da una resistenza elettrica azionata da un termostato, settato alla temperatura desiderata. Occorre comunque precisare che tale strumento servirà solamente ad evitare fluttuazioni della temperatura dell'acqua, la quale sarà comunque portata a valori prossimi alla temperatura desiderata tramite la regolazione della temperatura ambientale della stanza in cui è presente l'impianto. Collocare un impianto di allevamento di Zebrafish in un locale freddo è altamente sconsigliato in quanto il lavoro eccessivo richiesto ai riscaldatori dell'acqua ne influisce su funzionalità e precisione. Inoltre la presenza di acqua sensibilmente più calda rispetto all'ambiente in cui viene collocata causa una eccessiva evaporazione della stessa, con l'effetto di portare a una concentrazione dei soluti presenti in acqua e quindi un allontanamento costante dei valori dell'acqua rispetto a quelli desiderati.

Tab 2. – Principali parametri di riferimento da considerare per garantire condizioni standard di allevamento di Zebrafish.

Parametro	**Valore ottimale**
Alcalinità	50-150 mg / L $_{CaCO3}$
pH	6,8-7,5 (6,0-8,5 tollerata)
Salinità	0,5-1 g / L
Conducibilità	300 -1.500 mS
Temperatura	26-28,5°C
Ossigeno disciolto	> 6,0 mg / L
Durezza	50-100 mg / L $_{CaCO3}$
Ammoniaca	<0,02 mg / L
Nitrato (NO 3-)	<50 mg / L
Nitriti (NO 2-)	<0,1 mg / L

Vasche

Le vasche in cui materialmente sono contenuti i pesci hanno subìto negli anni una notevole evoluzione, migliorando sensibilmente per quello che riguarda la circolazione dell'acqua all'interno delle vasche stesse. Un corretto flusso di acqua è importante per non disturbare i pesci, i quali, come visto in precedenza, non amano particolarmente le zone a alta velocità di corrente idrica, ma allo stesso modo deve garantire per quanto possibile l'abolizione di zone morte all'interno delle vasche, dove si potrebbero poi accumulare feci e cibo non ingerito dai pesci. Tali sostanze devono invece essere convogliate in un apposito scomparto presente all'interno della vasca a cui si può collegare un sifone e, agendo su di esso, aspirare tutto lo scarto che si desidera eliminare dalla vasca. Per ottenere questo effetto le vasche hanno pareti con particolari inclinazioni e un ingresso ed uscita dell'acqua posto in modo tale da creare un flusso idrico ben controllato e canalizzato per il raggiungimento degli scopi appena citati. Le vasche di allevamento vengono raggruppate in particolari supporti, impilate in più fila e colonne, fino a completare dei rack chiamati anche armadi. Queste strutture hanno dei binari a cui le vasche si appoggiano, facilitandone l'estrazione e rimozione dall'unità di allevamento. Ad ogni vasca si devono connettere i tubi di entrata ed uscita dell'acqua e ognuno di essi è dotato di una valvola, la quale consente di interrompere il flusso d'acqua in ogni singola vasca senza avere ripercussioni sulle altre vasche che condividono il circuito idrico. Solitamente una struttura di allevamento comprende vasche di dimensione differente, che vanno da una capacità di un litro, utilizzata per l'accrescimento dei giovanili, sino alle vasche da 5-10 litri utilizzate per gli adulti. Dimensioni di vasche differenti consentono di adeguare la densità a cui si tengono gli esemplari di Zebrafish a secondo della loro dimensione. Le case produttrici delle vaschette in plastica solitamente forniscono anche gli strumenti di lavoro ad esse dedicati, quali ad esempio i retini che servono per la cattura dei pesci, i quali presentano una forma sovrapponibile alla sezione della vasca, in modo da poter far scorrere i retini all'interno della vasca occupandone tutta la sezione e quindi imprigionare tutti i pesci contenuti nella vasca con una unica pescata, senza quindi dover ripetere più volte l'operazione, cosa che causerebbe uno stress maggiore ai pesci che si tenta di catturare. Sia le vasche, che i reti-

ni, che tutti gli accessori utilizzati nei sistemi di allevamento per Zebrafish, sono di materiale plastico atossico e autoclavabile. Le ditte specializzate nella produzione di sistemi di allevamento solitamente producono anche autoclavi e macchine di lavaggio dedicate ad accogliere la strumentazione e che sono progettate per un lavaggio completo dei vari componenti senza il rischio di danneggiamento.

Le vasche devono essere illuminate e generalmente si ricorre all'illuminazione ambientale, fornendo 14 ore di luce e 10 di buio.

Gli Zebrafish vengono solitamente tenuti a delle densità di 5 individui per litro da adulti. Nelle fasi di crescita il numero di individui per unità di volume è maggiore, arrivando a 25 esemplari per litro durante la fase larvale e a 15 esemplari per litro nella fase giovanile.

ALIMENTAZIONE

L'alimentazione dello Zebrafish si è evoluta nel tempo grazie al sempre più intensivo utilizzo che questo animale ha avuto nei laboratori di ricerca. Se fino a 15 anni or sono non vi erano delle linee di alimenti artificiali dedicati alla specie e quindi si ricorreva ad utilizzare mangimi studiati per l'acquaristica, ora esistono in commercio linee di mangimi che seguono l'alimentazione dello Zebrafish dallo svezzamento fino all'adulto e alla riproduzione. L'alimento viene normalmente fornito due volte al giorno ed è bene che l'operatore osservi nel dettaglio come gli animali si alimentano, per registrare, al primo segnale, delle alterazioni del comportamento alimentare che possono essere il preludio a patologie. In molte strutture di allevamento rimane comunque l'abitudine di fornire, in associazione con i mangimi artificiali costituiti da mangime estruso di varie dimensioni, anche dell'alimento vivo. Tale alimento viene utilizzato soprattutto per gli animali non direttamente utilizzati per la ricerca ma, ad esempio, è una ottima integrazione per i pesci riproduttori, ovvero i pesci da cui ottenere le uova che verranno poi utilizzate per le sperimentazioni. Una integrazione con alimento vivo produce infatti come risultato un aumento della fecondità degli animali e uova di qualità superiore rispetto ad animali alimentati esclusivamente con dieta artificiale. Come alimento vivo vengono utilizzati nauplii, ovvero forme larvali, di *Artemia salina* ed adulti del medesimo crostaceo. Tale piccolo crostaceo vive abitualmente nei laghi salati o in lagune e produce delle uova in grado di sopravvivere per anni anche in assenza di acqua, come risposta evolutiva alla vita in corpi idrici in cui, in alcuni momenti dell'anno, l'acqua contenuta presenta dei valori di salinità non compatibili con la vita di questi animali. Gli adulti di artemia salina quando registrano un aumento di salinità dell'acqua modificano il loro comportamento riproduttivo ed emettono uova racchiuse in cisti che proteggono l'embrione dall'ambiente esterno. Le cisti sono disidratate e possono venire raccolte e stoccate anche per mesi in ambiente asciutto, consentendone anche la commercializzazione. Una volta che le cisti devono venire usate esse devono essere reidratate. A tale procedimento l'embrione contenuto al loro interno riprende il proprio sviluppo ed è in grado di emergere dall'uovo e dare vita a una nuova generazione di artemie. I nauplii di Artemia sono anche utilizzati come primo alimento per le larve di Zebrafish, una volta che esse hanno esaurito le loro riserve alimentari endogene, ovvero il residuo del sacco vitellino embrionale. Inizialmente venivano utilizzate culture di Paramecium, ma studi recenti hanno dimostrato come sia possibile alimentare con successo le larve di Zebrafish partendo direttamente con nauplii di artemia, avendo solo l'accortezza di utilizzarne ceppi nani, che presentando dimensioni minori possono essere preda delle larve appena queste cominciano ad alimentarsi di alimento esogeno. Sono state testate delle diete artificiali utilizzabili come primo alimento per le larve di Zebrafish, ma ad oggi i risultati ottenuti con queste diete non sono ancora paragonabili a quelli che si hanno con l'alimento vivo. Probabilmente la larva di Zebrafish, come del resto molte altre specie ittiche, ha necessità dello stimo-

lo visivo di una preda in movimento per scatenare il comportamento alimentare, quindi un alimento inerme viene ingerito con meno frequenza e può quindi causare problemi di denutrizione nelle larve portando ad un mancato accrescimento e di conseguenza alla morte. L'utilizzo di nauplii come alimento larvale richiede però una procedura atta ad eliminare dall'alimento somministrato anche le eventuali cisti di artemia non schiuse, in quanto la struttura cistica non viene degradata dagli enzimi digestivi dei pesci e, data la sua dimensione paragonabile al diametro del lume intestinale delle larve di pesce, essa può causare ostruzioni intestinali che portano quindi alla morte degli individui che ingeriscono cisti intere. Per questo motivo è necessario attuare delle procedure che ci permettono o di separare completamente le cisti di artemia dai nauplii, oppure di eroderne la parete in modo da lasciare esposto solamente l'uovo di artemia, privato della sua capsula protettiva. Questa seconda opzione viene effettuata con dei bagni acidi in cui vengono sciolte le cisti, seguiti da un tamponamento per riportare le uova a pH neutro e non comprometterne la vitalità. La procedura è abbastanza delicata e prevede utilizzo di acidi e basi forti il cui utilizzo espone l'operatore a dei rischi. Inoltre un errore nella tempistica di applicazione di uno dei passaggi è in grado di provocare la morte delle uova di artemia impedendone la schiusa. Per questi motivi solitamente il decapsulamento delle cisti di artemia è l'opzione meno praticata per l'ottenimento di nauplii privi di cisti. Il secondo metodo prevede la separazione di nauplii e cisti, sfruttando la tendenza dei nauplii di nuotare in zone maggiormente illuminate. Il procedimento è quindi il seguente e prevede l'utilizzo di un contenitore conico dove far schiudere le cisti. Le cisti vengono prima reidratate in acqua dolce per 20 minuti, in modo da riattivarne la vitalità. Successivamente sono poste in acqua marina nel contenitore conico, trasparente e dotato di un rubinetto al suo vertice, il cui azionamento consente lo svuotamento del recipiente. Le cisti, mantenute in costante agitazione da un aeratore a pietra porosa posto sul fondo del cono, schiudono in circa 24 ore a temperatura di 20°C. A schiusa completa si spegne l'aeratore e lo si estrae. Ad acqua ferma si accende una luce circa a metà dell'altezza del cono. I nauplii liberi da cisti nuoteranno nella colonna d'acqua avvicinandosi alla sorgente luminosa, mentre le cisti schiuse saliranno in superficie e quelle non schiuse precipiteranno sul fondo del contenitore, producendo una perfetta separazione. Azionando quindi il rubinetto si potranno scartare, con la prima acqua in uscita dal cono, le cisti non schiuse e pericolose per i pesce, mentre nel volume di acqua seguente si potranno recuperare i nauplii. Essi verranno quindi sciacquati con acqua pulita e immessi nelle vasche dove sono presenti le larve da alimentare. Esiste una ulteriore tecnica per ottenere una perfetta separazione di cisti ed nauplii, ovvero l'utilizzo di cisti di Artemia magnetizzate. Queste cisti sono prodotte da una industria che si occupa dell'alimentazione per pesci di acquacoltura ed è riuscita a caricare magneticamente le pareti delle cisti. Una volta che le cisti sono state reidratate e i nauplii sono schiusi sarà quindi semplice allontanare tutte le cisti dall'acqua di allevamento semplicemente inserendovi un magnete, a cui confluiranno solamente le cisti, mentre i nauplii rimarranno liberi di nuotare in acqua.

I nauplii di Artemia sono un ottimo alimento in quanto contengono naturalmente un elevato quantitativo di lipidi di alta qualità, ricchi di acidi grassi omega-3. Se invece che alimentare le larve di Zebrafis si vorranno alimentare gli adulti, si potrà procedere all'accrescimento delle Artemie. Per ottenere adulti di artemia dal profilo nutrizionale ottimale è bene quindi alimentare le artemie in accrescimento con degli integratori ricchi dei nutrienti che vogliamo vengano veicolati ai pesci che stiamo allevando. In commercio sono disponibili vari arricchitori costituiti da paste di alghe unicellulari, le quali conferiscono alle artemie sia acidi grassi essenziali, che numerose vitamine ed antiossidanti, i quali garantiranno i nutrienti per i pesci nella loro forma più biodisponibile e naturale. Lo stimolo presentato all'adulto di Zebrafish fornendo un alimento vivo che si muove da-

vanti ad esso, costituisce un forte stimolo alimentare che è in grado di migliorare lo stato di salute generale del pesce e di conseguenza anche le performance riproduttive.

L'alimento artificiale viene somministrato tramite dei dispenser in ogni vasca, che consentono di dosare precisamente i quantitativi di alimento e di standardizzarne il dosaggio e distribuzione. Le case produttrici che progettano e realizzano le strutture di allevamento hanno ideato anche questi utili accessori che si innestano perfettamente sulle aperture presenti nelle vaschette di allevamento. La somministrazione dell'alimento vivo, soprattutto per quello che riguarda i nauplii, viene invece eseguita con siringa connessa ad una cannula. I nauplii essendo organismi di acqua marina non vivono a lungo nelle acque dolci in cui vengono allevati gli Zebrafish, per cui è bene inserirli in acqua proprio nelle vicinanze delle larve dei pesci, in quanto in breve tempo esse muoiono e non vengono più predate dai pesci. Sia nell'alimentazione di adulti che di larve è bene interrompere il flusso di acqua nelle vasca, in modo che la corrente idrica non allontani troppo velocemente il cibo dai pesci provocando una mancata assunzione di alimento e un aumento del rifiuto prodotto nell'impianto.

RIPRODUZIONE

Molti esperimenti che utilizzano Zebrafish si basano sull'utilizzo delle uova fecondate e delle larve prima che esse abbiano cominciato ad alimentarsi. Questa tendenza deriva dal fatto che l'utilizzo di embrioni e larve di pesci che non hanno ancora cominciato ad assumere alimento ha un iter più snello per quello che riguarda l'autorizzazione all'utilizzo di animali nella sperimentazione. Risulta quindi evidente che la produzione continua di un buon numero di uova sia una necessità costante per i laboratori che utilizzano Zebrafish come modello animale. La riproduzione di questa specie è abbastanza semplice, motivo che ha contribuito al successo nell'utilizzo di questo pesce come animale da laboratorio. Lo Zebrafish ha una riproduzione continua, con cicli di produzione di uova molto ravvicinati, che possono anche avvenire ogni 2-3 giorni. Un utilizzo così continuo e massiccio produce però alla lunga un esaurimento della capacità riproduttiva delle femmine di Zebrafish, con perdita di numero di uova prodotte a deposizione e percentuale di schiusa. Per questo motivo si tende a utilizzare le femmine per la riproduzione circa una volta a settimana, in modo che nel periodo tra due deposizioni successive vi sia uno stop riproduttivo che consenta all'animale di reintegrare energie e nutrienti per la riproduzione successiva. La riproduzione può essere gestita sia come riproduzione di massa che facendo riprodurre individui selezionati, scegliendone il partner. La scelta si basa sugli obiettivi che il ricercatore deve perseguire, se ottenere un gran numero di uova oppure pochi individui ma di una ben precisa linea genetica o con caratteristiche particolari. È anche possibile eseguire la riproduzione artificiale con la manipolazione dei gameti. Per ottenere un elevato successo riproduttivo è necessario che gli esemplari utilizzati per la riproduzione siano mantenuti in acqua dalle migliori caratteristiche qualitative, in quanto, come visto in precedenza, un acqua di scarsa qualità può portare l'animale ad interrompere il suo ciclo riproduttivo in attesa di condizioni ambientali migliori.

RIPRODUZIONE DI MASSA

Per ottenere quotidianamente un elevato numero di uova si può ricorrere alla riproduzione di massa, agendo su un cospicuo numero di riproduttori contemporaneamente. I riproduttori vengono selezionati e spostati dalle vasche di allevamento alla vasca di riproduzione, la quale ha una conformazione particolare, studiata appositamente per lo scopo. Lo Zebrafish presenta un dimorfismo sessuale riconoscibile osservando la forma del corpo del pesce. Le femmine si presentano più rotondeggianti e con colorazione meno brillante, mentre i maschi hanno un corpo più slanciato e con pigmentazione più cari-

ca. È bene introdurre un numero di femmine ben superiore ai maschi e non esagerare con gli individui di sesso maschile. I maschi di Zebrafish hanno infatti un comportamento competitivo e le lotte che si generano tra di essi possono portare alla morte degli individui più deboli. D'altra parte è stato dimostrato che la visione da parte delle femmine di comportamenti ostili tra i vari maschi presenti nel banco ha il vantaggio di stimolare la produzione di gameti di qualità maggiore. I maschi hanno anche un comportamento di corteggiamento verso le femmine che vengono stimolate alla deposizione anche tramite colpetti sull'addome portati con il muso dal maschio. La riproduzione avviene alle prime luci dell'alba. Entro la prima ora dall'accensione dell'illuminazione le femmine avranno deposto le uova, le quali saranno immediatamente fecondate dai maschi che seguono le femmine nell'atto di emettere le uova. Le uova sono di grosse dimensioni se rapportate alla dimensione degli Zebrafish, intorno a 1mm di diametro, e sono completamente trasparenti e non adesive. Esse cadono sul fondo della vasca. Sfruttando questo comportamento la vasca di riproduzione ha un fondo a tronco di piramide, separato da un setto con dei pori attraversabili dalle uova ma non dai pesci adulti. Le uova cadranno quindi sul fondo della vasca raccogliendosi nel bicchiere di raccolta e gli adulti non potranno più raggiungerle. Ciò serve ad evitare la predazione che le uova potrebbero subire dopo la deposizione da parte di altri riproduttori. Prima che queste vasche venissero messe in commercio vi era l'abitudine di utilizzare delle normali vasche di stabulazione, dove venivano stabulati Zebrafish di un unico genere. Per avere la riproduzione si andavano ad inserire esemplari dell'altro genere, tenendo un rapporto di maschi femmine 2:1. Per impedire la predazione delle uova si ricopriva il fondo della vasca di biglie di vetro, tra cui le uova possono penetrare e raggiungere il fondo della vasca in sicurezza. Avvenuta la riproduzione si andavano ad estrarre sia i pesci che le biglie, ottenendo le uova deposte libere sul fondo della vasca e potendole quindi facilmente prelevare per il loro utilizzo successivo. Una femmina di solito produce un centinaio di uova trasparenti in una singola emissione. Un buon cluster di uova viene considerato di 80-300 uova di cui almeno l'80% è fecondato. Le uova non fecondate si possono riconoscere poche ore dopo la deposizione in quanto presentano una colorazione bianca e non è possibile veder l'embrione contenuto nel suo percorso di sviluppo. Le uova non fecondate o morte devono essere allontanate il prima possibile dal resto delle uova in quanto esse vanno in contro a degradazione e possono essere un centro di contagio per il resto delle uova, soprattutto di infezioni funginee.

RIPRODUZIONE DI COPPIA

Se vogliamo riprodurre dei particolari esemplari di Zebrafish per ottenere delle linee selezionate, è possibile organizzare la riproduzione con coppie selezionate di riproduttori. Tali pesci devono essere inseriti il giorno precedente alla riproduzione in apposite vaschette, simili a quelle di allevamento, ma che possono essere divise con un setto permeabile all'acqua e che hanno un fondo grigliato dove le uova, una volta deposte, possono cadere e rimanere al sicuro dalla predazione. Maschio e femmina vengono posti nei due settori della vasca, ma garantendo un contatto visivo ai due esemplari e il passaggio di acqua da uno scomparto all'altro, in quanto affinché la fertilità dei due esemplari sia massima occorre che essi si possano vedere e che possano scambiarsi vicendevolmente dei segnali costituiti da ferormoni. Al mattino con la prima illuminazione della vasca si procede a rimuovere il setto e la riproduzione avrà luogo nell'ora successiva. È importante non lasciare maschio e femmina in uno spazio ristretto per un periodo troppo lungo con possibilità di contatto in quanto il maschio potrebbe avere un comportamento troppo irruento nei confronti della femmina e portarle uno stress tale da compromettere la sua fisiologia riproduttiva. La medesima vasca viene utilizzata anche per ottenere dei gameti dai pesci con cui poi poter eseguire

una riproduzione artificiale. Maschio e femmina rimangono separati ma a contatto tutta la notte e il mattino non vengono liberati nel medesimo spazio, ma prelevati per il prelievo delle gonadi. I pesci possono venire anestetizzati tramite bagno in Tricaina alla concentrazione di 150 mg/l. Una volta che i pesci hanno perso la capacità di mantenere l'equilibrio e presentano un ritmo respiratorio lento e costante possono essere appoggiati su appositi posizionatori, tenuti umidi per non danneggiare la cute del pesce, e tramite una leggera pressione sull'addome, si possono far fuoriuscire sia le uova che lo sperma a seconda del sesso dell'animale. È importante sottolineare che in caso di prelievo di sperma è importante aspirare il liquido seminale con una pipetta direttamente dal polo genitale del pesce, impedendo che esso entri in contatto con l'acqua. Gli spermatozoi dei pesci sono infatti emessi dal maschio in una stato inattivato ed in questo stato possono essere conservati per il loro successivo utilizzo, mentre appena essi entrano in contatto con l'acqua subiscono il processo di attivazione che li porterà a morte in pochi minuti, eliminandone il potere fecondante.

Le uova fecondate, qualsiasi sia il metodo con il quale sono state prodotte, devono essere raccolte tramite sifonamento con tubi del calibro idoneo, per non essere danneggiate. Le uova vengono quindi messe ad incubare in piastre di Petri, disinfettandole prima con soluzioni differenti in base al protocollo sperimentale a cui le uova saranno destinate. Come disinfettanti si possono utilizzare soluzioni con blu di metilene, iodopovidone o ipoclorito di sodio.

Il completo sviluppo embrionale si completa in 72h dalla fecondazione per le uova tenute a 28°C . Alla schiusa la larva presenta una sviluppo molto incompleto, non presentando ad esempio un apparato digerente funzionante. A 5 giorni dalla schiusa le larve hanno esaurito le riserve del vitellino e cominciano ad alimentarsi attivamente. Contemporaneamente vi è la prima insufflazione della vescica natatoria e la capacità di nuoto dell'animale comincia a svilupparsi con la differenziazione delle pinne. In fase larvale precoce vi è un'unica pinna che percorre il corpo del pesce dal capo all'apertura anale. Passati i primi dieci giorni dalla schiusa, fase identificata come fase larvale precoce, il pesce attraversa la sua fase larvale tardiva che lo porterà in un mese ad avere l'aspetto definitivo simile a quello dell'individuo adulto.

BIBLIOGRAFIA

Carvalho, A. P., Araújo, L. and Santos, M. M. (2006), Rearing zebrafish (*Danio rerio*) larvae without live food: evaluation of a commercial, a practical and a purified starter diet on larval performance. Aquaculture Research, 37: 1107-1111. doi:10.1111/j.1365-2109.2006.01534.x

Engeszer R.E., Patterson L.B., Rao A.A., Parichy D.M. Zebrafish in the wild: a review of natural history and new notes from the field. Zebrafish. 2007 4(1):21-40.

Farias M, Certal AC (2016) Different Feeds and Feeding Regimens have an Impact on Zebrafish Larval Rearing and Breeding Performance. SOJ Aquatic Res 1(1): 1-8

Lawrence C. Advances in Zebrafish Husbandry and Management. In Methods in Cell Biology

Editor(s): H. William Detrich, Monte Westerfield, Leonard I. Zon, Academic Press, Volume 104, 2011, Pages 429-451, ISSN 0091-679X, ISBN 9780123748140

Lawrence C. The husbandry of zebrafish (Danio rerio): A review. Aquaculture, 269 Issues 1-4 2007: 1-20

Nasiadka A., Matthew D. Clark, Zebrafish Breeding in the Laboratory Environment, ILAR Journal, Volume 53, Issue 2, June 2012, Pages 161–168, https://doi.org/10.1093/ilar.53.2.161

ZEBRAFISH, IL PESCE SCIENZIATO

LUCA DEL GIACCO, ANNA GHILARDI
Dipartimento di Bioscienze, Università degli Studi di Milano
Corresponding Author: Luca Del Giacco, Dipartimento di Bioscienze, Università degli Studi di Milano, via Giovanni Celoria, 26, 20133 Milano (MI), Italy
Tel. +39 02 50314807 – Email: luca.delgiacco@unimi.it

INTRODUZIONE

Lo zebrafish (nome scientifico *Danio rerio*) è un piccolo pesce tropicale d'acqua dolce originario del sud est asiatico. Diverse sue caratteristiche, tra le quali sicuramente la facilità d'allevamento, l'essere prolifico per tutto l'anno e la trasparenza del suo embrione, lo hanno reso modello d'elezione per lo studio delle più disparate problematiche di ordine biologico. Inoltre, la sua estrema manipolabilità e la possibilità di applicare in zebrafish le più avanzate tecniche di transgenesi e *genome editing*, ne ha rafforzato la presenza nei laboratori di ricerca di tutto il mondo.

In questa presentazione si intende fornire una visione generale del modello zebrafish, partendo dallo sviluppo embrionale per arrivare alle motivazioni che hanno portato alla sua adozione come strumento insostituibile in innumerevoli campi della ricerca scientifica.

Zebrafish è un pesce teleosteo appartenente alla famiglia dei Ciprinidi. La sua prima descrizione in letteratura, ad opera del medico e naturalista scozzese Francis Hamilton, risale ai primi dell'800; Hamilton, studiando la flora e la fauna dell'Asia meridionale si imbatte in questo piccolo pesciolino (l'adulto misura circa 3 cm in lunghezza) che descrive come 'bello', ma anche 'insipido' e probabilmente di scarso valore economico (Hamilton, 1822). L'ambiente naturale dello zebrafish sono i corsi d'acqua lenta o ferma delle pianure alluvionali di Bangladesh, India, Nepal e Pakistan, sebbene i massivi cambiamenti ambientali di origine antropica ne fanno un abitante molto presente anche nelle acque associate alla coltivazione del riso. Lo zebrafish preferisce acque calde, relativamente limpide e lente con una certa vegetazione e un fondo limoso, anche se sono stati trovati in una varietà di ambienti diversi (Arunachalam et al., 2013; Engeszer et al., 2007; McClure et al., 2006; Parichy, 2015; Spence et al., 2006, 2008; Suriyampola et al., 2016). Sebbene zebrafish venga allevato in laboratorio alla temperatura di 28/28.5°C, ceppi selvatici sopravvivono anche a temperature comprese tra 24,6° e 38,6°C senza segni di stress termico (Engeszer et al., 2007).

Sebbene la sua riproduzione in natura sia associata alla stagione dei monsoni (Mahapatra et al., 2004; Spence et al., 2006, 2008; Suriyampola et al., 2016), zebrafish in condizioni di laboratorio è in grado di riprodursi per tutto l'arco dell'anno, senza manifestare alcun tipo di stagionalità, consentendo così ai ricercatori di ottenere giornalmente un cospicuo numero di embrioni per la sperimentazione. Lo sviluppo embrionale di zebrafish, così come la fecondazione delle uova, sono eventi che si verificano esternamente al corpo della femmina adulta. L'accoppiamento avviene solitamente alle prime luci dell'alba (Hisaoka & Firlit, 1962; Legault, 1958; Spence et al., 2007), motivo per il quale, per ottenere embrioni in laboratorio, i maschi e le femmine adulti vengono fatti accoppiare all'accensione della luce artificiale, che mima il sorgere del sole. Brevemente, il maschio e la femmina, la sera precedente l'accoppiamento, vengono alloggiati in una vaschetta (vaschetta d'accoppiamento) ma rimangono fisicamente separati da una piccola parete di materiale trasparente. La mattina seguente, all'accendersi delle luci, la parete di separazione viene rimossa e i pesci sono in grado di interagire. Il maschio *corteggia* la femmina - la insegue colpendola ripetutamente sul fianco - portandola alla deposizione delle uova

che vengono immediatamente fecondate dagli spermatozoi rilasciati dal maschio che la insegue da vicino (Darrow & Harris, 2004). Una femmina può deporre centinaia di uova per accoppiamento (Hisaoka & Firlit, 1962) ad intervalli di circa 10 giorni l'uno dall'altro. Purtroppo, il destino dell'uovo fecondato (zigote) sarebbe quello di essere cannibalizzato dai genitori; per tale motivo nelle vaschette d'accoppiamento utilizzate in laboratorio si interpone, tra i pesci e il fondo della vaschetta, una fitta rete che consenta il passaggio delle uova fecondate (che vanno quindi ad adagiarsi sul fondo) ma che impedisca agli adulti di cibarsene.

Lo zebrafish è caratterizzato da uno sviluppo embrionale incredibilmente rapido (in circa 48 ore di sviluppo il 'piccolo' è già una larva in grado di nuotare) che è possibile seguire nel dettaglio in ogni sua fase grazie alla trasparenza dell'embrione (Fig. 1) e dell'involucro, detto corion, che lo circonda (Kimmel et al., 1995). Il corion è una struttura coriacea di natura glicoproteica che conferisce all'embrione una protezione contro insulti meccanici e, in parte, anche chimici e biologici; l'unica via di accesso attraverso il corion che lo spermatozoo ha per arrivare all'uovo deposto e fecondarlo è costituita dal micropilo, un 'foro' passante che mette in comunicazione l'ambiente esterno con il plasmalemma dell'uovo: lo spermatozoo di zebrafish che, come quello di tutti i pesci Teleostei risulta privo di acrosoma, attraversa il micropilo e si fonde alla cellula uovo (Bonsignorio et al. 1996; Del Giacco et al., 1998; Del Giacco et al., 2000). Dopo la fecondazione il micropilo viene chiuso, il corion si solleva dall'uovo e il citoplasma più chiaro si sposta al polo animale dell'embrione, separando il blastodisco (la regione dello zigote da cui origina l'embrione) dalla più grande massa di tuorlo (o vitello) sottostante, che rappresenta il materiale di riserva di cui si nutre l'embrione durante i primi giorni di sviluppo. A partire da circa 45 minuti dopo la fecondazione, il blastodisco va incontro ad una divisione di tipo meroblastico/discoidale, mentre il vitello rimane indiviso e confinato in quella che viene definita cellula del vitello. Ogni ciclo cellulare impiega circa 15 minuti e le divisioni si verificano in modo sincrono. A partire dal quarto ciclo cellulare (passaggio da 8 a 16 blastomeri), le divisioni cellulari iniziano a separare completamente alcune cellule dal vitello, mentre altre (cellule marginali) rimangono ad esso collegate (Kimmel et al., 1995). Col procedere delle divisioni cellulari si produce una massa di cellule al polo animale dell'embrione in via di sviluppo, chiamata blastoderma. In concomitanza col decimo ciclo cellulare l'embrione inizia la fase detta della transizione di media blastula *(mid-blastula transition)*, dove le divisioni cellulari si allungano e diventano asincrone, i blastomeri iniziano la trascrizione dei loro genomi, piuttosto che affidarsi agli mRNA di origine materna, ed acquisiscono capacità migratorie così da potersi organiz-

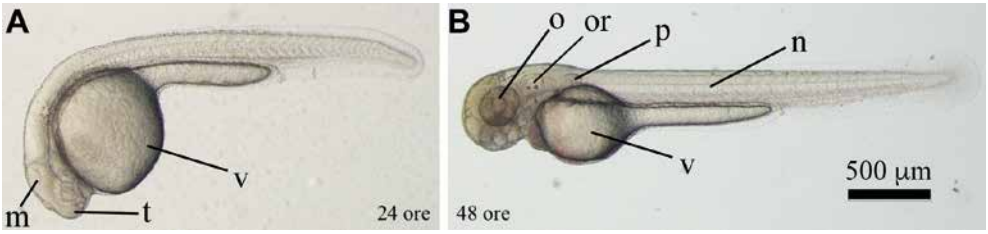

Figura 1 – Foto allo stereomicroscopio di embrioni di zebrafish. Nel pannello sono ritratti embrioni di zebrafish a 24 (A) e 48 ore di sviluppo (B), orientati con l'estremità anteriore verso sinistra e quella dorsale verso l'alto. La trasparenza dei tessuti consente di osservare anche strutture interne all'embrione (ad esempio le vescicole encefaliche e la notocorda).
Abbreviazioni: v, vitello (materiale di riserva che viene gradualmente assorbito durante i primi giorni di sviluppo); t, telencefalo; m, mesencefalo; o, occhio; or, orecchio; p, pinna; n, notocorda.

zare, successivamente, nei tre foglietti embrionali, ecto-, meso- ed endoderma (Kane & Kimmel, 1993). Sempre in questo periodo, le cellule marginali a ridosso della cellula del vitello collassano, spingendo i loro nuclei e contenuti citoplasmatici nel vitello stesso, formando così uno strato sinciziale di vitello multinucleato chiamato strato sinciziale vitellino *(YSL, yolk syncytial layer)*, una struttura peculiare dei pesci Teleostei che è vitale per i movimenti cellulari che seguiranno (Kimmel & Law, 1985; Kimmel et al., 1995). Infatti, è proprio grazie allo YSL e al sistema di microtubuli ad esso connesso che le cellule del blastoderma cominciano, secondo un movimento detto di epibolia, a scorrere sulla cellula del vitello per circondarla completamente (Bruce, 2016). Sulla base della percentuale di vitello coperta dalle cellule del blastoderma che stanno compiendo l'epibolia si definiscono gli stadi embrionali in questa fase dello sviluppo. Al 50% di epibolia una quota delle cellule che stanno compiendo il viaggio dal polo animale a quello vegetativo si separano e si muovono 'a ritroso' verso il polo animale; ciò determina la formazione di due distinte popolazioni cellulari: la prima, che continua a compiere l'epibolia, che costituisce l'epiblasto (precursore dell'ectoderma) e la seconda - che risale al di sotto della prima, verso il polo animale – che rappresenta l'ipoblasto (precursore di endo- e mesoderma); ha così inizio la gastrulazione. Negli istanti immediatamente successivi si apprezza la formazione di un accumulo di cellule (lo scudo embrionale o *shield*) in un punto discreto dell'equatore dell'embrione; lo scudo embrionale marca il futuro lato dorsale dell'embrione e rappresenta un'area cruciale per la definizione dell'asse dorso-ventrale, incluso il differenziamento del sistema nervoso. A circa 10 ore dalla fecondazione il processo di epibolia si è completato e tutta la cellula del vitello è stata inglobata dall'embrione; si possono quindi apprezzare la formazione dell'abbozzo della regione caudale *(tailbud)*, vicino a quello che era il polo vegetativo dell'embrione, così come l'abbozzo della regione cefalica nei pressi di quello che era il polo animale. Quindi inizia la segmentazione del mesoderma del tronco in somiti, segmentazione che procede in senso antero-posteriore, con i primi somiti che si formano ogni 20 minuti e i successivi ogni 30 (Kimmel et al., 1995). Contemporaneamente ha luogo la neurulazione, processo che culmina con la formazione del tubo neurale a partire da una regione specifica del foglietto ectodermico. Lo sviluppo prosegue rapidamente: a circa 24 ore dalla fecondazione la maggior parte dei principali organi è formata. La schiusa dei pesci dal loro corion avviene, in genere, tra le 48 e le 72 dalla fecondazione e, convenzionalmente, segna la fine del periodo embrionale e marca l'ingresso nel periodo larvale (Kimmel et al., 1995). Tra i 3 e i 4 giorni di sviluppo la vescica natatoria comincia a funzionare consentendo il nuoto in verticale all'interno della colonna d'acqua (Müller e van Leeuwen, 2004; Parichy et al., 2009). Dalla fine del giorno 5 la larva è in grado di aprire la bocca e nutrirsi autonomamente, palesando anche degli atteggiamenti predatori (Muto & Kawakami, 2013).

Tutte le fasi dello sviluppo poc'anzi descritte si riferiscono ad embrioni e larve incubati a 28,5°C; deviazioni sia verso il basso sia verso l'alto della temperatura modificano il tasso di sviluppo (Kimmel et al., 1995). Il periodo di crescita larvale segue il periodo embrionale e si protrae per circa un mese, mentre la maturità sessuale viene raggiunta intorno ai 120 giorni post-fecondazione. Sebbene possa vivere anche parecchi anni, lo zebrafish comincia a mostrare segni di invecchiamento intorno ai 2 anni di vita (Gerhard et al., 2002).

I meccanismi alla base della determinazione del sesso e del differenziamento delle gonadi in zebrafish sono ancora oggetto di dibattito; non risulta esistere una coppia di cromosomi sessuali, ma si ritiene comunque che il sesso in zebrafish venga determinato principalmente per via genetica e non ambientale (più geni autosomici sarebbero coinvolti), anche se l'ambiente può influenzare i suddetti meccanismi a diversi livelli (Liew and Orbàn, 2013).

VITA DA LABORATORIO

Lo zebrafish nasce come modello per lo studio della biologia dello sviluppo dei Vertebrati. L'interesse degli scienziati per questo organismo risale almeno agli anni '30, quando Charles Creaser lo utilizzò nei laboratori sperimentali didattici e nella ricerca (Creaser, 1934). Sebbene a partire dagli anni '40 diversi gruppi utilizzavano zebrafish per studiare lo sviluppo embrionale, il comportamento, la neurobiologia la formazione di tumori e per saggi tossicologici e di teratogenicità (Battle & Hisaoka, 1952; Endo & Ingalls, 1968; Hisaoka & Firlit, 1962; Marrable, 1965), l'ampia diffusione dello zebrafish come modello sperimentale è da attribuirsi a George Streisinger, che era alla ricerca di un Vertebrato che potesse essere impiegato negli studi genetici e, come acquariofilo, ne aveva compreso i numerosi vantaggi (Walker & Streisinger, 1983).

Qualche anno più tardi Christiane Nüsslein-Volhard, già premio Nobel per gli studi condotti su *Drosophila* tra gli anni '70 ed '80, organizzò uno *screening* di mutagenesi su larga scala utilizzando proprio zebrafish, identificando oltre 4000 linee mutanti che interessavano vari aspetti dello sviluppo embrionale. La descrizione di una selezione di queste linee è stata pubblicata in un numero speciale della rivista *Development* (Haffter et al., 1996) e negli anni seguenti numerosi laboratori di tutto il mondo hanno dedicato i loro sforzi all'identificazioni dei geni la cui alterazione era alla base dell'insorgenza dei fenotipi alterati di sviluppo. Inoltre, negli anni '90, zebrafish veniva inserito nel progetto genoma e il sequenziamento del suo DNA veniva completato nel 2013 (Howe et al., 2013), mettendo in evidenza come il genoma di zebrafish e quello umano contenessero approssimativamente lo stesso numero di geni e che circa il 70% di questi fossero tra loro omologhi. Infine, circa l'85% dei geni associati a malattia identificati fino ad ora nell'uomo hanno un corrispettivo in zebrafish (Howe et al., 2013).

Un importante aspetto relativo al genoma di zebrafish che deve essere tenuto in opportuna considerazione quando si decide di intraprendere studi che prevedano, ad esempio, l'inattivazione di uno specifico gene di interesse, è che zebrafish possiede non uno, bensì due ortologhi di molti dei geni dei Mammiferi. Ciò sembrerebbe dovuto ad un evento di tetraploidizzazione, avvenuto tra 280 e 350 milioni di anni fa, alla base della radiazione che ha portato all'evoluzione dei pesci Teleostei. Ormai, dopo tutto questo tempo, lo zebrafish non è più tetraploide (è tornato ad essere un organismo diploide) ma, nonostante ciò, presenta due ortologhi in circa il 30% dei casi quando comparato ai Mammiferi (Pasquier et al., 2017).

L'estrema facilità della micromanipolazione degli embrioni di zebrafish, insieme all'introduzione di tecnologie di transgenesi sempre più efficienti quali quella basata sulla *Sce*I meganucleasi e, soprattutto, i sistemi fondati sull'uso dei trasposoni come il Tol2 o lo *Sleeping Beauty* hanno notevolmente facilitato la possibilità di inserire casualmente sequenze transgeniche nel genoma di zebrafish (Davidson et al., 2003; Kawakami, 2007; Kwan et al., 2007). Ciò ha consentito, ad esempio, di generare delle linee reporter che esprimono proteine fluorescenti in distretti specifici dell'embrione che vengono così marcati e possono venire monitorati, durante lo sviluppo, nell'embrione *in vivo* (Pan et al., 2013).

La disponibilità della sequenza del genoma ha consentito di sviluppare strategie per condurre esperimenti di genetica inversa (intervento sito-specifico sul DNA genomico e analisi del fenotipo eventualmente indotto) allo scopo di studiare la funzione di un particolare gene di interesse. Una delle tecniche più diffuse che consente l'ablazione funzionale transiente di un gene è quella che prevede l'iniezione nello zigote di oligomeri antisenso chiamati morfolino, che riconoscono, in quanto complementari, il mRNA del gene da inattivare e ne bloccano la traduzione determinando un decremento della quantità della proteina corrisponden-

te nell'embrione in sviluppo (Nasevicius & Ekker, 2000). Per l'alterazione stabile del gene (o dei geni) di interesse si ricorre invece alle tecniche di modificazione del genoma. Le strategie per l'editing del genoma in zebrafish erano inizialmente basate sull'utilizzo di tecniche macchinose quali le nucleasi ZFN e TALEN (Zu et al., 2013). Più recentemente, l'evoluzione del sistema CRISPR/Cas9, basato sul sistema immunitario delle cellule batteriche, ha reso l'*editing* genomico, anche in zebrafish, estremamente semplice ed immediato, oltre che molto economico (Li et al., 2016).

Poiché gli organismi acquatici sono sensibili alle sostanze presenti nel mezzo, zebrafish (ma soprattutto i suoi embrioni) è diventato un modello imprescindibile per *screening* tossicologici allo scopo di identificare sostanze potenzialmente carcinogeniche o teratogeniche (Parenti et al., 2019; Parolini et al., 2019). Per lo stesso motivo gli embrioni di zebrafish rappresentano un valido strumento per identificare composti in grado di migliorare o revertire fenotipi alterati (Benedetti et al., 2016). Data la loro ridotta dimensione (pochi millimetri), un numero elevato di embrioni e larve può così venire trattato con differenti composti (o con concentrazioni differenti del medesimo composto) aggiunti direttamente all'acqua, consentendo così quelli che vengono definiti degli *high-throughput unbiased screening*, cioè l'analisi su larga scala di un alto numero di composti potenzialmente attivi in un singolo esperimento senza avere la necessità di conoscere, a priori, nessuna informazione riguardante le molecole indagate.

Questo scritto vuole essere solo una brevissima introduzione al sistema zebrafish che, come è possibile intuire anche solo da una rapida occhiata alla crescita esponenziale del numero di pubblicazioni che lo vedono protagonista (Meyers, 2018), si sta affermano in innumerevoli ambiti della ricerca scientifica e non solo (qui non riportati per ovvi motivi di spazio), ambiti che vanno dalla rigenerazione di tessuti ed organi, allo studio del comportamento, alla generazione di modelli malattia.

BIBLIOGRAFIA

Arunachalam, M., Raja, M., Vijayakumar, C., Malaiammal, P., & Mayden, R. L. (2013). Natural history of zebrafish *(Danio rerio)* in India. Zebrafish, 10, 1–14. doi: 10.1089/zeb.2012.0803.

Battle, H. I., & Hisaoka, K. K. (1952). Effects of ethyl carbamate (Urethan) on the early development of the teleost *Brachydanio rerio*. Cancer Research, 12, 334–340.

Bonsignorio, D., Perego, L., Del Giacco, L., and Cotelli, F. (1996). Structure and macromolecular composition of the zebrafish egg chorion. *Zygote*, 4:101-108.

Darrow, K. O., & Harris, W. A. (2004). Characterization and development of courtship in zebrafish, Danio rerio. Zebrafish, 1, 40–45. doi: 10.1089/154585404774101662.

Davidson, A. E., Balciunas, D., Mohn, D., Shaffer, J., Hermanson, S., Sivasubbu, S., Cliff M. P., Hackett P. B., Ekker S. C. (2003). Efficient gene delivery and gene expression in zebrafish using the Sleeping Beauty transposon. Developmental Biology, 263, 191-202. doi: 10.1016/j.ydbio.2003.07.013.

Del Giacco, L., Vanoni, C., Bonsignorio, D., Duga, S., Mosconi, G., Santucci, A., and Cotelli, F. (1998). Identification and spatial distribution of the mRNA encoding the gp49 component of the gilthead sea bream, *Sparus aurata*, egg envelope. *Molecular Reproduction and Development*, 49:58-69.

Del Giacco, L., Diani, S., and Cotelli, F. (2000). Identification and spatial distribution of the mRNA encoding an egg envelope component of the Cyprinid zebrafish, *Danio rerio*, homologous to the mammalian ZP3 (ZPC). *Development Genes and Evolution,* 210:41-46.

Endo, A., & Ingalls, T. H. (1968). Chromosomes of the zebra fish. A model for cytogenetic, embryologic, and ecologic study. The Journal of heredity, 59, 382–384. doi: 10.1093/oxfordjournals.jhered.a107755.

Engeszer, R. E., Patterson, L. B., Rao, A. A., & Parichy, D. M. (2007). Zebrafish in the wild: A review of natural history and new notes from the field. Zebrafish, 4, 21–40. doi: 10.1089/zeb.2006.9997.

Gerhard, G. S., Kauffman, E. J., Wang, X., Stewart, R., Moore, J. L., Kasales, C. J., Demidenko, E., & Cheng, K. C. (2002). Life spans and senescent phenotypes in two strains of Zebrafish *(Danio rerio)*. Experimental Gerontology, 37, 1055–1068. doi: 10.1016/S0531-5565(02)00088-8.

Haffter, P., Odenthal, J., Mullins, M. C., Lin, S., Farrell, M. J., Vogelsang, E., Haas F., Brand M., van Eeden F. J., Furutani-Seiki M., Granato M., Hammerschmidt M., Heisenberg C. P., Jiang Y. J., Kane D. A., Kelsh R. N., Hopkins N., & Nüsslein-Volhard, C. (1996). Mutations affecting pigmentation and shape of the adult zebrafish. Development Genes and Evolution, 206, 260–276. doi: 10.1007/s004270050051.

Hamilton, F. 1822. An account of the fishes found in the river Ganges and its branches. Edinburgh: A. Constable and Company.

Hisaoka, K. K., & Firlit, C. F. (1962). Ovarian cycle and egg production in the zebrafish, *Brachydanio rerio*. Copeia, 1962, 788. doi: 10.2307/1440680.

Howe, K., Clark, M. D., Torroja, C. F., Torrance, J., Berthelot, C., Muffato, M., *et al*. (2013). The zebrafish reference genome sequence and its relationship to the human genome. Nature, 496, 498–503. doi: 10.1038/nature12111.

Kane, D. A., & Kimmel, C. B. (1993). The zebrafish midblastula transition. Development (Cambridge, England), 119, 447– 456.

Kawakami, K. (2007). Tol2: A versatile gene transfer vector in vertebrates. Genome Biology, 8, 1–10. doi: 10.1186/gb-2007-8-s1-s7.

Kimmel, C. B., Ballard, W. W., Kimmel, S. R., Ullmann, B., & Schilling, T. F. (1995). Stages of embryonic development of the zebrafish. Developmental Dynamics, 203, 253–310. doi: 10.1002/aja.1002030302.

Kimmel, C. B., & Law, R. D. (1985). Cell lineage of zebrafish blastomeres. II. Formation of the yolk syncytial layer. Developmental Biology, 108, 86–93. doi: 10.1016/0012-1606(85)90011-9.

Kwan, K. M., Fujimoto, E., Grabher, C., Mangum, B. D., Hardy, M. E., Campbell, D. S., Parant J. M., Yost H. J., Kanki J. P., & Chien, C. B. (2007). The Tol2kit: A multisite gateway-based construction Kit for Tol2 transposon transgenesis constructs. Developmental Dynamics, 236, 3088–3099. doi: 10.1002/dvdy.21343.

Legault, R. (1958). A Technique for Controlling the Time of Daily Spawning and Collecting of Eggs of the Zebra Fish, *Brachydanio rerio (Hamilton-Buchanan)*. Copeia, 1958, 328. doi: 10.2307/1439968.

Li, M., Zhao, L., Page-McCaw, P. S., & Chen, W. (2016). Zebrafish Genome Engineering Using the CRISPR Cas9 System. Trends in Genetics, 32, 815–827. doi: 10.1016/j.tig.2016.10.005.

Liew, W. C., & Orbán, L. (2014). Zebrafish sex: A complicated affair. Briefings in Functional Genomics, 13, 172–187. doi: 10.1093/bfgp/elt041.

Mahapatra, B., Vinod, K., & Mandal, B. 2004. Studies on reproductive biology of a native ornamental fish, Brachydanio rerio, from NEH region. In Current Issues in Environmental and Fish Biology: Proceedings of UGC-DSA National Seminar on Environmental and Fish Biology, February 01-03, 2002. (S. Bhattacharya and S. Maitra, eds.) pp. 173–179. Daya, Delhi.

Marrable, A. W. (1965). Cell numbers during cleavage of the zebra fish egg. Journal of Embryology and Experimental Morphology, 14, 15–24.

McClure, M. M., McIntyre, P. B., & McCune, A. R. (2006). Notes on the natural diet and habitat of eight danionin fishes, including the zebrafish *Danio rerio*. Journal of Fish Biology, 69, 553–570. doi: 10.1111/j.1095-8649.2006.01125.x.

Meyers, J.R. (2018). Zebrafish: Development of a Vertebrate Model Organism.

Current Protocols Essential Laboratory Techniques Volume 16, Issue 1

Müller, U. K., & van Leeuwen, J. L. (2004). Swimming of larval zebrafish: Ontogeny of body waves and implications for locomotory development. The Journal of experimental biology, 207, 853– 868. doi: 10.1242/jeb.00821.

Muto, A., & Kawakami, K. (2013). Prey capture in zebrafish larvae serves as a model to study cognitive functions. Frontiers in Neural Circuits, 7, 1–5. doi: 10.3389/fncir.2013.00110.

Nasevicius, A., & Ekker, S. (2000). Effective targeted gene "knockdown" in zebrafish. Nature Genetics, 26, 216–220. doi: 10.1038/79951.

Pan, Y. A., Freundlich, T., Weissman, T. a, Schoppik, D., Wang, X. C., Zimmerman, S., Ciruna B., Sanes J. R., Lichtman J. W., & Schier, A. F. (2013). Zebrabow: Multispectral cell labeling for cell tracing and lineage analysis in zebrafish. Development, 140, 2835–2846. doi: 10.1242/dev.094631.

Parenti C.C., Ghilardi, A., Della Torre, C., Magni, S., Del Giacco, L, Binelli, A. (2019). Evaluation of the infiltration of polystyrene nanobeads in zebrafish embryo tissues after short-term exposure and the related biochemical and behavioural effects. Environ Pollut., 254(Pt A):112947. doi: 10.1016/j.envpol.2019.07.115.

Parichy, D. M. (2015). Advancing biology through a deeper understanding of zebrafish ecology and evolution. eLife, 4, 1-11. doi: 10.7554/eLife.05635.

Parichy, D. M., Elizondo, M. R., Mills, M. G., Gordon, T. N., & Engeszer, R. E. (2009). Normal table of postembryonic zebrafish development: Staging by externally visible anatomy of the living fish. Developmental Dynamics, 238, 2975–3015. doi: 10.1002/dvdy.22113.

Parolini, M., Ghilardi, A., De Felice, B., Del Giacco, L. (2019). Environmental concentration of fluoxetine disturbs larvae behavior and increases the defense response at molecular level in zebrafish (Danio rerio). Environ Sci Pollut Res Int. doi: 10.1007/s11356-019-06619-4.

Pasquier, J., Braasch I., Batzel, P., Cabau, C., Montfort, J., Nguyen, T., Jouanno, E., Berthelot, C., Klopp, C., Journot, L., Postlethwait, J.H., Guiguen, Y., Julien, B. (2017). Evolution of gene expression after whole-genome duplication: New insights from the spotted gar genome. J Exp Zool B Mol Dev Evol., 328:709-721. doi: 10.1002/jez.b.22770.

Spence, R., Ashton, R., & Smith, C. (2007). Oviposition decisions are mediated by spawning site quality in wild and domesticated zebrafish, *Danio rerio*. Behaviour, 144, 953–966. doi: 10.1163/156853907781492726.

Spence, R., Fatema, M. K., Reichard, M., Huq, K. A., Wahab, M. A., Ahmed, Z. F., & Smith, C. (2006). The distribution and habitat preferences of the zebrafish in Bangladesh. Journal of Fish Biology, 69, 1435–1448. doi: 10.1111/j.1095-8649.2006.01206.x.

Spence, R., Gerlach, G., Lawrence, C., & Smith, C. (2008). The behaviour and ecology of the zebrafish, *Danio rerio*. Biological Reviews, 83, 13–34. doi: 10.1111/j.1469-185X.2007.00030.x.

Suriyampola, P. S., Shelton, D. S., Shukla, R., Roy, T., Bhat, A., & Martins, E. P. (2016). Zebrafish social behavior in the wild. Zebrafish, 13, 1–8. doi: 10.1089/zeb.2015.1159.

Walker, C., & Streisinger, G. (1983). Induction of mutations by gamma-rays in pregonial germ cells of zebrafish embryos. Genetics, 103, 125–136.

Zu, Y., Tong, X., Wang, Z., Liu, D., Pan, R., Li, Z., Hu Y., Luo Z., Huang P., Wu Q., Zhu Z., Zhang B., & Lin, S. (2013). TALEN-mediated precise genome modification by homologous recombination in zebrafish. Nature Methods, 10, 329–331. doi: 10.1038/nmeth.2374.

L'ALLEVAMENTO E MANAGEMENT DEI CEFALOPODI E LORO UTILIZZO NELLA RICERCA SCIENTIFICA

ANNA DI COSMO, GIANLUCA POLESE, VALERIA MASELLI
dicosmo@unina.it
Dipartimento di Biologia, Università degli Studi di Napoli Federico II, Napoli
Task Force Blue Italian Growth BIG FED II – MARE

I CEFALOPODI

I cefalopodi sono la classe di molluschi più complessa e meno rappresentata, in termini di numero di specie (Hanlon and Messenger 1996). Con i loro grandi occhi e il loro comportamento "intelligente", affascinano da sempre l'umanità fin dalle antiche culture minoica, greca e cinese attirando l'attenzione non solo degli scienziati. Includono esclusivamente animali marini che hanno colonizzato sia le acque superficiali che quelle profonde, occupando una vasta gamma di nicchie ecologiche. Vivono in tutti gli oceani del mondo, ad eccezione del Mar Nero e del Mar Caspio. Sono stati tra i grandi predatori che hanno dominato gli oceani durante la loro lunga storia geologica. Si sono evoluti durante l'era Cambriana, popolarono i mari prima dei pesci, divenendo predatori dominanti e a loro volta preda di altri grandi predatori, con un ruolo importante nelle reti trofiche degli ecosistemi marini (Jereb and Roper 2005; Pierce et al. 2008). Rappresentano a tutt'oggi un importante fonte di cibo per molte specie marine e per l'uomo. Nel corso degli ultimi 60 anni negli oceani e mari del mondo il numero di cefalopodi è aumentato (Doubleday et al. 2016). Attualmente si ritiene che i cambiamenti su vasta scala dell'ambiente marino, causati dalle attività umane, quali il riscaldamento globale e la pesca eccessiva delle specie ittiche (predatrici e competitori dei cefalopodi), rappresentino il driver dell'aumento globale dei cefalopodi.

Gli scienziati sono stati sempre attratti dalle capacità esibite da alcuni cefalopodi (polpi, seppie e calamari), che consentono loro di fare cose che non ci si aspetterebbe da un mollusco: apprendono (Grasso and Basil 2009; Hochner et al. 2006), memorizzano e mostrano comportamenti sofisticati in natura quando mettono in atto strategie di predazione, difesa e riproduzione (De Lisa et al. 2012; De Lisa et al. 2013; Hanlon and Messenger 1996; Hvorecny et al. 2007). Inoltre dormono (Frank et al. 2012), mostrano una sorta di "personalità" (Godfrey-Smith 2016; Mather 2008; Pronk et al. 2010) e sono in grado di utilizzare strumenti (Huffard 2013). I polpi, in particolare, sono abili nel cambiare il loro comportamento per adattarsi a diverse circostanze (Norman et al. 2001). Questo tipo di comportamento adattativo suggerisce che questi animali possiedono coscienza e capacità di percepire il dolore, una proprietà che gioca un ruolo fondamentale nel modellare il loro comportamento in natura (Crook and Walters 2011; Vitti 2013; Winlow et al. 2018). Questa loro grande capacità adattativa potrebbe essere collegata ad un'altra intrigante caratteristica scoperta recentemente grazie al sequenziamento del genoma e del trascrittoma di *Octopus bimaculoides:* la capacità di modificare alcuni geni, cambiando l'RNA che codifica per le proteine (Albertin et al. 2015; Liscovitch-Brauer et al. 2017). Convenzionalmente si ritiene che l'RNA agisca come un messaggero intermedio, tra il DNA e le proteine, ma può accadere che l'RNA modificato, cambiando le proprie istruzioni genetiche, crei proteine che non sono originariamente codificate nel DNA, permettendo ad un organismo di aggiungere nuove proteine al suo modello genetico di base; questo meccanismo è definito *RNA-editing*. I coleoidi hanno decine di migliaia di cosiddetti siti di ricodifica dell'RNA, quindi più del 60% delle trascrizioni di RNA viene ricodificato mediante *editing*, un valore incredibilmente più alto di quello osservato in altri animali, tra cui i moscerini della frutta e

l'uomo, nei quali si raggiunge al massimo un valore dell'1%. Tali recenti scoperte hanno consentito la realizzazione di calamari (*Euprymna scolopes*) transgenici mediante la tecnica CRISPR-Cas9 (Rosenthal *personal communication*), dando la possibilità di creare modelli traslazionali di malattie.

Una delle caratteristiche più affascinanti dei cefalopodi è la loro capacità di mimetizzarsi cambiando il colore della loro pelle in pochi secondi per adattarsi all'ambiente circostante e sparire completamente sullo sfondo. I cefalopodi in un paio di secondi fanno quello che gli scienziati delle "*machine learning*" e di "*computer vision*" riescono ad ottenere solo dopo aver addestrato reti neuronali a riprodurre un ambiente. Questa capacità è dovuta ai cromatofori, iridofori, leucofori e cellule riflettenti contenuti nella loro pelle multistrato (Buresch et al. 2015; Grasso and Basil 2009; Packard 1972). Questi organi sono di diversi colori, a seconda del pigmento che contengono e di diverse dimensioni. Sono controllati da motoneuroni per gruppi di cromatofori dello stesso colore in modo gerarchico (Reiter et al. 2018). Se l'animale vuole sparire in uno sfondo scuro, i cromatofori neri devono espandersi mentre quelli gialli devono ridursi. Quindi i motoneuroni "a controllo nero" invieranno il messaggio di contrazione dei muscoli, mentre i motoneuroni "a controllo giallo" rimarranno in silenzio. Il camouflage è una caratteristica di immensa complessità e, nonostante le molte decadi di indagini, siamo solo all'inizio della nostra comprensione dei meccanismi che regolano la percezione visuale-spaziale dei cefalopodi e l'adattamento all'ambiente circostante. Recenti indagini hanno iniziato a rivelare l'esistenza di meccanismi indipendenti di controllo del camouflage basati esclusivamente sulla "percezione della pelle" dell'illuminazione ambientale (Kingston et al. 2015; Ramirez and Oakley 2015). Questi studi hanno dimostrato che i cromatofori, possono essere attivati dalla luce in un modo completamente indipendente dal sistema nervoso centrale. Questo processo è basato su un meccanismo molecolare comune e conservato di foto-trasduzione della luce che avviene tra l'occhio e la pelle.

L'attenzione a queste affascinanti abilità si è sviluppata in oltre 100 anni di ricerca classica dedicata allo studio degli aspetti sia comportamentali che neurofisiologici di questi "invertebrati avanzati" (Hochner et al. 2006). La neuroetologia, che combina neuroscienza ed etologia, mira ad esplicitare le basi neurofisiologiche che sottendono al comportamento animale ed è il campo in cui maggiormente si sono sviluppate le ricerche sui cefalopodi (De Lisa et al. 2012; De Lisa et al. 2013), in particolare su Calamaro (*Loligo vulgaris*), Seppia (*Sepia officinalis*) e Polpo (*Octopus vulgaris*).

Dal 1° gennaio 2013, le circa 700 specie di cefalopodi viventi sono state incluse nella direttiva UE relativa alla "protezione degli animali utilizzati a fini scientifici" con la stessa regolamentazione precedentemente adottata per i vertebrati (direttiva 2010/63/UE) a cui ha fatto seguito il D.L. 4 marzo 2014, n. 26 (Polese et al. 2014; Smith et al. 2013).

ALLEVAMENTO E MANAGEMENT DEI CEFALOPODI

I cefalopodi sono considerati da tempo come modelli sperimentali in molte aree di ricerca, in particolare in neuroscienze e fisiologia (Gilbert et al. 1990) e l'attuale ricerca scientifica si basa sempre di più sul mantenimento di animali sani in laboratorio. Tuttavia, la storia dell'allevamento dei cefalopodi non è così antica (tranne, forse, per le ricerche di Grimpe 1928), con importanti progressi a partire da circa cinquant'anni fa (Choe and Ohshima 1961; Itami et al. 1963) quando sono state gettate le basi per l'allevamento di questi molluschi.

Un recente impulso al miglioramento delle pratiche di allevamento dei cefalopodi è scaturito principalmente dalla comunità di ricerca biomedica attratta dal sistema nervoso altamente sviluppato di questi molluschi e dalle loro avanzate capacità visive (Hanlon 1987; Koueta and Boucaud-Camou 1999). Stimoli per la coltura di questi animali so-

no l'industria globale in rapida crescita per l'acquariofilia, principalmente polpi e seppie, e la tendenza mondiale nell'acquacoltura commerciale per la produzione di organismi a scopo alimentare.

Come conseguenza di questa crescente attenzione all'allevamento dei cefalopodi, negli ultimi decenni ci sono stati periodici progressi nel campo dell'acquacoltura (Hanlon 1987; Hanlon 1988; Hanlon 1998; Hanlon et al. 1999a; Hanlon et al. 2009; Hanlon et al. 2013; Hanlon et al. 1999b; Villanueva and Norman 2008; Villanueva et al. 1995; Villanueva et al. 1997), dovuti alla valutazione del potenziale espresso da alcune specie (Lee et al. 1994a; Rosas et al. 2013; Sykes et al. 2006; Vaz-Pires et al. 2004), caratterizzate da un ciclo vitale breve ed elevati indici di crescita (Rodhouse et al. 2014). Negli ultimi anni i cambiamenti ambientali antropogenici (surriscaldamento delle acque, riduzione drastica degli stock ittici dovuti ad un eccessivo sfruttamento), hanno portato ad un sostanziale aumento della biomassa mondiale in controtendenza con il depauperamento degli altri stock ittici conseguenti a politiche di pesca intensiva e *overfishing* (Doubleday et al. 2016).

Dalle delicate forme planctoniche agli adulti bentonici, una varietà di specie e fasi di vita sono state mantenute, allevate e coltivate, con diversi gradi di successo. La maggior parte delle specie considerate sono cefalopodi costieri per la facilità di cattura, il mantenimento e la disponibilità di una notevole mole di informazioni riguardanti i loro cicli vitali.

Tra le specie più diffuse e commercializzate per scopi alimentari in Italia ci sono il Calamaro, la Seppia, il Polpo, il Moscardino e il Totano (Boyle and Rodhouse 2005). In Asia, in special modo nelle Filippine, viene consumato e apprezzato anche il *Nautilus pompilius*.

I cefalopodi hanno molte caratteristiche considerate favorevoli e attraenti per l'acquacoltura. Tra quelle che meritano attenzione, oltre ai loro cicli di vita brevi (per lo più tra 4 e 18 mesi) è da considerare, la facilità nell'ottenere grandi quantità di uova, infatti molte specie, in particolare polpo e seppia, le depongono prontamente quando vengono introdotte in cattività. La fertilità di alcune specie risulta piuttosto elevata e paragonabile alle specie ittiche (Saville 1987), con conseguente produzione di un gran numero di paralarve planctoniche, mentre altre specie che mostrano bassa fertilità producono grandi uova e piccoli bentonici (Fig. 1). Questi piccoli, a sviluppo diretto, sono miniature degli adulti, con un sistema nervoso altamente sviluppato e abilità predatorie innate. Il tasso di crescita di alcuni cefalopodi è impressionante, compreso tra il 5 e il 13% del peso corporeo umido al giorno (WW d^{-1}) (Lee et al. 1994a; Lee et al. 1994b) che combinato con alti tassi di conversione alimentare del 30-50% (Lee et al. 1994a; O'Dor and Wells 1978) li rendono uno dei gruppi più interessanti di invertebrati marini considerati adatti per l'acquacoltura. Inoltre, i cefalopodi sono apprezzati come alimento ad alto contenuto proteico (75-85% di peso secco proteico) e per il fatto che l'80-85% del loro peso corporeo totale è commestibile per il consumo umano (Lee et al. 1994a; Lee et al. 1994b). Ciò rappresenta un impatto significativo sulla redditività e sulla capacità di mercato, in particolare se confrontato con il solo il 40-45% dei crostacei e il 40-75% dei pesci teleostei (Kreuzer 1984). Le implicazioni di queste caratteristiche biologiche per la coltura commerciale sono evidenti e si traducono in brevi cicli di coltura con elevati rapporti di produzione in biomassa e di conseguenza un elevato rapporto costi-benefici. Tuttavia, la redditività dipende anche da altri fattori, come la domanda, i mercati e l'alto valore commerciale. È quindi importante valutare i mercati che potrebbero sostenere potenziali iniziative commerciali che coinvolgano l'acquacoltura dei cefalopodi.

La domanda attuale dipende quasi esclusivamente da stock catturati in natura, ma è improbabile che la pesca possa continuare a soddisfare la domanda. Il declino di molti stock ittici ha aumentato la pressione di pesca sui cefalopodi, ampliando la loro importanza commerciale e il conseguente rapido aumento delle statistiche sulle catture negli ultimi decenni (Pierce and Portela 2014;

Rodhouse et al. 2014). La pesca globale di cefalopodi è aumentata costantemente dal 1950 da un totale di 0.5 milioni di tonnellate all'anno con un picco di oltre 4 milioni di tonnellate nel 2007, seguito da un recente calo a 3.5 milioni di tonnellate nel 2010 (Pierce and Portela 2014). Pertanto, il trend a lungo termine sembra indicare che gli anni del boom della pesca dei cefalopodi potrebbero essere terminati a causa della pesca eccessiva. Questo trend segue la diffusa percezione che la produzione della pesca in generale stia diminuendo in tutto il mondo (Hilbor 2012; Rodhouse et al. 2014; Worm et al. 2009).

Tuttavia, esiste un mercato consolidato e redditizio per i cefalopodi nei paesi europei e asiatici. La maggior parte dei paesi europei sono importatori di cefalopodi e la Spagna e l'Italia sono in cima alla lista degli importatori (importano più di 5 e 4 milioni di tonnellate, rispettivamente). Durante il 1976 e il 2009, il Giappone ha importato più cefalopodi di qualsiasi altro paese (7 milioni di tonnellate), raggiungendo il più grande deficit netto totale import-export di qualsiasi paese del mondo (Pierce and Portela 2014). Ad esempio le statistiche sul commercio dei cefalopodi enfatizzano la limitata disponibilità di polpi nel 2011 (Globefish 2012) e le cifre per gli anni a seguire indicano che il Giappone aumenterà ulteriormente le sue importazioni di polpi. Anche per i calamari e le seppie, le importazioni stanno aumentando (Pierce and Portela 2014), quindi chiaramente c'è una domanda crescente di cefalopodi in Europa e in Giappone e nei mercati di esportazione. Se la pesca mondiale dei cefalopodi continuerà a mostrare un declino, l'aumento della domanda tenderà ad aumentare i prezzi, il che rappresenterà sicuramente lo stimolo più efficace per lo sviluppo dell'acquacoltura dei cefalopodi come l'unica alternativa plausibile per soddisfare la domanda. Inoltre la necessità di destagionalizzare il loro reperimento in commercio, trova nell'acquacoltura una possibile risposta (Kunisaki 2000; Ruíz-Capillas et al. 2002).

La produzione è in gran parte limitata dalle abitudini alimentari altamente selettive dei cefalopodi, che sono carnivori e quindi necessitano di una dieta a base di proteine con lipidi di alta qualità ricchi di acidi grassi essenziali, fosfolipidi e colesterolo. Soddisfare i loro voraci appetiti richiede grandi quantità di cibo, preferibilmente vivo. A causa dei loro alti tassi metabolici e di alimentazione (20-50% WW d^{1}; (Hanlon 1987; Lee et al. 1994a), se le loro esigenze nutrizionali non vengono soddisfatte, possono morire di fame rapidamente e fin dalla tenera età ricorrono al cannibalismo (vedi, ad esempio, Ibáñez and Keyl 2010). Le prime fasi dello sviluppo sono particolarmente vulnerabili poiché richiedono, per sostenere i loro tassi di alimentazione esorbitanti, mangime vivo di dimensioni, forma e mobilità specifiche, poiché sono cacciatori visivi ed olfattivi (80% del WW d^{1}; Di Cosmo et al. 2018b; Hanlon 1987; Segawa 1990). L'allevamento delle paralarve e la produzione di giovani su base commerciale sono stati gravemente limitati da questi fattori, insieme a una conoscenza insufficiente delle loro abitudini alimentari e dei tipi di cibo, causando alti tassi di mortalità durante i primi stadi di vita in cattività. Ciò sottolinea la necessità di trovare una fornitura affidabile di mangime vivo per le paralarve o di sviluppare mangimi artificiali convenienti. Come per altre specie di acquacoltura marina commerciale, concentrarsi sui miglioramenti nutrizionali è una strategia necessaria per abbreviare i tempi di raggiungimento delle taglie commerciali.

La coltura dei cefalopodi su piccola scala è già possibile per alcune specie, come il calamaro della barriera corallina, *Sepioteuthis lessoniana* (Lesson, 1839), la seppia europea, *Sepia officinalis* (Linnaeus, 1758); il polpo messicano, *Octopus maya* (Voss e Solis, 1966), e il polpo comune, *Octopus vulgaris* (Cuvier, 1797). Tutte queste specie selezionate, ad eccezione di *O. vulgaris*, producono prole di grandi dimensioni senza una fase paralarvale planctonica vulnerabile. Invece risulta decisamente proibitivo l'allevamento di Nautilus, in quanto richiederebbe delle temperature estremamente basse, considerato che questi animali vivono a oltre 500 metri di profondità, o di calamari che mal si adattano alla cattività.

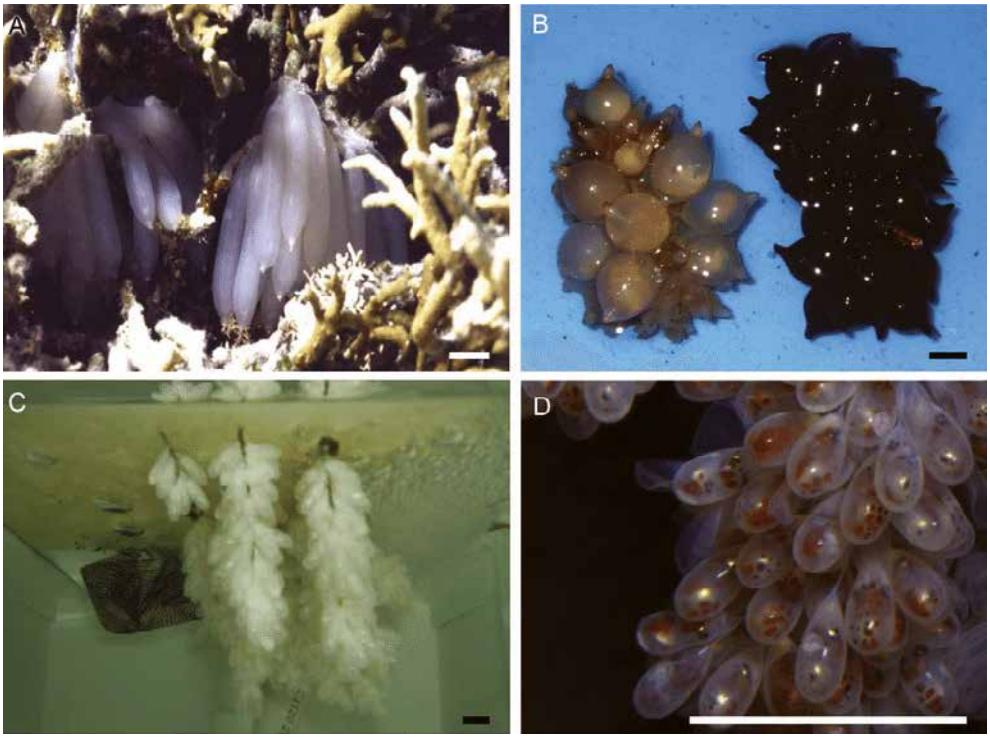

Fig. 1 – Uova di cefalopodi. (A) *Sepioteuthis lessoniana*, (B) *Sepia officinalis*, (C) *Octopus maya* and (D) *Octopus vulgaris*. Scale bar 1 cm. (Vidal et al. 2014)

Le seppie sono animali stupendi sia per gli straordinari colori che per la singolare intelligenza. Le seppie possiedono dieci tentacoli ciascuno con due fila di ventose dei quali due sono destinati all'alimentazione e vengono allungati in pochissimi istanti per catturare e portare al becco la preda. Possiedono tre cuori, un cervello complesso ed hanno una durata di vita compresa dai sei mesi ai tre anni. Cambiano colore in modo sorprendente. Il cambiamento di colore repentino permette di confondere sia prede che predatori, quest'ultimi possono essere disorientati anche dal getto d'inchiostro meglio conosciuto come il "nero di seppia". Sono predatori fenomenali, inseguono le loro prede con astuzia ed attaccano con precisione, velocità e abilità. Quando sono allevati con il tempo imparano a riconoscere chi le nutre.

La specie di seppia maggiormente usata per l'acquacoltura è *Metasepia pfefferi* (Grasse et al. 2014). In natura essa si trova a profondità comprese tra 3 e 90 metri, principalmente nelle acque del Sud Est asiatico e in Australia. Il suo habitat naturale sono il sedimento e il fango, mentre è meno comune su substrati rocciosi poiché risulta essere troppo visibile alle sue prede anche se tali substrati sono invece ampiamente utilizzati per la deposizione e l'ancoraggio delle uova. Il problema principale del mantenimento in acquario di piccole seppie *(Metasepia pfefferi* e *Sepia bandensis*) è dato dal reperimento di animali sani in quanto i combattimenti che avvengono durante il trasporto portano a lesioni o ad infezioni che possono essere letali. Gli animali sani possono essere mantenuti in acquario per tutta la durata della vita naturale, fino alla senescenza. Le seppie, essendo molto piccole, possono essere allevate anche in piccole vasche, circa 40 litri per esemplare, sviluppate in al-

tezza per dare alle seppie la sensazione di profondità.

Le *Metasepia pfefferi* e le *Sepia bandensis* (Vidal et al. 2014) provenendo dal sud est asiatico (ad es. dalle *Filippine)* sono allevate bene in acqua alla temperatura di circa 28°C, pH compreso tra 8.1-8.4 e ammoniaca, nitriti e nitrati quanto più possibile vicini allo zero, privi di metalli pesanti. Prima di inserire le piccole seppie l'acquario deve essere ben maturo. L'acquario dev'essere dotato non solo di filtrazione meccanica, ma anche di schiumatoio e filtro a carboni attivi per far fronte ad evenutali spruzzi di inchiostro. Infine è consigliabile effettuare un cambio mensile del 25-50% di acqua.

Gli animali devono alloggiare in vasche dotate di tane abbastanza ariose e un letto di sabbia alto almeno 0.5 centimetri per consentirgli di scavare.

Per quando riguarda la dieta le seppie, essendo predatori, in natura mangiano soprattutto crostacei e pesci, e sembra che il movimento della preda provochi in loro lo stimolo della caccia. In acquario questi animali potrebbero essere nutriti con crostacei e pesci marini comprati nei negozi di acquariofilia, anche se risulterebbe molto costoso, oppure, utilizzare pesce o crostacei freschi o congelati, ma gli esemplari allevati vanno prima abituati a questo genere di alimenti, ad esempio simulando il movimento di una preda viva. Le seppie devono essere alimentate quotidianamente poiché hanno un metabolismo molto accelerato.

Grandi sforzi si stanno concentrando per la messa in opera del farming dei polpi, che rappresentano dei candidati ideali per tali scopi. I polpi infatti vivono poco, crescono rapidamente e maturano presto, e tipicamente raggiungono due-tre chili (un peso elevatissimo per un invertebrato). Nonostante sia considerato un candidato ideale per l'acquacoltura, attualmente è difficile coltivare i primi stadi di vita dei polpi e mantenere un alto tasso di sopravvivenza per le loro paralarve, che rappresentano attualmente lo step critico e limitante (Aguado Giménez and García García 2002; Carrasco et al. 2006).

In particolare, negli ultimi anni, sono stati condotti studi concernenti l'allevamento estensivo di *Octopus vulgaris* e di *Sepia officinalis*, in Portogallo e in Tunisia (Sykes et al. 2006), *Octopus maya* in Messico (Rosas et al. 2013), *Octopus ocellatus* in Asia (Segawa and Nomoto 2002), *Octopus mimus* in Sud America (Baltazar et al. 2000), *Octopus bimaculoides* in America (Solorzano et al. 2009). Attualmente i polpi vengono, da diversi anni, allevati e riprodotti in cattività con successo (soprattutto negli States). Tuttavia siamo ben lontani dall'allevamento intensivo a scopi alimentari che si sta orientando soprattutto sul polpo comune del Mediterraneo (*Octopus vulgaris*), ma anche sul polpo californiano (*Octopus bimaculoides*) che meglio si prestano all'allevamento in cattività (Iglesias et al. 2014).

Il polpo conduce una vita solitaria e fenomeni di cannibalismo sono molto comuni, pertanto devono essere isolati dai conspecifici. Inoltre, i polpi sono animali molto inclini alla fuga pertanto le vasche devono essere ben chiuse e il coperchio deve essere strettamente fissato. I polpi hanno una enorme superficie corporea e di conseguenza sono molto sensibili alla qualità dell'acqua, quindi inquinanti quali ammoniaca e nitriti dovrebbero essere tenuti a zero. I nitrati sembrano essere tollerati fino alla concentrazione di 50-100 ppm senza effetti apparenti. Il rame risulta invece letale anche a bassissime concentrazioni e dovrebbe essere testato prima dell'introduzione del polpo in acquario. Per tutti gli altri parametri si possono seguire le linee guida comuni per gli invertebrati di acquario marino. È importante sapere che un polpo produce una quantità di ammoniaca tre volte superiore a quella prodotta da pesci delle medesime dimensioni corporee; inoltre, è necessario mantenere i livelli di ossigenazione dell'acqua più alti possibili in quanto, essendo i polpi dotati di tre cuori, anche il fabbisogno d'ossigeno è di tre volte superiore rispetto a quello di un pesce.

Proprio perchè tali animali richiedono acqua molto ossigenata, nonostante la produ-

Fig. 2 – Polpo *Octopus vulgaris* coinvolto nella sperimentazione animale nello stabulario del Dipartimento di Biologia, Università degli Studi di Napoli Federico II – Di Cosmo's facilities.

zione di rifiuti biologici, è utile utilizzare filtri sovradimensionati e ottimi schiumatoi.

Anche i polpi, quando si sentono minacciati possono emettere una nuvola di inchiostro molto viscosa, ad altissima densità proteica. Nonostante tale inchiostro non presenti velenosità, esso potrebbe coprire le branchie dell'animale, uccidendolo per asfissia. Un ottimo schiumatoio unito a dei carboni attivi di ottima qualità sono di solito sufficienti per eliminare l'inchiostro dalla vasca.

La salinità è l'altro parametro critico dell'acqua da tenere strettamente sotto controllo. Il valore a cui puntare per la salinità è sempre quello di 1.026, tenendo presente che una bassa salinità ucciderà il polpo. Il pH deve essere mantenuto tra 8 e 8.4 ed è necessario un cambio d'acqua del 25% ogni quindici giorni. La temperatura di allevamento consigliata va dai 16 ai 22°C.

ALLEVAMENTO A SCOPO SCIENTIFICO

I cefalopodi sono stati utilizzati nella ricerca da oltre 100 anni, per la loro plasticità fenotipica, per un sistema nervoso complesso e centralizzato, per gli studi sull'apprendimento e la memoria e per delle caratteristiche anatomiche che facilitano gli studi fisiologici (ad es. l'assone gigante del calamaro). Il 1 ° gennaio 2013, la ricerca che utilizza una delle circa 700 specie esistenti di "cefalopodi vivi" è stata regolamentata all'interno dell'Unione europea dalla direttiva 2010/63, accolta dalla legislazione italiana con decreto legislativo n° 26/2014, conferendo ai cefalopodi la stessa protezione offerta precedentemente solo ai vertebrati. La direttiva ha notevoli implicazioni per la ricerca nel campo delle neuroscienze e la comunità scientifica ha prodotto "linee guida"

per l'utilizzo dei cefalopodi nella sperimentazione animale (Fiorito et al. 2014; Polese et al. 2014; Winlow and Di Cosmo 2019; Winlow et al. 2018) dando particolare enfasi al benessere dei cefalopodi.

Tra i cefalopodi i più utilizzati per l'allevamento a scopo scientifico ritroviamo polpi (in particolare *Octopus vulgaris*) e il calamaro sepiolide (*Euprymna scolopes*).

Euprymna scolopes (conosciuto anche come calamaro delle Hawaii) è originario dell'Oceano Pacifico centrale, dove è presente in acque costiere poco profonde al largo delle Isole Hawaii e dell'Isola di Midway. L'*E. scolopes* cresce fino a 30 millimetri di lunghezza del mantello. I piccoli pesano 0,005 grammi e maturano in 80 giorni mentre gli adulti pesano fino a 2,67 grammi. In natura, l'*E. scolopes* si nutre in particolare di gamberetti, mentre in laboratorio è allevato con una dieta variegata che comprende misidi e artemie. *E. scolopes* è stata a lungo studiata a causa della relazione simbiotica con il batterio bioluminescente *Vibrio fischeri*, che colonizza uno speciale organo luminoso nel mantello del calamaro.

Il polpo *O. vulgaris* (Fig. 2) è allevato in cattività soprattutto per studiarne le incredibili capacità cognitive legate ad una straordinaria intelligenza (Di Cosmo et al. 2018b), che vanno dal problem solving al gioco, e alla capacità di effettuare neurogenesi adulta (Bertapelle et al. 2017; Di Cosmo et al. 2018a). Tuttavia gli esperimenti comportamentali su tali animali possono essere effettuati solo con animali pescati *ad hoc* dall'ambiente, ed allevati in stabulario (Di Cosmo et al. 2015).

In stabulario i polpi hanno una aspettativa di vita che va dai 6 mesi ai 15 mesi. Solo alcune specie abissali e di acque fredde, come *Barhypolypus articus*, hanno una aspettativa di vita maggiore, che può arrivare a 6 anni. Il polpo è un animale dalle dimensioni variabili e per tali esemplari è consigliata una vasca di almeno 100 litri.

L'intelligenza dei polpi richiede un ambiente arricchito, che consiste nell'inserimento di oggetti all'interno della vasca. Il modo più semplice per fare tutto ciò consiste nell'inserimento di una tana, rocce, conchiglie di taglia mista e vari tipi di oggetti (barattoli, lego, etc); il polpo apprezzerà e magari utilizzerà tali accessori per costruire la porta della propria tana.

La maggior parte dei polpi sono animali notturni, ma generalmente cambiano le loro abitudini in base al momento della giornata in cui vengono nutriti. In natura la dieta di un polpo consiste soprattutto in crostacei, anche se la maggior parte degli esemplari accetterà di buon grado tranci di pesce. Il cibo può essere proposto anche con una pinza, al fine di guadagnare l'approvazione dell'animale e migliorare le relazioni operatore-animale. Per consentire una veloce acclimatazione dei polpi, è consigliato mantenere sempre la luce soffusa.

LIMITAZIONI ATTUALI

Si sono registrati progressi significativi nei metodi di coltura dei cefalopodi ed oggi è possibile allevare molte specie per periodi relativamente lunghi nei laboratori e nelle strutture acquatiche. Tuttavia per alcune specie, ci sono ancora alcuni ostacoli importanti da superare prima che diventi possibile sostenere l'acquacoltura per più cicli di vita a un livello di produzione industrialmente stabile ed economicamente sostenibile.

La progettazione di base del sistema di acquacoltura dei cefalopodi è passata da progetti rettangolari-cubici a circolari-cilindrici, popolati con semplici unità abitative a base di tubi dove i polpi sono disposti in circolo per sfruttare appieno i volumi d'acqua. Il rilascio dei mangimi negli acquari di grandi dimensioni è generalmente manuale e casuale, con alcuni animali che tendono a dominare durante la fase di alimentazione, con conseguenti tassi di crescita e gamma di dimensioni variabili.

I requisiti di qualità dell'acqua aumentano i rischi per l'acquacoltura su larga scala in assenza di un sistema di acqua di mare aperto che sia stabile a lungo termine e di alta qualità, poiché tutti i cefalopodi sono altamente vulnerabili alla presenza di inquinanti artificiali e improvvisi cambiamenti di parametri

quali temperatura, salinità, pH e concentrazioni di vari soluti. È quindi necessario prevedere un monitoraggio efficiente, una misurazione particolarmente regolare del pH e del contenuto di composti azotati all'aumentare della biomassa coltivata, facendo attenzione a non superare la capacità del sistema. I sistemi di acquacoltura richiedono il mantenimento delle temperature vicino a quelle della popolazione naturale (Boyle 1991), con un'attenta valutazione del fabbisogno energetico per il raffreddamento e il riscaldamento, se le temperature utilizzate e quelle naturali sono significativamente diverse.

Uno dei maggiori "colli di bottiglia" presenti nell'acquacoltura dei cefalopodi è la produzione di quantità sufficienti di prole di qualità. Ciò è direttamente correlato al controllo della riproduzione che rimane una pietra miliare per lo sviluppo dell'acquacoltura dei cefalopodi. La qualità e la quantità di uova e piccoli, dipenderanno dalle influenze ambientali durante il processo di maturazione e durante lo sviluppo embrionale. È stato dimostrato che la vitalità delle uova si riduce dopo diverse generazioni di coltura a causa della consanguineità (ad esempio Walsh et al. 2002); quindi, il controllo sulla riproduzione è necessario per raggiungere la produzione di massa. La fase paralarvale e il periodo di insediamento sul fondo, in un certo numero di specie che producono uova piccole, hanno dimostrato di essere "colli di bottiglia" critici. Ad oggi tutte le specie con una fase paralarvale possono essere allevate solo sperimentalmente, in numeri che risultano essere troppo bassi per essere commercialmente praticabili.

La nutrizione è un problema comune alla coltura della maggior parte delle specie di cefalopodi e di molte fasi del loro ciclo vitale, in quanto si sa poco su (1) cosa mangiano in natura i cefalopodi in diverse fasi della vita, (2) la loro fisiologia nutrizionale e (3) come e quando presentare alimenti adeguati in un sistema chiuso.

L'intelligenza straordinariamente elevata dei cefalopodi ha portato al riconoscimento dell'importanza dell'arricchimento (ad esempio Wood and Wood 1999) , come il gioco e altre forme di stimolazione che potrebbero fornire distrazione da tratti comportamentali negativi come il cannibalismo (Budelmann 2010). L'assenza di opportunità di arricchimento dell'ambiente in cattività, in particolare per i polpi, può abbassare il grado di salute e quindi la crescita ottimale richiesta per l'acquacoltura commerciale.

In termini di possibili limitazioni future, il valore della policoltura (per superare le limitazioni della resa per unità di volume d'acqua) a livello commerciale non è ancora stato studiato. Le alghe sono state utilizzate come parte del filtraggio in serie durante il ritrattamento dell'acqua in circuiti chiusi (vedi, ad esempio Yang et al. 1989) , ma la policoltura in termini di tentativi di raccogliere gli scarti e il cibo non consumato dai sistemi di coltura dei polpi è in gran parte inesplorato (Al-Hafedh et al. 2012; Martínez-Porchas et al. 2010).

Infine il dilemma etico di coltivare animali intelligenti come i cefalopodi come fonte di cibo deve ancora essere esplorato come possibile limitazione.

BIBLIOGRAFIA

Aguado Giménez, F. & B. García García, 2002. Growth and food intake models in *Octopus vulgaris* Cuvier (1797): Influence of body weight, temperature, sex and diet. Aquaculture International 10(5):361-377.

Al-Hafedh, Y. S., A. Alam, A. H. Buschmann & K. M. Fitzsimmons, 2012. Experiments on an integrated aquaculture system (seaweeds and marine fish) on the Red Sea coast of Saudi Arabia: efficiency comparison of two local seaweed species for nutrient biofiltration and production. Reviews in Aquaculture 4(1):21-31.

Albertin, C. B., O. Simakov, T. Mitros, Z. Y. Wang, J. R. Pungor, E. Edsinger-Gonzales, S. Brenner, C. W. Ragsdale & D. S. Rokhsar, 2015. The octopus genome and the evolution of cephalopod neural and morphological novelties. Nature 524(7564):220-4.

Baltazar, P., P. Rodríguez, W. Rivera & V. Valdivieso, 2000. Cultivo experimental de

Octopus mimus, Gould 1852 en el Perú. Rev Peru Biol 7(2):151–160.

Bertapelle, C., G. Polese & A. Di Cosmo, 2017. Enriched Environment Increases PCNA and PARP1 Levels in *Octopus vulgaris* Central Nervous System: First Evidence of Adult Neurogenesis in Lophotrochozoa. J Exp Zool B Mol Dev Evol.

Boyle, P. R., 1991. The UFAW Handbook on the Care and Management of Cephalopods in the Laboratory. Universities Federation for Animal Welfare, Potters Bar, UK.

Boyle, P. R. & P. G. Rodhouse, 2005. Cephalopods: Ecology and fisheries. Blackwell, Oxford, England.

Budelmann, B. U., 2010. Cephalopoda. UFAW Handbook On the Care and Management of Laboratory and Other Research Animals:787-793.

Buresch, K. C., K. M. Ulmer, D. Akkaynak, J. J. Allen, L. M. Mäthger, M. Nakamura & R. T. Hanlon, 2015. Cuttlefish adjust body pattern intensity with respect to substrate intensity to aid camouflage, but do not camouflage in extremely low light. Journal of Experimental Marine Biology and Ecology 462:121-126.

Carrasco, J. F., J. C. Arronte & C. Rodríguez, 2006. Paralarval rearing of the common octopus, *Octopus vulgaris* (Cuvier). Aquaculture Research 37(15):1601-1605.

Choe, S. & Y. Ohshima, 1961. On the embryonal development and the growth of the squid, Sepioteuthis lessoniana Lesson. Venus (Tokyo) 21(2):462–476.

Crook, R. J. & E. T. Walters, 2011. Nociceptive Behavior and Physiology of Molluscs: Animal Welfare Implications. Ilar Journal 52:185-95.

De Lisa, E., M. Paolucci & A. Di Cosmo, 2012. Conservative nature of oestradiol signalling pathways in the brain lobes of *Octopus vulgaris* involved in reproduction, learning and motor coordination. J Neuroendocrinol 24(2):275-84.

De Lisa, E., A. M. Salzano, F. Moccia, A. Scaloni & A. Di Cosmo, 2013. Sperm-attractant peptide influences the spermatozoa swimming behavior in internal fertilization in *Octopus vulgaris*. Journal of Experimental Biology 216(12):2229-2237.

Di Cosmo, A., C. Bertapelle, A. Porcellini & G. Polese, 2018a. Magnitude Assessment of Adult Neurogenesis in the *Octopus vulgaris* Brain Using a Flow Cytometry-Based Technique. Frontiers in physiology 9:1050.

Di Cosmo, A., V. Maselli & G. Polese, 2018b. *Octopus vulgaris*: An Alternative in Evolution. Results Probl Cell Differ 65:585-598.

Di Cosmo, A., G. Polese, C. Bertapelle, A. Palumbo & Z. L., 2015. Cefalopodi. Benessere ed animal care dell'animale da laboratorio. Le Point Veterinaire Italie, Milano.

Doubleday, Z. A., T. A. A. Prowse, A. Arkhipkin, G. J. Pierce, J. Semmens, M. Steer, S. C. Leporati, S. Lourenço, A. Quetglas, W. Sauer & B. M. Gillanders, 2016. Global proliferation of cephalopods. Current Biology 26(10):R406-R407.

Fiorito, G., A. Affuso, D. B. Anderson, J. Basil, L. Bonnaud, G. Botta, A. Cole, L. D'Angelo, P. De Girolamo, N. Dennison, L. Dickel, A. Di Cosmo, C. Di Cristo, C. Gestal, R. Fonseca, F. Grasso, T. Kristiansen, M. Kuba, F. Maffucci, A. Manciocco, F. C. Mark, D. Melillo, D. Osorio, A. Palumbo, K. Perkins, G. Ponte, M. Raspa, N. Shashar, J. Smith, D. Smith, A. Sykes, R. Villanueva, N. Tublitz, L. Zullo & P. Andrews, 2014. Cephalopods in neuroscience: regulations, research and the 3Rs. Invertebrate Neuroscience 14(1):13-36.

Frank, M. G., R. H. Waldrop, M. Dumoulin, S. Aton & J. G. Boal, 2012. A Preliminary Analysis of Sleep-Like States in the Cuttlefish Sepia officinalis. PLoS ONE 7.

Gilbert, D. L., W. J. Adelman Jr. & J. M. Arnold, 1990. Squid as Experimental Animals. Plenum Press, New York.

Globefish, 2012. Globefish highlights FAO/ Globefish. vol 58.

Godfrey-Smith, P., 2016. Other Minds: The Octopus, the Sea, and the Deep Origins of Consciousness. Farrar, Straus and Giroux.

Grasse, B., A. Ii & B. m. Org, 2014. The Biological Characteristics, Life Cycle, and System Design for the Flamboyant and Paintpot Cuttlefish, Metasepia sp., Cultured Through Multiple Generations.

Grasso, F. W. & J. A. Basil, 2009. The Evolution of Flexible Behavioral Repertoires in Cephalopod Molluscs. Brain Behav Evol 74(3):231-45.

Grimpe, G., 1928. Pflege, Behandlung und Zucht der Cephalopoden fu ¨r zoologische und physiologische Zwecke Handbuch der Biologischen Arbeitsmethoden Urban und Schwarzenberg. Berlin, 331–402.

Hanlon, R. T., 1987. Mariculture. In Boyle, P. R. (ed) Cephalopod Life Cycles. vol II. Comparative Reviews. Academic Press, London, 291–305.

Hanlon, R. T., 1988. Adaptive coloration in young cuttlefish (*Sepia officinalis*): the morphology and development of body patterns and their relation to behaviour. Philosophical Transactions of the Royal Society of London B, Biological Sciences 320(1200):437.

Hanlon, R. T., 1998. Mating systems and sexual selection in the squid Loligo: how might commercial fishing on spawning grounds affect them? CalCOFI Reports 39:92-100.

Hanlon, R. T., S. A. Ament & H. Gabr, 1999a. Behavioral aspects of sperm competition in cuttlefish, *Sepia officinalis* (Sepioidea: Cephalopoda). Mar Biol 134(4):719-728.

Hanlon, R. T., C.-C. Chiao, L. M. Mäthger, A. Barbosa, K. C. Buresch & C. Chubb, 2009. Cephalopod dynamic camouflage: bridging the continuum between background matching and disruptive coloration. Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences 364(1516):429-437.

Hanlon, R. T., C.-C. Chiao, L. M. Mäthger & N. J. Marshall, 2013. A fish-eye view of cuttlefish camouflage using in situ spectrometry. Biological Journal of the Linnean Society 109(3):535-551.

Hanlon, R. T., J. W. Forsythe & D. E. Joneschild, 1999b. Crypsis, conspicuousness, mimicry and polyphenism as antipredator defences of foraging octopuses on Indo-Pacific coral reefs, with a method of quantifying crypsis from video tapes. Biological Journal of the Linnean Society 66(1):1-22.

Hanlon, R. T. & J. B. Messenger, 1996. Cephalopod Behaviour. Cambridge University Press.

Hilbor, R., 2012. The evolution of quantitative marine fisheries management 1985-2010. Natural Resource Modeling 25(1):122-144.

Hochner, B., T. Shomrat & G. Fiorito, 2006. The Octopus: A Model for a Comparative Analysis of the Evolution of Learning and Memory Mechanisms. The Biological Bulletin 210(3):308-317.

Huffard, C. L., 2013. Cephalopod neurobiology: an introduction for biologists working in other model systems. Invertebrate Neuroscience 13(1):11-18.

Hvorecny, L. M., J. L. Grudowski, C. J. Blakeslee, T. L. Simmons, P. R. Roy, J. A. Brooks, R. M. Hanner, M. E. Beigel, M. A. Karson, R. H. Nichols, J. B. Holm & J. G. Boal, 2007. Octopuses (*Octopus bimaculoides*) and cuttlefishes (*Sepia pharaonis, S. officinalis*) can conditionally discriminate. Anim Cogn 10(4):449-59.

Ibáñez, C. M. & F. Keyl, 2010. Cannibalism in cephalopods. Reviews in Fish Biology and Fisheries 20(1):123-136.

Iglesias, J., L. Fuentes & R. Villanueva, 2014. Cephalopod Culture; Springer: Dordrecht:494.

Itami, K., Y. Izawa, S. Maeda & K. Nakai, 1963. Notes on the laboratory culture of the octopus larvae. Bull Jpn Soc Sci Fish 29(6):514–520.

Jereb, P. & C. F. E. Roper, 2005. Cephalopods of the World: an annotated and illustrated catalogue of Cephalopod Species known to date, Vol. 1, Chambered Nautiluses and Sepioids (Nautilidae, Sepiidae, Sepiolidae, Sepiadariidae, Idiosepiidae and Spirulidae). In: Purpose, F. S. C. f. F. (ed) 4. vol 1. FAO, Rome.

Kingston, A. C. N., A. M. Kuzirian, R. T. Hanlon & T. W. Cronin, 2015. Visual phototransduction components in

cephalopod chromatophores suggest dermal photoreception. Journal of Experimental Biology 218:1596-1602.

Koueta, N. & E. Boucaud-Camou, 1999. Food intake and growth in reared early juvenile cuttlefish Sepia officinalis L. (Mollusca Cephalopoda). Journal of Experimental Marine Biology and Ecology 240(1):93-109.

Kreuzer, R., 1984. Cephalopods: handling, processing and products. In: Paper, F. F. T. (ed). vol 254. FAO, Rome, Italy.

Kunisaki, N., 2000. Nutritional Properties of Squid and Cuttlefish. In Okuzumi, M. & T. Fujii (eds) Nutritional and Functional Properties of Squid and Cuttlefish National Cooperative Association of Squid Processors. vol 218, Japan.

Lee, P. G., P. E. Turk, W. T. Yang & R. T. Hanlon, 1994a. Biological characteristics and biomedical applications of the squid *Sepioteuthis lessoniana* cultured through multiple generations. Biol Bull 186(3):328-41.

Lee, P. G., P. E. Turk, W. T. Yang & R. T. Hanlon, 1994b. Biological Characteristics and Biomedical Applications of the Squid Sepioteuthis lessoniana Cultured Through Multiple Generations. The Biological Bulletin 186(3):328-341.

Liscovitch-Brauer, N., S. Alon, H. T. Porath, B. Elstein, R. Unger, T. Ziv, A. Admon, E. Y. Levanon, J. J. Rosenthal & E. Eisenberg, 2017. Trade-off between Transcriptome Plasticity and Genome Evolution in Cephalopods. Cell 169(2):191-202 e11.

Martínez-Porchas, M., L. R. Martínez-Córdova, M. A. Porchas-Cornejo & J. A. López-Elías, 2010. Shrimp polyculture: a potentially profitable, sustainable, but uncommon aquacultural practice. Reviews in Aquaculture 2(2):73-85.

Mather, J. A., 2008. Cephalopod consciousness: behavioural evidence. Consciousness and cognition 17(1):37-48.

Norman, M. D., J. Finn & T. Tregenza, 2001. Dynamic mimicry in an Indo-Malayan octopus. Proceedings Biological sciences 268(1478):1755-8.

O'Dor, R. K. & M. J. Wells, 1978. Reproduction versus somatic growth: hormonal control in *Octopus vulgaris*. J Exp Biol 77:15-31.

Packard, A., 1972. Cephalopods and fish: the limits of convergence. Biological Reviews 47(2):241-307.

Pierce, G. J. & J. Portela, 2014. Fisheries Production and Market Demand. In Iglesias, J., L. Fuentes & R. Villanueva (eds) Cephalopod Culture. Springer Netherlands, Dordrecht, 41-58.

Pierce, G. J., V. D. Valavanis, A. Guerra, P. Jereb, L. Orsi-Relini, J. M. Bellido, I. Katara, U. Piatkowski, J. Pereira, E. Balguerias, I. Sobrino, E. Lefkaditou, J. Wang, M. Santurtun, P. R. Boyle, L. C. Hastie, C. D. MacLeod, J. M. Smith, M. Viana, A. F. González & A. F. Zuur, 2008. A review of cephalopod-environment interactions in European Seas. Hydrobiologia 612:49-70.

Polese, G., W. Winlow & A. Di Cosmo, 2014. Dose-dependent effects of the clinical anesthetic isoflurane on *Octopus vulgaris*: a contribution to cephalopod welfare. J Aquat Anim Health 26(4):285-94.

Pronk, R., D. R. Wilson & R. Harcourt, 2010. Video playback demonstrates episodic personality in the gloomy octopus. Journal of Experimental Biology 213:1035-41.

Ramirez, M. D. & T. H. Oakley, 2015. Eye-independent, light-activated chromatophore expansion (LACE) and expression of phototransduction genes in the skin of *Octopus bimaculoides*. J Exp Biol 218(Pt 10):1513-20.

Reiter, S., P. Hülsdunk, T. Woo, M. A. Lauterbach, J. S. Eberle, L. A. Akay, A. Longo, J. Meier-Credo, F. Kretschmer, J. D. Langer, M. Kaschube & G. Laurent, 2018. Elucidating the control and development of skin patterning in cuttlefish. Nature 562:361-366.

Rodhouse, P. G., G. J. Pierce, O. C. Nichols, W. H. Sauer, A. I. Arkhipkin, V. V. Laptikhovsky, M. R. Lipinski, J. E. Ramos, M. Gras, H. Kidokoro, K. Sadayasu, J. Pereira, E. Lefkaditou, C. Pita, M. Gasalla, M. Haimovici, M. Sakai & N. Downey, 2014. Environmental

effects on cephalopod population dynamics: implications for management of fisheries. Adv Mar Biol 67:99-233.

Rosas, C., A. Valero, C. Caamal-Monsreal, I. Uriarte, A. Farias, P. Gallardo, A. Sánchez & P. Domingues, 2013. Effects of dietary protein sources on growth, survival and digestive capacity of Octopus maya juveniles (Mollusca: Cephalopoda). Aquaculture Research 44(7):1029-1044.

Ruíz-Capillas, C., A. Moral, J. Morales & P. Montero, 2002. Characterisation of non-protein nitrogen in the Cephalopods volador (*Illex coindetii*), pota (*Todaropsis eblanae*) and octopus (*Eledone cirrhosa*). Food Chem 76(2):165-172.

Saville, A., 1987. Comparisons between cephalopods and fish of those aspects of the biology related to stock management. Cephalopod Life Cycles, Vol II Comparative Reviews 2:277-290.

Segawa, S., 1990. Food Consumption, Food Conversion and Growth Rates of the Oval Squid *Sepioteuthis lessoniana* by Laboratory Experiments. Nippon Suisan Gakkaishi 56(2):217-222.

Segawa, S. & A. Nomoto, 2002. Laboratory growth, feeding, oxygen consumption and ammonia excretion of *Octopus ocellatus*. Bulletin of Marine Science 71(2):801-813.

Smith, J. A., P. L. R. Andrews, P. Hawkins, S. Louhimies, G. Ponte & L. Dickel, 2013. Cephalopod research and EU Directive 2010/63/EU: Requirements, impacts and ethical review. Journal of Experimental Marine Biology and Ecology 447:31-45.

Solorzano, Y., M. T. Viana, L. M. López, J. G. Correa, C. C. True & C. Rosas, 2009. Response of newly hatched *Octopus bimaculoides* fed enriched *Artemia salina*: Growth performance, ontogeny of the digestive enzyme and tissue amino acid content. Aquaculture 289(1):84-90.

Sykes, A. V., P. M. Domingues, M. Correia & J. P. Andrade, 2006. Cuttlefish culture - state of the art and future trends. Vie Milieu 56(2):129–137.

Vaz-Pires, P., P. Seixas & A. Barbosa, 2004. Aquaculture potential of the common octopus (*Octopus vulgaris* Cuvier, 1797): a review. Aquaculture 238(1):221-238.

Vidal, E., R. Villanueva, J. P. Andrade, I. Gleadall, J. Iglesias, N. Koueta, C. Rosas, S. Segawa, B. Grasse, R. Franco-Santos, C. Albertin, C. Caamal-Monsreal, M. Chimal, E. Edsinger, P. Gallardo, C. Le Pabic, C. Pascual, K. Roumbedakis & J. Wood, 2014. Cephalopod culture: current status of main biological models, and research priorities, in: Vidal, E.A.G (Ed.), Advances in cephalopod science, biology, ecology, cultivation and fisheries. Advances in Marine Biology 67:1-98.

Villanueva, R. & M. D. Norman, 2008. Biology of the planktonic stages of benthic octopuses. In Gibson, R. N., A. R.J.A. & J. D. M. Gordon (eds) Oceanogr Mar Biol Annu Rev. vol 46. Press-Taylor & Francis Group, Boca Raton, 105.

Villanueva, R., C. Nozais & S. v. Boletzky, 1995. The planktonic life of octopuses. Nature 377:107.

Villanueva, R., C. Nozais & S. v. Boletzky, 1997. Swimming behaviour and food searching in planktonic *Octopus vulgaris* Cuvier from hatching to settlement. Journal of Experimental Marine Biology and Ecology 208(1):169-184.

Vitti, J. J., 2013. Cephalopod Cognition in an Evolutionary Context: Implications for Ethology. Biosemiotics 6(3):393-401.

Walsh, L. S., P. E. Turk, J. W. Forsythe & P. G. Lee, 2002. Mariculture of the loliginid squid *Sepioteuthis lessoniana* through seven successive generations. Aquaculture 212(1):245-262.

Winlow, W. & A. Di Cosmo, 2019. Editorial: Sentience, Pain, and Anesthesia in Advanced Invertebrates. Frontiers in physiology 10(1141).

Winlow, W., G. Polese, H. F. Moghadam, I. A. Ahmed & A. Di Cosmo, 2018. Sense and Insensibility - An Appraisal of the Effects of Clinical Anesthetics on Gastropod and Cephalopod Molluscs as a Step to Improved Welfare of Cephalopods. Frontiers in physiology 9:1147.

Wood, J. B. & D. A. Wood, 1999. Enrichment for an advanced invertebrate. Shape Enrich 8(3):1-5.

Worm, B., R. Hilborn, J. K. Baum, T. A. Branch, J. S. Collie, C. Costello, M. J. Fogarty, E. A. Fulton, J. A. Hutchings, S. Jennings, O. P. Jensen, H. K. Lotze, P. M. Mace, T. R. McClanahan, C. Minto, S. R. Palumbi, A. M. Parma, D. Ricard, A. A. Rosenberg, R. Watson & D. Zeller, 2009. Rebuilding Global Fisheries. Science 325(5940):578-585.

Yang, W. T., R. T. Hanlon, P. G. Lee & P. E. Turk, 1989. Design and function of closed seawater systems for culturing loliginid squids. Aquacultural Engineering 8(1):47-65.

IL CONTROLLO DELL'AMBIENTE ACQUATICO: UNA SFIDA PER IL MICROBIOLOGO

PIERA ANNA MARTINO
Dipartimento di Medicina Veterinaria – Università degli Studi di Milano
piera.martino@unimi.it

SOMMARIO

La qualità dell'acqua
I patogeni nelle specie acquatiche di laboratorio
Il campionamento e le tecniche diagnostiche
Come intervenire

L'acqua rappresenta un mezzo altamente "vitale" non solo per le specie acquatiche (*Zebrafish, Medaka,* Cefalopodi) o semi-acquatiche (*Xenophus*) utilizzate nella sperimentazione, che vivono necessariamente in tale ambiente, ma anche per le specie "microscopiche" (alghe, batteri, virus, protozoi) che possono colonizzarla.

Nella cura dei modelli acquatici è di fondamentale importanza la qualità dell'acqua, in quanto soprattutto in questi animali vi è un significativo legame con la salute e il loro benessere. Già l'ottava edizione del testo "*Guide for the care and use of laboratory animals*" nel 2011 sottolineava come "*Different classes, species, and ages in a species may have different water-quality needs and sensitivities to changes in water-quality parameters*" [ILAR, 2011]. Infatti, anche per gli acquatici, le risposte sperimentali (sia comportamentali sia di altra natura) possono essere fortemente condizionate dall'ambiente e dalla comparsa di malattie.

LA QUALITÀ DELL'ACQUA

La qualità dell'acqua è uno dei primi parametri che vanno presi in considerazione quando gli animali mostrano alterazioni nel comportamento o segni di *distress*. Le caratteristiche da valutare comprendono temperatura, pH, prodotti del ciclo dell'azoto (ammoniaca, nitriti, nitrati), fosforo, cloro, potenziale di ossido-riduzione, conduttività, durezza, alcalinità, ossigeno disciolto (O_2), contenuto di ioni e metalli, e da ultimo anche le caratteristiche microbiologiche [Mason & Matthews]. Ad esempio, i pesci sono poichilotermi e la temperatura influenza la chimica dell'acqua e la fisiologia degli animali, nonché la proliferazione microbica; per Zebrafish, che è una specie d'origine tropicale la temperatura ideale è di 28.5°C, come riportato dalla letteratura e, in genere, nei diversi stabulari viene mantenuta in un *range* variabile da 24-29°C. [Alestrom]. A temperature più basse, infatti, gli embrioni o le larve crescono più lentamente, mentre poco è noto sulle variazioni nel comportamento degli adulti.

Anche la solubilità dell'ossigeno nell'acqua viene influenzata dalla temperatura in quanto diminuisce al suo aumentare; tuttavia, i sistemi a ricircolo non richiedono l'introduzione di O_2 in quanto il continuo movimento porta ad un'ossigenazione sufficiente [Lawrence, 2012; Alestrom, 2019].

La qualità dell'acqua è però legata alla fonte della stessa; in alcuni laboratori viene utilizzata l'acqua potabile senza grandi correzioni, ma il cloro deve essere rimosso poiché il livello *safe* per l'uomo (0.1 mg/L) è tossico per i pesci. In alcuni casi è sufficiente tenere in agitazione e areare l'acqua in modo costante per 24 ore prima di utilizzarla; nel caso venga disinfettata con l'uso di cloramina, invece, è necessario trattare l'acqua filtrandola attraverso filtri a carbone attivo [Alestrom, 2019; Lawrence, 2012].

Nella maggior parte delle *facilities* per pesci, in genere, l'acqua viene controllata ed "aggiustata" poiché o troppo dura o troppo dolce oppure viene usata acqua deionizzata

Tab. 1 – Principali indicazioni per quanto concerne la qualità dell'acqua nella stabulazione di *Zebrafish*, secondo lo ZIRC e le indicazioni EZRC & FELASA.

PARAMETRO	ZIRC	EZRC & FELASA
Densità degli animali	> 7	5 (in base al volume del *tank*)
Luce	12 luce:12 buio oppure 10:14	10 luce:14 buio
Temperatura	26-28.5	26-29
pH	6.8-7.5	6.5-8
Conduttività (μS)	300-1.000	250-600
Nitriti (mg/L)	< 0.1	≤ 0.025
Nitrati(mg/L)	< 5-10	< 2.5
Ossigeno disciolto	6.0	

(modificata da https://zebrafish.org e www.eufishbiomed.kit.edu)

condizionata. Per quest'ultimo scopo viene usata l'osmosi inversa con la successiva aggiunta di sale, cloruro di calcio e bicarbonato di sodio per arrivare alla giusta durezza e pH [Alestrom, 2019; Lawrence, 2012]. In base al sistema di produzione dell'acqua la conduttività dipende dalla quantità di sodio e cloro o di calcio e carbonato; per quanto concerne il pH in genere rientra in un *range* tra 6.5 e 8.

Nei sistemi a ricircolo l'acqua viene purificata grazie alla combinazione di filtri meccanici e biologici e poi irradiata con raggi UVC prima di essere reintrodotta nei *tank*. Di nuovo è fondamentale che tutti i parametri siano corretti in quanto, nel caso dell'uso di filtri biologici, il loro "funzionamento" è legato alla presenza e moltiplicazione dei batteri nitrificanti (*Nitrobacter* e *Nitrosomonas spp*.) che permettono di detossificare l'ammoniaca a nitriti e poi ai nitrati [ILAR, 2011]. Il pH deve essere valutato giornalmente mentre settimanalmente vanno controllati i composti azotati.

Per quanto riguarda il ciclo luce-buio, devono essere fornite 10 ore di buio e 14 di luce, che non interferiscono col benessere animale e con i comportamenti fisiologici/riproduttivi [Lawrence, 2012; https://zebrafish.org].

Le indicazioni sui parametri che condizionano la qualità dell'acqua riportate per i pesci, usati nella sperimentazione, valgono anche per i cefalopodi. Le condizioni ottimali variano da specie a specie, in base agli stadi di vita (paralarve, giovani, adulti) e alla fisiologia (femmine *versus* maschi). I parametri da controllare sono sempre ossigeno (da mantenere vicino alla saturazione poiché i cefalopodi hanno un metabolismo molto elevato); pH (7.8-8.3); livelli di composti azotati anch'essi diversi per le diverse specie [Fiorito, 2015].

I PATOGENI NELLE SPECIE ACQUATICHE DI LABORATORIO

Rapidi cambiamenti nella qualità dell'acqua possono causare *stress* e aumentare morbilità e mortalità legate allo sviluppo di microrganismi. Questo poiché per le specie acquatiche non solo è presente una flora commensale che in condizioni di equilibrio non causa patologie (come per qualsiasi altra specie animale), ma anche una "flora ambientale" legata all'acqua che è rappresentata da specie potenzialmente patogene (ad es., per i batteri *Pseudomonadaceae, Aeromonadaceae, Vibrio,* Micobatteri). In particolare, i modelli acquatici che si trovano in sistemi di ricerca confinati sono costantemente circondati da e ingeriscono i loro "rifiuti"; perciò, senza una qualità ottima dell'acqua, batteri e protozoi anche opportunisti possono causare infezioni [Kent, 2009; Mansfield, 2010; Marancik, 2019].

Il fallimento delle operazioni di disinfezione nei sistemi a ricircolo di acqua, come quelli in genere usati per Zebrafish, può portare alla diffusione rapida di patogeni nei *tanks*, così come alterazioni nel filtro biologico con accumulo di ammoniaca tossica, che può non solo stressare gli animali stabulati ma anche compromettere i batteri che sono alla base del funzionamento del filtro biologico stesso.

I sistemi a flusso offrono più vantaggi, poiché i pesci ricevono acqua pulita con un flusso costante, con un minimo accumulo di rifiuti e la trasmissione di patogeni. L'uso di sistemi statici invece permette di confinare i patogeni eventualmente presenti, ma sono *time-consuming* per la necessità dei frequenti cambi dell'acqua [Mansfield, 2010; Alestrom, 2019; Marancik, 2019].

Ecco dove sta la sfida per il microbiologo: valutare il ruolo commensale o patogeno che le diverse specie possono avere nell'ambiente acquatico.

In ogni caso, fino a qualche anno fa le conoscenze relative alla malattie infettive nelle specie acquatiche utilizzate nella ricerca derivavano dall'acquacoltura e dai *pet*; fortunatamente ora la diffusione dei modelli acquatici ha permesso di ampliare la conoscenza con studi mirati [Alestrom, 2019, Marancik, 2019].

Ovviamente è indispensabile introdurre un sistema di monitoraggio sanitario delle popolazioni di pesci, utilizzati nelle *facilities*, per valutare la presenza di malattie infettive e non. Tre sono, infatti, gli elementi che possono favorire lo sviluppo di malattie infettive: 1) le condizioni dell'ambiente (ad es., presenza di *biofilm*) che possono favorire la diffusione di microrganismi, 2) l'elevata densità degli animali che può facilitare la trasmissione della malattia e 3) lo *stress* secondario alla loro manipolazione [Murray, 2016; Marancik, 2019] (Figura 1).

È possibile osservare la presenza di batteri Gram-negativi causa di infezioni sia primarie sia secondarie, tra cui *Edwardsiella ictaluri*, che è associata a setticemia in animali senza segni clinici, e *Aeromonas* spp., causa di lesioni cutanee probabilmente secondarie proprio a cattiva qualità dell'acqua e allo *stress* [Murray, 2016; Alestrom, 2019; Marancik, 2019]. I micobatteri sono piuttosto diffusi e causa di forme croniche e talvolta mortali; oltre a quelle riportate in tabella 2 vi sono anche *M. abscessus, M. fortuitum* anch'essi causa di malattia quando le condizioni ambientali sono deteriorate. Il controllo delle micobatteriosi nelle *facilities* per pesci è un problema complesso poiché si ritiene che i micobatteri siano ubiquitari negli ecosistemi acquatici e siano presenti in *biofilm* anche quando gli animali non sono infettati [Whipps, 2008].

A tale proposito va ricordato che l'ambiente acquatico si presta bene alla produzione, da parte di molti dei batteri sopra riportati, di *biofilm*. Infatti, Costerton nel suo studio del 1978 osservò proprio che comunità batteriche acquatiche, adese a una superficie, erano avvolte in un glicocalice che ne

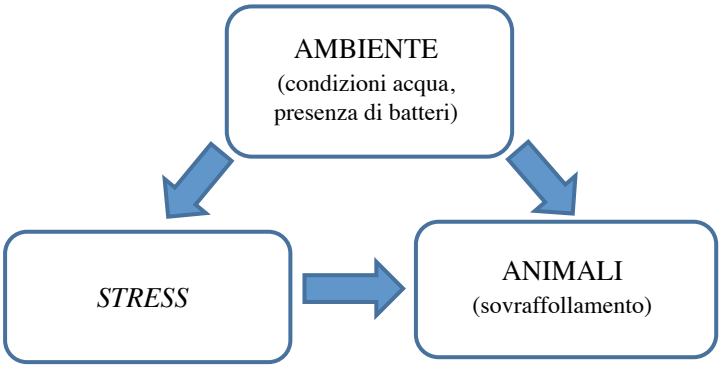

Fig. 1 – Rappresentazione schematica dei fattori
che possono condizionare lo sviluppo di malattie infettive.

Tab. 2 – Principali microrganismi che possono essere presenti in un sistema acquatico per Zebrafish.

Patogeno	Patologia e impatto	Trasmissione materna
Edwardsiella iactaluri	Setticemia Elevata mortalità	Non nota. Non osservata nelle uova
Aeromonas spp.	Forme cutanee Elevata morbilità e mortalità	Non nota
Mycobacterium chelonae	Infiammazione cronica Bassa mortalità	Non nota; bacilli osservati nelle ovarie
Mycobacterium marinum	Malattia sistemica grave Rischio zoonosico	Non nota; bacilli raramente osservati nelle uova
Mycobacterium haemophilum	Grave infiammazione cronica Elevata mortalità	Non nota; numerosi bacilli osservati nelle ovarie
Pseudocapillaria tomentosa	Grave enterite cronica e grave emaciazione Mortalità da moderata a grave	No
Pseudoloma neurophilia	Emaciazione, ipofertilità e cambiamenti comportamentali Bassa mortalità	Si; trasmissione *intra-ovo* documentata

(modificata da Murray, 2016)

mediava l'adesione, suggerendo che la formazione di *biofilm* può essere considerata un meccanismo evoluzionistico che permette ai batteri di sopravvivere in ambienti competitivi, supportando la selezione di patogeni protetti rispetto all'ecosistema esterno [Costerton, 1978; Donlan and Costerton, 2002]. Il *biofilm* è una architettura complessa e dinamica coordinata da un sistema di comunicazione detto *quorum-sensing* e basato su 5 *step* che coinvolgono i batteri: a) adesione; b) aggregazione; c) accumulo; d) maturazione; e) distacco (Otto, 2009).

Oltre ai micobatteri anche *Aeromonas* ed *Edwardsiella* possono produrre *biofilm*; inoltre, *Pseudomonas*, batterio Gram-negativo spesso presente nell'acqua anche come contaminante ambientale, può produrre tale matrice [Marancik, 2019; Poli, 2017].

Per quanto riguarda i parassiti, invece, è possibile riscontrare la presenza del nematode *Pseudocapillaria tomentosa* causa di enterite e che viene ritenuto, in seguito a studi di carcinogenesi, un possibile fattore confondente nello sviluppo di neoplasia intestinale. Il microsporidio *Pseudoloma neurophilia*, è invece, associato a problemi di ipofecondità ed a deformità muscolo-scheletriche; può colpire anche il Sistema Nervoso Centrale dando encefalite o mielite, interferendo con studi comportamentali. Il problema principale legato a questo parassita è la resistenza delle sue spore al candeggiamento e la possibilità di trasmissione *intra-ovo*.

I virus sono la componente più "abbondante" delle comunità microbiche acquatiche ma poche sono le segnalazioni in letteratura [Marancik, 2019].

Nei cefalopodi la situazione è abbastanza sovrapponibile a quella appena vista per i pesci; il mantenimento della qualità dell'acqua è fondamentale per minimizzare il rischio di trasmissione di malattie infettive e lo *stress* che può rendere gli animali più suscettibili ad infezione. Inoltre, vanno evitati anche traumatismi durante la manipolazione che possono causare lesioni cutanee *door opener* a infezioni secondarie (batteriche in genere) che, se non trattate, possono causare anche mortalità [Fiorito, 2015].

Tab. 3 – I più comuni batteri che sono riportati nei cefalopodi e che possono essere sia commensali (ad es., *Vibrio fisheri, Pseudomonas spp.*) sia patogeni (ad es., *Vibrio lentus, Aeromonas spp., Flavobacterium spp.*).

Batteri	Batteri
Acinetobacter anitratus	*Vibrio alginolyticus*
Aeromonas cavia	*Vibrio anguillarum*
Aeromonas spp.	*Vibrio carchariae*
Micrococcus spp.	*Vibrio damsela*
Myxobacteria spp.	*Vibrio harveyi*
Pseudomonas spp.	*Vibrio lentus*
Pseudomonas stutzeri	*Vibrio pelagius*
Rickettsia spp.	*Vibrio spp.*
Vibrio parahaemolyticus	*Vibrio splendidus*

(modificata da Fiorito, 2015)

IL CAMPIONAMENTO E LE TECNICHE DIAGNOSTICHE

A tutt'oggi vi sono poche linee guida relative al monitoraggio dei patogeni e delle infezioni nei sistemi di stabulazione per specie acquatiche; perciò i metodi di campionamento variano da struttura a struttura. Il numero dei pesci sottoposto a controlli viene spesso scelto in modo arbitrario oppure è legato al costo degli esami di laboratorio che devono essere eseguiti; basandosi sulle linee guida dell'OIE (*Office International des Epizooties*) "*Aquatic Animal Health Surveillance*" si dovrebbe utilizzare un campione della popolazione che fornisca il 95% di confidenza per l'identificazione di un patogeno, utilizzando le tecniche *gold standard* [WHO, 2010]. In realtà, questo *modus operandi* è utilizzato per il pesce destinato al consumo e poco si sa per quel che concerne i pesci utilizzati nella ricerca.

In genere gli Zebrafish campionati per l'*Health monitoring* sono scelti in modo

Tab. 4 – Test diagnostici che possono essere utilizzati nella sorveglianza microbiologica e nello *screening* sui pesci campionati (a partire da rene, cuore, cervello, branchie, fegato, milza generalmente in *pool*).

Batteriologia	Tecnica/che diagnostiche
Batteri aerobi	Coltura su *Tryptic Soy Agar* e agar sangue
Mycobacteria spp.	PCR
Edwarsiella ictaluri	Coltura + PCR
Flavobacterium columnare	Coltura + PCR
Aeromonas hydrophila	Coltura + PCR
Virologia	
Colture cellulari	Linee cellulari FHM e BF-2
Parassitologia	
Pseudocapillaria tomentosa	Microscopia + PCR
Pseudoloma neurophilia	PCR

(modificata da Marancik, 2019)

randomizzato da diverse sottopopolazioni presenti nello stabulario, in modo da avere un'ampia distribuzione campionaria. Inoltre, alcune *facilities* scelgono di avere delle "sentinelle" (così come avviene nei roditori), cioè pesci stabulati in contenitori isolati che sono esposti all'acqua in uscita. Molto importante è, però, utilizzare tecniche diagnostiche sensibili e specifiche per i patogeni da ricercare.

In caso di morbilità/mortalità elevate nello stabulario, dal momento che l'acqua è il mezzo nel quale gli animali si trovano ed è anche il mezzo responsabile della diffusione rapida dei patogeni, una scelta possibile è quella di eseguire esami microbiologici su campioni di acqua. È possibile determinare la conta batterica totale mesofila a 25°C e a 37°C (come viene fatto per l'acqua di bevanda destinata al consumo umano) [Proctor, 2015; Saxena, 2015], oltre alla presenza di *E. coli*, coliformi, coliformi fecali, *Pseudomonas*, ecc. [Saxena, 2015]. Anche per l'acqua sono a disposizione diverse tecniche diagnostiche, di cui quelle basate sulla biologia molecolare sono estremamente sensibili. Va ricordato, però, che i risultati ottenuti con queste tecniche, basate sulla ricerca del DNA o dell'RNA, non sono correlabili alla vitalità dei microrganismi, in quanto l'acido nucleico può persistere anche in cellule morte. Pertanto, quando possibile, sarebbe meglio affiancare alle tecniche di isolamento molecolari quelle "classiche", che permettono di valutare anche la vitalità del patogeno [Saxena, 2015].

Per il controllo dell'acqua è possibile anche sfruttare i sistemi ad ATP, che permettono di valutare la carica microbica utilizzando la misurazione dell'energia prodotta dai microrganismi; questa tecnica fornisce una stima diretta della concentrazione microbica e della vitalità. L'ATP viene quantificato misurando la luce prodotta attraverso la reazione fra l'ATP e l'enzima luciferasi usando un luminometro; la quantità di luce prodotta è direttamente proporzionale alla quantità di organismi viventi presenti nel campione. Maggiore è la carica, maggiore è la misura dell'ATP in superficie (unità di misura: RLU - *Relative Light Units*) e la misura è rapidissima (< 1 min).

Alla luce di quanto illustrato, il ruolo del microbiologo nella diagnostica di un problema infettivo all'interno di un'*aquatic facility* è di nuovo fondamentale, poiché può guidare il veterinario e il responsabile del benessere, nonché i ricercatori coinvolti, nella definizione dei protocolli da seguire per il monitoraggio sanitario, nella scelta dei campioni significativi, nella scelta delle tecniche diagnostiche più appropriate all'identificazione microbica e, non ultima, nell'interpretazione dei risultati ottenuti.

COME INTERVENIRE?

Una volta appurata la presenza di un rischio o di un'infezione sostenuta da microrganismi (batteri soprattutto), è necessario intervenire sull'acqua e sui sistemi di stabulazione. Poiché molte malattie possono diffondersi attraverso il contatto fisico tra i pesci, attraverso le vasche e i sistemi di circolazione dell'acqua, qualsiasi parte delle attrezzature a contatto con gli animali deve essere sanitizzata periodicamente. Per tale disinfezione è possibile utilizzare sostanze chimiche ma è necessario risciacquare abbondantemente per evitare la contaminazione dell'acqua. Più sicuro è l'utilizzo del calore e dell'autoclavaggio a 121°C, che permette la sterilizzazione dei materiali. I nidi possono essere immersi sia in acqua calda per almeno 10 min e poi asciugati, sia immersi in una miscela di disinfettanti commerciali e acqua ottenuta per osmosi inversa per 1 ora. Le vasche, i coperchi, i sistemi per l'alimentazione, i contenitori, ecc. possono essere puliti utilizzando i metodi precedentemente illustrati con l'eventuale aggiunta di candeggina dal 2 al 5%. La mancanza di linee guida aggiornate porta ad avere sistemi di disinfezione diversi nelle diverse strutture [Garcia, 2011].

In conclusione, il microbiologo si trova davvero davanti a una sfida nel caso del monitoraggio sanitario per animali acquatici uti-

lizzati nella ricerca. Infatti, i microrganismi in questo ambiente si trovano in un equilibrio molto fragile e possono comportarsi come commensali o come patogeni a seconda delle fluttuazioni anche minime dei diversi parametri, che a loro volta possono causare *stress* nei pesci.

La sfida potrà essere vinta o almeno affrontata, però, soltanto collaborando con tutto il personale coinvolto nello stabulario e puntando sull'educazione al corretto approccio alle patologie infettive negli acquatici.

BIBLIOGRAFIA

Aleström P, D'Angelo L, Midtlyng PJ, Schorderet DF, Schulte-Merker S, Sohm F, Warner S: Zebrafish: Housing and husbandry recommendations. Laboratory Animals 0(0) 1–12, 2019

Costerton JW, Geesey GG, Cheng KJ: How bacteria stick. *Sci. Am.*, 238: 86–95, 1978

Donlan RM, Costerton JW: Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clin Microbiol Rev.*, 15(2):167-93, 2002

Fiorito G, Affuso A, Basil J, Cole A, de Girolamo Paolo, D'Angelo L, Dickel L, Gestal C, Grasso F, Kuba M, Mark F, Melillo D, Osorio D, Perkins K, Ponte G, Shashar N, Smith D, Smith J, Andrews PLR: Guidelines for the Care and Welfare of Cephalopods in Research –A consensus based on an initiative by CephRes, FELASA and the Boyd Group. *Laboratory Animals*, 49(S2), 1–90, 2015

Garcia RL & Sanders GE: Efficacy of Cleaning and Disinfection Procedures in a Zebrafish (*Danio rerio*) Facility. JAALAS, 50(6), 2011

https://zebrafish.org/wiki/health/disease_manual/start

Institute for Laboratory Animal Research (ILAR): Guide for the care and use of laboratory animals. Washington DC, National Academic Press, 2011

Kent ML, Feist SW, Harper C, Hoogstraten-Miller S, Law JM, Sánchez-Morgado JM, Tanguay RL, Sanders GE, Spitsbergen JM, Whipps CM: Recommendations for control of pathogens and infectious diseases in fish research facilities. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol*, 149(2): 240-8, 2009

Lawrence C & Mason T: Zebrafish Housing Systems: A Review of Basic Operating Principles and Considerations for Design and Functionality. *ILAR Journal*, 53(2), 179-191, 2012

Mansfield KG, Riley LK, Kent ML: Workshop summary: detection, impact, and control of specific pathogens in animal resource facilities. *ILAR Journal*, 51(2), 171-179, 2010

Marancik D, Collins J, Afema J, Lawrence C: Exploring the advantages and limitations of sampling methods commonly used in research facilities for zebrafish health inspections. *Laboratory Animals* 0(0) 1-13, 2019

Mason TJ & Matthews M: Aquatic environment, housing and management in the Eight Edition of the *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals*: additional considerations and recommendations. *JAALAS*, 51(3), 329-332, 2012

Murray KN, Varga ZM, Kent ML: Biosecurity and health monitoring at the Zebrafish International Resource Center. Zebrafish 13(S1), S-30-S-38, 2016

Poli G, Dall'Ara P, Martino PA, Rosati S: Microbiologia e immunologia veterinaria. EDRA Milano, 2017

Proctor CR, Edwards MA, Pruden A: Microbial composition of purified waters and implications for regrowth control in municipal water system. *Environ. Sci.: Water Res. Technol*, 1, 882-892, 2015

Saxena G, Bharagava RN, Kaithwas G, Raj A: Microbial indicators, pathogens and methods for their monitoring in water environment. J of Water and Health, 13(2), 319-339, 2015

Whipps CM, Matthews JL, Kent ML: Distribution and genetic characterization of *Mycobacterium chelonae* in laboratory zebrafish *Danio rerio*. *Dis Aquat Organ*, 82(1): 45-54, 2008

World Organisation for Animal Health. Aquatic animal health surveillance. In: Aquatic animal health code. 13th ed. Paris: World Organisation for Animal Health, 9-43, 2010
www.eufishbiomed.kit.edu: The European Society for Fish Models in Biology and Medicine

ALLEVAMENTO DI *XENOPUS LAEVIS*: PRINCIPII GENERALI

ELENA MENEGOLA, SILVIA CAMERONI, RENATO BACCHETTA, FRANCESCA DI RENZO
Università degli Studi di Milano, Dipartimento di Scienze e Politiche Ambientali
Corresponding Author: Elena Menegola - elena.menegola@unimi.it

INTRODUZIONE

Xenopus laevis, Anfibio Anuro di origine africana, è utilizzato come organismo modello per studi di fisiologia fin dall'inizio del '900. In questo periodo venne anche utilizzato per effettuare test di gravidanza, in quanto l'iniezione ipodermica nelle femmine di *X. laevis* di urina umana era in grado di stimolare la deposizione delle uova solo se l'urina conteneva gonadotropina corionica umana (hCG), ormone prodotto solo in gravidanza). In seguito, proprio per la possibilità di stimolare la deposizione di uova iniettando hCG, è stato proposto come modello per studi di biologia dello sviluppo e embriotossicità (tra i test di tossicologia dello sviluppo si ricordi il test FETAX- Frog Embryo Teratogenesis Assay: Xenopus, validato ECVAM). Più recentemente, *Xenopus* è stato identificato come modello per lo studio degli effetti di interferenti endocrini, usando la metamorfosi come evento sensibile a tali composti (test XEMA- *XEnopus* Matamorphosis Assay).

Nonostante *X. laevis* sia un modello utilizzato da parecchi decenni, non ci sono linee guida standard univoche per la cura e la gestione degli Anfibi da laboratorio. Di seguito descriveremo le caratteristiche della specie e le condizioni considerate ideali per l'allevamento al fine di garantire il benessere animale.

CARATTERISTICHE E HABITAT NATURALE

X. *laevis* è un Anfibio Anuro acquatico dal corpo piatto e piriforme, in cui è caratteristica la presenza dell'organo della linea laterale anche dopo la metamorfosi. Nell'adulto quest'organo è visibile in posizione laterodorsale dalla base del cranio fino alla porzione caudale e consta di circa 180 neuromasti specializzati per percepire lo spostamento dell'acqua attorno all'animale e rilevare la presenza di predatori o prede (Elepfandt, 1996; Van Zutphen et al., 2001). La piccola testa è caratterizzata da occhi dorsali privi di palpebre, atti a perlustrare la superficie dell'acqua, e assenza di lingua (sono animali definiti per questo aglossi). Le narici sono posizionate sulla sommità del muso e la presenza di due cavità nasali (la vomero-nasale e la rostrale) offre loro la possibilità di percepire gli odori sia nell'aria che nell'acqua (Elepfandt, 1996). Pur avendo orecchio interno e orecchio medio ben sviluppati, la pelle della zona auricolare è indifferenziata senza una apertura otica visibile. Tale morfologia permette a *X. laevis* di percepire molto bene i suoni sott'acqua.

La pelle dell'animale selvatico è mimetica: di un colore bruno – verde con tonalità grigio oliva e grandi macchie scure sul dorso, mentre le parti ventrali sono biancogiallastre (Deuchar, 1975). Linee albine sono state ottenute tra gli animali allevati, benché il tipo di albinismo non sia totale e dipenda dallo stadio del ciclo vitale (viene detto albinismo periodico) (Hoperskaya, 1975). L'epidermide è sottile, con funzione respiratoria soprattutto per dissipare CO_2 (Van Zutphen et al., 2001). Nel derma sono alloggiate ghiandole alveolari, a secrezione mucosa e sierosa. I secreti, riversati sulla superficie cutanea, hanno funzioni impermeabilizzanti e antibatteriche, costituendo una barriera contro gli agenti patogeni potenzialmente aggressivi (batteri, funghi, protozoi) (Schultz & Dawson, 2003). Tra i secreti cutanei protettivi, è stata descritta una nuova classe di sostanze antibiotiche di particolare interesse, le

magainine (peptidi con attività antiparassitaria, antivirale e, sembra, anche antitumorale, motivo questo che rende X. *laevis* interessante agli occhi delle case farmaceutiche).

Gli arti anteriori hanno quattro dita filiformi libere, atte a portare il cibo alla bocca e a sminuzzarlo, mentre quelli posteriori hanno cinque dita palmate, atte al nuoto. La possente muscolatura degli arti posteriori rende *X. laevis* abile anche nel salto. La presenza di artigli è caratteristica ed ha portato al nome comune anglosassone di *African clawed frog*.

Gli esemplari femmine differiscono dai maschi per la presenza di alette cloacali, per i fianchi allargati e per le dimensioni maggiori (oltre i 15 cm dal muso alla cloaca, mentre i maschi raggiungono al massimo i 10 cm) (University of Ariziona, 2001).

Dal punto di vista cromosomico *X. laevis* ha un cariotipo allotetraploide, con n=18 cromosomi. Funzionalmente, tuttavia, si comporta da diploide.

Classificazione di *Xenopus laevis*:

Classe	Amphibia
Subclasse	Lissamphibia
Superordine	Salientia
Ordine	Anura
Famiglia	Pipidae
Sottofamiglia	Dactylethrinae
Genere	*Xenopus*
Specie	*X. laevis*

X. laevis ha origini africane, ma attualmente si trova anche in America settentrionale e in Gran Bretagna, dove è stato introdotto artificialmente e dove è entrato in competizione con le specie endemiche.

X. laevis annovera diverse sottospecie che si possono trovare nella Penisola del Capo in Sud Africa, in Sudan a nord-est e Nigeria a nord-ovest. Nonostante queste sottospecie si trovino in tutto il Sud Africa, nello Zimbabwe e anche in altri continenti, si ritiene che in realtà siano discendenti della popolazione nativa residente nella Penisola del Capo in Sud Africa (Carr et al., 1987; Tinsley and McCoid, 1996). La sottospecie maggiormente utilizzata nei laboratori è *X. laevis laevis*.

L'habitat naturale di *X. laevis* non è univoco: fiumi, laghi, acquitrini, stagni o fossati con un fondo fangoso, di solito poco profondi, sono alcuni degli ambienti colonizzati in natura. Pur essendo, in condizioni normali, totalmente acquatici (Mattison, 1998; Tyler 1999) nei periodi di accoppiamento o quando si verifica un periodo di siccità, gli adulti possono ricorrere a due possibili strategie: possono migrare alla ricerca di nuove pozze stagionali, muovendosi abbastanza velocemente attraverso una serie di salti "lolloping leaps", oppure possono scavare una nicchia nel fango con un'apertura per l'aria (Deuchar, 1975; Wilson et al. 2002) dove possono rimanere, in uno stato di dormienza o torpore, anche per otto mesi senza cibarsi (estivazione) (Hewitt and Power, 1913).

La migrazione è limitata dalla distanza (gli esemplari selvatici possono spostarsi di 0,2 Km durante la tarda primavera in cerca di un luogo adatto per la deposizione delle uova (Tinsley and McCoid, 1996)) e dal periodo dell'anno. Gli animali preferiscono le serate piovose, così da limitare il pericolo di una disidratazione eccessiva che, in un paio d'ore potrebbe portare alla morte (Van Zutphen et al. 2001). Nel periodo in cui estivano, sono in grado di alterare la concentrazione osmotica dei fluidi corporei trattenendo l'urea, aumentandone i livelli e generando uno stato ipertonico: strategia che consente loro di minimizzare la perdita d'acqua (Balinsky et al., 1967; Stebbins and Cohen, 1995; Wray & Wilkie, 1995). L'abilità di sopportare stati ipertonici rende *Xenopus* in grado di invadere anche ambienti salmastri (Munsey, 1972; Romspert, 1976).

L'habitat ideale può essere in ambienti molto diversi tra loro ma in genere *X. laevis* predilige acque piuttosto ferme, eutrofiche (laghi poco profondi con larghe rive, paludose o no, con acque chiare, verdi o gialle, ricche di sali umici e di fitoplancton), prive di pesci predatori, con fondi soffici e non ghiaiosi, con vegetazione emergente, con una temperatura intorno ai 20°C quasi tutto l'anno. Queste condizioni sono state correla-

te a benessere, alto tasso riproduttivo con anche un ampliamento del periodo riproduttivo oltre ad un acceleramento dello sviluppo larvale (McCoid and Fritts, 1993, 1995).

CARATTERISTICHE COMPORTAMENTALI

X. laevis è una specie territoriale, notturna che vive in colonie, nelle quali si stabilisce una gerarchia. Pur non avendo corde vocali o sacchi vocali, sono in grado di emettere suoni caratteristici (clicks e buzzes) tramite i quali gli individui comunicano tra loro (Tinsley & Kobel, 1996).

Il normale comportamento consiste nel trascorrere la maggior parte del tempo giacendo immobili sulla superficie dell'acqua (University of Arizona, 2001) con gli arti anteriori estesi, aspettando il cibo (Mattison, 1998). La dieta nell'adulto è pressoché onnivora, si basa quasi completamente sulla predazione di organismi acquatici, in prevalenza crostacei, insetti nectonici e bentonici; una quota inferiore della dieta deriva da animali terrestri caduti accidentalmente in acqua e da predazione nei confronti di uova e larve di altre specie di anfibi e di pesci. Gli artigli delle zampe posteriori facilitano la presa di insetti e altri alimenti dal fango e, se la preda è grande, la frammentazione in porzioni facilmente ingeribili.

Il periodo riproduttivo in natura nel luogo di origine di *X. laevis* è la tarda primavera, quindi da settembre (Primavera) a Marzo (fine Estate); talvolta questo intervallo di tempo si allunga decisamente tra marzo e giugno se le condizioni sono favorevoli (Measey, 2004). Il picco di massima intensità dei richiami sonori maschili si riscontra in aprile - maggio. In natura ci sono condizioni di concorrenza tra i maschi per l'accesso alle poche femmine recettive, viene quindi stabilita una gerarchia in cui i subordinati raramente possono vocalizzare (Tobias et al. 2004). Nel periodo recettivo le femmine mostrano le alette cloacali arrossate mentre i maschi sviluppano guanti nuziali di un colore marrone scuro sugli avambracci interni e le dita, con i quali trattengono più facilmente le femmine durante l'accoppiamento (Sive et al, 2000). Il maschio sale sul dorso della femmina stringendola alla vita e così facendo esplica un'azione di "spremitura" meccanica sull'addome della femmina a cui è abbracciato. Questa posizione può durare più di 12 ore (Sive et al. 2000); durante questo periodo la femmina depone in tempi diversi e il maschio contemporaneamente al rilascio delle uova rilascia lo sperma, assicurando la fecondazione. La fecondazione è esterna e le uova vengono deposte, coperte da una massa gelatinosa prodotta dagli ovidutti, su piante acquatiche, rocce o strutture bentoniche. Gli adulti effettuano durante l'accoppiamento una serie di capriole in acqua e centinaia di uova vengono rilasciate e fertilizzate (Deuchar, 1975; Dawson et al, 1992).

La divisione cellulare procede subito dopo la fecondazione e in poche ore la fase di blastula è raggiunta. La schiusa dalla membrana vitellina avviene dopo due o tre giorni; dall'uovo fuoriescono larve che inizialmente si attaccano al substrato circostante tramite l'organo adesivo che secerne una secrezione collosa. Successivamente le larve si staccano e iniziano a nutrirsi in forma libera (stadio 47 secondo Nieuwkoop e Faber, 1956) (McCoid and Fritts, 1980). Essendo erbivori filtratori, i girini di X. *laevis* si cibano filtrando il fitoplancton, in particolare le diatomee e altre alghe unicellulari, i protozoi e i batteri (Deuchar, 1975; Schoonbee et al., 1992) in sospensione nell'acqua.

La dieta carnivora subentra dopo la metamorfosi (completata in due o tre mesi dalla fecondazione) (University of Arizona, 2001).

I giovani sono voraci e aggressivi, nutrendosi pressoché di tutto quello che trovano, manifestando anche episodi di cannibalismo verso i giovani conspecifici.

ALLEVAMENTO

Affinché l'allevamento porti al maggior benessere animale, è indispensabile riprodurre al meglio le condizioni dell'ambiente colonizzato, considerando che *X. laevis* allevato in laboratorio si adatta perfettamente

alla presenza discreta dell'uomo (può rimanere completamente 'indifferente' al rumore improvviso e può abituarsi allo spostamento frequente di persone nella stanza) (Consiglio d'Europa, 2004).

Vanno evitati inutili movimenti delle mani sopra la vasca che spaventano gli esemplari sospesi sulla superficie dell'acqua inducendole a rispondere con la fuga per nascondersi. Questa risposta non è solitamente stimolata da oggetti che passano a lato della vasca (Elepfandt, 1996), ma solo da oggetti in rapido movimento sopra la vasca (in natura, uccelli predatori).

Visto che *X. laevis* in natura vive in gruppi gerarchici, il raggruppamento è consigliabile. I principali vantaggi sono dati dall'abitudine all'alimentazione collettiva (in questa specie frenesie per l'alimento non sono così diffuse quando gli animali vivono isolati o in numero molto ridotto [Consiglio d'Europa, 2004]) e da una riduzione marcata delle risposte alla paura.

Mantenere la stabilità dei gruppi è consigliabile per agevolare le relazioni co-specifiche riducendo situazioni di stress che spesso sfociano in lotte tra individui provocando loro lesioni e ferite.

Nel D.lgs 26/2014 non ci sono indicazioni precise per l'allevamento di *X. laevis*. La dimensione del gruppo deve essere calibrata alle dimensioni della vasca di allevamento (gli individui non devono trovarsi in condizioni di sovraffollamento in quanto le risposte frenetiche per l'alimentazione possono portare i compagni di vasca a infliggersi lesioni traumatiche) (De Nardo, 1995). Stabilito il numero di animali favorevole a incoraggiare questi comportamenti, il concetto di "area per esemplare" diventa più importante del numero effettivo di esemplari presenti nella vasca. La densità di popolazione all'interno della vasca è un fattore critico per gli animali in crescita, maggiore è la densità minore è la crescita e, per gli adulti, la produttività (Hilken et al. 1995). Inoltre, ricordiamo che una densità troppo elevata e livelli d'acqua insufficienti influiscono negativamente sulla qualità degli ovociti nelle femmine, provocando in alcuni casi la regressione dell'ovaio (Alexander & Bellerby, 1938).

Il gruppo che viene composto dovrebbe essere abbastanza piccolo da consentire la formazione di una gerarchia stabile, ma anche abbastanza grande da promuovere deliri per l'alimentazione. In assenza di dati completi che ci permettano di stabilire l'ottimale dimensione di un gruppo di *X. laevis*, si è visto che gruppi composti minimo da 5 o 6 animali risultano funzionali. È importante, infine, che gli animali tenuti insieme nella stessa vasca siano di dimensioni simili (animali più grossi possono cannibalizzare i più piccoli). Per alloggiare 4-5 esemplari di medie dimensioni, LASA (2001) raccomanda una dimensione della vasca di 65 x 45 x 45 cm e l'uso di 5-10 litri d'acqua.

Vasche

Le vasche di allevamento devono essere costruite con materiale atossico, liscio, antiurto, impermeabile, possibilmente a ridotta crescita di alghe, facile da pulire e senza spigoli vivi. I materiali maggiormente utilizzati sono le plastiche PVC autoclavabili (Schultz & Dawson, 2003).

Le vasche devono essere di colore opaco o scuro perché meglio approssima la condizione di stagno (Sive et al. 2000). Un fondo scuro o nero migliora il senso di sicurezza degli animali (Consiglio d'Europa, 2004; Goldin, 1992; Hilken et al. 1995). Le vasche dotate di un pavimento trasparente, permettono infatti il passaggio della luce da sotto, che è l'esatto opposto di ciò che si verifica in uno stagno naturale.

Il coperchio, indispensabile per evitare le fughe, deve consentire all'aria di circolare liberamente.

La forma della vasca è altrettanto importante, non deve limitare l'attività locomotoria e il comportamento sociale, come le reazioni euforiche (Consiglio d'Europa, 2004), devono avere spazio sufficiente per poter aggiungere oggetti che costituiscono un arricchimento ambientale, come ad esempio rifu-

gi e ninfee artificiali (Brown & Nixon, 2004; Kreger, 2002; Schaeffer 1999).

A questo riguardo il D.lgs 26/2014 dà indicazioni molto generali e adatte a qualsiasi specie, espresse nell'allegato III Sezione A, Paragrafo 3.3, comma a) - b) – c):

a) Alloggiamento

Gli animali, ad eccezione di quelli per natura solitari, sono alloggiati in gruppi stabili di individui compatibili. Nei casi in cui sono consentiti alloggiamenti singoli ai sensi dell'articolo 33, paragrafo 3, la durata è *limitata allo stretto necessario ed* è *mantenuto il contatto visivo, uditivo, olfattivo e tattile. Si deve sorvegliare attentamente l'inserimento o il reinserimento degli animali in gruppi stabili per evitare problemi di incompatibilit*à *e perturbazioni delle relazioni sociali.*

b) Arricchimento

*Tutti gli animali dispongono di spazio sufficientemente complesso che consenta loro di esprimere un ampio repertorio di comportamenti normali. Essi dispongono di un certo grado di controllo e di scelta rispetto al proprio ambiente per ridurre comportamenti indotti da stress. Gli stabilimenti mettono in atto tecniche adeguate di arricchimento per ampliare la gamma di attivit*à *a disposizione degli animali e aumentare la loro capacit*à *di risposta tra cui l'esercizio fisico, il foraggiamento e le attivit*à *di manipolazione e cognitive adeguate alle specie interessate. L'arricchimento ambientale offerto negli alloggiamenti* è *adattato alle specie e alle esigenze individuali degli animali. Le strategie di arricchimento negli stabilimenti sono riviste e aggiornate periodicamente.*

c) Alloggiamenti

Gli alloggiamenti non sono costruiti con materiali dannosi per la salute degli animali. Essi sono progettati e costruiti in modo da non danneggiare gli animali. Se non si tratta di strutture usa e getta, sono costruiti con materiali resistenti alle tecniche di pulizia e decontaminazione applicate. La progettazione delle pavimentazioni degli alloggiamenti è *adattata alle specie e all'et*à *degli animali ed* è *progettata in modo da facilitare l'asportazione degli escrementi.*

Parametri di allevamento

I parametri consigliati sono parzialmente diversi a seconda delle fonti, di seguito i parametri che riteniamo più idonei:

- *Temperatura della stanza*: 18°C. Deve essere circa 3°C in meno rispetto a quella dell'acqua ma idonea anche per il personale che vi lavora.
- *Ricambi d'aria all'ora*: 10-12
- *Fotoperiodo*: 12 ore di luce e 12 ore di buio. È consigliabile la simulazione di alba e tramonto.
- *Illuminazione*: Non deve esserci illuminazione diretta delle vasche. Lux delle lampade: 54-354 a livello della superficie dell'acqua.
- *Parametri dell'acqua*: sono in commercio sistemi rack che permettono il controllo automatizzato dei parametri dell'acqua di allevamento (pH 6,5 - 8,5; conducibilità: 900-1.100 μS; temperatura di allevamento adulti: 18°C-20°C; temperatura di allevamento per larve-girini fino a un anno: 22-23°C; concentrazione di Ammoniaca: 0 mg/L; concentrazione di Nitriti: < 0.3 mg/L; concentrazione di Nitrati: < 25 mg/L). In generale il ricambio dell'acqua non deve causare flussi troppo alti (solitamente è sufficiente il ricambio del 10% nelle 24 ore, anche se questo parametro può essere anche raddoppiato a seconda delle concentrazioni di nitriti e nitrati).
- *Alimentazione*: *X. laevis* adulto è carnivoro (Phillips, 1979), in natura si ciba anche di carcasse di animali morti anche se preferisce cibo vivo (Green, 2002), è vorace e si serve dell'olfatto per portare alla bocca qualsiasi potenziale alimento. Pur essendo insetti la preda più comune negli animali adulti (Tinsley & Kobel, 1996), dall'esame del contenuto dello stomaco sono stati trovati anche i resti di pesci, uccelli e altri anfibi, lumache, vermi e altri invertebrati acquatici (Green, 2002). Non

essendo indispensabile per la cattura il movimento della preda, gli esemplari allevati accettano facilmente prodotti alimentari preparati *ad hoc*.
Si consiglia di somministrare il cibo alla fine della giornata in modo che consumino e digeriscano il loro cibo indisturbate durante la sera/notte, questo riflette più da vicino il comportamento in natura ed evita il problema di rigurgito da stress e paura (la letteratura scientifica dimostra che esiste il rigurgito del cibo correlato allo stress, University of Arizona 2001). È importante non disturbare e non manipolare i soggetti per almeno 3-5 ore per evitare che rigurgitino il cibo con rischio di soffocamento.
La quantità di cibo somministrata per unità varia a seconda dell'età, della stagione, del genere e della temperatura dell'acqua. Si raccomanda in condizioni standard circa 1 g/animale. La frequenza consigliata di somministrazione del cibo agli adulti varia fra i vari autori: giornaliera, una volta a settimana o 2-3 volte a settimana. Il cibo non consumato entro la mattina successiva la somministrazione deve essere rimosso per prevenire la contaminazione dell'acqua.

Il monitoraggio sanitario deve essere effettuato da veterinari qualificati, che diano anche indicazioni sulla necessità di una eventuale quarantena.

BIBLIOGRAFIA

Alexander & Bellerby, 1938. Experimental studies on the sexual cycle of the South African clawed toad (Xenopus laevis). I. Journal of Experimental Biology 15:74-81.

Balinsky et al., 1967. The reproductive ecology of amphibians of the Transvaal Highveld. Zoologica Africana 4:37–93.

Brown & Nixon, 2004. Enrichment for the captive environment – The Xenopus laevis' Animal Technology and Welfare 3:87-95.

Carr et al., 1987. Evolutionary inferences from restriction maps of mitochondrial DNA from nine taxa of Xenopus frogs. Evolution 41:176–188.

Consiglio d'Europa, 2004. Draft Appendix A – of the European Convention for the Protection of Vertebrate Animals used for experimental and other Scientific Purposes (ETS No.123) (8th meeting of the working party)' Council of Europe: Strasbourg.

Dawson et al, 1992. Laboratory care and breeding of the African Clawed Frog' Lab Animal 21:31-36.

De Nardo, 1995. Amphibians as laboratory animals' ILAR Journal V37 (4).

Deuchar, 1975. *Xenopus*: the South African Clawed Frog' John Wiley and Sons, London.

Elepfandt, 1996. Sensory perception and the lateral line system in the clawed frog' p97-120; in 'Biology of *Xenopus*'

Fig. 1 – Femmina riproduttrice albina in allevamento

Fig. 2 – Femmina albina in accoppiamento con maschio pigmentato

Eds Tinsley & Kobel: Oxford University Press, Oxford.

Goldin, 1992. Maintenance of *Xenopus laevis* and oocyte injection' Methods in Enzymology 207:266-279.

Green, 2002. Factors affecting oogenesis in the South African Clawed Frog (Xenopus laevis) Comparative Medicine 52:307-312.

Hewitt and Power, 1913. A list of South African Lacertilia, Ophidia, and Batrachia in the McGregor Museum, Kimberley; with field-notes on various species. Transactions of the Royal Society of South Africa 3:147–176.

Hilken et al. 1995. Growth of Xenopus laevis under different laboratory rearing conditions' Laboratory Animals 29:152-162.

Hoperskaya, 1975 The development of animals homozygous for a mutation causing periodic albinism (ap) in Xenopus laevis. J. Embryol. Exp. Morph. 34:253-264.

Kreger, 2002. Comfortable quarters for amphibians and reptiles in research institutions : p109-114' in 'Comfortable Quarters for Laboratory Animals' Reinhardt,V. & Reinhardt, A. (eds). Animal Welfare Institute, Washington DC, US.

Laboratory Animal Science Association (LASA - 2001) 'Good Practice Guidelines – Xenopus Husbandry' (John Cadera) LASA; Staffordshire.

Mattison, 1998. Frogs and toads of the world' Blandford; London.

McCoid and Fritts, 1993. Speculations on colonizing success of the African clawed frog *Xenopus laevis* Pipidae in California. South African Journal of Zoology 28:59–61.

McCoid, Michael J. and Fritts, Thomas H. (1980). Observations of Feral Populations of *Xenopus laevis* (Pipidae) in Southern California, *Bulletin of the Southern California Academy of Sciences*: Vol. 79: Iss.

McCoid, M.J. and T.H. Fritts; (1995): Female reproductive potential and winter growth of African clawed frogs (Pipidae: *Xenopus laevis*) in California. California Fish and Game 81:39–42.

Measey, 2004. Xenopus laevis' Global Invasive Species Database
http://www.issg.org/database/welcome/

Munsey, 1972. Salinity tolerance of the African pipid frog, *Xenopus laevis*. Copeia 1972:584–586.

Nieuwkoop and Faber, 1956. *Normal Table of Xenopus laevis (Daudin)*. North Holland Publishing Co., Amsterdam.

Phillips, 1979. The care and induced breeding of Xenopus laevis' Journal of the Institute of Animal Technicians 30:11-16.

Romspert, 1976. Osmoregulation of the African clawed frog, *Xenopus laevis*, in hypersaline media. Comparative Biochemistry and Physiology A 54:207–210.

Schaeffer 1999. Breeding, maintenance and use of non-mammalian species – care of laboratory reptiles and amphibians' Proceedings of the International XII ICLAS and VII FELASA Joint meeting 26-28 May 1999, Palma de Mallorca, Spain.

Schoonbee et al., 1992. Observations on the feeding habits of larvae, juvenile and adult stages of the African clawed frog *Xenopus laevis* in impoundments in Transkei. Water South Africa 18:227–236.

Schultz & Dawson, 2003. Housing and husbandry of Xenopus for oocyte production' Lab Animal 32:34-39.

Sive et al, 2000. Early development of Xenopus laevis – a laboratory manual' Cold Spring Harbor Laboratory Press: New York.

Stebbins and Cohen, 1995. A Natural History of Amphibians. Princeton University Press, Princeton, New Jersey.

Tinsley & Kobel, 1996. The Biology of Xenopus' Oxford University Press, Oxford.

Tinsley and McCoid, 1996. Feral populations of Xenopus outside Africa' 81-94; in 'Biology of Xenopus' Eds Tinsley & Kobel: Oxford University Press, Oxford.

Tobias et al. 2004. Vocal communication between male Xenopus laevis' Animal Behaviour 67:353-365.

Tyler 1999. Frogs and toads as experimental animals' ANZCCART news Vol. 12, no.1: Australia.

University of Ariziona, 2001. Institutional Animal Care and Use Committees (IACUC) guidelines on 'Care and handling of Xenopus laevis'

http://www.ahsc.arizona.edu/uac/iacuc/xenopus/xenopus.shtml

Van Zutphen et al., 2001. Principles of laboratory animal science' Elsevier, Amsterdam.

Wilson et al. 2002. Trade-offs between speed and endurance in the frog Xenopus laevis: a multi-level approach' The Journal of Experimental Biology 205:1145-1152.

Wray & Wilkie, 1995. The relationship between plasma urea levels and some muscle trimethylamine levels in Xenopus laevis: A 31P and 14N nuclear magnetic resonance study' The Journal of Experimental Biology 198:373-378.

XENOPUS LAEVIS NELLA RICERCA DALLA BIOLOGIA DELLO SVILUPPO ALLO STUDIO DI PROTEINE ETEROLOGHE

ELENA BOSSI*, RAFFAELLA CINQUETTI, CRISTINA ROSETI, FRANCESCA VACCA
Università degli Studi dell'Insubria, Department of Biotechnology and Life Sciences
Via J.H. Dunant, 3 – 21100 Varese
**Corresponding author: elena.bossi@uninsubria.it*

Lo *Xenopus Laevis*, anfibio anuro, è una specie acquatica utilizzata da ormai quasi un secolo nei laboratori di tutto il mondo. Già a partire dalla fine del XIX secolo gli anfibi venivano utilizzati per studi di embriologia, e dagli anni '20 del secolo scorso l'utilizzo dello xenopus compare nelle pubblicazioni scientifiche. Nel corso degli ultimi 30 anni, questa specie è stata adottata come (animale) modello principalmente nella biologia dello sviluppo e i suoi oociti nell'espressione eterologa finalizzata allo studio funzionale delle proteine di membrana. Lo xenopus, inoltre, è stato utilizzato da Thomas Morgan, premio Nobel nel 1933 per i suoi studi sul ruolo dei cromosomi nella , trasmissione ereditaria, condotti e finalizzati però in un altrettanto famoso organismo modello: la Drosophila (*Drosphila Melanogaster*). L'endocrinologo Lancelot Hogben avvia la propria carriera accademica in Sudafrica negli anni '30, svolgendo ricerche sui cromatofori, ed utilizza per i suoi studi una specie locale, lo *Xenopus laevis* appunto, durante la sua ricerca osserva come l'iniezione di estratto di ghiandola pituitaria in una femmina di xenopus induca l'ovulazione dopo poche ore. Da tempo i ricercatori tentavano di individuare una specie ad ovulazione continua per sviluppare un test di gravidanza, gli studi di Hogben, perciò, permisero di identificare questo anfibio come possibile animale per testare la presenza di gondatropine in fluidi iniettati nell'animale. In precedenza, i tentativi di sviluppare un test di gravidanza richiedevano il sacrificio dell'animale (topi, ratti o conigli), tempi molto lunghi e scarsi risultati. Hogben, con i suoi esperimenti verificò che la femmina *X. laevis* ovula se iniettata

Fig. 1 – *Xenopus Laevis*

con l'urina da una donna gravida, la presenza dell'ormone gonadotropina corionica stimola, infatti, l'ovideposizione degli oociti entro 18 ore. Questo effetto è dovuto alla presenza, nell'ovaio di xenopus, di oociti a tutti e sei possibili stadi di maturazione e all'assenza di stagionalità dei cicli riproduttivi. Per diverso tempo, fino alla fine degli anni '50, l'Hogben Test è stato l'unico test di gravidanza disponibile tanto che molti ospedali e diversi laboratori allevavano *X. laevis* per questo scopo. La paternità dell'utilizzo dello xenopus come test di gravidanza è tuttavia controversa dal momento che il primo a pubblicare questo studio è stato Hillel Shapiro, allievo di Hogben durante la sua permanenza in Sudafrica, con Harry Zwarenstein (Sha-

piro and Zwarenstein, 1934). La controversia sulla scoperta è stata discussa in un articolo dei primi anni 2000 dal premio Nobel Gurdon (Gurdon and Hopwood, 2000) , il quale chiarisce come Hogben abbia dimostrato in linea di principio che lo xenopus potesse essere usato per testare la presenza di gonadotropine nelle urine di una donna gravida, ma la sua segnalazione non menziona affatto il test di gravidanza nella pubblicazione, potenzialità che compare invece nel lavoro di Shapiro. In ogni caso è Hogben che, con il suo lavoro, rende definitivamente lo xenopus l'animale modello alla base delle ricerche successive che porteranno a svariati premi Nobel. (https://www.yourgenome.org/stories/the-african-clawed-frog-).

Proprio Gurdon nel 1958 inizia i suoi studi relativi al trapianto di nucleo e pubblica nel 1962 il lavoro, premiato 50 anni dopo con il Nobel, in cui dimostra che la specializzazione delle cellule è reversibile. Egli dimostrò, con un esperimento in cui utilizza uova di *Xenopus laevis*, che la sostituzione del nucleo cellulare immaturo in una cellula uovo con il nucleo di una cellula intestinale matura permette all'uovo di svilupparsi in un normale girino; e dà prova del fatto che il DNA della cellula matura possiede ancora interamente le informazioni necessarie per formare tutte le cellule della rana (Gurdon, 2013; Gurdon, 2015; Halley-Stott et al., 2010).

Con questi esperimenti sviluppò la tecnica del trasferimento nucleare che è ancora ad oggi utilizzata e rese possibile per la prima volta l'applicazione del termine clone ad un animale.

Gurdon ebbe anche un ruolo fondamentale nello sviluppo delle tecniche di espressione eterologa in quanto autore del primo lavoro che dimostra come, a seguito dell'iniezione di RNA codificante per una proteina (in questo primo approccio l'emoglobina e b mioglobina di xenopus), la suddetta proteina possa essere correttamente tradotta e resa funzionale dall'apparato traduzionale dell'ovocita (Gurdon, 1973; Gurdon et al., 1971; Smith et al., 1973).

Per un decennio la tecnica di Gurdon non ebbe particolari applicazioni, tuttavia a partire dai primi anni '80 del secolo scorso tecniche sempre più efficienti di identificazione di nuove sequenze di DNA permisero il clonaggio di geni codificanti per numerose proteine e aumentarono di conseguenza la disponibilità dei rispettivi cRNA.

In molti casi si mostrava necessario confermare la funzionalità della proteina ottenuta, conoscerne la farmacologia e identificare l'attività delle cosiddette proteine "orfane". Così, l'esigenza di un sistema in grado di caratterizzare con dettaglio la funzione e le proprietà di proteine, anche multimeriche, fece sì che la tecnica ideata da Gurdon venisse applicata ottenendo l'espressione funzionale di proteine di membrana. Il premio Nobel nel 2003 Peter Agre utilizza proprio questo sistema per lo studio delle acquaporine (Agre, 2004; Agre and Kozono, 2003)

Dal 1981 la tecnica di espressione eterologa in oociti di *Xenopus laevis* di proteine elettrogeniche, come ad esempio canali ionici, trasportatori e recettori, divenne la tecnica di elezione per gli studi funzionali e farmacologici (Kusano et al., 1982; Sumikawa et al., 1981).

A partire da questo anno, il numero di pubblicazioni riguardo studi che si servono degli oociti di *Xenopus laevis* come sistema di espressione eterologa è cresciuto copiosamente, raggiungendo i 1000 lavori/ anno nel decennio 1996/2006 e stabilizzandosi oltre i 500 negli ultimi anni.

Nella presente relazione l'attenzione sarà focalizzata sull'utilizzo dello xenopus come fonte di cellule uovo, cellule che possono essere considerate delle minuscole fabbriche di proteine. L'utilizzo di queste peculiari cellule è legato ad alcune caratteristiche che le rendono altamente adatte alla caratterizzazione funzionale e farmacologica di proteine elettrogeniche di membrana. Innanzitutto i meccanismi di traduzione sono noti e l'efficienza di traduzione può essere agevolmente incrementata tramite l'utilizzo di strategie specifiche studiate in modo accurato da Wormington e riprese in Bossi et al (Bossi et al., 2007; Wormington, 1991). Le cellule uovo di *X. leavis* hanno dimensioni di circa 1 mm e sono perciò facilmente manipolabili, in particolare

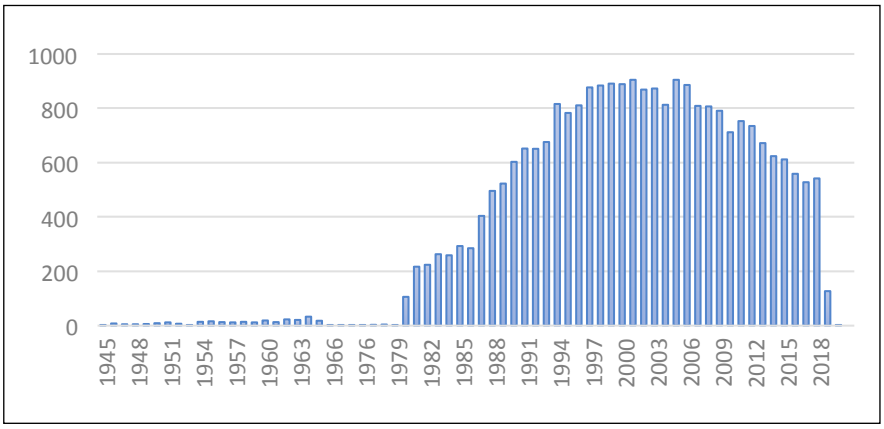

Fig. 2 – *Xenopus laevis* (MeSH terms), numero di pubblicazioni anno

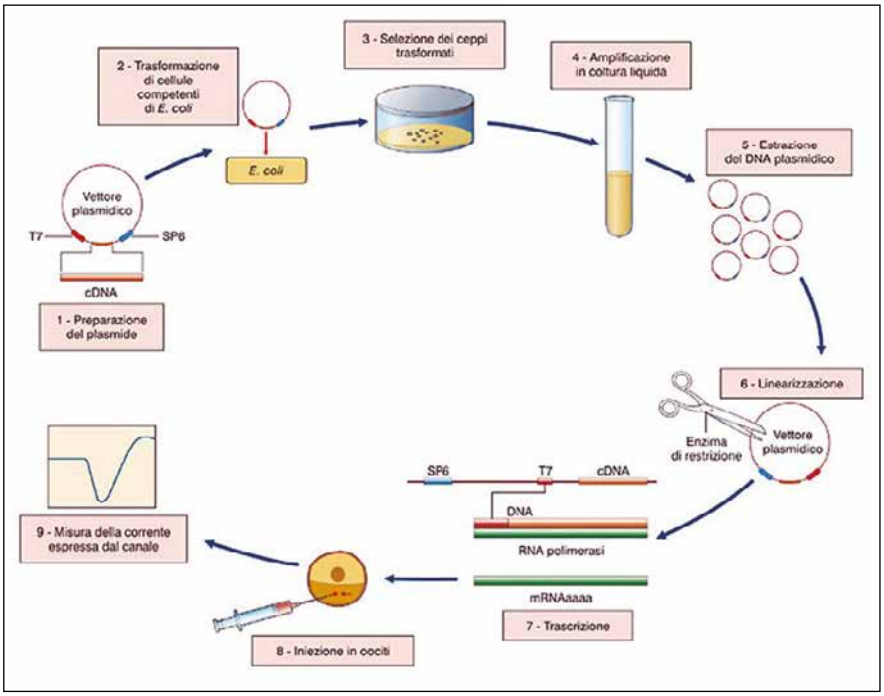

Fig. 3 – Schematizzazione della preparazione del cRNA, della microiniezione ed espressione in oociti di *Xenopus laevis* (Peres A., D'Angelo E., *Fisiologia, Molecole cellule e sistemi*, © 2006 dei.ermes Milano).

nella fase di microiniezione e di analisi elettrofisiologica. Inoltre, possono essere mantenute per una decina di giorni in semplice soluzione salina, addizionata al bisogno con antibiotici e piruvato. Dal momento che tutte le cellule, se correttamente iniettate, esprimono le proteine, è possibile ottenere preparazioni biochimiche omogenee. L'elevata capacità di traduzione e di inserimento di modifiche post-traduzionali fa sì che queste cellule, quando iniettate con cDNA o cRNA codificanti per diverse subunità di proteine multimeriche, siano in grado di assemblare correttamente la proteina stessa, glicosilandola, trasferendola opportunamente in membrana e mantenendo la funzionalità che la proteina stessa aveva nel tessuto originale. Queste caratteristiche permettono lo studio dei ruoli delle singole subunità, e consentono la costruzione proteine chimera e proteine codificanti per mutanti puntiformi o proteine con domini aminoacidici modificati.

Dal momento che, iniettato il cRNA, il 90/95% delle proteine espresse è di tipo esogeno, un grosso vantaggio è rappresentato dalla possibilità di comprendere la funzionalità di una proteina in un ambiente "isolato" (Broer, 2010; Dascal, 1987; Wagner et al., 2000), e in soluzioni saline controllate. Sono noti, infatti, la maggior parte di canali, trasportatori e recettori endogeni espressi rendendo facilmente identificabili le caratteristiche delle proteine esogene (Krause et al., 1996; Sobczak et al., 2010; Terhag et al., 2010; Tosco et al., 2008; Tzounopoulos et al., 1995; Van Winkle, 1993). Inoltre, sono conosciute le principali caratteristiche chimico fisiche, pubblicate in Broer 2010 e riportate nella seguente tabella:

Tab. 1 – *Da Broer (Broer, 2010)*

Proprietà	**Valore**
Volume accessibile	368±21
Permeabilità all'acqua	1-4x10^{-4} cm/s
Superfice	18-30mm^2
Potenziale di membrana	Da -30 a -60 mV
Capacità tampone	20mM/unità di pH a pH 7.0
pH intracellulare	7.4±0.1
Concentrazione di Na^+	4-10mM
Concentrazione di K^+	76-120 mM
Concentrazione di Ca^{2+}	<0.3 mM
Concentrazione di ATP	3-5mM

Gli oociti di *Xenopus leavis* sono utilizzati per l'espressione eterologa tramite microiniezione di RNA (mRNA, cRNA PolyA-RNA) (Sigel, 1990; Soreq and Seidman, 1992), cDNA oppure tramite microiniezione di membrane provenienti da altre cellule isolate per centrifugazione (microtrapianti di membrana) (Marsal et al., 1995; Palma et al., 2012). Eventualmente possono anche essere silenziate proteine endogene tramite i siRNA (Prives and Foukal, 1991).

Il protocollo per la preparazione degli oociti è riportato in numerose pubblicazioni (Bossi et al., 2007; Broer, 2010; Nargeot et al., 1992; Wagner et al., 2000) e qui riassunto. Gli oociti vengono prelevati tramite laparatomia da uno *Xenopus laevis* femmina adulta: anestetizzato l'animale secondo quanto riportato in (Cakir and Strauch, 2005; Smith et al., 2018), l'ovario viene parzialmente estratto tramite una piccola incisione di qualche mm sulla cute e nel muscolo sottostante, a questo punto gli oociti sono prelevati nel numero necessario per l'esperimento. Dopo essere stati asportati, gli oociti vengono separati manualmente in piccoli gruppi e trattati con collagenasi in agitazione a 18°C per la completa separazione e per la rimozione delle cellule follicolari. Successivamente, dopo aver rimosso i residui del trattamento enzimatico, sono selezionati gli oociti che si trovano al V o VI stadio di maturazione in buono stato, con netta separazione tra polo animale e vegetativo, con corretta e omogenea pigmentazione e turgidità. Il giorno successivo al prelievo si procede alla microiniezione di 50nL di mRNA alla concentrazione desiderata. L'iniezione è eseguita con micro-iniettore movimentato da un micromanipolatore allo stereomicroscopio penetrando la cellula, possibilmente nel polo vegetativo, per l'iniezione di mRNA e membrane, raggiungendo poi la vescico-

la germinativa per l'iniezione di cDNA, che sarà trascritto dalla cellula stessa. A questo punto, gli oociti si lasciano in incubazione in soluzione di mantenimento per 48-72h prima di effettuare i test funzionali, in particolare per le proteine di membrana è necessario attendere almeno 60 ore affinché sia lasciato il tempo all'oocita di sintetizzare la proteina di studio e ottenere una buona espressione.

Per concludere, è altresì importante esporre le possibili problematiche che limitano l'utilizzo di questo modello. Innanzitutto, l'espressione è transiente, quindi la proteina espressa a seconda della complessità e dell'emivita permane in membrana per un tempo variabile dalle 48 alle 120 ore, fattore che rende limitato il tempo di utilizzo per ciascun batch. È necessario tener presente anche che queste cellule sono normalmente studiate a circa 18° C e che la composizione della membrana è adattata a queste temperature, per questo motivo è opportuno analizzare la funzionalità delle proteine che la costituiscono solo tra i 17°C e 27° C, per non incorrere in una eccessiva rigidità o eccessiva fluidità della membrana, che altererebbero il comportamento della proteina considerata (Bossi et al., 2012). Ciononostante, proteine di mammifero mantengono perfettamente caratteristiche come affinità, velocità ed efficienza di trasporto alle temperature di 18/21 °C, perché spesso legate alle caratteristiche di fluidità della membrana stessa. Infine, è importante ricordare che non sempre batch diversi esprimono la stessa quantità di proteina, e in alcuni casi la presenza di canali endogeni può influenzare lo studio delle proteine in esame, richiedendo particolari accorgimenti per identificare la funzione della proteina studiata. In altri casi la funzionalità nota di proteine endogene può essere utilizzata per verificare l'attività di diverse proteine o recettori (Bertram et al., 2011).

Sono ora illustrate brevemente alcune applicazioni degli oociti di *Xenopus laevis* nello studio di proteine di trasporto, si è scelto in modo particolare un lavoro significativo per i molteplici approcci utilizzati. Uno delle tecniche maggiormente utilizzate per lo studio della funzionalità di proteine di trasporto elettrogeniche è la misura tramite Voltage clamp a due elettrodi delle correnti generate dall'oocita in risposta alla traslocazione di

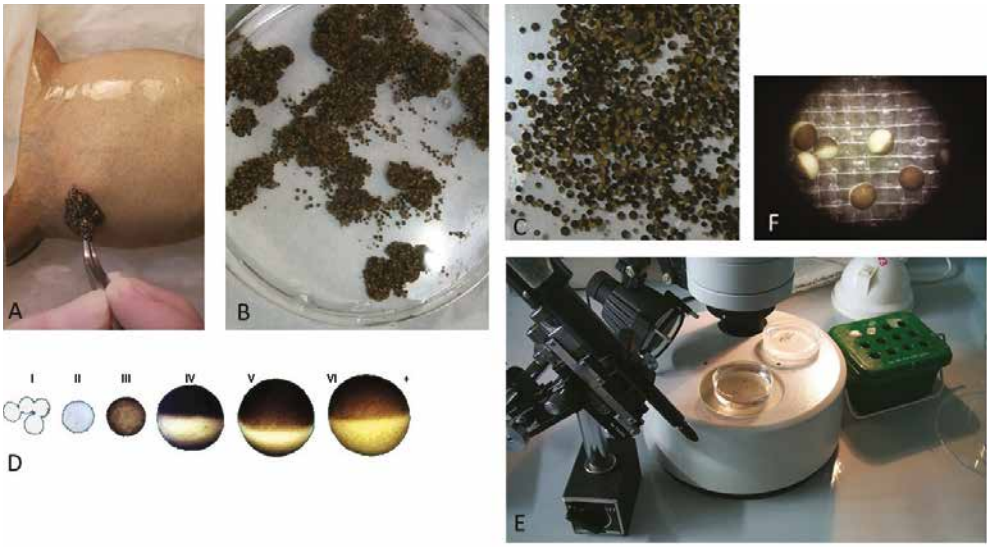

Fig. 4 – **A** estrazione degli oociti tramite laparotomia; **B** oociti prima del trattamento in collagenasi; **C** oociti dopo il trattamento, sono riconoscibili diversi stadi riassunti in **D**; **E** set da microiniezione; **F** microiniezione

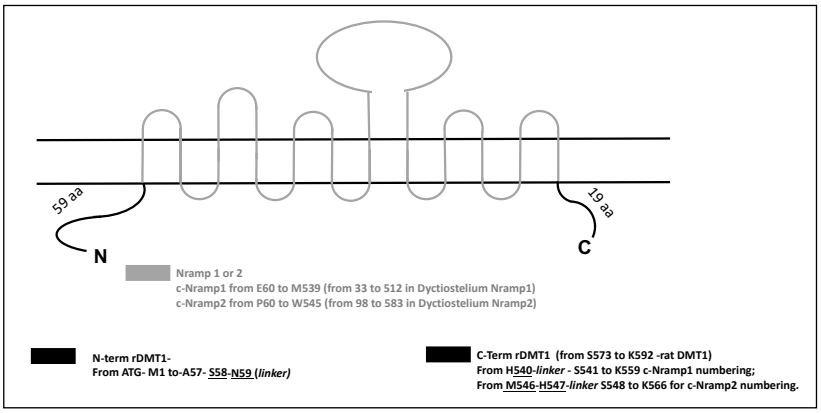

Fig. 5 – Struttura della proteina chimera realizzata per l'espressione in membrana della proteina Nramp1 clonata da *Dictyostelium discoideum*. Figura tratta da (Buracco et al., 2015).

un substrato. In particolare, nello studio delle proteine SLC (SoLuteCarrier), trasportatori di membrana secondariamente attivi o cotrasportatori, il trasferimento di una molecola organica o di uno ione contro il proprio gradiente di concentrazione è sostenuto dalla contemporanea traslocazione secondo gradiente di ioni sodio o protoni. In alternativa è possibile misurare la quantità di substrati traslocati utilizzando gli stessi radiomarcati oppure tramite l'utilizzo di probe fluorescenti. In molti casi l'approccio tramite diversi metodi di indagine permette di chiarire al meglio gli attori coinvolti in una risposta funzionale.

Nello studio qui riassunto due trasportatori di metalli dell'ameba *Dictyostelium discoideum* (Buracco et al., 2015) sono stati caratterizzati utilizzando un approccio multiplo. Queste proteine sono coinvolte nell'omeostasi del ferro e come nei macrofagi conferiscono la resistenza ai batteri patogeni, nel Nramp1 Dictyostelyum è espresso nel fagosoma, nel ratto e nell'uomo a seconda dell'isoforma la proteina è localizzata sulla membrana plasmatica o a livello subcellulare (Mackenzie et al., 2007). Nramp2 si trova localizzata nel vacuolo contrattile di dictyostelium e non ha un equivalente tra le proteine di vertebrato. In questo studio, il cDNA codificante per le proteine di interesse è stato modificato per permetterne la corretta espressione sulla membrana plasmatica dell'oocita, costruendo una proteina chimera dove le regioni transmembrana, codificanti per le regioni funzionali del trasportatore, sono quelle del trasportatore clonato in dictyostelium (Fig. 5), le regioni C ed N terminale sono invece quelle codificanti per il trasportatore ortologo di ratto rDMT1, contenenti le sequenze per il suo indirizzamento nella membrana plasmatica. Queste modifiche hanno permesso di studiare la funzionalità della proteina c-Nramp1 e c-Nramp2 tramite un approccio elettrofisiologico, fluorimetrico e di uptake classico. Gli esperimenti sono stati condotti misurando tramite Voltage clamp a due elettrodi le correnti generate in presenza di diversi metalli divalenti (Fig. 6); al tempo stesso tramite microscopia confocale (Fig. 7) l'effettivo ingresso di metallo in cellula è stato monitorato attraverso l'utilizzo di un marcatore fluorescente, la cui fluorescenza veniva ridotta dalla presenza dei substrati nell'ambiente citoplasmatico, e tramite la quantificazione del ferro radioattivo ritrovato all'interno della cellula dopo l'esposizione dell'oocita esprimente la proteina ad una soluzione contenente il substrato radiomarcato.

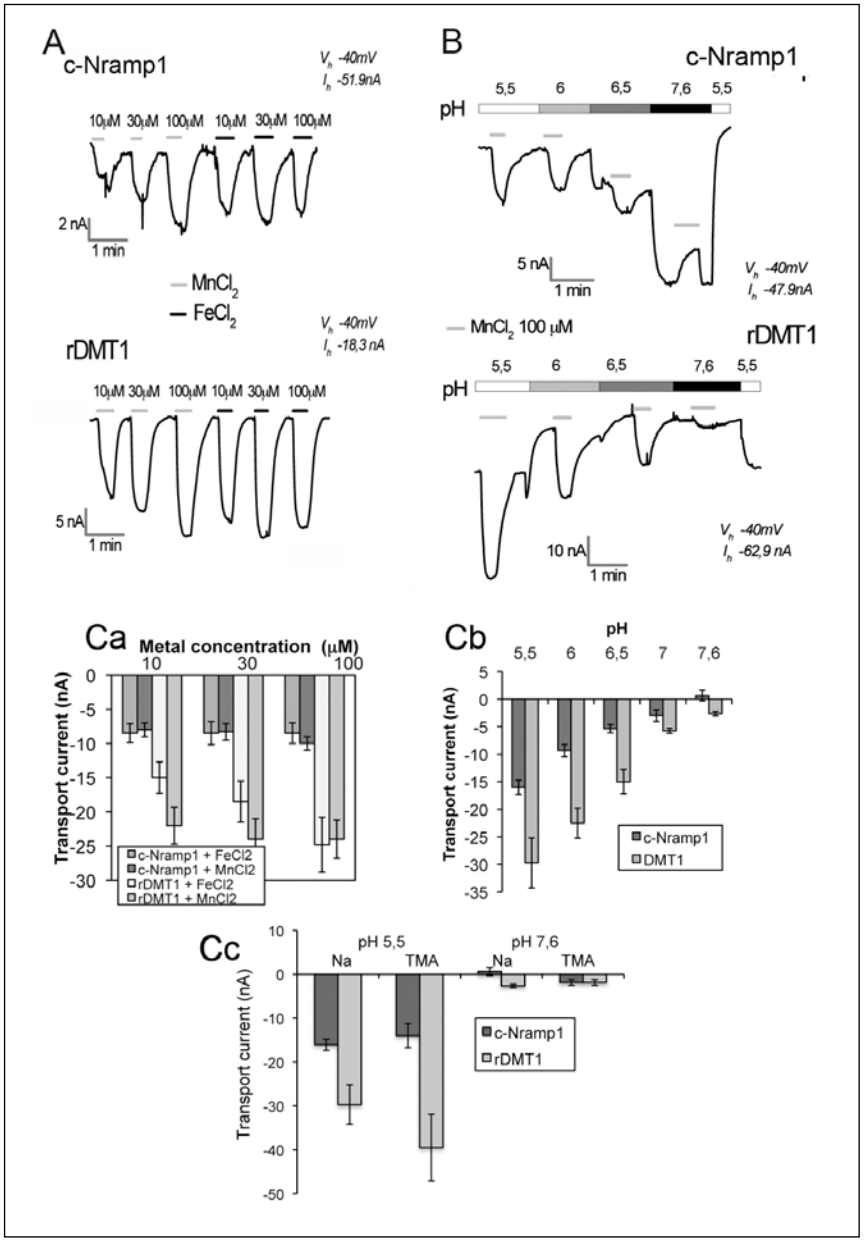

Fig. 6 – Correnti rappresentative in presenza di Fe^{2+} e Mn^{2+} che generano correnti pH-dipendenti negli oociti esprimenti c-Nramp1 o rDMT1. (A, B). Le registrazioni sono state condotte al potenziale di membrana di –40 mV in soluzione di sodio a pH 6,0 (A) o (B) a pH diversi e perfuso con i metalli indicati. In C sono riportate le correnti medie di trasporto misurate in un numero significativo di oociti (da 5 a 20 provenienti da batch diversi) esprimenti cNramp1 o DMT1, in presenza di concentrazioni crescenti di Fe^{2+} e Mn^{2} $(Ca)^{+}$, in Mn^{2}+ a pH differenti (Cb), in Mn^{2+} in presenza di Na o in sua assenza (sostituito dal TMA) (Cc). Figura tratta da (Buracco et al., 2015).

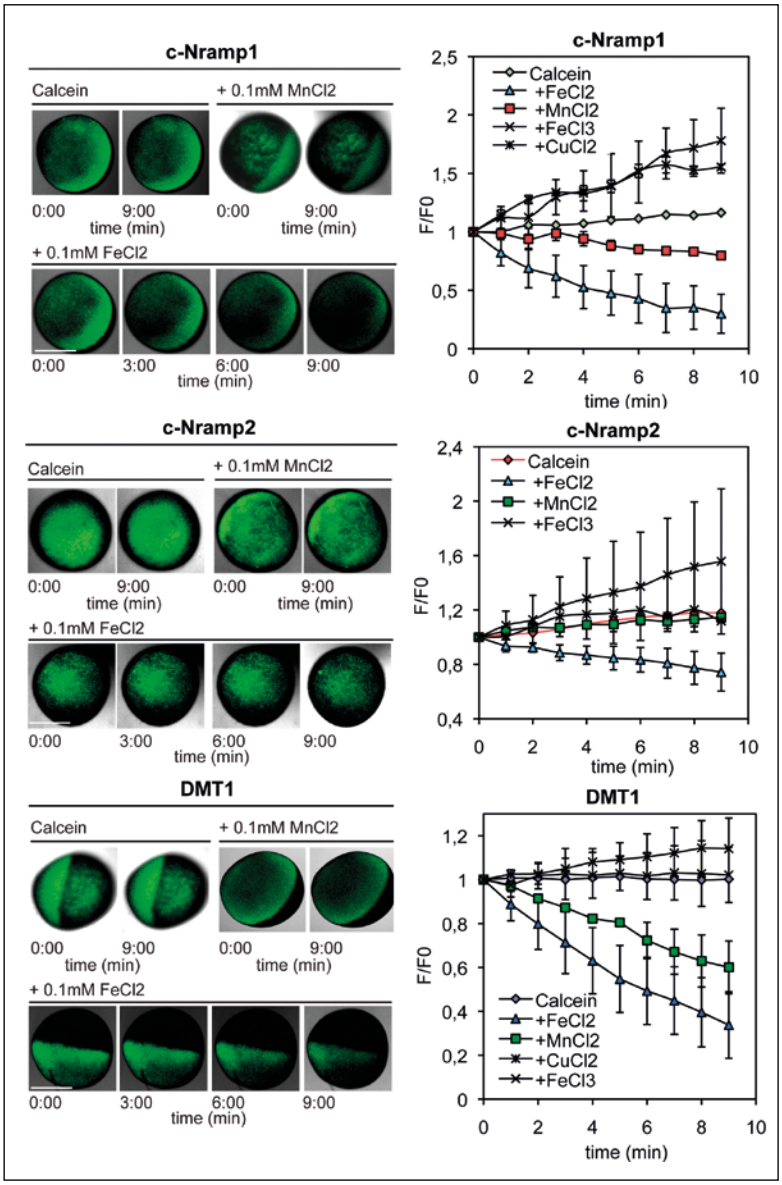

Fig. 7 – Immagini al microscopio confocale del trasporto di metallo negli ovociti di *xenopus* mediante misura della fluorescenza della calceina. Oociti di *xenopus* che esprimono c-Nramp1, c-Nramp2 o rDMT1 sono stati iniettati con calceina e perfusi con una soluzione contenente o meno il metallo indicato. A sinistra immagini rappresentative degli oociti nelle diverse condizioni. A destra l'andamento della fluorescenza della calceina preventivamente iniettata negli oociti in presenza dei diversi metalli. Immagine da (Buracco et al., 2015)

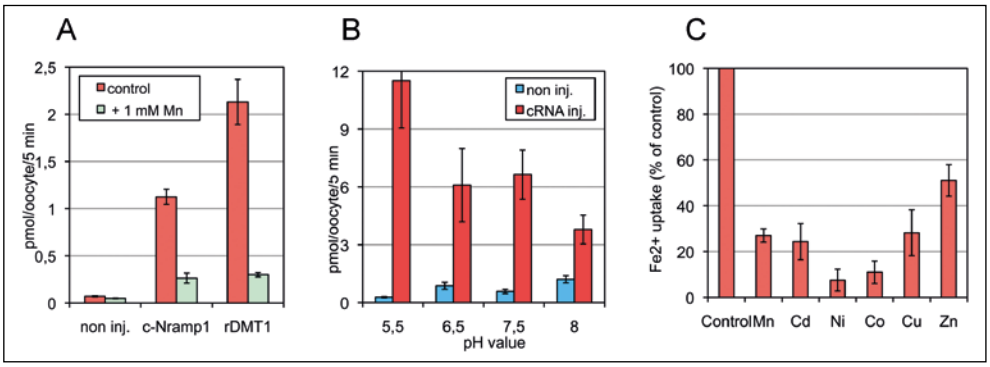

Fig. 8 – Saggi di uptake di ferro radiomarcato in oociti di *Xenopus* che esprimono c-Nramp1, o rDMT1. (A) oociti non iniettati (Control) o iniettati con cRNA per c-Nramp1 o rDMT1 (cRNA inj.) sono stati incubati con $_2$ in presenza o meno di 1 mM $MnCl_2$ (B) Uptake di ferro in c-Nramp1 ai diversi pH, (C)inibizione dell'uptake del ferro da parte dei metalli indicati. Figura tratta da (Buracco et al., 2015).

I dati raccolti hanno permesso di comprendere nel dettaglio la funzionalità di *dd*Nramp1, e di caratterizzare parzialmente ddNramp2, la cui espressione era piuttosto ridotta e l'elettrogenicità assente.

Utilizzando la medesima sonda fluorescente che ha consentito di quantificare l'ingresso del metallo in cellula, è stato messo a punto di recente un metodo che permette di raccogliere rapidamente dati significativi in numerosi oociti, anche per trasportatori non elettrogenici. Il metodo citato si basa sulla misura della fluorescenza dell'estratto cellulare di oociti esprimenti la proteina di interesse (nel nostro caso i trasportatori di Dictyostelium e DMT1 o la proteina trasportatrice di di- e tri- peptidi PepT1 di coniglio) esposta al substrato. Questo metodo permette di raccogliere informazioni su un numero elevato di oociti, esposti in contemporanea al substrato, leggendo la fluorescenza tramite un lettore di piastre al termine dell'esposizione. I dati raccolti hanno permesso di validare il metodo dal momento che confermano quanto visto in precedenza con gli approcci soprariportati (Buracco et al., 2015) e quanto scritto in letteratura (Boll et al., 1994), e hanno permesso di approfondire la caratterizzazione della funzionalità di Nramp2 (Cinquetti, 2019).

Gli esempi illustrati sono solo alcune delle applicazioni dell'espressione eterologa di proteine di trasporto in oociti di *Xenopus laevis*, nel laboratorio di Fisiologia Cellulare e Molecolare. La tecnica nel laboratorio è ampiamente utilizzata soprattutto per studi comparativi di trasportatori provenienti da diversi ortologhi con lo scopo di meglio caratterizzare la funzionalità e i domini aminoacidici coinvolti nelle interazioni con il substrato e negli step del ciclo di traslocazione (Margheritis et al., 2013; Soragna et al., 2004). Alla tecnica classica dell'espressione, volta a misure elettrofisiologiche, sono spesso affiancati approcci diversificati per avere un quadro completo del trasporto e dell'espressione delle proteine stesse.

In parallelo sono spesso studiate le correnti indotte dai substrati o dalle variazioni di potenziale correlandole con l'espressione della proteina sulla membrana plasmatica valutata tramite tecniche immunochimiche (Bossi et al., 2011) (immunocitochimica, Western-blot, Single oocyte chemiluminescence, SOC) e quantificando, infine, con tecniche fluorescenti (Cinquetti, 2019) o tramite HPLC (Vollero et al., 2016), l'effettiva quantità di substrato trasportato. L'insieme dei dati raccolti permette di indentificare in maniera dettagliata i residui chiave (Giovanola et al., 2018), il ruolo delle proteine accessorie (Margheritis et al., 2016) o caratterizzare nel dettaglio nuovi trasportatori (Gomes et al., 2019; Vacca et al., 2019).

BIBLIOGRAFIA

Agre, P. (2004). Nobel Lecture. Aquaporin water channels. *Biosci Rep* 24, 127-63.

Agre, P. and Kozono, D. (2003). Aquaporin water channels: molecular mechanisms for human diseases. *FEBS Lett* 555, 72-8.

Bertram, S., Cherubino, F., Bossi, E., Castagna, M. and Peres, A. (2011). GABA reverse transport by the neuronal cotransporter GAT1: influence of internal chloride depletion. *Am.J.Physiol Cell Physiol* 301, C1064-C1073.

Boll, M., Markovich, D., Weber, W. M., Korte, H., Daniel, H. and Murer, H. (1994). Expression cloning of a cDNA from rabbit small intestine related to proton-coupled transport of peptides, beta-lactam antibiotics and ACE-inhibitors. *Pflugers Arch* 429, 146-9.

Bossi, E., Cherubino, F., Margheritis, E., Oyadeyi, A. S., Vollero, A. and Peres, A. (2012). Temperature effects on the kinetic properties of the rabbit intestinal oligopeptide cotransporter PepT1. *Pflugers Arch*. 464, 183-191.

Bossi, E., Fabbrini, M. S. and Ceriotti, A. (2007). Exogenous protein expression in Xenopus Laevis Oocyte, Basic procedure. In *In Vitro Transcription and translation Protocols*, (ed. G. Grandi), pp. 107-131. Totowa NJ: Humana Press.

Bossi, E., Renna, M. D., Sangaletti, R., D'Antoni, F., Cherubino, F., Kottra, G. and Peres, A. (2011). Residues R282 and D341 act as electrostatic gates in the proton-dependent oligopeptide transporter PepT1. *J.Physiol* 589, 495-510.

Broer, S. (2010). Xenopus laevis Oocytes. *Methods Mol.Biol*. 637, 295-310.

Buracco, S., Peracino, B., Cinquetti, R., Signoretto, E., Vollero, A., Imperiali, F., Castagna, M., Bossi, E. and Bozzaro, S. (2015). Dictyostelium Nramp1, which is structurally and functionally similar to mammalian DMT1 transporter, mediates phagosomal iron efflux. *J Cell Sci* 128, 3304-16.

Cakir, Y. and Strauch, S. M. (2005). Tricaine (MS-222) is a safe anesthetic compound compared to benzocaine and pentobarbital to induce anesthesia in leopard frogs (Rana pipiens). *Pharmacol Rep* 57, 467-74.

Cinquetti, R. I., Francesca, Guia;Bozzaro, Salvatore;Zanella Daniele;Vacca, Francesca;Roseti, Cristina;Peracino,Barbara;Castagna, Michela;Bossi, Elena. (2019). Measuring transport activity in Xenopus laevis Oocytes by fluorophore quenching: characterization of Dictyostelium discoideum iron transporter NrampB (Manuscript).

Dascal, N. (1987). The use of Xenopus oocytes for the study of ion channels. *CRC Crit Rev Biochem* 22, 317-87.

Giovanola, M., Vollero, A., Cinquetti, R., Bossi, E., Forrest, L. R., Di Cairano, E. S. and Castagna, M. (2018). Threonine 67 is a key component in the coupling of the NSS amino acid transporter KAAT1. *Biochimica et biophysica acta Biomembranes* 1860, 1179-1186.

Gomes, A. S., Vacca, F., Cinquetti, R., Murashita, K., Barca, A., Bossi, E., Ronnestad, I. and Verri, T. (2019). Identification and characterization of the Atlantic Salmon Peptide Transporter 1a. *Am J Physiol Cell Physiol*.

Gurdon, J. B. (1973). The translation of messenger RNA injected in living oocytes of Xenopus laevis. *Acta Endocrinol.Suppl (Copenh)* 180, 225-243.

Gurdon, J. B. (2013). The egg and the nucleus: a battle for supremacy (Nobel Lecture). *Angew Chem Int Ed Engl* 52, 13890-9.

Gurdon, J. B. (2015). The Egg and the Nucleus: A Battle for Supremacy. *Rambam Maimonides Med J* 6.

Gurdon, J. B. and Hopwood, N. (2000). The introduction of Xenopus laevis into developmental biology: of empire, pregnancy testing and ribosomal genes. *International Journal of Developmental Biology* 44, 43-50.

Gurdon, J. B., Lane, C. D., Woodland, H. R. and Marbaix, G. (1971). Use of frog eggs and oocytes for the study of messenger RNA and its translation in living cells. *Nature* 233, 177-182.

Halley-Stott, R. P., Pasque, V., Astrand, C., Miyamoto, K., Simeoni, I., Jullien, J. and Gurdon, J. B. (2010). Mammalian nuclear transplantation to Germinal Vesicle stage Xenopus oocytes - a method for quantitative transcriptional reprogramming. *Methods* 51, 56-65.

Krause, J. D., Foster, C. D. and Reinhart, P. H. (1996). Xenopus laevis oocytes contain endogenous large conductance Ca2(+)-activated K+ channels. *Neuropharmacology* 35, 1017-22.

Kusano, K., Miledi, R. and Stinnakre, J. (1982). Cholinergic and catecholaminergic receptors in the Xenopus oocyte membrane. *J.Physiol* 328, 143-170.

Mackenzie, B., Takanaga, H., Hubert, N., Rolfs, A. and Hediger, M. A. (2007). Functional properties of multiple isoforms of human divalent metal-ion transporter 1 (DMT1). *Biochem.J.* 403, 59-69.

Margheritis, E., Imperiali, F. G., Cinquetti, R., Vollero, A., Terova, G., Rimoldi, S., Girardello, R. and Bossi, E. (2016). Amino acid transporter B(0)AT1 (slc6a19) and ancillary protein: impact on function. *Pflugers Arch* 468, 1363-74.

Margheritis, E., Terova, G., Oyadeyi, A. S., Renna, M. D., Cinquetti, R., Peres, A. and Bossi, E. (2013). Characterization of the transport of lysine-containing dipeptides by PepT1 orthologs expressed in Xenopus laevis oocytes. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol* 164, 520-8.

Marsal, J., Tigyi, G. and Miledi, R. (1995). Incorporation of acetylcholine receptors and Cl- channels in Xenopus oocytes injected with Torpedo electroplaque membranes. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 92, 5224-5228.

Nargeot, J., Dascal, N. and Lester, H. A. (1992). Heterologous expression of calcium channels. [Review] [88 refs]. *Journal of Membrane Biology* 126, 97-108.

Palma, E., Conti, L., Roseti, C. and Limatola, C. (2012). Novel approaches to study the involvement of alpha7-nAChR in human diseases. *Curr Drug Targets* 13, 579-86.

Prives, C. and Foukal, D. (1991). Use of Oligonucleotides for Antisense Experiments in Xenopus-Laevis Oocytes. *Methods in Cell Biology* 36, 185-210.

Shapiro, H. A. and Zwarenstein, H. (1934). A Rapid Test for Pregnancy on Xenopus lævis. *Nature* 133, 762-762.

Sigel, E. (1990). Use of Xenopus oocytes for the functional expression of plasma membrane proteins. *J.Membr.Biol.* 117, 201-221.

Smith, B. D., Vail, K. J., Carroll, G. L., Taylor, M. C., Jeffery, N. D., Vemulapalli, T. H. and Elliott, J. J. (2018). Comparison of Etomidate, Benzocaine, and MS222 Anesthesia with and without Subsequent Flunixin Meglumine Analgesia in African Clawed Frogs (Xenopus laevis). *J Am Assoc Lab Anim Sci* 57, 202-209.

Smith, M., Stavnezer, J., Huang, R. C., Gurdon, J. B. and Lane, C. D. (1973). Letter: Translation of messenger RNA for mouse immunoglobulin light chains in living frog oocytes. *J.Mol.Biol.* 80, 553-557.

Sobczak, K., Bangel-Ruland, N., Leier, G. and Weber, W. M. (2010). Endogenous transport systems in the Xenopus laevis oocyte plasma membrane. *Methods* 51, 183-189.

Soragna, A., Mari, S. A., Pisani, R., Peres, A., Castagna, M., Sacchi, V. F. and Bossi, E. (2004). Structural domains involved in substrate selectivity in two neutral amino acid transporters. *Am J Physiol Cell Physiol* 287, C754-61.

Soreq, H. and Seidman, S. (1992). Xenopus oocyte microinjection: from gene to protein. [Review] [165 refs]. *Methods in Enzymology* 207, 225-265.

Sumikawa, K., Houghton, M., Emtage, J. S., Richards, B. M. and Barnard, E. A. (1981). Active multi-subunit ACh receptor assembled by translation of heterologous mRNA in Xenopus oocytes. *Nature* 292, 862-4.

Terhag, J., Cavara, N. A. and Hollmann, M. (2010). Cave Canalem: how endogenous ion channels may interfere

with heterologous expression in Xenopus oocytes. *Methods* 51, 66-74.

Tosco, M., Faelli, A., Gastaldi, G., Paulmichl, M. and Orsenigo, M. N. (2008). Endogenous lactate transport in Xenopus laevis oocyte: dependence on cytoskeleton and regulation by protein kinases. *J.Comp Physiol B* 178, 457-463.

Tzounopoulos, T., Maylie, J. and Adelman, J. P. (1995). Induction of endogenous channels by high levels of heterologous membrane proteins in Xenopus oocytes. *Biophys J* 69, 904-8.

Vacca, F., Barca, A., Gomes, A., Mazzei, A., Piccinini, B., Cinquetti, R., Del Vecchio, G., Romanom, A., Rønnestad, I., Bossi, E. et al. (2019). The Peptide Transporter 1a of the zebrafish Danio rerio, an emerging model in nutrigenomics and nutrition research: molecular characterization, functional properties and expression analysis (Gene &Nutrition- in press).

Van Winkle, L. J. (1993). Endogenous amino acid transport systems and expression of mammalian amino acid transport proteins in Xenopus oocytes. *Biochim.Biophys. Acta* 1154, 157-172.

Vollero, A., Imperiali, F. G., Cinquetti, R., Margheritis, E., Peres, A. and Bossi, E. (2016). The D-amino acid transport by the invertebrate SLC6 transporters KAAT1 and CAATCH1 from Manduca sexta. *Physiol Rep* 4.

Wagner, C. A., Friedrich, B., Setiawan, I., Lang, F. and Broer, S. (2000). The use of Xenopus laevis oocytes for the functional characterization of heterologously expressed membrane proteins. *Cell Physiol Biochem*. 10, 1-12.

Wormington, M. (1991). Preparation of synthetic mRNAs and analyses of translational efficiency in microinjected Xenopus oocytes. *Methods Cell Biol* 36, 167-83.

NELLA STESSA COLLANA SONO STATI PUBBLICATI I SEGUENTI VOLUMI:

1 - 1979 Infezioni respiratorie del bovino
2 - 1980 L'oggi e il domani della sulfamidoterapia veterinaria
3 - 1980 Ormoni della riproduzione e Medicina Veterinaria
4 - 1980 Gli antibiotici nella pratica veterinaria
5 - 1981 La leucosi bovina enzootica
6 - 1981 La «Scuola per la Ricerca Scientifica» di Brescia
7 - 1982 Gli indicatori di Sanità Veterinaria nel Servizio Sanitario Nazionale
8 - 1982 Le elmintiasi nell'allevamento intensivo del bovino
9 - 1983 Zoonosi ed animali da compagnia
10 - 1983 Le infezioni da Escherichia coli degli animali
11 - 1983 Immunogenetica animale e immunopatologia veterinaria
12 - 1984 5° Congresso Nazionale Associazione Scientifica di Produzione Animale
13 - 1984 Il controllo delle affezioni respiratorie del cavallo
14 - 1984 1° Simposio Internazionale di Medicina veterinaria sul cavallo da competizione
15 - 1985 La malattia di Aujeszky. Attualità e prospettive di profilassi nell'allevamento suino
16 - 1986 Immunologia comparata della malattia neoplastica
17 - 1986 6° Congresso Nazionale Associazione Scientifica di Produzione Animale
18 - 1987 Embryo transfer oggi: problemi biologici e tecnici aperti e prospettive
19 - 1987 Coniglicoltura: tecniche di gestione, ecopatologia e marketing
20 - 1988 Trentennale della Fondazione Iniziative Zooprofilattiche e Zootecniche di Brescia, 1956-1986
21 - 1989 Le infezioni erpetiche del bovino e del suino
22 - 1989 Nuove frontiere della diagnostica nelle scienze veterinarie
23 - 1989 La rabbia silvestre: risultati e prospettive della vaccinazione orale in Europa
24 - 1989 Chick Anemia ed infezioni enteriche virali nei volatili
25 - 1990 Mappaggio del genoma bovino
26 - 1990 Riproduzione nella specie suina
27 - 1990 La nube di Chernobyl sul territorio bresciano
28 - 1991 Le immunodeficienze da retrovirus e le encefalopatie spongiformi
29 - 1991 La sindrome chetosica nel bovino
30 - 1991 Atti del convegno annuale del gruppo di lavoro delle regioni alpine per la profilassi delle mastiti
31 - 1991 Allevamento delle piccole specie
32 - 1992 Gestione e protezione del patrimonio faunistico
33 - 1992 Allevamento e malattie del visone
34 - 1993 Atti del XIX Meeting annuale della S.I.P.A.S., e del Convegno su Malattie dismetaboliche del suino
35 - 1993 Stato dell'arte delle ricerche italiane nel settore delle biotecnologie applicate alle scienze veterinarie e zootecniche - Atti 1ª conferenza nazionale
36 - 1993 Argomenti di patologia veterinaria
37 - 1994 Stato dell'arte delle ricerche italiane sul settore delle biotecnologie applicate alle scienze veterinarie e zootecniche

38 - 1995 Atti del XIX corso in patologia suina e tecnica dell'allevamento

39 - 1995 Quale bioetica in campo animale? Le frontiere dell'ingegneria genetica

40 - 1996 Principi e metodi di tossicologia in vitro

41 - 1996 Diagnostica istologica dei tumori degli animali

42 - 1998 Umanesimo ed animalismo

43 - 1998 Atti del Convegno scientifico sulle enteropatie del coniglio

44 - 1998 Lezioni di citologia diagnostica veterinaria

45 - 2000 Metodi di analisi microbiologica degli alimenti

46 - 2000 Animali, terapia dell'anima

47 - 2001 Quarantacinquesimo della Fondazione Iniziative Zooprofilattiche e Zootecniche di Brescia, 1955-2000

48 - 2001 Atti III Convegno Nazionale di Storia della Medicina Veterinaria

49 - 2001 Tipizzare le salmonelle

50 - 2002 Atti della giornata di studio in cardiologia veterinaria

51 - 2002 La valutazione del benessere nella specie bovina

52 - 2003 La ipofertilità della bovina da latte

53 - 2003 Il benessere dei suini e delle bovine da latte: punti critici e valutazione in allevamento

54 - 2003 Proceedings of the 37th international congress of the ISAE

55 - 2004 Riproduzione e benessere in coniglicoltura: recenti acquisizioni scientifiche e trasferibilità in campo

56 - 2004 Guida alla diagnosi necroscopica in patologia suina

57 - 2004 Atti del XXVII corso in patologia suina e tecnica dell'allevamento

58 - 2005 Piccola storia della Medicina Veterinaria raccontata dai francobolli

59 - 2005 IV Congresso Italiano di Storia della Medicina Veterinaria

60 - 2005 Atti del XXVIII corso in patologia suina e tecnica dell'allevamento

61 - 2006 Atlante di patologia cardiovascolare degli animali da reddito

62 - 2006 50° Fondazione Iniziative Zooprofilattiche e Zootecniche di Brescia, 1955-2005

63 - 2006 Guida alla diagnosi necroscopica in patologia del coniglio

64 - 2006 Atti del XXIX corso in patologia suina e tecnica dell'allevamento

65 - 2006 Proceedings of the 2nd International Equitation Science Symposium

66 - 2007 Piccola storia della Medicina Veterinaria raccontata dai francobolli - II edizione

67 - 2007 Il benessere degli animali da reddito: quale e come valutarlo

68 - 2007 Proceedings of the 6th International Veterinary Behaviour Meeting

69 - 2007 Atti del XXX corso in Patologia Suina

70 - 2007 Microbi e alimenti

71 - 2008 V Convegno Nazionale di Storia della Medicina Veterinaria

72 - 2008 Proceedings of the 9th World Rabbit Congress

73 - 2008 Atti Corso Introduttivo alla Medicina non Convenzionale Veterinaria

74 - 2009 La biosicurezza in veterinaria

75 - 2009 Atlante di patologia suina I

76 - 2009 Escherichia Coli

77 - 2010 Attività di mediazione con l'asino

78 - 2010 Allevamento animale e riflessi ambientali

79 - 2010 Atlante di patologia suina II
PRIMA PARTE

80 - 2010 Atlante di patologia suina II
SECONDA PARTE

81 - 2011 Esercitazioni di microbiologia

82 - 2011 Latte di asina

83 - 2011 Animali d'affezione

84 - 2011 La salvaguardia della biodiversità zootecnica

85 - 2011 Atti I Convegno Nazionale di Storia della Medicina Veterinaria

86 - 2011 Atti II Convegno Nazionale di Storia della Medicina Veterinaria

87 - 2011 Atlante di patologia suina III

88 - 2012 Atti delle Giornate di Coniglicoltura ASIC 2011

89 - 2012 Micobatteri atipici

90 - 2012 Esperienze di monitoraggio sanitario della fauna selvatica in Provincia di Brescia

91 - 2012 Atlante di patologia della fauna selvatica italiana

92 - 2013 Thermography: current status and advances in livestock animals and in veterinary medicine

93 - 2013 Medicina veterinaria (illustrato). Una lunga storia. Idee, personaggi, eventi

94 - 2014 La medicina veterinaria unitaria (1861-2011)

95 - 2014 Alimenti di origine animale e salute

96 - 2014 I microrganismi, i vegetali e l'uomo

97 - 2015 Alle origini della vita: le alghe

98 - 2015 Regimen Sanitatis Salerni

99 - 2015 Atti del VI Congresso Nazionale di Storia della Medicina Veterinaria

100 - 2015 Equus Frenatus. Morsi dalla Collezione Giannelli

101 - 2016 Lactose and gluten free: alimenti del domani?

102 - 2017 I modelli animali spontanei per lo studio della fisiologia e patologia dell'uomo

103 - 2017 Atti del VII Congresso Nazionale di Storia della Medicina Veterinaria

104 - 2017 Progetto legno: biodeterioramento e salute

105 - 2017 Il coniglio: storia ed evoluzione dell'allevamento in Italia e in Europa

106 - 2018 Riabilitazione equestre: relazione e progettualità

107 - 2018 Leggiamo insieme. Storie di sanità fra cronaca e scienza

108 - 2018 The Military Veterinary Services of the Fighting Nations in World War One. Historical congress

109 - 2019 Non erano nel menù. Storie di cibo e altro

110 - 2019 250 anni dalla Fondazione della Scuola di Veterinaria di Torino

111 - 2019 Microbiologia e virologia in sintesi

Finito di stampare da
Litos s.r.l. - Gianico (BS)
nel mese di febbraio 2020

ISBN 978-88-97562-26-9

9 788897 562269