



ALMA MATER STUDIORUM  
UNIVERSITÀ DI BOLOGNA

# Criteria principali per la scelta della specie in sperimentazione animale

**Luciana Giardino**

DIMEVET, Università di Bologna

4 Febbraio 2020

**Un organismo modello è una specie che è stata ampiamente studiata per comprendere particolari fenomeni biologici**

- Si usa l'organismo modello per studiare meccanismi generalmente a livello cellulare o ancor più a livello molecolare e genetico e questi meccanismi si ritiene possano almeno in parte estendersi alle altre specie animali



yourgenome



ALMA MATER STUDIORUM  
UNIVERSITÀ DI BOLOGNA

# organismi modello

## yourgenome



Per essere un “**buon modello**” per la ricerca sperimentale un organismo animale deve presentare alcune caratteristiche particolari:

- un **ciclo vitale breve**
- una **progenie numerosa**, in modo da consentire lo studio di numerosi individui per varie generazioni
- la facilità di allevamento e manipolazione
- il **basso costo**



# Perché gli organismi modello sono utili nella ricerca?

- Molti organismi modello possono **riprodursi in grandi quantità**
- Alcuni hanno un tempo di **generazione** molto **breve**, quindi è possibile seguire più generazioni contemporaneamente
- E' possibile e relativamente facile la **manipolazione genetica**
- Gli organismi modello possono essere utilizzati per creare mappe genetiche altamente dettagliate
- Alcuni organismi modello hanno geni simili o genomi di dimensioni simili all'uomo



yourgenome



ALMA MATER STUDIORUM  
UNIVERSITÀ DI BOLOGNA

**Non** esiste una **relazione** tra **complessità** di un Organismo e **numero di geni**

Specie	Tipo	Dimensioni del genoma (Mb)	Numero di geni strutturali
<i>H. sapiens</i>	Uomo	3100	~ 20.000
<i>D. melanogaster</i>	Moscerino della frutta	169	~ 14.150
<i>C. elegans</i>	Nematode	100	~ 20.200
<i>Tetrahymena termophila</i>	Protozoo cililato	104	>27.000
<i>A. pisum</i>	Afide piante del pisello	517	>34.666





Uomo

Opossum

Pollo

Salamandra  
(axolotl)

Pesce  
(aguglia)

- Un'altra possibile caratteristica è che occupino una **posizione particolare nell'albero dell'evoluzione**, quindi che rappresentino una specie di particolare interesse per chi studia l'evoluzione

# Esempi di organismo modello

La **sperimentazione animale** è giustificata nel momento in cui è utilizzata per **migliorare la salute umana e animale**, quindi la corrispondenza con l'uomo deve essere assolutamente chiara

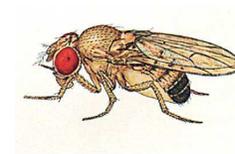
Lieviti

(*Saccharomyces cerevisiae*)



Moscerino della frutta

(*Drosophila melanogaster*)



Verme nematode

(*Caenorhabditis elegans*)



Rana acquatica

(*Xenopus tropicalis*)



Zebrafish

(*Danio rerio*)



Topo

(*Mus musculus*)



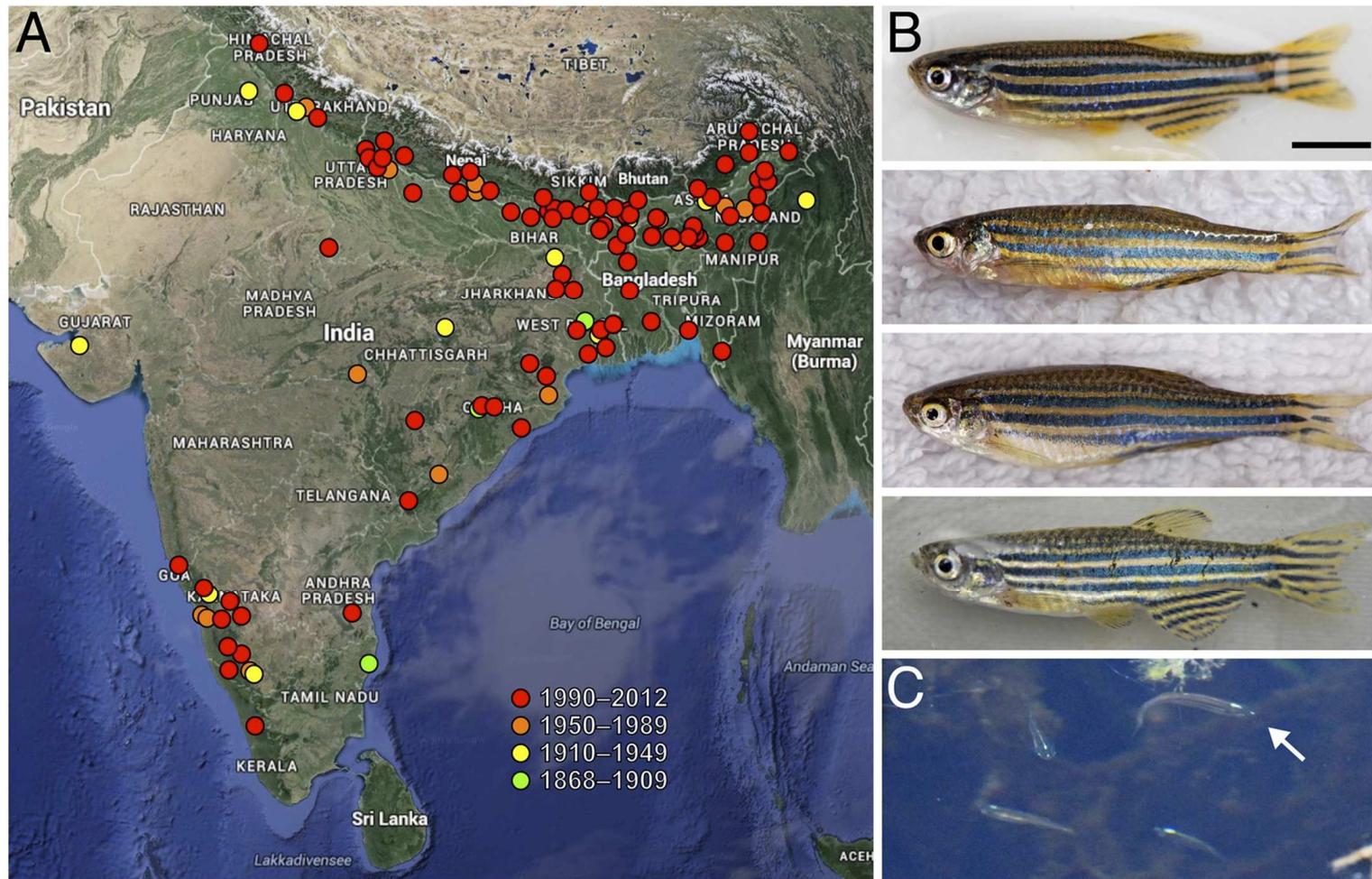
# Come scegliere???

- Gestione e normativa
- Conoscere la **storia naturale** del modello
- Focalizzare sull'**obiettivo** dello studio/esperimento:
  - ✓ Genetica
  - ✓ Embriologia
  - ✓ Oncologia
  - ✓ Malattie complesse
    - Target identification
    - Biomarkers discovery
    - Testing preclinico
  - ✓ Invecchiamento
    - Qualità
    - Farmacologia
    - ....



# Zebrafish

scelto per la sua tracciabilità e, soprattutto, il suo potenziale per l'analisi genetica e l'osservazione cellulare



# Storia naturale del Zebrafish

- **onnivori**
- Le osservazioni del comportamento in campo sono poche e aneddotiche, e gran parte di ciò che i pesci fanno in natura deve essere dedotto dal loro comportamento in laboratorio
- In campo è stata osservata la formazione di aggregazioni sociali libere, o a banchi
- I ceppi di laboratorio **si riproducono tutto l'anno**, ma l'allevamento in natura avviene principalmente durante i monsoni estivi
- Gli studi di laboratorio indicano che il corteggiamento e i comportamenti di accoppiamento sono stereotipati
- I ceppi di laboratorio differiscono sostanzialmente gli uni dagli altri, e anche alcuni dei ceppi più "inbred" mantengono livelli notevolmente elevati di **diversità genetica**
- Sebbene la **maturità riproduttiva** possa essere raggiunta **in meno di 4-6 settimane** in laboratorio, dove si sa che gli zebrafish vivono fino a **diversi anni**, non conosciamo ancora i tempi della loro maturazione o la loro longevità in natura

# Legal aspects of Zebrafish neuropharmacology and neurotoxicology research *(de Abreu et al., 2019)*

Zebrafish possiede oltre **26000 geni** codificanti proteine, con quasi il **71% di omologia nell'uomo**

- modello attrattivo nelle **neuroscienze**
- Sia lo zebrafish **adulto** che quello **larvale** esprimono alcuni ben noti **fenotipi comportamentali**
- facile da usare per il modello di malattia
- risponde a una vasta gamma di **farmaci psicotropi**
- modello eccellente per la ricerca sullo **stress** poiché presenta risposte fisiologiche ben caratterizzate
- risponde a **fattori di stress** acuti e cronici
- può anche essere utilizzato nella ricerca sul **dolore**, in quanto possiede robuste **risposte nocicettive** e **recettori del dolore** evolutivamente conservati
  
- **OBS !!!! Strategia 3R per superare l'uso di Zebrafish**



# Zebrafish role in CNS drug discovery (FDA panel respective requirements) *(de Abreu et al., 2019)*

- Il **test di tossicità acuta nei pesci**, delineato nelle linee guida dell'Organizzazione per la cooperazione e lo sviluppo economico (**OCSE**), è il test più comunemente condotto nel **vertebrato** per la **valutazione del rischio ambientale e del rischio nei pesci adulti**
- Il **modello di pesce** può potenzialmente supportare le **leggi di protezione ambientale** (esempio, presenza di prodotti farmaceutici nell'ambiente acquatico, specialmente nelle grandi città)
- **discrepanze** relative allo **screening farmacologico del SNC** nelle **specie acquatiche** richiedono un'ulteriore attenzione normativa (ad esempio per lo screening dei farmaci che utilizzano un'esposizione idrica a bassa concentrazione in specie acquatiche)
- Zebrafish è un modello animale approvato/raccomandato per piattaforme di screening di farmaci del CNS ???



## ➤ I pesci sentono dolore:

L'anestesia è richiesta quando il pesce deve essere tenuto immobile

L'uso di un protocollo anestetico inadeguato può compromettere non solo il benessere del pesce, ma anche l'affidabilità dei risultati della ricerca (Lab Anim. 2018 Dec 4)

## ➤ I pesci sperimentano lo stress:

è fondamentale promuovere il benessere dei pesci, perché questi vertebrati possono mostrare segni di stress e/o dolore durante la manipolazione, il trasporto, l'etichettatura, il campionamento e le procedure invasive (Lab Anim. 2018 Dec 4)

➤ The zebrafish as a model for nociception studies. Malafoglia V, Bryant B, Raffaelli W, Giordano A, Bellipanni G. J Cell Physiol. 2013 Oct;228(10):1956-66. doi: 10.1002/jcp.24379. Review.



# Nothobranchius furzeri

**pesce "istantaneo"**: un promettente modello di vertebrato nella ricerca sull'invecchiamento e un organismo **modello emergente** in genomica, medicina rigenerativa, biologia dello sviluppo ed ecotossicologia



- Vive nelle pozze poco profonde nella **savana africana**, durante la stagione delle piogge
- **Matura** dopo appena **quattro settimane**, dopo di che la loro mortalità aumenta bruscamente dall'età di sei settimane e tutti i pesci **muoiono** entro le **10-12 settimane**
- reattivo agli interventi farmacologici, dietetici e di stile di vita
- Sono disponibili anche diverse **linee inbred**
- Sono adottate tecniche di modifica del genoma per produrre rapidamente **linee transgeniche stabili**

# *Nothobranchius furzeri*: vantaggi chiave come specie modello



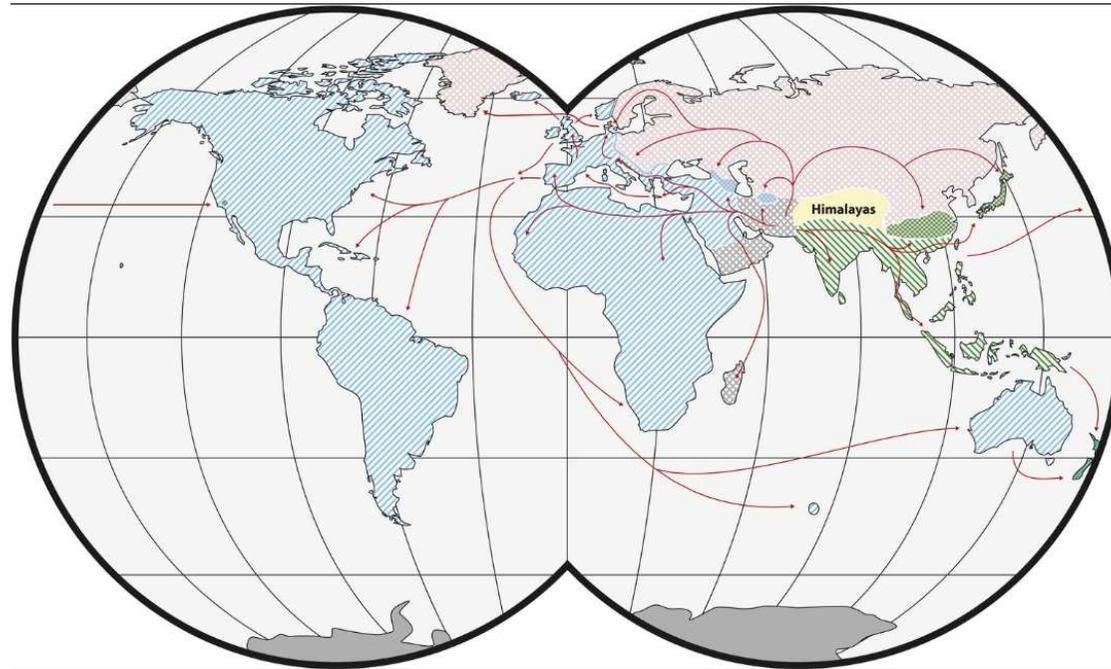
Platzer & Englert, 2016

**Trends in Genetics**

- stile di vita rapido post-schiusa e lunga fase di arresto embrionale, con storia e durata della vita simile ad invertebrati
- non richiede condizioni precise per la qualità dell'acqua e allevamento, forse eccetto per l'abbondanza di cibo anche ricco in nutrienti
- **L'invecchiamento ricorda l'invecchiamento dei mammiferi**
  - Degradazione progressiva del telomero
  - disfunzione mitocondriale e senescenza cellulare
  - instabilità genomica e alterazioni epigenetiche
  - comunicazione intercellulare alterata
  - esaurimento delle cellule staminali

# wild house mouse *Mus musculus*

Eccellente modello di mammifero per lo studio di un'ampia varietà di meccanismi e di malattie, compresi quelli coinvolti nel metabolismo, nello sviluppo, nei disturbi neurologici, nell'immunità ....

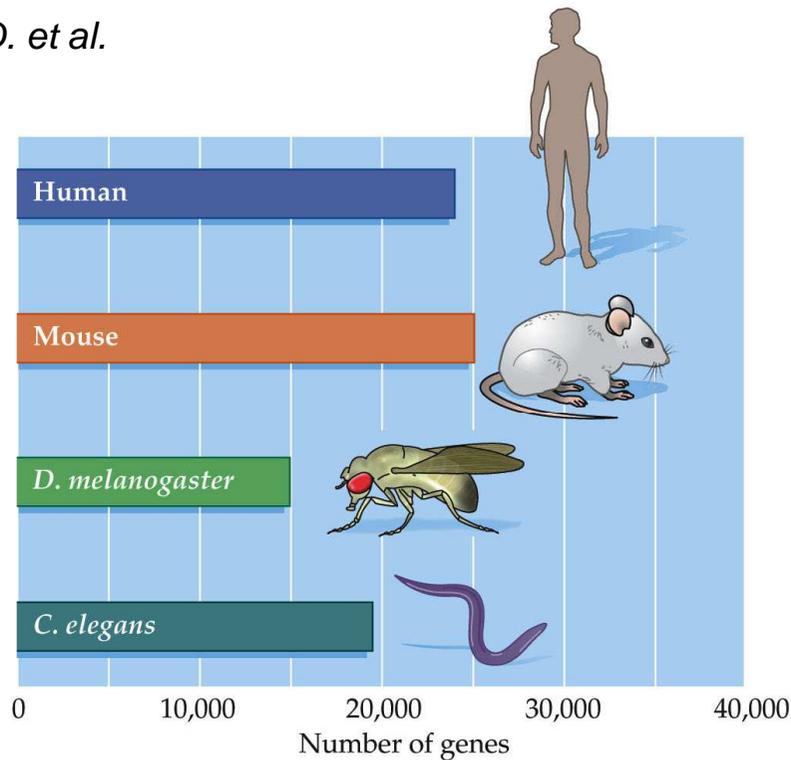


House mice may not be found throughout the complete extent of hatched areas: for example, sub-arctic regions, the Sahara Desert, and the Amazon rainforest. Checkered areas indicate regions of hybridization. Red arrows indicate inferred routes of historical migrations and recent movements in association with humans

# Storia naturale del topo (domestico)

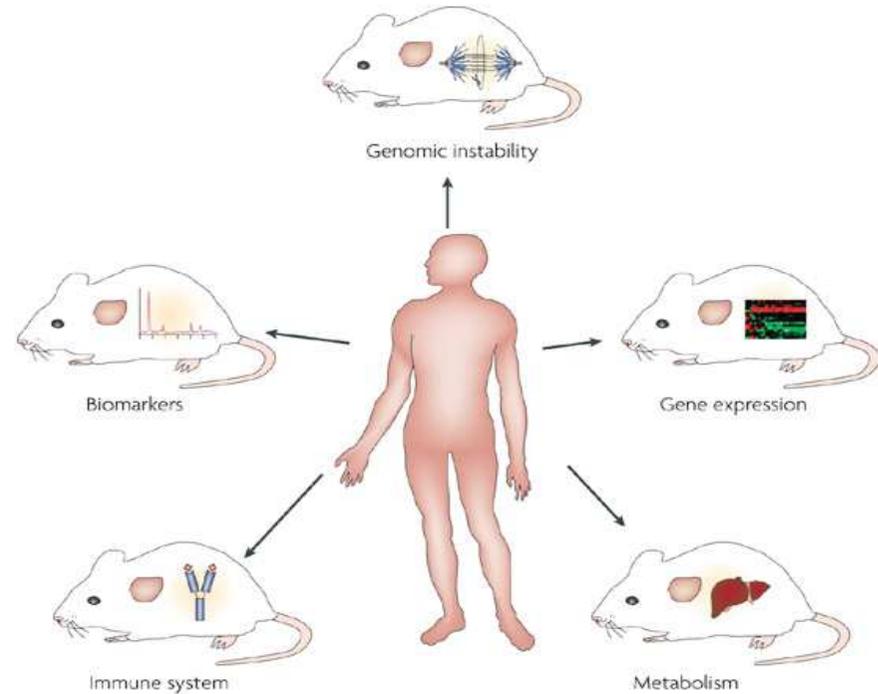


	domestico	laboratorio
Phylogenesis	<ul style="list-style-type: none"> <li>vivono principalmente in prossimità degli umani</li> <li>sono onnivori</li> <li>pesa meno di 20 grammi</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>tollerano la manipolazione regolare da parte degli esseri umani</li> <li>Vivono e si allevano in piccoli ambienti</li> </ul>
Reprod., sociality	<ul style="list-style-type: none"> <li>tempi di generazione brevi (gestazione di 3 settimane, sessualmente matura a 6-8 settimane)</li> <li>strutture sociali variabili</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>i tempi di generazione in laboratorio sono tra 9 e 11 settimane</li> </ul>
Phenotypic variation	<ul style="list-style-type: none"> <li>dal livello del mare a oltre 4000 m</li> <li>dai tropici agli ambienti subartici</li> <li>in ambienti sia asciutti che bagnati</li> <li>i topi possono adattarsi agli habitat aridi</li> </ul>	<p>ES: I topi selvatici allevati a 3°C per 10 generazioni erano più fertili, con cucciolate più grandi e di dimensioni corporee maggiori e raggiungevano la maturità sessuale prima dei topi allevati a 23°C</p>
Genetic variation	<p>Le variazioni genetiche sono maggiori nel topo wild rispetto all'umano (coerentemente con le dimensioni delle rispettive popolazioni)</p>	<p>ceppi inbred di topi da laboratorio derivano da una serie limitata di fondatori e quindi contengono solo un piccolo sottoinsieme della variazione genetica che si vede in natura</p>



NEUROSCIENCE, Fourth Edition, Figure 1.1

© 2008 Sinauer Associates, Inc.



Nature Reviews | Cancer

- Ottenere ceppi di topo geneticamente alterati è costoso e lungo.
- uno dei grandi vantaggi del topo è che il 99% dei suoi geni ha degli omologhi nell'uomo
- tra questi ci sono anche geni associati a malattie umane

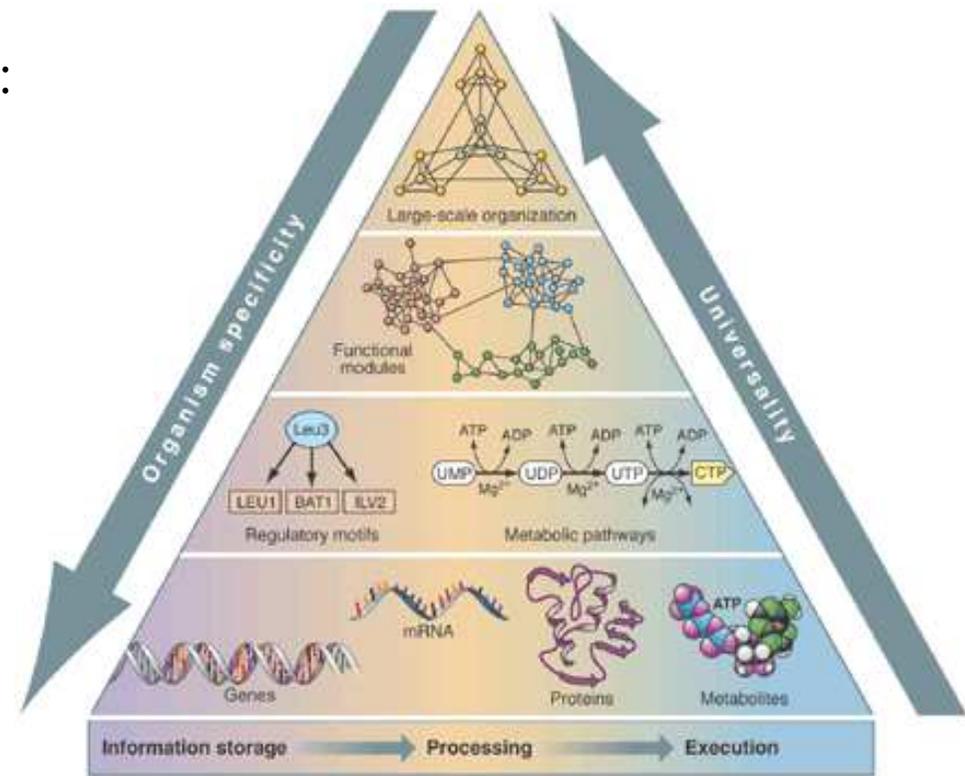


# Come scegliere???

Conoscere la **storia naturale** del modello

**Obiettivo** dello studio/esperimento:

- Genetica
- Embriologia
- Oncologia
- Malattie complesse
  - Target identification
  - Biomarkers discovery
  - Testing preclinico
- Invecchiamento
  - Qualità
  - Farmacologia
  - ....



KATHARINE SUTLIFF/SCIENCE, 2002



ALMA MATER STUDIORUM  
UNIVERSITÀ DI BOLOGNA

# Come scegliere il vertebrato, fra pesce e topo???

Dipende dall'**obiettivo sperimentale!!!**

Biologia: in acqua vs terra/aria

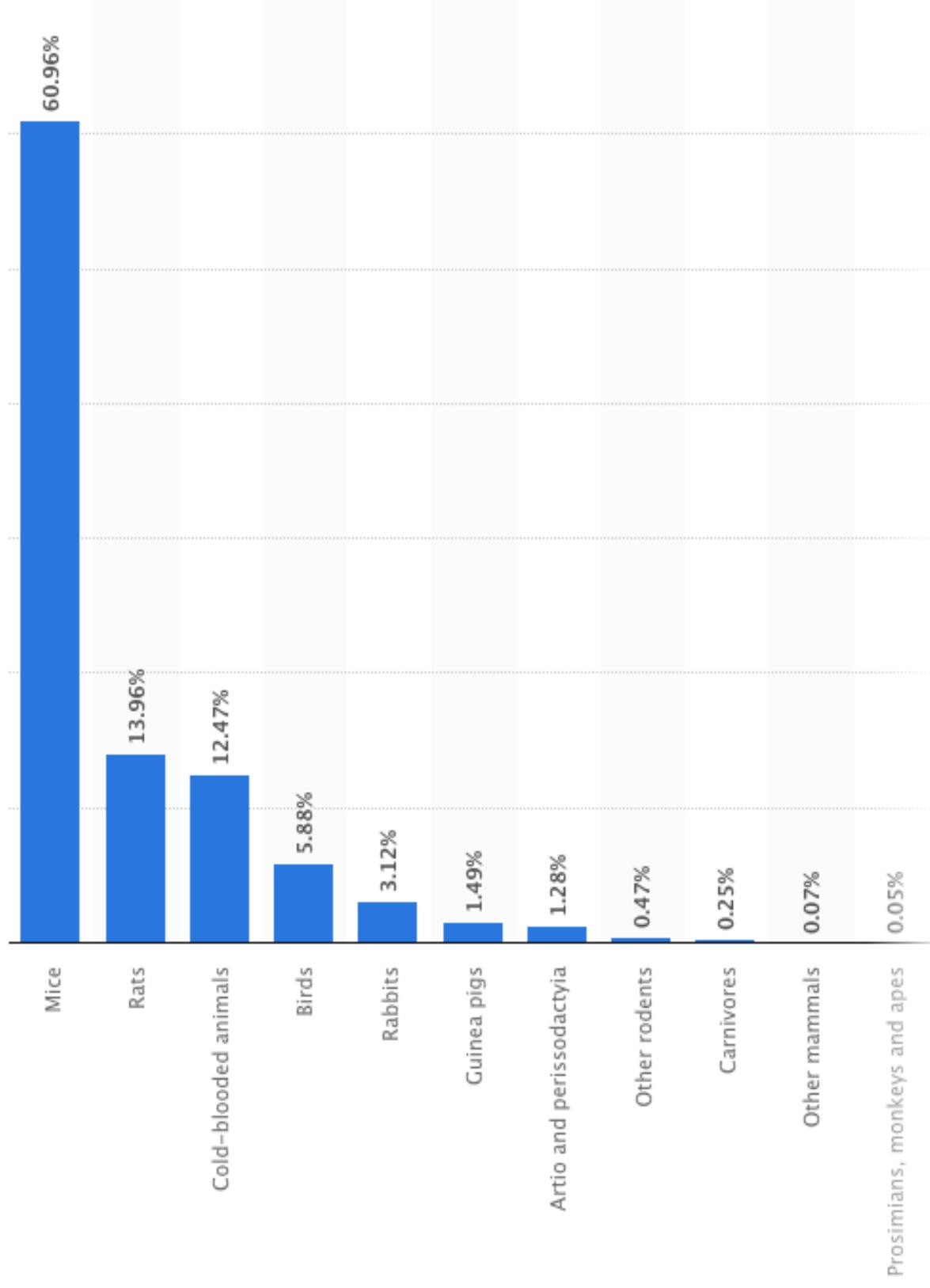
Embriologia: pesci, sviluppo rapido, ex-utero, embrione e larve trasparenti  
topo, gestazione lunga, e in utero

Neuroscienze: **encefalizzazione**: quello che rende il pesce attrattivo per le 3R (CNS relativamente primitivo), è un ovvio limite per lo studio di molti aspetti di comportamenti complessi e malattie neurodegenerative

**Traslazione:** **Science Translational Medicine**: "la medicina traslazionale si basa sui progressi della ricerca di base - studi sui processi biologici che utilizzano colture cellulari, ad esempio, o modelli animali - e li usa per sviluppare **nuove terapie o procedure mediche**"  
**molto limitata con il pesce** (es. a meccanismi genetici/molecolari)



## Share of animals used for scientific research in the European Union (27 countries) in 2011, by class of animal



# Animal Research in Great Britain in 2018

**3,519,917**

**Procedures**

In the UK research facilities are asked to record the number of procedures carried out on animals. A procedure can be as mild as an injection, or as severe as an organ transplant. Procedures are categorised according to the amount of pain an animal may experience. **Most procedures are classified as mild or sub-threshold, however in 2018 3.6% were classed as severe.**

## Number of Procedures by Species



**2.6 M**

Mice



**514,340**

Fish



**177,904**

Rats



**148,047**

Birds



**53,672**

Sheep



**6,445**

Guinea Pigs



**11,159**

Rabbits



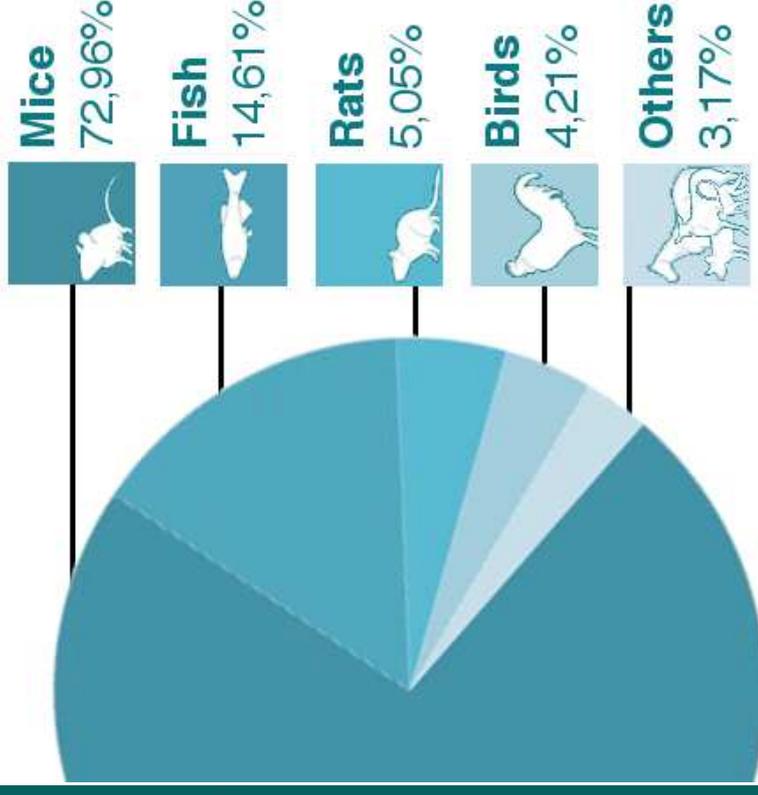
**9,873**

Amphibians

## Specially Protected Species

Dogs, cats, horses and primates have special protections under UK law. This means they can only be used in scientific research when no other species would be suitable.

## on living animals 2018



Total Number of procedures  
**3,519,917**



Basic Research  
**56%**



Regulatory  
**26%**



Applied Research  
**17%**

## Number of Animal Procedures in Great Britain in 2018

Species	Experimental Procedures	Creation & Breeding of GA animals not used in experimental procedures	Total Procedures (2018)	% of total	% change from 2017
Mice	1,078,738	1,489,459	2,568,197	72.96%	-7.67%
Fish	297,811	216,529	514,340	14.61%	+0.05%
Rats	170,665	7,239	177,904	5.05%	-26.35%
Birds	146,860	1,187	148,047	4.21%	+12.15%
Other mammals	82,754	427	83,181	2.36%	-10.51%
Reptiles	104	0	104	0.003%	+13.04%
Amphibians	6,827	3,046	9,873	0.28%	+4.69%
Primates	3,207	0	3,207	0.09%	+8.34%
Cats	159	0	159	0.005%	-19.70%
Dogs	4,481	0	4,481	0.13%	+16.48%
Horses	10,424	0	10,424	0.30%	-1.66%
<b>Total</b>	<b>1,802,030</b>	<b>1,717,887</b>	<b>3,519,917</b>	<b>100%</b>	<b>-7.11%</b>



## Severity of Animal Procedures in Great Britain in 2018

Severity	Experimental Procedures	Creation & Breeding of GA animals not used in experimental procedures	Total Procedures (2018)	Change from 2017
<b>Sub Threshold</b>	186,011 (10.3%)	1,229,656 (71.6%)	1,415,657 (40.2%)	↓
<b>Non-Recovery</b>	90,054 (5.0%)	505 (0.03%)	90,559 (2.6%)	↓
<b>Mild</b>	961,246 (53.3%)	409,303 (23%)	1,370,549 (39%)	↑
<b>Moderate</b>	477,162 (26.5%)	40,560 (2.4%)	517,722 (14.7%)	=
<b>Severe</b>	87,557 (4.9%)	37,863 (2.2%)	125,420 (3.6%)	=



Figure 1: Proportion of animals used in science by type at CCAC-certified institutions in 2011

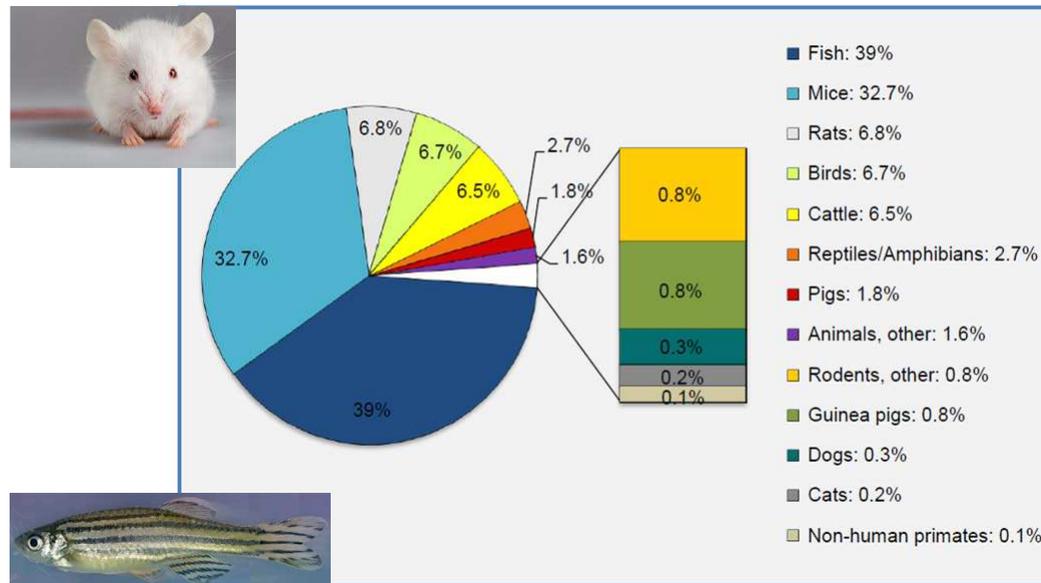
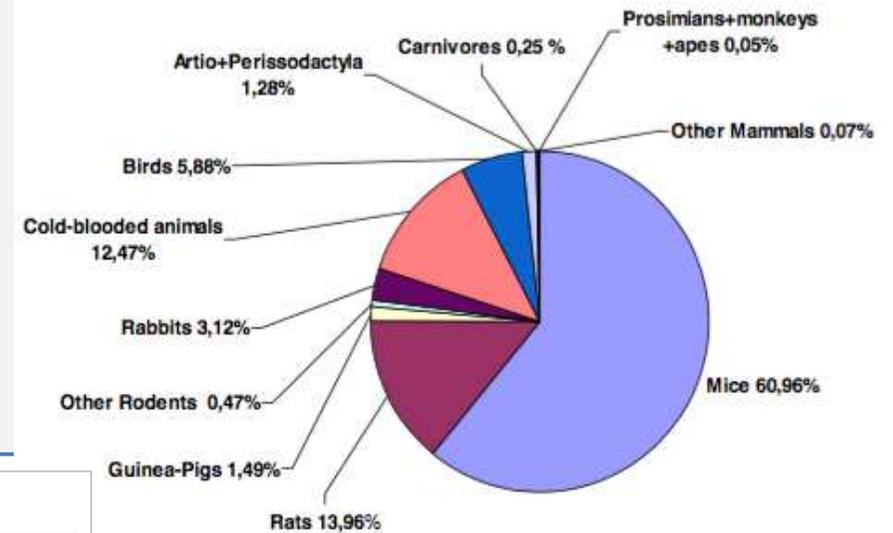
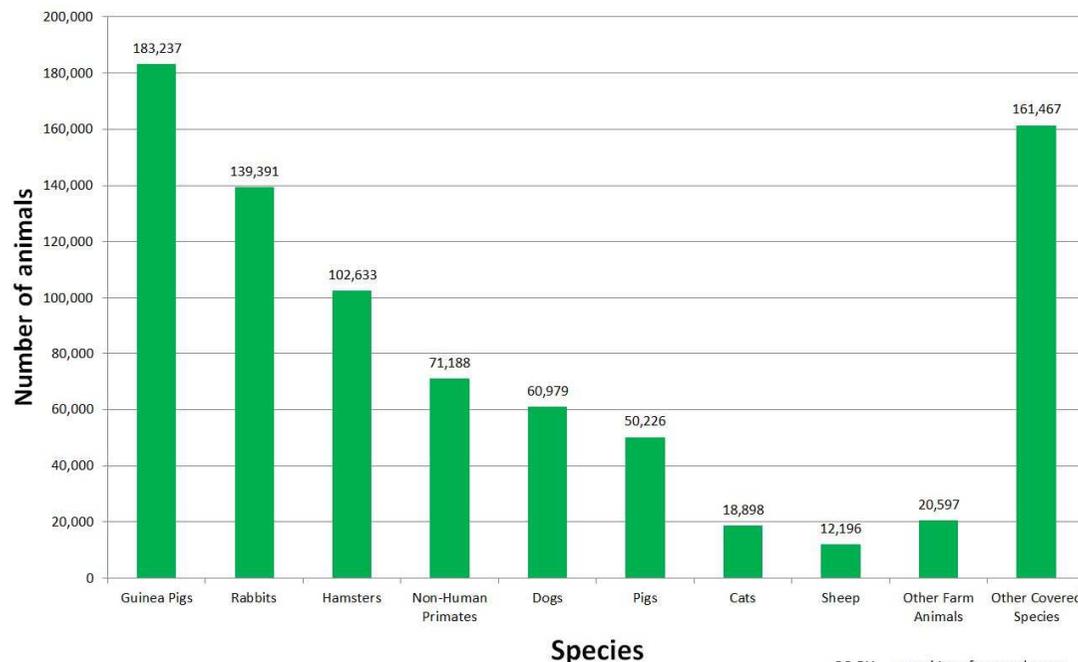


Figure 1.1 Percentages of animals used by classes in the Member States



Number of animals used in research in the US in 2016



È importante notare che queste statistiche In US non includono ratti, topi, uccelli o pesci, in quanto questi animali non sono coperti dalla legge sul benessere degli animali - sebbene siano ancora protetti da altri regolamenti





# Come scegliere la specie ittica???

## Features anatomiche

D'Angelo et al., 2016

Table 1. General anatomical features of the most used fish in **biomedical research**.

	<b>Turquoise killifish</b>	<b>Medaka</b>	<b>Zebrafish</b>	<b>Goldfish</b>
<b>Embryonic development</b>	Hatching 12 days after fertilization, as independent feeding larva	Hatching 9 days after fertilization, as independent feeding larva	Hatching 3 days after fertilization, independent feeding after 5 days post fertilization	Hatching 3 days after fertilization, independent feeding after 5 days post fertilization
<b>Digestive apparatus</b>	Oral and pharyngeal teeth Stomach	Oral and pharyngeal teeth Stomachless	Teeth attached to the fifth branchial arch Stomachless	Pharyngeal teeth Stomachless
<b>Reproductive system</b>	Sexual dimorphism	Sexual dimorphism	Sexual dimorphism	Sexual dimorphism
<b>Skin</b>	Highly colorful skin in male	Pigmented skin. 4 types of chromatophores	Five uniformly pigmented, horizontal stripes on the side of the body	Head without scales
<b>Lateral line</b>	Complete	Subdivided in anterior and posterior lateral line, according to the neuromast position	Subdivided in anterior and posterior lateral line, according to the neuromast position	Complete

- sviluppo esterno di embrioni di pesce da uova trasparenti
- assenza delle fasi G1 e G2, quindi le cellule procedono direttamente dalla fase S alla fase M
- strategia di sviluppo strettamente correlata al loro ciclo di vita (ICM)
- il sesso può essere determinato da meccanismi che sono genetici, ambientali o una combinazione di entrambi
- **sistemi nervosi semplici rispetto ai mammiferi, con molti meno neuroni**
- I geni che sono importanti per il patterning del cervello del pesce sono generalmente conservati nei mammiferi
- Il cervello del pesce è simile ad altri vertebrati, ma la **corteccia è rudimentale**
- ghiandola pituitaria secreta un numero di ormoni, **manca l'eminenza mediana**, (che collega l'ipofisi con l'ipotalamo nei mammiferi)
- ....



# Specie ittiche, Campi di applicazione

Table 2. A summary of the utilization of different fish species in current biomedical research.

Main field of use	Turquoise killifish	Medaka	Zebrafish	Goldfish
Anatomy and physiology	Basic research (age research)	Basic research (developmental biology)	Basic research (developmental biology)	Basic research (neuro-endocrinestudies)
Applied pharmacology	Drug validation for aging (Valenzano and Cellerino, 2006)	Anticancer drug (Matsuzaki et al., 2013)	General use (Haesemeyer and Schier, 2015)	
Pathology <i>Cancer and cancerogenesis</i>	Spontaneous tumors in brain, liver and genital apparatus (Di Cicco et al., 2011)	Spontaneous lymphoma, ovarian tumor; induced melanoma, liver tumors, and xenograft (Hasegawa et al., 2009)	Spontaneous and induced tumors, and through transgenesis* and xenograft (White et al., 2013)	

# Specie ittiche, Campi di applicazione

D'Angelo et al., 2016

Table 2. A summary of the utilization of different fish species in current biomedical research.

Main field of use	Turquoise killifish	Medaka	Zebrafish	Goldfish
Pathology <b>Toxicology</b>		Ecotoxicity/toxicity tests (Padilla et al., 2009)	Ecotoxicity/drug development (Gaytán and Vulpe, 2014)	Ecotoxicity (Velma and Tchounwou, 2011)
<b>Neuro-degeneration and neuropathology</b>	Neuro-degeneration (Valenzano et al., 2006)	Retinite pigmentosa (Conte et al., 2015)	Genetic-based pathologies (Newman et al., 2014)	
<b>Endocrinology and endocrine pathologies</b>			Diabetes Food intake regulation (Matsuda et al., 2012)	Hypothalamic-pituitary axis Food intake regulation (Popescu et al., 2008)
<b>Genetic pathologies</b>		General use (Schartl, 2014)	General use (Schartl, 2014)	
<b>Others</b>			Cardiovascular diseases (Asnani and Peterson, 2014)	

## Specie mammifere, features anatomiche, es:

- Mouse:**
- le vene polmonari si uniscono per formare un singolo vaso che lascia il polmone e si apre nella parete dorsale dell'atrio sinistro
  - L'anatomia delle arterie coronarie è peculiare in diversi aspetti
  - Le differenze anatomiche nel polmone il topo e l'uomo sono principalmente istologiche
  - Come caratteristica generale, il sistema immunitario del topo è in ritardo di sviluppo rispetto all'uomo

- Rat:**
- L'istologia dell'osso mostra alcune differenze significative rispetto a quella dell'uomo
  - Ghiandole bronchiali sono presenti, ma concentrate nella porzione superiore della trachea
  - Il rene è unipapillato, con una papilla e un calice, che entrano direttamente nell'uretere
  - Ci sono nefroni superficiali che possono essere facilmente perforati usando tecniche microscopiche

# Come scegliere la specie di mammifero (topo, ratto, criceto, gerbil, cavia, coniglio, and maiale)???

Lossi et al., 2016

**Table 1**

Summary of the utilization of different mammalian species in current biomedical research.

Main fields of use	Mouse	Rat	Hamster	Gerbil	Guinea pig	Rabbit	Pig
Anatomy and physiology	Basic research (general)		Urinary apparatus (pathology)	Brain circulation	Embryogenesis Teratogenicity	Basic research	Biology of reproduction Circulatory system (pathology) General use Xenotransplantation
Applied pharmacology development of biomedical devices	General use				Vitamin C deficiency		
Pathology		Cancer and cancerogenesis	General use	Oral cavity tumors Pancreatic tumors	Radiation research	General use	
		Toxicology Neurological disturbances, neuro pathology and neurodegeneration	General use General use	Epileptic syndrome	General use Audiometry Vascular pathology	Audiometry	General use Neurological disturbances
		Endocrinology and endocrine pathologies	General use	Diabetes	Adrenal glands		Diabetes
		Genetic pathologies	General use	Muscular dystrophy		Asthma	Hypertrophic cardiomyopathy Cystic fibrosis
		Others	General use	Atherosclerosis Thrombosis Caries	Infectious diseases	Atherosclerosis Infectious diseases	Cutaneous regeneration
Surgery	General use (microsurgery)				Eye (hypermetropia)	Eye	General use

# Specie mammifere, features anatomiche

Lossi et al., 2016

**Table 2**

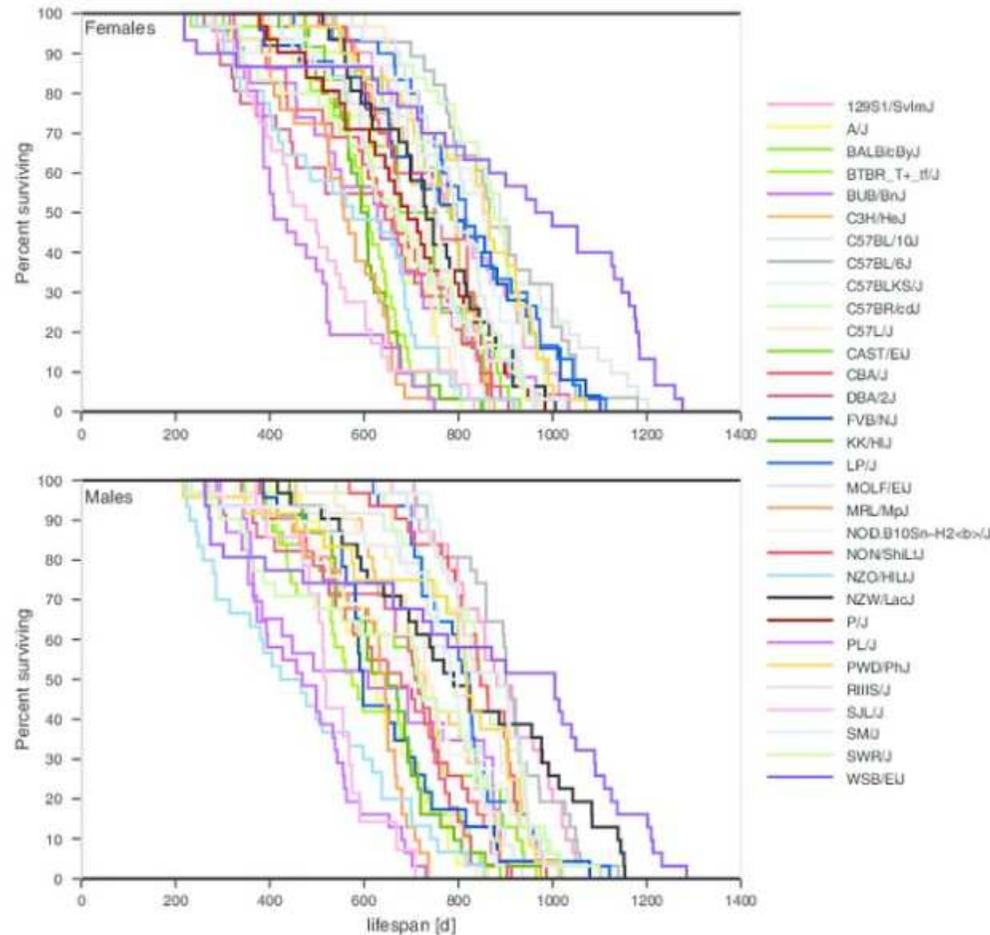
General anatomical features of rodents (mouse, rat, hamster, gerbil, guinea pig), rabbit, and pig used in biomedical research compared to those in humans. Dental formulas of diphyodonts are those of permanent dentition. See text for additional data.

		Humans	Mouse	Rat	Hamster	Gerbil	Guinea pig	Rabbit	Pig
Skeleton	Clavicle	Present	Present	Present	Present	Absent	Present (vestigial)	Present (vestigial)	Absent
	Number of digits (ant/post)	5/5	5/5	5/5	4/5	4/5	4/3	5/4	4/4
Digestive apparatus	Teeth	Diphyodont Heterodont Bunodont (premolars, molars) Dental formula: 2/2 1/1 2/2 3/3	Monophyodont Heterodont Lophodont Diastema Dental formula: 0/0 0/0 3/3				Monophyodont Heterodont Lophodont Diastema Dental formula: 1/1 0/0 1/1 3/3	Diphyodont Heterodont Two pair of upper incisors. Ever-growing incisors Diastema Lophodont Dental formula: 2/1 0/0 3/2 3/3	Diphyodont Heterodont Bunodont (premolars, molars) Dental formula: 3/3 1/1 4/4 3/3
	Ascending colon	Straight	Straight				Looped	Looped	Looped (spiroid colon)
Female reproductive system	Gall bladder	Present	Present	Absent	Absent	Present	Present	Present	Present
	Cecal appendix	Present	Absent	Absent	Absent	Absent	Absent	Present	Absent
	Type of uterus	Simple acorn	Simple bicorn	Simple bicorn bipartite	Simple bicorn	Simple bicorn	Simple bicorn	Double	Simple bicorn bipartite
	Mammary glands	2	10	10-12	12-16	8	2	8-10	10-14
Immune system and blood	Tonsils	Present	Absent	Absent	Absent	Absent	Present	Present	Present
	Neutrophil Lymphocyte % in peripheral blood (min-max)	N 40-75% L 20-50%	N 7-37% L 63-75%	N 30% L 65%	N 7-37% L 63-75%	N 18-34% L 70-76%	N 28-44% L 39-72%	N 25-46% L 39-68%	N 28-47% L 39-62%

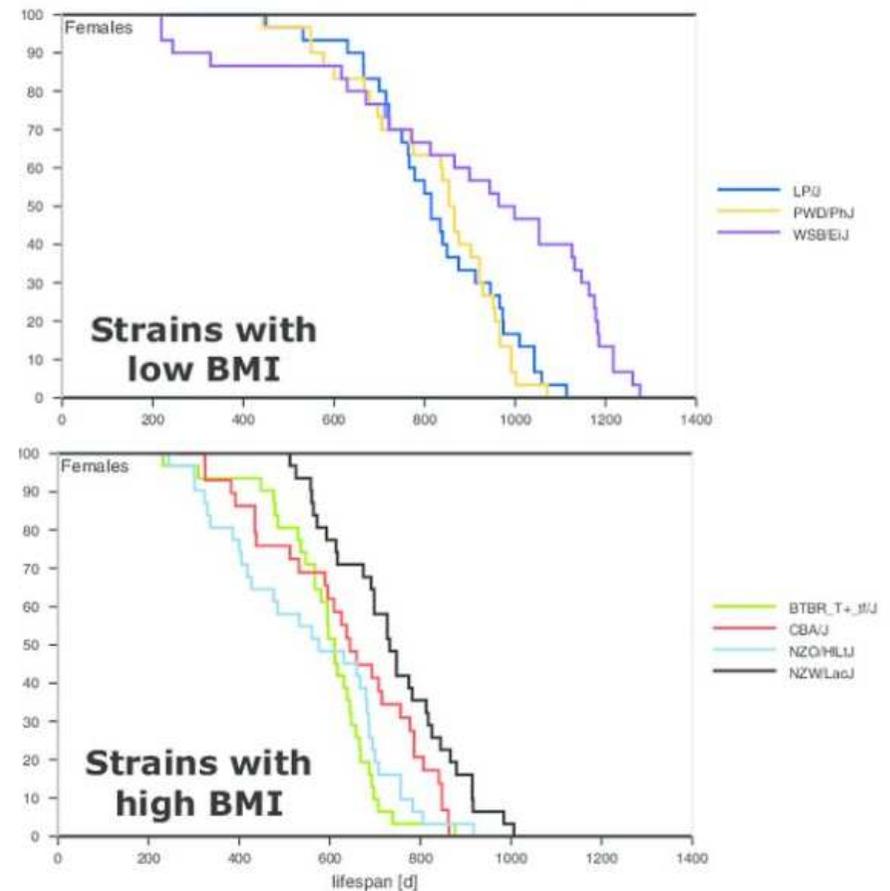


# Strain, longevity

## A. All strains, females and males



## Selected strains, females only



# Strain, depression models

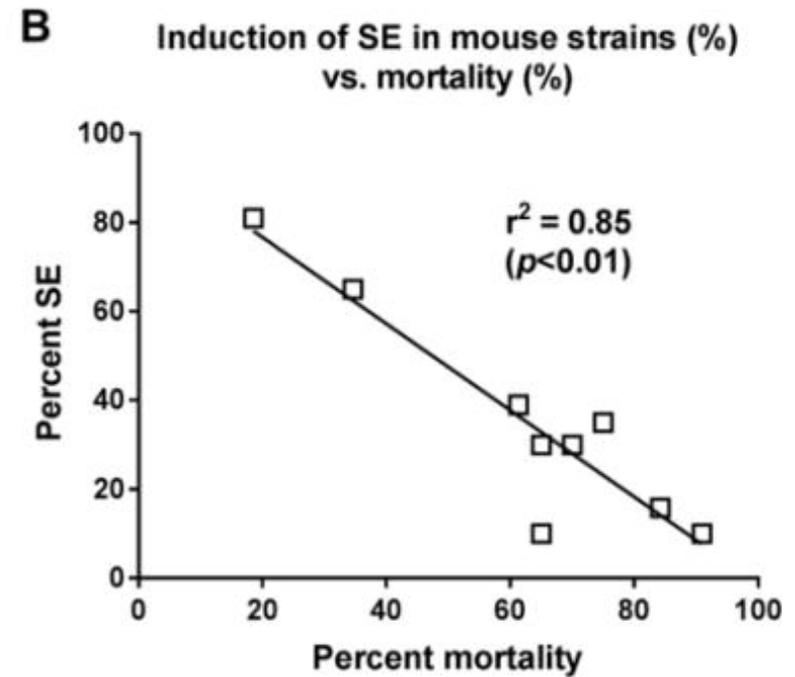
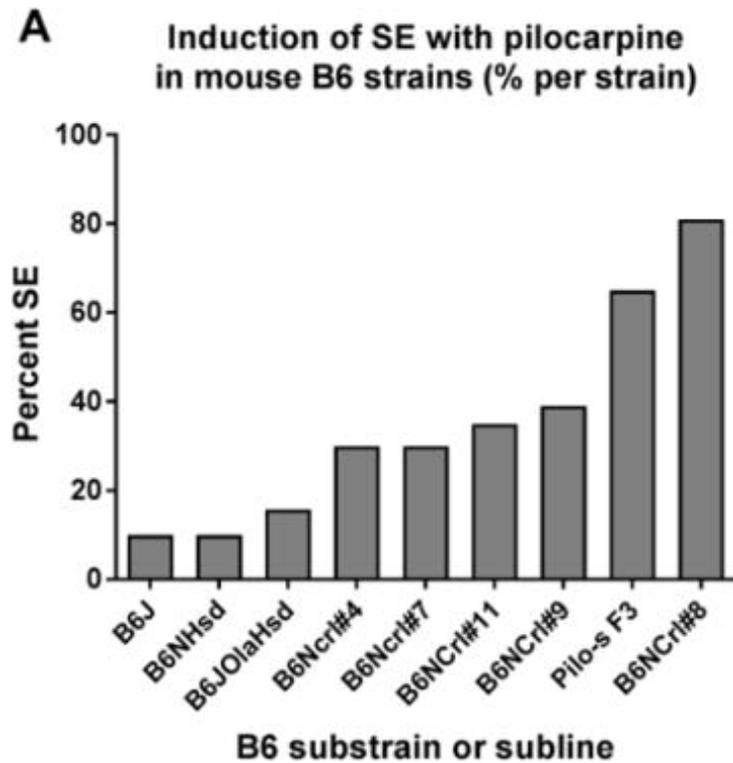
Feeling strained? Influence of genetic background on depression-related behavior in mice: a review.

Jacobson LH, Cryan JF.

Behav Genet. 2007 Jan;37(1):171-213. Epub 2006 Sep 23.



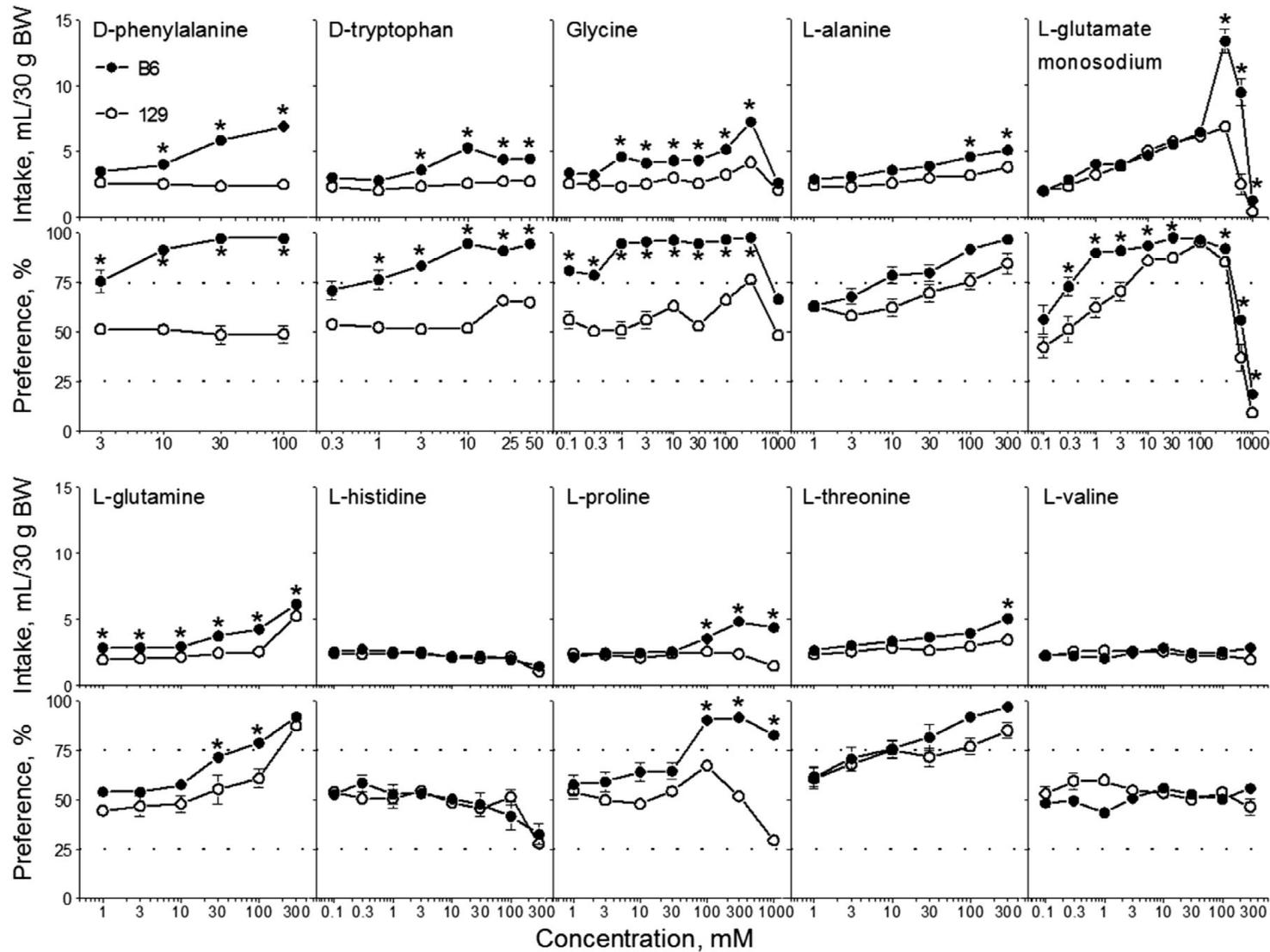
# Strain, es 1, epilepsy research



Differences in sensitivity to pilocarpine in various C57BL/6 (B6) substrains and sublines (Epilepsy Behav. 2017)



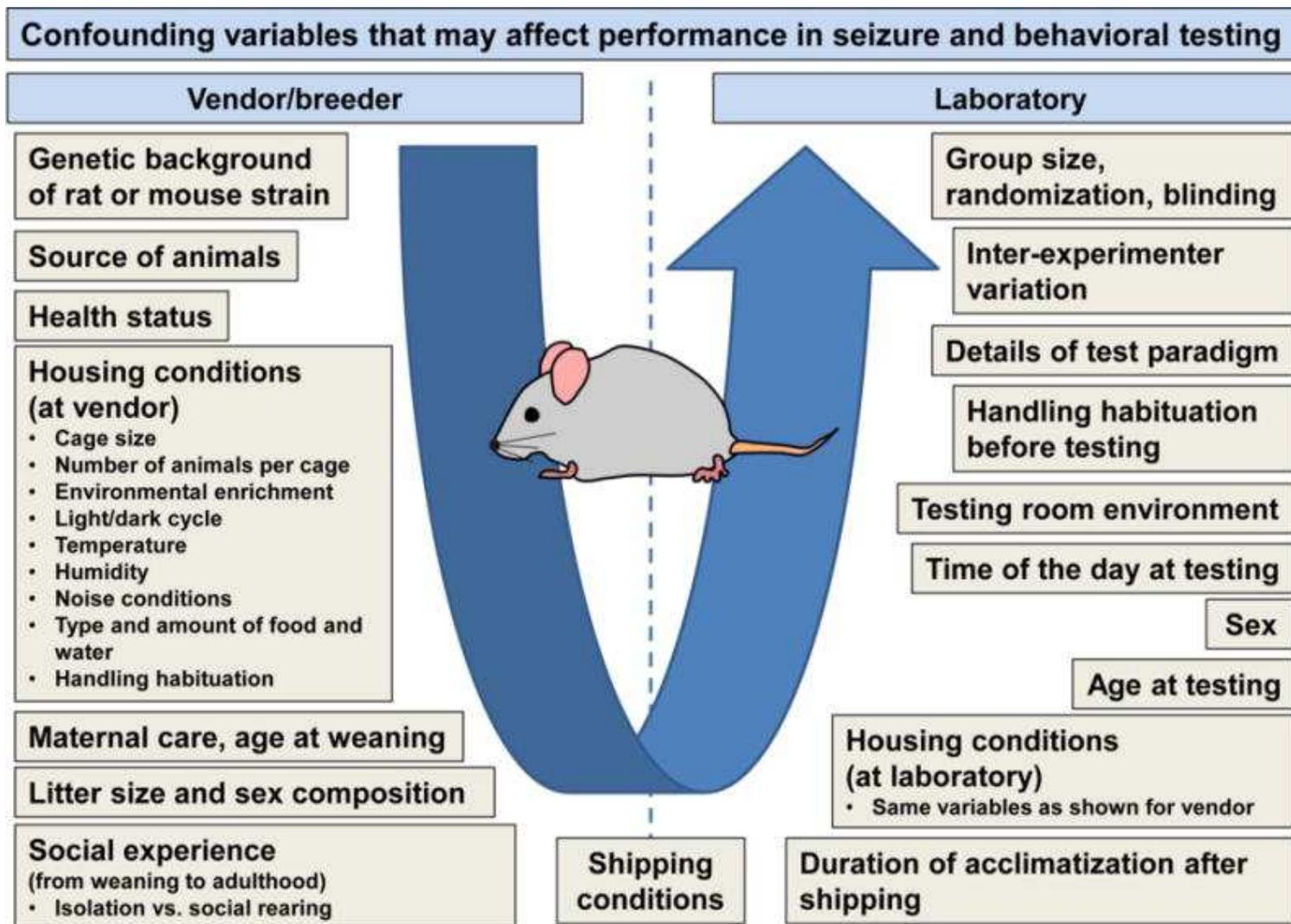
# Strain, es 2, taste



Bachmanov et al., 2016

OBS!!!!

# Strain, variabili confondenti



*Epilepsy Behav.* 2017

# Genetic background in transgenic research

*Es. Male or Female C57BL/6, 129, and B6,129 Mice*

- Cause di morte
- Incidenza di tumori spontanei
- Patologie più comuni in studi a lungo termine (>1 anno), inbred e non-inbred
- Variabili sperimentali che influenzano fenotipo e outcome sperimentale nei diversi ceppi
- B6 per AD e degenerazione retinica: impatto sui test di apprendimento e memoria

*Brayton et al., 2012*



ALMA MATER STUDIORUM  
UNIVERSITÀ DI BOLOGNA



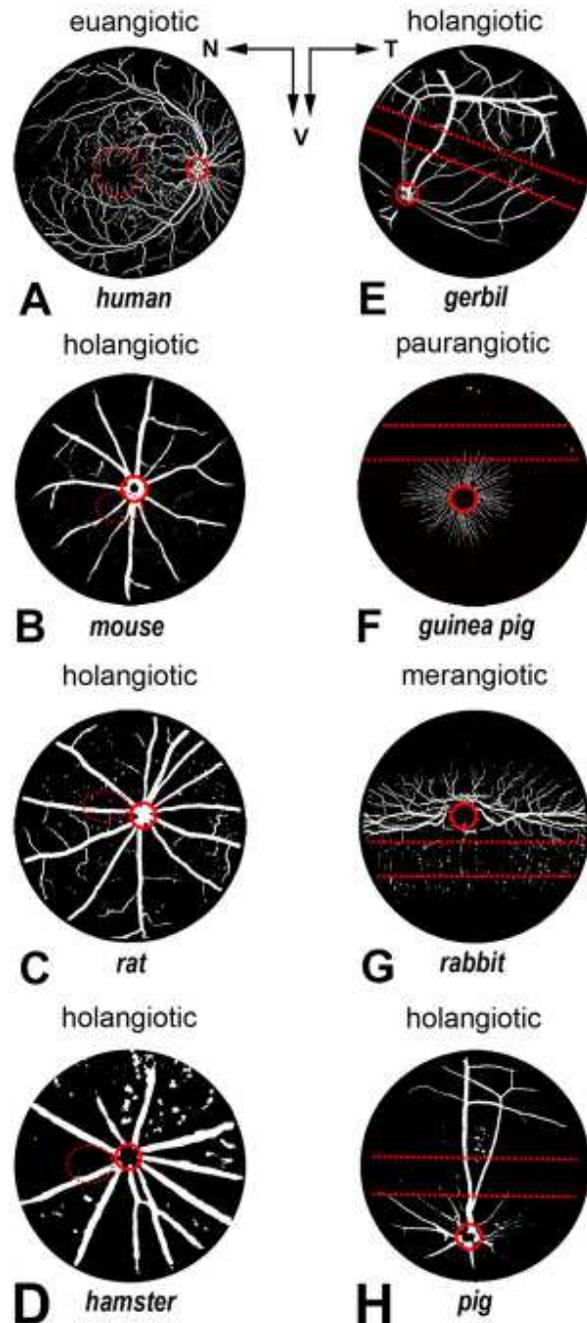
ALMA MATER STUDIORUM  
UNIVERSITÀ DI BOLOGNA

**GRAZIE**

luciana.giardino@unibo.it

[www.unibo.it](http://www.unibo.it)

# Specie mammifere, circolazione retinica



- La **vascolarizzazione retinica** varia significativamente tra **primati** e altri **mammiferi** (see Luty et al., 2012 for further information)
- Quando la **retina** viene irrorata da **un'arteria retinica centrale**, il modello di vascolarizzazione viene indicato come **euangiotico** così come si verifica nell'**uomo** (A) e nei **primati**
- Nelle retine **olangiatiche** di **roditore** (B-E) e maiale (H) i **vasi sanguigni retinici** derivano invece dalle **arterie cilio-retiniche**
- nella retina **paurangiotica** della **cavia** (F) ci sono solo vasi molto piccoli intorno al disco ottico
- La retina di **coniglio** (G) è **merangiotica**: i vasi sanguigni sono presenti solo in una piccola parte della retina, estendendosi in direzione orizzontale per formare bande su entrambi i lati del disco ottico
- Further details on retinal specialization maps can be found at <http://retinalmaps.com.au/>.

# ORGANISMI MODELLO per lo studio di aspetti biologici



Embriologia e sviluppo animale: anfibi (rana, tritone, rospo *Xenopus*);  
riccio di mare; pollo

ALMA MATER UNIVERSITATIS  
UNIVERSITÀ DI BOLOGNA

Elettrofisiologia e neurobiologia: molluschi (calamaro e *Aplysia*)

Neurobiologia e sviluppo animale: nematode *Caenorhabditis elegans*

# ORGANISMI MODELLO

Come scegliere un organismo modello?



## Principali caratteristiche per essere un buon organismo modello

ALMA MATER STUDIORUM  
UNIVERSITÀ DI BOLOGNA

- Utilizzo economico
- Possibilità di allevarlo (o coltivarlo) in condizioni controllate di laboratorio in poco spazio
- Ciclo di riproduzione rapido
- Progenie numerosa
- Sequenza del suo genoma nota
- Caratteristiche che permettano applicazioni di tecniche di biochimica, genetica e biologia molecolare

# ESEMPI DI ORGANISMI MODELLO

Procarioti unicellulari: *E. coli*



Eucarioti unicellulari: *S. cerevisiae* (lievito di birra)

Eucarioti multicellulari: *N. crassa* (muffa del pane)

ALMA MATER STUDIORUM  
UNIVERSITÀ DI BOLOGNA

Eucarioti: *A. thaliana* (pianta angiosperma)

Eucarioti: *C. elegans* (invertebrato, verme Nematode)

*Drosophila melanogaster* (invertebrato, insetto)

*Danio rerio* (vertebrato, pesce)

*Xenopus* (vertebrato, anfibio)

*Gallus gallus* (vertebrato, uccello)

*Mus musculus* e *Rattus norvegicus* (vertebrati, mammifero)

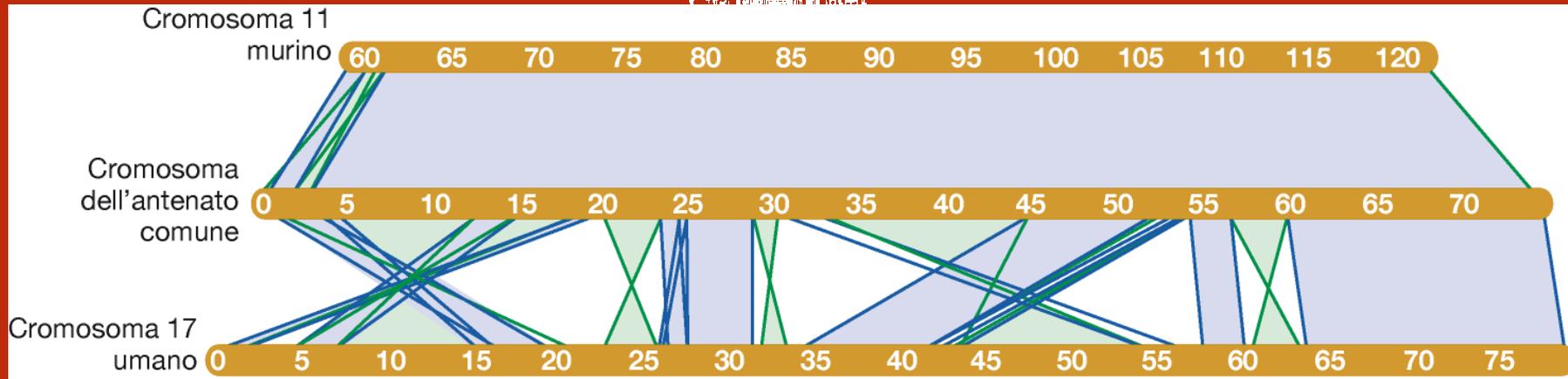
# ORGANISMI MODELLO

Con la genomica comparata è possibile:



- conoscere le relazioni tra i diversi organismi e costruire alberi filogenetici molecolari delle specie esistenti e capire quali processi abbiano plasmato un genoma permettendogli di evolvere
- identificare il DNA funzionale e quello non funzionale
- identificare le regioni genomiche fortemente conservate

# EVOLUZIONE DEI MAMMIFERI ATTRAVERSO IMPORTANTI RIARRANGIAMENTI CROMOSOMICI



**Separazione delle linee umana e murina: 75 mya**

**80% di tutti i geni umani e murini sono identificabili come ortologhi: le proteine sono essenzialmente le stesse.**

**Regioni di sintenia: regioni genomiche che contengono gruppi di geni simili, spesso disposti nello stesso ordine (in celeste) o in ordine inverso (in verde)**



**99,7% del genoma eucromatico  $\cong$  21000 geni distinti  
codificanti per proteine  molte più proteine che geni!**

[www.unibo.it](http://www.unibo.it)

# GENOMICA COMPARATA: NON ESISTE UNA RELAZIONE TRA COMPLESSITA' DI UN ORGANISMO E IL SUO NUMERO DI GENI



Specie	Tipo	Dimensioni del genoma (Mb)	Numero di geni strutturali
<i>H. sapiens</i>	Uomo	3100	~ 20.000
<i>D. melanogaster</i>	Moscerino della frutta	169	~ 14.150
<i>C. elegans</i>	Nematode	100	~ 20.200
<i>Tetrahymena thermophila</i>	Protozoo cililato	104	>27.000
<i>A. pisum</i>	Afide piante del pisello	517	>34.666

CLASSE	VANTAGGI	SVANTAGGI E LIMITI
Primati non umani	Molto simili all' uomo a livello biochimico, fisiologico, genetico; importanti per le neuroscienze	Eticamente inaccettabili per molti; alti costi; progenie ridotta
Altri mammiferi	Simili per alcuni aspetti (pecore e maiali); topi e ratti facili da manipolare, generazioni brevi, alta numerosità progenie	Non sono buoni modelli per funzioni cerebrali, es malattie come Alzheimer, breve vita per studio m. insorgenza tardiva
Altri vertebrati	Pollo, Zebrafish, <i>Xenopus</i> , buoni per sviluppo embrionale; bassi costi,	Zebrafish: embrione piccolo per manipolazioni <i>Xenopus</i> : genoma tetraploide Pollo: numero individui limitato
Invertebrati	<i>C. elegans</i> , <i>Drosophila</i> . Bassi costi; facile analisi genetica	Molto distanti evolutivamente dall' uomo

**sperimentazione animale è giustificata nel momento in cui è utilizzata per migliorare la salute umana e animale, quindi la corrispondenza con l'uomo deve essere assolutamente chiara. Possono essere utilizzati in studi genetici in particolare per creare mappe genetiche.**

# Organismi modello

Batterio, *Escherichia coli*

Lievito gemmante, *Saccharomyces cerevisiae*

Muffa del pane, *Neurospora crassa*

Nematode, *Caenorhabditis elegans*

Arabetta comune, *Arabidopsis thaliana*

Moscerino della frutta, *Drosophila melanogaster*

Topo domestico, *Mus musculus*

Gli organismi modello più diffusi presentano numerosi vantaggi ai fini sperimentali, come **rapido sviluppo** e **breve ciclo vitale**, taglia ridotta, pronta disponibilità, manipolabilità e diventano sempre più utili nel momento in cui sono adottati da un crescente numero di studiosi. Questi organismi forniscono un grande numero di dati, utilizzabili per l'**analisi dei processi evolutivi**, di **regolazione genica**, delle malattie genetiche.



## Zebrafish role in CNS drug discovery (FDA panel respective requirements) *(de Abreu et al., 2019)*.

- The acute fish toxicity test, outlined in the Organization for Economic Co-operation and Development (OECD) guidelines, is the most commonly conducted vertebrate test for **environmental** hazard and risk assessment in adult fish
- discrepancies related to CNS drug screening in aquatic species require further regulatory attention (for example for drug screening using low-concentration water exposure in aquatic specie)
- Fish model can potentially inform **environmental protection laws** (example, presence of pharmaceutical products in the aquatic environment, especially around large cities)
- zebrafish approved/recommended animal model for CNS drug screening platforms???



# 3R strategy (also to overcome the use of Zebrafish)

(de Abreu et al., 2019).

**Table 2**

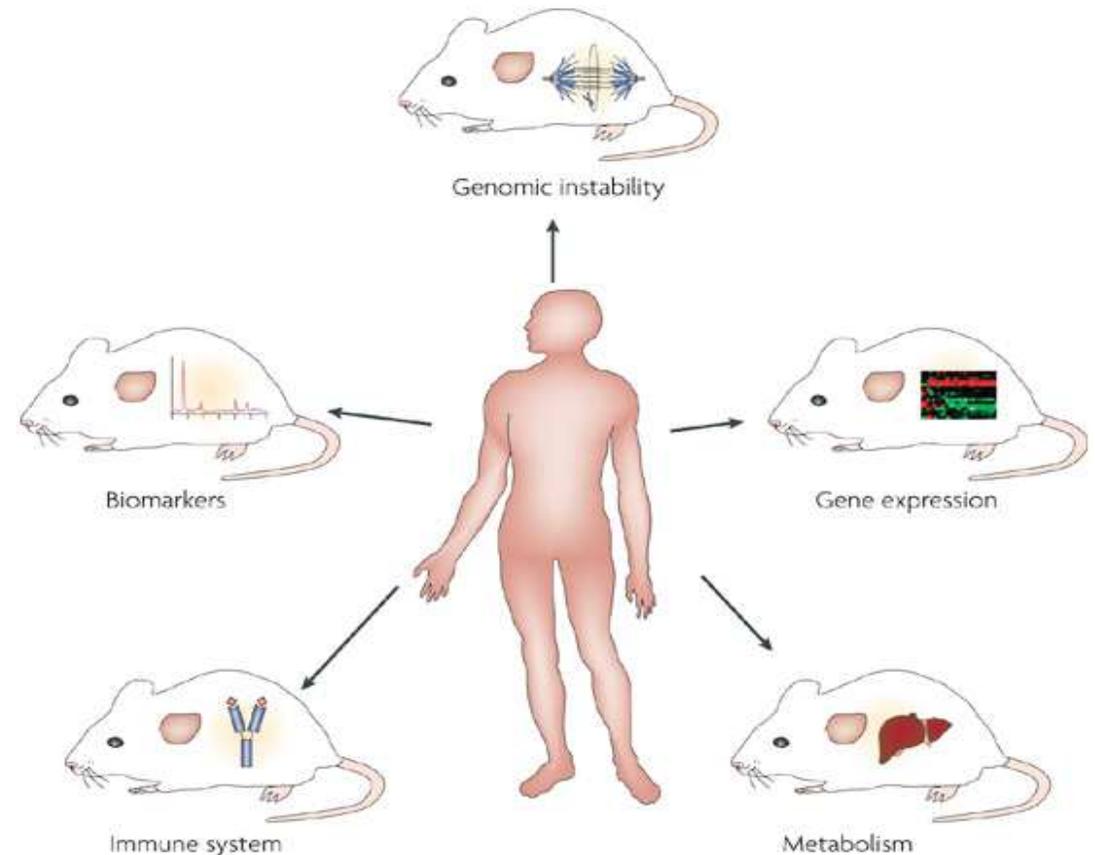
Examples of applying the 3R principles to zebrafish models.

Principle	Definition	Zebrafish models
Replacement	Methods to avoid or replace the use of animals.	Using embryonic zebrafish to replace rodents; using fish images or robotic fish to replace live animals
Reduction	Methods to minimize the number of animals used per experiment.	Zebrafish are highly sensitive to experimental manipulations, yet maintaining a high genetic and physiological homology with mammals. Using zebrafish in drug discovery narrows down the selection of candidate compounds, thereby lowering the number of rodents to use at subsequent research phases.
Refinement	Methods to minimize animal suffering and improve welfare.	Model allows drug administration by water immersion vs injection as a less stressful/invasive procedure.



Fra tutti, il **modello** più utile per lo studio delle **malattie umane** è il **topo**. Questo non è però il più semplice tra gli organismi modello. Per facilità di allevamento e manipolazione del DNA, il **topo** crea molte più difficoltà degli altri organismi modello. Ottenere **ceppi di topo** geneticamente alterati è costoso e lungo. Ma uno dei grandi vantaggi del **topo** è che il **99% dei suoi geni ha degli omologhi nell'uomo**, e tra questi ci sono anche **geni associati a malattie umane**.

## I' animale sostituisce l' uomo



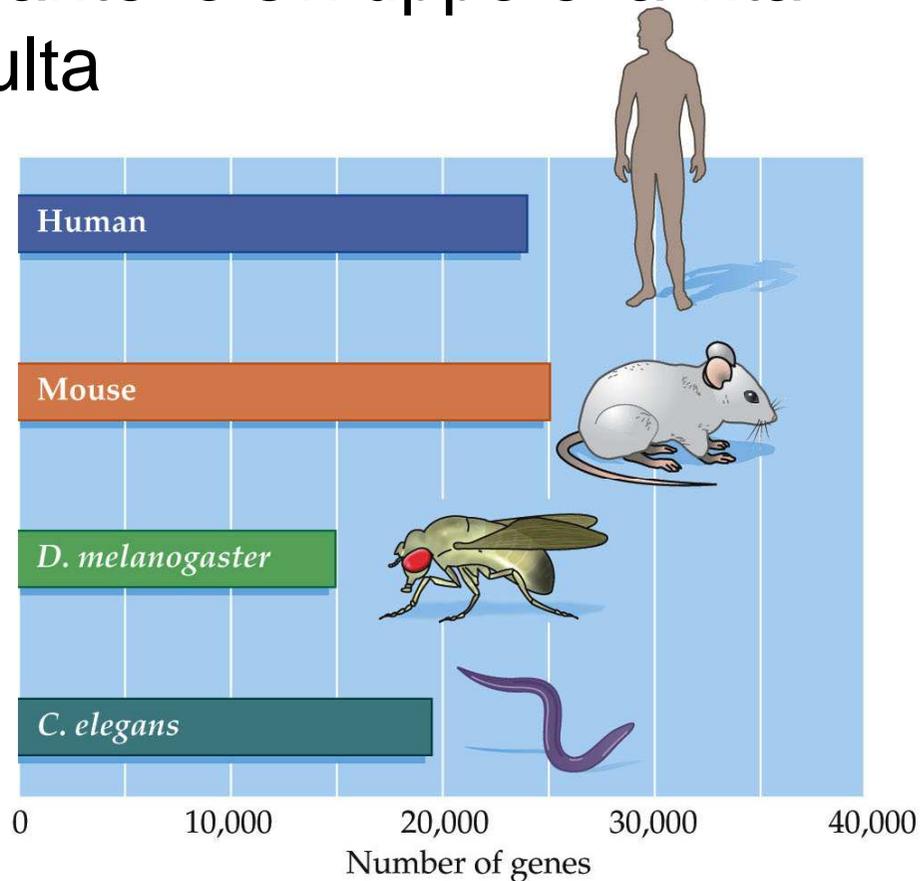
Nature Reviews | Cancer

Per questi motivi il topo si è rivelato un prezioso modello nella ricerca in ambiti quali la biologia dello sviluppo, la genetica, l'immunologia. Il sequenziamento del suo genoma fornisce inoltre un sistema per lo studio e la comprensione di patologie umane e delle relative strategie terapeutiche



ALMA MATER STUDIORUM  
UNIVERSITÀ DI BOLOGNA

❖ La **maggioranza** dei **25000** **geni** che compongono il **genoma umano** sono espressi nel **cervello** durante lo sviluppo e la vita adulta



**NEUROSCIENCE, Fourth Edition, Figure 1.1**  
*Purves D. et al.*

❖ Solo un numero molto ristretto di geni è espresso **esclusivamente** nei **neuroni**

❖ Le cellule nervose **hanno in comune** la maggior parte delle **proprietà strutturali e funzionali di base** di altre cellule

# Come scegliere la specie ittica???

## Features anatomiche

Table 1. General anatomical features of the most used fish in [biomedical research](#).

	<b>Turquoise killifish</b>	<b>Medaka</b>	<b>Zebrafish</b>	<b>Goldfish</b>
<b>Embryonic development</b>	Hatching 12 days after fertilization, as independent feeding larva	Hatching 9 days after fertilization, as independent feeding larva	Hatching 3 days after fertilization, independent feeding after 5 days post fertilization	Hatching 3 days after fertilization, independent feeding after 5 days post fertilization
<b>Digestive apparatus</b>	Oral and pharyngeal teeth Stomach	Oral and pharyngeal teeth Stomachless	Teeth attached to the fifth branchial arch Stomachless	Pharyngeal teeth Stomachless
<b>Reproductive system</b>	Sexual dimorphism	Sexual dimorphism	Sexual dimorphism	Sexual dimorphism
<b>Skin</b>	Highly colorful skin in male	Pigmented skin. 4 types of chromatophores	Five uniformly, pigmented, horizontal stripes on the side of the body	Head without scales
<b>Lateral line</b>	Complete	Subdivided in anterior and posterior lateral line, according to the neuromast position	Subdivided in anterior and posterior lateral line, according to the neuromast position	Complete

- external development of fish embryos from transparent eggs
- absence of the G1 and G2 phases, thus cells proceed directly from the S to M phase
- developmental strategy closely related to their life cycle (ICM)
- sex can be determined by mechanisms that are genetic, environmental, or a combination of both
- simple nervous systems compared to mammals, with far fewer neurons
- Genes that are important for fish brain patterning are usually conserved in mammals
- Fish brain is similar to other vertebrates but rudimental cortex
- pituitary gland secretes a number of hormones, lacks the median eminence, (which connects the pituitary with the hypothalamus in mammals)
- ....