

Titolo divulgativo: **Contaminanti ambientali emergenti: monitoraggio e valutazione della tossicità**

Titolo scientifico: **Contaminanti emergenti nell'ambiente: caratterizzazione del profilo di interferenza endocrina e del rischio per la salute**

Responsabile dello studio: **Fabiana Morroni**

Gruppo di ricerca: **Giulia Sita, Agnese Graziosi, Camilla Corrieri, Luca Ghelli**

Affiliazione: **Dipartimento di Farmacia e BioTecnologie, Alma Mater Studiorum – Università di Bologna**

Relazione scientifica

Background e razionale

L'Organizzazione Mondiale della Sanità (OMS) definisce la salute come uno stato di completo benessere fisico, mentale e sociale. Il concetto di ambiente si è evoluto nel tempo, arrivando oggi a comprendere l'interconnessione tra le comunità viventi, inclusi gli esseri umani, e il contesto fisico, rendendo inscindibile il rapporto tra ambiente e salute. Fattori come inquinamento e cambiamenti climatici influenzano profondamente il benessere delle popolazioni.

Tra le minacce emergenti, i contaminanti ambientali rappresentano una crescente preoccupazione. Tra questi, gli interferenti endocrini (IE) sono sostanze in grado di alterare la sintesi, il metabolismo e l'azione degli ormoni, con possibili effetti negativi sulla salute. La loro presenza nell'ambiente è ubiquitaria e l'esposizione umana avviene principalmente attraverso l'ingestione di cibi contaminati o l'uso di prodotti farmaceutici e per la cura della persona. Gli IE possono agire anche a basse dosi, con un rischio cronico per la popolazione, in particolare per feti e neonati, durante finestre critiche dello sviluppo.

Gli effetti nocivi degli IE sono stati evidenziati inizialmente dall'aumento di anomalie riproduttive in uomini e animali. Tuttavia, il loro impatto si estende a diversi sistemi fisiologici, compreso il sistema nervoso centrale, con possibili ripercussioni sull'invecchiamento cerebrale. L'approccio riduzionistico, che analizza i singoli inquinanti, risulta ormai superato: è necessario adottare il concetto di esposoma, considerando l'insieme delle esposizioni ambientali lungo l'intero arco della vita.

Un aspetto innovativo della ricerca riguarda il ruolo dell'epigenetica, in particolare la modulazione dei microRNA (miRNA), piccole molecole regolatrici dell'espressione genica. I miRNA stanno emergendo come biomarcatori promettenti dell'esposizione ambientale, ma i meccanismi che ne regolano l'interazione con le sostanze tossiche restano in gran parte inesplorati. Approfondire queste dinamiche è cruciale per comprendere meglio l'impatto degli inquinanti sulla salute e sviluppare strategie di prevenzione più efficaci.

Obiettivi del progetto

In questo contesto, il presente progetto di ricerca è stato orientato allo studio dell'impatto dell'esposizione agli IE sulla salute umana e ambientale, analizzando in particolare i pathway coinvolti nei meccanismi di neurotossicità. L'attività sperimentale è stata volta alla valutazione e caratterizzazione dei meccanismi molecolari e cellulari che concorrono alla tossicità degli IE, utili ai fini della loro caratterizzazione e classificazione.

Metodi e Risultati

Un'iniziale analisi della letteratura ha permesso di studiare e selezionare gli IE di interesse. Per avere un'ampia rappresentazione di diverse sostanze con caratteristiche di IE, le molecole scelte sono state: atrazina (A - erbicida), vinclozolin (V - fungicida) e cipermetrina (C - insetticida), come rappresentanti della classe dei pesticidi, etinilestradiolo (E - estrogeno semisintetico) tra i farmaci con caratteristiche di IE, acido perfluoroottansolfonico (P - impermeabilizzante) e dietilftalato (F - plastificante), prodotti chimici industriali. Una volta scelte le molecole, il passo successivo è stata l'ottimizzazione del disegno sperimentale, per imitare al meglio l'esposizione umana alle sostanze selezionate. Per eseguire questi studi è stata scelta la linea cellulare di neuroblastoma umano SH-SY5Y, ampiamente utilizzata nello studio del sistema nervoso ed in particolare per la neurotossicità, grazie alla capacità di queste cellule di essere differenziate a neuroni maturi. Successivamente è stata valutata la vitalità cellulare, tramite il test dei sali di tetrazolio, e la formazione di specie reattive dell'ossigeno (ROS) causato dall'esposizione agli IE, mediante la sonda 2',7'-diclorodidrossifluoresceina diacetato (H2DCF-DA). In questo modo, è stato possibile selezionare le concentrazioni e il tempo di esposizione agli IE scelti che non influenzassero la vitalità cellulare e non causassero la produzione di ROS per i test successivi.

Nella seconda fase sperimentale sono stati valutati i meccanismi epigenetici, in particolare lo studio della modulazione dei miRNA da parte degli IE e per questo è stato effettuato un profiling per esaminarne l'espressione. L'analisi ha permesso di riconoscere un ampio gruppo di miRNA modulati, che sono quindi stati validati mediante Real Time PCR (RT-PCR) in singola sonda.

Per mimare in maniera più efficace l'esposizione agli IE, è stato messo a punto un protocollo di differenziamento per la linea cellulare SH-SY5Y al fine di ottenere neuroni maturi. Le cellule differenziate sono state poi trattate con gli IE (0,1 μ M e 1 μ M) per 48 ore. Sono stati eseguiti il test di vitalità (test Alamar) e il test dei ROS per verificare che le condizioni scelte non fossero tossiche per le cellule differenziate.

È stato eseguito un profiling dei miRNA anche nelle cellule differenziate e, come si può evincere dalla Tabella 1, è stato possibile osservare una down-regolazione della maggior parte dei miRNA analizzati dopo esposizione a tutti gli IE in studio.

Nella terza fase sperimentale, le sei molecole in studio sono state divise in due gruppi e sono prima stati studiati gli effetti dei prodotti fitosanitari (A, V e C). Grazie ad un'analisi bioinformatica, eseguita con il software miRNet, è stato possibile determinare i geni bersaglio dei miRNA modulati dopo l'esposizione ai tre fitosanitari. È stato interessante osservare come la maggior parte dei geni bersaglio facesse parte del pathway PI3K/Akt/mTOR, una delle vie di segnalazione cellulare più critiche, che controlla la proliferazione cellulare, la sopravvivenza, il metabolismo, la motilità e le risposte a stress e trattamenti. Grazie all'analisi in qRT-PCR di alcuni dei geni appartenenti al pathway (Tab. 2), è stato possibile osservare come dopo l'esposizione a V e C sia presente una up-regolazione (Fold >2) dei geni ADAM10, CDK6 e PTEN. Il pathway è stato convalidato anche dall'analisi Western Blotting (Fig. 1) che ha mostrato una significativa up-regolazione delle proteine Akt e mTOR, mentre la proteina p53, fattore di trascrizione che regola il ciclo cellulare, è risultata down-regolata in accordo anche alla riduzione del rapporto Bax/Bcl2 per A, V e C, promuovendo la sopravvivenza cellulare.

Una volta concluse queste analisi, lo studio si è concentrato sulle restanti molecole, E, P e F. L'analisi bioinformatica dei miRNA modulati dopo l'esposizione a queste sostanze ha portato all'identificazione di alcuni geni coinvolti nel pathway di Ras, che regola diversi processi cellulari, come proliferazione, migrazione, sopravvivenza, differenziamento e fibrosi. L'analisi qRT-PCR di alcuni dei geni coinvolti in questo pathway ha mostrato una significativa up-regolazione dei geni AREG, EGFR, EZH2, IGF1R, PTEN e SOX30 (Tab. 3). Il pathway è stato convalidato anche mediante analisi Western Blotting (Fig. 2). È stato possibile osservare

una significativa up-regolazione delle proteine EGFR, Akt e mTOR, mentre p53 è risultato nuovamente down-regolato insieme al rapporto Bax/Bcl2.

Conclusioni

Negli ultimi anni, diversi studi hanno indagato i meccanismi attraverso i quali gli IE possano esplicare la loro attività sul sistema endocrino, ma ci sono ancora molti aspetti da chiarire. Infatti, ad oggi pochissimi studi hanno considerato il ruolo dei miRNA correlati all'interferenza endocrina. Sebbene siano necessari ulteriori studi per comprendere meglio gli effetti degli IE sul sistema nervoso centrale, i risultati del presente progetto mostrano che l'esposizione a basse concentrazioni di IE può indurre diverse risposte cellulari. Definire i meccanismi molecolari alla base delle alterazioni dei miRNA e le conseguenze cellulari indotte dagli IE potrebbe contribuire a comprendere la causalità tra l'esposizione ad essi e le modifiche epigenetiche, ma faciliterebbe anche lo sviluppo di nuovi metodi per esaminare il potenziale dei prodotti chimici di alterare meccanismi cellulari critici. Il presente progetto ha contribuito allo sviluppo di strategie per testare gli IE e definire il rischio associato alla loro esposizione, migliorandone la valutazione, al fine di delineare misure di prevenzione per ridurre le malattie associate all'esposizione agli IE, favorire la loro rimozione dall'ambiente e trasferire le evidenze scientifiche nei programmi e nelle politiche di sanità pubblica.

Tabella 1. qRT-PCR dell'espressione di miRNA in cellule SH-SY5Y differenziate dopo trattamento con i 6 IE selezionati [100 nM, 1 μ M] per 48 ore. Analisi quantitativa: metodo $2^{-\Delta\Delta C_t}$; calibratore Vh. In rosso: up-regolazione (Fold>2); in giallo: down-regolazione (Fold<0,5).

	Fold Average											
	A1	A100	C1	C100	E1	E100	F1	F100	P1	P100	V1	V100
miR-200a-3p	0.41	0.49	0.41	0.28	0.46	0.63	0.32	0.25	0.40	0.83	0.22	0.26
miR-18b-5p	0.65	0.30	0.18	0.16	0.21	0.44	0.59	0.31	0.58	0.25	0.32	0.26
miR-653-5P	0.59	0.41	1.07	0.26	0.47	0.37	0.78	0.48	0.96	0.29	0.89	0.22
miR-133b	0.82	0.51	0.70	0.67	1.08	0.53	0.48	0.30	0.54	0.38	0.62	0.44
miR-146b	0.56	0.49	0.65	1.47	0.53	1.53	0.50	0.46	0.40	0.45	0.97	0.50
miR-29b	0.92	0.42	0.87	0.65	1.01	0.59	0.96	0.58	1.32	0.51	0.70	0.38
miR-452-5p	0.52	0.55	0.86	0.81	0.56	0.93	0.81	0.65	0.79	0.62	0.25	0.57
miR-193a-5p			0.92	0.67	1.01	0.31	0.59	0.34				
miR-379-5p	0.97	0.41	1.15	0.73	1.22	0.91	0.66	0.44	1.08	0.43	0.51	0.66
miR-455-5p	0.92	0.62	0.84	0.82	0.92	0.94	0.60	0.65	0.69	0.80	0.46	0.96
miR-15b-5p			0.80	0.61								

Tabella 2. Analisi qRT-PCR dell'espressione dei geni target in cellule SH-SY5Y differenziate dopo trattamento con atrazina (A), vinclozolin (V) e cipermetrina (C) [100 nM, 1 μ M] per 48 ore. Analisi quantitativa: metodo $2^{-\Delta\Delta C_t}$; calibratore Vh. In rosso: up-regolazione (Fold>2).

	Average Fold GAPDH							
	ADAM12	BACE1	BCL2	CDK6	HDAC4	MCL1	MMP2	PTEN
A1	1.38	1.06	1.13	1.58	1.32	1.07	1.26	1.72
A100	1.20	0.91	1.31	1.28	1.12	0.92	1.08	1.52
C1	1.34	1.02	1.05	1.74	1.46	0.88	1.19	2.07
C100	1.43	1.10	1.56	1.98	1.30	1.21	1.13	1.73
V1	2.58	1.22	1.60	2.97	1.94	1.95	1.89	3.78
V100	2.11	1.17	1.99	2.13	1.46	1.36	1.42	2.26

Tabella 3. Analisi qRT-PCR dell'espressione dei geni target nelle cellule SH-SY5Y differenziate dopo trattamento con etinilestradiolo (E), acido perfluoroottansolfonico (P) e dietil ftalato (F) [100 nM, 1 μ M] per 48 ore. Analisi quantitativa: metodo $2^{-\Delta\Delta C_t}$; calibratore Vh. In rosso: up-regolazione (Fold>2); in giallo: down-regolazione (Fold<0,5).

	Average Fold GAPDH							
	AREG	CDK6	EGFR	EZH2	IGF1R	PTEN	SOS 1	SOX30
E1	2.02	0.76	4.02	2.09	2.85	0.89	0.57	2.65
E100	1.24	0.55	3.58	1.54	2.49	0.61	0.46	1.44
F1	2.48	0.76	4.08	2.17	3.49	0.90	0.73	3.07
F100	1.15	1.38	4.40	2.17	2.19	2.07	1.11	4.01
P1	1.61	1.11	2.95	3.00	1.32	1.42	1.34	1.28
P100	1.50	1.25	3.84	1.76	3.34	1.73	1.37	1.49

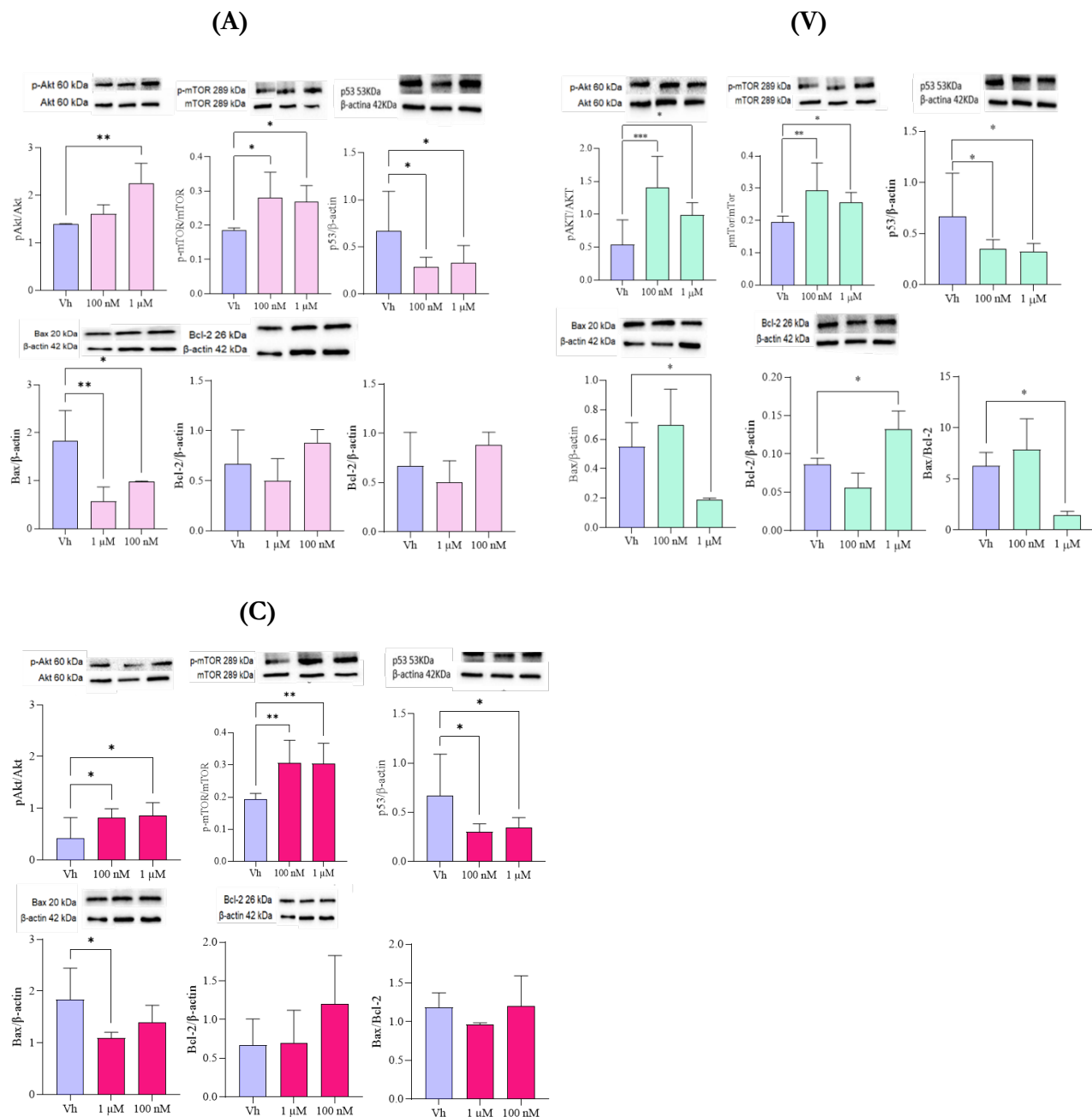


Figura 1. Livelli proteici ottenuti tramite Western Blotting nelle cellule SH-SY5Y differenziate dopo trattamento con atrazina (A), vinclozolin (V) e cipermetrina (C) [100 nM, 1 μM] per 48 ore. I dati sono espressi come rapporto tra la proteina di interesse e l'espressione di β-actina e riportati come DS ± la media di tre esperimenti indipendenti (One-way ANOVA, Dunnet post hoc test).

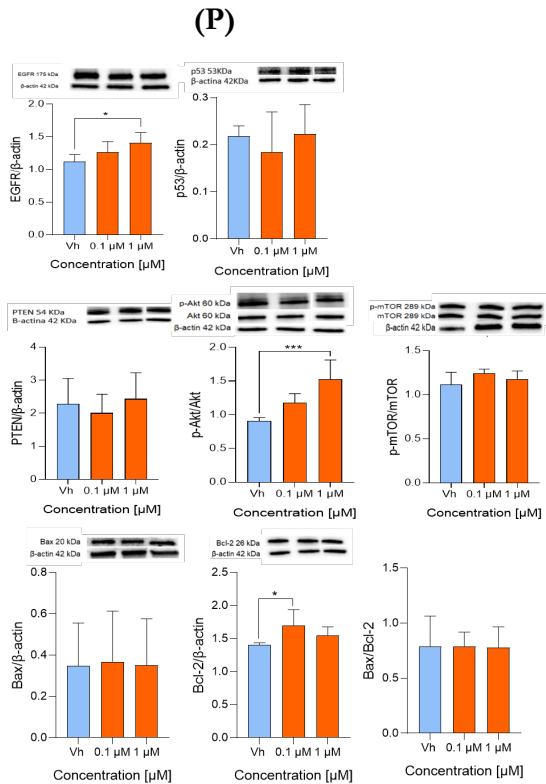
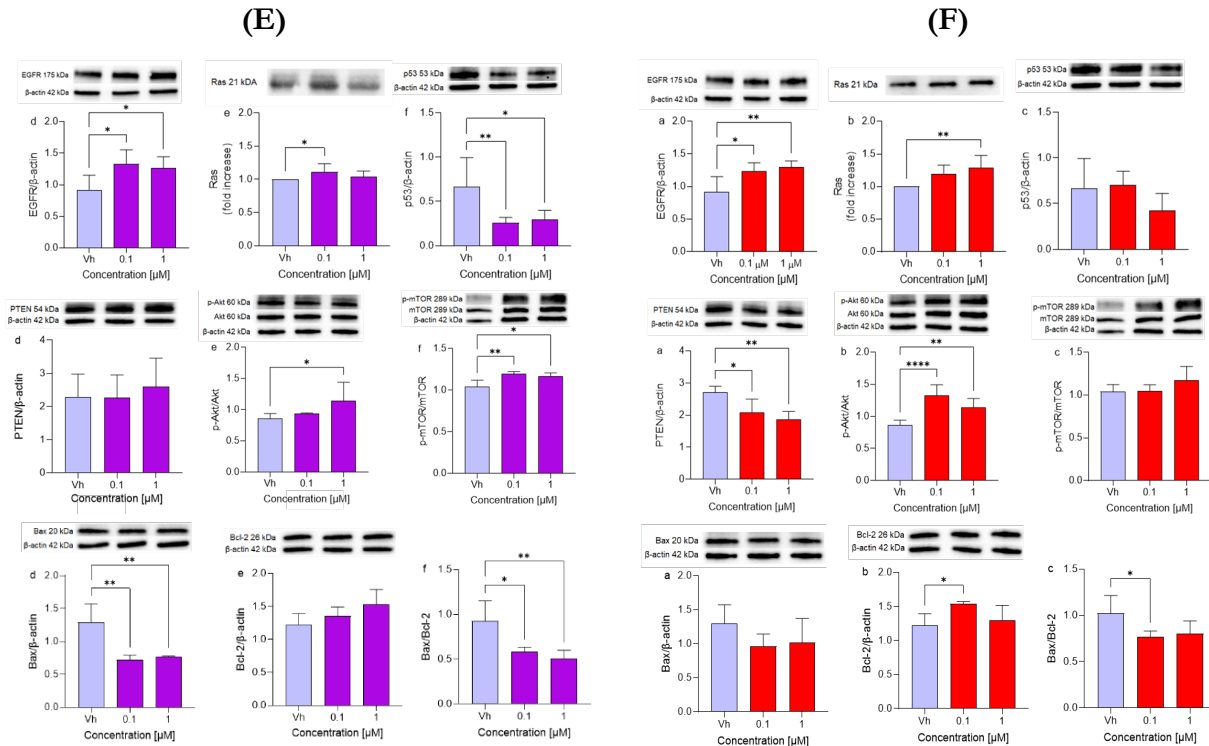


Figure 2. Livelli proteici ottenuti tramite Western Blotting nelle cellule SH-SY5Y differenziate dopo trattamento con etinilestradiolo (E), acido perfluorooctansolfonico (P) e dietil ftalato (F) [100 nM, 1 μM] per 48 ore. I dati sono espressi come rapporto tra la proteina di interesse e l'espressione di β-actina e riportati come DS ± la media di tre esperimenti indipendenti (One-way ANOVA, Dunnet post hoc test).

Bibliografia

Boxall, A.B.A. Murray A. Rudd, M. A. et al. Pharmaceuticals and Personal Care Products in the Environment: What are the Big Questions? *Environ Health Perspect.* 120(9),1221-9 (2012).

Combarrous, Y. Endocrine Disruptor Compounds (EDCs) and agriculture: The case of pesticides. *C. R. Biol.* 340, 406–409 (2017).

Darbre, P. D. Endocrine Disruptors and Obesity. *Curr. Obes. Reports* 2017 61 6, 18–27 (2017).

Padmanabhan, V., Cardoso, RC. & Puttabyatappa, M. Developmental Programming, a Pathway to Disease. *Endocrinology* 157, 1328–1340 (2016).

Schug, TT., Janesick, A., Blumberg, B. & Heindel, JJ. Endocrine disrupting chemicals and disease susceptibility. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 127, 204–215 (2011).