

**UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI NAPOLI 'FEDERICO II'**



SCUOLA POLITECNICA E DELLE SCIENZE DI BASE  
AREA DIDATTICA SCIENZE MATEMATICHE, FISICHE E NATURALI

XXIX DOTTORATO IN BIOLOGIA

**Studio degli effetti neurotossici e genotossici dell'esposizione *in vitro* ed *in vivo* al Chlorpyrifos, un pesticida organofosfato.**

Coordinatore : Prof. Salvatore Cozzolino

Tutor  
Dott.ssa Rosa Carotenuto  
Co-tutor  
Prof.ssa Teresa Capriglione

Dottoranda  
Maria Michela Pallotta

# INDICE

	<i>Pag.</i>
<b>Abstract</b>	1
<b>Capitolo 1: Introduzione</b>	10
<b>1.1 I PESTICIDI</b>	11
1.1.2 Classificazione	11
1.1.3 Esposizione	12
1.1.4 Gli organofosfati	13
<b>1.2 IL CHLORPYRIFOS</b>	15
1.2.1 Esposizione al CPF	16
1.2.2 Tossicità del CPF: neurotossicità	18
1.2.3 Effetti del CPF sull'apparato riproduttivo maschile	21
1.2.4 Effetti del CPF sull'apparato riproduttivo femminile e sullo sviluppo embrionale	23
<b>1.3 SCOPO DEL LAVORO</b>	25
<b>Capitolo 2: <i>XENOPUS LAEVIS</i></b>	27
<b>2.1 Materiali e Metodi</b>	28
2.1.1 Fecondazione <i>in vitro Xenopus Laevis</i>	28
2.1.2 Crescita degli embrioni a contatto con il Chlorpyrifos	28
2.1.3 Analisi statistiche	29
2.1.4 Fissazione embrioni in MEMFA	29
2.1.5 Fissazione embrioni in PFA 4%	30
2.1.6 Immunofluorescenza <i>in toto</i> con anticorpo anti-tubulina acetilata.	30
2.1.7 Colorazione Alcian Blue	31
2.1.8 Inclusione in paraffina e colorazione di Galgano	32
2.1.9 Sparaffinatura e idratazione	34
2.1.10 Colorazione tricromia di Galgano	34
2.1.11 Real Time PCR quantitativa	36
2.1.11.1 Estrazione RNA da embrioni stadio 41	36

2.1.11.2 Retrotrascrizione	37
2.1.11.3 RT-PCR	37
<b>2.2 Risultati</b>	<b>39</b>
2.2.1 Mortalità	39
2.2.2 Analisi fenotipi	40
2.2.3 Analisi istologiche	42
2.2.4 Osservazione alterazioni cartilagini cranio-facciali	43
2.2.5 Analisi di espressione genica	44
<b>2.3 Discussione</b>	<b>47</b>
<b>Capitolo 3: <i>MUS MUSCULUS</i></b>	<b>52</b>
<b>3.1 Materiali e Metodi</b>	<b>53</b>
3.1.1 Raccolta degli encefali di <i>Mus musculus</i>	53
3.1.2 Purificazione dell'RNA totale dai tessuti recuperati	53
3.1.3 Analisi spettrofotometrica dell'RNA estratto	55
3.1.4 Verifica dell'integrità dell'RNA estratto	55
3.1.5 Contaminazione da genomico	55
3.1.6 Reazione di retrotrascrizione	56
3.1.7 Verifica mediante PCR della digestione del DNA genomico e del cDNA sintetizzato	57
3.1.8 Valutazione dei profili di espressione mediante PCR array e real-time PCR	57
3.1.8.1 PCR array	57
3.1.8.2 Analisi statistica	61
3.1.8.3 Real-Time PCR	61
3.1.9 Estrazione delle proteine	63
3.1.9.1 Quantizzazione proteica con il metodo Bradford	63
3.1.9.2 Saggio dell'acetilcolina esterasi	64
<b>3.2 Risultati</b>	<b>65</b>

<b>3.2.1 PCR array e validazione dei dati tramite PCR real-time</b>	65
3.2.1.1 3 mesi	65
3.2.1.2 8 mesi	69
<b>3.3 Discussione</b>	73
<b>Capitolo 4: <i>BOS TAURUS</i></b>	79
<b>4.1 Materiali e metodi</b>	80
4.1.1 Prelievo ovaie e trasporto in laboratorio	80
4.1.2 Aspirazione del fluido follicolare e maturazione ovocitaria	80
4.1.3 Scongellamento del liquido seminale	81
4.1.4 Trattamento con CPF	82
4.1.5 Valutazione della motilità e dei parametri cinetici	82
4.1.6 Fecondazione	83
4.1.6.1 Denudazione e sviluppo embrionale	83
4.1.7 Valutazione del grado di frammentazione del DNA, Tunel su spermatozoi	84
4.1.8 Ibridazione in situ (FISH) sui cromosomi sessuali	86
2.3.9 Analisi di metilazione sul gene XIST e GNAS	87
4.1.9.1 Estrazione DNA spermatico	87
4.1.9.2 Conversione del DNA con bisolfito	88
4.1.9.3 PCR	89
4.1.9.4 Pirosequenziamento	90
4.1.10 LUMA: luminometric methylation assay	91
4.1.11 Analisi statistica	92
<b>4.2 Risultati</b>	93
4.2.1 Effetto del CPF sulla motilità e cinetica spermatica	93
4.2.2 Effetto del CPF sulla frammentazione del DNA	96

4.2.3 Effetti sulle % di fecondazione e sul numero di embrioni ad 8 cellule in terza giornata	98
4.2.4 Effetti sull'integrità dei cromosomi sessuali.	100
4.2.5 Effetto del CPF sul pattern di metilazione del gene XIST e GNAS	102
4.2.6 Effetto del CPF sul pattern di metilazione globale tramite LUMA	103
<b>4.3 Discussione</b>	105
<b>Capitolo 5: Conclusioni</b>	109
<b>Bibliografia</b>	113

## ABSTRACT

Chlorpyrifos (CPF) is an organophosphate insecticide used primarily to control foliage and soilborn insect pests on a variety of food and feed crops. The main mechanism of CPF action is, likely the other organophosphates, the inhibition of acetylcholinesterase (AChE), which results in accumulation of acetylcholine and subsequent hyperactivity in the cholinergic system. However, multiple developmental studies on animal models have reported that chronic CPF exposure can alter brain development and neuronal morphogenesis even in the absence of significant AChE inhibition (Campbell et al., 1997; Das and Barone, 1999; Levin et al., 2002; Slotkin et al., 2006, 2007; Timofeeva et al., 2008a,b; Tussellino et al., 2016). In aquatic lower vertebrates, fish and amphibians, exposure to this compound has been correlated to teratogenic activity which results in several anatomical alterations. In mammals, maternal exposure to CPF has been reported to induce dose-related abnormalities such as slower brain growth and cerebral cortex thinning. In mice, prenatal CPF exposure has been found to have the potential of affecting long-term brain cognitive function, but the mechanisms are not fully understood. On the other hand, several studies demonstrated that CPF can affect endocrine system, mainly thyroid and adrenal glands; moreover, it has been demonstrated that CPF has an inhibitory effect on the secretion of pituitary hormones such as luteinizing hormone (LH) and follicle stimulating hormone (FSH), and, in rat testis, can determine a decrease in testosterone biosynthesis.

Based on these evidence, the aim of this PhD project is to gain a deeper understanding of the altered regulatory mechanisms triggered by environmental exposure to CPF.

For this reason, we evaluated the effects of CPF on both aquatic and terrestrial model vertebrates, focusing, mainly, on 3 aspects:

1. Adverse effects during embryo development and neurogenesis in aquatic organisms:

*Xenopus laevis*

2. Putative neurodegenerative alterations after long-lasting in utero and post-natally exposure:

*Mus musculus*

3. Effects of CPF on mammalian sperm and fertility rate: *Bos taurus*

### *Xenopus laevis*

In the first part of our study, we investigated the effects of exposure to different CPF concentrations (10, 15 and 20 mg/L) on *Xenopus laevis* embryos from stage 4/8 to stage 46. Some of the morphological changes we detected in CPF-exposed embryos included cranial neural crest cell (NCC)-derived structures. For this reason, we analyzed the expression of select genes involved in hindbrain patterning (*egr2*), cranial neural crest chondrogenesis, and craniofacial development (*fgf8*, *bmp4*, *sox9*, *hoxa2* and *hoxb2*). We found that CPF exposure induced a reduction in transcription of all the genes involved in Cranial Neural Crest-dependent chondrogenesis, with largest reductions in *fgf8* and *sox9*; whereas, in hindbrain, we did not find any alterations in *egr2* expression. Thus, changes in the expression of *fgf8*, *bmp4*, and *sox9*, which are master regulators of several developmental pathways, result in teratogenic alterations of the facial skeleton. Interestingly, in birds and mammals (Le Douarin et al. 2007, the cranial NCC region forming the facial skeleton is also critical for the development of the anterior brain, and the interactions between these two regions during development require a correct balance of Fgf8 and of Bmp4 levels. The altered gene expression levels described in this work provide preliminary data that may help explain the correlation between OP and neurodevelopmental toxicity observed in mammals exposed to these molecules before birth (Chen et al., 2014).

### *Mus musculus*

To study the effects of chronic CPF exposure in mammals we used F1 offspring (sacrificed at 3 and 8 months) of *Mus musculus*, exposed in utero and postnatally to 3 doses of CPF (0,1-1-

10 mg/kg/d), commonly found on fruit and vegetables.. The analysis was performed evaluating the alterations reported by 84 genes associated to Parkinson disease, using RT<sup>2</sup> Profiler PCR Arrays. First of all, we evidenced a clear dose–response relationship in brains of 3 as well as 8 month mice exposed to the pesticide both for AChE inhibition as well as alterations of gene expression, although the panel of altered genes differed between the two aged groups. Overall, chlorpyrifos exposure produced a mixed pattern of up- and down-regulation, which is more evident in in the higher-CPF groups (10 mg/kg/d)). However, while there was still a dose response relationship, not appreciable worsening was detectable with the increase of exposure time because brains of eldest mice showed a sort of general recovery of gene functionality with aging. The total number of *gene* networks affected sharply reduced at 8 months and AchE values shift from highly inhibited, approximately 80% in 3 months, to 30% in the eldest mice. It was interesting to note that some of genes significantly and steadily down-regulated were directly related to Parkinson's onset, such as e Park 2, Sv2b, Gabbr2, Sept5, Atxn2. Interestingly, at 8 months we reported an up-regulation of the expression of Park7, HSPA4, Rgs4, and Chgb. Increased level of Park7 and HSPA4, considered neuroprotectors, together with the decrease of brain cholinesterase inhibition may, be explained as an adaptive response to the chronic stress induce by exposure to the pesticide and justify the recovery observed. Our evidence provide useful connections on the different scenarios determined by chronically environmental exposure to organophosphate pesticides. Based on our experimental results, though animals do not show full blown syndrome, it is conceivable to hypothesize that their brain cells are more *susceptible to develop* specific neurological diseases.

### **Bos Taurus**

Frozen semen samples were incubated with different concentrations of CPF (5,10,25,50µg/ml) for 2 h, and various spermatozoa functional parameters were assessed:

motility, in *vitro* fertilization rates, DNA fragmentation and chromatin alterations, methylation pattern.

Progressive forward motility was significantly ( $p < 0.05$ ) reduced in spermatozoa exposed to the 10, 25, 50  $\mu\text{g/ml}$  of CPF while DNA fragmentation and putative chromatin deconstruction appeared to increase significantly ( $p < 0.05$ ) only at CPF higher concentrations ( $\geq 10 \mu\text{g/ml}$ ). The *vitro* fertilization capabilities and the percentage of 8 cell embryos were significantly reduced at 50  $\mu\text{g/ml}$  of chlorpyrifos when compared to control. Evaluation of the global sperm DNA methylation level, carried out at 10 and 25  $\mu\text{g/ml}$  of CPF, showed no differences between the treated groups and the control. To confirm the results, we then selected 2 genes, Xist and GNAS, known to be imprinted in human and mice. In particular, we analyzed 10 CpG islands XIST promoter and 22 CpG islands for GNAS promoter. While, GNAS regolative region didn't show any significative variations in methylation level, XIST promoter showed an increase in sperm DNA methylation after treatment (10 $\mu\text{g/ml}$ ). The present study demonstrates that low doses of CPF impair sperm quality and can reduce male fertility potential. Moreover, our results showed that Chlorpyrifos exerted reproductive toxicology of sperm cells through various means, mainly altered sperm motility and reduction of fertilization rate.

## **Conclusions**

On the basis of our experimental results, it is possible to assume that, subjects exposed daily to Chlorpyrifos, although not showing obvious signs of toxicity, may have higher sensitivity in developing pathologies, in particular neurological and reproductive disorders.

## RIASSUNTO

Il Chlorpyrifos (CPF) è un insetticida organofosfato utilizzato principalmente per eliminare insetti infestanti su fogliame, su una vasta varietà di colture alimentari e di mangimi. Il principale meccanismo d'azione del CPF è, così come per gli altri organofosfati, l'inibizione della acetilcolinesterasi (AChE), che si traduce in accumulo di acetilcolina e successiva iperattività del sistema colinergico. Tuttavia, diversi studi, su modelli animali, hanno dimostrato come, anche in assenza di una significativa inibizione dell'AChE, l'esposizione cronica al CPF possa alterare la neurogenesi (Campbell et al, 1997;. Das e Barone, 1999; Levin et al., 2002; . Slotkin et al, 2006, 2007;. Timofeeva et al, 2008a, b;. Tussellino et al, 2016). Nei vertebrati acquatici, come pesci e anfibi, l'esposizione a questo pesticida è stata correlata a teratogenesi con conseguente sviluppo di alterazioni anatomiche in diverse parti del corpo. Nei topi, l'esposizione prenatale al CPF è in grado di influenzare le funzioni cognitive del cervello, mentre, nell'uomo, l'esposizione materna al CPF è stata associata all'induzione di anomalie embrionali dose-dipendenti, come il rallentamento della crescita del cervello e l'assottigliamento della corteccia cerebrale. Recenti studi hanno infine dimostrato che il CPF può agire anche come interferente del sistema endocrino, andando ad alterare la funzionalità tiroidea e delle ghiandole surrenali, inibendo la secrezione degli ormoni ipofisari (LH e FSH) e inducendo una diminuzione della biosintesi del testosterone.

Sulla base di queste evidenze, l'obiettivo del mio progetto di dottorato è stato quello di acquisire nuovi dati per una più completa comprensione dei meccanismi, alla base delle alterazioni indotte dal pesticida, che correlare l'esposizione cronica a dosi ambientali di CPF con la possibilità di sviluppare patologie neurodegenerative (Parkinson) e con l'insorgenza di infertilità dovuta ad alterazioni epigenetiche.

Per il mio studio, ho utilizzato tre modelli animali : 1. *Xenopus laevis*, per valutare gli effetti del pesticida sullo sviluppo embrionale in ambiente acquatico; 2. *Mus musculus* per correlare

l'esposizione pre e post-natale al pesticida con l' insorgenza di patologie neurodegenerative. 3  
*Bos taurus* per ricercare un'eventuale correlazione fra esposizione, *in vitro*, al CPF e  
insorgenza di un danno epigenetico nel DNA spermatico.

### *Xenopus laevis*

Utilizzando *Xenopus laevis*, sono stati studiati gli effetti dell'esposizione a diverse  
concentrazioni di CPF (10, 15 e 20 mg / L) in embrioni da stadio 4/8 fino allo stadio 46.  
Alcuni dei cambiamenti morfologici individuati in embrioni esposti a CPF, sono a carico di  
strutture derivanti dalle cellule della cresta neurale (NCC). In particolare, abbiamo messo in  
evidenza che l'esposizione al CPF induce una riduzione della trascrizione di geni (*fgf8*, *bmp4*,  
*sox9*, *hoxa2* e *hoxb2*) coinvolti nello sviluppo cranio-facciale dipendente dalla Cresta Neurale  
Cefalica, pur non alterando i livelli i livelli di *EGR2*, un gene coinvolto nel patterning del  
romboencefalo .

E' interessante notare come Le Douarin e collaboratori (2007) abbiano dimostrato che negli  
uccelli e nei mammiferi, il corretto sviluppo dello scheletro facciale, dipendente da una  
corretta espressione proprio di di *FGF8* e *BMP4*, sia essenziale per guidare lo sviluppo del  
cervello anteriore. I livelli genici alterati della NCC, ritrovati durante lo sviluppo di *Xenopus*  
potrebbero aiutare a spiegare la correlazione tra OP e la tossicità nello sviluppo neurologico  
osservata nei mammiferi esposti a queste molecole prima della nascita (Chen et al. 2014) e  
fornire marcatori precoci per diagnosticare alterazioni durante lo sviluppo.

### *Mus musculus*

Per collegare gli effetti dell'esposizione cronica al CPF con l'eventuale predisposizione a  
sviluppare patologie neurodegenerative, abbiamo usato prole F1 (sacrificata a 3 e 8 mesi) di  
*Mus musculus*, esposta, in utero e dopo la nascita, a 3 dosi di CPF (0,1-1-10 mg / kg / d), che  
si ritrovano comunemente su frutta e verdura. L'analisi è stata effettuata utilizzando un RT2

Profiler PCR array, che permette di valutare eventuali alterazioni di 84 geni associati all'insorgenza del Parkinson.

L'analisi condotta, dimostra una chiara relazione dose-dipendente nel cervello di topi a 3 e a 8 mesi, esposti al pesticida, sia per l'inibizione dell'AChE che per alterazioni dell'espressione genica. Nel complesso, l'esposizione al Chlorpyrifos ha prodotto un misto di up-e down-regolazione, che è più evidente nel gruppo esposto alla concentrazione superiore di CPF (10 mg/ kg /d). Non è stato, tuttavia, rilevato un progressivo peggioramento con l'aumento del tempo di esposizione, infatti, i topi a 8 mesi mostrano una sorta di generale ripresa della funzionalità genica. In particolare, il numero totale di geni alterati si riduce drasticamente a 8 mesi, mentre l'attività dell'AChE passa da altamente inibita, circa l'80% in topi di 3 mesi, al 30% nei topi di 8 mesi.

A tre mesi alcuni geni noti come direttamente correlati con l'insorgenza del Parkinson giovanile, Park 2, SV2B, Gabbr2, Sept5, Atxn2, risultano fortemente down-regolati. È interessante notare che, a 8 mesi si ritrova, invece, un aumento dell'espressione di Park7, HSPA4, RGS4, e Chgb. L'aumento dei trascritti di Park7 e HSPA4, considerati neuroprotettori, insieme con la diminuzione di inibizione della colinesterasi cerebrale, potrebbero rappresentare una risposta adattativa allo stress cronico indotto dall'esposizione al pesticida e giustificare la ripresa osservata. A 8 mesi, aumenta, però, il numero di trascritti per alcuni geni (i.e. RGS4), coinvolti nella modulazione negativa della segnalazione cellulare mediata dalle proteine G.

Sulla base di questi risultati sperimentali è possibile ipotizzare che, anche se i topi studiati non manifestano una sindrome Parkinson-like, il danno indotto dall'esposizione cronica al CPF renda le loro cellule neuronali sicuramente più predisposte a sviluppare patologie neurodegenerative.

## **Bos Taurus**

Per condurre l'ultimo studio, abbiamo utilizzato campioni di sperma bovino scongelato, incubati per 2 ore con diverse concentrazioni di CPF (5, 10, 25, 50µg /ml). Sono stati, poi, valutati i vari parametri funzionali degli spermatozoi trattati: motilità, tassi di fecondazione *in vitro*, frammentazione del DNA e alterazioni della cromatina, pattern di metilazione.

La motilità totale e progressiva è risultata significativamente ( $p < 0.05$ ) ridotta negli spermatozoi esposti alle concentrazioni 10, 25,50 ug/ml di CPF mentre la frammentazione del DNA e la putativa destrutturazione della cromatina sembrano aumentare significativamente ( $p < 0,05$ ) solo alle concentrazioni di CPF più alte ( $> 10$  ug / ml). Inoltre, la capacità di fecondazione *in vitro* e la percentuale di embrioni 8 cellulari sono significativamente ridotte a 50 mg/ml di Chlorpirifos rispetto al controllo.

La valutazione del livello di metilazione globale del DNA spermatico, effettuata alle concentrazioni di 10 e 25 ug/ml di CPF, non ha, invece, mostrato differenze tra i gruppi trattati e i gruppi controllo. Per confermare e approfondire i risultati ottenuti dall'analisi del pattern generale di metilazione, sono stati scelti e analizzati 2 geni, XIST e GNAS, noti per essere sottoposti ad imprinting nell'uomo e nel topo.

In particolare, sono state analizzate 10 isole CpG per il promotore di XIST e 22 isole CpG per il promotore di GNAS. Mentre, le regioni regolative di GNAS non hanno mostrato variazioni significative nel livello di metilazione, il promotore di XIST ha mostrato un aumento significativo della metilazione nel DNA spermatico trattato con 10ug/ml di CPF.

Il presente studio, condotto *in vitro*, dimostra, quindi, come basse dosi di CPF possano compromettere la qualità dello sperma, alterandone sia i parametri fisiologici che provocando un effetto genotossico. Il potenziale di fertilità maschile ne risulta chiaramente ridotto.

## **Conclusioni**

Sulla base dei nostri risultati sperimentali, è, dunque, possibile ipotizzare che, soggetti esposti cronicamente al Chlorpirifos, pur non mostrando evidenti segni di tossicità, possano riportare una serie di alterazioni che li rendono più suscettibili allo sviluppo di patologie diverse, quali disordini neurologici e riproduttivi. Infine, i geni, i cui livelli di espressione si alterano durante l'esposizione al CPF, potrebbero essere utilizzati come marcatori per monitorare precocemente il danno indotto dal pesticida.

# **Capitolo 1:**

# **Introduzione**

## **1.1 I PESTICIDI**

E' definito pesticida dalla United States Environmental Protection Agency (US EPA) “qualsiasi sostanza o miscela di sostanze destinate alla prevenzione, distruzione, repulsione, o attenuazione di ogni tipo di parassita”.

In generale, i pesticidi sono impiegati in diversi settori e per risolvere numerosi problemi che mettono a rischio la salute umana, animale e vegetale. Ovviamente il settore principale in cui sono utilizzati è l' agricoltura, quali dispositivi di controllo delle piante infestanti e per il miglioramento della produzione.

### **1.1.2 Classificazione**

I pesticidi sono classificati in base a criteri diversi:

- destinazione d'uso (agente contro cui sono diretti);
- tossicità;
- struttura chimica.

In base alla destinazione d'uso, si distinguono, ad esempio, gli insetticidi (contro gli insetti e artropodi), gli acaricidi (contro gli acari), i rodenticidi (contro i roditori), i molluschicidi (contro le lumache), i nematocidi (contro i vermi), i fungicidi o anticrittogamici (contro funghi e muffe), gli erbicidi, i raticidi, i larvicidi, i repellenti (contro agenti infestanti), i disinfettanti (contro i microrganismi).

La classificazione dei pesticidi in funzione della tossicità è stata, invece, proposta nel 1975 dall'Organizzazione Mondiale della Sanità (WHO). Essa prevede una loro classificazione che utilizza come elemento di riferimento la dose di principio attivo in grado di uccidere il 50% di animali di laboratorio (ratti), cioè la DL50 espressa in mg/kg di peso corporeo; ne derivano 4 classi (Ia, Ib, II e III) di tossicità decrescente, considerando due vie di penetrazione, orale e percutanea.

Il NIOSH (National Institute of Occupational Safety and Health), invece, ha classificato i pesticidi secondo il criterio tossicologico in 3 categorie (I, II e III) di tossicità decrescente, che considerano la DL50 e la possibilità di provocare effetti cutanei (corrosione o irritazione) e corneali (opacità). In Italia, il principale riferimento normativo resta a tutt'oggi il D.P.R. del 3 agosto 1968 n. 1255 "Regolamento concernente la disciplina della produzione, del commercio e della vendita di fitofarmaci e dei presidi delle derrate alimentari immagazzinate in cui i pesticidi sono classificati in 4 classi di tossicità decrescente secondo il criterio della DL50 su parere di una Commissione Consultiva costituita presso il Ministero della Sanità, dai 'tossici' (classe I, simbolo del teschio), ai 'nocivi' (classe II, croce di S. Andrea), a quelli 'da manipolare con prudenza' (classe III), a quelli 'di nocività trascurabile' (classe IV).

I pesticidi possono essere semplici sostanze inorganiche come zolfo, cloro, arsina, arsenicato di rame, bromuro di potassio, oppure composti organometallici, o composti organici volatili come il tetracloruro di carbonio, il bromuro di metile, il naftalene, o composti organici semivolatili come pentaclorofenolo, diazinone, o, infine composti organici non volatili. I pesticidi più comuni sono rappresentati soprattutto dai composti organici semivolatili e dai composti organici non volatili.

La suddivisione dei pesticidi in base alla struttura chimica prevede, infine, tre classi principali: pesticidi organo-alogenati, pesticidi organo-fosforati, pesticidi azotati.

### **1.1.3 Esposizione**

Il numero di pesticidi sul mercato è elevatissimo. Si calcola che ogni anno vengano immesse nella biosfera 250.000.000 di tonnellate di prodotti organici di sintesi tra cui 2.000.000 tonnellate di pesticidi (300.000 t. nella sola Unione Europea). Una serie di studi affermano che almeno il 65% delle terre agricole europea supera abbondantemente il limite di contaminazione stabiliti dalla UE.

Circa il 95% dei pesticidi è utilizzato in agricoltura, mentre un'altra via di esposizione è l'ambiente indoor (ambiente chiuso). Mentre l'utilizzo in agricoltura è strettamente regolato,

negli ambienti indoor non vi è nessun tipo di regolamentazione. Inoltre tali sostanze vengono utilizzate in molti prodotti di uso domestico, ad esempio per preservare il legno, per la protezione delle piante da appartamento, in cucina, nei prodotti per la pulizia e per la disinfezione. Secondo alcuni studi solo una piccola parte di queste sostanze (circa lo 0,1%) raggiunge il bersaglio, il resto produce effetti dannosi sia per l'ambiente che per le persone: intossicazione dei lavoratori del settore (numerosi sono i morti, soprattutto nei paesi sottosviluppati); morte di uccelli e insetti predatori dei parassiti; inquinamento di fiumi, laghi e mari; comparsa di residui tossici nei prodotti alimentari con conseguenze sulla salute dei consumatori; aumento delle resistenze.

L'esposizione ai pesticidi può quindi avvenire attraverso fonti diverse:

- dirette, per chi li usa nelle operazioni agricole;
- indirette, per chi vive o frequenta l'ambiente circostante a quello in cui vengono utilizzati;
- alimentari, quelle a cui potenzialmente si è sottoposti attraverso l'ingestione di alimenti che contengono residui di pesticidi.

Ciò ha determinato la necessità di stabilire dei limiti di tolleranza per i residui di pesticidi presenti negli alimenti. Il livello più alto di residuo per un pesticida legalmente tollerato negli alimenti o nei mangimi (espresso in parti per milione cioè ppm = milligrammi per chilogrammo di prodotto) è definito limite massimo di residuo (LMR). La Commissione europea stabilisce gli LMR per tutti gli alimenti e i mangimi.

### **1.1.3 Gli organofosfati**

Il gruppo degli organofosfati (OPPs) occupa un posto rilevante nel mondo dei pesticidi. Di uso più comune sono il Parathion, Malathion, Metil parathion, Chlorpyrifos, Diazinon, Dichlorvos. I pesticidi fosforati sono caratterizzati dalla presenza nella molecola di un gruppo fosforico variamente sostituito (alchil e/o aril fosfati, pirofosfati, tiofosfati e ditiofosfati). Queste sostanze svolgono prevalentemente azione d'insetticida. Le motivazioni che hanno portato ad un loro così largo utilizzo sono varie: i) questi pesticidi sono stati introdotti in commercio in sostituzione dei

“persistenti” organoclorurati, per limitare i danni all’ambiente, ii) il loro vasto spettro di azione permette di controllare diverse specie di insetti utilizzando un unico prodotto, iii) gli insetti stessi non hanno ancora sviluppato resistenza come per altri pesticidi, iv) sono economici.

Dal punto di vista ambientale, a differenza degli organoclorurati, la maggior parte di questi pesticidi subisce normalmente reazioni di degradazione enzimatica, chimica, o processi di volatilizzazione etc. per cui vengono eliminati dai vegetali piuttosto rapidamente e non rimangono per molto tempo nell'ambiente, se il trattamento è eseguito secondo le regole (Wheeler, 2002). Nonostante ciò non si possono escludere per alcuni di loro fenomeni di persistenza nell’ambiente. Infatti esteri fosforici e loro derivati sono stati ripetutamente identificati anche nelle acque superficiali sia in Italia che in altri paesi. Dato il loro ampio uso, tutti gli individui sono costantemente esposti. (EPA)

L’azione degli organofosfati si esplica principalmente a livello del sistema nervoso. Gli antiparassitari di questo tipo inibiscono stabilmente l’attività enzimatica dell’acetilcolinesterasi (AChE), enzima che catalizza la degradazione della acetilcolina (ACh), a livello sinaptico.

Il conseguente accumulo di ACh a livello del vallo sinaptico provoca una continua stimolazione dei suoi recettori postsinaptici, muscarinici e nicotinici con l’insorgenza di una sintomatologia complessa. In particolare, l'accumulo di ACh può determinare effetti sui recettori muscarinici delle fibre postgangliari parasimpatiche che si manifestano con sintomi respiratori (senso di oppressione toracica, tosse, cianosi, ipersecrezione bronchiale e broncospasmo), gastroenterici (scialorrea, nausea, vomito, diarrea, dolori addominali), cardiocircolatori (ipotensione arteriosa, bradicardia), urinari (incontinenza urinaria), oculari (miosi, disturbi dell’accomodazione) e iperidrosi.

Effetti sui recettori nicotinici sono dovuti, invece, all'accumulo di ACh a livello delle terminazioni nervose dei muscoli scheletrici e a livello delle fibre pregangliari simpatiche e parasimpatiche e consistono in tremori (in particolare tremore linguale,) fascicolazioni, paralisi, crampi, tachicardia, ipertensione arteriosa. Sul sistema nervoso centrale è possibile osservare un

quadro che va dal rallentamento decisionale e motorio (per basse dosi), fino a diminuzione dello stato di coscienza, convulsioni, apnea, morte (per dosi più elevate).

Numerosi organofosfati vengono convertiti, inoltre, rapidamente nel fegato da tioni ad oxoni più tossici, che danno luogo a cataboliti alchilfosfati e fenolici, prontamente eliminati con le urine.

## 1.2 IL CHLORPYRIFOS

Il Chlorpyrifos è un' insetticida organofosfato ampiamente utilizzato in ambito agrario (Betancourt and Russell, 2003).

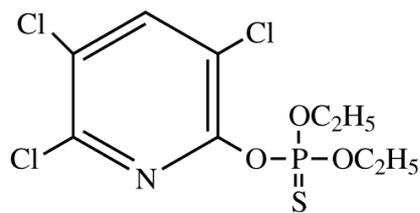


Figura 1.1 : molecola di Chlorpyrifos

Ha una relativamente breve emivita biologica (circa 24 ore nel sangue e 60 nel grasso), non si accumula nel corpo ma si trasforma in Chlorpyrifos oxon, circa 3000 volte più dannoso nei confronti del sistema nervoso. La tossicità in vivo del Chlorpyrifos è il risultato della sua bioattivazione attraverso il citocromo P450 (Figura 1.2) mediato da mono-ossigenasi verso un più potente inibitore, dato appunto dalla forma ossonica. La reazione di ossidazione, che procede attraverso un possibile intermedio, può portare sia ad una reazione di desulfurazione, che genera il composto ossonico, sia ad una reazione di dearilazione, che degrada il composto parentale. Queste reazioni avvengono nel fegato ( Cole et al., 2011).

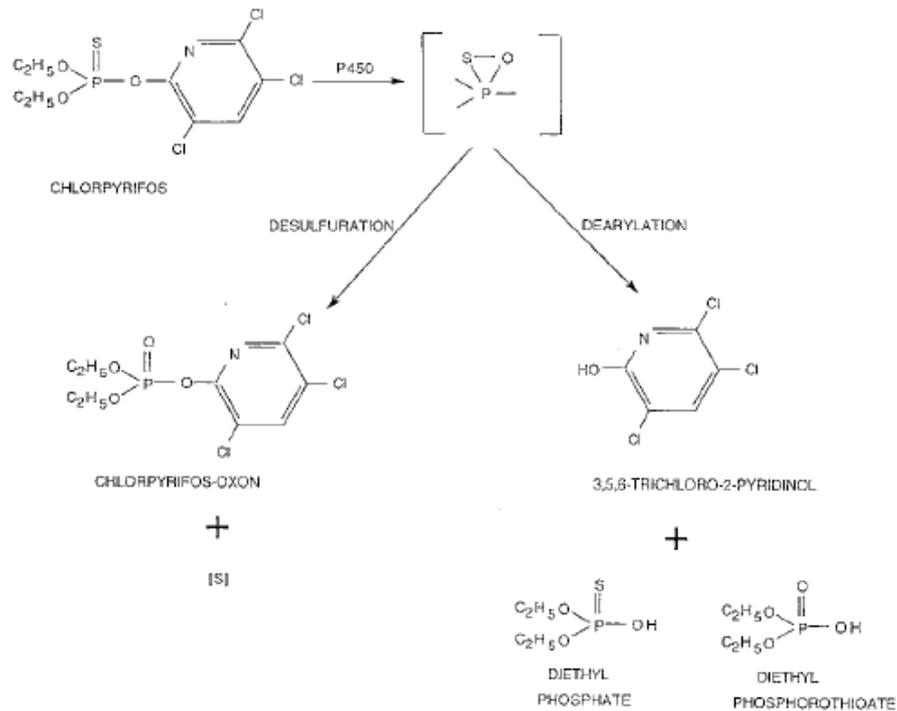


Figura 1.2 : metabolismo del Chlorpyrifos dipendente dal citocromo P450

Da anni ormai si conosce la pericolosità del pesticida Chlorpyrifos tanto che la U.S. Environmental Protection Agency ne ha bandito l'uso domestico. Il Chlorpyrifos infatti, come tutti i pesticidi organofosforici, è un inibitore dell'acetilcolinesterasi, enzima che controlla i livelli del neurotrasmettitore acetilcolina nel sistema nervoso centrale e periferico. In Italia il Chlorpyrifos e il Chlorpyrifos-methyl, da soli o in miscela con altre sostanze, sono tra gli insetticidi più usati e sono presenti in oltre 50 insetticidi commerciali di cui ogni anno si vendono 1.700.000 chilogrammi, largamente utilizzati, in case, ospedali, giardini pubblici, in campo agricolo e per le irrorazioni adulticide contro insetti striscianti e volanti. Inoltre i prodotti che lo contengono, se diffusi nell'ambiente, rappresentano un rischio per gli ecosistemi acquatici.

### 1.2.1 Esposizione al CPF

Un numero crescente di dati raccolti nel decennio passato sostiene la neurotossicità degli OP, ed in particolare del più utilizzato di essi, il CPF. La maggior parte degli utilizzi non agricoli del

CPF, come l'utilizzo indoor per il controllo degli insetti, sono stati vietati negli Stati Uniti nel 2001 (EPA, 2002) e in Europa nel 2005 (Commission Regulation (EC), 2007). Tuttavia il CPF rimane di gran lunga l'OP più utilizzato in agricoltura in Europa (Bjorling-Poulsen et al., 2008, Venerosi et al., 2015) e ciò è motivo di preoccupazione per gli effetti di deriva (legati al vento) che possono provocare elevate concentrazioni di questo pesticida nell'aria, nella polvere delle abitazioni e nel suolo, inoltre a causa della sua persistenza nei sedimenti il CPF rappresenta un pericolo per i fondali marini (Di Lonardo et al., 2012).

Il contatto con il CPF può avvenire in diversi modi: attraverso l'ingestione di cibi contaminati o ingestione secondaria di polveri e terreni contaminati, mediante l'inalazione di aerosol o vapori ed infine per mezzo dell'assorbimento cutaneo in seguito al contatto del pesticida con la pelle (Eaton et al., 2008). L'esposizione agricola è la causa più frequente di avvelenamento da CPF, ma, in generale, chiunque sia coinvolto nella produzione, formulazione, trasporto e l'applicazione di queste sostanze è a rischio se non segue le dovute precauzioni. Episodi di avvelenamento si verificano spesso tra i lavoratori che si recano nei campi per il raccolto quando non è ancora trascorso il tempo necessario affinché la persistenza del pesticida si sia ridotta sotto una soglia di sicurezza. Altre occupazioni a rischio sono i lavoratori che esercitano nel campo del controllo dei parassiti, i guardiani delle tenute agricole, i veterinari e gli addetti alla pulizia degli animali. L'esposizione accidentale del pubblico può verificarsi in prossimità di campi irrorati (ISPRA 2015), infatti nelle aree agricole caratterizzate da un ampio impiego di CPF le concentrazioni corporee di questo pesticida sono più elevate della norma e si è osservato che l'esposizione cronica al CPF attraverso l'aria è correlata anche a malattie autoimmuni (Thrasher et al., 2002).

Gli avvelenamenti causati da queste sostanze si verificano con una maggiore incidenza nei paesi meno sviluppati a causa della scarsa istruzione sulla tossicità, di minori controlli e di scarsa regolamentazione per la loro fabbricazione e uso. Sebbene l'assorbimento cutaneo o per inalazione siano i meccanismi più comuni di contaminazione per i lavoratori esposti a tale pesticida, l'ingestione attraverso la dieta è il meccanismo predominante con cui la popolazione

mondiale viene esposta al CPF (Eaton et al., 2008), di fatto ricorrendo ad una dieta a base di prodotti provenienti da agricoltura biologica, è stata osservata una riduzione dei livelli dei metaboliti degli OP (Loui et al., 2008).

Il CPF, in quanto lipofilico, può attraversare rapidamente la placenta e raggiungere il feto (Hunter et al., 1999), può inoltre concentrarsi nel latte materno, infatti uno studio in India ha evidenziato che il livello di CPF nel latte umano raggiungeva concentrazioni di 0.23mg/L, ciò significa che la quantità giornaliera di CPF assunta dai neonati mediante l'allattamento raggiungeva circa  $\approx 0.041$ mg CPF/kg, un livello 4.1-volte il limite massimo stabilito dall'Organizzazione Nazionale della Salute (Sanghi et al., 2003). Queste evidenze risultano quindi preoccupanti dato che studi recenti hanno suggerito che i feti, gli infanti e i bambini possano essere più suscettibili degli adulti alla tossicità degli OP (Mansour and Mossa., 2011).

### **1.2.2 Tossicità del CPF: Neurotossicità**

Studi in vivo e in vitro su modello animale murino, hanno evidenziato diversi effetti negativi del CPF. Essi includono: la riduzione della sintesi proteica (Dam et al., 1998; Whitney et al., 1995), il decremento del numero di cellule cerebrali durante l'embriogenesi (Campbell et al., 1997), inibizione dell'attività adenilato ciclasica (Auman et al., 2000; Song et al., 1997), decremento dei livelli di RNA (Johnson et al., 1998) e dell'attività colinacetiltransferasi (Dam et al., 1999), ed infine riduzione del legame dei fattori di trascrizione al DNA (Crumpton et al., 2000).

Sebbene il CPF sia associato principalmente ad alterazioni del segnale colinergico, l'inibizione dell'AChe non è sufficiente a spiegare tutti gli effetti di questo pesticida sul sistema nervoso centrale (Slotkin, 1999).

La relazione tra il danno cellulare indotto dal CPF e l'inibizione delle colinesterasi non è completamente chiara nello sviluppo cerebrale (Betancourt et. Carr, 2004). È stato suggerito che, gli effetti del CPF nel cervello, durante il primo periodo postnatale, possano essere mediati da meccanismi non-colinesterasici, come ad esempio, l'aumento della concentrazione dei ROS, in

quanto il CPF è stato associato all'induzione di stress ossidativo con conseguente accumulo di lipidi perossidati (LPO) in diversi organi (Mansour and Mossa, 2009, 2010a, 2011; Verma et al., 2007; Yu et al., 2008), in particolare il cervello risulta essere molto vulnerabile allo stress ossidativo a causa dell'alto tasso di consumo di ossigeno e della presenza di un elevato contenuto lipidico (Auman et al., 2000; Campbell et al., 1997; Crumpton et al., 2000; Dam et al., 1998, 1999;; Song et al., 1997; Whitney et al., 1995). Nonostante ciò, l'inibizione dell'attività dell'acetilcolinesterasi dev'essere considerata un'importante componente nella valutazione della tossicità da CPF (Betancourt e L. Carr, 2004).

Studi recenti suggeriscono che il CPF potrebbe agire anche in altri sistemi di neurotrasmissione, in particolare sulla serotonina (5-HT) (Chen et al., 2011) e sulla dopamina, monoamine conosciute per essere implicate, in caso di alterazioni, nell'insorgenza di disturbi comportamentali. (Chen et al., 2011; Aldridge et al., 2005). Infatti, il CPF è in grado di ridurre i livelli delle suddette monoamine, attraverso l'aumento dello stress ossidativo, a livello dello striato, del *nucleus accumbens* e dell'ippocampo (Dodd e Klein, 2009; Aldridge et al., 2005; Moreno et al., 2008), regioni dell'encefalo deputate rispettivamente alla regolazione del movimento e della funzione esecutiva, all'elaborazione delle sensazioni di piacere e paura e al corretto funzionamento della memoria a lungo termine e all'orientamento nello spazio. Studi su ratti esposti a CPF hanno rilevato infatti uno stato di ansia nel test EPM (elevated plus-maze) che potrebbe essere attribuito alla perdita della funzione sinaptica della serotonina, la quale svolge un ruolo fondamentale nell'insorgenza della depressione (Aldridge et al., 2005). Inoltre, sono state condotte misurazioni dei livelli di tre proteine sinaptiche correlate alla serotonina: 5-HT<sub>1A</sub> e 5-HT<sub>2C</sub>, recettori postsinaptici, e SERT, un trasportatore presinaptico. I livelli proteici di tutte le molecole esaminate sono risultati ridotti in seguito all'esposizione a CPF (Slotkin et al., 2005; Aldridge et al., 2005).

Recenti studi mostrano inoltre, che l'esposizione a CPF riduce i livelli di dopamina, anche se in minor misura rispetto alla serotonina (Aldridge et al., 2005). È stato visto che bassi livelli di CPF

sono sufficienti ad influenzare il metabolismo della dopamina nell'ippocampo, (Aldridge et al., 2005) mentre a livello del nucleus accumbens i livelli di dopamina decrescono solo in seguito ad un'acuta intossicazione da CPF (Moreno et al., 2008).

Studi in vivo e in vitro su modello murino hanno mostrato che il CPF è in grado di attaccare direttamente la glia (Garcia et al., 2001,2005; Crumpton et al., 2000). La glia, o neuroglia, è la maggiore componente cellulare del sistema nervoso, costituita da astrociti, oligodendrociti, cellule di Schwann, e microglia. Le cellule della glia, oltre a fornire sostegno ai neuroni, controllano l'ambiente cerebrale, partecipano alla formazione della barriera ematoencefalica e della guaina mielinica, assicurano la protezione delle cellule nervose da agenti estranei o traumi. Il ruolo fondamentale della glia nello sviluppo e nel funzionamento del sistema nervoso è testimoniato dal loro coinvolgimento in molte importanti neuropatologie. In seguito a trattamento con CPF, sono state infatti evidenziate alterazioni del filamento intermedio chiamato proteina fibrillare acida della glia (GFAP) e della proteina basica della mielina (MBP), marcatori di astrociti e oligodendrociti, così come dei marcatori neuronali, i neurofilamenti NF68 and NF200, che hanno condotto a difetti della maturazione degli astrociti, ipomielinizzazione e alterato sviluppo assonale (Garcia et al., 2002, 2003).

Alcuni studi in vitro, hanno dimostrato inoltre che il CPF e il CPO inducono apoptosi dei neuroni nel sistema nervoso centrale. L'apoptosi è il culmine della tossicità data dal CPF nel sistema nervoso centrale e avviene indipendentemente dall'inibizione dell'AChE. Il CPF attiva tre famiglie di MAP chinasi pro-apoptotiche, ERK1/2, JNK e p38, attivate oltre che da composti chimici tossici anche dallo stress ossidativo. Si ritiene che l'incremento di fenomeni di apoptosi sia uno dei fattori che aumenta la predisposizione a malattie neurodegenerative come il Parkinson (Caughlan et al., 2004).

In esperimenti su colture di tessuto cerebrale bovino il CPF e il CPO si sono dimostrati capaci di influenzare la chinesina, interrompendo il trasporto chinesina-dipendente sui microtubuli. Il movimento chinesina-dipendente di vescicole, organelli, e altri componenti cellulari lungo i

microtubuli è fondamentale per l'organizzazione di tutte le cellule eucariotiche, in particolare nei neuroni, dove organelli e proteine sintetizzate nel corpo cellulare devono muoversi lungo gli assoni fino ai siti pre-sinaptici nelle terminazioni nervose. La perturbazione del trasporto intracellulare chinesina-dipendente potrebbe spiegare alcuni degli effetti del CPF sul sistema nervoso centrale e periferico (Gearhart et al., 2007).

In studi recentissimi, l'esposizione a CPF di cellule progenitrici neuronali umane, ha dimostrato che questo pesticida è capace di indurre alterazioni epigenetiche, in particolare sono stati rilevati cambiamenti nello stato di fosforilazione, acetilazione e metilazione dell'istone H3 oltre che cambiamenti nei livelli di espressione di proteine coinvolte nel differenziamento neuronale e di markers di stress cellulare (Kim et al., 2016).

### **1.2.3 Effetti del CPF sull'apparato riproduttivo maschile**

La qualità del liquido seminale è un parametro importante per predire la capacità fecondante degli spermatozoi e rappresenta un indice sensibile per studiare gli effetti di una varietà di fattori chimici e fisici sui gameti (Aitken et al., 1984). Studi in vivo sul modello animale murino hanno evidenziato che il CPF riduce in maniera significativa la qualità del seme. Decrementi significativi del numero e della motilità spermatica e incrementi delle anomalie morfologiche degli spermatozoi sono stati dimostrati in ratti esposti a CPF. (Sai et al 2014). Risultati simili sono stati ottenuti utilizzando altri pesticidi OP (Bardin et al., 1988; Sinha et al., 1995). L'analisi istopatologica dei testicoli ha mostrato atrofia dei tubuli seminiferi e una diminuzione delle cellule germinali, dimostrando che il CPF può indurre gravi difetti nella spermatogenesi. (Sai et al., 2014). In questo processo l'attività di alcuni enzimi presenti nel testicolo è un fattore importante per la maturazione degli spermatozoi. L'LDH è enzima localizzato principalmente nei tubuli seminiferi ed è coinvolto nel metabolismo energetico e nella maturazione dell'epitelio seminifero (Hong-Wei and Ai-Guo, 2002). LDH-x è un'isoforma dell'LDH, ed è localizzato nei mitocondri degli spermatozoi, la sua funzione è metabolizzare l'acido lattico secreto dalle cellule

del Sertoli per fornire energia per la formazione degli spermatozoi e mantenerne l'attività e le capacità motorie (Mori et al., 1992). È stato osservato in ratti esposti a concentrazione di CPF pari a 5.4 e 12.8 mg/kg un aumento notevole dell'attività dell'LDH e LDH-x, una diminuzione dei livelli di Testosterone e un aumento dell'FSH (Sai et al., 2014). Esperimenti in vivo in ratti albini hanno mostrato che l'esposizione al CPF non produce effetti sul peso dell'animale ma riduce significativamente le dimensioni dei testicoli. Il CPF ha causato inoltre una diminuzione del numero degli spermatozoi sia nell'epididimo che nei testicoli e una diminuzione delle concentrazioni di testosterone e di acido sialico rispettivamente nel siero e nei testicoli, ed una riduzione delle concentrazioni testicolari di glicogeno (Joshi et al., 2007).

Secondo alcuni studi Il CPF potrebbe essere in grado di modulare in vivo la fosforilazione di differenti protammine nucleari in spermatozoi di ratti influenzando negativamente la riproduzione (Kadavil et al., 2001).

Analisi di liquido seminale umano hanno constatato una correlazione significativa tra la presenza del metabolita TCPy nelle urine e una diminuita produzione di testosterone così come un decremento della qualità seminale, in termini di velocità rettilinea e concentrazione spermatica (Meeker et al., 2006, 2004 e 2010). Inoltre uno studio condotto su lavoratori messicani esposti a OP ha trovato una correlazione tra la presenza di alcuni metaboliti del CPF nelle urine e una riduzione degli ormoni FSH (ormone follicolo stimolante) e LH (ormone luteinizzante), portando a supporre, insieme a risultati ottenuti mediante esperimenti condotti sugli animali, che l'esposizione agli OP comporti l'alterazione dell'asse ipotalamo-ipofisi-gonadi (Recio et al., 2005), di fatto il CPF si colloca tra i cosiddetti interferenti endocrini (Ventura et al., 2016), ovvero agenti esogeni che influenzano la sintesi, la secrezione, il trasporto, il legame, l'azione o l'eliminazione di ormoni naturali che sono responsabili dell'omeostasi, della riproduzione e dello sviluppo. Gli ormoni agiscono a concentrazioni molto basse, di fatto gli interferenti endocrini spesso non seguono il classico effetto dose-dipendente e a basse dosi possono provocare effetti peggiori che ad alte dosi.

Oltre ad influenzare la produzione ormonale e la motilità, il CPF influenza i parametri cinetici, uno studio effettuato in vitro su spermatozoi di bufalo, ha evidenziato infatti che l'esposizione a concentrazioni pari a 1.0 e 0.5 ug/ml riduce significativamente la velocità spermatica lineare (VSL) (Selvaraju et al., 2011).

In bufalo il CPF potrebbe alterare la fertilità attraverso danni all'acrosoma. Esperimenti in vitro hanno infatti evidenziato che l'esposizione al CPF riduce l'integrità dell'acrosoma. Durante la fecondazione, gli spermatozoi devono mantenere intatta la membrana cellulare, fondamentale per l'interazione con l'ovocita e la reazione acrosomale. Il mantenimento di una fertilità ottimale dipende dall'integrità strutturale e biochimica dell'acrosoma, che contiene gli enzimi necessari per penetrare la zona pellucida e fecondare l'ovulo (Selvaraju et al., 2011).

Inoltre, esperimenti in vitro condotti sempre nei bufali, hanno dimostrato che il CPF a basse dosi (0.05 ug/ml) influenza il potenziale di membrana mitocondriale (Selvaraju et al., 2011). Un elevato potenziale di membrana mitocondriale è correlato ad un aumento della motilità e dei tassi di fecondazione nell'uomo (Kasai et al., 2002) e in bufalo (Selvaraju et al., 2008). Al contrario, una diminuzione del potenziale di membrana definisce uno stadio apoptotico precoce (Marchetti et al., 2002).

#### **1.2.4 Effetti del CPF sull'apparato riproduttivo femminile e sullo sviluppo embrionale**

Nel liquido follicolare di diversi mammiferi sono state ritrovate concentrazioni di pesticidi nell'ordine di parti per trilione e parti per milione, che sono strettamente correlate alle concentrazioni presenti nel siero. (Trapp et al., 1984; Younglai et al., 2002; Kamarianos et al., 2003). Alcuni pesticidi possono agire da interferenti endocrini, portando ad effetti negativi sul sistema riproduttivo attraverso la distruzione dell'equilibrio ormonale necessario per il mantenimento della fertilità. L'esposizione ai pesticidi è stata infatti associata a disturbi del ciclo riproduttivo, prolungamento del tempo richiesto per ottenere una gravidanza, aborti spontanei, morte endouterina fetale, anomalie strutturali, alterazioni della crescita e deficit strutturali in

mammiferi, soprattutto ratti. (Bretveld et al., 2008). Questi problemi riproduttivi potrebbero essere associati ad alterazioni del ciclo ovarico (Bretveld et al., 2006; Pocar et al., 2006). Studi in vivo su pecora hanno dimostrato che il CPF influenza le concentrazioni sieriche di ormoni metabolici e sessuali (Rawlings et al., 1998). Inoltre esperimenti condotti su ratti albini, hanno evidenziato, in seguito a somministrazione orale di CPF, alterazioni del ciclo riproduttivo con una soppressione dell'estro e un metaestro prolungato, un ingrossamento delle ghiandole mammarie, un incremento significativo dello spessore dell'epitelio della superficie ovarica e uterina e un aumento del diametro e dell'atresia follicolare. Tali risultati hanno fatto pensare che l'esposizione sub-cronica al CPF causi stress ossidativo ed effetti negativi sugli organi riproduttivi femminili, effetti che potrebbero portare ad un aumento dell'incidenza di cancro. (Nishi et Hundal, 2013).

Esperimenti in vitro condotti su ovociti di bufalo hanno mostrato che il CPF già a concentrazioni pari a 0.02 ug/ml ha effetti ovo ed embriotossici, mentre a concentrazioni di 10 ug/ml determina una totale degenerazione degli embrioni (Nandi et al., 2011). Infatti, l'esposizione al CPF ha determinato una riduzione della maturazione e vitalità ovocitaria ed una conseguente riduzione di competenza allo sviluppo, in maniera dose-dipendente, alterando le concentrazioni di proteine totali, calcio e fosforo. La riduzione della maturazione ovocitaria è da attribuire ad un effetto del CPF diretto sugli ovociti, ad un'azione mediata dalle cellule del cumulo ooforo e al blocco dell'azione di alcuni ormoni (Nandi et al., 2011). La possibile spiegazione per la riduzione nei tassi di maturazione degli ovociti esposti al pesticida potrebbe essere la distruzione del fuso meiotico (Picard et al., 2003) o difetti funzionali delle cellule del cumulo ooforo che portano a una riduzione dei livelli ovocitari di cAMP e glutazione (Tiemann,2008).

Tuttavia è stato osservato che la somministrazione orale di 3 e 15 mg/kg al giorno di CPF (dosi tossiche per la madre) in ratti è risultata non letale per gli embrioni, non fetotossica, non teratogena e non ha presentato effetti negativi sulla fertilità o la struttura degli organi riproduttivi. (Breslin et al., 1996). Infatti, in seguito alla somministrazione orale di CPF a

femmine di ratto gravide, non sono stati mostrati difetti nello sviluppo del feto. Ciononostante sono stati osservati degli effetti sulla crescita neonatale e la sopravvivenza dei nati. (Breslin et al., 1996).

### **3. SCOPO DEL LAVORO**

Mentre sono abbastanza noti gli effetti, provocati nell'uomo dall' esposizione acuta al CPF, indoor e nell'ambiente di lavoro, scarse sono le conoscenze sugli effetti dell'esposizione cronica al pesticida. In generale, gli effetti cronici possono manifestarsi anche dopo un lungo periodo di esposizione risultando estremamente difficili da correlare con l'eventuale comparsa di patologie. In particolare, studi sempre più numerosi, indicano come l'esposizione cronica a basse quantità di pesticidi, principalmente introdotti nell'organismo con l'alimentazione, possa determinare nel tempo alterazioni al sistema nervoso o riproduttore degli organismi, predisponendoli, con il tempo all'insorgenza di gravi patologie e/o sterilità.

Per quanto riguarda il Chlorpyrifos, inoltre, approfondite analisi hanno permesso di identificarne concentrazioni elevate in numerosi campioni alimentari con (Legambiente). Ci determinerebbe quindi un'esposizione reale almeno 10 volte superiore ai LMR (limite massimo di residuo) del Chlorpyrifos. Senza considerare il fatto che, il CPF, non si trova soltanto sul cibo, ma è contenuto in moltissimi prodotti utilizzati per l'igiene della casa, insetticidi e detersivi per il legno, e inoltre è presente sui nuovi collari antiparassitari dei più comuni animali domestici.

In questo ambito si inserisce il mio progetto di dottorato. Lo scopo è stato quello di analizzare e di meglio comprendere i possibili effetti dell'esposizione al Chlorpyrifos sul sistema nervoso di *Xenopus laevis* e *Mus musculus* e sul sistema riproduttivo di *Bos taurus*.

In particolare ho analizzato 3 aspetti dell'esposizione al CPF :

1. Effetti sullo sviluppo embrionale, in particolare la neurogenesi degli organismi acquatici, usando come organismo modello l'anfibio *Xenopus laevis*.

2. Eventuali danni a carico del sistema nervoso in seguito ad esposizione cronica in utero e dopo la nascita nei vertebrati terrestri, usando il mammifero *Mus musculus*.
3. Possibili problemi a carico degli spermatozoi e valutazione degli effetti sul tasso di fecondazione nei mammiferi, usando *Bos taurus*.

## **Capitolo 2:**

**Effetti sullo sviluppo embrionale, in particolare la neurogenesi degli organismi  
acquatici, usando come organismo modello l'anfibio *Xenopus laevis***

## **2.1 MATERIALI E METODI**

### **2.1.1 Fecondazione in vitro *Xenopus Laevis***

Per studiare gli effetti del CPF sugli embrioni di *X. laevis*, è stata effettuata una fecondazione *in vitro*, ottenendo così gli embrioni che verranno poi messi a contatto con il Chlorpyrifos dallo stadio di 4-8 cellule.

Circa 16 ore prima dal prelievo delle uova, gli esemplari femmina sessualmente mature sono state iniettate, nel sacco linfatico dorsale, con 500 unità di GONASI HP (AMSA) per favorire la maturazione degli ovociti. Le uova sono state posti in piastre di Petri, e sono state inseminate immediatamente dopo la deposizione. A tal scopo sono state esposte a sperma di *Xenopus*, ottenuto sminuzzando i testicoli prelevati da maschi maturi in 1-2 ml di RINGER (111 mM NaCl, 1.3 mM CaCl<sub>2</sub>, 2 mM KCl, 0.8 mM MgSO<sub>4</sub>, in 25 mM Hepes, pH 7.8). Dopo 10 minuti dall'aggiunta dello sperma si aggiungono 30 ml di soluzione FETAX (Frog Embryo Teratogenesis Assay—*Xenopus*) a temperatura ambiente. Le uova fecondate vengono quindi prelevate e preparate per la degelatinazione, ovvero la rimozione della gelatina che le riveste. Questa procedura, viene condotta utilizzando una soluzione di 100ml di RINGER a ph 9 a cui è stato aggiunto 0.3% di β-mercaptoetanololo, noto agente riducente dei ponti disolfurici. La soluzione di degelatinamento è poi allontanata e sostituita da soluzione FETAX .

### **2.1.2 Crescita degli embrioni a contatto con il Chlorpyrifos**

Gli esperimenti di allevamento di embrioni in CPF sono stati effettuati utilizzando il protocollo FETAX (*Frog Embryo Teratogenesis Assay: Xenopus*) (Tussellino et al.,2015) modificato per minimizzare i danni da stress da sovraffollamento, in cui 10 embrioni sono stati posti in 400 mL di soluzione FETAX, mentre il protocollo FETAX classico prevede l'allevamento di 20 embrioni in capsule di Petri da 6 cm di diametro. Gli embrioni sono stati lasciati nella soluzione salina e allevati fino al raggiungimento dello stadio 46/47. Il Chlorpyrifos, essendo insolubile in soluzione acquosa, è stato prima sciolto in acetone. Per questa ragione, oltre al controllo classico,

in cui gli embrioni sono stati allevati unicamente in mezzo FETAX, è stato eseguito un secondo controllo in cui, oltre al mezzo FETAX, è stata aggiunta la quantità di acetone (0,02%) corrispondente a quella usata per lo sperimentale. Ciò ha assicurato che gli eventuali effetti non fossero dovuti all'esposizione degli embrioni all'acetone ma all'azione teratogenica del pesticida. Il Chlorpyrifos così sciolto è stato portato alle concentrazioni finali di 5, 10, 15, 20 mg/l. L'esposizione al pesticida è stata portata avanti per 7 giorni ad una temperatura di 21° C. Tutti gli embrioni sono stati fotografati usando lo stereomicroscopio Leica MZ16F UV dotato di Leica DFC 300Fx camera e IM50 Image Manager Software. Allo stadio 40/41 gli embrioni di *X. laevis* iniziano ad aprire la bocca (Nieuwkoop and Faber, 1956) ingerendo e assorbendo il CPF non solo tramite la pelle ma anche tramite ingestione.

### **2.1.3 Analisi statistiche**

Giornalmente è stata seguita la stadiazione dei singoli embrioni (Nieuwkoop and Faber, 1967) e allontanati i morti, fino al raggiungimento dello stadio 46-47 (~ 7 giorni a 21°C). Con questi dati sono stati costruiti dei grafici per valutare la percentuale di mortalità, mortalità nel tempo, e lunghezza del corpo. La significatività dei dati ottenuti, in particolare per il tasso di mortalità e per la percentuale di malformazioni ottenute, è stata analizzata con il Chi square-test, mentre le differenze nei tassi di crescita tra i vari gruppi sono state esaminate con ANOVA. Tutte le analisi sopracitate sono state condotte utilizzando il GraphPad Prism software 6 (San Diego, CA).

### **2.1.4 Fissazione embrioni in MEMFA**

Per la fissazione è stata utilizzata una soluzione di MEMFA contenente formalina al 4%, la soluzione finale è stata ottenuta partendo da soluzioni stock di MEMFA, 10x, e di formalina, 40%. Il MEMFA è costituito, inoltre, da una concentrazione di MOPS pari a 100 mM (3-(N-morfolino) Acido propanesulfonico), un tampone usato per sistemi biologici vicini a pH neutro, di EGTA 20 mM (Acido etilenglicoletraacetico) che agisce come agente chelante, e di MgSO<sub>4</sub> 10 mM. La soluzione viene poi portata a volume con H<sub>2</sub>O mQ e posta in ghiaccio. Quindi si è

proceduto con la fissazione prima sciacquando gli embrioni con PBS sterile per allontanare il FETAX e poi ponendoli in vials di vetro sterili a cui è stato aggiunto 1ml di fissativo, agitando per 1 ora. Conclusa la fissazione, si è proceduto con la disidratazione in etanolo.

#### **2.1.5 Fissazione embrioni in PFA 4%**

Per la realizzazione di altri esperimenti è stato utilizzato come fissativo la paraformaldeide 4% in PBS. A 10 ml di PBS sono stati aggiunti 0.4 gr di PFA, successivamente la soluzione è stata posta nel bagnetto a 60°C per circa 2 ore per permettere lo scioglimento completo della polvere. Questo tipo di fissazione è stata utilizzata in particolare per gli embrioni destinati all'inclusione in paraffina per la quale è necessario effettuare prima una disidratazione (la paraffina è una sostanza apolare quindi è necessario allontanare l'acqua prima dell'inclusione). A tale scopo sono stati fatti una serie di passaggi in etanolo partendo da soluzioni meno concentrate a soluzioni più concentrate. I passaggi di disidratazione sono stati effettuati a 4°C.

#### **2.1.6 Immunofluorescenza *in toto* con anticorpo anti-tubulina acetilata.**

Il primo passaggio è stato il *Bleaching* che serve per allontanare il pigmento in eccesso dagli embrioni. A tale scopo si è preparato una soluzione costituita da una parte di H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (perossido di idrogeno) al 30% e due parti MetOH 100% in cui gli embrioni sono stati tenuti in agitazione a temperatura ambiente, fino a che il pigmento è scomparso (circa 2 giorni). Una volta che gli embrioni si sono scoloriti la soluzione di bleaching è stata sostituita da metanolo al 50% diluito in PBS per 15 minuti e poi in metanolo 30% in PBS per lo stesso tempo e infine in PBS. In questo modo gli embrioni sono stati reidratati. A questo punto:

-è stato eseguito uno sciacquo in PBS a T. ambiente.

-è stata effettuata poi una reidratazione attraverso 2 lavaggi in PBS già freddo (di 20 minuti ciascuno) a 4 °C.

-si è proceduto, quindi, con l'incubazione in anticorpo primario (mouse anti-CH1\_tropomyosin muscle, Developmental Studies Hybridoma Bank at the university of Iowa) diluito 1:100 in PBS + 0.5% BSA + 0.1% TRITON l'incubazione è avvenuta in camera fredda a 4°C per 16-36 ore.

-sono stati eseguiti lavaggi in PBS freddo per 24 ore sempre a 4°C mantenendo i campioni in agitazione

-si è proceduto quindi all'incubazione con l'anticorpo secondario diluito in PBS + 0.5% BSA + 0.1% TRITON. L'anticorpi utilizzato per questo passaggio è stato: anti-mouse IgG coniugato a BODYPY, un fluoro cromo che fluoresce nel verde della ditta Molecular Probes, fatto in capra con diluizione 1:200. Poi si è proceduto allo stesso modo, ovvero:

-incubazione in agitazione a 4 °C per 16-36 ore.

-lavaggi in PBS a 4°C in agitazione per 24-48 ore.

Quindi si è proceduto alla disidratazione in metanolo effettuata sempre in camera fredda. Gli embrioni sono stati, quindi, conservati a 4°C fino all'osservazione allo stereomicroscopio a fluorescenza (Leica MZ 16F) prima della quale gli embrioni hanno subito un trattamento di chiarificazione con una soluzione costituita da 2 parti di benzil benzoato e una parte di alcol benzilico.

Durante questi passaggi (dopo l'aggiunta dell'anticorpo secondario) è importante tenere gli embrioni al buio per evitare che la fluorescenza non decada.

### **2.1.7 Colorazione Alcian Blue**

Durante il primo giorno di colorazione è stata preparata la soluzione colorante, sciogliendo l'Alcian blu in una soluzione 80% etanolo assoluto/20% acido acetico, lasciandola in agitazione per circa 1 ora. Al termine del tempo previsto la soluzione è stata filtrata su carta 3 MM. Gli embrioni prima della colorazione sono stati disidratati in etanolo e successivamente in una soluzione 80% etanolo e 20% acido acetico.

A questo punto gli embrioni sono stati colorati con Alcian blu 0.05%. Gli embrioni sono stati lasciati nella soluzione colorante per 6 ore. Passate le ore previste gli embrioni sono stati lavati

con una soluzione 80% etanolo/20% acido acetico e lasciati in questa per 1 ora in agitazione. Al termine del lavaggio è stato fatto un risciacquo in una nuova soluzione 80% etanolo/20% acido acetico lasciando gli embrioni O.N.

Durante il secondo giorno di colorazione è stata preparata innanzitutto una soluzione satura di tetraborato di sodio in acqua (5.7g in 100 ml di H<sub>2</sub>O) ed il cilindro con la soluzione viene messo in agitazione per 1 ora, al termine della quale la soluzione è stata lasciata decantare per mezz'ora per far precipitare il sale non sciolto. A questo punto sono stati prelevati 3 ml di soluzione senza disturbare il fondo, aggiungendoli a una soluzione finale di 1% Idrossido di potassio (KOH) e 3% acqua ossigenata (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) in PBT, infine viene aggiunta Tripsina 0.05% e si lascia in agitazione per 3 ore. Il PBT è una soluzione composta da PBS, una soluzione salina tamponata che permette di mantenere costante il valore del pH, a cui si aggiunge 0.1% Tween 20. A questo punto sono stati eseguiti diversi lavaggi con la soluzione finale al termine dei quali i campioni sono stati messi in una soluzione di PBS O.N. I campioni sono stati quindi fotografati allo stereo microscopio Leica MZ 16F.

### **2.1.8 Inclusione in paraffina e colorazione di Galgano**

Prima di procedere con l'inclusione in paraffina, che è una sostanza apolare, è necessario fare dei passaggi di disidratazione per allontanare l'acqua (sostanza polare) in modo tale da garantire la penetrazione della paraffina nelle cellule degli embrioni. A tale scopo sono stati eseguiti una serie di passaggi in etanolo partendo da soluzioni a concentrazioni minori fino a soluzioni a concentrazioni maggiori ad una temperatura di 4°C.

Essendo anche l'alcol una sostanza polare, deve essere allontanata. Per farlo è stato utilizzato Histolemon, un solvente organico che è stato aggiunto 200 µl alla volta (a temperatura ambiente) e lasciato riposare dopo ogni aggiunta, fino a raggiungere una soluzione 50% Histolemon e 50% Et-OH. Sono stati fatti poi altri tre passaggi: uno in una soluzione 75% di Histolemon e 25% di etanolo assoluto per 15 minuti (a temperatura ambiente); gli altri due passaggi in soluzioni al

100% di Histolemon per 15 minuti ciascuno. Il tessuto così processato è pronto per essere infiltrato con un mezzo di inclusione, che dopo solidificazione, conferirà al tessuto la giusta consistenza per ottenere sezioni sottili. Per la microscopia ottica il mezzo di inclusione utilizzato è la “paraffina”, una miscela di idrocarburi saturi che diventa fluida se riscaldata (a 50°C-60°C), mentre solidifica a temperatura ambiente.

Dopo aver recuperato la paraffina, che è stata lasciata a sciogliere il giorno precedente in una stufa a 60°C e dopo averla filtrata, è stato fatto un passaggio in una soluzione 50% Histolemon e 50% paraffina per 45 minuti a 60°C. A questo punto si sono eseguiti dei passaggi in paraffina assoluta:

-100% di paraffina a 20 minuti a 60°C;

-100% di paraffina per 3 ore oppure O.N. a 60°C;

-100% paraffina per 20 minuti a 60°C;

a questo punto la fase di infiltrazione è stata completata e i blocchetti di paraffina con incluso gli embrioni sono stati lasciati a solidificare a temperatura ambiente. I campioni a questo punto presentano la consistenza idonea per essere tagliati al microtomo in sottili sezioni da poter osservare al microscopio.

Man mano che il campione è stato sezionato, le fette sono state poste su dei vetrini precedentemente posti su una piastra riscaldata alla temperatura di 37°C, sui quali è stata messa qualche goccia di una soluzione acquosa contenete albumina glicerinata (soluzione che permette la distensione delle fette sul vetrino e la loro adesione a quest'ultimo). L'albumina glicerinata è stata preparata prendendo l'albume di un uovo e aggiungendo ad esso un uguale volume di glicerina; dopo aver sbattuto e filtrato la soluzione, l'albumina è stata messa in un una boccetta nella quale è stato aggiunto un granello di canfora al fine di evitare la putrefazione. Infine per ottenere la nostra soluzione utilizzata per il montaggio delle fette sono state aggiunte 8 gocce di albumina glicerinata in 100 ml di acqua distillata (1 goccia di albumina glicerinata per ogni 10 cc

di acqua distillata). Dopo aver così montato le fette sui vetrini, queste sono state poste in una stufa alla temperatura di 37°C e lasciate asciugare per circa 24 ore.

### **2.1.9 Sparaffinatura e idratazione**

Prima di eseguire la colorazione tricromica è stata effettuata la sparaffinatura. La tecnica di sparaffinatura prevede che vengano effettuati due passaggi in histolemon e cinque passaggi in alcool con le seguenti concentrazioni:

- histolemon I per 15 minuti al 100% ;
- histolemon II per 15 minuti al 100% .

Dopo la sparaffinatura si è proceduti all'idratazione delle fette tramite una serie discendente di alcool:

- etanolo 100% (I) per 10 minuti;
- etanolo 100% (II) per 10 minuti
- etanolo 95% per 5 minuti
- etanolo 75% per 5 minuti
- etanolo 50% per 5 minuti

A questo punto si è proceduto con la colorazione tricromia di Galgano.

### **2.1.10 Colorazione tricromia di Galgano**

Dopo aver effettuato un lavaggio in acqua distillata per 5 minuti, sono stati effettuati i passaggi di colorazione che prevedono:

- colorazione con emallume (per colorare i nuclei) per cinque minuti. L'emallume può essere utilizzato più volte.
- lavaggio in acqua distillata con tre passaggi veloci;

-immersione dei vetrini in fucsina acida allo 0,1% per 30 secondi (questo è il tempo ottimale che viene utilizzato per la colorazione delle sezioni di embrioni) per colorare il citoplasma. La fucsina deve essere acidificata con acido acetico glaciale (7-8 gocce per 100cc di fucsina acida);

-passaggio veloce in acqua distillata;

-immersione in acido fosfomolibdico all'1% per 5 minuti;

-differenziazione della fucsina con acqua di fonte, agitando continuamente i vetrini su cui sono poste le sezioni, fino a quando il fondo non si decolora del tutto; la differenziazione è stata poi fermata in acqua acidulata con acido acetico;

-passaggio in acido fosfomolibdico all'1% per 5 minuti e lavaggio in acqua distillata con un passaggio veloce;

-immersione delle sezioni nella miscela di Mallory per un'ora (tempo necessario affinché si colorino i tessuti embrionali).

Quindi i vetrini sono stati asciugati tutti insieme con carta bibula ed è stata eseguita la differenziazione che prevede anche essa vari passaggi in alcool:

-il vetrino è stato tuffato in alcool 95% controllando poi al microscopio che l'eccesso di Mallory sia stato eliminato

-passaggio veloce in alcool 75%

-passaggio veloce in alcool 95% pulito

infine la differenziazione è stata arresta in alcool 100%.

A colorazione conclusa si è proceduto con la chiarificazione e col montaggio dei vetrini. La prima è stata eseguita tramite 2 passaggi in Histolemon (Histolemon I e II puliti) per 5 minuti.

Per il montaggio sui vetrini su cui sono presenti le sezioni sono state poste due o tre gocce della soluzione DPX (un polimero composto da distirene, permount e xilene), che è una resina che si scioglie in un solvente organico come l'Histolemon utilizzato nell'ultimo passaggio della colorazione.

### **2.1.11 Real Time PCR quantitativa.**

Per analizzare gli effetti del CPF sull'espressione genica è stata utilizzata la qRT-PCR che amplifica e quantifica contemporaneamente il cDNA grazie alla presenza nella miscela di amplificazione del SYBBR GREEN. È stato necessario retrotrascrivere l'RNA estratto dagli embrioni per ottenere il cDNA.

#### **2.1.11.1 Estrazione RNA da embrioni stadio 41**

Gli embrioni, allo stadio 40/41, sono stati sospesi in 500µl di Tri-Reagent e conservati a -80°C. Al momento dell'estrazione sono stati aggiunti altri 500µl di Tri-Reagent. Gli embrioni sono stati omogeneizzati in ghiaccio con pestelli opportunamente lavati in NaOH 10M e sciacquati con abbondante acqua mQ. Per ogni eppendorf (controllo e CPF 20mg/L) sono stati utilizzati pestelli diversi. A questo punto è stata eseguita una centrifugata per 10 minuti a 4°C e 13.400 rpm. Dopo la centrifugazione il surnatante è stato recuperato e messo in eppendorf sterili. È stato poi incubato a T ambiente per 5 minuti e successivamente è stato aggiunto cloroformio e agitato vigorosamente per 15 secondi quindi è stato lasciato a T ambiente per 10-15 minuti. Dopodiché è stato ricentrifugato a 12.000rpm per 15 minuti a 4°C. Ottenute così le tre fasi, è stato recuperato il surnatante, facendo attenzione a non aspirare anche la fase sottostante. Sono stati aggiunti poi 50µl di isopropanolo lasciato per 5 minuti a T ambiente, centrifugato nuovamente a 12.000 rpm per 10 minuti a 4°C. Il surnatante è stato recuperato e sono stati aggiunti 450µl di isopropanolo, incubando poi per 10 minuti a T ambiente. A questo punto è stata eseguita una centrifugata per 10 minuti a 4°C ed eliminato il sovratanante. Quello che è rimasto è stato sottoposto ad un passaggio in etanolo 96% e lasciato a -20°C per 2 ore circa passate le quali è stato centrifugato per 10 minuti a 8000 rpm eliminando il surnatante. Il pellet è stato trasferito in stufa a 37°C per far evaporare l'alcool in eccesso. Dopo questo passaggio, il pellet è stato risospeso in 30µl di acqua mQ e conservato a -80°C. La purezza dell'RNA estratto

è stato controllato tramite corsa elettroforetica e quantizzato al *NanoDrop® 1000* (THERMO SCIENTIFIC).

#### **2.1.11.2 Retrotrascrizione**

Il kit utilizzato per la retrotrascrizione è Super Script VILO cDNA Synthesis kit “Invitrogen”.

Per ogni campione sono stati utilizzati 1 $\mu$ g di RNA estratto e il volume finale in ogni eppendorf è stato di 20 $\mu$ l, nelle quali sono presenti due buffer, 1 $\mu$ g di RNA e acqua mQ a volume.

Per far avvenire la reazione i campioni con le miscele sono stati posti in un termociclatore impostato con il seguente programma:

25°C per 10'

42°C per 60'

85°C per 5'

4°C stazionario

#### **2.1.11.3 RT-PCR**

Le sequenze dei primers studiati sono state disegnate con “Primer 3” , un programma disponibile in rete (<http://frodo.wi.mit.edu/primer3>) che a partire dalla sequenza di mRNA del gene specifico, che è possibile trovare sul sito dell'NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez>), fornisce una o più coppie di primer compatibili con la regione da amplificare (Tab.2.1).

La reazione è stata condotta con l'uso del kit Power SYBR® Green Master Mix (Life technologies). La miscela di reazione per l'amplificazione è costituita da 10  $\mu$ l SYBR Green Master Mix 2X, 1  $\mu$ l di ciascun primer senso e antisenso 10 pmol/ $\mu$ l e acqua per portare a volume. Similmente è stata preparata la miscela di reazione per l'amplificazione di odc (ornitina decarbossilasi) che rappresenta il gene normalizzatore. Le quantità necessarie di componenti sono state preparate in appositi tubi di polipropilene sterili e 17  $\mu$ l di reazione sono stati dispensati in ogni pozzetto di una piastra da 96 per Real Time (MicroAmp Optical 96-well

reaction plate, Part number N801-0560, Applied Biosystems). Successivamente 3  $\mu$ l di cDNA da analizzare sono stati aggiunti ad ogni pozzetto per ottenere un volume finale di reazione di 20  $\mu$ l/campione. E' stata allestita una reazione in triplicato per ogni coppia campione-primers. Le condizioni di PCR sono state: 50°C per 2 minuti (step di attivazione dell' enzima), 95°C per 10 minuti (step di denaturazione), 40 cicli di amplificazione ognuno di essi diviso in una fase in cui il campione è stato portato a 95°C per 15 secondi e una fase a 60°C per 1 minuto in cui si ha l' annealing dei primer e una fase a 72°C per 20 secondi in cui si ha l' allungamento del filamento di DNA, infine la melting curve data da 95°C per 1 secondo e 60°C per 10 secondi grazie alle quali è possibile ottenere un'indicazione sulla purezza del prodotto d'amplificazione e informazioni circa l'eventuale formazione di dimeri di primers. La reazione è stata realizzata utilizzando lo strumento ABI Sequence Detection 7500 System (Applied Biosystems). L'espressione relativa dei geni di interesse (*fgf8*, *bmp4*, *egr2*, *hoxa2*, *hoxb2*,) rispetto al controllo è stata determinata con 22DDCt. L'analisi statistica è stata effettuata con il t-tet usando GraphPad Prism 6 software.

Gene Name	Oligo Sequence
bmp4 FOR	CCTCAGCAGCATTCCTAA
bmp4 REV	TCCGGTGGAAACCCTCATCC
egr2 FOR	AGTAAGACCCCAGTCCA
egr2 REV	GCAGTAATCGCAGGCAAAGG
fgf8 FOR	CGTTTGGAAGCAGAGTC
fgf8 REV	GTTGCCTTGTCTTCGACCCT
hoxa2 FOR	CCAAACACAGCCCAAAC
hoxa2 REV	TGCTGTGACTATAGGGGCTT
hoxb2 FOR	AGGATGGAGACGACATCA
hoxb2 REV	CTCAAGCCTGGGTTGGGATT
sox9 FOR	ACGGCGCAGAAAGTCTA
sox9 REV	GACATCTGTCTTGGGGGTGG
odc FOR	GTGGCAAGGAATCACCCGAA
odc REV	TCAAAGACACATCGTGCATC

Tabella 2.1: elenco dei primers utilizzati per le analisi di Real-time PCR.

## 2.2 RISULTATI

### 2.2.1 Mortalità

Il monitoraggio giornaliero dei campioni durante l'esperimento di contatto ha permesso di ottenere dati relativi alla percentuale di mortalità e alla mortalità nel tempo. Per quanto riguarda la mortalità i risultati hanno mostrato che il composto studiato ha effetto letale concentrazione dipendente con il massimo per gli embrioni sottoposti alla concentrazione di 20mg/L (Fig.2.1). Inoltre è stato possibile osservare che la massima percentuale di mortalità, 20%, è stata raggiunta quando gli embrioni si trovavano allo stadio 46-47.

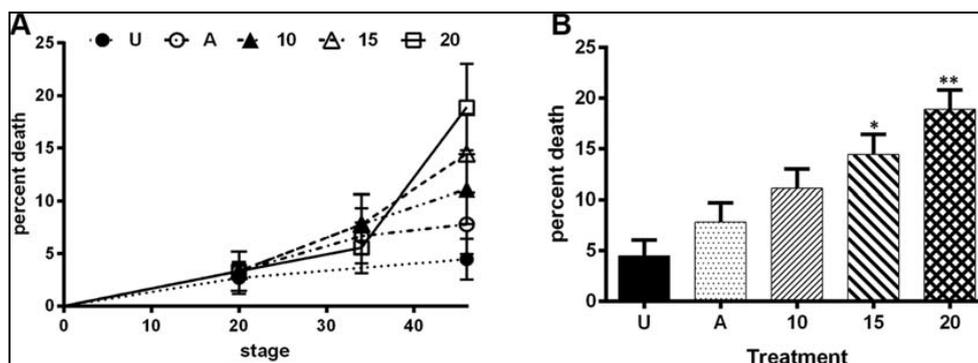


Figura 2.1: A-B Valutazione delle mortalità in embrioni trattati con CPF. (A) Percentuale di mortalità lungo la crescita dei campioni non trattati (U), 0.02% acetone (A) e 10, 15, 20 mg/L CPF (10, 15, e 20). (B). La percentuale di mortalità degli embrioni alla fine dell'esperimento è stata analizzata usando il test ANOVA.

	Untreated	Acetone %	CPF (mg/L)		
		0.02	10	15	20
Utilized embryos (n)	90	90	90	90	90
Dead embryos (n)	5	7	10	13	17
Living embryos (n)	85	83	80	77	73
Mortality (%)	5.56	7.78	11.11	14.44 <sup>a</sup>	18.89 <sup>b</sup>
Malformation (n)	2	2	80	77	73
Malformation (%)	2.41	2.41	100 <sup>c</sup>	100 <sup>c</sup>	100 <sup>c</sup>

Chi square test: a=P<0.05; b=P<0.001,c=P<0.0001

### 3.1.2 Analisi fenotipi

	Untreated	0.02% Acetone	CPF 10 mg/L	CPF 15 mg/L	CPF 20 mg/L
Gut <i>n</i> (%)	2 (1.87)	1 (1.20)	36 (45.00) <sup>b</sup>	63 (81.82) <sup>b</sup>	71 (97.26) <sup>b</sup>
Edema multiple <i>n</i> (%)	0	1 (1.20)	41 (51.25) <sup>b</sup>	59 (76.62) <sup>b</sup>	73 (100) <sup>b</sup>
Head <i>n</i> (%)	0	1 (1.20)	41 (51.25) <sup>b</sup>	59 (76.62) <sup>b</sup>	73 (100) <sup>b</sup>
Tail <i>n</i> (%)	0	0	26 (32.50) <sup>b</sup>	54 (70.13) <sup>b</sup>	71 (97.26) <sup>b</sup>
Fins <i>n</i> (%)	0	0	7 (8.75) <sup>a</sup>	49 (63.64) <sup>b</sup>	71 (97.26) <sup>b</sup>

Tabella 2.2: Percentuali basate sul numero di malformazioni / numero di embrioni vivi. Chi square test: a=P<0.05; b=P<0.001.

Gli embrioni esposti a 10, 15 e 20 mg/L hanno mostrato malformazioni dipendenti dalla concentrazione dipendenti. Allo stadio 46/47 gli embrioni esposti alla concentrazione di 20 mg/L hanno mostrato un fenotipo molto alterato (fig.2.2); infatti è stato possibile notare subito le ridotte dimensioni dell'embrione, code deviate verso l'alto, pigmentazione alterata, edemi estesi su tutto il corpo, soprattutto nella regione rostrale, inoltre le pinne sono apparse sfrangiate sia dorsalmente che ventralmente.



Fig.2.2: osservazione fenotipi. A-E anomalie in differenti parti del corpo degli embrioni trattati con CPF. A-C visione laterale D-E visione ventrale. F-G embrioni non trattati in embrioni in visione ventrale (F) e laterale (G).

Gli embrioni esposti alle tre diverse concentrazioni di CPF, e sopravvissuti, allo stadio 46/47, hanno mostrato difetti di attività neuromuscolare progressivamente più gravi, che, alla massima concentrazione, ha portato ad una forma di paralisi che ha compromesso seriamente il nuoto. La

malformazione più evidente e compromettente osservata è stata la presenza di edemi multipli nella regione della testa e ventrale, particolarmente pronunciati nel settore faringeo. Gli edemi faringei hanno prodotto una pressione su cuore e intestino che sono stati spostati verso la regione più rostrale. Sono state osservate anche malformazioni gastrointestinali gravi riguardanti in particolare un'avvolgimento anomalo dell'intestino, l'intestino è apparso, infatti, con un ridotto numero di spire (fig.2.2), che gli hanno conferito una forma a "ciambella" piuttosto che a spirale come quella presentata dagli embrioni wild type.

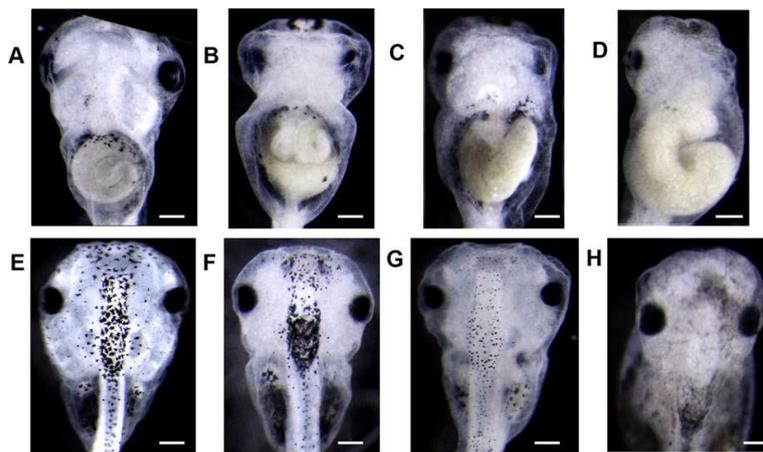


Figura 2.3: Alterazioni a carico dell'intestino e del pigmento negli embrioni trattati con CPF. A, E embrioni non trattati. B-D embrioni con anomalie all'intestino, F-H embrioni con alterazioni nella distribuzione del pigmento. Bars=0.5 mm

Per quanto riguarda i parametri di crescita quali la lunghezza, gli embrioni esposti a CPF hanno mostrato una netta riduzione della lunghezza significativamente correlata alla crescente concentrazione del composto (Fig.2.4).

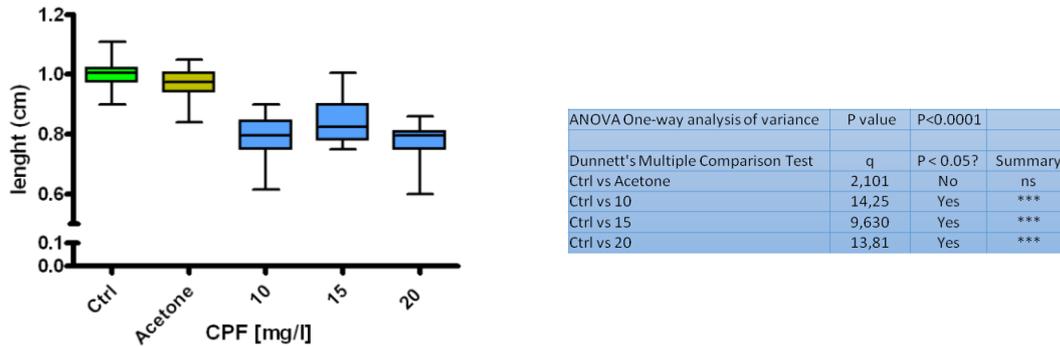


Figura 2.4: Lunghezze degli embrioni di *X. laevis* trattati e non con CPF (10, 15, 20 mg/ml). Il ritardo nella crescita è stato valutato con ANOVA test.

La riduzione delle dimensioni è peggiorata a causa della flessione della coda presente nel 30% degli embrioni trattati a 10mg/L, per raggiungere quasi il 100% a 20 mg/L.

### 2.2.3 Analisi istologiche

L'osservazione delle sezioni al microscopio ottico degli embrioni stadio 46/47, ci ha permesso di capire i danni causati dal CPF alla struttura e all'organizzazione degli organi interni e in particolare all'apparato circolatorio. Attraverso la comparazione delle sezioni dei campioni wt e di quelli esposti a 10 mg/L di CPF è stato possibile mettere in evidenza le alterazioni morfologiche che questo pesticida è in grado di provocare agli embrioni in via di sviluppo. Andando ad osservare in particolare il cuore, nei 10 mg/L si è notato che esso nei wt è posto ventralmente, invece nei 10 mg/L è spostato più dorsalmente, quasi a ridosso della faringe (Fig. 2.5). Inoltre è facilmente osservabile l'anteriorizzazione del cuore rispetto al wt. In questi ultimi infatti il cuore si può osservare a livello della trachea che è una struttura più posteriore rispetto al faringe. Nella figura E è stato evidenziato il cuore e in particolare il setto atrio-ventricolare che separa i due atri, posti superiormente, dal ventricolo. Il setto nei 10 mg/L è risultato essere più spesso rispetto al cuore dei campioni non trattati e inoltre ha assunto una struttura più allungata.

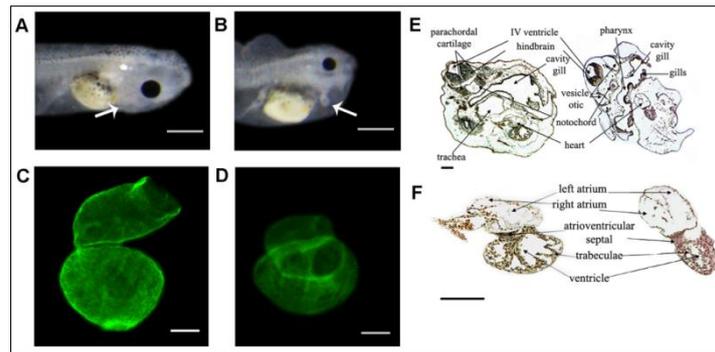


Figura 2.5: alterazioni a carico del cuore in embrioni trattati con CPF allo stadio 45/46. Vista laterale del controllo (A) ed embrioni trattati (B). Le frecce indicano la posizione del cuore. Bar in A e B=1 mm. (C-D) immunofluorescenza utilizzando anticorpo antitropomiosina su interi embrioni in vista ventrale. (E-F) Istologia con tricromica di Mallory sulle sezioni embrionali. Bar in C, D, E, F= 0.1 mm.

### 3.1.4 Osservazione alterazioni cartilagini cranio-facciali.

La colorazione con alcian blue su embrioni allo stadio 46 ha portato alla luce le alterazioni riscontrabili a livelli delle cartilagini craniali che sono in fase di sviluppo (Fig.2.6.). Negli embrioni controllo in figura, è possibile osservare ventralmente, facendo riferimento allo schema, la cartilagine di Meckel, le cartilagini ceratoiali, e i cestelli branchiali. Gli embrioni trattati alle concentrazioni di 10, 15 e 20 mg/L mostrano diverse alterazioni: la cartilagine ceratoiale è molto diversa dai controlli infatti si presenta fusa e mostra una struttura che stata definita “a campana”; i cestelli branchiali si mostrano più spessi; le branchie sono schiacciate nella parte posteriore sempre per causa dell’anteriorizzazione degli organi interni e si ha un’assenza quasi totale dei filamenti branchiali utili per la filtrazione (Fig.2.6).

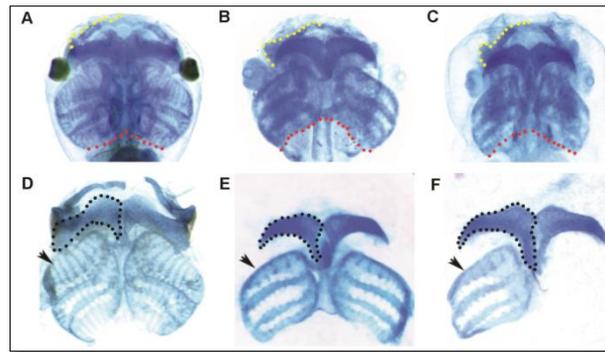


Figura 2.6: alterazione scheletrica in embrioni trattati con CPF allo stadio 45/46. Colorazione Alcian blue in embrioni controllo (A, D) e trattato (B-C, E-F). Le linee tratteggiate segnano la cartilagine e il palatoquadrato (giallo) mentre la cartilagine di Meckel e i cestelli branchiali sono in rosso. Struttura cranica dopo la rimozione della pelle in embrioni Controllo (D) e trattati (E-F). Le linee tratteggiate nere e le frecce evidenziano le alterazioni che si trovano al carico del ceratoiale e delle branchie.

### 3.1.5 Analisi di espressione genica

Da queste osservazioni si è notato che molti di questi fenotipi osservati: difetti della cartilagine cranio facciale, malformazione e delocalizzazione dell'intestino, difetti della pigmentazione possono essere ricondotti ad alterazioni di un unico processo cellulare ossia la migrazione ed il successivo differenziamento delle cellule della cresta neurale; dalle cellule di quest'ultima infatti si differenziano diversi tipi di cellule ed apparati quali:

- Sistema nervoso periferico (neuroni dei gangli sensitivi, simpatici e plessi, cellule della neuroglia e cellule di Schwann);
- Derivati endocrini e paraendocrini (midollare del surrene ecc.)
- Cellule pigmentate dell'epidermide
- Tessuto cartilagineo della faccia e della parte ventrale e anteriore del cranio;
- Tessuto connettivo: endotelio e stroma della cornea, papille dentarie, derma, muscolo liscio e tessuto adiposo della cute del capo e del collo, tessuto connettivo delle ghiandole salivari e

lacrimali, del timo, della tiroide, dell'ipofisi. Tessuto connettivo e muscolo liscio di arterie originate dall'arco aortico.

Dopo aver retro trascritto 1µg di RNA, è stata eseguita un'analisi di qRT-PCR per evidenziare un eventuale alterazione di una serie di geni da noi scelti. Nella tabella (Tab.2.3) sottostante sono riportati i geni analizzati e la loro funzione e/o localizzazione nell'embrione allo stadio 41.

Tabella 2.3: localizzazione e funzioni dei geni analizzati

<b>NOME GENE</b>	<b>LOCALIZZAZIONE/ FUNZIONE</b>
Fgf8	-encefalo anteriore -marcatore creste neurali
Sox9	-marcatore creste neurali
Rax1	-diencefalo -sviluppo dell'occhio
Pax6	- marcatore generico
Egr2	-encefalo posteriore -marcatore creste neurali
hox2A	-romboencefalo  -coinvolto nello sviluppo dello splancnocranio
hox2B	-romboencefalo  -coinvolto nello sviluppo dello splancnocranio
bmp4	-sviluppo mascella e intestino

Come si può notare esiste una generale down-regolazione dei geni studiati; in particolare *fgf8* diminuisce di circa il 80%, *hoxA2B* del 60%, *sox9* e *hox2A* di circa il 50% , e *bmp4* del 20%.

Non risulta, invece cambiata l'espressione di *egr2* (Fig.2.7).

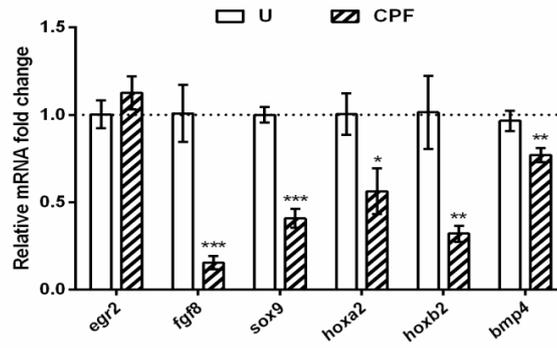


Figura 2.7: Real-time PCR dei geni coinvolti nello sviluppo neuronale, NCC patterning, e condrogenesi. La significatività statistica è stata determinata utilizzando t-test \* P < 0.05, \*\* P < 0,01, e \*\*\* P < 0.001.

### 2.3 DISCUSSIONE

Questo studio mostra gli effetti tossici che 3 concentrazioni di CPF (10, 15, e 20 mg / L) possono avere in embrioni di *Xenopus laevis*, esposti dallo stadio 4/8 cellule allo stadio 46. Le 3 concentrazioni di CPF sono state scelte per scopi esplorativi in quanto inducono risposte dell'organismo, chiaramente rilevabili con cambiamenti morfologici. Normalmente esperimenti, che utilizzano alte concentrazioni di pesticida, sono spesso eseguiti per indagare i meccanismi di tossicità alla base della molecola presa in esame (Lema et al., 2007). Inoltre, questo studio dimostra, per la prima volta, che il CPF induce cambiamenti morfologici riguardanti le strutture delle cellule della cresta neurale (NCC) da cui derivano le strutture craniche ed inoltre altera la trascrizione di geni coinvolti normalmente nel loro sviluppo. A tutte le concentrazioni testate, si osserva una funzione neuromuscolare alterata ed un aumento della mortalità, nonché cambiamenti morfologici tra cui ritardo della crescita, edema faringeo e malformazioni del cordone spinale. Questi risultati sono in linea con i dati ottenuti, in studi precedenti, con concentrazioni simili o differenti di CPF (Richards e Kendall. 2002; Colombo al. 2005; Tilton et al, 2011.; San Segundo et al 2013.; Watson et al., 2014). I cambiamenti morfologici sono risultati dose-dipendenti, progressivi, e persistenti. È ben noto che l'inibizione dell'attività dell'AChE è l'effetto principale osservato dopo esposizione a OP (Fulton and Kei, 2001; Colovic' et al., 2013). In particolare, l'inibizione del suddetto enzima porta ad un accumulo di ACh in prossimità della fessura sinaptica ed il conseguente aumento sia del livello che della durata dell'azione del neurotrasmettitore. Gli OP producono così, nei mammiferi, difetti tipici di tossicità anti-colinesterasi quali danni delle fibre muscolari e tremori (Karalliedde and Henry, 1993 De Bleecker et al., 1994). Per quanto riguarda gli embrioni di *X. laevis* il nuoto risulta essere alterato, ed in alcuni casi si arriva alla completa paralisi (dati non mostrati). Le anomalie osservate negli embrioni esposti al CPF, come ad esempio, coda storta e la lunghezza ridotta, potrebbero essere la conseguenza di alterazioni del sistema colinergico, dove l'inibizione

dell'AChE provoca danni a livello muscolare con il conseguente piegamento della coda e, ad alte concentrazioni, il raggiungimento della paralisi. In zebrafish, embrioni che presentano omozigosi per mutazione del gene AChE mostrano, infatti, un fenotipo con coda piegata (Behra et al., 2002; Bonfanti et al., 2004). Un precedente studio di Bonfanti et al. (2004) ha proposto un possibile ruolo degli OP sull'insorgenza della distrofia muscolare congenita dovuta all'inibizione dell'attività dell'AChE.

I cambiamenti morfologici rilevati dopo esposizione, interessano anche diverse strutture craniche derivanti dalle cellule della cresta neurale. Le NCC migrano dal diencefalo, mesencefalo anteriore, romboencefalo e hanno giocato un ruolo chiave durante l'evoluzione dei Craniota che ha consentito lo sviluppo della testa contribuendo alla formazione del cranio viscerale, frontonasale, e di alcune ossa del cranio (Dupin and Le Douarin, 2014; Jandzik et al., 2015). Durante la neurulazione, le NCC craniali si delaminano e migrano ad alcune aree della testa, dove si condensano a formare gli elementi della cartilagine, degli archi branchiali e del cranio ventrale (Selleck and Bronner- Fraser, 1995; Mancilla et al., 1996; Le Douarin et al., 2007). In embrioni esposti, i componenti del cranio viscerale sono correttamente collocati, suggerendo che il percorso di migrazione delle NCC non è influenzato. Piuttosto, le malformazioni sembrano dipendere da un'alterata segnalazione genetica. Infatti, indagini condotte sui livelli di geni coinvolti in questo processo hanno dimostrato un diretto effetto del CPF sulla condrogenesi di *Xenopus*.

In particolare, l'esposizione al CPF induce una riduzione dei trascritti di tutti i geni indagati tranne uno; la maggiore riduzione è stata ritrovata per *fgf8*, e *sox9*, che sono direttamente coinvolti nella condrogenesi dipendente dalle NCC (Schneider et al., 2001; Eames et al., 2004; Deimling and Drysdale, 2011).

Un'elevata down-regolazione dell'espressione di *fgf8*, come quella ritrovata nei nostri embrioni, è nota per indurre una generale ipoplasia degli archi-branchiali e malformazioni simili a quelle ritrovate nel nostro caso (SONG et al., 2004; Mina et al., 2002). Infatti, *fgf8* ha un ruolo

importante nel patterning neurale antero-posteriore ed una sua normale espressione (così come BMP4 e Sonic hedgehog) nell'ectoderma rostrale dei vertebrati, è essenziale per gli elementi scheletrici mascellari e frontonasali e per lo sviluppo della parte anteriore dell'animale (Deimling and Drysdale, 2011). L'abbassamento e la mancanza di espressione di FGF8 è correlata con anomalie cranio-facciali e neurali in tutti i vertebrati studiati (Monsoro-Burq et al., 2003). Inoltre, livelli normali di FGF8 (Farrell et al., 2001; Schneider et al., 2001) sono necessari per lo sviluppo del sistema cardiovascolare di zebrafish e del pollo (Reifers et al., 2000; Abu-Issa et al., 2002; Alsan e Schultheiss 2002). In larve esposte a CPF, *bmp4* e *sox9* risultano essere anche loro downregolati. Questi geni sono coinvolti nella modulazione del commitment osteogenico del mesenchima derivato dalle NCC. In particolare, alti livelli di BMP4 da soli possono indurre un destino condrogenico, mentre la formazione della componente cartilaginea è regolata da SOX9 attraverso l'attivazione di una serie di geni associati con questo processo (Eames et al., 2004; Jones and Trainor, 2005; Abzhanov et al., 2007). Topi mutanti per SOX9 mostrano ipoplasia generale delle ossa endocordali (Foster et al., 1994; Wagner et al., 1994; Akiyama et al., 2004), suggerendo che la sua down-regolazione possa portare, negli embrioni esposti a CPF, alla formazione di un cestello branchiale ipoplasico e l'ispessimento generale dei suoi componenti. Inoltre, studi su BMP4, dimostrano che esso svolge un ruolo importante nelle interazioni epiteliali-mesenchimali che sono alla base della specificazione, regionalizzazione e differenziazione nello sviluppo dell'intestino (Faure et al., 2002; Roberts et al., 1998; Smith et al., 2000). La sua downregolazione può quindi essere correlata con l'avvolgimento anomalo dell'intestino visto negli embrioni di *Xenopus* trattati, magari attraverso un'azione su Foxf1, un bersaglio a valle e un mediatore della segnalazione di BMP4 nell'intestino. È stato riportato che una upregolazione di foxF1 può ristabilire il fenotipo derivato dall'eliminazione di BMP4, e che iniezioni con FoxF1Mo in embrioni portano ad un allungamento dell'intestino e difetti nelle circunvoluzioni (Tseng et al., 2004).

L'abbassamento dei geni Hox PG2 può anche interessare la morfogenesi scheletrica del viso e della gola. In Gnatostomata, il romboencefalo dei vertebrati e le sue strutture sono determinate, almeno in parte, dai geni Hox PG2 *hoxa2* e *hoxb2* (Baltzinger et al., 2005). In *Xenopus*, il gene *hoxa2*, da solo, sembra essere specifico per le strutture derivate dal secondo PA (PA2). Questi dati sostengono fortemente l'idea che *hoxb2* non può essere coinvolto, nel lignaggio dei tetrapodi, nel patterning dello ioide, mentre nei pesci teleostei uno dei due geni Hox PG2 può specificare strutture derivate da PA2 (Baltzinger et al., 2005; Le Pabic et al., 2007). Una diminuzione dell'espressione sia di *hoxa2* che di *hoxb2* in embrioni di *Xenopus* trattati, suggerisce che entrambi possono contribuire alla morfogenesi dell' arco ioide. È probabile che *hoxa2* potrebbe influenzare l'espressione del polipeptide secreto endothelin1a (Edn1), un bersaglio a valle che in topo e in altri vertebrati regola il patterning dorsoventrale dell'arco branchiale (Baltzinger et al., 2005; Ozeki et al., 2005; Talbot et al., 2010). Inoltre, i livelli di proteina di *Hoxa2* sono in grado di modulare la capacità delle NCC craniche di rispondere a FGF regolando localmente il bilancio tra sopravvivenza, proliferazione, e specificazione verso un destino scheletogenico (Santagati and Rijli 2003). Il presente risultato suggerisce che le anomalie indotte dal CPF possono derivare da variazioni di uno o più di questi geni. Inoltre il livello trascrizionale di *hoxb2* riflette la downregolazione generale dei geni coinvolti nella differenziazione condrogenica degli archi viscerali suggerendo che *hoxa2* e *hoxb2* sono necessari anche per la selezione del patterning ioideo nei tetrapodi (Baltzinger et al., 2005). Il disturbo nella proliferazione e nel differenziamento delle NCC rostrali è rafforzato da due osservazioni: il livello invariato di *egr2* e la distribuzione dei melanociti dorsali, che nei vertebrati derivano dallo stesso EGR2 (Adameyko et al., 2009).

Mutazioni dominanti di EGR2 sono noti per causare alterazioni nella segmentazione del romboencefalo e nella mielinizzazione (Nonchev et al., 1996; Setainidou et al., 1997). La mancanza di coinvolgimento del marcatore del romboencefalo, EGR2, nonostante sotto la downregolazione degli altri geni, è sostenuta dal fatto che riesce a mantenere l'espressione dei

geni Hox durante la neurogenesi del romboencefalo e durante la migrazione delle NCC anche in embrioni trattati con CPF (Nonchev et al., 1996). La localizzazione dei melanociti è conservata nella regione dorsale e sul torace, suggerendo l'assenza di un switch tra cellule gliali/precursori neurali e precursori dei melanoblasti. La differenza principale tra controllo ed embrioni trattati sta nella distribuzione dei melanociti sulla superficie dorsale della testa, dove si osserva una generale diminuzione della pigmentazione nella regione rostrale. Anche se il meccanismo con cui il CPF altera la distribuzione dei melanociti sulla testa non è chiaro, l'esposizione, influenza la progressione del ciclo cellulare e/o la proliferazione cellulare nella regione dorso-frontale della testa, anche se non ha modificato la loro differenziazione primaria. È interessante notare che, negli uccelli e mammiferi (Le Douarin et al., 2007) le NCC craniali formano lo scheletro facciale ed inoltre sono anche fondamentali per lo sviluppo del cervello anteriore. Le interazioni tra queste due regioni durante lo sviluppo richiedono un corretto equilibrio tra i livelli di Fgf8 e di livelli BMP4.

Le alterazioni riguardanti l'espressione genica, descritte in questo lavoro, possono fornire dati preliminari che aiutano a spiegare la correlazione tra OP e i danni provocati allo sviluppo neuronale osservati in mammiferi esposti a questa molecola prima della nascita (Chen et al., 2014). Ulteriori indagini, utilizzando altri modelli animali, sono chiaramente necessarie per confermare le alterazioni geniche che l'esposizione al CPF ha mostrato nel nostro studio.

## **Capitolo 3:**

**Eventuali danni a carico del sistema nervoso in seguito ad esposizione cronica in utero e dopo la nascita nei vertebrati terrestri, usando il mammifero *Mus musculus*.**

### **3.1 MATERIALI E METODI**

#### **3.1.1 Raccolta degli encefali di *Mus musculus***

Gli encefali sono stati raccolti grazie alla collaborazione con la dottoressa Concetta Ambrosino, coordinatrice del gruppo geni e ambiente del Biogem (Ariano Irpino, Avellino). I campioni sono stati prelevati dal personale autorizzato dello stabulario dove gli animali vengono trattati nel rispetto delle normative vigenti riguardanti la protezione e l'utilizzo degli animali vertebrati a fini sperimentali e scientifici: *Decreto Legislativo del 27 gennaio 1992 n.116, la decisione del Consiglio 1999/575/CE del 23 marzo 1998 e Decisione 2003/584/CE del Consiglio del 22 luglio 2003*. I topi sono stati alimentati per tutta la durata della gravidanza e dell'allattamento con mangimi a cui è stato aggiunto Chlorpyrifos a diversi dosaggi. Alla nascita, la prole è stata divisa per sesso in gruppi di 10 individui e sottoposta alla stessa dieta dei genitori fino al momento del sacrificio. I topi sono stati fatti crescere fino a 3 e 8 mesi in modo tale da osservare gli effetti nel tempo della somministrazione di questo pesticida. Le dosi di Chlorpyrifos utilizzate sono state 0.1mg/Kg/d (GP5, gruppo 5), 1.0 mg/Kg/d (GP6, gruppo 6), 10 mg/Kg/d (GP7, gruppo 7) e topi non sottoposti a trattamento sono stati utilizzati come controllo (GP1, gruppo 1). Al raggiungimento dell'età desiderata, i topi sono stati sottoposti ad eutanasia con CO<sub>2</sub>.

Al momento del sacrificio i cervelli sono stati rimossi rapidamente, trasferiti in RNAlater® Solution (Invitrogen) per l'analisi molecolare e poi posti alla temperatura di -20°C.

#### **3.1.2 Purificazione dell'RNA totale dai tessuti recuperati**

RNA totale è stato isolato a partire da encefalo, mediante l'impiego del kit NucleoSpin® RNA della Macherey-Nagel. Tale estrazione si basa sull'utilizzo di colonnine contenenti membrane a base di silice e di una serie di buffer in grado di favorire il legame dell'RNA alla membrana nonché di prevenirne la degradazione inattivando le RNasi; inoltre prevede un passaggio con una DNasi in modo da evitare qualsiasi tipo di contaminazione da DNA genomico.

Ogni encefalo viene inizialmente pesato e poi tagliato lungo la linea sagittale, dividendo i due emisferi encefalici. Il peso medio di ogni emisfero è risultato essere di circa 200 mg. Ogni metà viene ulteriormente divisa in 3 parti e trasferita in un' eppendorf a cui si aggiungono una sfera di acciaio del diametro di 3 mm e 1.2mL del buffer di estrazione RA1. I campioni sono così omogenizzati con il Tissue Lyser LT (Qiagen) e processati con 50 oscillazioni al secondo per un tempo totale di 5 minuti, con 3 pause in cui il campione viene tenuto in ghiaccio per 1 minuto. Il contenuto delle 3 eppendorf viene poi ripartito in due tubi sterili da 1.5mL, in modo tale da non avere la sfera di acciaio nel tubino durante la centrifugazione a 11.000 x g per 10 min;

Il surnatante viene prelevato e filtrato attraverso NucleoSpin® Filter in un tubo da 2mL e si centrifuga per 1 minuto a 11.000 x g;

Viene scartato il NucleoSpin® Filter, si aggiungono 2.3mL di etanolo al 70% e si miscela la soluzione con la pipetta;

Viene poi messa una NucleoSpin® RNA Column in un tubo sterile da 2 mL, si caricano 750µL di lisato per volta (capacità massima della NucleoSpin® RNA Column) e si centrifuga per 30s a 11.00 x g ogni volta che si carica la colonnina;

Trasferita la NucleoSpin® RNA Column in un nuovo tubo sterile da 2 mL, si aggiungono 2.3 mL di MDB (membrane desalting buffer) e si centrifuga per 1 minuto a 11.000 x g;

Si aggiungono poi 95 µL DNase reaction mixture direttamente al centro della membrana della colonnina e si incuba per 15 minuti a temperatura ambiente;

Successivamente si aggiungono 200µL di Buffer RA2 per inattivare la DNase alla NucleoSpin® RNA Column e si centrifuga per 30 secondi a 11.000 x g;

La colonnina è trasferita in un nuovo tubo da 2mL, si aggiungono 600 µL di Buffer RA3 e si centrifuga nuovamente per 30 secondi a 11.000 x g;

A questo lavaggio ne segue un altro con 250µL di Buffer RA3 e si centrifuga per 2 minuti a 11.000 x g per asciugare bene il filtro da eventuali residui di etanolo e si trasferisce la colonnina in un nuovo tubo da 1.5mL;

Si eluisce l' RNA in 40 $\mu$ L di RNase-free H<sub>2</sub>O incubando per 4 minuti e centrifugando per 1 minuto a 11.000 x g.

### **3.1.3 Analisi spettrofotometrica dell'RNA estratto**

Per determinare la concentrazione e la presenza di eventuali contaminanti nell'RNA isolato da tessuto, è stata effettuata una analisi spettrofotometrica utilizzando il NanoDrop™ 1000 (Thermo Scientific). Con 1 $\mu$ l di ogni estratto lo strumento è in grado di fornire sia la concentrazione dell'RNA, in base alla sua assorbanza a 260 nm, espressa in ng/ $\mu$ l, sia i rapporti di assorbanza 260/280 e 260/230 che indicano quanto l'RNA estratto sia puro, ovvero non contaminato rispettivamente da proteine e da residui dei reagenti utilizzati per l'estrazione.

### **3.1.4 Verifica dell'integrità dell'RNA estratto**

Allo scopo di saggiarne l'integrità, una quantità pari a 500 ng di RNA estratto da campioni di controllo e trattati, implementato del relativo tampone di caricamento (Fermentas) contenente 0,015% di blu di bromofenolo, 0,015% di xilene, 10% di glicerolo e EDTA 10mM viene posto a migrazione elettroforetica su gel di agarosio al 2% in TAE 1X (Tris EDTA Acido acetico).

### **3.1.5 Contaminazione da genomico**

Per eliminare con sicurezza un' eventuale contaminazione residua da DNA, l' RNA estratto è stato sottoposto ad un ulteriore trattamento con DNasi (DNasi Ambion Kit) secondo il protocollo del kit.

La miscela di reazione viene preparata in un volume complessivo di 50 $\mu$ l secondo la seguente formulazione:

1. 5 $\mu$ l TURBO DNasi Buffer 10x
2. 1 $\mu$ l TURBO DNasi 2U
3. 5 $\mu$ g di RNA

Dopo l' incubazione della miscela a 37°C per 30-40 minuti, viene aggiunto il reagente di inattivazione della DNasi, 1,5µl EDTA 15mM, che viene fatto agire a 75°C per 10minuti.

Segue una PCR di controllo con primer della β2-microglobulina che annila sul promotore. Il promotore è un elemento genico presente nel DNA che non viene trascritto, per cui se l'RNA estratto è completamente puro, ci aspettiamo di non ottenere alcuna banda nel gel di agarosio.

### **3.1.6 Reazione di retrotrascrizione**

Una quantità pari a 2 µg di RNA totale viene sottoposto ad una reazione di retrotrascrizione mediante l'impiego del kit SuperScript™ III Reverse Transcriptase (Invitrogen) con random primers seguendo le istruzioni fornite dalla ditta. La miscela per la retrotrascrizione è costituita da:

2µg RNA

3µl random esameri 50ng/µl

1µl dNTP 10mM

H<sub>2</sub>O distillata fino a 13µl

La miscela è stata incubata a 65°C per 5 minuti e posta in ghiaccio per 1 minuto.

Successivamente sono stati aggiunti:

4µl First-Strand Buffer 5x

1µl DTT 0,1M

1µl RNaseOUT™ Recombinant Ribonuclease Inhibitor (40U/µl)

1µl SuperScript™ III RT (200U/µl)

La miscela è stata incubata a 25°C per 5 minuti per attivare l'enzima, poi è stata incubata a 50°C per 60 minuti per permettere la retrotrascrizione di tutto il materiale di partenza ed al termine la reazione è stata bloccata mediante riscaldamento a 70°C per 15 minuti.

### 3.1.7 Verifica mediante PCR della digestione del DNA genomico e del cDNA sintetizzato

La reazione di PCR viene eseguita in un volume di 20 µl contenente 1µl di stampo (RNA/cDNA), 2µl di DreamTaq Buffer 10x addizionato di Mg<sup>2+</sup>, 1µl di ciascuno dei due primers 10pmoli, 1µl di dNTP mix 10mM, 0,2µl di DreamTaq Polimerasi 5U/µl ed acqua sterile per un volume finale di 20µl. La reazione si svolge su termociclatore GeneAmp<sup>®</sup> PCR system 2400 (Applied Biosystem) con i seguenti parametri di amplificazione:

- attivazione dell'enzima a 95°C per 3'
  - denaturazione a 95°C per 45''
  - annealing dei primers a 58°C per 30''
  - estensione a 72°C per 45''
  - estensione finale a 72°C per 7'
- } 35 cicli di amplificazione

Gli amplificati sono separati su gel di agarosio al 2% in TAE 1X.

### 3.1.8 Valutazione dei profili di espressione mediante PCR array e real-time PCR

#### 3.1.8.1 PCR array

Il mio progetto di ricerca, volto a valutare nei topi trattati con Chlorpyrifos l'espressione dei geni specifici per il morbo di Parkinson, si è basato su uno studio realizzato mediante PCR Array.

La tecnica è articolata in 4 steps:

1. sintesi del cDNA,
2. allestimento della miscela di qRT-PCR,
3. amplificazione e analisi di Melting,
4. raccolta ed elaborazione dei dati.

*-sintesi del cDNA*

Viene preparata una miscela di digestione del DNA genomico contenente:

RNA totale	25ng-5µg
Buffer GE	2µl
Rnase-Free water	fino a un volume di 10 µl

Tale mix vien incubata per 5 minuti a 42°C e poi in ghiaccio per 1 minuto.

Si prepara successivamente la Reverse-transcription mix costituita da:

La mix (10µl) viene aggiunta alla miscela precedente (10µl).

5x Buffer BC3	4µl
Control P2	1µl
RE3 Reverse Transcriptase Mix	2µl
RNase-free water	3µl

L'intera miscela (20 µl) viene riscaldata a 42°C per 15 minuti e poi a 95°C per 5 minuti.

Si aggiungono infine 91µL RNase-free water a ciascuna miscela di retrotrascrizione.

Si procede con la qRT-PCR.

- *Miscela di qRT-PCR*

Per quanto concerne la fase di allestimento della miscela di PCR, una aliquota pari a 102 µl di cDNA sintetizzato viene addizionata a 1350 µl di RT Real-Time SYBR Green PCR master mix 2X e a 1 248 µl di acqua sterile. Tale miscela viene quindi trasferita in aliquote da 25 µl all'interno di pozzetti raggruppati in un supporto solido costituito da una piastra. A tale scopo sono state impiegate piastre contenenti 96 pozzetti prodotte dalla QIAGEN e indicate con la sigla Parkinson Disease RT<sup>2</sup> Profiler PCR Array-mouse (PAMM-124Z). All'interno di ciascun pozzetto è presente in forma liofilizzata un set di primers per l'amplificazione di un gene specifico. In particolare nelle piastre da 96 pozzetti è possibile esplorare l'espressione di 84 geni di interesse relativi ad uno specifico pathway (nel nostro caso i geni coinvolti nel Parkinson) e di 5 geni housekeeping, utilizzati per la normalizzazione dei dati sperimentali, indispensabile per

poter effettuare la valutazione dell'espressione genica differenziale nei vari campioni. Inoltre è possibile valutare la presenza di DNA genomico contaminante il cDNA sintetizzato, nonché di saggiare l'efficienza dei processi di retrotrascrizione e di amplificazione mediante PCR (Figura 3.1).

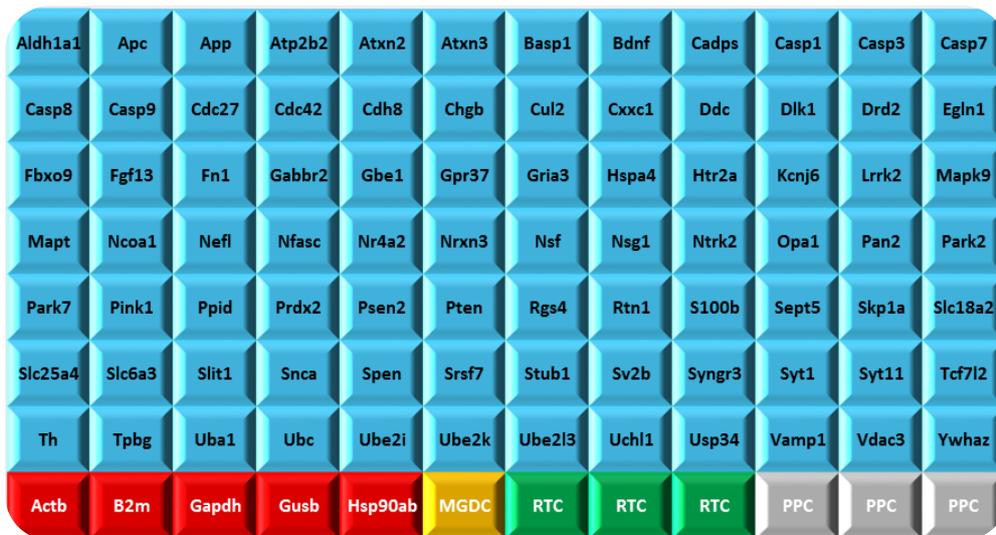


Figura 3.1 : piastra Parkinsons Disease RT<sup>2</sup> Profiler PCR Array (Qiagen).

- *Amplificazione e analisi di Melting*

L'analisi mediante PCR Array delle piastre relative ai campioni presi in esame è stata condotta utilizzando iCycler, quale termociclatore accoppiato allo strumento di acquisizione iQ5 Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad).

L'amplificazione ha previsto l'adozione delle seguenti condizioni:

1. denaturazione iniziale a 95°C per 10'
  2. denaturazione a 95°C per 15''
  3. annealing dei primers e polimerizzazione a 60°C per 1'
- } 40 cicli di amplificazione

Al termine della reazione di amplificazione l'allestimento delle curve di Melting relative a ciascun amplificato è stato condotto secondo il seguente protocollo:

1. mantenimento delle miscele a 95°C per 1'

2. mantenimento delle miscele a 55°C per 1'

3. incrementi consecutivi di 0,5°C (da 55°C a 94,5°C) compiuti ogni 10''.

*- Elaborazione dati*

L'analisi dei dati al termine della reazione di amplificazione e dell'allestimento delle curve di Melting è stata condotta mediante l'impiego del software iQ5 Optical System (Bio-Rad). Negli esperimenti relativi ai campioni presi in esame la threshold è stata posizionata sempre al medesimo valore di fluorescenza. Tale procedura ha consentito di determinare per ciascun gene il valore di Ct. Sono stati considerati non attendibili tutti i segnali a cui corrispondeva un valore di ciclo soglia maggiore di 35.

Relativamente ai campioni presi in esame, per ciascun gene è stato determinato il  $\Delta Ct$ , adottando la  $\beta 2$  microglobulina quale housekeeping. Per calcolare l'espressione relativa di ciascun gene in un campione rispetto al suo controllo è stata applicata la formula  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ . I Ct dei valori ottenuti da ogni singola piastra sono stati analizzati tramite un foglio Excel fornito dalla stessa ditta produttrice. Tra le finestre di calcolo della maschera Excel, ce n'è una che restituisce in output uno Scatter plot dei dati analizzati. Questo grafico mostra una correlazione tra le due variabili in esame: sull'asse delle ascisse sono presenti i livelli di espressione dei geni del campione controllo, mentre sull'asse delle ordinate troviamo quelli del campione trattato. Ai due lati della diagonale ci sono due linee che rappresentano l'intervallo di variabilità e permettono di separare quei geni le cui oscillazioni dei livelli di espressione sono da considerare casuali in un campione biologico. Il range di questo intervallo viene impostato dall'operatore ed è stabilito per questi esperimenti di  $\pm 20$  volte rispetto al controllo, ragion per cui tutti i geni contenuti all'interno di queste due diagonali sono stati considerati come geni i cui livelli di espressione non sono stati significativamente alterati dall'azione al Chlorpyrifos.

### 3.1.8.2 Analisi statistica

L'analisi statistica è stata analizzata grazie all' RT2 Profiler PCR Array Data Analysis software (version 3.5, SABiosciences®; QIAGEN, QIAGEN Sciences). Sono stati considerati significativi i livelli genici con un  $P < 0.05$ .

### 3.1.8.3 Real-Time PCR

Dopo aver elaborato i risultati ottenuti mediante PCR array, i geni che risultavano avere profili di espressione alterati nel trattato rispetto al controllo sono stati singolarmente indagati mediante Real-Time PCR.

Per ottenere templati utili alla valutazione quantitativa mediante Real-Time PCR dell'espressione del gene prescelto, sono stati sintetizzati i cDNA corrispondenti a partire dagli RNA purificati come precedentemente descritti.

Nello studio condotto sono stati utilizzati i seguenti primers (Tab.3.1):

Gene Name	Oligo Sequence
Gabbr FOR Gabbr REV	TCCGGAACGGGGAAAGAATG TCCGACCCCTGGAACCTTAT
Park2 FOR Park2 REV	ACCCACCTACAACAGCTTTTTTC CAGCAAGATGGGCCCTGG
Sept5 FOR Sept5 REV	GACCCAGAGGACAAACAGG ACCATGAGCGTGAAGTCGAA
Sv2b FOR Sv2b REV	TGCTGGAGATGGGCAAACAT TGAACACCTTTTCCGGGGTC
Atxn FOR Atxn REV	CCCGGGCGTACAACCTTTAT TGTCGCTGTTGGGGCATATT
Ubc FOR Ubc REV	GCCCAGTGTTACCACCAAGA CCCCATCACACCCAAGAACA
Chgb FOR Chgb REV	CTCACCAGGAGGCAAACGAT AGTTCCAGATCCATCGCAGC
Rgs4 FOR Rgs4 REV	GCCAGAGGGTAAGCCAAGAA TCCTCGCTGTATTCCGACTTC
Pink1 FOR Pink1 REV	CTGCCTGAGATGCCTGAGTC GTGCAGACGGTCTCTTGCT

Tabella 3.1: elenco dei primers utilizzati

Le sequenze dei primers studiati sono state disegnate con "Primer 3", un programma disponibile in rete (<http://frodo.wi.mit.edu/primer3>) che a partire dalla sequenza di mRNA del gene

specifico, che è possibile trovare sul sito dell'NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez>), ci fornisce una o più coppie di primer compatibili con la regione da amplificare.

La reazione è stata condotta con l'uso del kit Power SYBR® Green Master Mix (Life technologies). La miscela di reazione per l'amplificazione è costituita da 10 µl SYBR Green Master Mix 2X, 1 µl di ciascun primer senso e antisenso 10 pmol/µl e acqua per portare a volume. Similmente viene preparata la miscela di reazione per l'amplificazione della  $\beta$ 2-microglobulina. Le quantità necessarie di componenti sono state preparate in appositi tubi di polipropilene sterili e 17 µl di reazione sono stati dispensati in ogni pozzetto di una piastra da 96 per Real Time (MicroAmp Optical 96-well reaction plate, Part number N801-0560, Applied Biosystems). Successivamente 3 µl di cDNA da analizzare sono stati aggiunti ad ogni pozzetto per ottenere un volume finale di reazione di 20 µl/campione.

E' stata allestita una reazione in triplicato per ogni coppia campione-primers, anche per i negativi inseriti per ogni coppia di primers analizzata. Le condizioni di PCR sono: 50°C per 2 minuti (step di attivazione dell' enzima), 95°C per 10 minuti (step di denaturazione), 40 cicli di amplificazione ognuno di essi diviso in una fase in cui il campione viene portato a 95°C per 15 secondi e una fase a 60°C per 1 minuto in cui si ha l' annealing dei primer e una fase a 72°C per 20 secondi in cui si ha l' allungamento del filamento di DNA, infine la melting curve data da 95°C per 1 secondo e 60°C per 10 secondi grazie alle quali è possibile ottenere un'indicazione sulla purezza del prodotto d'amplificazione e informazioni circa l'eventuale formazione di dimeri di primers. La reazione è stata realizzata utilizzando lo strumento ABI Sequence Detection 7500 System (Applied Biosystems). L'espressione relativa geni di interesse (Gabbr2, Park2, Pink1, Sv2b, Sept5, Ubc, Chgb, Atxn2, Rgs4) rispetto al controllo ( $\beta$ 2 microglobulina) è stata calcolata come descritta in precedenza (paragrafo 3.3). L'analisi statistica è stata effettuata con il t-tet usando GraphPad Prism 6 software.

### **3.1.9 Estrazione delle proteine**

Le proteine sono state estratte dall'altra metà degli encefali usati per l'estrazione dell'RNA.

Gli encefali sono frammentati con un bisturi e posti in un eppendorf da 1,5ml aggiungendo 600 µl di tampone di lisi contenente PBS, 0,5% NP-40 e inibitori di proteasi PMSF 1mM (Roche).

Successivamente si effettua un'incubazione in ghiaccio per 1 ora agitando e, infine, si centrifuga a 12000 rpm per 1 ora a 4°C. Il surnatante ottenuto rappresenta l'estratto proteico che va conservato a

-20°C fino al momento dell'utilizzo.

L'estratto proteico totale è stato misurato mediante saggio Bradford.

#### **3.1.9.1 Quantizzazione proteica con il metodo Bradford**

La concentrazione proteica è stata valutata con il metodo Bradford (1976), che consiste in un saggio colorimetrico basato sul confronto della densità ottica del campione con quella di una quantità nota di una proteina standard, nel nostro caso la BSA (siero albumina bovina 1 µg/µl).

Sia quattro concentrazioni scalari note (2, 4, 6, 8 µg) di proteina standard che un volume preciso del campione (2µl), sono stati sciolti in acqua e reattivo di Bradford (Coomassie G-250 blu, Biorad) mescolati in un rapporto di 4:1 in un volume finale di 1ml. Il colorante nella soluzione madre si trova in forma cationica e ha un massimo di assorbanza a 470 nm; in ambiente acido e in seguito al legame con le proteine si ha uno spostamento del picco di assorbimento da 470 nm a 595 nm che visivamente è rappresentato dal viraggio del colorante dal marrone al blu. Il valore di assorbanza di ogni campione viene letto allo spettrofotometro (Ultrospec 2100 pro, UV/Visible Spectrophotometer, Amersham Pharmacia Biotech) a 595nm e la concentrazione proteica viene calcolata interpolando tali valori su una curva di taratura i cui punti sono concentrazioni scalari della soluzione a concentrazione nota della BSA.

### **3.1.10 Saggio dell' acetilcolina esterasi**

Il saggio dell' acetilcolina esterasi determina l'attività dell'acetilcolinesterasi (AChE). Il principio si basa sulla valutazione dell'attività dell'enzima acetilcolinesterasi che idrolizza il substrato acetiltiocolina e produce tiocolina e acetato. La tiocolina così prodotta riduce uno specifico reattivo, il DTNB, che libera nitrobenzoato e aumenta la densità ottica della soluzione. Rilevando questa densità ottica con lo spettrofotometro dopo circa 10 minuti dall'attivazione dell'enzima con il substrato, si determina l'attività dell'enzima. Nel saggio viene utilizzata una quantità di campione tale per cui nel volume finale siano presenti 30 µg di proteine precedentemente determinate con il metodo di Bradford. Ad ogni campione vengono addizionati 4 µl di DTNB (5,5'-dithiobis-(2-nitrobenzoic acid), o reagente di Ellman) sciolto in etanolo assoluto 10 mM, portati al volume finale di 200 µl con tampone fosfato 0,2 M pH 7,4 tenuto alla temperatura di 25°C. Il substrato (25 µl di acetiltiocolina sciolta in buffer fosfato pH 7,4 40mM) viene aggiunto al saggio nel momento della lettura allo spettrofotometro (tempo zero). La tiocolina prodotta riduce il reattivo DTNB che libera nitrobenzoato fornendo una colorazione gialla. Trascorsi 5-10 minuti la lettura viene ripetuta per valutare l'aumento di attività dell'enzima. Le densità ottiche vengono misurate alla lunghezza d'onda di 412 nm ed i campioni, fino al momento della lettura, sono mantenuti al buio e alla temperatura di 25 °C. La reazione enzimatica è quantificata contro un bianco che non contiene il substrato.

### 3.2 RISULTATI

Dopo esposizione cronica al CPF, non sono stati osservati segni evidenti di tossicità a livello comportamentale in nessun gruppo di topi alimentato con le diverse concentrazioni del pesticida.

Inoltre, i topi alimentati con 0,1-1 mg/kg/d di pesticida, non mostrano alcuna alterazione significativa dell'attività dell' AChE cerebrale, sia a 3 mesi che a 8 mesi. Una riduzione dell'attività colinesterasica viene, invece, ritrovata nei topi, di entrambe le età, trattati con il più alto dosaggio di CPF (10 mg / kg CPF) (80% -30% d' inibizione, rispettivamente). (Fig.3.2).

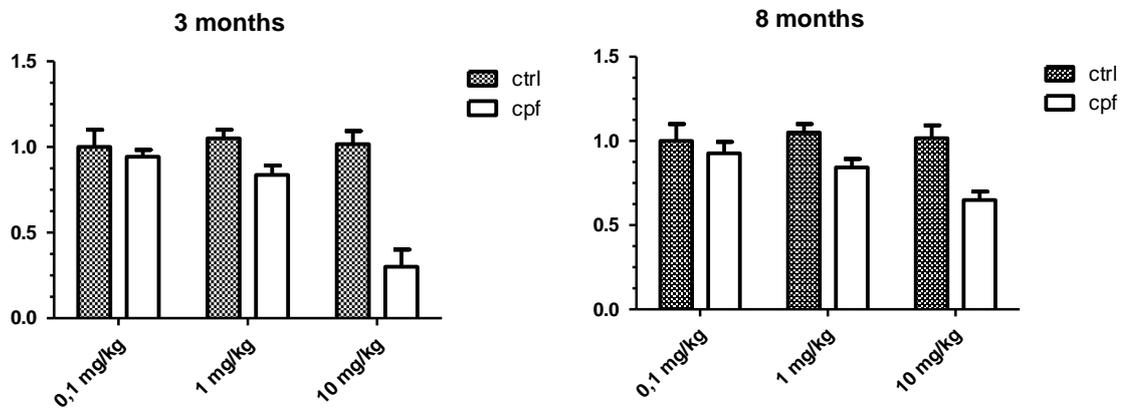


Figura 3.2 : saggio dell' acetilcolinesterasi su proteine estratte da encefali di *Mus musculus* a 3 e 8 mesi.

#### 3.2.1 PCR Array e convalida dei dati da qRT-PCR

##### 3.2.1.2 - 3 MESI

Utilizzando una piastra a 84 geni, si è saggiata l'espressione di trascritti direttamente o potenzialmente coinvolti nel Parkinson e/o in altre malattie neurodegenerative. Il valore soglia utilizzato per selezionare i geni con espressione alterata, è stato 2.0-fold. Abbiamo scelto e analizzato tutti i geni che superavano tale valore. A tre mesi, le analisi di qRT-PCR-array non hanno mostrato alcuna alterazione genica significativa a 0,1 mg/kg/d e solo una leggera tendenza alla diminuzione nel numero dei trascritti, a 1 mg/kg/d. Questa generale down-regolazione dei

livelli trascrizionali viene confermata e addirittura aumenta, per la maggior parte dei geni analizzati, nei topi trattati con 10 mg/kg/d(Fig.3.3) di CPF.

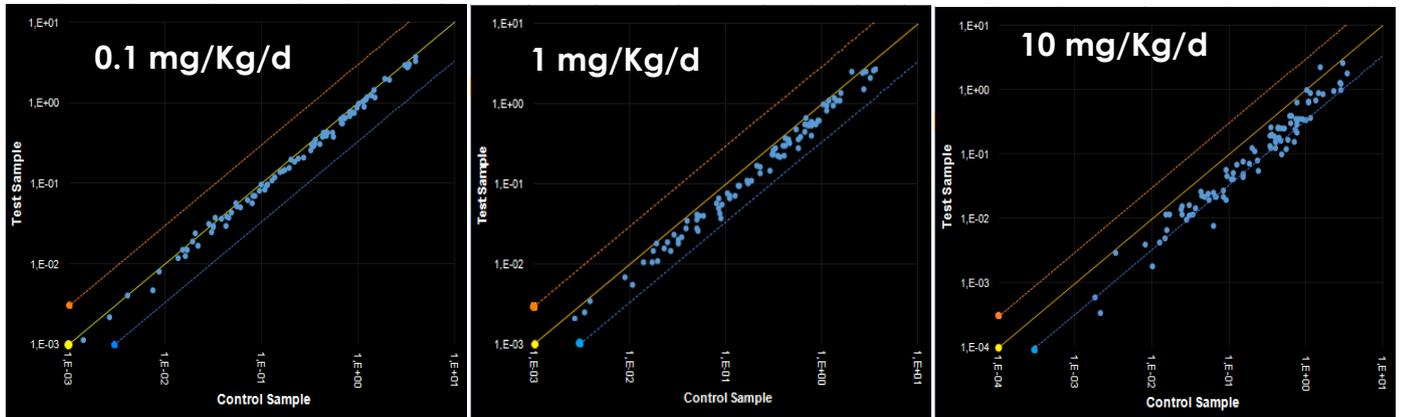


Figura 3.3 : scatter plot alle tre concentrazioni di CPF, dei profili di espressione relativi ai 96 geni presenti su piastra a 3 mesi.

Sulla base dei criteri di cut-off di  $(\log_2FC) > 2,0$ , e  $p < 0,05$  stabiliti per l'analisi con il PCR - Array, sono stati ritrovati, nei topi trattati con 10 mg/kg/d, 48 trascritti espressi in modo differenziale (DET) rispetto al controllo (Tab.3.2). La maggior parte dei valori alterati corrispondono a geni codificanti per proteine coinvolte nella trasmissione sinaptica e/o appartenenti alla segnalazione GABAergica e dopaminergica.

L'unica eccezione a questo generale decremento del numero dei trascritti è rappresentata dal gene UBC, il cui livello di espressione, seppur compreso entro i valori soglia, risulta aumentare gradualmente da +0,35 a +0,50, in modo direttamente proporzionale all'aumentare della concentrazione di CPF.

Gene name	Functions	Fold change
CASP9	Apoptosis	-0.35
MAPK9	Apoptosis	-0.39
NR4A2	Apoptosis, Dopaminergic Signaling	-0.34
CASP3	Apoptosis, Mitochondrial	-0.44
OPA1	Apoptosis, Mitochondrial	-0.29
CDH8	Cell Adhesion Molecules	-0.35
FN1	Cell Adhesion Molecules	-0.38
NFASC	Cell Adhesion Molecules	-0.33
NRXN3	Cell Adhesion Molecules	-0.35
TPBG	Cell Adhesion Molecules	-0.16

PTEN	Cell Adhesion Molecules, Apoptosis, Mitochondrial	-1.44
DRD2	Dopaminergic Signaling	-0.35
SLC6A3	Dopaminergic Signaling	-0.34
GABBR2	GABAergic Signaling	-0.13
ATP2B2	Ion Transport	-0.39
CXXC1	Ion Transport	-0.41
EGLN1	Ion Transport	-0.40
GRIA3	Ion Transport	-0.40
HTR2A	Ion Transport	-0.36
KCNJ6	Ion Transport	-0.26
NSF	Ion Transport	-0.29
SLIT1	Ion Transport	-0.34
SRSF7	Ion Transport	-0.41
ALDH1A1	Other Parkinson's Disease Genes	-0.37
BASP1	Other Parkinson's Disease Genes	-0.21
CHGB	Other Parkinson's Disease Genes	-0.40
NCOA1	Other Parkinson's Disease Genes	-0.40
RTN1	Other Parkinson's Disease Genes	-0.34
STUB1	Parkin Complex, Ubiquitination	-0.32
ATXN2	Parkin Substrate	-0.32
ATXN3	Parkin Substrate	-0.33
GPR37	Parkin Substrate	-0.30
SYT11	Parkin Substrate, Synaptic Vesicles	-0.35
SV2B	Synaptic Vesicles	-0.22
SYNGR3	Synaptic Vesicles	-0.22
SYT1	Synaptic Vesicles	-0.32
SEPT5	Synaptic Vesicles, Dopaminergic Signaling	-0.23
UBC	Ubiquitination	+0.49
USP34	Ubiquitination	-0.36
LRRK2	Ubiquitination, Mitochondrial, Synaptic Vesicles	-0.39
PARK2	Ubiquitination, Mitochondrial, Dopaminergic Signaling	-0.18
PINK1	Ubiquitination, Mitochondrial, Dopaminergic Signaling	-0.23

Tabella 3.2: 48 trascritti espressi in modo differenziale (DET) rispetto al controllo nei topi trattati con 10 mg/kg/d.

Un sottoinsieme di sei geni (PARK2, PINK1, SV2B, SEPT5, GABBR2 e UBC), deregolati a 10 mg/ kg/d , coinvolti in diversi pathway, è stato campionato per una verifica mediante Real-time PCR. I risultati di RT-PCR, in generale, sono in accordo con quelli ottenuti mediante analisi di microarray, anche se, talora, i livelli di alterazione, risultano differenti tra le 2 metodiche. In particolare, UBC conferma la tendenza di up-regolazione di + 0,30 dopo esposizione alla concentrazione maggiore di pesticida, rispetto al gruppo di controllo. I livelli di Pink1, Sept5, Park2, Gabbr2 e SV2B era invece down-regolati con valori simili, da - 0,5 a - 0,3 (Fig.3.4).

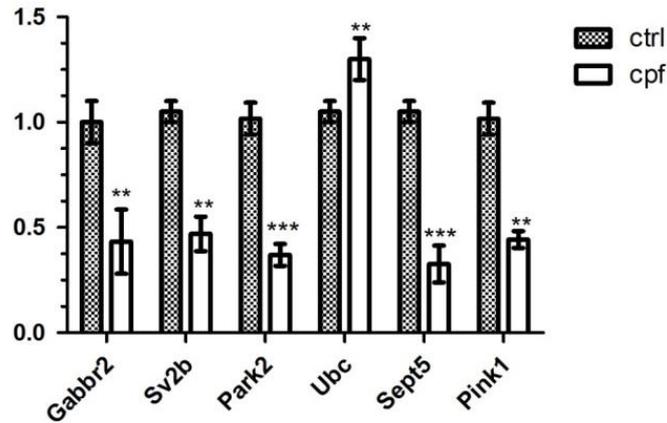


Figura 3.4.: Geni validati con PCR Real-Time a 3 mesi. La significatività statistica è stata determinata utilizzando t-test \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0,01$ , e \*\*\*  $P < 0.001$ .

Inoltre, utilizzando il diagramma di Venn, è stato possibile fare un'analisi generale (Fig. 3.5), la quale mostra come l'espressione genica cambi per le tre concentrazioni di CPF nei topi 3 di mesi. Solo i geni, la cui variazione dal controllo è compresa tra  $<0,5 > 0.5$ , e i valori di  $p < 0,05$  sono scelti per l'analisi.

Come mostrato in Figura 3.5, si ritrova un ridotto numero di geni deregolati, quattro, a tutti e tre i dosaggi. Due dei quattro geni fanno parte della segnalazione dopaminergica, Park2 e Nr4a2, uno della segnalazione GABAergica, GABBR2, e l'ultimo, SV2B è coinvolto in attività di trasporto transmembrana (Tab.3.3).

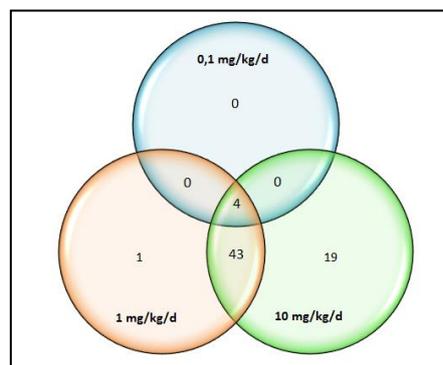


Figura 3.5: Venn diagram che mostra il numero di geni alterati, comuni e non alle 3 concentrazioni (0,1-1-10 mg/kg/d)

Chlorpyrifos Concentration	DETs	Altered genes Name
0,1 mg/Kg/d	0	0
0,1-1 mg/Kg/d	0	0
0,1-10 mg/Kg/d	0	0
1-10 mg/Kg/d	43	Ubc, Aldh1a1, Apc, Atp2b2, Atxn2, Atxn3, Basp1, Bdnf, Casp3, Casp9, Cdc27, Cdh8, Chgb, Cxhc1, Drd2, Egl1, Fbxo9, Fn1, Gabbr2, Gpr37, Htr2a, Kenj6, Lrrk2, Ncoa1, Nefl, Nfasc, Nrnx3, Nsf, Nsg1, Ntrk2, Opa1, Pan2, Park2, Pink1, Pten, Rgs4, Sept5, Srsf7, Sv2b, Syng3, Syt1, Ube2k, Usp34
1 mg/Kg/d	1	Gbe1
10 mg/Kg/d	19	App, Cadps, Casp7, Ddc, Dlk1, Gria3, Hspa4, Park7, Psen2, Rtn1, Skp1a, Slc6a3, Slit1, Stub1, Syt11, Tpbp, Uchl1, Ywhaz
0,1-1-10 mg/Kg/d	4	Park2, Nr4a2, Gabbr2, Sv2b

Tabella 3.3: elenco dei geni alterati in comune e non tra le varie concentrazioni di CPF (0,1-1-10 mg/kg/d)

### 3.2.1.3 - 8 MESI

Le alterazioni, conseguenza dell'esposizione al CPF, sono apparse molto diverse nei topi ad 8 mesi. Ancora una volta, nessun gene è stato ritrovato oltre i valori soglia alle concentrazioni più basse di CPF, 0,1 e 1 mg/kg/d, inoltre a 10 mg/Kg/d si riscontra una generale ripresa dei livelli del numero dei trascritti, deregolati a 3 mesi, eccezion fatta per Park2, Ataxin 2, DRD2 e UBC, i cui valori rimangono alterati (Fig.3.6).

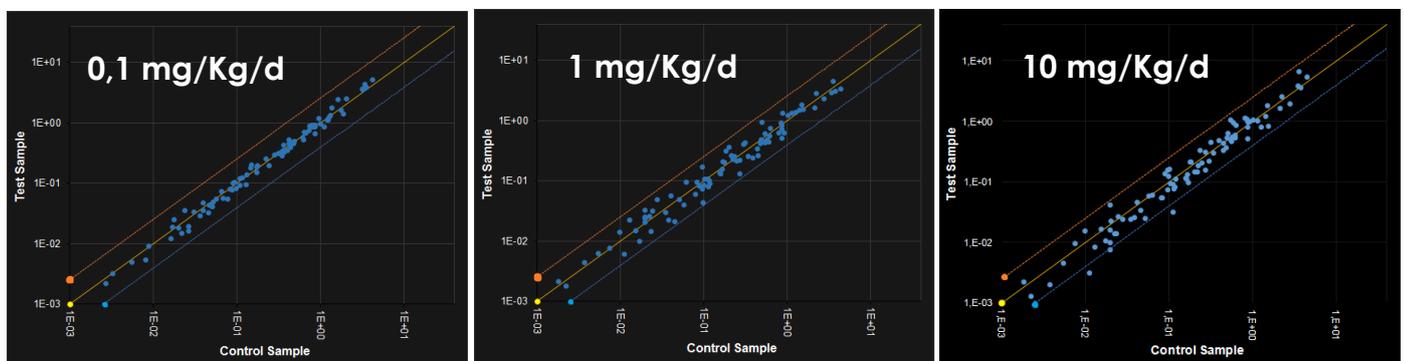


Figura 3.6: scatter plot alle tre concentrazioni di CPF, dei profili di espressione relativi ai 96 geni presenti su piastra a 8 mesi.

Con gli stessi criteri utilizzati a 3 mesi, sono stati ritrovati solo 14 trascritti espressi in modo differenziale (DET). In particolare, a 8 mesi, risultano down-regolati i trascritti di alcuni geni codificanti per proteine coinvolte nella segnalazione dopaminergica, mentre un up-regolazione viene evidenziata, per geni coinvolti nel processo di ubiquitinazione, segnalazione cellulare e appartenenti al parkin complex (Tab.3.4).

<b>Gene name</b>	<b>Functions</b>	<b>Fold change</b>
CASP1	Apoptosis	+1.13
CASP9	Apoptosis	+0.55
PSEN2	Apoptosis	+0.59
DRD2	Dopaminergic Signaling	-0.38
CHGB	MAP Kinase Signaling	+0.67
RGS4	MAP Kinase Signaling	+0.95
HSPA4	Parkin Complex, Mitochondrial	+0.45
PARK7	Parkin Complex, Mitochondrial, Dopaminergic Signaling	+0.44
ATXN2	Parkin Substrate	-0.29
CDC27	Ubiquitination	+0.57
FBXO9	Ubiquitination	+0.45
UBC	Ubiquitination	+0.89
UBE2K	Ubiquitination	+0.63
PARK2	Ubiquitination, Mitochondrial, Dopaminergic Signaling	-0.28

Tabella 3.4: 14 trascritti espressi in modo differenziale (DET) rispetto al controllo nei topi trattati con 10 mg/kg/d a 8 mesi

Un sottogruppo di cinque geni (Park2, ATX2, RGS4, CHGB e UBC), deregolati nei di 8 mesi trattati con 10 mg/kg/d, coinvolti in diversi pathways, è stato campionato per la verifica mediante Real-time PCR. I risultati di RT-PCR hanno confermato l'analisi di microarray. In particolare, la qRT-PCR mostrano un decremento di -0,30 e -0,10, rispettivamente per Park2 e ATX2, e un aumento di +0,66 per RGS4, +0,64 per Chgb e +0,96 per Ubc. In particolare, è interessante notare come i livelli del trascritto UBC, continuino ad aumentare progressivamente con l'avanzare del tempo (da +0,30 a 3 mesi, a +0,96 a 8 mesi) (Fig.3.7).

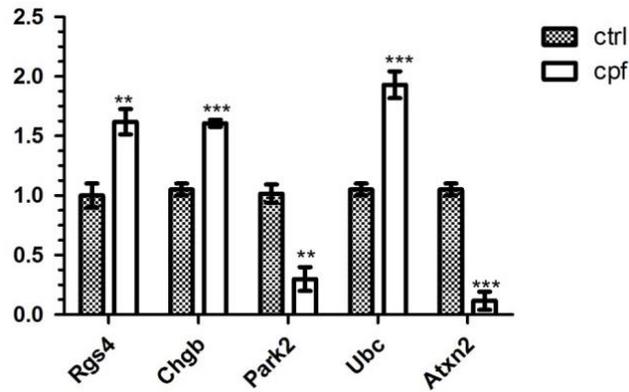


Figura 3.7: Geni validati con PCR Real-Time a 3 mesi. La significatività statistica è stata determinata utilizzando t-test \* P < 0.05, \*\* P < 0.01, e \*\*\* P < 0.001.

Anche a 8 mesi, l'analisi di Venn diagram è stata eseguita sui quei geni la cui variazione dal controllo è compresa tra > 0,5 e < 0,5, valore p < 0,05 (Fig.3.8). In questo intervallo di valori, solo due geni sono stati trovati comunemente deregolati alle tre concentrazioni, entrambi con un trend di up-regolazione: Ubc e CASP9 (Tab.3.5).

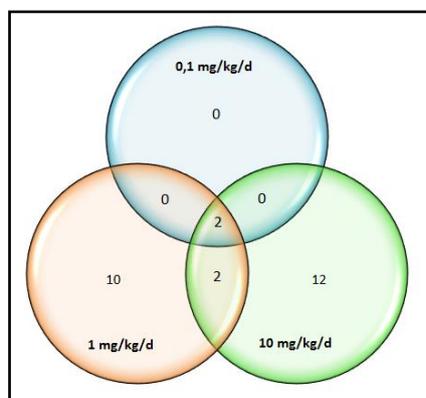


Figura 3.5: Venn diagram che mostra il numero di geni alterati, comuni e non alle 3 concentrazioni (0,1-1-10 mg/kg/d) a 8 mesi

<b>Chlorpyrifos concentration</b>	<b>Altered genes number</b>	<b>Altered genes name</b>
<b>0,1 mg/Kg/d</b>	0	
<b>0,1-1 mg/Kg/d</b>	0	
<b>0,1-10 mg/Kg/d</b>	0	
<b>1-10 mg/Kg/d</b>	2	Ube2k, Park2
<b>1 mg/Kg/d</b>	10	Bdnf, Cul2, Gabbr2, Gbe1, Pan2, Ppid, Snca, Dlk1, Kcnj6, Uchl1
<b>10 mg/Kg/d</b>	12	Cdc27, Chgb, Fbxo9, Hspa4, Park7, Psen2, Rgs4, Ube2l3, Atxn2, Ddc, Drd2, Fn1
<b>0,1-1-10 mg/Kg/d</b>	2	Ubc, Casp9

Tabella 3.3: elenco dei geni alterati, in comune e non, tra le varie concentrazioni di CPF (0,1-1-10 mg/kg/d) a 8 mesi

### 3.3 DISCUSSIONE

In questo studio è stata effettuata un'analisi al fine di valutare i cambiamenti putativi nell'espressione dei geni relativi al PD in cervelli murini esposti in maniera cronica, in utero e dopo la nascita, a tre diverse concentrazioni di CPF (0,1; 1,0; 10,0 mg/kg/d). I risultati hanno mostrato una prova diretta che l'esposizione a lungo termine al CPF, associabile presumibilmente a tutti gli organofosfati, si riflette negativamente sull'espressione dei diversi geni relativi all'insorgenza del PD e di altre patologie neurodegenerative negli esseri umani. (Slotkin and Seidler, 2012).

Prima di tutto, si dimostra una chiara relazione, dose-dipendente, nel cervello di topi a 3 e 8 mesi esposti al pesticida sia per l'inibizione AChE nonché per le alterazioni geniche, anche se il pattern dei geni alterati differisce tra i due gruppi di età. Nel complesso, l'esposizione al Chlorpyrifos produce differenti livelli di up-e down-regolazione, che sono più evidenti nel gruppo di topi trattati con la concentrazione superiore di CPF (10 mg/kg/d). Tuttavia non è stato rilevato un apprezzabile peggioramento in termini di alterazione genica con l'aumentare del tempo di esposizione, infatti il cervello dei topi di età maggiore ha mostrato una sorta di recupero generale della funzionalità genica con l'invecchiamento. Il numero totale dei trascritti alterati è drasticamente ridotto a 8 mesi e i valori dell'AChE passano da altamente inibito, circa l'80% nei 3 mesi, al 30% nei topi più anziani. L'attività colinergica fisiologica è importante per modulare, correttamente, l'espressione di geni coinvolti nella proliferazione, differenziazione e negli eventi apoptotici necessari per modellare le diverse regioni cerebrali dell'embrione. Inoltre, è noto che il controllo del circuito colinergico è necessario anche per la corretta neurogenesi postnatale (Asrican et al. 2016). Un'alterata produzione di AChE ha mostrato un'influenza sulla regolazione di geni critici per la neurogenesi, come il fattore di crescita neurotrofica nervosa (NGF) e di diversi neuropeptidi (Betancourt, 2007;. Lee et al 2016). Inoltre, nei ratti adulti, studi di immunoistochimica hanno dimostrato che livelli di AChE ridotti, in caso di esposizione a 10 mg/kg/d con iniezioni subcutanee di CPF per 21

giorni, hanno portato ad un upregolazione di CRHBP (Corticotropin Releasing Hormone Binding Protein), e NPY (neuropeptide Y) trascrizione nella regione CA1 dell'ippocampo (Lee et al., 2016).

Inoltre, Zhang et al. (2013), studiando l'effetto delle alterazioni dei livelli di AChE sulla malattia del Parkinson, utilizzando topi acetilcolinesterasi-deficienti, ha scoperto che questi topi hanno una riduzione della perdita di neuroni dopaminergici e bassi livelli di espressione di proteine apoptotiche. Essi concludono sostenendo che, una carenza o inibizione dell'acetilcolinesterasi, può diminuire l'apoptosi e proteggere i neuroni dopaminergici nel modello animale soggetto a questa patologia. (Zhang et al., 2013).

Nei topi a 3 mesi, i nostri dati confermano questo trend; infatti l'esposizione al CPF altera drammaticamente i livelli di ACHE nel cervello murino, probabilmente interferendo con la segnalazione dei geni coinvolti nel PD, che abbiamo analizzato. I geni più colpiti, in particolare, sono coinvolti nella regolazione della trasmissione sinaptica e ubiquitinazione, portando, così, ad un'alterazione nei pathways del GABA e DOPA signaling.

In particolare, i livelli di trascrizione del recettore GABBR2, uno dei geni master nella segnalazione del GABA, sono chiaramente ridotti nel gruppo trattato con 10 mg/kg/d CPF. I recettori GABAB svolgono un ruolo importante nel mantenere l'equilibrio eccitatorio/inibitorio nelle sinapsi del cervello. Recentemente in un lavoro del 2016, Błaszczyk, ha formulato il "l'ipotesi del collasso di GABA", in cui è stato proposto che, il declino di GABA può svolgere un ruolo di primario nello sviluppo e nella progressione della malattia del Parkinson e di altre malattie neurodegenerative (Petroff, 2002;. Moore et al., 2005; Surmeier and Schumacker, 2013; Błaszczyk, 2016).

Come riportato da diversi studi, anche le persone con autismo possono mostrare livelli ridotti di GAB (B). GABBR2, in particolare, è stato trovato significativamente ridotto nel cervelletto di pazienti affetti da autismo (Fatemi et al., 2009; Oblak et al., 2010).

Nello stesso contesto si può prendere in considerazione la riduzione dei diversi trascritti coinvolti nella corretta funzionalità sinaptica come SV2B, LRRK2, Sept5, SYNGR3, SYT1, NSF e NSG1. Tutti svolgono un ruolo nella trasmissione sinaptica, modulando la corretta formazione e il conseguente rilascio di vescicole. Alterazione dell'endo ed esocitosi, con il successivo danneggiamento del traffico intracellulare, sono ricorrenti nei pazienti e nei modelli sperimentali affetti da Parkinson (Miller et al., 2006) e stanno emergendo come un collegamento meccanicistico tra molti geni PD-associati. Un indizio evidente può provenire dall'anatomia dei neuroni dopaminergici. Le cellule DA, infatti, hanno un elevato numero assonale di terminazioni sinaptiche (Oorschot, 1996;. Roberts et al., 2002) e la perdita di terminazioni nervose nelle DA sembra precedere la perdita del corpo cellulare nel PD (Fahn, 2003). Possibilmente, la morfologia di questi neuroni li rende più vulnerabile agli insulti.

Questi cambiamenti potrebbero avere, in particolare, impatto sulle cellule DA a tre mesi, compromettendo la corretta funzionalità.

Quattro dei geni attualmente conosciuti, coinvolti nella segnalazione del dopa: PARK2, PINK1, DRD2 e SLC6A3, le cui mutazioni monogeniche sono comunemente trovate in pazienti con Parkinson precoce o giovanile (Bonifati, 2014) hanno livelli trascrizionali ridotti in topi a 3 mesi esposti a 10 mg/kg/d, mentre i livelli di  $\alpha$ -sinucleina non sono alterati, cosa che accade nei soggetti parkinsoniani con malattia conclamata.

Alcuni geni del PD quali Parkin (Park2) e PINK1 condividono un ruolo nella funzionalità mitocondriale. Parkin, PINK1 insieme Park7 regolano la degradazione autofagica dei mitocondri danneggiati. Mutazioni inattivanti di questi geni, causano il parkinsonismo autosomico recessivo ereditario. Nel panorama generale di down-regulation trovato a tre mesi, osserviamo una tendenza di up-regolazione di Ubc. Ubiquitina C (UBC) è stato descritto come il gene più reattivo nello stress cellulare, anche se si sa poco circa i meccanismi molecolari che modulano la sua espressione. (Bianchi et al., 2015). L'omologo Ubc1 è stato

trovato altamente indotto nel cervello di persone affette da Alzheimer, e upregolato in cellule neuronali dopo l'esposizione al peptide 23 amiloide- $\beta$ .

Inoltre, in una recente analisi trascrittomico, livelli aumentati di UBC sono stati ritrovati nel liquido cerebrospinale di pazienti con MP (malattia di Parkinson) ed è stato considerato, insieme ad altri trascritti, come biomarker potenziale nella diagnosi del PD. (Hossein-nezhada et al., 2016).

In generale, suggeriamo che in topi a 3 mesi trattati con la massima concentrazione, l'alterazione dei livelli di trascritti di tutti questi geni potrebbe mimare una temporanea condizione d'insorgenza del Parkinson precoce.

A otto mesi, il putativo recupero generale dei livelli di trascrizione della maggior parte dei geni down-regolati è in accordo con la diminuzione d'inibizione della colinesterasi cerebrale (ora circa il 30%). Si ipotizza che questa ripresa, potrebbe dipendere da una migliore capacità disintossicante dei topi di età maggiore come riportato da diversi studi. Le differenze individuali nella capacità di detossificazione per composti organofosforici (OP), sono dovute, in gran parte, a differenze d'efficienza catalitica o relative all'abbondanza dell'enzima paraoxonase (PON1). Studi su ratti di età diverse, hanno mostrato un aumento di attività dell'enzima PON1 in topi adulti, ciò potrebbero giustificare le variazioni riscontrate tra 3 e 8 mesi. (Furlong et al., 2005).

Inoltre, le differenze sulla sensibilità di esposizione al Clorpirifos legate all'invecchiamento (vale a dire, il confronto di diverse età esposte alla stessa dose di 20 mg/kg) sono state ritrovate anche nei ratti, che, in questo studio, hanno mostrato generalmente una riduzione dell'inibizione di AChE e un minor numero di difetti comportamentali con l'aumentare dell'età (Moser et al., 1998).

In ogni caso, il miglioramento generale nel numero di trascritti genici, che rientrano nella soglia di variabilità, non sembra riguardare ATXN2, un substrato di Park2, e DRD2, il cui livello di trascrizione rimanere piuttosto diminuito. Possiamo ipotizzato che, nonostante

l'apparente ripresa generale in numero di geni studiati coinvolti nel Parkinson, una certa alterazione cellulare è ancora evidente. In particolare, i bassi livelli di DRD2 nei topi a 8 mesi esposti a 10mg/kg/d, sembrano confermare una funzionalità ancora alterata delle cellule dopa. Inoltre, i presunti problemi nella comunicazione neuronale sono confermati dalla tendenza di up-regolazione per CHGB e RGS4, due proteine che sono implicate nell'insorgenza di diverse malattie neurodegenerative.

RGS4, è un regolatore negative della segnalazione delle proteina G, specificamente espressa nel sistema nervoso (Gold et al., 1997). Di solito, questa proteina è regolata da elementi coinvolti nel sistema dopaminergico, quindi RGS4 è indotta nei pazienti parkinsoniani in cui i livelli DOPA diminuiscono (Grillet et al., 2005). L'upregolazione di RGS4, insieme con la riduzione di DRD2, sembra essere un ulteriore indizio di un'alterazione nella segnalazione di dopa. È interessante notare che recenti studi hanno suggerito che l'inibizione diretta di RGS4 può essere un nuovo bersaglio per la cura del Parkinson. (Lerner et al., 2012).

Un decremento dei peptidi CGB-derivati sono stati ritrovati nel liquido cerebrospinale di pazienti affetti da Sclerosi multipla (MS), ma Mo et al. hanno dimostrato che, in un modello murino per lo studio sulla sclerosi multipla (SM), i livelli di CGB sono elevati nei neuroni prima della comparsa dei sintomi della patologia conclamata. Inoltre, hanno suggerito che l'induzione iniziale di CGB, prima della comparsa dei sintomi, è causa di processi infiammatori. È quindi possibile che, l'esposizione di lunga durata al CPF nei topi a 8 mesi alla concentrazione più elevata, può generare uno stato simile.

Sono tornati a valori fisiologici o upregolati i trascritti di geni coinvolti nella via dell'ubiquitinazione, UBC e Ube2k, ad eccezione di Park2, il cui livello di down-regolazione non varia con l'avanzamento dell'età. È interessante notare che, UBC e Ube2k mostrano valori aumentati di quasi il doppio rispetto ai 3 mesi, imitando ciò che accade durante la progressione del PD. (Hosseini-Nzhad et al., 2016).

Inoltre, i livelli incrementati di Park7 e HSPA4, appartenenti al Parkin complex, possono, invece, essere associati ad una possibile risposta adattativa allo stress cronico indotto dall'esposizione al pesticida. Entrambi i geni sono considerati neuroprotettori e possiamo ipotizzare che, durante l'invecchiamento, l'espressione più alta di Park 7 e HSPA4 potrebbe essere richiesta dai neuroni per stabilizzare i livelli di Pink1 e per proteggere le cellule dallo stress ossidativo e dall'apoptosi (Jaramillo-Gómez et al., 2015; Hauser et al., 2016). Inoltre la proteina HSPA4, membro della famiglia HSP70, ha un ruolo importante nella degradazione delle proteine mal ripiegate.

I risultati, a 8 mesi, fanno luce su un possibile meccanismo attraverso il quale il CPF, a dosi ambientali, può causare alterazioni nella segnalazione cellulare che, con l'invecchiamento, può indurre patologie neurodegenerative.

In generale, l'eziologia del PD e i sintomi clinici in fase iniziale non sono chiaramente visibili. Anche se non sono stati osservati i sintomi tipici del Parkinson nei nostri topi, i risultati sembrano suggerire che la neurotrasmissione dopaminergica e l'integrità mitocondriale sono i target principali dei pesticidi organofosforici ed entrambi possono essere considerati come biomarcatori sensibili all'esposizione, contribuendo allo spettro globale di neurotossicità.

## **Capitolo 4:**

**Possibili problemi a carico degli spermatozoi e valutazione degli effetti sul tasso di fecondazione nei mammiferi, usando *Bos taurus*.**

## **4.1 MATERIALI E METODI**

### **4.1.1 Prelievo ovaie e trasporto in laboratorio**

La procedura utilizzata consiste nel recupero di ovaie al momento della macellazione degli animali, presso il macello Straccione di San Marcellino. Il trasporto in laboratorio viene effettuato in contenitori sterili a secco in borsa termica alla temperatura di 30°C. Tale raccolta deve avvenire entro 30 min dall'eviscerazione ed è fondamentale che il materiale sia raccolto e trasportato in laboratorio in un periodo di tempo relativamente breve (circa 3 ore) (Leibfried-Rutledge et al., 1987). La temperatura di trasporto sembra rappresentare un punto cruciale per l'effettivo risultato positivo dell'esperimento e il suo eventuale abbassamento al di sotto dei 30°C potrebbe compromettere la possibilità di una successiva maturazione e sviluppo *in vitro* (First and Parrish, 1987).

### **4.1.2 Aspirazione del fluido follicolare e maturazione ovocitaria**

Una volta in laboratorio, si procede all'aspirazione del fluido follicolare dalle ovaie che viene eseguita con un aspiratore automatico, raccogliendo i follicoli recuperati in coniche falcon da 15 ml, e poi lasciati sedimentare per circa 10 min in incubatore a 38.8°C, 5% CO<sub>2</sub>. I follicoli con un diametro di 2-8 mm vengono aspirati, mentre vengono scartati quelli con diametro superiore ed inferiore a tale range. Di fatto i follicoli con diametro inferiore ai 2 mm contengono alte percentuali di ovociti atresici, mentre quelli con diametro maggiore di 10 mm presentano spesso ovociti degenerati. Pertanto i follicoli che sembra permettano un recupero maggiore di ovociti sono quelli con diametro compreso nel range sopra indicato (Lonergan et al. 1994).

Il sedimento ottenuto viene distribuito in capsule Petri da 10 cm, grigliate e preriscaldate per eseguire lo screening dei complessi cumulo ooforo – ovocita (COC) allo stereomicroscopio su piastra riscaldata. La procedura di screening viene eseguita in un ambiente preriscaldato in modo da evitare sbalzi termici e in condizioni di completa sterilità, utilizzando materiale aperto sotto cappa biologica a flusso verticale. I COCs recuperati vengono lavati 3 volte in mezzo di lavaggio

(Medium 199-4530, Hepes sale sodico 10 mM, Polyvinyl Alcool (PVA) 0,5 mg/ml, Gentamicina 50 µg/ml) e 1 volta in mezzo di maturazione Epidermal Growth Factor (EGF) free (M199 4530, Gentamicina 50 µg/ml, FBS 10%) per eliminare il fluido follicolare.

In seguito, i COCs vengono trasferiti in piastre multi-well da 4 pozzetti di tipo nunc contenenti 500 µl di mezzo di maturazione EGF free in attesa di terminare lo screening, in modo da evitare differenze nei tempi di maturazione tra un ovocita e l'altro. Una volta concluso lo screening, i COCs vengono lavati 1 volta in mezzo di maturazione contenente EGF (M199 4530, Gentamicina 50 µg/ml, FBS10%, EGF 10 ng/ml). Segue trasferimento dei COCs in pozzetti multi-well contenenti 500 µl di mezzo di maturazione ed incubazione a 38.8°C, 5% CO<sub>2</sub> per 22-24h.

#### **4.1.3 Scongellamento del liquido seminale**

Il seme utilizzato, proviene da tori donatori, di provata fertilità, acquistato presso l'INSEME ITALY (S. Giuliano Saliceta, Modena) e si trova all'interno di paillettes, ovvero congelato in azoto liquido in sottili tubi di cloruro di polivinile, che offrono un vantaggioso rapporto superficie-volume, consentendo un rapido ed omogeneo congelamento. Vengono scongelate 3 paillettes di seme bovino appartenente a 3 tori diversi, al fine di avere una maggiore eterogeneità del campione. Lo scongelamento viene eseguito tramite passaggio diretto dall'azoto liquido all'acqua calda, alla temperatura di 38.8°C. La tecnica di scongelamento rapido evita danni alle strutture cellulari. Il contenuto di ciascuna paillette viene raccolto in una provetta a fondo conico da 15 mL e un'aliquota di 10 µl viene utilizzata per l'osservazione al microscopio ottico, al fine di verificare che gli spermatozoi non abbiano subito alterazioni della motilità in seguito allo scongelamento.

Il liquido seminale recuperato viene centrifugato a 1100 rpm per 10', in centrifuga ALC da banco, utilizzando come mezzo di lavaggio lo SpermTalp BSA-free [Tyrode's Solution Stock (NaCl 114 mM, KCl 3,22 mM, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>\* H<sub>2</sub>O 0,3 mM, CaCl<sub>2</sub>\* 2H<sub>2</sub>O 0,1 mM, MgCl<sub>2</sub>\* 6H<sub>2</sub>O

0,49 mM e Rosso Fenolo 10 mg/L), NaHCO<sub>3</sub> 25,78 mM, Lattato 22 mM e Hepes H3375 6.71 mM] supplementato al momento dell'utilizzo con Piruvato 1,03 mM e Gentamicina 50µg/ml.

Dopo la rimozione del surnatante, il pellet ottenuto viene risospeso in 1 ml di mezzo di Fecondazione [Tyrode's Solution Stock (NaCl 114 mM, KCl 3,22 mM, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>\* H<sub>2</sub>O 0,3 mM, CaCl<sub>2</sub>\* 2H<sub>2</sub>O 2,1 mM, MgCl<sub>2</sub>\* 6H<sub>2</sub>O 0,49 mM e Rosso Fenolo 10 mg/L), NaHCO<sub>3</sub> 25,78 mM e Lattato 22 mM] supplementato al momento dell'utilizzo con Piruvato 1,03 mM, Gentamicina 50µg/mL, BSA EFAF 6mg/mL.

Vengono valutate la concentrazione spermatica, tramite conta degli spermatozoi con la camera di Bürker e la motilità mediante l'ausilio del sistema computerizzato SCA e della camera di Makler.

#### **4.1.4 Trattamento con CPF**

Le sospensioni spermatiche alla concentrazione di  $2 \times 10^6$  spm/ml sono sottoposte per due ore al trattamento con CPF. Per ogni esperimento, è stata pesata una quantità compresa fra 2 e 3 mg di CPF (SIGMA 45395) sciolta poi in un opportuno volume di acetone, al fine di ottenere le concentrazioni desiderate per il trattamento. Le concentrazioni di CPF usate nei vari esperimenti sono state: 1µg/ml, 5µg/ml, 10µg/ml, 25µg/ml, 50µg/ml. Le sospensioni spermatiche sono state trattate con CPF alle diverse concentrazioni per 2h. Inoltre, per ogni esperimento è stato effettuato un controllo (CONTR) ossia una sospensione spermatica trattata con acetone, veicolo nel quale è disciolto il CPF, alla concentrazione massima utilizzata nei campioni trattati. La presenza di acetone, in esperimenti preliminari, non ha mostrato alcuna differenza rispetto ad un campione controllo a cui non era stato aggiunto acetone.

#### **4.1.5 Valutazione della motilità e dei parametri cinetici**

Ad ogni ora, aliquote da 10 µl delle sospensioni spermatiche controllo o trattate con CPF sono state caricate su una camera di Makler ed analizzate su un tavolino riscaldato a 39°C mediante un microscopio

invertito Nikon TE 2.000, collegato ad una telecamera Basler Vision Technology A312 FC con un contrasto di fase positivo, utilizzando un obiettivo 10x. In particolare, sono stati acquisiti ed analizzati quattro campi ed almeno 400 cellule. La valutazione delle motilità totale e progressiva e dei parametri cinetici, ossia velocità curvilinea (VCL), velocità progressiva (VSL), e velocità media del percorso (VAP), è stata effettuata con il sistema SCA (SCA Microptic SL Barcellona, Spagna).

#### **4.1.6 Fecondazione**

Dopo 22-24 h di maturazione, i COCs vengono lavati 3 volte in mezzo di lavaggio e 1 volta in mezzo di fecondazione. Al termine dei lavaggi, i COCs vengono trasferiti in gruppi di 50 in pozzetti multi-well contenenti 250 µl di mezzo di Fecondazione, in incubatore a 38.8°C, 5% CO<sub>2</sub>. In seguito vengono aggiunti ad ogni pozzetto 250µl di rispettiva sospensione spermatica relativa al campione controllo e ai campioni trattati con CPF 10µg/ml, 25µg/ml, 50µg/ml , con l'aggiunta di eparina 100µg/ml, così da ottenere una concentrazione spermatica finale di 2x10<sup>6</sup> di spermatozoi motili/ml. I COCs così inseminati vengono incubati a 38.8°C, 5% CO<sub>2</sub>, 95% umidità, per 22-24 ore.

##### **24.1.6.1 Denudazione e sviluppo embrionale**

A 22-24 ore dalla fecondazione si procede alla rimozione delle cellule del cumulo ooforo dagli zigoti. Questa operazione viene eseguita meccanicamente: gli zigoti vengono trasferiti in coniche da 15ml contenenti 1ml di mezzo di lavaggio e vortexati per 2 min. Al termine si verifica l'avvenuta denudazione tramite osservazione al microscopio; in caso contrario si utilizza un metodo alternativo che si basa sull'uso di una particolare pipetta, la Flexi-Pet, con puntali ad ago con un diametro di 130 µm. Quindi, gli zigoti circondati da resti di cellule del cumulo vengono aspirati e rilasciati ripetutamente in modo da provocarne il distacco. Seguono 3 lavaggi in mezzo di lavaggio e 1 lavaggio nel mezzo di coltura embrionale Synthetic Oviductal Fluid (SOF) [trisodio citrato 0.34mM, mioinositolo 2.77mM, stock A (NaCl 1076,3 mM, KCl 71,6 mM, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 11,9 mM, MgSO<sub>4</sub>\* 7H<sub>2</sub>O 15,1 mM, Lattato 46,5 mM), stock B (NaHCO<sub>3</sub> 250 mM,

Rosso Fenolo 100 µg/ml), stock C (Piruvato 727 mM) e Stock D (CaCl<sub>2</sub> \* 2H<sub>2</sub>O 178 mM), BME 3%, MEM 1%, glutammina 0.20 mM, gentamicina 50 µg/ml] supplementato al momento dell'utilizzo con FCS 5%.

L'incubazione viene effettuata in pozzetti multi-well contenenti 700 µl di mezzo SOF in un minincubatore ad atmosfera modificata a 38.8°C, 5% CO<sub>2</sub>, 5% O<sub>2</sub> e restante parte di azoto; viene aggiunto mezzo nell'intercapedine, per evitare l'evaporazione.

Dopo 72 ore dall'inseminazione gli zigoti vengono osservati al microscopio invertito Nikon Eclipse TE2000-U in modulazione di contrasto per valutare le percentuali di fecondazione e le percentuali di embrioni a 8 cellule, al fine di rilevare possibili differenze tra i campioni trattati e controllo. Le percentuali di fecondazione sono espresse come numero di ovociti fecondati/numero di ovociti totali. Le percentuali di embrioni a 8 cellule sono espresse come numero di embrioni a 8 cellule/numero di ovociti fecondati

#### **4.1.7 Valutazione del grado di frammentazione del DNA, Tunel su spermatozoi**

*Fissazione:* Il campione controllo è stato diviso in due aliquote, una fissata a tempo 0, l'altra, insieme ai campioni trattati è, invece, fissata, dopo le 2 ore di trattamento.

Ogni aliquota è stata centrifugata a 1100 rpm per 10 minuti, eliminato il surnatante, poi, sono stati aggiunti circa 500 µl di soluzione fissativa (paraformaldeide Sigma al 4 %), che agisce per 30 minuti a temperatura ambiente. La paraformaldeide è un poliossimetilene oligomero della formaldeide, ha un elevato potere di penetrazione, agisce formando legami crociati con gli amminoacidi delle proteine ed è inoltre in grado di preservare la morfologia delle cellule e la reattività delle macromolecole.

Al termine della fissazione sono stati effettuati 3 lavaggi in tampone fosfato salino PBS 1x (1.5 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 154 mM NaCl, 2.7 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> in acqua milliQ). I campioni sono stati diluiti in PBS 1x fresco e, così, "spottati" sui vetrini, e lasciati essiccare a temperatura ambiente.

*Permeabilizzazione:* Su ogni spot è stata aggiunta la soluzione permeabilizzante (0.1 % Triton X-100 in 0.1 % di sodio citrato) e i vetrini sono stati, poi, lasciati su ghiaccio per 5 minuti. Il Triton X-100 (Sigma) è un tensioattivo non ionico utilizzato generalmente, insieme a detergenti come il CHAPS, per solubilizzare le proteine di membrana nel loro stato nativo, ed è inoltre impiegato per permeabilizzare le membrane della cellula eucariotica. Al termine del processo di permeabilizzazione, l'eccesso di detergente è stato allontanato mediante 3 lavaggi dei vetrini con PBS 1x.

*Tunel:* Ai campioni sono stati aggiunti 50 µl (per spot) di miscela TUNEL 1:10 (5 µl di soluzione enzimatica TdT e 45 µl di miscela di nucleotidi) e poi sono stati coperti con parafilm per evitare l'essiccazione. I campioni così preparati sono stati poi incubati in una camera umida, al buio, per 1h a 37 °C.

*Marcatura con Hoechst:* Si è proseguito, poi, con i lavaggi dei vetrini in PBS 1x, per eliminare l'eccesso di miscela TUNEL, e con la colorazione con Hoechst 33342 (Sigma) 10 µg/ml, per 7 minuti a temperatura ambiente.

L'Hoechst è un colorante specifico per le regione ricche in A-T del DNA, presenta un picco di eccitazione a 340 nm e un picco di emissione a 510 nm. E' in grado di colorare sia cellule vitali che non vitali in tal modo, quindi, l'intera popolazione cellulare appare marcata di blu. Infine, dopo lavaggi in PBS 1x per allontanare il colorante in eccesso, si è proseguito con l'osservazione al microscopio a fluorescenza. Il fluorocromo FITC presenta un picco di eccitazione a 475 nm nel blu ed un picco di emissione a 550 nm nel verde. Un'analisi statistica significativa, per il calcolo della percentuale di DNA danneggiato, richiede l'analisi di almeno 200 cellule per ogni campione.

#### **4.1.8 Ibridazione in situ (FISH) sui cromosomi sessuali**

##### *-Fissazione*

Dopo il trattamento degli spermatozoi con il CPF 10 µg/ml, 25 µg/ml e 50 µg/ml, sono stati eseguiti 3 lavaggi in PBS 1X. In seguito, gli spermatozoi sono stati strisciati sui vetrini e fatti asciugare all'aria. I vetrini sono stati poi fissati con una soluzione 3:1 di Etanolo 100% e Acido acetico e lasciati over night a temperatura ambiente in tale soluzione. Sono stati poi lasciati ad asciugare all'aria.

##### *-Decondensazione e denaturazione*

Per la decondensazione è stata usata un'apposita soluzione di decondensazione su ogni vetrino composta da Papaine/ DTT / Tris HCL 2M ph8 / H<sub>2</sub>O.

Ogni vetrino è stato coperto con un coprioggetto. Dopo 5 minuti, i vetrini sono stati lavati in acqua, asciugati ed osservati. I vetrini sono stati poi lavati per 2 minuti con Etanolo 70%, 90% e 100% a temperatura ambiente e asciugati rapidamente. Vi sono stati aggiunti 10ul di sonda (è stato preparato un pool delle 2 sonde da usare (sonda x e sonda y) e di una mix d'ibridazione), sono stati coperti con coprioggetto, sigillati e posti a 72°C/ 16min in Hybridizer, adattato per vetrini (denaturazione) e poi over night a 37°C.

##### *- Preparazione e aggiunta dell'anticorpo secondario*

I vetrini sono stati lavati in agitazione dopo aver rimosso il coprioggetto in SSC 2x; sono stati poi incubati a 72°C/ 4 min in SSC 0.4x preriscaldato. In seguito sono stati spostati in PBT. Nel frattempo è stato preparato l'anticorpo secondario: 300ul di PBT, 1.5ul di anti digossigenina e 1.5 ul di streptavidina.

Sono stati usati 100 ul dell'anticorpo su ciascun vetrino; è seguita l'applicazione del coprioggetto e incubazione per 1 h a 37°C.

- *Rivelazione:*

Sono stati effettuati 3 lavaggi di 6 minuti ciascuno con PBS-Tween e ogni vetrino è stato montato con aggiunta di una goccia di Vectashield (senza Dapi). Dopo l'applicazione del coprioggetto, è seguita l'osservazione al microscopio a fluorescenza.

#### **4.1.9 Analisi di metilazione sul gene XIST e GNAS**

##### **4.1.9.1 Estrazione DNA spermatico**

I campioni controllo, CPF 10µg/ml e 25 µg/ml, dopo analisi della motilità totale e progressiva e dei parametri cinetici, sono stati sottoposti all'estrazione del DNA spermatico. È stato seguito un protocollo particolare, in quanto le metodiche di estrazione convenzionali sono risultate non idonee in questi esperimenti a causa di una maggiore sensibilità del seme scongelato alla degradazione rispetto al seme fresco.

Dopo 2 lavaggi dei campioni in PBS1X a 6000 rpm per 5 minuti, è stato aggiunto Buffer di lisi (Tris HCL pH 7,5 (1M); EDTA (0,5M); SDS 10% (10%); NaCl (5M); in H<sub>2</sub>O). Sono stati poi aggiunti DTT 1M, proteinasi k (PK) 0,2 mg/ml, glicogeno 25µg/ml. È seguita incubazione overnight a 55°C.

Il giorno successivo dopo l'aggiunta di RNasi A 25µg/ml, i campioni sono stati incubati in bagnetto caldo 1h a 37°C, in seguito è stata aggiunta PK 200µg/ml e i campioni sono stati incubati nuovamente in bagnetto caldo 1h a 42°C. Si è proceduto poi con i seguenti step:

-centrifuga a vuoto a 16000g per 30 secondi,

-aggiunta di 1 volume di Fenolo,

-agitazione per inversione,

-centrifuga a 12000g per 5 minuti,

-aggiunta di 1 volume di Fenolo-Cloroformio,

-agitazione per inversione,

-centrifuga a 12000g per 5 minuti.

La fase acquosa è stata quindi trasferita in una eppendorf da 1,5 ml, è stato aggiunto NaCl 0,2M, i campioni sono stati agitati per inversione e sono stati aggiunti 2,5 volumi di Etanolo 100% freddo; infine, in seguito ad agitazione per inversione, i campioni sono stati incubati over night a 20°C.

Il giorno successivo, i campioni sono stati centrifugati a 5250g per 30 minuti a 4°C, ed è stato aggiunto Etanolo 70% freddo. Dopo una centrifuga a 5250g per 30 minuti a 4°C, i campioni sono stati lasciati ad asciugare sotto lampada; infine ai campioni è stato aggiunto buffer tris EDTA (TE) pH8 ed è seguita l'incubazione over night a 4°C.

#### **4.1.9.2 Conversione del DNA con bisolfito**

Per valutare lo stato di metilazione del DNA, questo è stato sottoposto ad un trattamento con sodio bisolfito, che converte la citosina in uracile, ma non è in grado di convertire la 5-metilcitosina, in questo modo, tutte le citosine rilevate al sequenziamento, rappresentano siti di metilazione.

Per ogni campione è stato usato una stessa concentrazione di DNA di partenza (1 $\mu$ g) in volume finale di 18  $\mu$ l di TE. I campioni sono stati denaturati a 100°C per 5 minuti, sono stati aggiunti 2  $\mu$ l di NaOH 2N e infine sono stati incubati in bagnetto caldo per 15 minuti a 37°C. I campioni sono poi stati spostati su ghiaccio e vi è stata aggiunta la soluzione di bisolfito di sodio (Bisolfito 5,7g, Idrochinone 165mg, 2,16 ml di NaOH 2N in H<sub>2</sub>O a volume finale =7,5ml), filtrata con un filtro da 0,45  $\mu$ M, a causa dell'Idrochinone che si scioglie difficilmente. Sono state aggiunte 2 gocce di olio per evitare evaporazione, le quali, in seguito ad incubazione per 4h a 55°C, sono state rimosse. A questo punto il materiale è stato trasferito su colonnine

Promega (MethylEdge bisulfite conversion system, Promega 1301), che sono state poste su un apposito macchinario che ha la medesima funzione di una pompa a vuoto a diverse aperture, in cui su ogni apertura è posizionata una colonnina Promega caricata con un campione convertito con bisolfito, questa pompa presenta dei rubinetti, che, in seguito all'apertura, garantiscono l'aspirazione della soluzione mentre il DNA rimane intrappolato nella membrana della colonnina.

Dopo l'aggiunta di 1 ml di resina fornita dal kit Promega, sono stati effettuati due lavaggi con isopropanolo 80% (-20°C), aprendo i rubinetti di ogni tubo e lasciando asciugare prima e dopo ogni lavaggio. Dopo il trasferimento del filtro contenente il DNA in una nuova eppendorf da 1,5ml, è stata effettuata la centrifuga a 2000 giri per 2 minuti, per eliminare i residui di isopropanolo. Sono stati poi ripetuti per 2 volte l'aggiunta di H<sub>2</sub>O (100°C) e la centrifuga a 12000g per 2 minuti a 20°C in modo da far eluire il DNA. Una volta rimosso il filtro, è stato aggiunto 4 ul NaOH 3N e i campioni sono stati incubati 15 minuti a 37°C. Dopo l'aggiunta di 22 ul di Acetato di ammonio 6M, 1 ul di glicogeno e 250 ul di Etanolo 100% (-20°C), i campioni sono stati incubati over night a -20°C. Il giorno seguente è stata effettuata una centrifuga a 15000g per 45 minuti a 4°C; dopo l'eliminazione del surnatante e l'aggiunta di 1 ml di Etanolo 70%, senza risospendere il pellet, i campioni sono stati nuovamente centrifugati a 15000g per 20 minuti a 4°C. Il pellet è stato poi lasciato ad asciugare, risospeso in 20 ul di H<sub>2</sub>O e conservato a -20°C.

#### **4.1.9.3 PCR**

Dopo conversione con bisolfito, sono state amplificate per PCR due regioni del promotore del gene XIST adiacenti tra di loro, che sono state siglate come "XIST1" e "XIST2", e 3 regioni del promotore di GNAS. I primer sono stati disegnati mediante software PyroMark Assay Design 2.0 (Qiagen product no. 9019062). Le sequenze dei primers usati per la PCR sono (Tab.4.1):

<b>Gene name</b>	<b>Oligo Sequence</b>
XIST1 FOR XIST 1 REV	GGGTGTTTTTGTGTTTAGTGTTAG ACAAAATCAACCATATTATCCCTACAA
XIST2 FOR XIST2 REV	TTTTTGATAGGTTTTGTTGTAGGGATAAT TAACATTACCAATCCCTCCTTCACT
GNAS1 FOR GNAS1 REV	AGAGAAATTAGTTTTAAATTAGTTGGTTAT AAGTATTTGGAGTTTGGAGTTTAGGATT
GNAS2 FOR GNAS2 REV	TGGAGTTTGGAGTTTAGGATT AATTATTTGTGTTTGGAGGGTAAG
GNAS3 FOR GNAS3 REV	TTTGTGTTTGGAGGGTAAGTAGAG TGGATATATTTTGGTTGGAGAG

Tabella 4.1: sequenze dei primers utilizzati per il pirosequenziamento

I PR sono biotinilati per permettere il riconoscimento da parte della biglia magnetica ricoperta di streptadivina, utilizzata nel prossimo step dell'esperimento.

Per ogni campione sono state allestite 2 reazioni con volume finale di 50  $\mu$ l, utilizzando il kit PyroMark PCR (Qiagen product no. 978703).

#### **4.1.9.4 Pirosequenziamento**

In ogni pozzetto della plate, sono stati inseriti 20  $\mu$ l del prodotto della precedente PCR e 60  $\mu$ l di una sospensione costituita da 48  $\mu$ l di biglie magnetiche ricoperte da streptadivina, 960  $\mu$ l di binding buffer Qiagen (necessario a far avvenire la reazione di legame della biglia magnetica alla biotina coniugata ai primer utilizzati per l'amplificazione mediante PCR) e 432  $\mu$ l di  $H_2O$ .

La piastra è stata coperta con un film e vortexata per 10 minuti in modo da permettere l'adesione delle biglie magnetiche all'amplificato. In seguito c'è stata la "cattura" delle biglie da parte del macchinario.

I campioni sono poi stati trasferiti in apposite vaschette (fig 3.5.4.4) e incubati in etanolo 70% per 5 secondi, poi in agente denaturante (Pyro Marker denaturation solution Qiagen) per 5 secondi ed infine in Washing buffer Qiagen per 10 secondi.

Le biglie sono state poste nella piastra con i primers per il sequenziamento (0,3 $\mu$ M in un volume di 324  $\mu$ l di buffer annealing Qiagen, 0,97  $\mu$ l di Primer seq dallo stock 100 pmol/ $\mu$ l, di tale

soluzione sono stati utilizzati 25 ul per pozzetto).

I primers utilizzati (Tab. 4.2) per il sequenziamento sono stati disegnati mediante l'ausilio del software usato in precedenza:

Gene name	Oligo Sequence
XIST1 seq	GGTAGAAATATTTTGTTATATAG
XIST2 seq	GATATTGTGGTAGGGGTG
GNAS1 seq	GGAAAGTAGGGT
GNAS2 seq	GGGGTTAGAGAT
GNAS3 seq	TAGTTGGTTTGATGG

Tabella 4.2: elenco dei primers utilizzati per il pirosequenziamento

La piastra è stata riscaldata 2 minuti a 90°C e in seguito lasciata raffreddare per 5 minuti.

Dopo il raffreddamento, la piastra è stata inserita nell'apposito macchinario (PyroMark Q24 pyrosequencer, Qiagen product no.9001514). Il processo è stato eseguito per entrambe le regioni del promotrici di XIST e GNAS.

#### **4.1.10 LUMA: luminometric methylation assay**

Il LUMA è una tecnica che si basa sull'utilizzo di due enzimi isoschizomeri uno metil-sensibile (HpaII) e l'altro che digerisce siti metilati e non metilati (MspI), ed un terzo enzima EcorI che viene utilizzato come normalizzatore. Dopo l'analisi al pyrosequencer (PyroMark Q24 pyrosequencer, Qiagen product no.9001514) è possibile valutare i livelli di metilazione globali del DNA analizzato. Il LUMA è una tecnica altamente riproducibile e affidabile.

Il DNA dei vari campioni esaminati, è stato incubato per 4 ore a 37°C ad una concentrazione di 500 ng, insieme con i 3 enzimi di restrizione:

Hpa II	X16	Msp I	X16
Tp cutsmart	48ul	Tp cutsmart	48ul
Ecor I	6ul	Ecor I	6ul

Hpa II	12ul	Msp I	6ul
H2O	174ul	H2O	180ul

Dopo le 4 ore vengono preparate le piastre per effettuare l'analisi in duplicato. Prima di avviare la corsa sono aggiunti nucleotidi enzima e substrato. E=180ul, S=180ul, H2O=180ul, A=90ul, T=90ul, C+G= 45ul +45 ul. Ogni corsa è durata 11 minuti.

### **2.3.11 Analisi statistica**

I risultati riguardanti le analisi di motilità, parametri cinetici e pirosequenziamento sono stati validati statisticamente mediante ANOVA test. Invece, i dati ottenuti dalla Tunel e la FISH sono stati analizzati statisticamente mediante Fisher test. Una probabilità  $p < 0.05$  è considerata significativa; una probabilità  $p < 0.01$  è considerata altamente significativa.

## 4.2 RISULTATI

### 4.2.1 Effetto del CPF sulla motilità e cinetica spermatica

L'analisi della motilità totale e progressiva, effettuata mediante l'ausilio del sistema computerizzato SCA, ha mostrato, già per i campioni controllo, riduzioni significative di entrambe le motilità in seguito all'incubazione per 1 e 2 ore a 37°C rispetto al campione a tempo 0 (motilità totale: CONTR tempo 0 = 78,9% ± 6,6%, CONTR 1H = 65,4% ± 9,8%, CONTR 2H = 59,2 ± 9,9%, 0 vs 1H e 0 vs 2H, P<0,01; motilità progressiva: CONTR tempo 0 = 74,2 ± 7,7% , CONTR 1H = 61,9 ± 10,5% , CONTR 2H = 55,8 ± 10,3%, 0 vs 1H P<0,05 e 0 vs 2H P<0,01). Il decremento di motilità, a partire da un'ora di incubazione, osservato nelle sospensioni spermatiche controllo è da attribuire al tipico comportamento degli spermatozoi bovini sottoposti a procedure di congelamento/scongelo.

Per quanto riguarda i campioni trattati con le diverse concentrazioni di CPF, ad 1 ora di incubazione solo la concentrazione più alta, pari a 50ug/ml, è in grado di determinare un decremento altamente significativo della motilità totale e progressiva, rispetto al relativo controllo (motilità totale: CONTR 1H=65,4% ± 9,8% vs CPF 50ug/ml 1H= 41,3% ± 16,7% P<0,01; CONTR 2H = 59,2% ± 9,9%, CPF 10ug/ml 2H=40,3% ± 11,3%, CPF 25 ug/ml 2H=38,6% ± 11%, CPF 50ug/ml 2H=26% ± 13,6%, CONTR 2H vs CPF 10,25 e 50 ug/ml P<0,01; motilità progressiva: CONTR 1H= 61,9 ± 10,5% vs CPF 50ug/ml 1H= 35,3 ± 18,2% P<0,01; CONTR 2H = 55,8 ± 10,3%, CPF 10ug/ml 2H=36,8% ± 12,8%, CPF 25 ug/ml 2H=34,3% ± 11,3%, CPF 50ug/ml 2H=19,5% ± 14%, CONTR 2H vs CPF 10,25 e 50 ug/ml P<0,01) (Fig. 4.1).

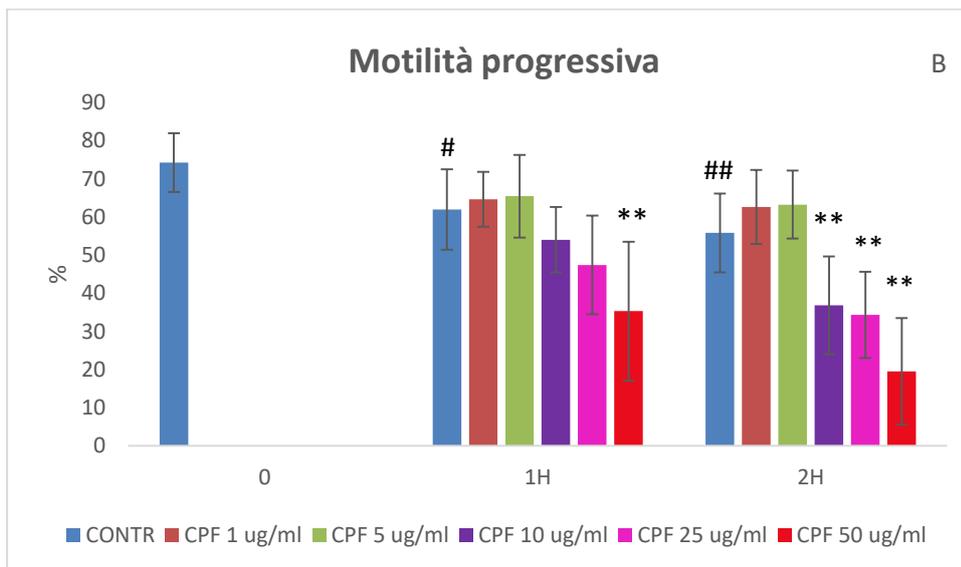
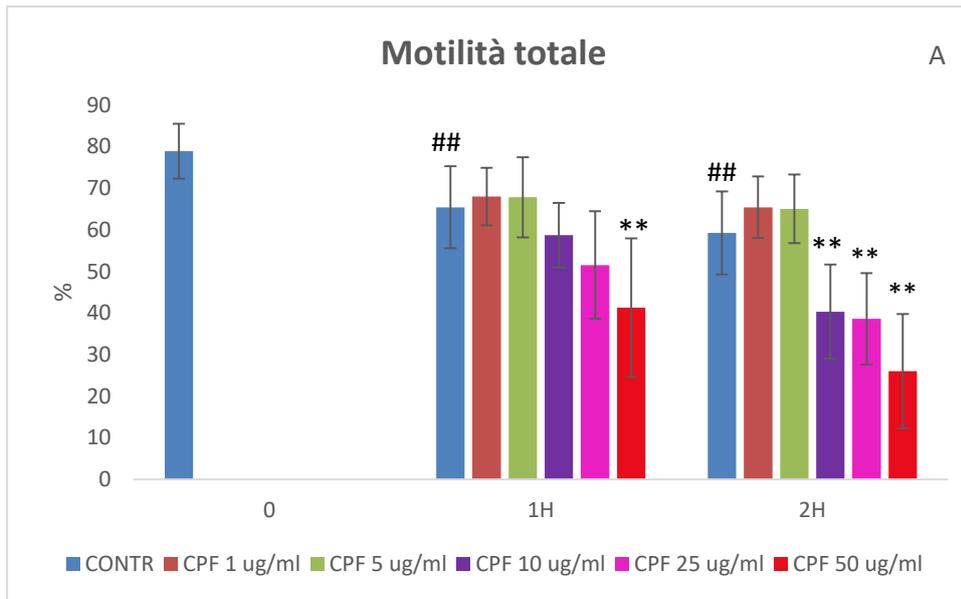
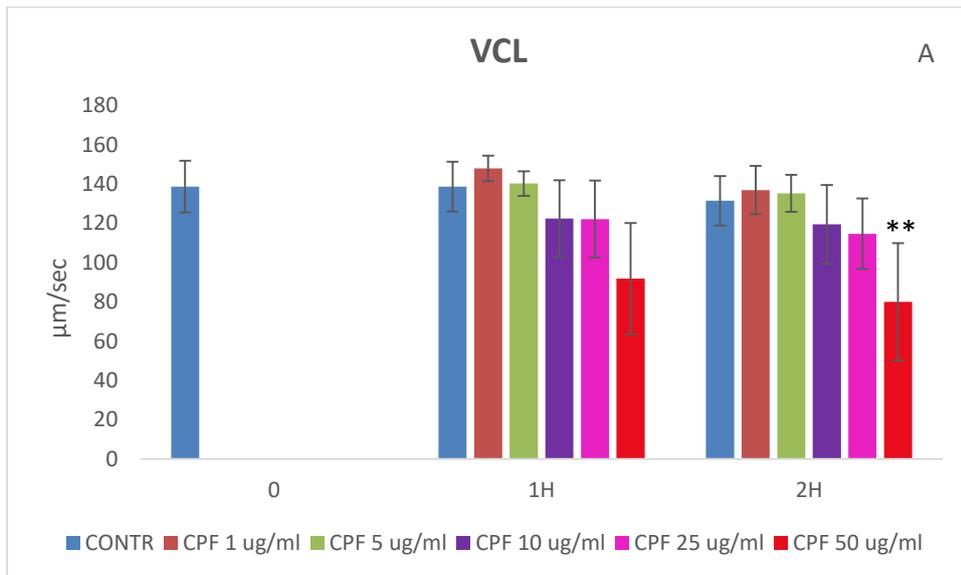


Fig.4.1: Effetti del CPF sulla motilità totale (A) e sulla motilità progressiva (B) degli spermatozoi. # e ## differenze significative ed altamente significative rispetto al controllo tempo 0 (P<0,05; P<0,01); \*\* altamente significative rispetto al corrispondente controllo (P< 0,01).

Anche l'analisi dei parametri cinetici ha mostrato un incremento significativo di VSL e VAP nei campioni controllo già a partire da un'ora di incubazione rispetto al tempo 0, (VSL: CONTR tempo 0 = 80,6 ± 12, CONTR 1H = 100,5 ± 15,5, CONTR 2H = 99,7 ± 14; 0 vs 1H e 0 vs 2H, P<0,01;

VAP: CONTR tempo 0 =  $90,5 \pm 18$ , CONTR 1H =  $106,6 \pm 15,1$ , CONTR 2H =  $103,1 \pm 15,3$ ; 0 vs 1H e 0 vs 2H,  $P < 0,05$ ). Un decremento altamente significativo di tutti e tre i parametri cinetici rispetto al corrispondente controllo è osservabile solo in seguito al trattamento con la concentrazione più alta di CPF. Questo decremento è molto più evidente a due ore di incubazione (VSL: CONTR 1H =  $100,5 \pm 15,5$ , 50 ug/ml 1H =  $65,7 \pm 18,8$ , CONTR 2H =  $99,7 \pm 14$ , 50 ug/ml 2H =  $58,7 \pm 22,6$ ; CONTR 1H vs 50ug/ml 1H,  $P < 0,01$ , CONTR 2H vs 50ug/ml 2H,  $P < 0,01$ ; VAP: CONTR 1H =  $106,6 \pm 15,1$ , 50ug/ml 1H =  $69,9 \pm 20,1$ , CONTR 2H =  $103,1 \pm 15,3$ , 50ug/ml 2H =  $62,5 \pm 23,4$ ; CONTR 1H vs 50ug/ml 1H,  $P < 0,01$ , CONTR 2H vs 50ug/ml 2H,  $P < 0,01$ ; VCL: CONTR 2H =  $131,5 \pm 12,7$  vs 50ug/ml 2H =  $80 \pm 29,4$ ,  $P < 0,01$ ) (fig.4.2).



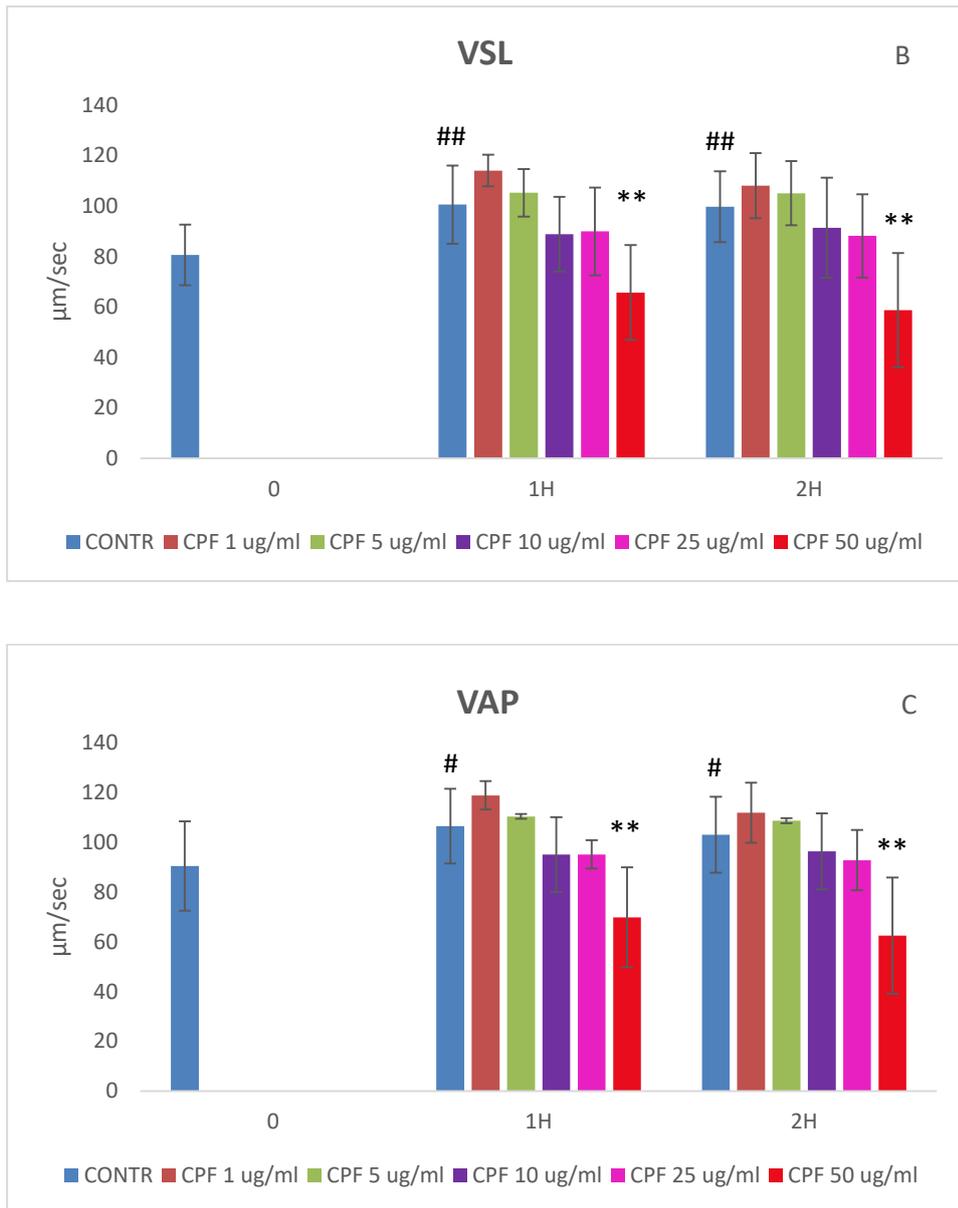


Fig. 4.2: Effetti del CPF sulla cinetica spermatica. (A) Velocità curvilinea (VCL) (B) Velocità lineare (VSL). (C) Velocità media della traiettoria (VAP). # e ## differenze significative ed altamente significative rispetto al controllo tempo 0 ( $P < 0,05$ ;  $P < 0,01$ ); \*\* altamente significative rispetto al corrispondente controllo ( $P < 0,01$ ).

#### 4.2.2 Effetto del CPF sulla frammentazione del DNA

L'effetto del CPF è stato valutato non solo sulla motilità e sulla cinetica spermatica, ma anche sulla frammentazione del DNA. A questo scopo le sospensioni spermatiche controllo a tempo 0

ed i campioni controllo, 10ug/ml, 25ug/ml, 50ug/ml, a 2 ore, sono stati sottoposti a TUNEL Assay.  
(fig.4.3).

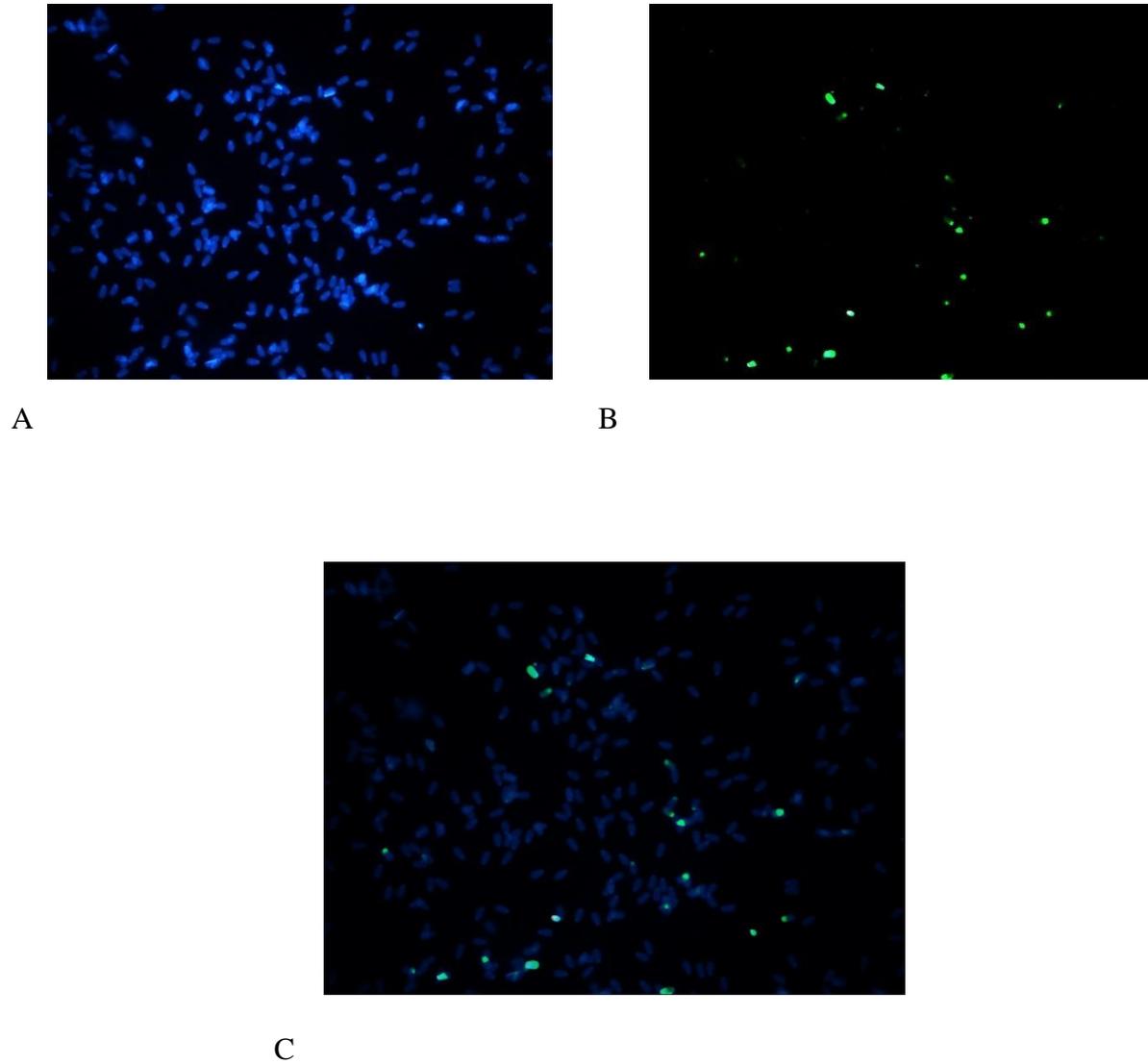


Fig. 4.3: (A)Spermatozoi marcati con Hoechst. (B)Spermatozoi TUNEL positivi. (C)Merge.

I risultati sull'analisi preliminare, condotta sui campioni controllo, hanno mostrato che dopo 2 ore di incubazione a 37°C si verifica un fisiologico aumento, altamente significativo, della percentuale di nuclei con DNA frammentato (CONTR tempo 0= 10,1% vs CONTR 2H= 16,4% P<0.01).

Per quanto riguarda i campioni trattati con pesticida, dopo due ore di incubazione, solo le concentrazioni di CPF 25 e 50ug/ml sono in grado di determinare un aumento, rispettivamente in maniera altamente significativa e significativa, della percentuale di nuclei con DNA frammentato, rispetto al corrispondente controllo (CONTR 2H= 16,4%, CPF 25ug/ml 2H= 22,5%, CPF 50ug/ml = 21,1%; CONTR 2H vs CPF 25ug/ml 2H  $P<0,01$ , CONTR 2H vs CPF 50ug/ml 2H  $P<0,05$ ) (fig.4.4).

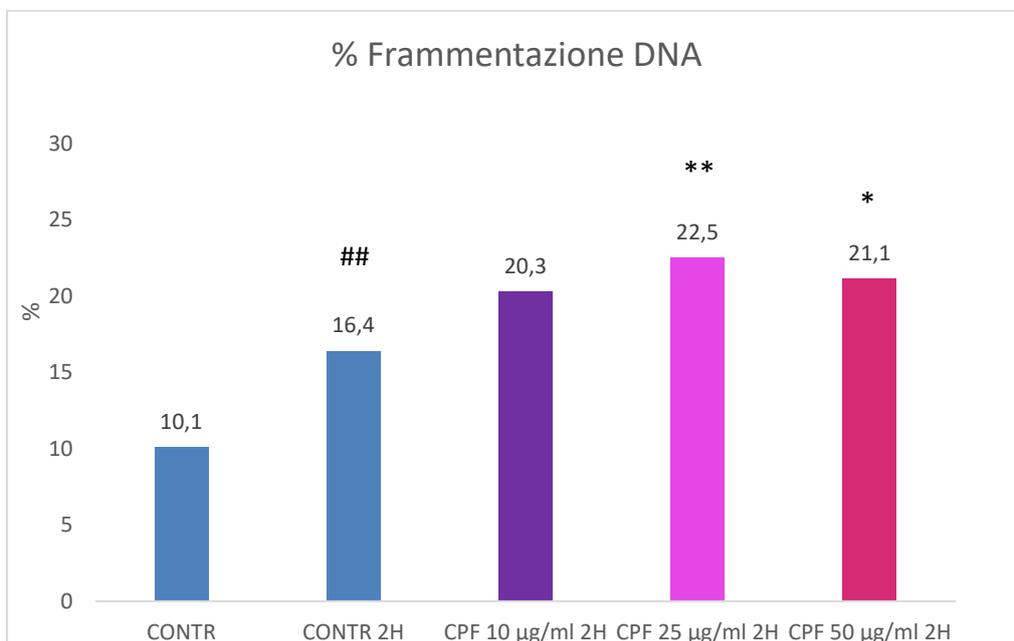


Fig.4.4: Effetti dell'esposizione di spermatozoi a CPF 10µg/ml, 25µg/ml, 50µg/ml sulla frammentazione del DNA spermatico. ## differenze altamente significative rispetto al controllo tempo 0 ( $P<0,01$ ); \* e \*\* differenze significative e altamente significative rispetto al corrispondente controllo ( $P<0,05$ ;  $P<0,01$ ).

#### **4.2.3 Effetti sulle % di fecondazione e sul numero di embrioni ad 8 cellule in terza giornata**

Sia campioni controllo di spermatozoi, sia campioni di spermatozoi esposti a CPF 1µg/ml, 5µg/ml, 10µg/ml, 25µg/ml, 50µg/ml per 2 ore, sono stati utilizzati per l'inseminazione dei COCs.

Dati raccolti dopo 3 giorni dall'inseminazione hanno mostrato che il trattamento del liquido seminale con CPF ha effetti negativi sulla percentuale di fecondazione (percentuale di ovociti fecondati sul totale) e sul numero di embrioni ad 8 cellule (sul totale degli embrioni). In particolare, le percentuali di fecondazione dei campioni CPF 5 $\mu$ g/ml (36,73%) e CPF 50 $\mu$ g/ml (28,2%) si abbassano in maniera altamente significativa ( $p < 0.01$ ) rispetto al controllo (69,21%) (Fig.4.5),

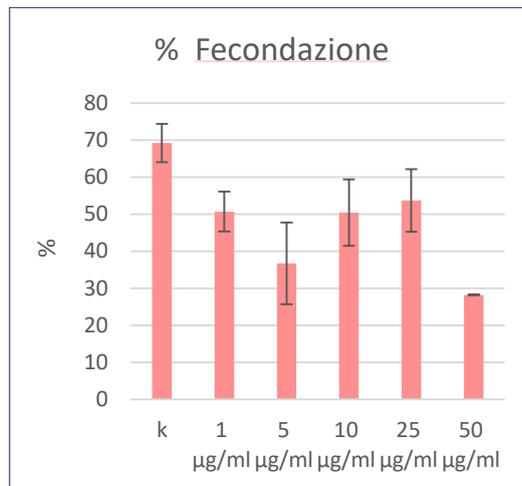


Figura 4.5: Effetti dell'esposizione di spermatozoi a CPF 1 $\mu$ g/ml, 5 $\mu$ g/ml, 10 $\mu$ g/ml, 25 $\mu$ g/ml, 50 $\mu$ g/ml sulle percentuali di fecondazione a 3 giorni dall'inseminazione.

mentre le percentuali di embrioni a 8 cellule, al terzo giorno dall'inseminazione, si riducono nei campioni esposti a CPF. In particolare, le percentuali dei campioni CPF 5 $\mu$ g/ml (27,36%) e CPF 50 $\mu$ g/ml (25,76%) si abbassano in maniera significativa ( $p < 0.05$ ) rispetto al controllo (54,63%). Anche in questo caso, l'effetto maggiore si ha alla concentrazione di 50 $\mu$ g/ml (Fig.4.6).

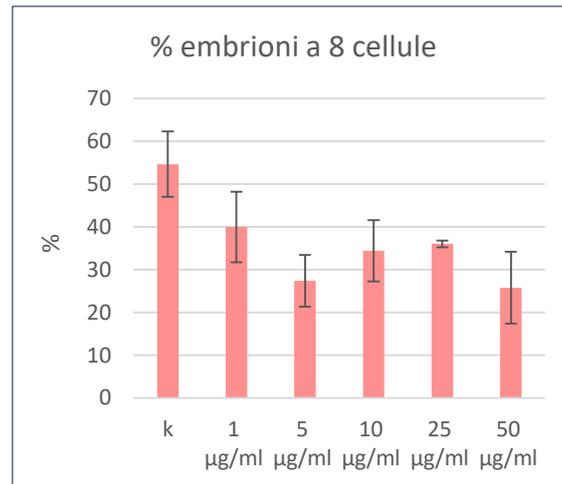


Figura 4.6: Effetti dell'esposizione di spermatozoi a CPF 1µg/ml, 5µg/ml, 10µg/ml, 25µg/ml, 50µg/ml sulle percentuali di embrioni a 8 cellule a 3 giorni dall'inseminazione.

#### **4.2.4 Effetti sull'integrità dei cromosomi.**

Per valutare l'integrità specifica strutturale dei cromosomi, si è fatto ricorso alla tecnica di ibridazione in situ fluorescente (FISH), utilizzando sonde chromosome painting, specifiche per i cromosomi sessuali X e Y. Questo tipo di sonde riconoscono sequenze specifiche per ogni singolo cromosoma localizzate lungo tutto il suo asse.

Dall'analisi dei risultati ottenuti, si nota che una certa percentuale di spermatozoi riporta una malformazione caratteristica, tipo strozzatura, a livello del segnale di ibridazione. Fra gli spermatozoi trattati con CPF alle concentrazioni 10, 25 e 50 µg/ml, la percentuale di spermatozoi che presentano questo tipo di malformazione è nettamente maggiore rispetto al controllo (Fig.4.7).

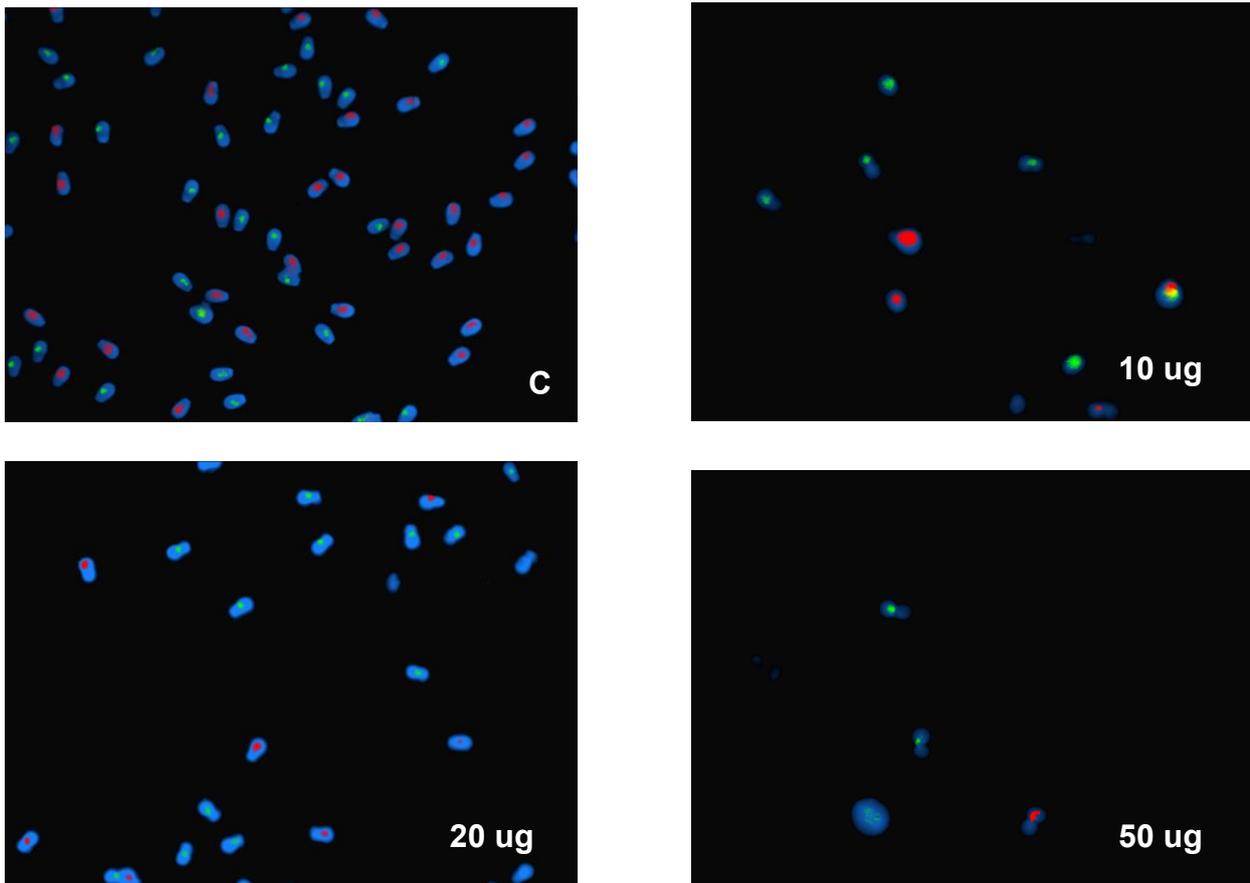


Figura 4.7: FISH su cromosomi sessuali di spermatozoi controllo (A), esposti a CPF 10µg/ml (B), esposti a CPF 25µg/ml (C), esposti a CPF 50µg/ml (D). ROSSO: Chr X ; VERDE: Chr Y.

In particolare, la percentuale di spermatozoi con cromosoma sessuale malformato passa dall'1,4% (controllo) fino al 22% (campione CPF 50µg/ml) per il cromosoma X, e dall'1,5% (controllo) al 16% (campione CPF 50µg/ml) per il cromosoma Y, con un andamento dose-dipendente. Tutte le percentuali ottenute alle tre diverse concentrazioni risultano estremamente significative rispetto al controllo ( $p \ll 0.01$ ).

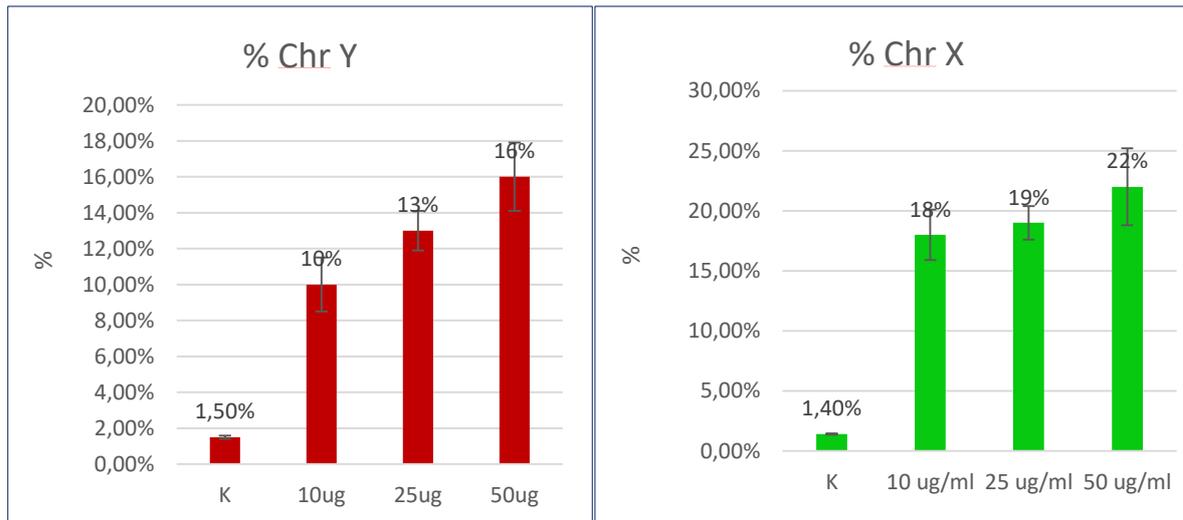


Figura 4.8: percentuale di spermatozoi con cromosoma sessuale malformato

#### 4.2.5 Effetto del CPF sul pattern di metilazione del gene XIST e GNAS

Dopo il trattamento di 2h, le sospensioni spermatiche controllo (C), CPF 10µg/ml e 25µg/ml sono state sottoposte a pirosequenziamento per determinare eventuali anomalie del pattern di metilazione delle regioni promotrici geniche.

Nello specifico, è stato analizzato il pattern di metilazione delle CpG islands (XIST 1 e XIST 2) presenti al promotore di un gene localizzato sul cromosoma X, XIST, e di un gene, GNAS, presenti sul cromosoma XIII bovino. Per la nostra analisi abbiamo, quindi, selezionato 32 loci (10 XIST e 22 GNAS) di interesse, noti per essere improntati in uomo e topo.

Il trattamento con entrambe le concentrazioni di CPF non ha mostrato differenze di metilazione per nessuna delle regioni CpG del promotore di GNAS (Fig.4.10) e per tutte le CpG islands della regione 1 del promotore di XIST (Fig. 4.9). Un'aumento di metilazione era invece presente a carico della prima CpG island della regione 2 di XIST, nei campioni trattati con 10µg/ml di CPF (CONTR=9,3% ± 3,4% vs CPF 10µg/ml=12,8% ± 4,8% P<0.05).

La concentrazione più alta di CPF, 25µg/ml provocava alterazioni non statisticamente significative nei livelli di metilazione di alcune CpG islands della regione XIST 2.

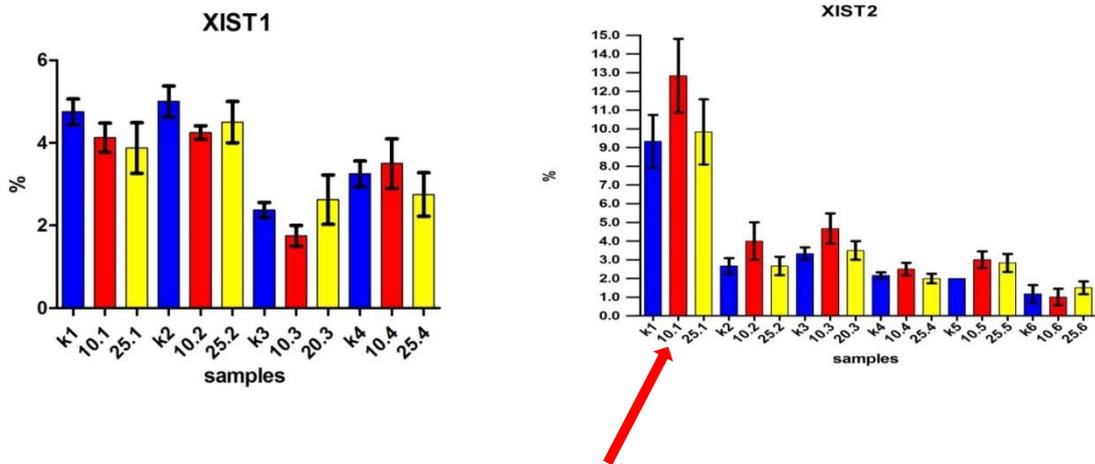


Fig.4.9: Effetto del trattamento con CPF 10μg/ml e 25 ug/ml sui livelli di metilazione delle regioni XIST 1 (A) e XIST 2 (B) del promotore del gene XIST.

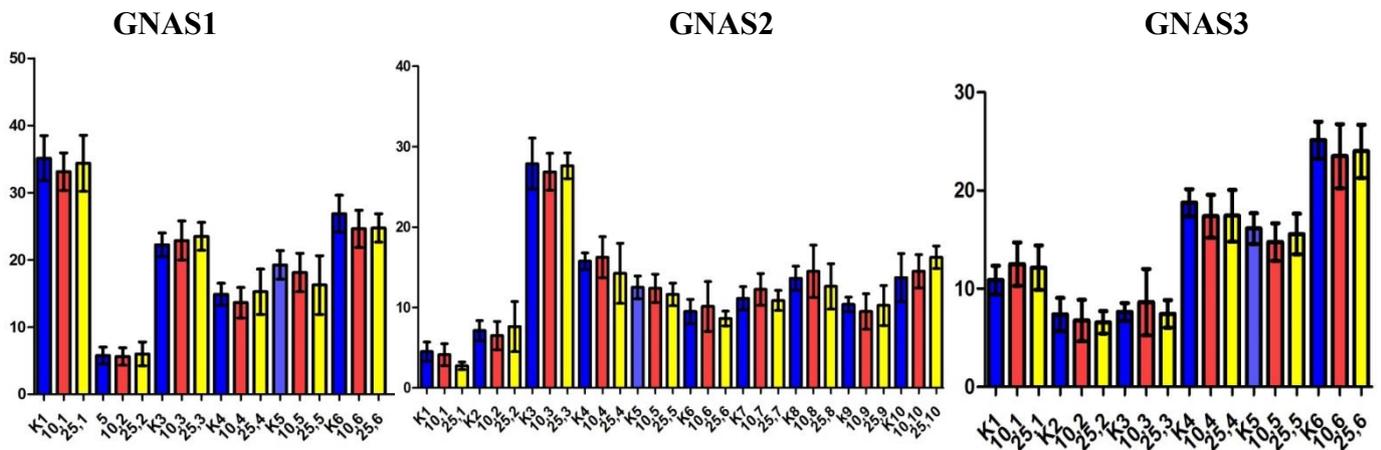


Fig.4.10: Effetto del trattamento con CPF 10μg/ml e 25 ug/ml sui livelli di metilazione delle regioni GNAS1, GNAS 2 e GNAS3 del promotore del gene GNAS.

### 3.3.5 Effetto del CPF sul pattern di metilazione globale tramite LUMA

Al fine di valutare eventuali alterazioni nel pattern di metilazione globale, tramite la tecnica LUMA, le sospensioni spermatiche controllo e trattate per 2h con CPF (10ug/ml e 25ug/ml) sono state sottoposte ad estrazione del DNA . Il DNA è stato quindi digerito per 4 ore a 37°C con 2

enzimi di restrizione, isoschizomeri, di cui uno metilazione sensibile. Dopo le 4 ore sui campioni è stata applicata la tecnica della Luminometric Methylation Assay (LUMA).

Dall'analisi condotta, si nota come non vi siano differenze significative per quanto riguarda i livelli di metilazione globale (fig 4.11), nei campioni trattati con 10 e 25 ug/ml di CPF rispetto al controllo.

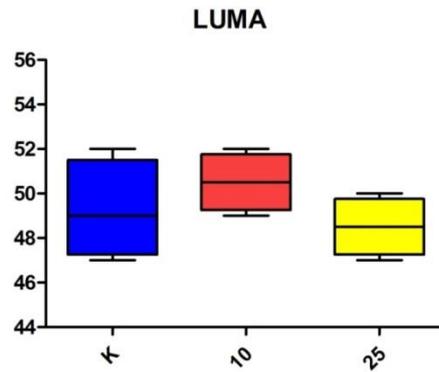


Fig.4.11: Effetto del trattamento con CPF 10 $\mu$ g/ml e 25 ug/ml sui livelli di metilazione globale

### 4.3 DISCUSSIONE

Gli effetti negativi degli inquinanti sulla produzione e sulla corretta funzionalità spermatica, stanno diventando oggetto di studio sempre più rivelante. In particolare, diversi studi evidenziano come l'esposizione a pesticidi organofosfati, in dosi ambientali, sia fra le principali cause delle disfunzioni legate al sistema riproduttivo maschile, contribuendo all'aumento dei problemi di infertilità (Sharma et al., 2014). Il Chlorpyrifos (CPF), i cui effetti nocivi sono nostro oggetto di studio, è fra i pesticidi associati a questo tipo di disfunzione

In questo studio sono stati esaminati gli effetti che l'esposizione *in vitro* al Chlorpyrifos provoca su diversi parametri funzionali degli spermatozoi, fondamentali per la capacità di fecondazione (Moce and Graham, 2008) ed abbiamo ricercato le eventuali cause a monte delle alterazioni riscontrate.

I dati ottenuti nel corso degli esperimenti, hanno rivelato una significativa correlazione fra l'esposizione *in vitro* degli spermatozoi al pesticida e gli effetti dannosi sulla loro motilità totale e progressiva in linea con altri lavori presenti in letteratura ma condotti con un disegno sperimentale diverso. Vari lavori ipotizzano la presenza di cause diverse alla base dell'abbassamento delle percentuali di motilità; i) diminuzione dell'attività mitocondriale, ii) alterata sintesi del fruttosio, iii) compromissione delle strutture microtubulari degli spermatozoi, tutti fattori fondamentali per la fisiologia spermatica (Uzunhisarcikli et al., 2007). A supporto di ciò, Heikal et al., nel suo studio del 2014, proponeva, come causa dell'inibizione della motilità spermatica, nei topi trattati con Chlorpyrifos, proprio i bassi livelli di produzione di ATP (Heikal et al., 2014), conseguenza della riduzione dell'attività mitocondriale. Inoltre, Selvaraju et al. nel 2011 ha dimostrato come, campioni di seme bovino, scongelati, e incubati con diverse concentrazioni di pesticidi, fra cui Chlorpyrifos ed Endosulfan, mostravano abbassamento dei valori di motilità e dei parametri cinetici, riduzione dell'integrità del plasmalemma, abbassamento del potenziale di membrana mitocondriale e ridotta capacità di fecondazione.

Anche nel mio studio, l'esposizione in *vitro* degli spermatozoi con diverse concentrazioni di CPF, presenti come residuo in natura, determinava un abbassamento, rispetto ai campioni controllo, delle percentuali di fecondazione raccolte a tre giorni dall'inseminazione. Probabilmente, questo dato può essere associato alle alterazioni dei valori di motilità e dei parametri cinetici che hanno portato anche alla compromissione della capacità di fecondazione.

In uno studio di Salazar-Arredondo del 2008, viene riportato come l'esposizione occupazionale acuta a questo tipo di pesticida degli operatori del settore agricolo, durante la "spraying season", metteva a rischio la loro fertilità e/o lo sviluppo embrionale dei concepiti (Salazar-Arredondo, 2008). La compromissione dello sviluppo embrionale osservata nello studio di Salazar-Arredondo, potrebbe anche giustificare la riduzione delle percentuali, rispetto al controllo, di embrioni, che raggiungono lo stadio di 8 cellule, osservate nel corso della sperimentazione effettuata.

Ciò potrebbe avere come concausa, come è emerso dai miei esperimenti, la percentuale di frammentazione del DNA spermatico, che in seguito all'esposizione in *vitro* al Chlorpyrifos, aumenta in maniera altamente significativa rispetto al controllo.

Il modo in cui il pesticida riesce ad apportare danni a livello del DNA può essere associato alla produzione di ROS (specie reattive dell'ossigeno), come spiega Bian et al. nel suo lavoro del 2004. Diversi infatti, sono gli studi che riportano, fra i potenziali meccanismi di genotossicità degli organofosfati, proprio l'induzione dello stress ossidativo sia negli animali da laboratorio esposti, sia in studi in *vitro* (Salazar-Arredondo, 2008). Inoltre, il dato ritrovato, nella mia tesi di dottorato, inerente all'aumento della percentuale di frammentazione del DNA, risulta molto interessante, in quanto, in letteratura, è riportato che le percentuali di frammentazione del DNA spermatico >30% sono strettamente correlate con esiti negativi di gravidanza naturale e di fecondazione in *vitro*, così come con l'aumento del rischio di aborto spontaneo precoce (Evenson et al., 2006).

Altra causa di alterazione della fisiologia spermatica può essere individuata nel danno al DNA a livello cromatinico. In particolare, Piña-Guzman et al., nel lavoro del 2005, riteneva che, gli organofosfati, possono essere considerati dei potenti agenti fosforilanti, che sono potenzialmente genotossici per gli spermatozoi, poiché portano ad alterazione della struttura cromatinica attraverso il legame fra DNA e protammine, rendendo il DNA più suscettibile alla denaturazione (Piña-Guzman et al., 2005).

Nel corso dei miei esperimenti, tramite tecnica di chromosome painting su cromosomi sessuali, è stato riscontrato un aumento della percentuale di spermatozoi che presentavano alterazioni morfostrutturali probabilmente a livello cromatinico. L'alterazione era particolarmente evidente nei nuclei spermatici ibridati con il cromosoma X, che sembrava, quindi, essere più sensibile a tale fenomeno indotto dal trattamento con il CPF. Potremmo ipotizzare che le maggiori dimensioni del cromosoma X, e la sua posizione nel nucleo spermatico rispetto all' Y, lo renderebbero più accessibile all'azione del pesticida.

Quest'ultimo dato non è per niente trascurabile, visto che l'integrità strutturale e funzionale del DNA spermatico, come affermava Evenson et al. nel 2002, è un fattore decisivo nella trasmissione delle informazioni genetiche durante la riproduzione, e alterazioni cromatiniche o danni al DNA germinale possono risolversi in problemi di infertilità maschile (Evenson, et al., 2002).

Sono, quindi, di un certo interesse anche i dati raccolti riguardo alle percentuali di metilazione a livello del promotore del gene XIST presente sulla regione centrale del cromosoma X e coinvolto nel processo di inattivazione dell'X. IL promotore XIST inizia, infatti a presentare una parziale ipermetilazione a livello di siti CpG nei campioni trattati con CPF rispetto al controllo.

In linea generale, non ci sono riscontri in letteratura circa la variazione dei livelli di metilazione del promotore del gene XIST in seguito ad esposizione a pesticidi organofosfati. E', quindi, la prima volta che si osserva un fenomeno di alterazione epigenetica dopo trattamento *in vitro* con un pesticida organofosfato, quale il CPF.

Poiché un incremento della metilazione a livello delle CpG island del gene XIST è correlata ad un decremento dei livelli del suo trascritto (Chureau et al., 2010), il possibile silenziamento del gene XIST, dovuto alla sua ipermetilazione, potrebbe verosimilmente determinare difetti nell'inattivazione del cromosoma X, con conseguenze sul dosaggio genico negli embrioni.

L'effetto, in particolare, si nota alla concentrazione di CPF minima utilizzata nei campioni seminali sottoposti a pirosequenziamento (10 ug/ml). La spiegazione di questo fenomeno potrebbe risiedere nel fatto che le alterazioni dovute a questo pesticida, essendo il CPF un interferente endocrino, spesso non seguono il classico effetto dose-dipendente ma a basse dosi provocano danni peggiori e apiù ampio spettro che a dosi elevate (Kavlock et al., 1996). I dati ottenuti sono dunque particolarmente interessanti poiché, oltre a dimostrare un effetto tossico diretto del CPF sul liquido seminale, mettono in luce il rischio di indurre difetti transgenerazionali. Studi epigenetici hanno, infatti, già dimostrato una correlazione fra la presenza di difetti di metilazione, in particolare nei geni imprintati H19 e GTL2, in bambini concepiti mediante tecniche di procreazione medicalmente assistita e alterazioni presenti negli spermatozoi dei loro padri (Hisato et al., 2009). Non risultano invece alterati, negli spermatozoi trattati con CPF, sia i livelli di metilazione globali, ottenuti tramite LUMA, sia i livelli di metilazione del promotore del gene GNAS. Studi recenti hanno dimostrato come i livelli di metilazione del promotore di GNAS siano maggiori nei cinghiali sterili, rispetto ai cinghiali in grado di fecondare (Pinton et al., 2014). Sebbene un aumento del pattern di metilazione di GNAS sia stato quindi ritrovato in casi di infertilità maschile conclamata, nel nostro lavoro non ritroviamo la stessa situazione. Rispetto a XIST, localizzato sul cromosoma X, GNAS è localizzato, in bovino, sul cromosoma 13. Questo cromosoma risulta essere di dimensioni notevolmente ridotte rispetto al cromosoma X ed è intrigante ipotizzare che ciò lo renda meno esposto all'azione del pesticida.

# **Capitolo 5:**

# **Conclusioni**

## 5 CONCLUSIONI

Principale interesse del mio lavoro di dottorato, è stato quello di valutare gli effetti prodotti dall'esposizione al pesticida organofosfato Chlorpyrifos, su vertebrati acquatici e terrestri, utilizzando approcci in vivo e in vitro.

I dati raccolti con il mio lavoro di dottorato, confermano che l'esposizione ambientale al CPF, e probabilmente agli altri pesticidi organofosfati, aumenta il rischio di sviluppare, nelle prime fasi dello sviluppo embrionale, alterazioni che possono avere sia un effetto teratogenico, riscontrabile in particolare nei vertebrati acquatici, andando ad alterare la corretta neurogenesi, predisponendolo all'insorgenza di varie patologie fra cui il morbo di Parkinson (Fitzmaurice et al., 2014).

Abbiamo, inoltre, evidenziato, con uno studio in vitro su spermatozoi bovini come l'esposizione, anche per tempi brevi, al CPF possa alterare non solo le caratteristiche fisiologiche e la capacità di fecondazione delle cellule germinali maschili ma per la prima volta, si evidenziano alterazioni che coinvolgono il pattern epigenetico del DNA spermatico.

Dallo studio condotto sugli embrioni di *X. laevis*, abbiamo dimostrato che l'esposizione al CPF può indurre una riduzione dei livelli trascrizionali di geni coinvolti nella migrazione e nel differenziamento delle cellule della cresta neurale cefalica, provocando alterati pattern di sviluppo delle cartilagini branchiali e, quindi del cranio viscerale. E' interessante sottolineare che la cresta neurale cefalica, negli uccelli e nei mammiferi è coinvolta nella formazione del processo frontonasale, il quale, mediante inibizione di bmp4 e Gremlins collabora al corretto sviluppo delle strutture cerebrali anteriori. (Le Douarin et al., 2007).

L'alterazione genica descritta negli embrioni di *X. laevis*, potrebbe quindi fornire dati preliminari per spiegare la correlazione tra OP e la tossicità nello sviluppo neurologico osservato nei mammiferi esposti a questo pesticida prima della nascita: assottigliamento della corteccia cerebrale prefrontale, alterato pattern di orientamento dei neuriti nei vari strati della corteccia cerebrale, osservati nell'uomo e nel topo (Chen et al., 2014).

I risultati ottenuti studiando gli effetti dell'esposizione cronica in utero e postnatale nel topo, hanno portato nuovi dati sui possibili meccanismi attraverso cui dosi ambientali di CPF, e di altri pesticidi organofosfati, potrebbero agire innanzitutto danneggiando il sistema colinergico, indispensabile per la corretta neurogenesi adulta, e quindi, successivamente, alterare l'espressione dei geni coinvolti nella segnalazione cellulare. Tali alterazioni potrebbero, con l'invecchiamento, creare deficienze che renderebbero più predisposti a sviluppare malattie neurodegenerative, come il morbo di Parkinson. Inoltre, il pattern di alterazioni osservato nel cervello dei topi da noi studiati, potrebbe aiutare a spiegare l'insorgenza di malattie neurodegenerative precoci e giovanili, che spesso non sono associate a fattori genetici ereditari. Ed infine i nostri risultati hanno dimostrato che il Chlorpirifos esercita, anche in vitro, un effetto negativo sugli spermatozoi, confermando i dati già presenti in letteratura per gli organofosfati. Questi dati, seppur validi e consistenti, saranno oggetto di ulteriori studi e analisi, in quanto i meccanismi alla base delle alterazioni che il CPF provoca sugli spermatozoi bovini, richiedono un ulteriore approfondimento, con studi condotti, possibilmente in vivo. In particolare, è necessario comprendere meglio quando e in che modo l'esposizione a questo pesticida vada ad alterare il pattern di metilazione di alcuni geni. Questo è un dato molto preoccupante, in quanto, si è visto come i livelli alterati di metilazione dei gameti maschili, siano poi ereditati nel concepito.

In conclusione, il nostro studio fornisce collegamenti utili tra i diversi scenari, determinati dall'esposizione ambientale cronica al CPF, un pesticida organofosfato. Sulla base dei nostri risultati sperimentali, è possibile ipotizzare che, soggetti esposti quotidianamente a questo tipo di pesticida, seppur non mostrando evidenti segni di tossicità, possano presentare una maggiore sensibilità nello sviluppare patologie di vario genere, in particolare neurologiche e riproduttive.

Infine, nonostante sia problematico condurre esperimenti su larga scala per stabilire rapporti diretti di causa-effetto, l'associazione statistica tra l'esposizione a certi fitofarmaci e l'incidenza

di alcune malattie non può essere ignorata, in particolare per quelle persone che, per predisposizione genetica, presentano una maggiore suscettibilità agli effetti dei pesticidi, e sono dunque più a rischio di altre.

# **BIBLIOGRAFIA**

- Abu-Issa R, Smyth G, Smoak I, Yamamura K, Meyers EN. (2002). Fgf8 is required for pharyngeal arch and cardiovascular development in the mouse. *Development* 129:4613–4625.
- Abzhanov A, Rodda SJ, McMahon AP, Tabin CJ. (2007). Regulation of skeletogenic differentiation in cranial dermal bone. *Development* 134:3133–3144.
- Adameyko I, Lallemand F, Aquino JB, Pereira Ja Topilko P, M€uller T, Fritz N, Beljajeva A, Mochii M, Liste I, Usoskin D, et al. (2009). Schwann cell precursors from nerve innervation are a cellular origin of melanocytes in skin. *Cell* 139:366–379.
- Aitken RJ et Sawyer DW (2003). The human spermatozoon: not waving but drowning. *Med. Biol*
- Aitken RJ, Best FSM, Warner P, Templeton A. (1984) A prospective study of the relationship between semen quality and fertility in cases of unexplained infertility. *Int J Androl* 5:297–303.
- Akiyama H, Lyons JP, Mori-Akiyama Y, Yang X, Zhang R, Zhang Z, Deng JM, Taketo MM, Nakamura T, Behringer RR, et al. (2004). Interactions between Sox9 and beta-catenin control chondrocyte differentiation. *Genes Dev* 18:1072–1087.
- Aldridge Justin E, Meyer Armando, Seidler Frederic J and Slotkin Theodore A. (2005) Alterations in Central Nervous System Serotonergic and Dopaminergic Synaptic Activity in Adulthood after Prenatal or Neonatal Chlorpyrifos Exposure. *Environmental Health Perspectives* Vol. 113, No. 8, pp. 1027-1031
- Aldridge Justin E., Levin Edward D., Seidler Frederic J. and Slotkin Theodore A. (2005) Developmental Exposure of Rats to Chlorpyrifos Leads to Behavioral Alterations in Adulthood, Involving Serotonergic Mechanisms and Resembling Animal Models of Depression. *Environmental Health Perspectives* VOLUME 113 NUMBER 5 527-531.
- Alsan BH, Schultheiss TM. (2002). Regulation of avian cardiogenesis by Fgf8 signaling. *Development* 129:1935–1943.
- Asrican B, Paez-Gonzalez P, Erb J, Kuo CT. (2016).Cholinergic Circuit Control of Postnatal Neurogenesis. *Neurogenesis* (Austin). 3(1). pii: e1127310.
- Auman, J. T., Seidler, F. J., and Slotkin, T. A. (2000). Neonatal chlorpyrifos exposure targets multiple proteins governing the hepatic adenylyl cyclase signaling cascade: Implications for neurotoxicity. *Dev. Brain Res.* 121, 19–27.
- Baltzinger M, Ori M, Pasqualetti M, Nardi I, Rijli FM. (2005). Hox2a knockdown in *Xenopus* results in hyoid to mandibular homeosis. *Dev Dyn* 234:858–867.
- Bardin CW, Cheng CY, Musto NA, Gunsalus GL. (1988) The sertoli cell. In: *The Physiology of Reproduction*. New York: Raven Press. pp 933–74.
- Behra M, Cousin X, Bertrand C, Vonesech JL, Biellmann D, ChatonnetA, Strahle U. (200). Acetylcholinesterase is required for neuronal and muscular development in the zebrafish embryo. *Neuroscience* 5:111–118.

- Betancourt A.M. and Russell L. Carr (2003). The Effect of Chlorpyrifos and Chlorpyrifos-Oxon on Brain Cholinesterase, Muscarinic Receptor Binding, and Neurotrophin Levels in Rats Following Early Postnatal Exposure. *Toxicological Sciences* Volume 77, Issue 1 Pp. 63-71.
- Betancourt AM, Filipov NM, Carr RL. (2007) Alteration of neurotrophins in the hippocampus and cerebral cortex of young rats exposed to chlorpyrifos and methyl parathion. *Toxicol Sci.* 100(2):445-55.
- Betancourt Angela M. and Carr Russell L. (2004). The Effect of CPF and CPF-Oxon on Brain Cholinesterase, Muscarinic Receptor Binding, and Neurotrophin Levels in Rats Following Early Postnatal Exposure *Toxicol Sci.* 77(1):63-71.
- Bianchi M, Giacomini E, Crinelli R, Radici L, Carloni E, Magnani M. (2015) Dynamic transcription of ubiquitin genes under basal and stressful conditions and new insights into the multiple UBC transcript variants. *Gene* 573(1):100-9.
- Bjorling-Poulsen M, Andersen HR, Grandjean P. (2008) Potential developmental neurotoxicity of pesticides used in Europe. *Environ Health.* 7:50.
- Błaszczyc Janusz W. (2016) Parkinson's Disease and Neurodegeneration: GABA-Collapse Hypothesis *Front. Neurosci* <https://doi.org/10.3389/fnins.2016.00269>
- Bonfanti P, Colombo A, Orsi F, Nizzetto I, Andrioletti M, Bacchetta R, Mantecca P, Fascio U, Vailati G, Vismara C. (2004) Comparative teratogenicity of chlorpyrifos and malathion on *Xenopus laevis* development. *Aquat Toxicol* 70:189–200.
- Bonifati V. (2014) Genetics of Parkinson's disease--state of the art, 2013. *Parkinsonism Relat Disord.* 2014 Jan;20 Suppl 1:S23-8.
- Breslin WJ, Liberacki AB, Dittenber DA, Quast JF. (1996) Evaluation of the developmental and reproductive toxicity of CPF in the rat. *Fund Appl Toxicol* 29:119–130.
- Bretveld RW, Thomas CMG, Scheepers PTJ, Zielhuis GA, Roeleveld N. (2006). Pesticide exposure: The hormonal function of the female reproductive system disrupted? *Reprod Biol Endocrinol* 4:30.
- Bretveld, R.W., Hooiveld, M., Zielhuis, G.A., Pellegrino, A., van Rooij, A., Roeleveld, N. (2008). Reproductive disorders among male and female greenhouse workers. *Reproductive Toxicology* 25: 107-114.
- Campbell, C. G., Seidler, F. J., and Slotkin, T. A. (1997). Chlorpyrifos interfere with cell development in rat brain regions. *Brain Res.* 43, 179–189.
- Caughlan A, Newhouse K, Namgung U, Xia Z. (2004) Chlorpyrifos Induces Apoptosis in Rat Cortical Neurons that is Regulated by a Balance Between p38 and ERK/JNK MAP Kinases - *TOXICOLOGICAL SCIENCES* 78, 125–134

- Chen WQ, Yuan L, Xue R, Li YF, Su RB, Zhang YZ, Li J. (2011) Repeated exposure to chlorpyrifos alters the performance of adolescent male rats in animal models of depression and anxiety. *NeuroToxicology* Volume 32, Pages 355–361.
- Chen XP, Chen WF, Wang DW. (2014). Prenatal organophosphates exposure alternates the cleavage plane orientation of apical neural progenitor in developing neocortex. *PLoS One* 9:e95343
- Chureau Corinne, Sophie Chantalat, Antonio Romito, Angélique Galvani, Laurent Duret, Philip Avner, Claire Rougeulle (2010) Ftx is a non-coding RNA which affects Xist expression and chromatin structure within the X-inactivation center region *Hum. Mol. Genet.*
- Cole Toby B., Richard P. Beyer, Theo K. Bammler, Sarah S. Park, Federico M. Farin, Lucio G. Costa, and Clement E. Furlong. (2011). Repeated Developmental Exposure of Mice to CPF Oxon Is Associated with Paraoxonase 1 (PON1)-Modulated Effects on Cerebellar Gene Expression *Toxicol Sci.*123(1):155-69
- Colombo A, Orsi F, Bonfanti P.( 2005). Exposure to the organophosphorus pesticide chlorpyrifos inhibits acetylcholinesterase activity and affects muscular integrity in *Xenopus laevis* larvae. *Chemosphere* 61:1665–1671.
- Colovic, Mirjana B.; Krstic, Danijela Z.; Lazarevic-Pasti, Tamara D.; Bondzic, Aleksandra M.; Vasic, Vesna M. (2013). Acetylcholinesterase Inhibitors. *Pharmacology and Toxicology Current Neuropharmacology*, Volume 11, Number 3, pp. 315-335.
- Congras A , Yerle-Bouissou M, Pinton A, Vignoles F, Liaubet L, Ferchaud S, Acloque H. (2014) Sperm DNA methylation analysis in swine reveals conserved and species-specific methylation patterns and highlights an altered methylation at the GNAS locus in infertile boars. *Biol Reprod.* 91(6):137.
- Crumpton T.L., Seidler F.J, Slotkin T.A. (2000) Is oxidative stress involved in the developmental neurotoxicity of chlorpyrifos? *Brain Research* 121 189–195
- Crumpton, T. L., Seidler, F. J., and Slotkin, T. A. (2000). Developmental neurotoxicity of chlorpyrifos in vivo and in vitro: Effects on nuclear transcription factors involved in cell replication and differentiation. *Brain Res.* 857, 87–98.
- Dam, K., Garcia, S. J., Seidler, F. J., and Slotkin, T. A. (1999). Neonatal chlorpyrifos exposure alters synaptic development and neuronal activity in cholinergic and catecholaminergic pathways. *Dev. Brain Res.* 116, 9–20.
- Dam, K., Seidler, F. J., and Slotkin, T. A. (1998) Developmental neurotoxicity of chlorpyrifos: Delayed targeting of DNA synthesis after repeated administration. *Dev. Brain Res.* 108, 39–45.
- De Bleecker J, Lison D, Van Den Abeele K, Willems J, De Reuck J. (199). Acute and subacute organophosphate poisoning in the rat. *Neurotoxicology* 15:341–348.

- Deimling SJ, Drysdale TA. (2011). Fgf is required to regulate anterior– posterior patterning in the *Xenopus* lateral plate mesoderm. *Mech Dev* 128:327–341.
- Di Lonardo S., Sciarra D., Sciotti A. (2012): *Pesticidi nel piatto*. Legambiente, Roma
- Dodd CA and Klein BG (2009) Pyrethroid and organophosphate insecticide exposure in the 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine mouse model of Parkinson's disease: an immunohistochemical analysis of tyrosine hydroxylase and glial fibrillary acidic protein in dorsolateral striatum -*Toxicology and Industrial Health* 2; 25: 25–39
- Dupin E, Le Douarin NM. (2014). The neural crest, a multifaceted structure of the vertebrates. *Birth Defects Res C Embryo Today* 102: 187–209; doi:10.1002/bdrc.21080.
- Eames BF, Sharpe PT, Helms JA. (2004). Hierarchy revealed in the specification of three skeletal fates by Sox9 and Runx2. *Dev Biol* 274: 188–200.
- Eaton DL, Daroff RB, Autrup H, Bridges J, Buffler P, Costa LG, Coyle J, McKhann G, Mobley WC, Nadel L, Neubert D, Schulte-Hermann R, Spencer PS. (2008) Review of the Toxicology of Chlorpyrifos With an Emphasis on Human Exposure and Neurodevelopment, *Critical Reviews in Toxicology*, 38: sup2, 1-125.
- EPA. (2002) U.S. Chlorpyrifos Facts.
- Evenson D., Wixon R. (2006) Meta-analysis of sperm DNA fragmentation using the sperm chromatin structure assay. *Rep Biomed Online* 12: 466–72.
- Evenson D.P. (2002) Sperm chromatin structure assay: its clinical use for detecting sperm DNA fragmentation in male infertility and comparisons with other techniques. *J Androl* 23(1): 25–43.
- Fahn S. Description of Parkinson's disease as a clinical syndrome. (2003) *Ann N Y Acad Sci*. 991:1-14. Review
- Farrell MJ, Burch JL, Wallis K, Rowley L, Kumiski D, Stadt H, Godt RE, Creazzo TL, Kirby ML. (2001). FGF-8 in the ventral pharynx alters development of myocardial calcium transients after neural crest ablation. *J Clin Invest* 107:1509–1517.
- Faure S, De Santa Barbara P, Roberts DJ, Whitman M. (2002). Endogenous patterns of BMP signaling during early chick development. *Dev Biol* 244:44–65.
- First N.L., Parrish J.J. (1987). In vitro fertilization of ruminants. *Journal of Reproduction and Fertility* 34: 151-165.
- Food and Agriculture Organization of the United Nations (1986) *FAO international code of conduct on the distribution and use of pesticides*. Rome.
- Foster JW, Dominguez-Steglich MA, Guioli S, Kwok C, Weller PA, Stevanovic M, Weissenbach J, Mansour S, Young ID, Goodfellow PN. (1994). Campomelic dysplasia and autosomal sex reversal caused by mutations in an SRY-related gene. *Nature* 372:525–530.

- Fulton MH, Key PB. (2001). Acetylcholinesterase inhibition in estuarine fish and invertebrates as an indicator of organophosphorus insecticide exposure and effects. *Environ Toxicol Chem* 20:37–45.
- Furlong CE1, Cole TB, Jarvik GP, Pettan-Brewer C, Geiss GK, Richter RJ, Shih DM, Tward AD, Lusis AJ, Costa LG. (2005) Role of paraoxonase (PON1) status in pesticide sensitivity: genetic and temporal determinants. *Neurotoxicology* (4):651-9.
- Garcia S.J., Seidler F.J., Crumpton T.L., Slotkin T.A.. (2001) Does the developmental neurotoxicity of chlorpyrifos involve glial targets? Macromolecule synthesis, adenylyl cyclase signaling, nuclear transcription factors, and formation of reactive oxygen in C6 glioma cells. *Brain Research* 891, 54–68.
- Garcia SJ, Seidler FJ, Qiao D, Slotkin TA. (2002) Chlorpyrifos targets developing glia: effects on glial fibrillary acidic protein. *Developmental Brain Research* Volume 133,2 Pages 151–161
- Garcia SJ, Seidler FJ, Slotkin TA. (2003) Developmental neurotoxicity elicited by prenatal or postnatal chlorpyrifos exposure: effects on neurospecific proteins indicate changing vulnerabilities. *Environ Health Perspect.* 111(3): 297–303.
- Garcia SJ, Seidler FJ, Slotkin TA. (2005) Developmental neurotoxicity of chlorpyrifos: targeting glial cells *Environmental Toxicology and Pharmacology* 19 455–461
- Gearhart DA, Sickles DW, Buccafusco JJ, Prendergast MA, Terry AV Jr, (2007): Chlorpyrifos, chlorpyrifos-oxon, and diisopropylfluorophosphate inhibit kinesindependent microtubule motility. *Toxicology and applied pharmacology*, 218(1): 20- 9.
- Gold SJ, Ni YG, Dohlman HG, Nestler EJ. (1997) Regulators of G-protein signaling (RGS) proteins: region-specific expression of nine subtypes in rat brain. *J Neurosci.* 17(20):8024-37
- Grillet N1, Pattyn A, Contet C, Kieffer BL, Goridis C, Brunet JF. (2005) Generation and characterization of Rgs4 mutant mice. *Mol Cell Biol.* 25(10):4221-8.
- Hauser DN, Primiani CT, Cookson MR. (2016) The effects of variants in the PARK2 (parkin), PINK1, and PARK7 (DJ-1) genes along with evidence for their pathogenicity. *Curr Protein Pept Sci.* [Epub ahead of print]
- Heikal T.M. et al. (2014) Oxidative damage and reproductive toxicity associated with cyromazine and chlorpyrifos in male rats: the protective effects of green tea extract. *Res J Environ Toxicol* 8:53–67.
- Hisato K, Hitoshi H, Rosalind MJ, Akiko S, Eiko O, Naoko K, Rei S, Fumihiko S, Chika H, Takafumi U, Nobuo Y and Takahiro A (2009) DNA methylation errors at imprinted loci after assisted conception originate in the parental sperm. *European Journal of Human Genetics* 17, 1582– 1591
- Hong-Wei X, Ai-Guo MA. (2002). The effect of vitamin A deficiency on rat spermatogenesis and activity of testicular marker enzyme. *Chinese J Publ Health* 18:1298–1299.

- Hossein S, Fatemi E, Timothy A., FolsomTeri D., ReutimanPaul J., Thuras D. (2009) Expression of GABAB Receptors Is Altered in Brains of Subjects with Autism. *The Cerebellum* Volume 8, Issue 1, pp 64–69
- Hossein-Nezhad A, Fatemi RP, Ahmad R, Peskind ER, Zabetian CP Hu, Shi M, Wahlestedt C, Zhang J, Faghihi MA. (2016) Transcriptomic Profiling of Extracellular RNAs Present in Cerebrospinal Fluid Identifies Differentially Expressed Transcripts in Parkinson's Disease. *J Parkinsons* 6(1):109-17.
- Hunter, D. L., Lassiter, T. L., and Padilla, S.(1999) Gestational exposure to CPF: Comparative distribution of trichloropyridinol in the fetus and dam. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 158:16–23.
- Istituto Superiore per la Protezione e la Ricerca Ambientale (ISPRA). (2015) Impatto sugli ecosistemi e sugli esseri viventi delle sostanze sintetiche utilizzate nella profilassi antizanzara.
- Jandzik D, Garnett AT, Square TA, Cattell MV, Yu JK, Medeiros DM. (2015). Evolution of the new vertebrate head by co-option of an ancient chordate skeletal tissue. *Nature* 518:534–537.
- Jaramillo-Gómez J, Niño A, Arboleda H, Arboleda G. (2015) Overexpression of DJ-1 protects against C2-ceramide-induced neuronal death through activation of the PI3K/AKT pathway and inhibition of autophagy. *Neurosci Lett.* 603:71-6.
- Johnson, D. E., Seidler, F. J., and Slotkin, T. A. (1998). Early biochemical detection of delayed neurotoxicity resulting from developmental exposure to chloropyrifos. *Brain Res. Bull.* 45, 143–147.
- Jones NC, Trainor PA. (2005). Role of morphogens in neural crest cell determination. *J Neurobiol* 64:388–404. Karalliedde L, Henry JA. 1993. Effects of organophosphates on skeletal muscle. *Hum Exp Toxicol* 12:289–296.
- Joshi SC, Mathur R, Gulati N. (2007) Testicular toxicity of CPF (an organophosphate pesticide) in albino rat. *Toxicol Ind Health.* 23(7):439-44.
- Kadavil JA, Katz EJ, Eldefrawi ME, Eldefrawi AT.(2001) Modulation of protein phosphorylation and dephosphorylation in neuronal tissue by CPF: a novel mechanism of OP toxicity. *Toxicologist* 60, 243–249.
- Kamarianos A, Karamanlis X, Goulas P, Theodosiadou E, Smokovitis A. (2003) The presence of environmental pollutants in the follicular fluid of farm animals (cattle, sheep, goats, and pigs). *Reprod Toxicol* 17:185–190.
- Kasai T, Ogawa K, Mizuno K, Nagai S, Uchida Y, Ohta S, Fujie M, Suzuki K, Hirata S, Hoshi K: (2002) Relationship between sperm mitochondrial membrane potential, sperm motility, and fertility potential. *Asian J Androl* 4, 97–103.
- Kavlock RJ, Daston GP, DeRosa C, Fenner-Crisp P, Gray LE, Kaattari S, et al. Research needs for the risk assessment of health and environmental effects of endocrine disruptors: a report of the U.S. EPA-sponsored workshop. *Environ Health Perspect* 1996; 104: 715–740.

- Le Douarin NM, Brito JM, Creuzet S. (2007). Role of the neural crest in face and brain development. *Brain Res Rev* 55:237–247.
- Le Pabic P, Stellwag EJ, Brothers SN, Scemama JL. (2007). Comparative analysis of Hox paralogue group 2 gene expression during Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) embryonic development. *Dev Genes Evol* 217:749–758.
- Lee JH, Sung YB, Jang SH. (2016) Nerve growth factor expression in stroke induced rats after shock wave. *J Phys Ther Sci.* 28(12):3451-3453. doi: 10.1589/jpts.28.3451.
- Leibfried-Rutledge M.L. et al. (1987) Development potential of bovine oocytes matured in vitro or in vivo. *Biology of Reproduction* 36: 376-383.
- Lema SC, Schultz IR, Scholz NL, Incardona JP, Swanson P. (2007). Neural defects and cardiac arrhythmia in fish larvae following embryonic exposure to 2,20,4,40-tetrabromodiphenyl ether (PBDE 47). *Aquat Toxicol* 82:296–307.
- Lerner TN, Kreitzer AC. (2012) RGS4 is required for dopaminergic control of striatal LTD and susceptibility to parkinsonian motor deficits. *Neuron.* 73(2):347-59.
- London L. et al. (2012) Neurobehavioral and neurodevelopmental effects of pesticide exposures. Elsevier ed., *NeuroToxicology* 33:887-896.
- Lonergan P. et al. (1994). Development of bovine embryos in vitro following oocyte maturation under defined conditions. *EDP Sciences Reproduction Nutrition Development* 34(4): 329-339.
- Loui, J.; Casarett J.D.; Curtis D.; Klaassen Casarett and Doull's (2008). *Toxicology: The Basic Science of Poisons*, 7th ed.; McGraw-Hill Professional: New York, NY, USA.
- Mancilla A, Mayor R. (1996). Neural crest formation in *Xenopus laevis*: Mechanisms of Xslug induction. *Dev Biol* 177:580–589.
- Mansour SA, Mossa AH (2009) Lipid peroxidation and oxidative stress in rat erythrocytes induced by chlorpyrifos and the protective effect of zinc. *Pesticide Biochemistry and Physiology* 93: 34–39
- Mansour SA, Mossa AH (2010) Oxidative damage, biochemical and histopathological alterations in rats exposed to chlorpyrifos and the antioxidant role of zinc. *Pesticide Biochemistry and Physiology* 96: 14–23
- Mansour SA, Mossa AH (2011) Adverse effects of exposure to low doses of chlorpyrifos in lactating rats. *Toxicology and Industrial Health* 27(3): 213–224.
- Marchetti C, Obert G, Deffosez A, Formstecher P, Marchetti P (2002) Study of mitochondrial membrane potential, reactive oxygen species, DNA fragmentation and cell viability by flow cytometry in human sperm. *Hum Reprod* 17, 1257– 1265.

- Meeker J.D., Ryan L., Barr D.B., Herrick R.F., Bennett D.H., Bravo R., Hauser R. (2004) The Relationship of Urinary Metabolites of Carbaryl/Naphthalene and Chlorpyrifos with Human Semen Quality. *Environmental Health Perspectives*, 112(17): 1665–1670.
- Meeker J.D., Ryan, L., Barr D.B., Hauser R. (2006) Exposure to Nonpersistent Insecticides and Male Reproductive Hormones. *Epidemiology*, 17(1)-61-68
- Meeker J.D., Stapleton H.M. (2009) House Dust Concentrations of Organophosphate Flame Retardants in Relation to Hormone Levels and Semen Quality Parameters. *Environmental Health Perspectives*, 118: 318-323.
- Meeker John D., Narendra P. Singh, Louise Ryan, Susan M. Duty, Dana B. Barr, Robert F. Herrick, Deborah H. Bennett, Russ Hauser. (2004) Urinary levels of insecticide metabolites and DNA damage in human sperm. *Human Reproduction* Volume 19, Issue 11. Pp. 2573-2580.
- Miller RM1, Kiser GL, Kaysser-Kranich TM, Lockner RJ, Palaniappan C, Federoff HJ. (2006) Robust dysregulation of gene expression in substantia nigra and striatum in Parkinson's disease. *Neurobiol Dis.* 21(2):305-13.
- Mina M, Wang YH, Ivanisevic AM, Upholt WB, Rodgers B. (2002) Region- and stage-specific effects of FGFs and BMPs in chick mandibular morphogenesis. *Dev Dyn* 223:333–352.
- Mo M, Hoang HT, Schmidt S, Clark RB, Ehrlich BE. (2013)The role of chromogranin B in an animal model of multiple sclerosis. *Mol Cell Neurosci.* 56:102-14.
- Moce E., Graham J.K. (2008) In vitro evaluation of sperm quality. *Anim Reprod Sci* 105: 104–118.
- Monsoro-Burq AH, Fletcher RB, Harland RM. 2003. Neural crest induction by paraxial mesoderm in *Xenopus* embryos requires FGF signals. *Development* 130:3111–3124.
- Moore, D. J., West, A. B., Dawson, V. L., and Dawson, T. M. (2005). Molecular pathophysiology of Parkinson's disease. *Ann. Rev. Neurosci.* 28, 57–87.
- Moreno M, Cañadas F, Cardona D, Suñol C, Campa L, Sánchez-Amate MC, Flores P, Sanchez-Santed F. (2008) Long-term monoamine changes in the striatum and nucleus accumbens after acute chlorpyrifos exposure. *Toxicology Letters* 176, 162–167
- Mori K, Kaido M, Fujishiro K, Inoue N, Koide O. (1992). Effects of megadoses of pyridoxine on spermatogenesis and male reproductive organs in rats. *Arch Toxicol* 66, 3:198–203.
- Moser VC1, Padilla S. Age- and gender-related differences in the time course of behavioral and biochemical effects produced by oral chlorpyrifos in rats. *Toxicol Appl Pharmacol.* 1998 Mar;149(1):107-19.
- Nandi S, Gupta PS, Roy SC, Selvaraju S, Ravindra JP (2011) CPF and endosulfan affect buffalo oocyte maturation, fertilization, and embryo development in vitro directly and through cumulus cells. *Environ Toxicol.* 26(1):57-67.

- Nieuwkoop PD, Faber J. (1956). Normal table of *Xenopus laevis* (Daudin). Amsterdam: North Holland Publishing Co.
- Nishi Kumari e Hundal Swarndeeep Singh (2013). Chlorpyrifos induced toxicity in reproductive organs of female Wistar rats. *Food and Chemical Toxicology*. Volume 62, Pages 732–738.
- Nonchev S, Maconochie M, Vesque C, Aparicio S, Ariza-McNaughton L, Manzanares M, Maruthainar K, Kuroiwa A, Brenner S, Charnay P, et al. (1996). The conserved role of Krox-20 in directing Hox gene expression during vertebrate hindbrain segmentation. *Proc Natl Acad Sci USA* 93:9339–9345
- Oblak AL, Gibbs TT, Blatt GJ. (2010) Decreased GABA(B) receptors in the cingulate cortex and fusiform gyrus in autism. *J Neurochem*. 114(5):1414-23.
- Oorschot DE. (1996) Total number of neurons in the neostriatal, pallidal, subthalamic, and substantia nigral nuclei of the rat basal ganglia: a stereological study using the cavalieri and optical disector methods. *J Comp Neurol*. 366(4):580-99.
- Ozeki H, Kurihara Y, Tonami K, Watatani S, Kurihara H. (2004). Endothelin- 1 regulates the dorsoventral branchial arch patterning in mice. *Mech Dev* 121:387–395.
- Petroff, O. A. (2002). Book Review: GABA and glutamate in the human brain. *Neuroscientist* 8, 562–573.
- Picard A, Pahlavan G, Robert S, Pesando D, Ciapa B. (2003) Effect of organochlorine pesticides on maturation of starfish and mouse oocytes. *Toxicol Sci*. ;73(1):141-8.
- Piña-Guzman B. et al. (2005) Diazinon alters sperm chromatin structure in mice by phosphorylating nuclear protamines. *Toxicol Appl Pharmacol* 202(2): 189–198.
- Rauh VA, Garfinkel R, Perera FP, Andrews HF, Hoepner L, Barr DB, et al. 2006. Impact of prenatal CPF exposure on neurodevelopment in the first 3 years of life among inner-city children. *Pediatrics* 118:1845–1859.
- Rawlings NC, Cook SJ, Waldbillig D. (1998). Effects of the pesticides carbofuran, CPF, dimethoate, lindane, triallate, trifluralin, 2,4-D, and pentachlorophenol on the metabolic endocrine and reproductive endocrine system in ewes. *J Toxicol Environ Health* 54:21–36.
- Recio R., Ocampo-Gómez G., Morán-Martínez J., Borja-Aburto V., López-Cervantes M., Uribe M., Torres-Sánchez L., Cebrián M.E. (2005): Pesticide Exposure Alters Follicle-Stimulating Hormone Levels in Mexican Agricultural Workers. *Environmental Health Perspectives*, 113(9): 1160–1163.
- Reifers F, Walsh EC, Leger S, Stainier DY, Brand M. (2000). Induction and differentiation of the zebrafish heart requires fibroblast growth factor 8 (fgf8/acerebellar). *Development* 127:225–235.
- Richards SM, Kendall RJ. (2002). Biochemical effects of chlorpyrifos on two developmental stages of *Xenopus laevis*. *Environ Toxicol Chem* 21:1826–1835.

- Roberts DJ, Smith DM, Goff DJ, Tabin CJ. (1998). Epithelial-mesenchymal signaling during the regionalization of the chick gut. *Development* 125:2791–2801.
- Sai L, Li X, Liu Y, Guo Q, Xie L, Yu G, Bo C, Zhang Z, Li L. (2014) Effects of CPF on Reproductive Toxicology of Male Rats. *Environ Toxicol* 29(9):1083-8.
- Salazar-Arredondo E. et al. (2008) Sperm chromatin alteration and DNA damage by methylparathion, chlorpyrifos and diazinon and their oxon metabolites in human spermatozoa. *Reproductive Toxicology* 25: 455–460.
- San Segundo L, Martini F, Pablos MV. (201) Gene expression responses for detecting sublethal effects of xenobiotics and whole effluents on a *Xenopus laevis* embryo assay. *Environ Toxicol Chem* 32: 2018–2025.
- Sanghi, R., Pillai, M. K., Jayalekshmi, T. R., and Nair, A.(2003) Organochlorine and organophosphorus pesticide residues in breast milk from Bhopal, Madhya Pradesh, India. *Hum. Exp. Toxicol.* 22:73–76.
- Santagati F, Rijli FM. (2003) Cranial neural crest and the building of the vertebrate head. *Nat Rev Neurosci* 4:806–818.
- Schneider RA, Hu D, Rubenstein JL, Maden M, Helms JA. (2001) Local retinoid signaling coordinates forebrain and facial morphogenesis by maintaining FGF8 and SHH. *Development* 128:2755– 2767.
- Seitanidou T, Schneider-Maunoury S, Desmarquet C, Wilkinson DG, Charnay P. (1997) Krox-20 is a key regulator of rhombomerespecific gene expression in the developing hindbrain. *Mech Dev* 65:31–42.
- Selleck MA, Bronner-Fraser M. (1995). Origins of the avian neural crest: The role of neural plate-epidermal interactions. *Development* 121:525–538.
- Selvaraju S, Ravindra JP, Ghosh J, Gupta PSP, Suresh KP. (2008) Evaluation of sperm functional attributes in relation to in vitro sperm-zona pellucida binding ability and cleavage rate in assessing frozen thawed buffalo (*Bubalus bubalis*) semen quality. *Anim Reprod Sci* 106, 311–321.
- Selvaraju S, Nandi S, Gupta PSP and Ravindra JP. (2011) Effects of Heavy Metals and Pesticides on Buffalo (*Bubalus bubalis*) Spermatozoa Functions In Vitro. *Reprod Dom Anim* 46, 807–813.
- Sharma P. et al. (2014) Cypermethrin-induced reproductive toxicity in the rat is prevented by resveratrol. *J Hum Reprod Sci* 7(2): 99–106.
- Sinha N, Narayan R, Shanker R, Saxena DK. (1995). Endosulfan induced biochemical changes in the testis of rats. *Veterinary Hum Toxicol* 37:547–551.
- Slotkin T A. (1999) Developmental Cholinotoxicants: Nicotine and Chlorpyrifos - Environmental Health Perspectives. Vol 107, Supplement 1

- Slotkin TA, Card J, Seidler FJ. (2012) Chlorpyrifos developmental neurotoxicity: interaction with glucocorticoids in PC12 cells. *Neurotoxicol Teratol.* 34(5):505-12.
- Slotkin TA., Tate CA., Ryde IT, Levin ED. and Seidler FJ. (2006) Organophosphate Insecticides Target the Serotonergic System in Developing Rat Brain Regions: Disparate Effects of Diazinon and Parathion at Doses Spanning the Threshold for Cholinesterase Inhibition. *Environmental Health Perspectives VOLUME 114 | NUMBER 10 | - 1542-1546*
- Smith DM, Nielsen C, Tabin CJ, Roberts DJ. (2000) Roles of BMP signaling and Nkx2.5 in patterning at the chick midgut-foregut boundary. *Development* 127:3671–3681.
- Song Y, Hui JN, Fu KK, Richman JM. (2004) Control of retinoic acid synthesis and FGF expression in the nasal pit is required to pattern the craniofacial skeleton. *Dev Biol* 276:313–329.
- Song, X., Seidler, F. J., Saleh, J. L., Zhang, J., Padilla, S., and Slotkin, T. A. (1997). Cellular mechanisms for developmental toxicity of chlorpyrifos: Targeting the adenylyl cyclase signaling cascade. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 145, 158–174.
- Surmeier, D. J., and Schumacker, P. T. (2013). Calcium, bioenergetics, and neuronal vulnerability in Parkinson's disease. *J. Biol. Chem.* 288, 10736–10741. doi: 10.1074/jbc.R112.410530
- Talbot JC, Johnson SL, Kimmel CB. (2010) hand2 and Dlx genes specify dorsal, intermediate and ventral domains within zebrafish pharyngeal arches. *Development* 137:2507–2517.
- Thrasher JD., Heuser G& Broughton A (2002) Immunological Abnormalities in Humans Chronically Exposed to Chlorpyrifos- *Archives of Environmental Health: An international Journal* Volume 57,Pages 181-187
- Tiemann U. (2008) In vivo and in vitro effects of the organochlorine pesticides DDT, TCPM, methoxychlor, and lindane on the female reproductive tract of mammals: A review. *Reprod Toxicol* 25:316–32
- Tilton FA, Bammler TK, Gallagher EP. (2011) Swimming impairment and acetylcholinesterase inhibition in zebrafish exposed to copper or chlorpyrifos separately, or as mixtures. *Comp Biochem Physiol Part C* 153:9–16.
- Timofeeva OA, Sanders D, Seemann K, Yang L, Hermanson D, Regenbogen S, Agoos S, Kallepalli A, Rastogi A, Braddy D, et al. (2008) Persistent behavioral alterations in rats neonatally exposed to low doses of the organophosphate pesticide, parathion. *Brain Res Bull* 77:404–411.
- Trapp M, Baukloh V, Bohnet HG, Heeschen W. (1984) Pollutants in human follicular fluid. *Fertil Steril* 42:146–148.
- Tseng HT, Shah R, Jamrich M. (2004) Function and regulation of FoxF1 during *Xenopus* gut development. *Development* 131:3637–3647.
- Tussellino M, Ronca R, Formiggini F, De Marco N, Fusco S, Netti PA, Carotenuto R. (2015) Polystyrene nanoparticles affect *Xenopus laevis* development. *J Nanopart Res* 17–70.

- Tussellino M, Ronca R, Carotenuto R, Pallotta MM, Furia M, Capriglione T. (2016). Chlorpyrifos exposure affects *fgf8*, *sox9*, and *bmp4* expression required for cranial neural crest morphogenesis and chondrogenesis in *Xenopus laevis* embryos. *Environ Mol Mutagen* 57(8):630-640.
- Uzunhisarcikli M. et al. (2007) Acute, subacute and subchronic administration of methyl parathion-induced testicular damage in male rats and protective role of vitamins C and E. *Pestic Biochem Physiol* 87:115–122.
- Venerosi A, Tait S , Stecca L , Chiarotti F, De Felice A, Cometa M F, Volpe MT, Calamandrei G and Riccer L (2015). Effects of maternal chlorpyrifos diet on social investigation and brain neuroendocrine markers in the offspring – a mouse study. *Environmental Health* 14:32.
- Ventura C, Nieto MR, Bourguignon N, Lux-Lantos V, Rodriguez H, Cao G, Randi A, Cocca C, Núñez M. (2016) Pesticide chlorpyrifos acts as an endocrine disruptor in adult rats causing changes in mammary gland and hormonal balance. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 156:1-9.
- Verma RS, Mehta A, Srivastava N (2007) In vivo chlorpyrifos oxidative stress: attenuation by antioxidant vitamins. *Pesticide Biochemistry and Physiology* 88: 191–196
- Wacksman MN, Maul JD, Lydy MJ. (2006) Impact of atrazine on chlorpyrifos toxicity in four aquatic vertebrates. *Arch Environ Contam Toxicol* 51:681–689.
- Wagner T, Wirth J, Meyer J, Zabel B, Held M, Zimmer J, Pasantes J, Bricarelli FD, Keutel J, Hustert E, et al. (1994) Autosomal sex reversal and campomelic dysplasia are caused by mutations in and around the SRY-related gene SOX9. *Cell* 79:1111–1120.
- Watson FL, Schmidt H, Turman ZK, Hole N, Garcia H, Gregg J, Tilghman J, Fradinger EA. (2014) Organophosphate pesticides induce morphological abnormalities and decrease locomotor activity and heart rate in *Danio rerio* and *Xenopus laevis*. *Environ Toxicol Chem* 33:1337–1345.
- Wheeler WB. (2002). Role of Research and Regulation in 50 Years of Pest Management in Agriculture. *J. Agric. Food Chem.* 2002, 50, 4151-4155 4151.
- Whitney, K. D., Seidler, F. J., and Slotkin, T. A. (1995). Developmental neurotoxicity of chlorpyrifos: Cellular mechanisms. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 134, 53–62.
- Younglai EV, Foster WG, Hughes EG, Trim K, Jarrell JF. (2002). Levels of environmental contaminants in human follicular fluid, serum, and seminal plasma of couples undergoing in vitro fertilization. *Arch Environ Cont Toxicol* 43:121–126.
- Yu F, Wang Z, Ju B, . (2008) Apoptotic effect of organophosphorus insecticide chlorpyrifos on mouse retina in vivo via oxidative stress and protection of combination of vitamins C and E. *Experimental Toxicology and Pathology* 59: 415–423
- Yu F, Wang Z, Ju B, Wang Y, Wang J, Bai D. (2008) Apoptotic effect of organophosphorus insecticide chlorpyrifos on mouse retina in vivo via oxidative stress and protection of combination of vitamins C and E. *Exp Toxicol Pathol.* 59(6):415-23.

Zhang X, Lu L, Liu S, Ye W, Wu J, Zhang X(2013). Acetylcholinesterase deficiency decreases apoptosis in dopaminergic neurons in the neurotoxin model of Parkinson's disease. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 45 265–272