



UNIVERSITÀ POLITECNICA DELLE MARCHE  
**DIPARTIMENTO SCIENZE DELLA VITA E DELL'AMBIENTE**

---

Corso di Laurea Magistrale in:  
Biologia Molecolare e Applicata

Embriotossicità da bisfenoli: confronto degli effetti in due modelli animali appartenenti al Phylum dei Cordati

Bisphenol-related embryotoxicity: comparison of effects in two animal models belonging to the Phylum Chordata

Tesi di Laurea Magistrale di:

Arimatea Antoniana

Relatore:

Chiar.ma Prof.ssa

Carnevali Oliana

Correlatori:

Prof.ssa Pennati Roberta

Prof.ssa Menegola Elena

**Sessione:** Luglio 2022

**Anno Accademico:** 2021/2022

## INDICE

Capitolo Primo: INTRODUZIONE.....	Pag.1
1.1 I bisfenoli tra gli inquinanti ambientali “emergenti” .....	1
1.2 Il Bisfenolo A (BPA).....	3
1.2.1 BPA e sviluppo embrionale .....	12
1.3 Sostituti del BPA.....	19
1.4 <i>Xenopus laevis</i> come modello animale per studi tossicologici.....	24
1.4.1 Embriogenesi di <i>Xenopus laevis</i> .....	26
1.4.2 <i>Xenopus laevis</i> : modello ideale per studi tossicologici.....	28
1.5 Ascidie del genere <i>Ciona</i> come modello animale per studi tossicologici.....	33
1.5.1 Diverse specie di ascidie .....	34
1.5.2 Riproduzione di <i>Ciona intestinalis</i> .....	36
1.5.3 <i>Ciona intestinalis</i> , “stella nascente della biologia” .....	40
1.5.4 Larve di <i>Ciona intestinalis</i> : una morfologia peculiare .....	46
Capitolo Secondo: SCOPO DELLO STUDIO .....	49
Capitolo Terzo: MATERIALI E METODI .....	52
3.1 <i>Xenopus laevis</i> .....	52
3.1.1 Metodo R-FETAX (Refined-Frog Embryo Teratogenesis Assay- <i>Xenopus</i> ) .....	52
3.1.2 Applicazione metodo R-FETAX per testare embriotossicità dei bisfenoli su embrioni di <i>Xenopus laevis</i> .....	54
3.2 <i>Ciona intestinalis</i> .....	61
3.2.1 Metodo AET (Ascidia Embryo Teratogenicity Assay) .....	61

3.2.2 Applicazione metodo AET per testare embriotossicità dei bisfenoli su embrioni di <i>Ciona intestinalis</i> .....	61
Capitolo quarto: RISULTATI .....	66
4.1 <i>Xenopus laevis</i> .....	66
4.1.1 Stadi di sviluppo.....	66
4.1.2 Lunghezze .....	68
4.1.3 Malformazioni .....	70
4.1.4 Risultati valutazione apoptosi .....	72
4.2 <i>Ciona intestinalis</i> .....	73
4.2.1 Esposizione a BPB .....	73
4.2.2 Esposizione a BPS.....	78
Capitolo quinto: DISCUSSIONE E CONCLUSIONI.....	82
BIBLIOGRAFIA.....	87
RINGRAZIAMENTI .....	101

## Capitolo Primo

### INTRODUZIONE

#### ***1.1 I bisfenoli tra gli inquinanti ambientali “emergenti”***

L'esposizione agli inquinanti ambientali è uno dei fattori che, a causa della loro tossicità, desta oggi giorno molta preoccupazione per la salute dell'uomo, degli ecosistemi acquatici e terrestri (Pino-Herrera et al., 2017). Attualmente ci sono circa settanta milioni di tipi di sostanze chimiche di sintesi presenti in ambiente e stanno aumentando al ritmo di milioni di specie ogni anno (Liu et al., 2019); alcune di queste destano particolare preoccupazione perché oltre ad essere tossiche o nocive sono difficili da degradare in condizioni normali, quindi queste sostanze mettono in pericolo l'ambiente a lungo tempo. Tra le sostanze che, a causa della loro elevata tossicità, bassa degradazione, alta durabilità e ampia distribuzione, hanno attirato l'attenzione a livello mondiale (Velo-Gala et al., 2017) - si parla di “Emergent concern” - troviamo i cosiddetti “inquinanti emergenti” che includono principalmente farmaci (ad es. antibiotici), prodotti per la cura della persona e gli interferenti endocrini (EDC) (Rodriguez-Narvaez et al., 2017), i quali sono oggetto di studio e discussione del presente elaborato.

Gli interferenti endocrini sono per definizione molecole che hanno un effetto sull'asse ormonale dell'organismo, alterando la sintesi degli ormoni stessi o dei loro recettori o legandosi ai recettori, con vari tipi di effetto (Kim et al., 2017). Anche a dosi minime hanno, per esempio, la capacità di alterare i meccanismi cellulari mimando o bloccando gli ormoni steroidei endogeni attraverso l'interazione con i recettori degli ormoni (McLachlan, 2001) come i recettori di ormoni glucocorticoidi e tiroidei, o recettori per androgeni ed estrogeni.

Caratteristica delle sostanze chimiche estrogeniche è il potenziale di indurre la femminilizzazione in quasi tutte le classi di vertebrati (Pelissero et al., 1993). Ad esempio, anomalie gonadiche come ermafroditismo e ritardo dello sviluppo sono state indotte nelle rane leopardo (*Rana pipiens*) e in *Xenopus laevis* dall'esposizione all'atrazina durante lo sviluppo larvale (Hayes et al., 2002).

Tra gli inquinanti che seguono questo meccanismo d'azione, molto conosciuti sono i Bisfenoli, molecole costituite da due anelli fenolici legati attraverso atomi di carbonio sostituiti in modo vario e due frazioni metiliche funzionalizzate con diversi gruppi, solo il Bisfenolo M (BPM) presenta tre gruppi fenilici (Kitamura et al., 2005).

## 1.2 Il Bisfenolo A (BPA)

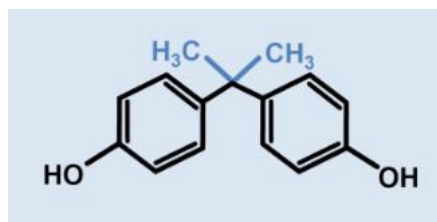


Figura 1: Struttura chimica del BPA.

Il BPA (*4,4'-isopropillidendifenolo, 2,2'-bis(4-idrossifenil) propano*), è il più studiato tra i bisfenoli. È stato originariamente commercializzato come un estrogeno sintetico nel 1938 (Miyagawa et al.; 2021). Prodotto dalla reazione tra due fenoli e una molecola di acetone, è pertanto un composto organico con due frazioni fenoliche (Huang et al., 2012). La produzione globale di BPA è stimata in oltre 3,8 milioni di tonnellate all'anno (MacKay e Abizaid, 2018) e cresce costantemente ogni anno. Il BPA viene utilizzato come sostanza chimica industriale nella produzione di plastica rigida in policarbonato e di resina epossidica ampiamente utilizzata nella fabbricazione di comuni beni di consumo e rivestimento di lattine per bevande e alimenti in alluminio o acciaio. È inoltre presente nelle carte termiche come sviluppatore di colore. È usato anche come stabilizzante e antiossidante nell'industria chimica (Olea et

al., 1996). Il polycarbonato e le resine epossidiche sono materiali relativamente stabili, tuttavia, a seconda delle condizioni di utilizzo, possono deteriorarsi e liberare, seppure in quantità esigue, le sostanze che li compongono. È così che il BPA contamina le derrate alimentari pur essendo presente in quantità minime. Quando è usato come additivo, per esempio nelle carte termiche o nel PVC, il BPA non è legato chimicamente e può quindi essere liberato con maggiore facilità, ma le quantità usate in questo ambito sono molto meno consistenti e l'esposizione è pertanto limitata. Il BPA può essere considerato a tutti gli effetti un contaminante ambientale: lo ritroviamo infatti nel suolo e nell'acqua (Kang et al., 2007), dove si sospetta che abbia anche effetti negativi sulla fauna selvatica e che influisca in particolare sulla riproduzione di numerosi animali acquatici; nell'acqua potabile, e anche nel cibo (Geens et al., 2011). Per esempio, dallo studio condotto da Staples et al (2019), è emerso che la distribuzione dei dati sulla concentrazione di acqua dolce e marina per l'Europa è generalmente simile a quella dell'acqua dolce nordamericana con la maggior parte dei valori nell'intervallo  $0,0001-1,0\mu\text{g L}^{-1}$ . Le concentrazioni al 95° percentile erano  $0,3\mu\text{g L}^{-1}$  e  $0,15\mu\text{g L}^{-1}$  rispettivamente per l'acqua dolce e marina. Le concentrazioni al 95° percentile erano di  $39\text{ ng g}^{-1}\text{ dw}$  e  $177\text{ ng g}^{-1}\text{ dw}$  nei sedimenti d'acqua dolce e  $100\text{ ng g}^{-1}\text{ dw}$  e  $63\text{ ng g}^{-1}\text{ dw}$  nei sedimenti marini.

Il BPA può entrare in contatto con il cibo per diverse vie: può essere ingerito dall'uomo attraverso il consumo di cibi o bevande tenuti in contenitori e incarti di policarbonato (Maragou et al., 2020), come parte di cannuce o tappi di bottiglie, tubi e serbatoi dell'acqua potabile e anche nelle confezioni di cartone per via del processo di riciclaggio (Berge et al., 2017). Il passaggio del BPA dal rivestimento al cibo dipende dalla composizione del cibo, se c'è o meno contatto diretto con il cibo, dalla durata del contatto, dallo spessore del materiale di rivestimento, dalla temperatura di contatto e dai valori di pH (Repossi et al., 2016).

Nell'Unione Europea sono stati condotti numerosi studi di monitoraggio sulla contaminazione da bisfenolo delle bevande di consumo comune. In Belgio, il BPA è stato rilevato a concentrazioni comprese tra 0,02 e 8,1  $\mu\text{g L}^{-1}$  nel 75% di 45 bevande in lattina analizzate, tra cui bevande analcoliche ed energetiche, cola, birra e succhi (Geens et al., 2010). Il BPA è stato riscontrato nel 50% delle bevande non gassate e nel 100% delle bevande gassate, in 71 bevande italiane variamente confezionate, comprese quelle a base di latte (Fasano et al., 2015).

La presenza di BPA nel latte è stata dimostrata anche quando la natura chimica del suo confezionamento non ne consente il rilascio (Grumetto et al., 2013). Ciò suggerisce che la presenza di BPA nel latte può verificarsi anche



durante la sua produzione lungo tutta la filiera, attraverso il contatto con utensili e attrezzature durante la lavorazione degli alimenti o attraverso l'alimentazione degli animali.

Invece, le analisi del BPA e dei suoi analoghi in frutta e verdura non in scatola sono state eseguite raramente nei paesi dell'UE, al contrario, è possibile una stima ragionevole della presenza in frutta e verdura in scatola, per via di diversi studi che riportano i livelli di concentrazione di bisfenoli in questo alimento (Tzatzarakis et al., 2017). La più alta concentrazione di BPA è stata trovata da Alabi et al. (2014) in conserve di asparagi ( $959 \mu\text{g}/\text{kg}^{-1}$ ), campionati dal mercato spagnolo.

A causa dell'inquinamento del mare, dei fiumi e degli oceani, anche i pesci contengono livelli significativi di EDC, tra cui BPA e suoi analoghi, nonché altri contaminanti ambientali. Le concentrazioni di BPA nel pesce fresco sono state determinate sia nel muscolo che nel fegato, poiché è noto che l'esposizione a contaminanti comporta prima un passaggio attraverso il fegato, dopodiché il composto raggiunge il muscolo (Mita et al., 2011). Uno studio sulla bioaccessibilità del BPA nei frutti di mare in scatola ha rivelato che variava dall'80 al 99% (Cunha et al., 2017). Ciò si verifica probabilmente perché la migrazione dagli imballaggi si aggiunge ai livelli già presenti nei tessuti dei pesci freschi e nei frutti di mare a causa del rilascio di detriti di

plastica negli oceani (Yang et al., 2014). Uno studio di Gatidou et al. (2010) su varie specie di bivalvi ha indicato che le concentrazioni di BPA erano simili nei mitili mediterranei di varie aree geografiche (0,16–626,3  $\mu\text{g kg}^{-1}$ ).

Gli studi di monitoraggio sui prodotti a base di carne hanno mostrato bassi valori di BPA in varie carni confezionate provenienti dai mercati norvegese (3,2  $\mu\text{g kg}^{-1}$ ) e greco (0,6  $\mu\text{g kg}^{-1}$ ) (Tzatzarakis et al., 2017). D'altra parte, lo studio condotto in Spagna da Alabi et al. nel 2014 sul contenuto di BPA e 11 derivati bisfenolici nella carne in scatola ha riportato valori di bisfenoli fino a 630,0  $\mu\text{g/kg}^{-1}$ .

I cereali sono un'importante fonte di energia per l'uomo. La produzione di grano, in ventisette paesi dell'UE selezionati, è ora stimata in 134,4 milioni di tonnellate (Russo et al.; 2019). Pertanto, la contaminazione da bisfenoli nei cereali potrebbe essere un' importante fonte di assunzione con la dieta. Purtroppo ad oggi sono stati condotti solo sei studi sulla contaminazione da BPA nei cereali e, tra questi, solo i tre studi del mercato spagnolo hanno considerato anche derivati del BPA (Alabi et al., 2014). Tre tipi di cereali sono stati testati per la contaminazione da bisfenolo: riso, mais e frumento, confezionati in lattine o in plastica. Il primo studio sul BPA nei cereali è stato condotto nel 2010 da Geens et al. su campioni di ravioli, ripieni

di carne e mais (in scatola o in vetro) raccolti dal mercato belga. I livelli di BPA trovati erano fino a  $73,1 \mu\text{g kg}^{-1}$ . Livelli dello stesso ordine di grandezza sono stati segnalati per il mais dolce in scatola nel 2010 da Vina et al., (2010) sul mercato spagnolo e più recentemente (2017) di Tzatzarakis et al. per il mais in scatola dal mercato greco. Livelli molto più bassi sono stati riscontrati in tre studi condotti nel 2012 su una grande varietà di cereali, in Norvegia, Svezia e Spagna.

Nel 2006, lo scenario peggiore dell'UE per l'assunzione giornaliera di BPA era stimato fino a  $1,5 \mu\text{g/kg}^{-1}$  bw (peso corporeo) per gli adulti secondo il parere dell'EFSA sui materiali a contatto con gli alimenti (Lehto et al.; 2017). Nel 2011, l'Organizzazione Mondiale della Sanità (OMS) ha stimato che l'assunzione giornaliera media di BPA con la dieta per gli adulti fosse di  $0,4-1,4 \mu\text{g kg}^{-1}$  bw, con lo scenario di esposizione peggiore di  $4,2 \mu\text{g kg}^{-1}$  bw per gli adulti che consumavano il 100% di bevande e alimenti confezionati (FAO/OMS, 2010).

Riguardo a questo argomento solo due paesi, *Spagna* e *Italia*, hanno rispettivamente 12 e 8 studi negli ultimi dieci anni. Al contrario, non sono disponibili studi o relazioni per ben venti paesi dell'UE. L'EFSA ha recentemente pubblicato un rapporto completo sulla concentrazione di BPA nei prodotti alimentari nell'UE. Il documento ha preso in considerazione sia

gli alimenti in scatola che quelli non in scatola. Il rapporto delle concentrazioni di bisfenoli tra alimenti in scatola e non in scatola variava da 3 a 500 volte per le diverse categorie di alimenti, suggerendo che la contaminazione potrebbe realizzarsi anche durante la lavorazione e la produzione degli alimenti (Pjanic, 2017).

L'Agenzia europea per le sostanze chimiche (European Chemicals Agency) ha dichiarato ufficialmente che l'esposizione a BPA pone seri problemi per la salute umana (Russo et al.; 2019), a seguito di un rapporto fornito dal governo francese che nel 2015 ha bandito il BPA da qualsiasi imballaggio alimentare. Pertanto, è stato rivisto l'elenco delle sostanze pericolose nel quale è stato incluso il BPA. La Direttiva della Commissione Europea 2004/19/CE ha definito un limite di migrazione specifico negli alimenti e nelle bevande fino a  $0,6 \text{ mg kg}^{-1}$  di BPA per cibo.

L'EFSA ha sancito nel 2015 che per il BPA la *Dose Giornaliera Tollerabile* (DGT o, in inglese TDI, *Tolerable Daily Intake*, la quantità di un composto chimico che può essere ingerito senza che ci siano rischi per la salute) passasse da  $50 \text{ } \mu\text{g/kg}^{-1} \text{ bw}$  per giorno a  $4 \text{ } \mu\text{g/kg}^{-1} \text{ bw}$  per giorno.

Il 23 agosto 2017, inoltre, la Commissione Europea ha pubblicato la bozza di regolamento “Bisfenolo A nelle vernici e rivestimenti e nelle materie

plastiche destinate al contatto con gli alimenti”. Questo documento stabilisce un nuovo limite di migrazione specifica per il BPA pari a  $0,05 \text{ mg/kg}^{-1}$  da vernici o rivestimenti applicati a materiali o oggetti destinati al contatto con gli alimenti. Nonostante questi provvedimenti, il dibattito se basse dosi di bisfenoli possano o meno avere effetti negativi sulla salute è ancora aperto (Wang et al., 2017).

Tuttavia, il fatto che l'uomo sia esposto a significative quantità di BPA è stato confermato dal fatto che il BPA è stato rilevato nel siero, nelle urine, nella saliva e persino nel latte e nel tessuto adiposo in oltre il 95% della popolazione generale, bambini inclusi (Sakhi et al., 2014). Dallo studio di Pednekar et al nel 2018 emerse che la concentrazione media  $\pm$  DS di BPA nel plasma delle donne infertili era  $4,66 \pm 3,52 \text{ ng/ml}$  ed era  $2,64 \pm 3,99 \text{ ng/ml}$  nelle donne fertili.

La concentrazione plasmatica di BPA in lavoratori esposti e non esposti (Cina) da Zhuang et al (2014) era maggiore nei campioni di siero di lavoratori esposti rispetto a quelli non esposti al BPA [mediana 18,75, intervallo non rilevabile (ND) a 98,50 ng/mL vs. mediana 3,37, intervallo ND a 28,40 ng/mL].

Dopo l'ingestione, il BPA, nell'organismo umano, viene metabolizzato attraverso il fegato in bisfenolo-A-glucuronide, un composto altamente

solubile che ha un'emivita di 6 ore e viene completamente eliminato entro le 24 ore (Volkel et al., 2002). L'aumento dei livelli di questi composti sembra a sua volta essere legato ad obesità, variabilità del battito cardiaco, aumento delle malattie cardiovascolari, aumento della pressione sanguigna (Bae et al., 2012).

I maggiori rischi per la salute legati al BPA sono dovuti soprattutto alla sua azione come interferente endocrino. Gli EDC sono sostanze in grado di interferire con il sistema ormonale e di provocare in tal modo effetti dannosi sull'organismo. Come interferente endocrino il BPA è in grado di legarsi ai recettori estrogenici che riconoscono l'ormone sessuale femminile, pur essendo, approssimativamente, da 10.000 a 100.000 volte meno attivo dell'ormone naturale. A dosi elevate, il BPA è tossico per il fegato e i reni. Influisce inoltre sulla riproduzione, sullo sviluppo embrio-fetale, sui sistemi nervoso, immunitario, nonché sul metabolismo (obesità, diabete) e si sospetta eserciti un'azione cancerogena (Seachrist et al., 2016).

Tuttavia, come affermato in un recente rapporto dell'EFSA, la responsabilità del BPA nelle disfunzioni cancerose è considerata poco probabile dagli scienziati europei. Il rapporto dell'EFSA rivela però che il BPA è in grado di modificare la struttura della ghiandola mammaria, il che potrebbe in seguito favorire lo sviluppo di tumori. L'Agenzia nazionale

francese per la sicurezza sanitaria dell'alimentazione, dell'ambiente e del lavoro (Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail) è invece giunta alla conclusione che determinate condizioni di esposizione al BPA da parte di donne in gravidanza presentano un potenziale rischio per i nascituri (Beausoleil et al.; 2018).

### ***1.2.1 BPA e sviluppo embrionale***

Uno sguardo attento va rivolto proprio agli effetti tossici delle sostanze chimiche in generale, del BPA in particolare, sull'organismo materno e sullo sviluppo embrionale: è stato visto che l'esposizione agli interferenti endocrini è particolarmente critica durante la fase dello sviluppo (embrione, feto, neonato), poiché gli effetti sono irreversibili e talvolta possono essere rilevati soltanto a un'età più avanzata (OMS, 2013).

La Commissione Europea nel 1992 ha deciso di introdurre a tal proposito una classificazione delle sostanze chimiche in tre categorie. Cat. 1: l'appartenenza di una sostanza chimica a questa categoria è basata su dati umani (epidemiologici) indicanti che ci sono prove sufficienti per stabilire una relazione causale tra l'esposizione umana alla sostanza e conseguente effetto sullo sviluppo. L'appartenenza alle categorie 2 o 3 è sulla base di studi sugli animali. In entrambi i casi si sottolinea che gli effetti negativi sul

concepimento devono essere ottenuti «in opportuni studi sugli animali in assenza di segni di marcata tossicità materna, oppure a circa gli stessi livelli di dose di altri effetti tossici ma che sono una conseguenza secondaria non specifica degli altri effetti tossici». La differenza tra Cat. 2 e 3 è che i risultati devono fornire una forte evidenza di effetti negativi sullo sviluppo (Cat. 3) o alcune prove di effetti negativi sullo sviluppo (Cat.2) ma insufficienti per posizionare i prodotti chimici nella Cat.3.

Sulla base di diversi studi, in Europa il BPA è stato recentemente classificato come «sostanza di cui è presunta la tossicità per la riproduzione umana» (categoria 1B) con il Regolamento 2018/213 varato dalla Commissione Europea il 12 febbraio 2018. Il BPA esercita tossicità sullo sviluppo (Yuan, Jianqin, et al.; 2019) e alterazioni genetiche (McCue e DeNicola, 2019) per embrioni e prole. Il BPA può passare attraverso la barriera placentare (Nesan et al., 2018) ed esercitare effetti negativi sullo sviluppo embrionale. Xie et al. (2016) hanno scoperto che il BPA può arrestare la meiosi, ridurre la qualità degli ovociti e influenzare la vitalità dell'embrione. Come verrà approfondito nelle successive pagine del presente elaborato, gli embrioni di *Xenopus* sono ampiamente utilizzati in studi di tossicità e come modelli di ricerca sullo sviluppo embrionale (Fort and Mathis, 2018). Ad esempio Arancio et al., (2019) hanno condotto un'esposizione acuta di 96 ore con BPA, e alcuni



sostituti del BPA su *Xenopus laevis*: i risultati hanno mostrato che il BPA (1–50  $\mu\text{M}$ ) ha interrotto le divisioni degli embrioni, rallentato la citochinesi e dissociato le cellule embrionali.

Zhu et al., (2020) hanno scoperto che il BPA sovraregolava l'espressione genica di Notch (gene fondamentale nello sviluppo), alterava la proliferazione cellulare e causava cambiamenti istologici nell'intestino di *Xenopus laevis*. Huang et al. (2020) hanno scoperto che l'esposizione di zebrafish a BPA 1  $\mu\text{M}$  portava a cambiamenti dei livelli di espressione di geni coinvolti nella regolazione epigenetica, nello stress ossidativo, nell'apoptosi e nel danno al DNA della prole. Sebbene sia stato segnalato che il BPA causa effetti avversi sullo sviluppo embrionale, il suo meccanismo d'azione, in particolare il meccanismo che causa anomalie alla formazione dell'asse antero posteriore, non è molto chiaro.

In un altro studio (Ge et al., 2021) embrioni di *Xenopus laevis* sono stati esposti a diverse concentrazioni di BPA allo stadio di due cellule per studiarne la tossicità durante lo sviluppo. Concentrazioni di BPA superiori a 1  $\mu\text{M}$  hanno esercitato effetti teratogeni significativi sugli embrioni di *Xenopus* che hanno mostrato coda corta, anomala rotazione dei visceri e la notocorda piegata come principali malformazioni. Gli embrioni esposti a concentrazioni di BPA superiori a 20  $\mu\text{M}$  sono stati gravemente danneggiati e

hanno mostrato deformità, capacità comportamentali compromesse e danni ai tessuti. L'esposizione a concentrazioni di BPA superiori a 0,1  $\mu\text{M}$  ha inoltre indotto in modo significativo un danno al DNA. Nel complesso, questi dati hanno indicato che il BPA può ritardare le prime fasi dello sviluppo, indurre danni al DNA e apoptosi e, infine, causare malformazioni multiple agli embrioni di *Xenopus* (Ge et al., 2021).

In particolare, sono già stati testati gli effetti di diverse concentrazioni di BPA su processi ontogenetici, sullo sviluppo del sistema nervoso e sulla differenziazione degli organi sensoriali in diverse specie di ascidie, come il Cordato non Vertebrato *Ciona intestinalis*. L'effetto teratogeno del BPA è stato confermato nelle ascidie e le principali alterazioni riportate hanno riguardato il sistema GABAergico, i neuroni dopaminergici e le cellule pigmentate degli organi sensoriali a concentrazioni vicine a quelle registrate in aree marine inquinate (Messinetti et al., 2019). Le uova fecondate esposte a concentrazioni di BPA superiori a 1  $\mu\text{M}$  non hanno raggiunto lo stadio larvale (Cangialosi et al., 2013), mentre l'esposizione dallo stadio a due cellule ha provocato una riduzione del tasso di schiusa larvale in maniera dose-dipendente a concentrazioni superiori a 3  $\mu\text{M}$  (Matsushima et al., 2013). Alterazioni specifiche sono state segnalate agli organi pigmentati, vale a dire deposizione anormale di pigmenti, assenza di uno o più organi

pigmentati o presenza di organi soprannumerari. Poiché effetti simili sul sistema nervoso e sugli organi sensoriali sono stati già segnalati in diverse specie di vertebrati, le ascidie hanno confermato il loro valore come modelli animali invertebrati per screening preliminari degli effetti di inquinanti.

Mercurio et al., (2022) hanno analizzato la morfologia generale larvale per determinare gli effetti del BPA sull'embriogenesi dell'ascidia *Ciona intestinalis*. Hanno visto che basse concentrazioni di BPA non hanno influenzato lo sviluppo larvale. Larve esposte a concentrazioni superiori a 10  $\mu\text{M}$  mostravano malformazioni, costituite principalmente da un tronco tondeggiante e/o una coda ricurva. A 20  $\mu\text{M}$  BPA, la maggior parte delle larve non si schiudevano ed erano considerate morte.

In *Ciona intestinalis*, l'esposizione al BPA ha alterato l'espressione genica dei fattori di trascrizione coinvolti nel sistema nervoso centrale e delle cellule del pigmento, come *Ci-Six3/6* e *Ci-Pax6*. Una simile alterazione era stata precedentemente descritta come conseguenza della perturbazione di FGF e Wnt, ciò porta a ipotizzare che il BPA agisca in un punto della cascata di queste vie di segnalazione.

Infine, la co-esposizione al BPA e a un agonista inverso del recettore correlato agli estrogeni (ERR), 4- idrossitamoxifene (4-OHT), durante

l'embriogenesi ha prodotto un recupero del fenotipo normale (Racioppi et al., 2014).

Considerando la presenza del BPA nell'ambiente marino, le ascidie hanno dimostrato di essere un organismo modello affidabile per i saggi biologici di ecotossicologia grazie alla loro posizione filogenetica, essendo il sister group dei vertebrati (Putnam et al., 2008), la loro ampia distribuzione negli ecosistemi marini e la loro ecologia (Gallo & Tosti, 2015). Nelle ascidie, la fecondazione avviene in acqua di mare, quindi gameti ed embrioni possono essere soggetti agli effetti di molti inquinanti ambientali (Villa et al., 2003), rendendo le larve organismi modello adatti per testare la tossicità di contaminanti ambientali come il BPA. Anche se questi effetti sono stati segnalati a concentrazioni lontane da quelle ambientali, la capacità dell'inquinante di accumularsi nei tessuti animali e la sua potenziale tossicità additiva fanno questi risultati degni di nota (Mercurio et al., 2021).

Dati questi risultati, è comprensibile l'applicazione di regole più severe, tra cui il rafforzamento delle misure di prevenzione per gli usi professionali del BPA e il divieto di miscele contenenti BPA destinate ai consumatori. In aggiunta, essendo stato il BPA riconosciuto come "sostanza estremamente preoccupante" riguardo la sua tossicità per la riproduzione (Matuszczak et al., 2019) è stato aggiunto nell'elenco delle sostanze candidate ad essere

soggette ad autorizzazione. Se nel futuro il BPA entrasse a far parte dell'elenco definitivo delle sostanze sottoposte ad autorizzazione, non sarebbe più possibile produrlo o importarlo nell'Unione Europea, salvo che la ditta che desidera utilizzarlo benefici di un'autorizzazione specifica e temporanea. Le normative attuali variano notevolmente da uno Stato all'altro, il che trasmette un senso d'insicurezza ai consumatori.

Paese	Applicazione	Limite	Introduzione
Unione europea	Plastica a contatto con derrate alimentari	Limite di migrazione fissato a 0,05 mg/kg	2018
	Biberon in policarbonati*	Vietato	2011
	Giocattoli	Limite di migrazione fissato a 0,04 mg/l	2017
	Carta termica	Vietato (limite fissato a 0,02% del peso)	2020
Austria	Tettarelle, ciucci e giocattoli per la dentizione	Vietato	2012
Belgio	Contenitori per alimenti destinati a bambini di età inferiore a tre anni	Vietato	2013
Danimarca	Contenitori per alimenti destinati a bambini di età inferiore a tre anni	Vietato	2010
Francia	Tutti i contenitori per alimenti	Vietato	2015
Svezia	Contenitori per alimenti destinati a bambini di età inferiore a tre anni	Vietato	2013
Svizzera	Plastica, vernice e rivestimenti a contatto con derrate alimentari	Limite di migrazione fissato a 0,05 mg/kg	2019
	Vernici e rivestimenti dei contenitori per alimenti dedicati ai lattanti e ai bambini	Alcuna migrazione ammessa	2019
	Giocattoli	Limite di migrazione fissato a 0,04 mg/l	2018
	Biberon in policarbonati*	Vietato	2017
	Carta termica	BPA e BPS vietati (limite fissato a 0,02% del peso)	Dicembre 2020
Australia	Nessun divieto legale		
Cina	Biberon in policarbonati	Vietato	2011
Canada	Biberon in policarbonati	Vietato	2010
Giappone	Nessun divieto, ma misure volontarie da parte dei produttori		
Stati Uniti	Biberon in policarbonati	Vietato	2012
	Contenitori per alimenti destinati a bambini di età inferiore a tre anni	Vietato in alcuni Stati USA	2010-2013

\* Nel quadro della legislazione delle plastiche a contatto con derrate alimentari

*Tabella 1: Attuale regolamentazione del BPA in vari Paesi (Centers for Disease Control and Prevention; 2010).*

### ***1.3 Sostituti del BPA***

La crescente preoccupazione per il bisfenolo A (BPA) come sostanza chimica che altera il sistema endocrino (Rochester 2013) e i suoi possibili effetti sulla salute umana ha portato alla progressiva rimozione del BPA dai prodotti di consumo, spesso ora etichettati come "BPA-free". Nel 2010, il governo canadese ha vietato l'importazione, la vendita e la pubblicità di biberon in polycarbonato contenenti BPA e nel 2011 anche l'Unione Europea si è adattata a questo cambiamento. Scienziati, agenzie regolative e il pubblico in generale hanno sollevato preoccupazioni sull'uso del BPA, soprattutto a causa della sua natura onnipresente e della potenziale esposizione continua (Vandenberg et al., 2010). Ciò ha spinto l'industria a cercare sostanze chimiche alternative.

Alcuni dei sostituti chimici utilizzati dalle industrie come alternative al BPA, tuttavia, sono anche essi bisfenoli e possono avere effetti fisiologici simili al precedente negli organismi e quindi non risultano sempre migliori del composto originario. Ad esempio, alcuni biberon BPA-free continuano ancora a rilasciare sostanze che imitano l'azione degli estrogeni per cui la dicitura «BPA-free» non è sinonimo di assenza di attività ormonale!

Gli analoghi più diffusi ai fini commerciali sono il bisfenolo S (BPS) o (*4,4-sulfonyldiphenol*) e il bisfenolo B (BPB) o (*2,2-Bis(4-hydroxyphenyl)butane*), ma molto diffuso è anche il bisfenolo F (BPF) e il BADGE o *Bisfenolo A-diglicidil-etero* (Chen et al., 2016).

Il BPS ha due gruppi funzionali fenolici su entrambi i lati di un gruppo sulfonilico. Si differenzia dal BPA perché possiede un gruppo sulfonato ( $\text{SO}_2$ ) come stereocentro della molecola invece di un gruppo dimetilmetilene, come nel caso del bisfenolo A.

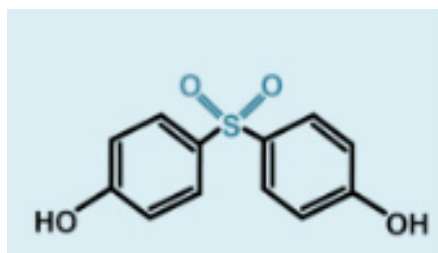


Figura 2: Struttura chimica del BPS.

Viene utilizzato per una varietà di applicazioni industriali: come agente di fissaggio nei prodotti per la pulizia, solvente per elettrodeposizione e costituente della resina fenolica (Clark, 2012). Il BPS è anche utilizzato come sviluppatore nella carta termica, anche nei prodotti commercializzati come "carta senza BPA" (Liao et al., 2012). Anche questa molecola è già stata ritrovata in bibite e cibi in scatola (Gallart-Ayala *et al.*, 2011) e carte termiche per ricevute (Becerra e Odermatt, 2012). Inoltre, il BPS (libero e coniugato) è

stato rilevato nell'81% dei campioni di urina della popolazione generale raccolti dagli Stati Uniti e da sette paesi asiatici ( $n = 315$ ; Liao *et al.*, 2012) a concentrazioni e frequenze paragonabili al BPA (Zhou *et al.*, 2014).

Il BPB è stato invece trovato nei pomodori in scatola (Grumetto *et al.*, 2008), nelle bibite e nelle birre in lattina (Cunha *et al.*, 2011) e insieme al BPS, nel 28% di sieri di sangue di donne italiane con endometriosi ( $n = 58$ ; Cobellis *et al.*, 2009).

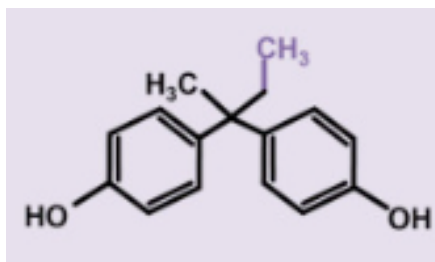


Figura 3: Struttura chimica del BPB.

BPF viene invece utilizzato per produrre resine epossidiche e rivestimenti, in particolare per sistemi che necessitano di maggiore spessore e durata come rivestimenti di serbatoi e tubi, pavimenti industriali, rivestimenti di ponti e strade, adesivi strutturali, stucchi, rivestimenti e vernici elettriche (Rochester *et al.*; 2015). Le resine epossidiche con BPF sono utilizzate anche per diversi prodotti di consumo come lacche, vernici, rivestimenti, adesivi, plastica, tubi dell'acqua, sigillanti dentali e imballaggi per alimenti (Office of Environmental Health Hazard Assessment 2012). BPS e BPF sono stati



rilevati in molti prodotti di uso quotidiano, come i prodotti per la cura della persona ad es. bagnoschiuma, prodotti per la cura dei capelli, trucchi, lozioni, dentifrici (Liao e Kannan 2014), prodotti cartacei ad es. valuta, volantini, biglietti, buste postali, carte d'imbarco per aeroplani (Liao et al., 2012) e alimentari come latticini, carne e prodotti a base di carne, verdure, cibi in scatola, cereali (Liao e Kannan 2013). BPS, BPF e BPA sono stati rilevati nella polvere domestica alle seguenti concentrazioni: BPS, 0,34  $\mu\text{g/g}$ ; BPF, 0,054  $\mu\text{g/g}$ ; BPA, 1,33  $\mu\text{g/g}$  (Liao et al., 2012). BPS e BPF sono stati ritrovati anche nelle acque superficiali, nei sedimenti e nelle acque reflue, generalmente a concentrazioni inferiori rispetto al BPA, ma nello stesso ordine di grandezza (Yang et al., 2014). Nell'uomo, anche il BPF oltre al BPS è stato rilevato nelle urine a concentrazioni e frequenze paragonabili al BPA (Zhou et al., 2014). Sono disponibili informazioni generalmente limitate sui rischi di questi analoghi del BPA. Idealmente, i sostituti utilizzati per sostituire una sostanza chimica preoccupante dovrebbero essere inerti, o almeno molto meno tossici delle sostanze chimiche originali. Tuttavia, come conseguenza della somiglianza strutturale di queste alternative al BPA, esiste il rischio che possano portare a effetti negativi simili. Sfortunatamente, infatti, molti prodotti chimici sostitutivi non sono stati testati prima di essere immessi sul mercato e in alcuni casi sono abbastanza simili alla sostanza

chimica originale da destare preoccupazione. Per questo motivo, tali analoghi chimici dovrebbero essere adeguatamente valutati prima di essere utilizzati come sostituti di sostanze chimiche tossiche. Queste sostanze chimiche possono essere altrettanto dannose degli originali - o più - e sono state descritte come "deplorable sostituzioni", come nel caso di diverse sostanze chimiche perfluorate, pesticidi e ritardanti di fiamma (Bergman et al., 2012).

Nello studio condotto da Rosenmai et al. (2014), l'obiettivo generale era confrontare il rischio di BPB, BPE, BPF, BPS e 4-cumilfenolo (HPP) rispetto al BPA caratterizzando i loro profili tossicologici *in silico* e *in vitro*. Il profilo tossicologico includeva effetti acuti e locali, interferenza con il sistema endocrino, teratogenicità, genotossicità, cancerogenicità ed effetti sul metabolismo. In tale studio il BPA e i cinque analoghi hanno mostrato un chiaro effetto sull'attività dei recettori per androgeni (AR) e dei recettori per estrogeni (ER) nonché sulla sintesi degli ormoni steroidei, suggerendo che questi composti possono interferire con il sistema endocrino attraverso diverse modalità d'azione. In generale, sull'attività degli ER, il BPS ha mostrato sia bassa potenza che efficacia suggerendo che il BPS è il composto meno estrogenico in generale. Al contrario di BPB e HPP che hanno mostrato un maggiore potenziale estrogenico complessivo rispetto al BPA.

Anche per quanto riguarda gli effetti antiandrogeni, il BPS ha mostrato un potenziale antiandrogeno inferiore rispetto ai restanti composti di prova: BPA e BPE erano i più potenti.

Alcuni autori hanno mostrato come il BPS si lega all'ER nucleare con un'affinità di legame relativa dello 0,0055% (Yamasaki et al., 2004). Ji et al. nel 2013 hanno studiato l'esposizione al BPS in zebrafish (*Danio rerio*) e hanno riscontrato diminuzioni del peso delle gonadi, alterazioni degli estrogeni plasmatici e del testosterone e riproduzione interrotta (cioè, diminuzione della produzione di uova e schiusa, aumento del tempo di schiusa, aumento delle malformazioni embrionali).

Considerando questi risultati, la sostituzione del BPA con uno qualsiasi degli analoghi testati dovrebbe essere effettuata con cautela.

#### ***1.4 Xenopus laevis come modello animale per studi tossicologici***

La rana artigliata sudafricana, meglio conosciuta come *Xenopus laevis* è un Anfibio appartenente alla Famiglia Pipidae, Phylum Chordata, originaria dell'Africa Meridionale. Il nome deriva dal latino e vuol dire liscio, alludendo alla sua pelle liscia. *Xenopus laevis* è stato utilizzato per uno dei primi test di gravidanza: la gonadotropina corionica (HCG) contenuta nell'urina delle donne gravide è infatti in grado di indurre la deposizione di uova nella

femmina adulta di *Xenopus laevis*. Oggigiorno tale proprietà viene utilizzata a fini di ricerca, per stimolare l'accoppiamento negli animali da laboratorio. Queste rane passano la maggior parte del loro ciclo vitale in acqua che abbandonano solo nei periodi di siccità e sono notturne. I maschi di *Xenopus laevis* sono lunghi 5–6 cm e raggiungono un peso di circa 60 g, mentre le femmine raggiungono i 10–12 cm e i 200 g (dimorfismo sessuale). La pelle presenta una colorazione variegata dal grigio al verde oliva sul dorso, mentre il ventre è biancastro con sfumature giallastre. Sono state descritte forme albine, prive di pigmentazione.



*Figura 4: Esempio di Xenopus laevis pigmentato.*



*Figura 5: Esempio di Xenopus laevis albino.*

Il corpo è appiattito e la testa di forma triangolare. Sono privi di lingua e di dentatura e le aperture dei condotti uditivi esterni sono anch'essi assenti. Nei maschi manca il sacco vocale. Gli occhi, piccoli e situati nella parte anteriore del capo, sono privi di palpebre. Gli arti anteriori sono piccoli e non palmati,

mentre le zampe posteriori sono grandi e palmate e sulle falangi distali delle prime tre dita sono presenti dei piccoli artigli. In natura questo Anfibio vive in ambienti umidi e con clima mite. Nei laboratori di ricerca viene allevato facilmente all'interno di vasche in soluzioni saline controllate, alla temperatura tra i 18 e i 23°C, ricreando le condizioni di umidità, temperatura, contenuto di sali e pH più simili possibile all'habitat naturale.

#### ***1.4.1 Riproduzione ed embriogenesi di *Xenopus laevis****

In natura, l'accoppiamento può avvenire durante tutto l'anno, più comunemente in primavera; sono stati documentati fino a quattro cicli riproduttivi per anno. In allevamento può avvenire o per stimolazione ormonale o in modo naturale. I maschi emettono il loro richiamo di accoppiamento prevalentemente durante le ore serali. La mancanza del sacco vocale è sopperita da rapide contrazioni dei muscoli laringei, che producono un richiamo caratterizzato dalla alternanza di trilli lunghi e corti. Le femmine possono rispondere al richiamo sia con un canto di consenso sia con un canto di rifiuto, comportamento assolutamente inusuale tra gli Anfibi. Ottenuto il consenso della femmina il maschio la cinge per la vita (amplesso pelvico) e dà inizio all'accoppiamento facendo fuoriuscire le uova dal ventre della rana; la femmina depone centinaia di uova, che si attaccano, singolarmente o in piccoli gruppi, a piante acquatiche, rocce o altre strutture bentoniche grazie ad

una sostanza gelatinosa che le riveste; dopo di che ha inizio la fecondazione esterna da parte del maschio. Le uova sono di medie dimensioni e gli embrioni sono facilmente osservabili al microscopio ottico. Alla fine dello sviluppo embrionale i girini completano il loro sviluppo in 6-8 settimane. Dopo la metamorfosi si ha lo stadio giovanile fino a raggiungere la maturità sessuale in 1-2 anni. Come la maggior parte delle specie del suo genere, ha un corredo cromosomico tetraploide.

L'uovo risulta circondato dall'involucro vitellino che attraverso cambiamenti diventa membrana di fecondazione. L'uovo fecondato è caratterizzato da due emisferi: il polo animale, pigmentato e ricco di citoplasma formativo, ed il polo vegetativo più ricco di vitello, privo di pigmento. Il nucleo e gli organelli citoplasmatici saranno contenuti nel citoplasma formativo, mentre nel tuorlo sarà presente ciò che serve a nutrire l'embrione nelle prime fasi di sviluppo e mRNA materni che consentono traduzione in assenza di trascrizione fino allo stadio di medioblastula.

La prima tappa dello sviluppo di *Xenopus laevis* è la segmentazione, caratterizzata da diverse divisioni mitotiche che vanno dallo zigote allo stadio di morula (16-64 blastomeri) intermedio, si arriva poi a uno stadio di fine segmentazione detto blastula (128 blastomeri), caratterizzato da una cavità interna detta blastocele. Alla segmentazione segue la fase di

gastrulazione (tra stadio 9 e 10), in cui si ha la formazione dei tre foglietti embrionali ectoderma, mesoderma ed endoderma.

A fine gastrulazione ha inizio la neurulazione (tra stadio 14 e 15) con la formazione del tubo neurale e solo successivamente l'organogenesi (tra lo stadio 21 e il 22) fino alla fine con il completamento della formazione dei vari organi e sistemi (stadio 44-45) (Atlante di Nieuwkoop & Faber, 1956).

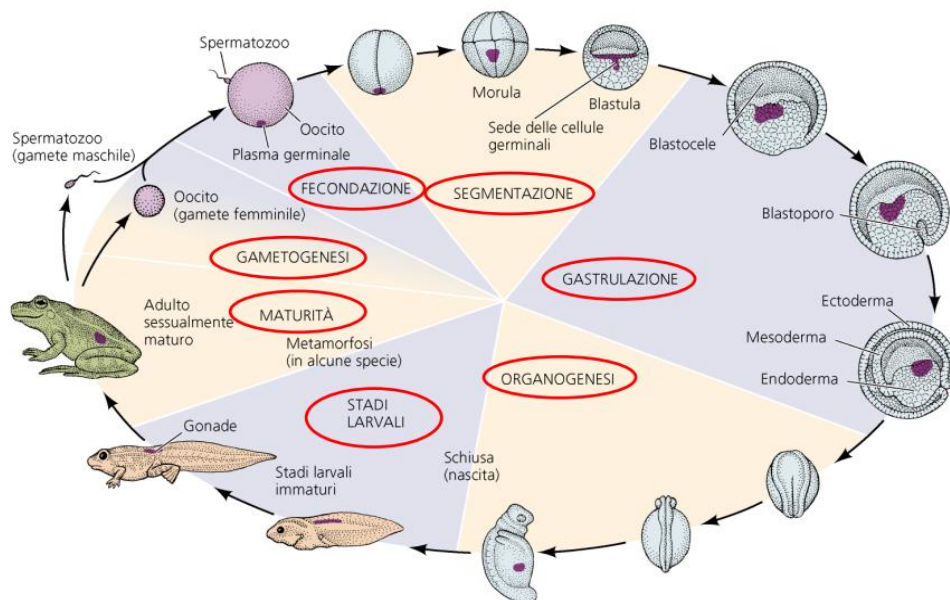


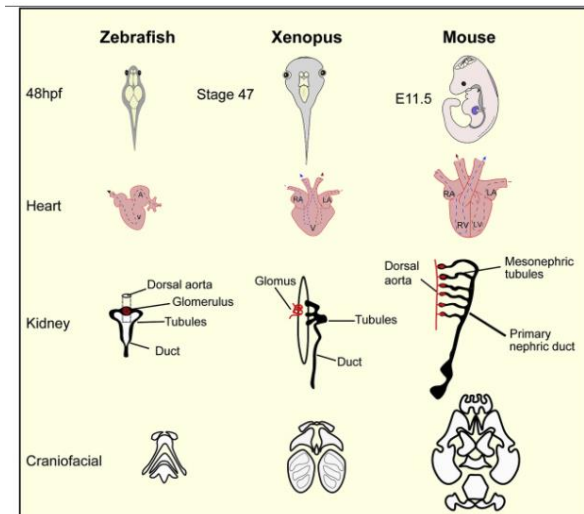
Figura 6: Embriogenesi in *Xenopus laevis*.

### 1.4.2 *Xenopus laevis*: modello ideale per studi tossicologici

L'allotetraploide *Xenopus laevis* è stato utilizzato come uno dei principali modelli animali vertebrati sin dalla loro introduzione come organismo modello negli anni '50 (Tadjuidje and Heasman, 2010) insieme a zebrafish. Il

modello *Xenopus* è un modello vantaggioso in termini di tempo e costi per lo studio *in vivo* dello sviluppo embrionale e della tossicità ambientale, perciò viene oggi spesso preferito e ampiamente utilizzato nella ricerca sullo sviluppo, biomedica e sul cancro (Zhu et al., 2018). Inoltre, le rane possono produrre un numero enorme di uova che vengono fecondate durante tutte le stagioni (Showell e Conlon, 2009). Sia gli embrioni che gli adulti vivono in acqua, il che rende facile per loro assorbire ormoni esogeni o altri composti chimici (Beck e Slack, 2001). Ancora più importante, *Xenopus* è evolutivamente più vicino ai vertebrati superiori rispetto ad altri modelli acquatici in termini di sviluppo degli organi, fisiologia ed espressione genica (Nenni et al., 2019). *Xenopus* condivide maggiori somiglianze nei tessuti e negli organi con i vertebrati superiori, come cuore, reni, sistema vascolare, polmoni, sistema linfatico (Ny et al., 2006) e il sistema immunitario (Wheeler e Brandli, 2009). Inoltre, *Xenopus* ha un cuore a tre camere, mentre zebrafish ha un cuore a due camere con un atrio e un ventricolo, che non può modellare completamente le anomalie del cuore umano a quattro camere (Blum e Ott, 2018). Inoltre, *Xenopus* sviluppa polmoni e arti, che sono assenti nel pesce. È importante sottolineare che la metamorfosi degli Anfibi assomiglia fisiologicamente per molti aspetti allo sviluppo postembrionale dei Mammiferi (Wheeler e Brandli, 2009).

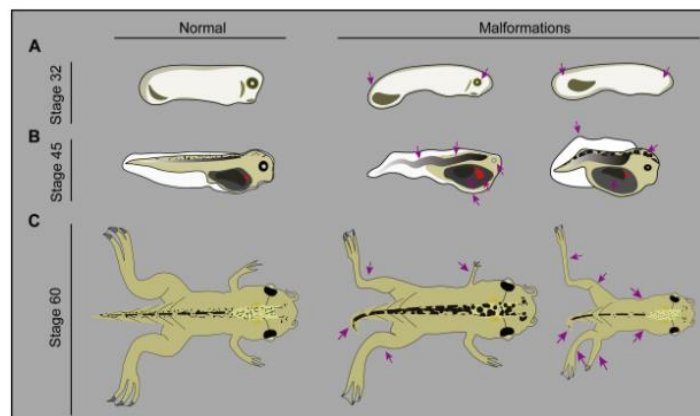




*Figura 7: Diagramma schematico di tessuti e organi evolutivamente conservati utilizzati per studi tossicologici su zebrafish, Xenopus e topo.*

Molti aspetti degli organi di *Xenopus* possono essere utilizzati per studiare il meccanismo dell'organogenesi, inclusi encefalo, occhi, cuore e reni (Frontera et al., 2016) e dell'embriogenesi (Hoppler e Conlon, 2020). Il sistema retino-tettale visivo è stato ampiamente utilizzato per studiare la neurogenesi, la funzione del circuito visivo e la plasticità sinaptica *in vivo* (He et al., 2018). Il nuoto libero dei girini e i comportamenti di evitamento guidato visivamente possono essere analizzati per misurare la funzione visivo-motoria, che aiuta nella comprensione dell'elaborazione sensoriale in un circuito neurale intatto (He et al., 2018). Inoltre, la metamorfosi degli Anfibi viene utilizzata nella ricerca sull'apoptosi cellulare mediata dagli ormoni tiroidei e sullo sviluppo delle cellule staminali durante le transizioni dello sviluppo dei Vertebrati (Buchholz, 2017). A differenza dei Mammiferi, i girini di *Xenopus* hanno un

alto potenziale rigenerativo per strutture compreso il midollo spinale (Aztekin et al., 2019), cuore (Marshall et al., 2019), epitelio (Kim et al., 2020) e arti (Herrera-Rincon et al., 2018), rendendo *Xenopus* un modello interessante per studiare i meccanismi che governano la rigenerazione (Phipps et al., 2020). L'esposizione a sostanze tossiche ambientali può causare danni reversibili a breve termine o irreversibili a lungo termine a vari tessuti e organi, portando a malformazioni e malattie.



*Figura 8: Diagramma schematico di diverse malformazioni conseguenti a studi di tossicità chimica in Xenopus. Gli stadi rappresentativi di Xenopus a 32, 45 e 60 sono quelli che di solito vengono utilizzati per studiare i deficit di sviluppo indotti da sostanze chimiche. (A) Perdita di occhi, embriogenesi anormale e malformazioni dell'embrione nella fase di sviluppo 32. (B) Aggregazione del pigmento, perdita di pigmento, intestino piegato male, occhio anormale, ingrossamento del cuore, diminuzione della lunghezza della colonna vertebrale, e flessione della coda allo stadio 45. (C) Aggregazione del pigmento, melanosomi dispersi, aumento della lunghezza degli arti, deformità degli arti, metamorfosi anormale e inibizione della crescita allo stadio 60. La dimensione degli embrioni non è proporzionalmente ridimensionata.*

Questi vantaggi rendono *Xenopus* un modello unico per studiare l'impatto dei fattori ambientali sul suo sviluppo dai livelli molecolari e cellulari a quelli

circuitali e comportamentali e meccanismi di malattie umane (Hasebe et al., 2017).

Poiché le specie di Anfibi hanno sia una fase larvale acquatica che una fase terrestre adulta, questi organismi sono sensibili agli inquinanti dell'acqua e del suolo, il che li rende un modello unico per il monitoraggio dei rischi ambientali con bassi costi sperimentali. L' uovo di *Xenopus* è una cellula di discrete dimensioni, facilmente manipolabile. Gli ovociti di *Xenopus* non fecondati rimossi dalle femmine sono stati ampiamente utilizzati per studiare i meccanismi di endocitosi, i canali ionici e i processi citologici (Maia et al., 2017). Gli estratti di uova di *Xenopus* sono un citoplasma privo di cellule e biologicamente attivo che imita l'ambiente fisiologico cellulare e contiene tutte le proteine citoplasmatiche, gli organelli e altri componenti essenziali (Hodskinson et al.,2020).

In contrasto con il tipo di *Xenopus* pigmentato, la pelle trasparente del girino di *Xenopus* albino è adatta per il monitoraggio in tempo reale della morfologia neurale, della dinamica cardiovascolare, dello sviluppo del cuore, della linfangiogenesi e dell'angiogenesi per ore o giorni con esposizione a sostanze chimiche tossiche (Duncan e Khokha, 2016).

### 1.5 Ascidie del genere *Ciona* come modello animale per studi tossicologici



Figura 9: Esempari di *Ciona intestinalis*.

*Ciona intestinalis* è un'ascidia appartenente alla famiglia Cionidae, Phylum Chordata, descritta per la prima volta in Svezia da Linneo nel 1767. Si tratta di un tunicato solitario di forma cilindrico-sacciforme, attaccato alla sua base ad un substrato mediante corti rizomi e presenta due aperture o sifoni, un sifone orale e uno atriale. I sifoni sono corti e diretti in alto, lobati ed hanno una caratteristica macchiolina rossa su ogni lobo. Il sifone orale ha 8 lobi, ciascuno con un margine giallo contenente 8 macchie rosso-arancio, ma queste macchie non sono sempre evidenti. Il sifone atriale ha 6 lobi, ciascuno con un margine giallo contenente 6 macchie rosso-arancio. Il sifone inalante è posto in posizione apicale, quello esalante è posto inferiormente e in posizione laterale. Il sifone orale è più grande del sifone atriale. Il cestello

branchiale è molto sviluppato ed occupa gran parte del corpo. L'acqua viene pompata attraverso il sifone orale, dove fitoplancton e detriti vengono filtrati dalle branchie e intrappolati nel muco e inviati allo stomaco e all'intestino da movimenti ciliari. I rifiuti vengono quindi espulsi nell'acqua dal sifone atriale in uscita. L'animale è rivestito da una spessa tunica di consistenza gelatinosa ed aspetto trasparente o traslucido, di colore per lo più biancastro, talora anche giallo-verde. Può raggiungere i 20 cm di lunghezza ed è solitamente più largo vicino all'estremità posteriore fissata in modo permanente e si assottiglia verso l'estremità anteriore. Gran parte della tunica è morbida, flessibile e gelatinosa, ad eccezione dell'estremità posteriore dove può essere dura, per lo più opaca, bianca o bianco-giallastra. Le fasce muscolari e gli organi interni sono spesso visibili sotto la tunica. Ci sono 5-7 bande muscolari longitudinali cospicue su ciascun lato del corpo che si estendono per quasi l'intera lunghezza del corpo (Sato et al., 2012).

### ***1.5.1 Diverse specie di ascidie***

Fino in tempi recenti *Ciona intestinalis* è stata considerata una specie cosmopolita. Diversi dati di natura molecolare, fisiologica ed ecologica hanno dimostrato l'esistenza di due entità filogeneticamente divergenti all'interno del complesso "Ciona intestinalis" (definiti tipo A e tipo B) alle quali è stato riconosciuto il livello tassonomico di specie. Il tipo B ha mantenuto il nome

di *Ciona intestinalis*, il tipo A è stato nominato *C. robusta* (Brunetti et al., 2015).

### **-*Ciona robusta***

La specie è ampiamente distribuita sulle coste dell'Europa meridionale, del Mar Mediterraneo e del Pacifico; era inizialmente designata 'tipo A', ed è risultata corrispondere a *C. robusta*, descritta in Giappone da Hoshino e Tokioka nel 1967.

### **-*Ciona intestinalis***

*Ciona intestinalis* è una specie associata alle acque più fredde e settentrionali, in contrasto con *C. robusta*, ampiamente presente nelle regioni temperato-calde. Predilige i fondali rocciosi ma vive anche attaccata alle alghe. Si adatta anche ad acque con grandi variazioni di salinità (lagune) o inquinate (porti), da 0 a 500 metri di profondità. *Ciona intestinalis* è ampiamente conosciuta come un organismo incrostante di navi e moli (Millar 1971). I suoi impatti economici più gravi sono stati sull'acquacoltura di molluschi in Nuova Scozia, dove si dice che i tunicati riducano i tassi di crescita delle cozze (Ramsay et al., 2008).

### ***1.5.2 Riproduzione di Ciona intestinalis***

Le ascidie solitarie si riproducono sessualmente mentre la riproduzione asexuale è tipicamente adottata dalle specie coloniali, le quali tendono a riprodursi mediante gemmazione e rigenerazione (Berrill, 1975). *Ciona intestinalis* è un organismo ermafrodita, le uova e lo sperma vengono rilasciati dalla camera atriale. I gameti vengono espulsi dal sifone esalante e la fecondazione ha luogo nel mare, quindi sono animali a fecondazione esterna e ovipari. La gemmazione è estremamente variabile e viene utilizzata sia per favorire la propagazione della specie, sia per garantirne la sopravvivenza. Lo zigote si sviluppa liberamente nell'acqua e l'embriogenesi avviene piuttosto rapidamente. Le uova di ascidia sono oligolecitiche, ossia il poco tuorlo presente è quasi omogeneamente distribuito nel citoplasma, e hanno dimensioni piuttosto piccole con un diametro medio di 170  $\mu\text{m}$ . Sono ricoperti da un involucro vitellino acellulare di natura coriacea, sulla cui superficie si osservano numerose cellule follicolari e sono caratterizzati da una polarità netta, infatti il nucleo è in posizione eccentrica, spostato verso il polo animale. La penetrazione avviene nel polo vegetativo, successivamente l'uovo si attiva e avviene un riarrangiamento del citoplasma della cellula uovo, chiamato segregazione ooplasmatica, che è una vera e propria compartimentazione dei determinanti citoplasmatici che determina il

differenziamento degli assi dorso-ventrale e antero-posteriore e le zone da cui origineranno le regioni corporee future. Lo sviluppo embrionale prosegue con le fasi di segmentazione, gastrulazione, neurulazione, fino alla schiusa della larva. La larva si sviluppa circa 12 ore dopo la fecondazione o nel giro di pochi giorni a seconda della specie e della temperatura ed è molto simile a un girino anche se differisce da esso per la mancanza di una bocca. La larva nuota per poche ore e successivamente subisce una metamorfosi mediante la quale si trasforma in individuo giovane. In alcune specie la maturità sessuale viene raggiunta nel giro di poche settimane se gli individui vivono in condizioni favorevoli, generalmente 1-2 mesi o ancora più precocemente se vivono in acque tiepide. Ciò suggerisce che, se questa specie vive in condizioni favorevoli, sarà in grado di passare attraverso diverse generazioni nel giro di un solo anno. Si riproduce durante tutto l'anno con picchi in estate. Nelle popolazioni più settentrionali (Svezia), il rilascio di gameti raggiunge il picco in maggio/giugno. In Svezia in acque meno profonde (0-8 m) e salinità ridotta (20 psu) la specie tende ad essere semelpara mentre in acque più profonde (15-30 m), più stabili e con piena salinità (30-32 psu) la specie raggiunge dimensioni maggiori, vive più a lungo ed è più iteropara. Gli adulti possono raggiungere i 2-3 anni di età, anche se in genere vivono solo un anno. La capacità riproduttiva dipende dalle dimensioni piuttosto che dall'età. In



laboratorio, l'insediamento e la deposizione delle uova possono essere controllati manipolando i livelli di luce (Woollacott, 74). Whittingham (1967) ha notato che *Ciona intestinalis* emetteva gameti entro 4 minuti ( $\pm 2,6$ ) dall'esposizione alla luce. Pertanto, l'esposizione alla luce può sincronizzare la deposizione delle uova. In alcuni casi ed è stato visto che *Ciona intestinalis* depone le uova intorno all'alba. Gli spermatozoi rimangono vitali fino a 16 ore dopo il rilascio in assenza di uova. Tuttavia, in presenza di uova la vitalità degli spermatozoi è ridotta a 1,5 ore (Bolton e Havenhand, 1996).

#### ***-Deposizione delle uova***

Dopo il rilascio, le uova rimangono vitali per la fecondazione fino a 30 ore. Le uova affondano in acqua ferma. Sono adesive e aderiscono al substrato. Le uova hanno un diametro di circa 160 micron, di colore rosso o verde. Le cellule follicolari esterne lunghe e affusolate si irradiano dalla superficie delle uova. Le uova possono essere rilasciate singolarmente o in filamenti di muco. Le corde di muco si aggrovigliano e aderiscono prontamente agli adulti vicini. Le larve giriniformi possiedono un tipico piano corporeo da cordato che include un tubo neurale dorsale, una notocorda assiale fiancheggiata da cellule muscolari e un filamento endodermico ventrale (Yasuo et al., 1994).

### *-Dispersione*

Lo sviluppo embrionale si completa nell'arco di circa 18 ore ma dipende dalla temperatura. Le larve appena schiuse possono fuoriuscire dai filamenti di muco per disperdersi nel plancton (40-60% delle larve) o possono essere trattenute fino all'insediamento. La ritenzione nella stringa di muco può spiegare le dense aggregazioni trovate negli adulti. In laboratorio, l'insediamento della larva può richiedere fino a sei giorni, ma sul campo di solito è molto inferiore (minuti o ore). Le uova e lo sperma vengono rilasciati attraverso il sifone atriale nella colonna d'acqua circostante dove avviene la fecondazione. Le uova fecondate si schiudono in una larva giriniforme con coda muscolosa provvista di notocorda. La larva lecitotrofica (che non si nutre, dipende dal tuorlo) nuota brevemente prima dell'insediamento. I periodi di nuoto sono generalmente inferiori a un giorno e alcune larve si depositano immediatamente dopo il rilascio, ma il periodo larvale può essere più lungo a temperature più basse (Dybern 1965). Una volta adesa al substrato, la coda viene assorbita, il cestello branchiale si espande e il tunicato inizia a nutrirsi filtrando (Katz et al.; 1983).

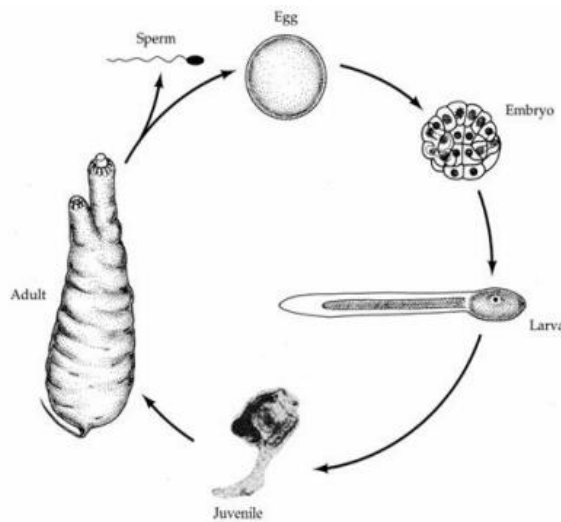
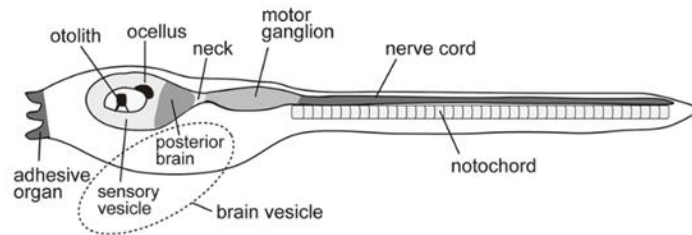


Figura 10: Ciclo vitale bifasico di *Ciona intestinalis*.

### ***1.5.3 Larve di Ciona intestinalis: una morfologia peculiare***

Le larve di ascidia sono individui liberamente natanti dalle dimensioni piuttosto variabili a seconda della specie e comprese tra 1 e 11 mm circa. L'anatomia della larva delle ascidie solitarie è molto semplice: hanno un tronco, sede dei centri nervosi e dove si trova la maggior parte degli organi costituiti da un totale di 2600 cellule: epidermide, sistema nervoso centrale e periferico, endoderma e mesenchima; e una coda che svolge una funzione motoria, dove sono situati notocorda e muscolo.



*Figura 11: Rppresentazione schematica della morfologia di una larva di Ciona intestinalis con indicazioni delle sue parti anatomiche.*

Il corpo è completamente avvolto da un sottile strato di epidermide, che secerne la tunica, a sua volta costituita da uno strato interno e da uno strato esterno e da filamenti extracellulari. Lo strato più esterno nella regione della coda si appiattisce e forma la pinna caudale, la cui funzione è probabilmente quella di aiutare l'animale nel nuoto. In alcune specie, le cellule dell'epidermide producono granuli elettro-densi, detti "ornamenti", che aderiscono allo strato cuticolare più esterno (Cloney and Cavey, 1982; Cloney, 1990). La tunica è munita, inoltre, di cellule ameboidi.

Cloney (1990) ha descritto in dettaglio il processo di metamorfosi delle larve di *Ciona intestinalis* e ha classificato gli organi e i tessuti di una larva natante in tre diversi gruppi in base al loro destino:

- **Organi larvali transitori (TLO):** esistono solo nella fase larvale, sono coinvolti nel nuoto, nel controllo motorio, nel trasporto di informazioni

sensoriali, nell'ancoraggio iniziale e nell'insediamento. Comprendono le papille adesive, la notocorda, la muscolatura della coda e la vescicola cerebrale.

- Organi e tessuti larvali giovanili (LJO): sono gli organi e i tessuti presenti in tutte le fasi del ciclo vitale di un individuo, sia nella fase larvale, sia nella fase adulta. Comprendono l'epidermide, le cellule del sangue, la muscolatura liscia e il cuore.
- Organi giovanili futuri (PTO): sono organi rudimentali, presenti già nella fase larvale, ma non funzionanti, che completano lo sviluppo con la metamorfosi. Comprendono gli abbozzi dei due sifoni, del cestello branchiale, dell'esofago, dello stomaco e dell'intestino.

Tra le strutture transitorie, nell'estremità anteriore del corpo di molte specie di ascidia si osservano le papille adesive, ossia tre strutture di forma conica, rispettivamente due dorsali e una ventrale, che svolgono un ruolo importante nell'adesione della larva al substrato prima della metamorfosi. Le papille sono completamente circondate, ad eccezione delle loro punte anteriori, da un singolo strato di cellule epidermiche appiattite.

Nel tronco è presente, inoltre, un faringe primordiale seguito da un intestino primordiale, entrambi costituiti da cellule relativamente indifferenziate ricche

di tuorlo. Il faringe è una sacca di cellule cuboidali e colonnari. L'intestino è invece un tubo chiuso e piegato, munito di un unico strato di cellule, che si estende rostralmente dal faringe primitivo e caudalmente all'inizio della notocorda.

In posizione posteriore, presso l'inizio della notocorda, è situato un abbozzo non funzionante del cuore formato da due atrii primitivi, organizzati in sacche sferiche che durante la metamorfosi si fonderanno a dare il singolo sifone atriale dell'adulto (Berril, 1950).

La coda contiene 40 cellule muscolari striate mononucleate, organizzate in tre file disposte lungo ogni lato della notocorda. Il nucleo di queste cellule è molto grosso e il citoplasma che lo avvolge è munito di numerosi mitocondri. Ogni cellula muscolare, inoltre, contiene 20-35 miofibrille, disposte parallelamente tra loro, ma leggermente oblique rispetto all'asse cellulare. I tubuli del reticolo sarcoplasmatico avvolgono completamente ognuna delle miofibrille.

Una volta terminata la neurulazione, il tubo neurale, da cui ha origine il SNC nelle ascidie, si differenzia in alcune regioni specifiche, quali la vescicola sensoriale, il collo, il ganglio viscerale e il cordone neurale dorsale.

La vescicola sensoriale è la struttura più evidente nel tronco. Si presenta come un rigonfiamento cavo localizzato in posizione anteriore nel tronco che contiene la neuroipofisi e tre organi sensoriali rappresentati dall'otolite anteriore, una cellula pigmentata adibita a svolgere funzioni di tipo geotattico, l'ocello posteriore, sensibile alla luce e infine l'organo di pressione probabilmente atto all'omeostasi della pressione idrostatica del liquido della vescicola (Nicol e Meinertzhagen, 1991). La vescicola sensoriale è anche la regione in cui si originano molti degli 80-100 neuroni del SNC. Il complesso fotorecettoriale è composto da una cellula pigmentata, l'ocello, tre cellule lenti e circa 30 cellule retinali. La vescicola sensoriale è considerata omologa al proencefalo e mesencefalo dei vertebrati. L'otolite e l'ocello contengono cellule con pigmenti di melanina e la loro posizione è coerente con un'origine proencefalica.

Il collo sottile collega la vescicola sensoriale al ganglio viscerale e comprende sei cellule endodermali (Nicol e Meinertzhagen, 1991). Il collo sembra rappresentare nelle ascidie l'equivalente dell'istmo dei vertebrati (Wada et al., 1998), ossia una regione organizzatrice posta a confine di mesencefalo e rombencefalo che rilascia induttori capaci di agire sul mesencefalo e di determinarne la strutturazione. Attualmente però non è ancora stata individuata nel collo la capacità organizzativa attribuibile all'istmo.

Il ganglio viscerale è posteriore al collo e contiene 45 cellule, inclusi 18 neuroni, dei quali cinque paia sono motoneuroni (Nicol e Meinertzhagen, 1991). Questa regione ha pertanto la funzione di controllo dei movimenti della larva natante e di integrazione degli stimoli sensoriali. Nonostante l'assenza di una visibile segmentazione, questa struttura è l'omologo del rombencefalo nei vertebrati. Infine il cordone neurale dorsale è situato in posizione posteriore e costituisce un semplice tubo neurale che si estende per tutta la coda della larva. Esso comprende cellule endodermali organizzate in quattro regioni: cellule laterali di destra e di sinistra, e cellule della regione dorsale e della regione ventrale.

Nonostante siano in numero ridotto, i neuroni della larva rappresentano un sistema nervoso attivo che permette all'organismo di manifestare vari comportamenti, come la scelta del substrato in cui fissarsi e il processo di metamorfosi mediato da vari stimoli sensoriali (Torrence e Cloney, 1983). Il sistema nervoso centrale delle ascidie può essere quindi confrontato con quello dei vertebrati analizzando sia l'espressione genica sia la morfologia (Dehal et al., 2002). Il sistema nervoso periferico è costituito da neuroni epidermici sensoriali (ESN) presenti sia nel tronco che nella coda. Tali neuroni si estendono con le lunghe ciglia fino alla tunica della larva e per questo motivo si pensa costituiscano gli organi meccanosensoriali (Crowther



e Whittaker, 1992). Inoltre due neuroni sensoriali sono stati localizzati in ognuna delle tre papille adesive situate all'estremità anteriore della larva.

In *Ciona intestinalis*, i neuroni epidermici sensoriali delle papille sono connessi alla vescicola sensoriale tramite i neuroni epidermici rostrali del tronco (RTEN). Sono stati, inoltre, trovati neuroni epidermici apicali del tronco (ATEN) dorsalmente alla parte posteriore della vescicola sensoriale che stabiliscono un contatto col ganglio viscerale, ma la funzione di questi neuroni non è ancora nota. Sono presenti, infine, neuroni epidermici nella zona mediana dorsale e ventrale della coda (Takamura, 1998).

#### ***1.5.4 Ciona intestinalis, “stella nascente della biologia”***

*Ciona intestinalis* ha alcune caratteristiche che la rendono un ottimo organismo modello per studi sul genoma e sulla embriogenesi: si riproduce durante tutto l'anno, ha un numero limitato di geni (circa 15000) e un genoma compatto (circa 160 milioni di basi azotate) ed ha infine, come tutti i tunicati, interessanti rapporti filogenetici con i vertebrati.

È stata utilizzata già in passato come modello per studi di embriologia ed è stata anche uno degli animali introdotti per la prima volta per la ricerca sul lignaggio cellulare (Liu et al., 2006). Negli anni '40, Morgan studiò l'autofecondazione e la fecondazione incrociata di *Ciona intestinalis*. Negli

ultimi decenni, *Ciona intestinalis* è diventato un cordato invertebrato usato come modello in vari campi della biologia, dalla biologia dello sviluppo all'evo-devo e alla genomica comparata (Satoh, 2003). I ricercatori hanno mostrato un aumento di interesse per le ascidie a causa della loro posizione evolutiva cruciale e della modalità di sviluppo (Dehal et al., 2002). L'intero genoma di *Ciona intestinalis* è stato sequenziato, analizzato e annotato (Sordino et al., 2001); sono stati divulgati centinaia di migliaia di EST; un gran numero di geni coinvolti nello sviluppo sono stati clonati e sono stati pubblicati centinaia di modelli di espressione genica (Satoh et al., 2003). In particolare, la pubblicazione nel 2002 della bozza del genoma nucleare di un individuo campionato in California ha dato ulteriore impulso allo studio di questo organismo modello e ha contribuito a chiarire l'origine evolutiva delle apomorfie dei cordati (Dehal P et al., 2002). Come potenziale sistema modello di biologia evolutiva, *Ciona intestinalis* ha guadagnato così tanta attenzione da essere considerato una “stella nascente della biologia” (Pennisi, 2002). In questo studio, focalizzeremo la nostra attenzione sulla morfologia larvale di *Ciona intestinalis*, dal momento che questa specie è ampiamente utilizzata come modello nella biologia dello sviluppo. Come modello, *Ciona intestinalis* offre numerosi vantaggi, perché unisce la struttura corporea tipica dei cordati alla maneggevolezza di un invertebrato che

produce migliaia di embrioni a rapido sviluppo, facilmente allevabili in acqua di mare.

## Capitolo secondo

### SCOPO DELLO STUDIO

L'uomo risulta esposto a composti chimici di varia natura presenti in diverse concentrazioni, come inquinanti, nell'ambiente, nel suolo, nell'acqua e nell'atmosfera. Proprio l'esposizione agli inquinanti ambientali è uno dei fattori che desta oggi giorno maggiore preoccupazione per la salute umana, degli ecosistemi acquatici e terrestri a causa della loro tossicità. Tra gli inquinanti emergenti troviamo le sostanze chimiche che alterano il sistema endocrino (Rodriguez-Narvaez et al., 2017): fanno parte di questa nuova classe i Bisfenoli, additivi che vengono aggiunti a plastiche e ad oggetti di cui facciamo gli usi più svariati. Con il presente studio è stato valutato l'effetto di questi composti chimici sullo sviluppo embrionale in due modelli diversi. Infatti è stato visto che l'esposizione agli interferenti endocrini è particolarmente critica durante la fase dello sviluppo (embrione, feto, neonato), poiché spesso gli effetti sono irreversibili e talvolta possono essere rilevati soltanto a un'età più avanzata (OMS, 2013). Lo scopo del presente lavoro è stato quello di valutare e comparare gli effetti embriotossici di due bisfenoli (BPB e BPS), su due modelli animali alternativi appartenenti al Phylum dei Cordati: *Xenopus laevis* e *Ciona intestinalis*. Bisfenolo A è stato testato solo in *Xenopus laevis*, dato l'effetto già noto in *Ciona intestinalis*

(Mercurio et al., 2022). La scelta dei modelli animali è stata dettata dal fatto che rappresentano alcuni tra i modelli evolutivi più vicini all'uomo quando si vuole fare ricerca riducendo il più possibile l'uso dei modelli mammiferi. Abbiamo comparato le concentrazioni che causano malformazioni e letalità in entrambi i modelli al fine di valutare la validità dei modelli stessi nella risposta alle molecole in esame. Sebbene i test di teratogenicità nei mammiferi siano fondamentali, per il benessere degli animali vi è una grande necessità di sviluppare sistemi alternativi per studi di ricerca. Gli embrioni di anfibio *Xenopus laevis* e zebrafish (*Danio rerio*), quindi vertebrati non mammiferi, stanno diventando il gold standard come modelli di vertebrati embrionali perché il sacrificio degli adulti non è necessario. La predittività per la teratogenicità umana di questi metodi è fortemente dovuta alla stretta correlazione tra lo sviluppo dei vertebrati nei loro stadi filotipici, ovvero gli stadi in cui embrioni di classi diverse esprimono il più alto grado di somiglianza morfologica e molecolare (Battistoni et al., 2022). Il presente studio vede utilizzato *Xenopus laevis* in quanto modello non mammifero più vicino all'uomo (E. Galdiero et al., 2017). Come modello di invertebrato, *Ciona intestinalis* offre numerosi vantaggi: fa parte del *Subphylum* dei Tunicati, considerato il *sister group* dei Vertebrati; ha tempi di

sviluppo rapidissimi; produce migliaia di embrioni; rappresenta un modello animale marino.

## Capitolo terzo

### MATERIALI E METODI

Tutta la sperimentazione è stata condotta presso il Dipartimento di Scienze e Politiche Ambientali dell'Università degli Studi di Milano sotto la supervisione della Prof.ssa Elena Menegola e della Prof.ssa Roberta Penati.

#### **3.1 *Xenopus laevis***

##### **3.1.1 Metodo R-FETAX (*Refined-Frog Embryo Teratogenesis Assay: Xenopus*)**

Il saggio di teratogenesi dell'embrione di rana *Xenopus* (FETAX) (Dumont et al., 1983) è un saggio sviluppato per determinare il potenziale di tossicità e teratogeno di sostanze chimiche e miscele complesse per lo sviluppo. Nel 1991, l'American Society for Testing and Materials (ASTM) ha sviluppato una linea guida di prova per FETAX (Dumont et al., 1983), che è stata successivamente rivista e ripubblicata nel 1998 come Background Review Document FETAX, Marzo 2000.

Gli endpoint primari includono mortalità, malformazioni e inibizione della crescita. A causa della piccola quantità di composto necessaria e della capacità di studiare l'organogenesi in un breve periodo di tempo (96 h), il test FETAX è considerato un efficiente test di allerta per la tossicità dello

sviluppo se eseguito all'inizio dello sviluppo nei test sulla sicurezza dei farmaci (Mouche et al., 2011).

Per il presente lavoro abbiamo utilizzato la metodica R-FETAX (Battistoni et al., 2022) che prevede accoppiamento naturale senza iniezione di ormoni e esposizione degli embrioni durante specifiche fasi dello sviluppo.

E' possibile raggruppare ogni stadio di sviluppo, descritto nell'atlante di Nieuwkoop & Faber (1956), in differenti finestre di esposizione che rappresentano ciascuna, una tappa caratteristica dell'embriogenesi; il test FETAX modificato (R-FETAX, Battistoni et al., 2022) considera le seguenti finestre di esposizione:

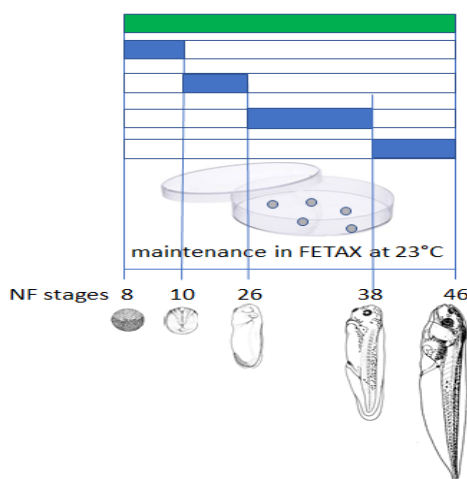


Figura 12: Finestre di esposizione test R-FETAX secondo Battistoni et al., 2022

1. Pre-gastrulazione (midblastula-gastrula) dallo stadio 8 al 10;

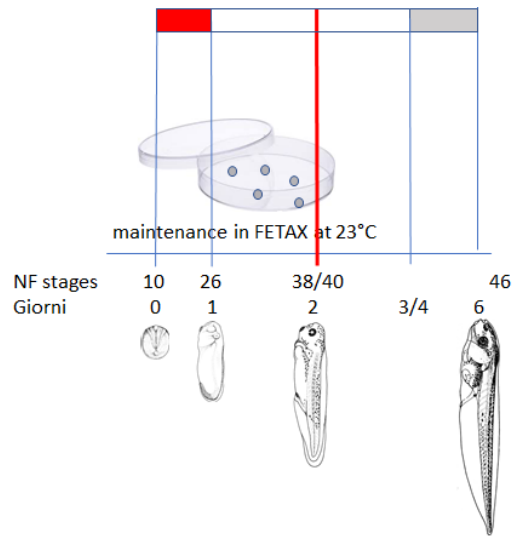


2. Inizio gastrulazione/periodo organogenetico precoce (gastrula-stadio filotipico) dallo stadio 10 al 26;
3. Periodo organogenetico tardivo (stadio filotipico-girino) dallo stadio 26 al 38;
4. Tadpole (girino): stadio 38-46. Questa finestra comprende gli stadi di differenziamento morfo-funzionale della larva. Vengono rifinite le strutture specifiche del girino, comprese le strutture cranio facciali con il differenziamento delle cartilagini. Corrisponde anche al periodo di maturazione neurologica.

Si tenga presente che NF 47 ½ è considerata l'ultima forma larvale ad alimentazione non autonoma (C.R. McKeown et al., 2017) ed esclusa dall'elenco dalla direttiva UE 2010/63/UE e dal D.lgs 26/2014 sulla protezione degli animali utilizzati a fini scientifici. R-FETAX pertanto è un test che non prevede alcuna procedura sugli animali normata.

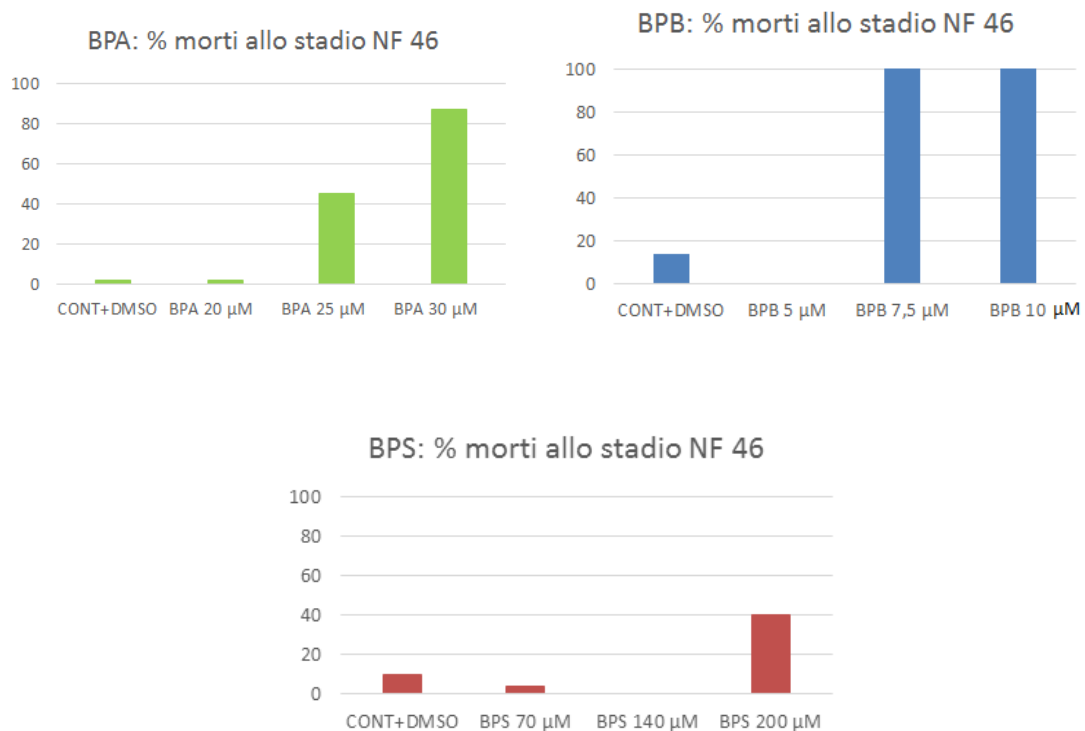
### ***3.1.2 Applicazione metodo R-FETAX per testare embriotossicità dei bisfenoli su embrioni di *Xenopus laevis****

Nel presente studio gli effetti teratogeni dei bisfenoli BPA, BPB e BPS sono stati valutati nella finestra di esposizione del metodo R-FETAX corrispondente alla morfogenesi precoce (Fig.13).



*Figura 13: Finestra di esposizione metodo R-FETAX (l'area rossa rappresenta la finestra di esposizione presa in considerazione nel presente studio, la linea rossa che indica lo stadio 38/40 rappresenta lo stadio scelto per la valutazione delle larve).*

Essendo partiti da dati preliminari che ci mostrano un alto tasso di mortalità in larve esposte ai bisfenoli studiati durante la fase organogenetica precoce (stadi NF 10-26, prime 24 ore di sviluppo) (Figura 13) e visto che negli studi preliminari era evidente che le larve non muoiono durante l'esposizione ma muoiono a partire dal 3/4° giorno di sviluppo (NF 42-44), quindi i risultati riportati nei grafici seguenti fanno supporre che l'esposizione abbia arrecato danni ad organi vitali.



*Figura 14: mortalità rilevata a fine test R-FETAX (NF stadio presunto 46) in studi preliminari nei gruppi esposti al solo solvente (DMSO, 4  $\mu$ l/mL) e a diverse concentrazioni di BPA, BPB e BPS durante lo stadio organogenetico precoce.*

Partendo da questi questi dati, lo scopo del presente lavoro è stato quello di valutare la morfologia degli embrioni al giorno 2 di sviluppo (stadio raggiunto previsto: 38/40, corrispondente alla fine del periodo organogenetico), trattandoli durante le prime 24 ore. La finestra di esposizione che in Fig.13 vediamo indicata da un'area rettangolare rossa è quella presa in considerazione nel presente studio. Lo stadio 38/40, indicato invece nell'immagine con una linea rossa è quello scelto per la fine del test, quindi per lo studio condotto non abbiamo portato gli embrioni fino a fine FETAX

(46). Abbiamo chiamato questo metodo con fine test allo stadio 38/40 “SUPER FAST FETAX”.

**- *Ottenimento degli embrioni***

Gli adulti di Amphibian *Xenopus laevis* (Nasco, USA) sono stati mantenuti in un sistema di allevamento automatico (TecnoPlus, Techniplast, Italia) in condizioni di acqua controllata ( $T = 20 \pm 2$  °C;  $pH = 7,5 \pm 0,5$ ; conducibilità =  $1000 \pm 100$   $\mu$ S), ciclo luce/buio di 12 ore (luce dalle 7:00 alle 19:00) e alimentato con una dieta semisintetica due volte a settimana (XE40 di Mucedola; Settimo Milanese, Italia) (Di Renzo F, Bacchetta R et al., 2011). In conformità con il perfezionamento del principio 3R e in contrasto con la classica metodologia FETAX, sono stati ottenuti embrioni senza iniezione di gonadotropina corionica umana, da accoppiamento naturale notturno in un sistema di accoppiamento con umidità controllata e controllata temperatura aria/acqua. È stato effettuato accoppiamento tra femmine albine e maschi pigmentati. Il maschio e la femmina sono stati posti insieme overnight in una vasca costituita da un doppio fondo a grata per permettere alle uova di cadere in un comparto sottostante, evitando così di essere danneggiate dagli adulti. La fecondazione nello *Xenopus laevis* è esterna, per cui la massa di uova deposta è fecondata nell'acqua dallo sperma del maschio. La mattina seguente ad accoppiamento

avvenuto, gli adulti sono ricollocati nelle vasche di mantenimento e l'operatore procede alla raccolta delle uova fecondate per sottoporle a test. Gli embrioni raccolti sono stati puliti agitandoli delicatamente in una soluzione di L-cisteina al 2,25% con un pH 8,0 (pesiamo la L-cisteina e la sciogliamo in una soluzione chiamata FETAX la cui composizione era 625 mg/L NaCl, 96 mg/L NaHCO<sub>3</sub>, 30 mg/L KCl, 15 mg/L CaCl<sub>2</sub>, 60 mg/L CaSO<sub>4</sub> · 2H<sub>2</sub>O e 70 mg/L MgSO<sub>4</sub>, poi portiamo a pH 8 con NaOH 5N) e sciacquati più volte sempre in FETAX. Dopo l'eliminazione della matrice gelatinosa, le uova fecondate sciacquate venivano mantenute in FETAX per essere osservate allo stereomicroscopio ed essere selezionate. Venivano dunque eliminate le uova non fecondate, degenerate, oppure danneggiate, le quali sarebbero andate incontro ad uno sviluppo aberrante.

#### ***- Allestimento dei gruppi sperimentali***

Gli embrioni selezionati per il test venivano posti in piastre Petri multiwell da 6 pozzetti di 3,5cm di diametro, ciascuno contenente 5 embrioni in 5mL di soluzione FETAX (1mL per embrione) quindi le Petri venivano posizionate in incubatore per 30' mantenuti a 23± 0,5°C fino al raggiungimento dello stadio di sviluppo desiderato.

### ***- Trattamenti***

Embrioni normalmente scissi allo stadio medio di blastula (stadio 8, secondo Nieuwkoop e Faber) sono stati selezionati per il test. Agli embrioni posizionati nelle Petri in FETAX, sono state aggiunte le soluzioni di trattamento preparate tramite diluizioni con solvente DMSO (4 $\mu$ L/mL, Sigma) a partire da soluzioni madre. Le sostanze testate con relative concentrazioni sono state :

- Il BPA: 20  $\mu$ M; 25  $\mu$ M; 30  $\mu$ M;
- Il BPB: 5  $\mu$ M; 7,5  $\mu$ M; 10  $\mu$ M;
- Il BPS: 70  $\mu$ M; 140  $\mu$ M; 200  $\mu$ M.

Sono stati usati due gruppi di controllo: controllo e controllo con DMSO e gli esperimenti sono stati effettuati in triplicato.

Per tutta la durata del test (3 giorni, considerando 0 la mattina dopo la deposizione delle uova), i campioni sono stati mantenuti in termostato a 23°C. Le piastre venivano controllate ogni giorno e venivano eliminati eventuali embrioni non sviluppati o morti; le larve venivano sciacquate in FETAX.

L'ultimo giorno di trattamento sono stati contati gli embrioni vivi e tolti i morti dalle multiwell dei trattati (è stato segnato il numero degli embrioni vivi sulle schede relative).

### ***- Esame degli embrioni e altre tecniche di studio***

A fine test gli embrioni venivano esaminati mediante osservazione allo stereomicroscopio dopo anestesia a 4°C con 4 gocce di anestetico (0,5% MS222, Sigma, disciolto in una soluzione di FETAX), fissazione e disidratazione in EtOH al 50% (la conservazione per studi successivi è stata fatta in EtOH al 70%). Per ogni embrione è stata quindi effettuata una valutazione morfologica per valutare lo stadio di sviluppo raggiunto, quindi eventuali ritardi nello sviluppo ed eventuali malformazioni, ed è stata misurata la lunghezza dalla testa alla coda della larva e appuntata in apposite tabelle. È stato registrato anche il tipo di larva (se pigmentata o albina). Su alcuni embrioni, prima della fissazione, è stata effettuata una colorazione vitale con arancio di acridina per evidenziare l'apoptosi (metodo di Abrams et al., 1993).

L'analisi statistica dei dati raccolti è stata fatta con ANOVA+ test di Tukey per i dati espressi come media e deviazione standard, Chi-square per il trend dei dati espressi come frequenza (N malformati/ N esaminati). Per la presentazione dei risultati negli istogrammi vengono messe le percentuali ma la statistica è stata fatta sulle frequenze.

## **3.2 *Ciona intestinalis***

### **3.2.1 Metodo AET (*Ascidia Embryo Teratogenicity Assay*)**

È stato visto che AET offre numerosi vantaggi come test di screening teratologico per lo studio degli effetti di sostanze e miscele chimiche (Battistoni M. et al., 2018): in primo luogo, l'AET è un approccio privo di vertebrati (le ascidie sono animali invertebrati il cui uso non è regolamentato o limitato da questioni etiche). Quindi, il test può essere eseguito coinvolgendo elevato numero di embrioni, ed essere completato in breve tempo. Lo screening delle malformazioni non richiede particolari competenze vista la semplice anatomia degli animali. Inoltre, la vicinanza filogenetica delle ascidie ai vertebrati può consentire anche un approccio genetico e l'AET potrebbe essere considerato indicativo anche per indagini tossicologiche approfondite negli embrioni di mammiferi.

### **3.2.2 Applicazione metodo AET per testare embriotossicità dei bisfenoli su embrioni di *Ciona intestinalis***

#### **- Ottenimento degli embrioni**

Adulti di *Ciona intestinalis* sono stati raccolti dal servizio di pesca della stazione Biologique de Roscoff (Francia) e allevati in acquari da 50 L in acqua di mare artificiale (Instant Ocean, salinità 32‰) dotati di filtri



meccanici, chimici e biologici. Gli animali sono stati mantenuti a  $16 \pm 1^\circ\text{C}$  e in condizioni di luce costante per evitare il rilascio di gameti e stimolarne la produzione (Lambert e Brandt, 1967). Tre animali sono stati sacrificati per ogni esperimento, uova e sperma sono stati ottenuti mediante dissezione dei gonodotti, ed è stata eseguita la fecondazione incrociata. Le uova sono state messe in una capsula Petri con H<sub>2</sub>O di mare filtrata. La procedura ha previsto attivazione dello sperma con una soluzione basica costituita da 1mL di H<sub>2</sub>O di mare + 50  $\mu\text{L}$  di Tris a pH 9.5 + 20  $\mu\text{L}$  di sperma raccolto. Un'accortezza importante è stata quella di diluire bene lo sperma perché se fosse risultato troppo concentrato avrebbe potuto dare polispermia. 200  $\mu\text{L}$  di sperma diluito sono stati aggiunti alle petri con le uova per fecondarle. Questa procedura permette di ottenere embrioni sincroni. Tutte le procedure sperimentali sono state eseguite a  $18 \pm 1^\circ\text{C}$ . I trattamenti sono stati eseguiti in capsule Petri in vetro ( $\varnothing$  4 cm). BPS (MW 250,27) e BPB (MW = 228,29) sono stati acquistati da Sigma (Milano, Italia).

#### ***- Allestimento dei gruppi sperimentali***

Quando gli embrioni hanno raggiunto lo stadio a due cellule ( $\sim 1$  hpf), circa 100 embrioni sono stati trasferiti in piastre Petri riempite con 10 ml di soluzioni con diverse concentrazioni di bisfenoli da testare (BPB e BPS) in

ASWH (Acqua di Mare Artificiale con HEPES) e allevati fino allo stadio di larva (~18 ore dopo la fecondazione - hpf).

### **- Trattamenti**

A partire da soluzioni madre, per diluizioni in acqua di mare filtrata, sono state ottenute le diverse concentrazioni di BPB e BPS utilizzate per i trattamenti delle ascidie. Dato che in esperimenti preliminari gli embrioni erano morti a concentrazioni 10  $\mu\text{M}$  di BPB, per questo studio sono state testate concentrazioni inferiori a 10 $\mu\text{M}$ . Da dati preliminari ottenuti su *Xenopus laevis*, abbiamo deciso di testare concentrazioni superiori a 10 $\mu\text{M}$  per il BPS. Sono stati preparati 10 mL di ogni soluzione da testare diluendo una soluzione madre 100  $\mu\text{M}$  in ASWH. Le concentrazioni delle due sostanze utilizzate sono state rispettivamente:

- 0,1  $\mu\text{M}$ ; 0,5  $\mu\text{M}$ ; 1  $\mu\text{M}$ ; 5  $\mu\text{M}$ ; 7,5  $\mu\text{M}$ ; 10  $\mu\text{M}$  per il BPB;
- 10  $\mu\text{M}$ ; 50  $\mu\text{M}$ ; 100  $\mu\text{M}$ ; 200  $\mu\text{M}$  per il BPS.

Sono stati usati due gruppi di controllo: controllo in acqua di mare e controllo in acqua di mare con DMSO (Sigma).

### ***- Esame degli embrioni***

Gli embrioni sono stati esposti per 18 ore a 18°C fino al raggiungimento di larva natante. Sono stati quindi osservati al microscopio gli effetti delle sostanze testate. Ogni esperimento è stato replicato almeno tre volte e considerato affidabile solo se l'80% degli embrioni di controllo si è era schiuso. Quando gli embrioni di controllo hanno raggiunto lo stadio di larva natante (~18 hpf), tutti i campioni sono stati fissati in fissativo MOPS (paraformaldeide al 4%, NaCl 0,5 M e Acido 0,1 M 3-(N-morfolino)propansolfonico; pH 7,5) per 90 min, lavati in soluzione salina tamponata con fosfato (PBS) ed esaminati al microscopio. Per la preparazione della soluzione fissativa è stata seguita la seguente procedura: è stata sciolta la paraformaldeide, quindi è stato aggiunto NaOH. A questo punto è stata riscaldata la miscela a 60°C ed è stato aggiunto HCl e tampone MOPS. Quindi, è stato regolato il pH a 7,5. Il tampone poteva essere conservato a 4°C per diversi giorni.

Per ogni trattamento è stato contato il numero di larve normali, larve con malformazioni, e campioni non sviluppati, i dati sono stati annotati ed è stata calcolata la percentuale corrispondente.

L'analisi della varianza (ANOVA) seguita dal test post hoc di HSD Tukey, è stata eseguita con il software R (R Core Team, 2013) e il pacchetto "agricolae" (de Mendiburu, 2015) per valutare le differenze di FR e sviluppo larvale dei campioni trattati con diverse concentrazioni dei sostituti del BPA. È stato eseguito un test di Cochran per verificare l'omogeneità e la normalità delle varianze e i dati percentuali sono stati trasformati quando non soddisfacevano le ipotesi dell'analisi (normalità e omoschedasticità). Le differenze nello sviluppo degli organi pigmentati sono state analizzate statisticamente con il test  $\chi^2$ .

## Capitolo quarto

### RISULTATI

#### **4.1 *Xenopus laevis***

Per quanto riguarda i risultati ottenuti, li distinguiamo in base alle valutazioni effettuate su:

- Stadi di sviluppo (riferiti alle tabelle di Nieuwkoop e Faber, 1956);
- Misurazione delle lunghezze;
- Malformazioni.

##### **4.1.1 *Stadi di sviluppo***

I risultati relativi agli effetti di BPA, BPB e BPS sugli stadi di sviluppo di embrioni di *Xenopus laevis* mostrano una diminuzione dello stadio di sviluppo solo alla concentrazione più alta di BPA e BPB. Infatti, come mostrato negli istogrammi, la concentrazione più alta di BPA (30  $\mu$ M) provoca un ritardo nello sviluppo degli embrioni sia rispetto al controllo che rispetto alla concentrazione più bassa testata (20  $\mu$ M), con quest'ultima in modo statisticamente significativo ( $P < 0.05$ ).

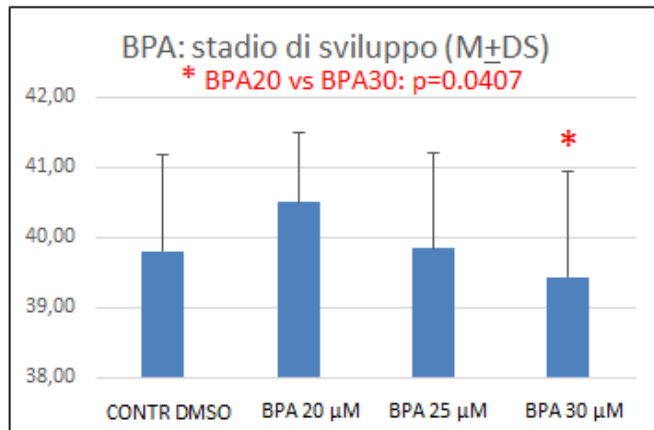


Figura 15: Istogramma per valutazione stadio di sviluppo che riporta i dati ottenuti dall'esposizione di embrioni di *Xenopus laevis* a diverse concentrazioni di BPA.

Anche per il BPB osserviamo importanti ritardi dello sviluppo negli embrioni esposti alla concentrazione più alta della sostanza (10 µM), questi embrioni risultano infatti meno sviluppati con  $P < 0.05$ , rispetto agli embrioni esposti alla concentrazione 7,5 µM.

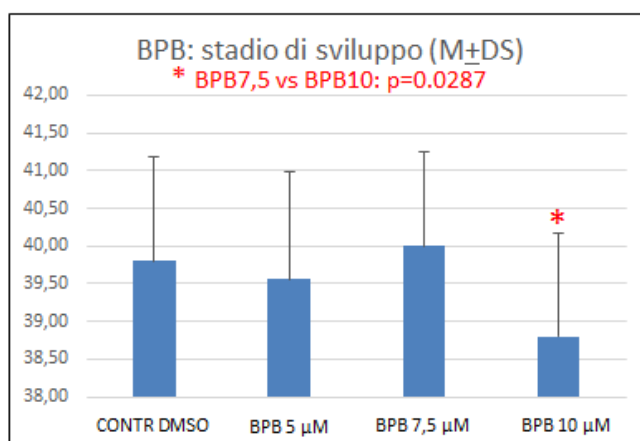
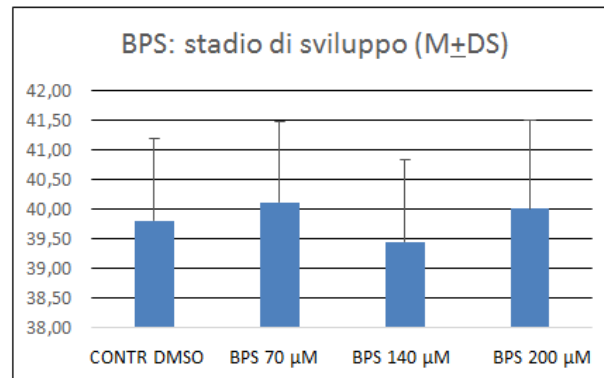


Figura 16: Istogramma per valutazione stadi di sviluppo che riporta i dati ottenuti dall'esposizione di embrioni di *Xenopus laevis* a diverse concentrazioni di BPB.

Non sembrano invece esserci ritardi statisticamente significativi nello sviluppo delle larve esposte a BPS, neanche alla concentrazione più alta testata (200  $\mu\text{M}$ ).



*Figura 17: Istogramma per valutazione stadi di sviluppo che riporta i dati ottenuti dall'esposizione di embrioni di *Xenopus laevis* a diverse concentrazioni di BPS.*

#### **4.1.2 Lunghezze**

Come mostrano gli istogrammi sottostanti, non sono state rilevate differenze significative della lunghezza delle larve per nessuna delle tre sostanze testate, e per nessuna delle concentrazioni rispettivamente utilizzate.

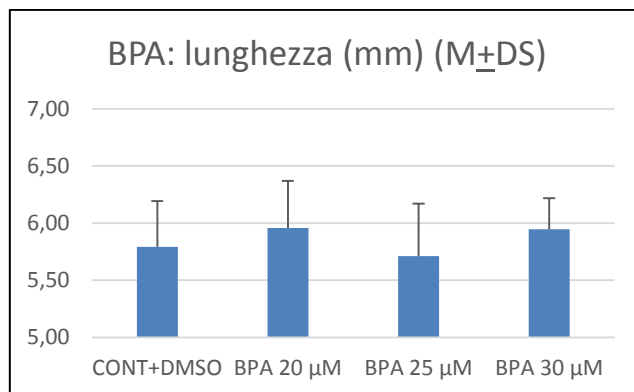


Figura 18: Istogramma che riporta i dati delle lunghezze (mm) ottenuti dall'esposizione di embrioni di *Xenopus laevis* a diverse concentrazioni di BPA.

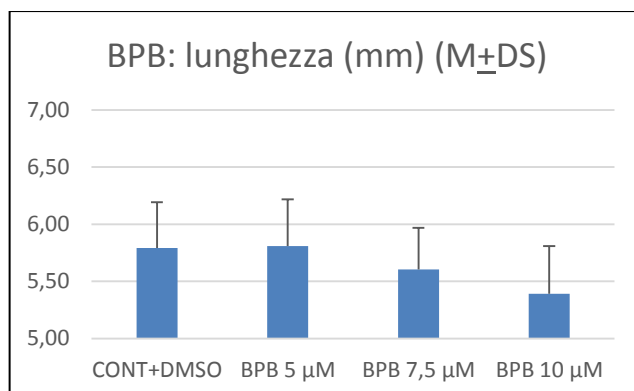


Figura 19: Istogramma che riporta i dati delle lunghezze (mm) ottenuti dall'esposizione di embrioni di *Xenopus laevis* a diverse concentrazioni di BPB.

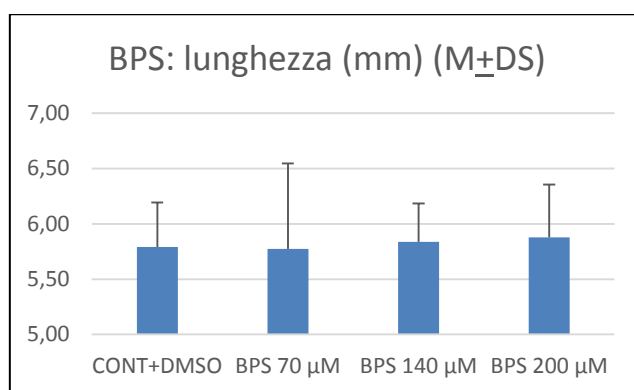


Figura 20: Istogramma che riporta i dati delle lunghezze (mm) ottenuti dall'esposizione di embrioni di *Xenopus laevis* a diverse concentrazioni di BPS.



### 4.1.3 Malformazioni

Per quanto riguarda l'ultimo parametro analizzato, ovvero le malformazioni indotte sulle larve di *Xenopus laevis* trattate con diverse concentrazioni di BPA, BPB e BPS, abbiamo visto che con il BPA sono stati osservati effetti dose-dipendenti, molto gravi alla concentrazione massima testata di 30  $\mu\text{M}$ , ma già a 25  $\mu\text{M}$  è stata osservata curvatura della coda, testa troncata o tondeggiante, probabilmente per alterazioni dello sviluppo durante la gastrulazione (coda) e, visto che le aree cranio-facciali si formano per compartecipazione delle creste neurali, durante la morfogenesi precoce forse a causa di una alterata migrazione delle cellule delle creste neurali. Il trend è risultato statisticamente significativo con  $P < 0.013$ .

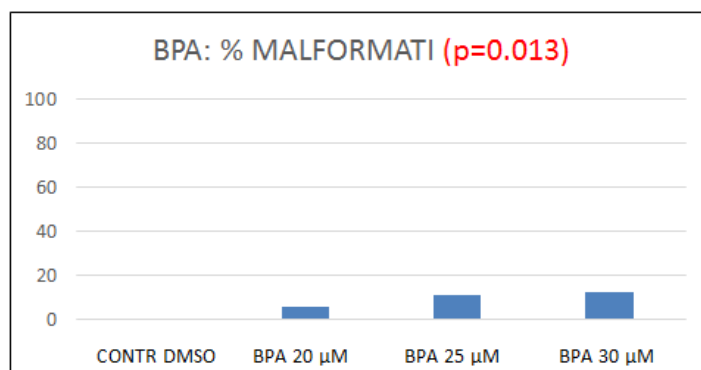


Figura 21: Istogramma che riporta la percentuale di embrioni di *Xenopus laevis* malformati ottenuti dall'esposizione a diverse concentrazioni di BPA.

Anche per il BPB l'effetto è dose-dipendente con un trend importante ( $P < 0.0001$ ) ed effetti marcati alla concentrazione massima testata di 10  $\mu\text{M}$ .

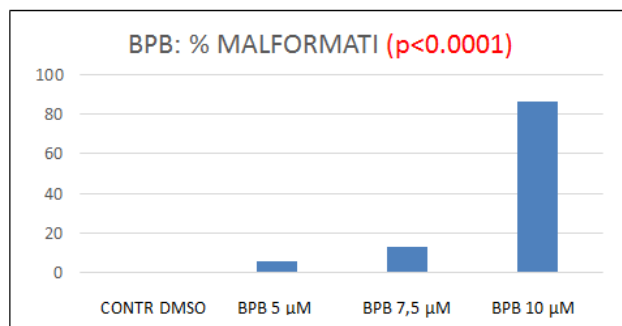


Figura 22: Istogramma che riporta la percentuale di embrioni di *Xenopus laevis* malformati ottenuti dall'esposizione a diverse concentrazioni di BPB.

Per il BPS invece fino a 200 µM non sono state rilevate anomalie significative, risultando meno embriotossico rispetto al BPA, almeno per i tre parametri su cui ci siamo soffermati nel presente studio.

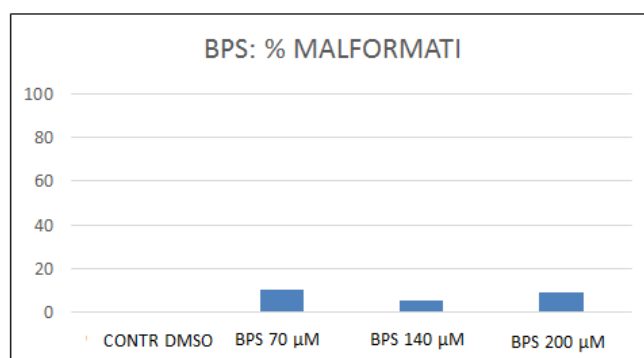
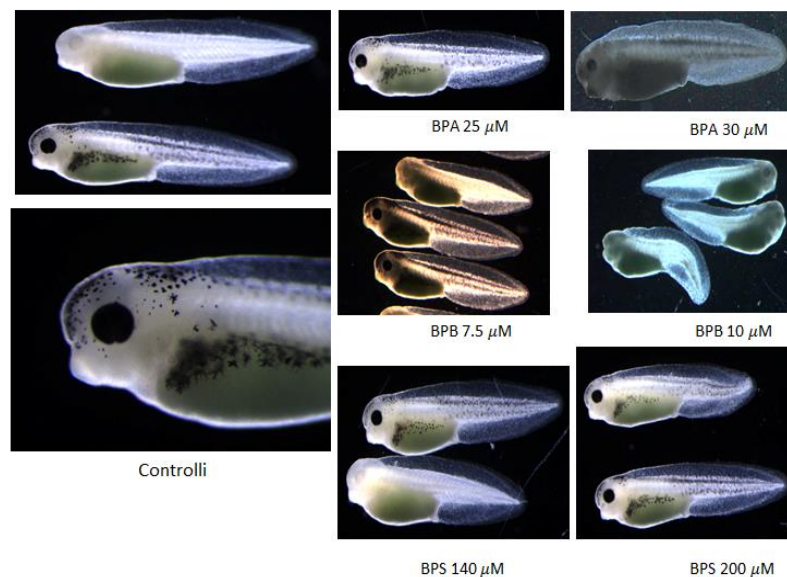


Figura 23: Istogramma che riporta la percentuale di embrioni di *Xenopus laevis* malformati ottenuti dall'esposizione a diverse concentrazioni di BPS.

Il tipo di malformazioni osservate sono riportate nelle immagini sottostanti. L'immagine di controllo rappresenta la vista laterale di una larva di controllo

con fenotipo normale in cui è possibile osservare il tubo neurale dorsale, tronco allungato, l'apparato branchiale visibile, l'occhio normale e ben sviluppato, l'intestino e l'apertura anale, la coda lunga e dritta. Gli esposti a BPA e BPB malformati riportano coda storta ad alte concentrazioni, anomalie alla testa (incluse branchie) anche alle concentrazioni intermedie. Gli esposti a BPS anomali presentano qualche caso di anomalie della coda non gravi.

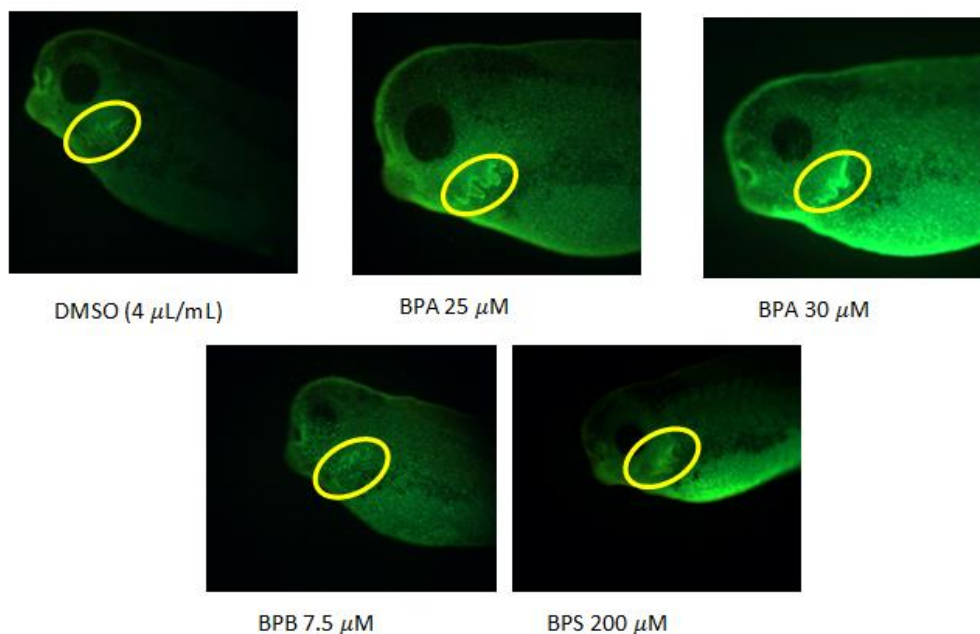


*Figura 24: Immagini delle malformazioni osservate negli embrioni di Xenopus controllati vs trattati.*

#### **4.1.4 Risultati valutazione apoptosi**

Il saggio per la valutazione dell'apoptosi è stato effettuato con l'arancio di acridina, un colorante vitale che lega il DNA, per cui in presenza di DNA frammentato la colorazione fluorescente sarà evidente. I risultati mostrano che

le espansioni delle branchie malformate e accorciate mostravano apoptosi evidente. Questo quadro suggerisce che la morte delle larve negli stadi successivi potrebbe avvenire per insufficienza respiratoria. Come si può vedere dalle immagini sottostanti, il quadro sembrerebbe più grave per il BPB.



*Figura 25: Immagini rappresentanti le espansioni di branchie anomale e fluorescenti (segno di apoptosi) in campioni BPA 25-30  $\mu\text{M}$ , BPB 7.5-10  $\mu\text{M}$  e BPS 200  $\mu\text{M}$ .*

## **4.2 *Ciona intestinalis***

### **4.2.1 *Esposizione a BPB***

Le larve sviluppate da embrioni esposti a BPB hanno mostrato malformazioni di gravità e incidenza dose-dipendenti (Fig. 26 e Tab. 2).

Le larve di controllo esposte al solo solvente DMSO mostravano una morfologia normale con un corretto sviluppo del tronco e della coda in più del 90% degli esemplari ( $92,22\% \pm 1,53$ ) (Fig. 26 e Tab. 2). Meno del 7% ( $6,48\% \pm 1,13$ ) dei campioni presentavano malformazioni e meno del 2% ( $1,94\% \pm 1,74$ ) erano morti. La stessa morfologia si rilevava nelle larve esposte alle più basse concentrazioni di BPB testate: 0,1; 0,5; 1  $\mu\text{M}$ . La coda si presentava diritta e il tronco era correttamente sviluppato con vescicola sensoriale e organi di senso pigmentati visibili al microscopio ottico (Fig. 27 B,C). L'incidenza delle malformazioni e dei morti non era significativamente differente da quella dei controlli ( $P>0,1$ ) (Fig. 27 A e Tab. 2). A partire dalla concentrazione 5  $\mu\text{M}$  le larve presentavano un consistente e significativo aumento della percentuale di malformati che risultava essere del  $58,5 \pm 14,58$ . Le larve presentavano un tronco meno allungato dei controlli, una riduzione della vescicola cerebrale e una coda incurvata. L'incidenza dei malformati è risultata significativamente diversa da quella dei controlli e dei controlli più solvente ( $P<0.001$ ). Il trattamento con BPB 7,5  $\mu\text{M}$  si è dimostrato letale in più del 90% ( $92,50\% \pm 5,91\%$ ) dei campioni (Fig. 26). L'incidenza dei morti era diversa in modo significativo da quella di

entrambi i controlli ( $P < 0.001$ ) (Fig. 26 e Tab. 2). I pochi esemplari sopravvissuti mostravano malformazioni molto gravi; le larve presentavano una coda corta e piegata, la vescicola cerebrale e gli organi pigmentati non si erano sviluppati correttamente (Fig. 27E). Molti embrioni non completavano lo sviluppo e non riuscivano a fuoriuscire dagli involucri ovulari. La concentrazione di BPB 10  $\mu\text{M}$  si è dimostrata letale per la totalità degli embrioni esposti (Fig. 26). L'osservazione al microscopio ottico ha mostrato che gli embrioni si sono bloccati allo stadio di due cellule per cui l'effetto tossico è stato immediato e ha ucciso gli embrioni appena sono stati esposti (Fig. 27F).

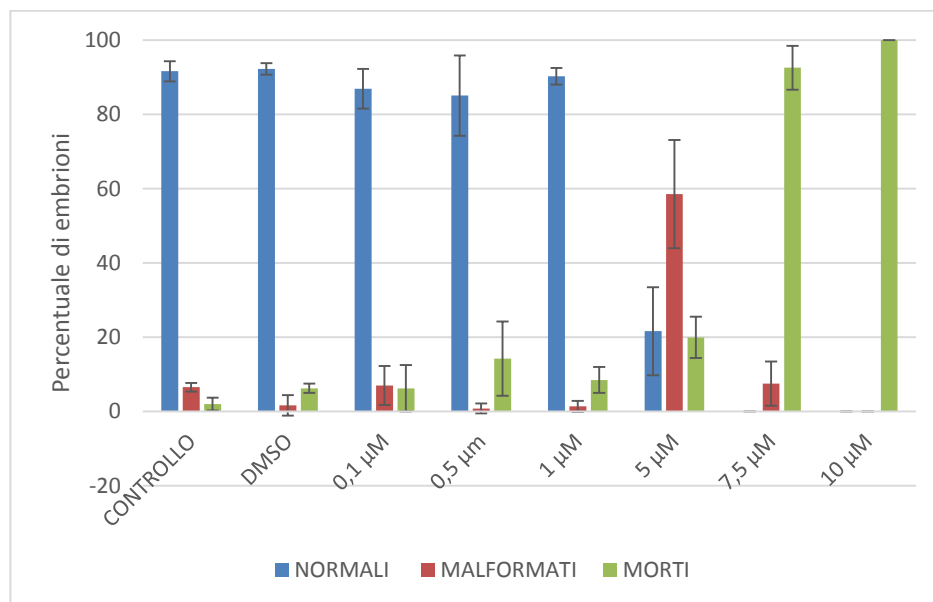


Figura 26: Istogramma che riporta i dati ottenuti dall'esposizione di embrioni di *Ciona intestinalis* a BPB. Sono riportate le medie più o meno la deviazione standard.

Sostanza: BPB	percentuale media			deviazione standard		
	NORMALI	MALFORMATI	MORTI	±	±	±
CONTROLLO	91,58	6,48	1,94	2,73	1,13	1,73
DMSO	92,22	1,59	6,19	1,53	2,75	1,26
0,1 $\mu$ M	86,86	6,93	6,21	5,32	5,26	6,25
0,5 $\mu$ m	85,03	0,78	14,2	10,81	1,34	9,97
1 $\mu$ M	90,2	1,37	8,43	2,25	1,48	3,48
5 $\mu$ M	21,58	58,5	19,92	11,84	14,58	5,54
7,5 $\mu$ M	0	7,46	92,54	0	5,91	5,91
10 $\mu$ M	0	0	100	0	0	0

Tabella 2: Tab. che spiega precedente istogramma: percentuale media e relativa DS di larve normali, malformate e morte dopo trattamento con BPB.

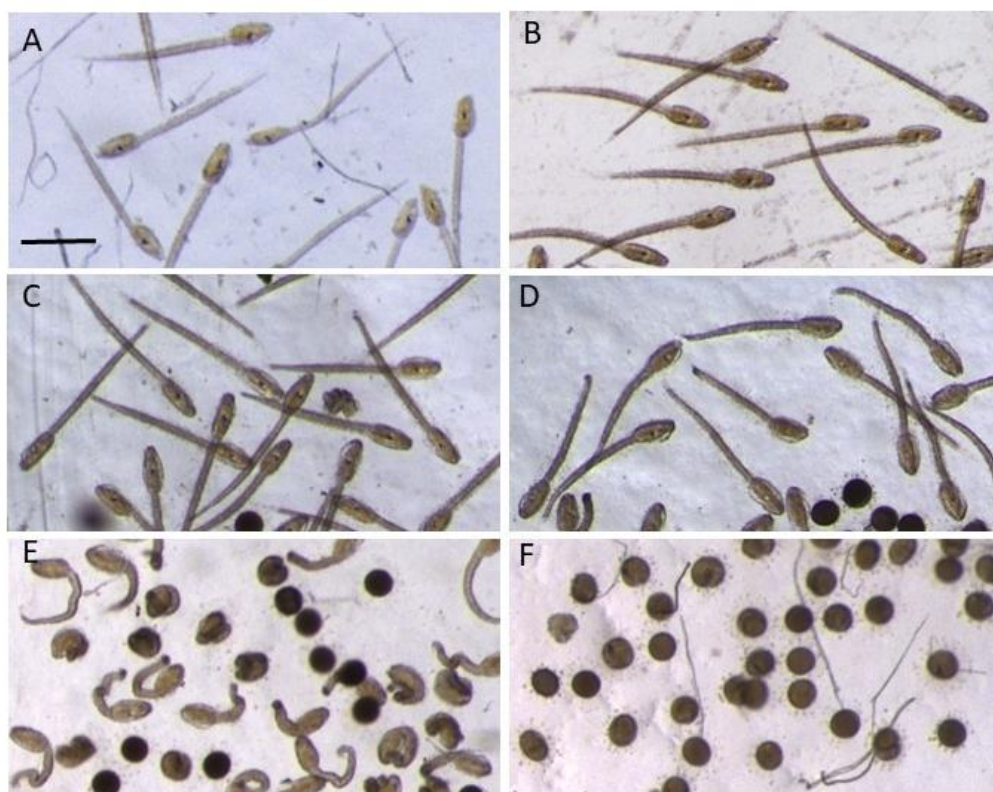


Figura 27: Effetti dell'esposizione degli embrioni di *Ciona intestinalis* a BPB. A) Larve di controllo esposte a DMSO. B) Larve sviluppate da embrioni esposti a BPB 0,5  $\mu$ M. C) larve esposte a 1  $\mu$ M BPB. D) Larve esposte a 5  $\mu$ M BPB. E) Larve esposte a 7,5  $\mu$ M BPB. F) Larve esposte a 10 $\mu$ M BPB. Scale bar. 100  $\mu$ M. Esposti a controllo e a concentrazione 0,1  $\mu$ M non sono mostrati perché sovrapponibili all'immagine degli esposti a controllo con DMSO.

**NORMALI:** analisi ANOVA  $P < 0.001$   $F_{7,16} = 147.9$

Tukey post hoc test:

	P value
CONTROLLO-0,1 $\mu\text{M}$	0.9764586
CONTROLLO-0,5 $\mu\text{M}$	0.8824779
CONTROLLO-1 $\mu\text{M}$	0.9999904
CONTROLLO-5 $\mu\text{M}$	0.0000000
CONTROLLO-7,5 $\mu\text{M}$	0.0000000
CONTROLLO-10 $\mu\text{M}$	0.0000000
DMSO-CONTROLLO	1.0000000
DMSO-0,1 $\mu\text{M}$	0.9540720
DMSO-0,5 $\mu\text{M}$	0.8271903
DMSO-1 $\mu\text{M}$	0.9998733
DMSO-5 $\mu\text{M}$	0.0000000
DMSO-7,5 $\mu\text{M}$	0.0000000
DMSO-10 $\mu\text{M}$	0.0000000

**MALFORMATI:** analisi ANOVA  $P < 0.001$   $F_{7,16} = 32,27$

Tukey post hoc test:

	P value
CONTROLLO-0,1 $\mu\text{M}$	1.0000000
CONTROLLO-0,5 $\mu\text{M}$	0.9311507
CONTROLLO-1 $\mu\text{M}$	0.9601559
CONTROLLO-5 $\mu\text{M}$	0.0000003
CONTROLLO-7,5 $\mu\text{M}$	0.9999990
CONTROLLO-10 $\mu\text{M}$	0.8775359
DMSO-CONTROLLO	0.9681185
DMSO-0,1 $\mu\text{M}$	0.9498033
DMSO-0,5 $\mu\text{M}$	0.9999997
DMSO-1 $\mu\text{M}$	1.0000000
DMSO-5 $\mu\text{M}$	0.0000001
DMSO-7,5 $\mu\text{M}$	0.9209980
DMSO-10 $\mu\text{M}$	0.9999718



**MORTI:** analisi ANOVA  $P < 0.001$   $F_{7,16} = 179.1$

Tukey post hoc test:

	P value
CONTROLLO-0,1 $\mu\text{M}$	0.9688760
CONTROLLO-0,5 $\mu\text{M}$	0.1483256
CONTROLLO-1 $\mu\text{M}$	0.7909360
CONTROLLO-5 $\mu\text{M}$	0.0123670
CONTROLLO-7,5 $\mu\text{M}$	0.0000000
CONTROLLO-10 $\mu\text{M}$	0.0000000
DMSO-CONTROLLO	0.9695248
DMSO-0,1 $\mu\text{M}$	1.0000000
DMSO-0,5 $\mu\text{M}$	0.5895950
DMSO-1 $\mu\text{M}$	0.9993268
DMSO-5 $\mu\text{M}$	0.0810385
DMSO-7,5 $\mu\text{M}$	0.0000000
DMSO-10 $\mu\text{M}$	0.0000000

*Tabella 3,4,5: risultati dell'analisi statistica Anova e Tukey post hoc test nelle larve di Ciona intestinalis trattate con BPB*

#### **4.2.2 Esposizione a BPS**

I risultati ottenuti con l'altra sostanza di trattamento utilizzata, il BPS, indicano risultati statisticamente significativi solo alle dosi più alte testate; nello specifico: le larve di controllo esposte al solo solvente DMSO mostravano una morfologia normale con un corretto sviluppo del tronco e della coda nel  $64,42\% \pm 8,36$  degli esemplari (Fig. 29A, Fig. 29B). La percentuale di malformati e morti era rispettivamente di  $21,06\% \pm 2,71$  e  $14,52\% \pm 5,68$ . Anche alla più bassa concentrazione di BPS testata ( $10 \mu\text{M}$ ), oltre il 70% ( $76,73\% \pm 10,43$ ) delle larve risultavano normalmente sviluppate. Già a partire dalla concentrazione di  $50 \mu\text{M}$  (Fig. 28 e Tab. 6) si verificava un aumento della percentuale di malformati statisticamente significativa, che

risultava essere del  $22,04\% \pm 1,80$ . Come per l'altra sostanza, anche qui le larve incominciavano a mostrare alterazioni a livello del tronco, della vescicola cerebrale e della coda rispetto ai controlli (Fig. 29D). Un'incidenza di malformazioni significativamente diversa da quella del controllo si è registrata solo a partire dalla concentrazione di  $100 \mu\text{M}$  (Fig. 29 e Tab. 6) con una percentuale del  $47,24\% \pm 0,58$  ( $P < 0.05$ ).

La percentuale di morti segue un andamento dose-dipendente: si osserva un aumento significativo della percentuale di larve morte intorno al 70% ( $68,67\% \pm 1,73$ ) nelle ascidie trattate con BPS  $200 \mu\text{M}$  ( $P < 0.001$ ) e l'incidenza dei morti era diversa in modo significativo da quella dei controlli ( $P < 0.001$ ) (Fig.29 F e Tab.6).

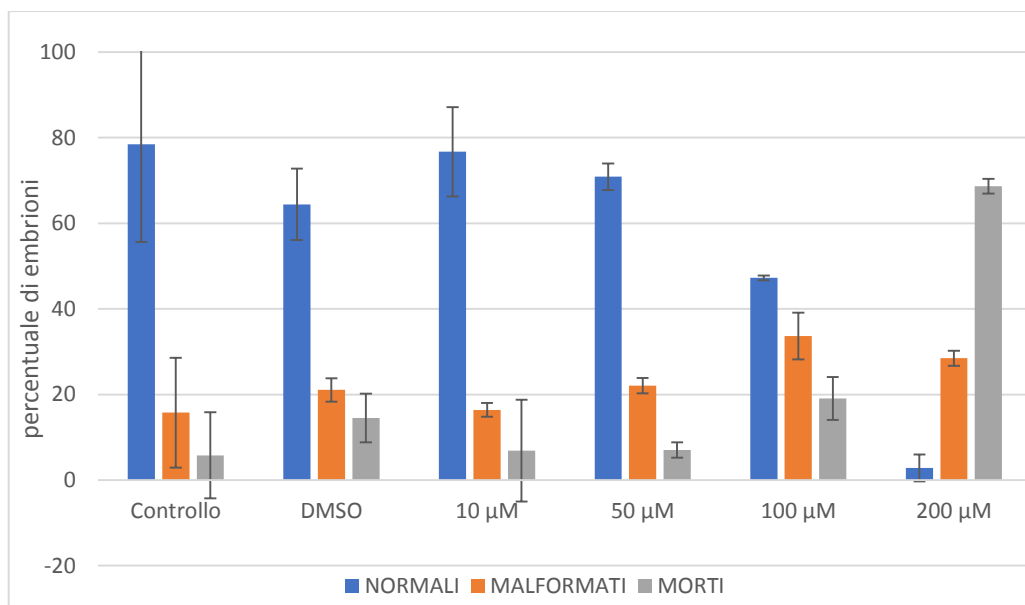


Figura 28: Istogramma che riporta i dati ottenuti dall'esposizione di embrioni di *Ciona intestinalis* a BPS. Sono riportate le medie più o meno la deviazione standard.

Sostanza: BPS	percentuale di embrioni			deviazione standard		
	NORMALI	MALFORMATI	MORTI	±	±	±
Controllo	78,45	15,75	5,8	22,81	12,82	10,04
DMSO	64,42	21,06	14,52	8,36	2,71	5,68
10 $\mu$ M	76,73	16,41	6,86	10,43	1,59	11,89
50 $\mu$ M	70,89	22,04	7,06	3,11	1,8	1,79
100 $\mu$ M	47,24	33,66	19,1	0,58	5,49	5
200 $\mu$ M	2,86	28,48	68,67	3,16	1,75	1,73

Tabella 6: Tab. che spiega precedente istogramma: percentuale media e relativa DS di larve normali, malformate e morte dopo trattamento con BPS.

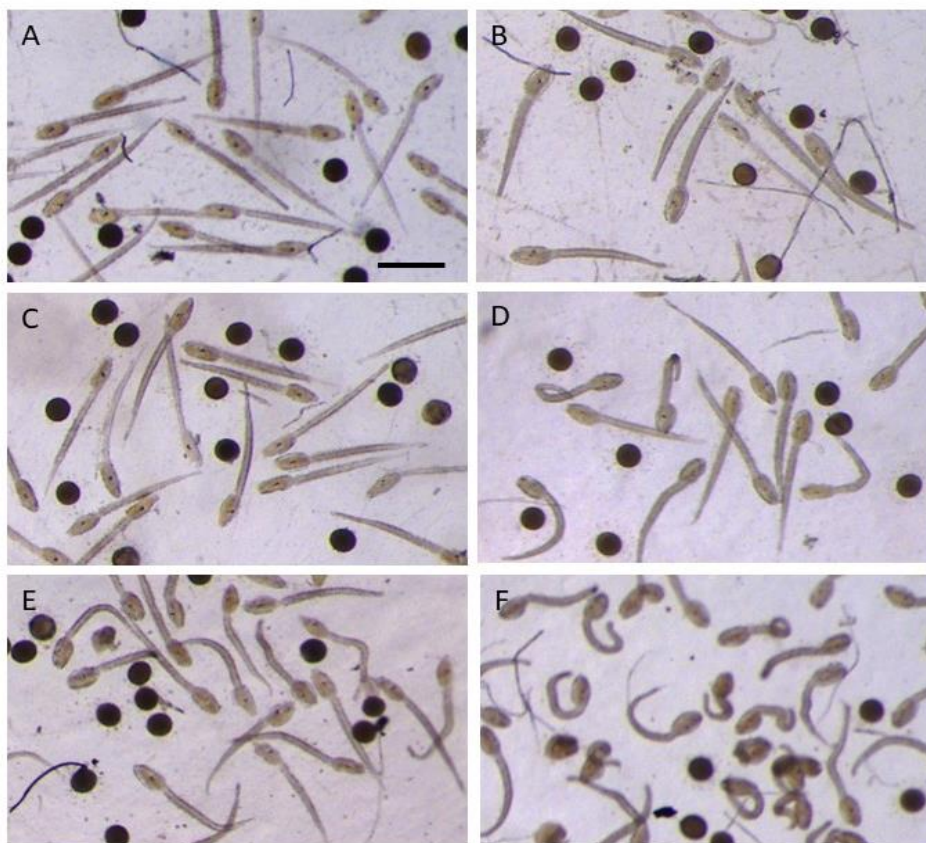


Figura 29: Effetti dell'esposizione degli embrioni di *Ciona intestinalis* a BPS. A) Larve di controllo. B) Larve di controllo esposte a DMSO. C) Larve sviluppate da embrioni esposti a BPS 10 $\mu$ M. D) larve esposte a 50 $\mu$ M BPS. E) Larve esposte a 100  $\mu$ M BPS. F) Larve esposte a 200  $\mu$ M BPS. Scale bar. 100 $\mu$ M.

**NORMALI:** analisi ANOVA  $P < 0.001$   $F_{5,12} = 20.65$

Tukey post hoc test:

	P value
CONTROLLO-10 $\mu\text{M}$	0.9999518
CONTROLLO-50 $\mu\text{M}$	0.9525108
CONTROLLO-100 $\mu\text{M}$	0.0399706
CONTROLLO-200 $\mu\text{M}$	0.0000245
DMSO-CONTROLLO	0.6309031
DMSO-10 $\mu\text{M}$	0.7394314
DMSO-50 $\mu\text{M}$	0.9750420
DMSO-100 $\mu\text{M}$	0.4345290
DMSO-200 $\mu\text{M}$	0.0001890

**MALFORMATI:** analisi ANOVA  $P < 0.05$   $F_{5,12} = 4.177$

Tukey post hoc test:

	P value
CONTROLLO-10 $\mu\text{M}$	0.9999914
CONTROLLO-50 $\mu\text{M}$	0.7793087
CONTROLLO-100 $\mu\text{M}$	0.0279737
CONTROLLO-200 $\mu\text{M}$	0.1627262
DMSO-CONTROLLO	0.8730532
DMSO-10 $\mu\text{M}$	0.9215279
DMSO-50 $\mu\text{M}$	0.9999379
DMSO-100 $\mu\text{M}$	0.1691737
DMSO-200 $\mu\text{M}$	0.6520299

**MORTI:** analisi ANOVA  $P < 0.001$   $F_{5,12} = 34.65$

Tukey post hoc test:

	P value
CONTROLLO-10 $\mu\text{M}$	0.9999630
CONTROLLO-50 $\mu\text{M}$	0.9999134
CONTROLLO-100 $\mu\text{M}$	0.2718483
CONTROLLO-200 $\mu\text{M}$	0.0000019
DMSO-CONTROLLO	0.6728091
DMSO-10 $\mu\text{M}$	0.7729480
DMSO-50 $\mu\text{M}$	0.7904961
DMSO-100 $\mu\text{M}$	0.9646615
DMSO-200 $\mu\text{M}$	0.0000092

Tabella 7,8,9: risultati dell'analisi statistica Anova e Tukey post hoc test nelle larve di *Ciona intestinalis* trattate con BPS.

## Capitolo quinto

### DISCUSSIONE E CONCLUSIONI

L'inquinamento ambientale rappresenta uno dei principali problemi per la salute umana. Tra gli inquinanti emergenti che hanno attirato l'attenzione mondiale a causa della loro elevata tossicità troviamo i Bisfenoli. Il Bisfenolo A (BPA) è il capostipite di questa classe di composti e a dosi elevate è risultato tossico per la salute umana in generale, oltre al fatto che influisce sulla riproduzione, sullo sviluppo embrionico, ed è quindi anche embriotossico. La crescente preoccupazione sull'uso del BPA e i suoi possibili effetti sulla salute umana ha portato alla quasi completa rimozione del BPA dai prodotti di consumo, spesso etichettati come "BPA-free". Ciò ha spinto l'industria a cercare sostanze chimiche alternative. Purtroppo però, alcuni dei sostituti chimici utilizzati dalle industrie, come alternative al BPA, sono anche essi bisfenoli e possono avere effetti fisiologici simili al precedente negli organismi e quindi non risultano sempre migliori del composto originario. Gli analoghi più diffusi ai fini commerciali sono il bisfenolo S (BPS) e il bisfenolo B (BPB) e anche questi sono ormai ampiamente diffusi.

Sulla base di questo, lo scopo del presente lavoro è stato quello di valutare gli effetti dei bisfenoli sullo sviluppo di due modelli animali appartenenti al Phylum dei Cordati: l'Anfibio *Xenopus laevis* e il Tunicato *Ciona intestinalis*. Embrioni precoci dei due modelli sono stati trattati con diverse concentrazioni di Bisfenolo A e i suoi sostituti Bisfenolo B e Bisfenolo S, per valutare se i sostituti del BPA avessero un impatto diverso del composto originario.

Dati preliminari in *Xenopus laevis* mostrano che esposizione a BPA (25-30  $\mu\text{M}$ ), BPB (7.5-10  $\mu\text{M}$ ) e BPS (200  $\mu\text{M}$ ) durante gli stadi di morfogenesi precoce porta a un alto tasso di larve morte a fine test. L'osservazione giorno per giorno ha mostrato chiaramente che la mortalità si realizza durante gli stadi larvali NF40-44. Nel presente lavoro abbiamo valutato gli effetti dei tre composti in embrioni esposti durante gli stadi morfogenetici precoci valutati alla fine del periodo morfogenetico. I dati ottenuti mostrano che in *Xenopus laevis* BPA causa ritardo di sviluppo alla concentrazione di 30  $\mu\text{M}$ . Embrioni esposti a BPB mostravano ritardi di sviluppo alla concentrazione di 10  $\mu\text{M}$ . Alle concentrazioni testate, è stato registrato un trend dose-dipendente relativo alla comparsa di malformazioni cefaliche sia per esposizione a BPA che per esposizione a BPB.

Per quanto riguarda il BPS invece nemmeno alla concentrazione massima testata di 200  $\mu\text{M}$  è stato registrato un ritardo significativo nello sviluppo

degli embrioni. Per BPS l'incidenza delle malformazioni non era significativamente diversa dai controlli.

In campioni con espansioni branchiali malformate si è osservata apoptosi. Questo giustificerebbe la mortalità delle larve osservata negli esperimenti preliminari.

In modo interessante risultati simili sono stati ottenuti con l'altro modello animale modello utilizzato, *Ciona intestinalis*. Anche in questo caso esposizione a BPB causava un aumento significativo di malformazioni negli embrioni a partire dalla concentrazione di 5  $\mu\text{M}$  ( $p < 0.001$ ) con un consistente e significativo aumento della percentuale di malformati. Per il BPS invece l'incidenza delle malformazioni è però risultata significativamente diversa da quella dei controlli solo alla concentrazione di 100  $\mu\text{M}$ .

Sulla base di questi risultati possiamo dire che la sostanza sostituta del BPA che sembra avere effetti più simili al composto originario in termini di alterazione dello sviluppo/aumento della mortalità degli embrioni e malformazioni registrate di entrambi i modelli animali è il BPB in quanto embriotossico a concentrazioni di un ordine di grandezza inferiore rispetto al BPS.

Riguardo a questa ultima sostanza, *Ciona intestinalis* sembra maggiormente sensibile rispetto a *Xenopus laevis* in quanto sono state riportate malformazioni in seguito ad esposizione alle concentrazioni di 100 e 200  $\mu\text{M}$ . In *Xenopus* nel presente lavoro abbiamo osservato una modesta incidenza di embrioni anomali, anche se nel lavoro preliminare si era osservato un alto tasso di embriofetali in campioni esposti alla concentrazione di 200  $\mu\text{M}$ . Per chiarire meglio questo punto sono previsti futuri approfondimenti tramite valutazione dei campioni al microscopio elettronico a scansione. Per il BPB invece i risultati sono sovrapponibili per i due modelli.

Questi dati confermano i risultati di studi precedenti sull'embriotossicità del BPA in *Xenopus* e sono una chiara prova che anche il sostituto BPB è embriotossico a concentrazioni nello stesso ordine di grandezza del BPA. Il BPS sembra essere in generale il meno tossico tra i sostituti testati, o comunque quello che inizia a dare i suoi effetti a dosi molto più alte.

Da questo studio emerge inoltre che sia *Xenopus laevis*, animale di acqua dolce, sia *Ciona intestinalis*, animale marino, sono organismi modello validi come alternativa ai test sui Mammiferi. Tuttavia, ad oggi, questi non possono ancora essere pensati come modelli che sostituiscano completamente i modelli più complessi come topo, anche se rispondono molto bene alle



sostanze testate. Potrebbero però essere proposti in futuro come modelli nei test preliminari per testare altri sostituti del BPA.

Infine, resta ancora sconosciuto il meccanismo d'azione e la via patogenetica con cui BPA e i suoi sostituti causano ritardo di sviluppo e le malformazioni osservate nel presente studio: potrebbe essere interessante approfondirli in seguito, partendo anche dall'evidenza ottenuta nel presente studio di apoptosi nei distretti cefalici e branchiali.

Relativamente alla valutazione del rischio per queste sostanze, nonostante gli evidenti risultati forniti da diversi studi, la comunità scientifica è alquanto divisa sull'argomento: si pensa che le concentrazioni di bisfenoli a cui siamo esposti siano molto basse perché possano avere un impatto dannoso sulla nostra salute e quella dell'intero ecosistema. La concentrazione plasmatica di BPA rilevata in un campione di donne infertili è risultata in un range pari a 3.60-5.72 ng/mL (0.016-0.025  $\mu$ M) (Pednekar et al., 2018), nelle acque superficiali è pari a 56  $\mu$ g/L (0.25 $\mu$ M) (Corrales et al., 2015). Tali concentrazioni sembrerebbero nel range di sicurezza rispetto alle concentrazioni effetto del nostro studio ma possibili accumuli e eventuali effetto miscela vanno tenuti in considerazione e meritano approfondimenti.

## BIBLIOGRAFIA

- Pino-Herrera, Douglas O., et al. "Removal mechanisms in aerobic slurry bioreactors for remediation of soils and sediments polluted with hydrophobic organic compounds: An overview." *Journal of hazardous materials* 339 (2017): 427-449.
- Liu, Bo, Shen-gen Zhang, and Chein-Chi Chang. "Emerging pollutants—part II: treatment." *Water Environment Research* 91.10 (2019): 1390-1401.
- Velo-Gala, I., et al. "Role of activated carbon surface chemistry in its photocatalytic activity and the generation of oxidant radicals under UV or solar radiation." *Applied Catalysis B: Environmental* 207 (2017): 412-423.
- Rodriguez-Narvaez, Oscar M., et al. "Treatment technologies for emerging contaminants in water: A review." *Chemical Engineering Journal* 323 (2017): 361-380.
- Kim, Jin Taek, and Hong Kyu Lee. "Childhood obesity and endocrine disrupting chemicals." *Annals of pediatric endocrinology & metabolism* 22.4 (2017): 219.
- McLachlan, John A. "Environmental signaling: what embryos and evolution teach us about endocrine disrupting chemicals." *Endocrine reviews* 22.3 (2001): 319-341.
- Pelissero, Catherine, et al. "Vitellogenin synthesis in cultured hepatocytes; an in vitro test for the estrogenic potency of chemicals." *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* 44.3 (1993): 263-272.
- Hayes, Tyrone B., et al. "Hermaphroditic, demasculinized frogs after exposure to the herbicide atrazine at low ecologically relevant doses." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 99.8 (2002): 5476-5480.
- Kitamura, Shigeyuki, et al. "Comparative study of the endocrine-disrupting activity of bisphenol A and 19 related compounds." *Toxicological Sciences* 84.2 (2005): 249-259.
- Miyagawa, Shinichi, Tomomi Sato, and Taisen Iguchi. "Bisphenol A." *Handbook of Hormones*. Academic Press, 2021. 1003-1004.
- Huang, Ruixiong, et al. "Heterogeneous sono-Fenton catalytic degradation of bisphenol A by Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> magnetic nanoparticles under neutral condition." *Chemical Engineering Journal* 197 (2012): 242-249.

- MacKay, Harry, and Alfonso Abizaid. "A plurality of molecular targets: The receptor ecosystem for bisphenol-A (BPA)." *Hormones and behavior* 101 (2018): 59-67.
- Olea, Nicolás, et al. "Estrogenicity of resin-based composites and sealants used in dentistry." *Environmental health perspectives* 104.3 (1996): 298-305.
- Kang, Jeong-Hun, Daisuke Aasi, and Yoshiki Katayama. "Bisphenol A in the aquatic environment and its endocrine-disruptive effects on aquatic organisms." *Critical reviews in toxicology* 37.7 (2007): 607-625.
- Geens, Tinne, Leo Goeyens, and Adrian Covaci. "Are potential sources for human exposure to bisphenol-A overlooked?." *International journal of hygiene and environmental health* 214.5 (2011): 339-347.
- Staples, Charles, et al. "Distributions of concentrations of bisphenol A in North American and European surface waters and sediments determined from 19 years of monitoring data." *Chemosphere* 201 (2018): 448-458.
- Maragou, Niki C., et al. "Determination of bisphenol A in canned food by microwave assisted extraction, molecularly imprinted polymer-solid phase extraction and liquid chromatography-mass spectrometry." *Journal of Chromatography B* 1137 (2020): 121938.
- Berge, T. L. L., et al. "Bisphenol A concentration in human saliva related to dental polymer-based fillings." *Clinical Oral Investigations* 21.8 (2017): 2561-2568.
- Reposi, Adele, et al. "Bisphenol A in edible part of seafood." *Italian journal of food safety* 5.2 (2016).
- Geens, Tinne, et al. "Intake of bisphenol A from canned beverages and foods on the Belgian market." *Food Additives and Contaminants* 27.11 (2010): 1627-1637.
- Fasano, Evelina, et al. "Bisphenol A contamination in soft drinks as a risk for children's health in Italy." *Food Additives & Contaminants: Part A* 32.7 (2015): 1207-1214.
- Grumetto, Lucia, et al. "Determination of five bisphenols in commercial milk samples by liquid chromatography coupled to fluorescence detection." *Journal of food protection* 76.9 (2013): 1590-1596.
- Tzatzarakis, Manolis N., et al. "Bisphenol A in soft drinks and canned foods and data evaluation." *Food Additives & Contaminants: Part B* 10.2 (2017): 85-90.

- Alabi, A., N. Caballero-Casero, and S. Rubio. "Quick and simple sample treatment for multiresidue analysis of bisphenols, bisphenol diglycidyl ethers and their derivatives in canned food prior to liquid chromatography and fluorescence detection." *Journal of Chromatography A* 1336 (2014): 23-33.
- Mita, L., et al. "Bisphenol A content in fish caught in two different sites of the Tyrrhenian Sea (Italy)." *Chemosphere* 82.3 (2011): 405-410.
- Cunha, Sara C., et al. "First approach to assess the bioaccessibility of bisphenol A in canned seafood." *Food chemistry* 232 (2017): 501-507.
- Yang, Yunjia, et al. "Urinary levels of bisphenol analogues in residents living near a manufacturing plant in south China." *Chemosphere* 112 (2014): 481-486.
- Gatidou, Georgia, Eleftheria Vassalou, and Nikolaos S. Thomaidis. "Bioconcentration of selected endocrine disrupting compounds in the Mediterranean mussel, *Mytilus galloprovincialis*." *Marine pollution bulletin* 60.11 (2010): 2111-2116.
- Tzatzarakis, Manolis N., et al. "Bisphenol A in soft drinks and canned foods and data evaluation." *Food Additives & Contaminants: Part B* 10.2 (2017): 85-90.
- Alabi, A., N. Caballero-Casero, and S. Rubio. "Quick and simple sample treatment for multiresidue analysis of bisphenols, bisphenol diglycidyl ethers and their derivatives in canned food prior to liquid chromatography and fluorescence detection." *Journal of Chromatography A* 1336 (2014): 23-33.
- Russo, Giacomo, et al. "Occurrence of Bisphenol A and its analogues in some foodstuff marketed in Europe." *Food and Chemical Toxicology* 131 (2019): 110575.
- Alabi, A., N. Caballero-Casero, and S. Rubio. "Quick and simple sample treatment for multiresidue analysis of bisphenols, bisphenol diglycidyl ethers and their derivatives in canned food prior to liquid chromatography and fluorescence detection." *Journal of Chromatography A* 1336 (2014): 23-33.
- Geens, Tinne, et al. "Intake of bisphenol A from canned beverages and foods on the Belgian market." *Food Additives and Contaminants* 27.11 (2010): 1627-1637.
- Vina, Jose, and Consuelo Borrás. "Women live longer than men: understanding molecular mechanisms offers opportunities to

intervene by using estrogenic compounds." *Antioxidants & redox signaling* 13.3 (2010): 269-278.

- Tzatzarakis, Manolis N., et al. "Bisphenol A in soft drinks and canned foods and data evaluation." *Food Additives & Contaminants: Part B* 10.2 (2017): 85-90.
- Lehto, Sari, et al. "Confronto delle normative relative ai colori alimentari nell'UE e negli Stati Uniti: una revisione delle attuali disposizioni.", 2017.
- Pjanic, Milos. "The role of polycarbonate monomer bisphenol-A in insulin resistance." *PeerJ* 5 (2017): e3809.
- Russo, Giacomo, et al. "Occurrence of Bisphenol A and its analogues in some foodstuff marketed in Europe." *Food and Chemical Toxicology* 131 (2019): 110575.
- Wang, Hui, et al. "Anti-androgenic mechanisms of Bisphenol A involve androgen receptor signaling pathway." *Toxicology* 387 (2017): 10-16.
- Sakhi, Amrit K., et al. "Concentrations of phthalates and bisphenol A in Norwegian foods and beverages and estimated dietary exposure in adults." *Environment international* 73 (2014): 259-269.
- Pednekar, Prajakta Parag, et al. "Estimation of plasma levels of bisphenol-A & phthalates in fertile & infertile women by gas chromatography-mass spectrometry." *The Indian Journal of Medical Research* 148.6 (2018): 734.
- Zhuang, Wanli, et al. "Association of serum bisphenol-A concentration and male reproductive function among exposed workers." *Archives of environmental contamination and toxicology* 68.1 (2015): 38-45.
- Völkel, Wolfgang, et al. "Metabolism and kinetics of bisphenol A in humans at low doses following oral administration." *Chemical research in toxicology* 15.10 (2002): 1281-1287.
- Bae, Sanghyuk, et al. "Associations of bisphenol A exposure with heart rate variability and blood pressure." *Hypertension* 60.3 (2012): 786-793.
- Seachrist, Darcie D., et al. "A review of the carcinogenic potential of bisphenol A." *Reproductive Toxicology* 59 (2016): 167-182.
- Beausoleil, Claire, et al. "Regulatory identification of BPA as an endocrine disruptor: Context and methodology." *Molecular and cellular endocrinology* 475 (2018): 4-9.

- Yuan, Jianqin, et al. "Bisphenol A-induced apoptosis, oxidative stress and DNA damage in cultured rhesus monkey embryo renal epithelial Marc-145 cells." *Chemosphere* 234 (2019): 682-689.
- McCue, Kelly, and Nathaniel DeNicola. "Environmental exposures in reproductive health." *Obstetrics and Gynecology Clinics* 46.3 (2019): 455-468.
- Nesan, Dinushan, Laronna C. Sewell, and Deborah M. Kurrasch. "Opening the black box of endocrine disruption of brain development: Lessons from the characterization of Bisphenol A." *Hormones and behavior* 101 (2018): 50-58.
- Xie, Meina, et al. "Neonatal bisphenol A exposure induces meiotic arrest and apoptosis of spermatogenic cells." *Oncotarget* 7.9 (2016): 10606.
- Fort, Douglas J., and Michael Mathis. "Frog Embryo Teratogenesis Assay—Xenopus (FETAX): Use in Alternative Preclinical Safety Assessment." *Cold Spring Harbor Protocols* 2018.8 (2018): pdb-prot098319.
- Arancio, Ashley L., et al. "Bisphenol A, Bisphenol AF, di-n-butyl phthalate, and 17 $\beta$ -estradiol have shared and unique dose-dependent effects on early embryo cleavage divisions and development in *Xenopus laevis*." *Reproductive Toxicology* 84 (2019): 65-74.
- Zhu, Min, et al. "Effects of bisphenol A and its alternative bisphenol F on Notch signaling and intestinal development: A novel signaling by which bisphenols disrupt vertebrate development." *Environmental Pollution* 263 (2020): 114443.
- Huang, Wenlong, et al. "A transcriptomics-based analysis of toxicity mechanisms of zebrafish embryos and larvae following parental Bisphenol A exposure." *Ecotoxicology and Environmental Safety* 205 (2020): 111165.
- Ge, Yaming, et al. "Bisphenol A exposure induces apoptosis and impairs early embryonic development in *Xenopus laevis*." *Environmental Pollution* 280 (2021): 116901.
- Messinetti, Silvia, Silvia Mercurio, and Roberta Pennati. "Bisphenol A affects neural development of the ascidian *Ciona robusta*." *Journal of Experimental Zoology Part A: Ecological and Integrative Physiology* 331.1 (2019): 5-16.
- Cangialosi, Maria Vittoria, Valentina Mansueto, and Ali S. Faqi. "Bisphenol A (BPA) and atrazine inhibit the embryonic development of *Ciona intestinalis* (Ascidiacea, Urochordata)." *Caryologia* 66.2 (2013): 97-102.

- Matsushima, Ayami, et al. "An endocrine disruptor, bisphenol A, affects development in the protochordate *Ciona intestinalis*: Hatching rates and swimming behavior alter in a dose-dependent manner." *Environmental pollution* 173 (2013): 257-263.
- Mercurio, S., et al. "Comparing the sensitivity of two cogeneric ascidian species to two plastic additives: Bisphenol A and the flame retardant tris (chloro-propyl) phosphate." *The European Zoological Journal* 89.1 (2022): 437-445.
- Racioppi, Claudia, et al. "Fibroblast growth factor signalling controls nervous system patterning and pigment cell formation in *Ciona intestinalis*." *Nature communications* 5.1 (2014): 1-17.
- Putnam, Nicholas H., et al. "The amphioxus genome and the evolution of the chordate karyotype." *Nature* 453.7198 (2008): 1064-1071.
- Gallo, Alessandra, and Elisabetta Tosti. "The ascidian *Ciona intestinalis* as model organism for ecotoxicological bioassays." *J. Mar. Sci. Res. Dev* 5 (2015): e138.
- Villa, L., et al. "Effects of tributyltin (IV) chloride on the gametes and fertilization of *Ascidia malaca* (Ascidiacea: Tunicata)." *Applied organometallic chemistry* 17.2 (2003): 106-112.
- Mercurio, Silvia, et al. "Embryotoxicity characterization of the flame retardant tris (1-chloro-2-propyl) phosphate (TCPP) in the invertebrate chordate *Ciona intestinalis*." *Journal of Experimental Zoology Part A: Ecological and Integrative Physiology* 335.3 (2021): 339-347.
- Matuszczak, Ewa, et al. "The impact of bisphenol A on fertility, reproductive system, and development: a review of the literature." *International journal of endocrinology* 2019 (2019).
- Rochester, Johanna R. "Bisphenol A and human health: a review of the literature." *Reproductive toxicology* 42 (2013): 132-155.
- Vandenberg, Laura N., et al. "Urinary, circulating, and tissue biomonitoring studies indicate widespread exposure to bisphenol A." *Environmental health perspectives* 118.8 (2010): 1055-1070.
- Chen, Da, et al. "Bisphenol analogues other than BPA: environmental occurrence, human exposure, and toxicity: a review." *Environmental science & technology* 50.11 (2016): 5438-5453.
- Clark, Clayton J., et al. "Evaluation of potential degradation of bisphenol A by zero-valent iron (ZVI)." *Environmental Forensics* 13.3 (2012): 248-254.

- Liao, Chunyang, and Kurunthachalam Kannan. "Determination of free and conjugated forms of bisphenol A in human urine and serum by liquid chromatography–tandem mass spectrometry." *Environmental science & technology* 46.9 (2012): 5003-5009.
- Gallart-Ayala, H., E. Moyano, and M. T. Galceran. "Analysis of bisphenols in soft drinks by on-line solid phase extraction fast liquid chromatography–tandem mass spectrometry." *Analytica Chimica Acta* 683.2 (2011): 227-233.
- Becerra, Valentina, and Jürgen Odermatt. "Detection and quantification of traces of bisphenol A and bisphenol S in paper samples using analytical pyrolysis-GC/MS." *Analyst* 137.9 (2012): 2250-2259.
- Liao, Chunyang, and Kurunthachalam Kannan. "Determination of free and conjugated forms of bisphenol A in human urine and serum by liquid chromatography–tandem mass spectrometry." *Environmental science & technology* 46.9 (2012): 5003-5009.
- Zhou, Ling, et al. "An electrochemical aptasensor based on gold nanoparticles dotted graphene modified glassy carbon electrode for label-free detection of bisphenol A in milk samples." *Food chemistry* 162 (2014): 34-40.
- Grumetto, Lucia, et al. "Determination of bisphenol A and bisphenol B residues in canned peeled tomatoes by reversed-phase liquid chromatography." *Journal of agricultural and food chemistry* 56.22 (2008): 10633-10637.
- Cunha, S. C., et al. "Simultaneous determination of bisphenol A and bisphenol B in beverages and powdered infant formula by dispersive liquid–liquid micro-extraction and heart-cutting multidimensional gas chromatography-mass spectrometry." *Food Additives and Contaminants* 28.4 (2011): 513-526.
- Cobellis, Luigi, et al. "Measurement of bisphenol A and bisphenol B levels in human blood sera from healthy and endometriotic women." *Biomedical Chromatography* 23.11 (2009): 1186-1190.
- Rochester, Johanna R., and Ashley L. Bolden. "Bisphenol S and F: a systematic review and comparison of the hormonal activity of bisphenol A substitutes." *Environmental health perspectives* 123.7 (2015): 643-650.
- Liao, Chunyang, and Kurunthachalam Kannan. "A survey of bisphenol A and other bisphenol analogues in foodstuffs from nine



- cities in China." *Food Additives & Contaminants: Part A* 31.2 (2014): 319-329.
- Liao, Chunyang, and Kurunthachalam Kannan. "Concentrations and profiles of bisphenol A and other bisphenol analogues in foodstuffs from the United States and their implications for human exposure." *Journal of agricultural and food chemistry* 61.19 (2013): 4655-4662.
  - Liao, Chunyang, and Kurunthachalam Kannan. "Determination of free and conjugated forms of bisphenol A in human urine and serum by liquid chromatography–tandem mass spectrometry." *Environmental science & technology* 46.9 (2012): 5003-5009.
  - Yang, Yunjia, et al. "Urinary levels of bisphenol analogues in residents living near a manufacturing plant in south China." *Chemosphere* 112 (2014): 481-486.
  - Zhou, Ling, et al. "An electrochemical aptasensor based on gold nanoparticles dotted graphene modified glassy carbon electrode for label-free detection of bisphenol A in milk samples." *Food chemistry* 162 (2014): 34-40.
  - Bergman, Åke, et al. "A novel abbreviation standard for organobromine, organochlorine and organophosphorus flame retardants and some characteristics of the chemicals." *Environment international* 49 (2012): 57-82.
  - Rosenmai, Anna Kjerstine, et al. "Are structural analogues to bisphenol a safe alternatives?." *Toxicological Sciences* 139.1 (2014): 35-47.
  - Yamasaki K, Noda S, Imatanaka N, et al. 2004. Comparative study of the uterotrophic potency of 14 chemicals in a uterotrophic assay and their receptor-binding affinity. *Toxicol Lett.* 146:111-20.
  - Ji, Kyunghee, et al. "Effects of bisphenol S exposure on endocrine functions and reproduction of zebrafish." *Environmental science & technology* 47.15 (2013): 8793-8800.
  - Atlante di Nieuwkoop, P.D. and Faber, J. (1956)
  - Tadjuidje, Emmanuel, and Janet Heasman. "Xenopus as an experimental organism." *eLS* (2010).
  - Zhu, Min, et al. "Bisphenol F disrupts thyroid hormone signaling and postembryonic development in *Xenopus laevis*." *Environmental science & technology* 52.3 (2018): 1602-1611.
  - Showell, Chris, and Frank L. Conlon. "The Western clawed frog (*Xenopus tropicalis*): An emerging vertebrate model for

- developmental genetics and environmental toxicology." *Cold Spring Harbor Protocols* 2009.9 (2009): pdb-emo131.
- Beck, Caroline W., and Jonathan MW Slack. "An amphibian with ambition: a new role for *Xenopus* in the 21st century." *Genome biology* 2.10 (2001): 1-5.
  - Nenni, Mardi J., et al. "Xenbase: facilitating the use of *Xenopus* to model human disease." *Frontiers in physiology* 10 (2019): 154.
  - Ny, Annelii, Monica Autiero, and Peter Carmeliet. "Zebrafish and *Xenopus* tadpoles: small animal models to study angiogenesis and lymphangiogenesis." *Experimental cell research* 312.5 (2006): 684-693.
  - Wheeler, Grant N., and André W. Brändli. "Simple vertebrate models for chemical genetics and drug discovery screens: lessons from zebrafish and *Xenopus*." *Developmental Dynamics* 238.6 (2009): 1287-1308.
  - Blum, Martin, and Tim Ott. "*Xenopus*: an undervalued model organism to study and model human genetic disease." *Cells Tissues Organs* 205.5-6 (2018): 303-313.
  - Wheeler, Grant N., and André W. Brändli. "Simple vertebrate models for chemical genetics and drug discovery screens: lessons from zebrafish and *Xenopus*." *Developmental Dynamics* 238.6 (2009): 1287-1308.
  - Frontera, Jimena Laura, et al. "Neural regeneration dynamics of *Xenopus laevis* olfactory epithelium after zinc sulfate-induced damage." *Journal of Chemical Neuroanatomy* 77 (2016): 1-9.
  - Hoppler, Stefan, and Frank L. Conlon. "*Xenopus*: experimental access to cardiovascular development, regeneration discovery, and cardiovascular heart-defect modeling." *Cold Spring Harbor perspectives in biology* 12.6 (2020): a037200.
  - He, Chun-Wei, Chien-Po Liao, and Chun-Liang Pan. "Wnt signalling in the development of axon, dendrites and synapses." *Royal Society Open Biology* 8.10 (2018): 180116.
  - Buchholz, Daniel R. "*Xenopus* metamorphosis as a model to study thyroid hormone receptor function during vertebrate developmental transitions." *Molecular and Cellular Endocrinology* 459 (2017): 64-70.
  - Aztekin, Can, et al. "Identification of a regeneration-organizing cell in the *Xenopus* tail." *Science* 364.6441 (2019): 653-658.

- Marshall, Lindsey N., et al. "Stage-dependent cardiac regeneration in *Xenopus* is regulated by thyroid hormone availability." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 116.9 (2019): 3614-3623.
- Kim, Hye Young, et al. "Tissue mechanics drives regeneration of a mucociliated epidermis on the surface of *Xenopus* embryonic aggregates." *Nature communications* 11.1 (2020): 1-10.
- Herrera-Rincon, Celia, and Michael Levin. "Booting up the organism during development: Pre-behavioral functions of the vertebrate brain in guiding body morphogenesis." *Communicative & integrative biology* 11.1 (2018): e1433440.
- Phipps, Lauren S., et al. "Model systems for regeneration: *Xenopus*." *Development* 147.6 (2020): dev180844.
- Hasebe, Takashi, et al. "Thyroid hormone-induced activation of Notch signaling is required for adult intestinal stem cell development during *Xenopus laevis* metamorphosis." *Stem Cells* 35.4 (2017): 1028-1039.
- Maia, Lorena A., Ian Velloso, and Jose G. Abreu. "Advances in the use of *Xenopus* for successful drug screening." *Expert opinion on drug discovery* 12.11 (2017): 1153-1159.
- Hodskinson, Michael R., et al. "Alcohol-derived DNA crosslinks are repaired by two distinct mechanisms." *Nature* 579.7800 (2020): 603-608.
- Duncan, Anna R., and Mustafa K. Khokha. "Xenopus as a model organism for birth defects—Congenital heart disease and heterotaxy." *Seminars in cell & developmental biology*. Vol. 51. Academic Press, 2016.
- Sato, Haruo, Michael C. Fehler, and Takuto Maeda. *Seismic wave propagation and scattering in the heterogeneous earth*. Springer Science & Business Media, 2012.
- Brunetti, Riccardo, et al. "Morphological evidence that the molecularly determined *Ciona intestinalis* type A and type B are different species: *Ciona robusta* and *Ciona intestinalis*." *Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research* 53.3 (2015): 186-193.
- Millar, R. H. "The biology of ascidians." *Advances in marine biology*. Vol. 9. Academic Press, 1971. 1-100.
- Ramsay, Aaron, et al. "Process of invasiveness among exotic tunicates in Prince Edward Island, Canada." *Biological Invasions* 10.8 (2008): 1311-1316.

- Berrill, N. J., A. C. Giese, and J. S. Pearse. "Chordata: tunicata." *Reproduction of marine invertebrates* 2 (1975): 241-282.
- Woollacott, Robert M. "Microfilaments and the mechanism of light-triggered sperm release in ascidians." *Developmental Biology* 40.1 (1974): 186-195.
- Whittingham, D. G. "Light-induction of shedding of gametes in *Ciona intestinalis* and *Molgula manhattensis*." *The Biological Bulletin* 132.2 (1967): 292-298.
- Bolton, Toby F., and Jon N. Havenhand. "Chemical mediation of sperm activity and longevity in the solitary ascidians *Ciona intestinalis* and *Ascidiella aspersa*." *The Biological Bulletin* 190.3 (1996): 329-335.
- Yasuo, Hitoyoshi, and Noriyuki Satoh. "An Ascidian Homolog of the Mouse Brachyury (T) Gene is Expressed Exclusively in Notochord Cells at the Fate Restricted Stage: (Ascidians/T (Brachyury) gene/sequence conservation/notochord cells/transient expression)." *Development, growth & differentiation* 36.1 (1994): 9-18.
- Dybern, Bernt I. "The life cycle of *Ciona intestinalis* (L.) f. *typica* in relation to the environmental temperature." *Oikos* (1965): 109-131.
- Katz, Michael J. "Comparative anatomy of the tunicate tadpole, *Ciona intestinalis*." *The Biological Bulletin* 164.1 (1983): 1-27.
- Cloney, Richard A., and Michael J. Cavey. "Ascidian larval tunic: extraembryonic structures influence morphogenesis." *Cell and tissue research* 222.3 (1982): 547-562.
- Cloney, Richard A. "Larval tunic and the function of the test cells in ascidians." *Acta Zoologica* 71.3 (1990): 151-159.
- Berrill, N. J. "Development and medusa-bud formation in the Hydromedusae." *The quarterly review of Biology* 25.3 (1950): 292-316.
- Nicol, Dianne, and I. A. Meinertzhagen. "Cell counts and maps in the larval central nervous system of the ascidian *Ciona intestinalis* (L.)." *Journal of Comparative Neurology* 309.4 (1991): 415-429.
- Wada, Hiroshi. "Evolutionary history of free-swimming and sessile lifestyles in urochordates as deduced from 18S rDNA molecular phylogeny." *Molecular biology and evolution* 15.9 (1998): 1189-1194.
- Torrence, Steven A., and Richard A. Cloney. "Ascidian larval nervous system: primary sensory neurons in adhesive papillae." *Zoomorphology* 102.2 (1983): 111-123.

- Dehal, Paramvir, et al. "The draft genome of *Ciona intestinalis*: insights into chordate and vertebrate origins." *Science* 298.5601 (2002): 2157-2167.
- Crowther, Robert J., and J. R. Whittaker. "Serial repetition of cilia pairs along the tail surface of an ascidian larva." *Journal of Experimental Zoology* 268.1 (1994): 9-16.
- Takamura, Katsumi. "Nervous network in larvae of the ascidian *Ciona intestinalis*." *Development genes and evolution* 208.1 (1998): 1-8.
- Liu, Li-ping, et al. "*Ciona intestinalis* as an emerging model organism: its regeneration under controlled conditions and methodology for egg dechoriation." *Journal of Zhejiang University Science B* 7.6 (2006): 467-474.
- Satoh, Nori. "The ascidian tadpole larva: comparative molecular development and genomics." *Nature Reviews Genetics* 4.4 (2003): 285-295.
- Dehal, Paramvir, et al. "The draft genome of *Ciona intestinalis*: insights into chordate and vertebrate origins." *Science* 298.5601 (2002): 2157-2167.
- Sordino, Paolo, et al. "Developmental genetics in primitive chordates." *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences* 356.1414 (2001): 1573-1582.
- Satoh, Nori. "The ascidian tadpole larva: comparative molecular development and genomics." *Nature Reviews Genetics* 4.4 (2003): 285-295.
- Dehal, Paramvir, et al. "The draft genome of *Ciona intestinalis*: insights into chordate and vertebrate origins." *Science* 298.5601 (2002): 2157-2167.
- Pennisi, Elizabeth. "Tunicate genome shows a little backbone." (2002): 2111-2112.
- Rodriguez-Narvaez, Oscar M., et al. "Treatment technologies for emerging contaminants in water: A review." *Chemical Engineering Journal* 323 (2017): 361-380.
- Mercurio, S., et al. "Comparing the sensitivity of two cogeneric ascidian species to two plastic additives: Bisphenol A and the flame retardant tris (chloro-propyl) phosphate." *The European Zoological Journal* 89.1 (2022): 437-445.
- Battistoni, Maria, et al. "Modified *Xenopus laevis* approach (R-FETAX) as an alternative test for the evaluation of foetal valproate spectrum disorder." *Reproductive Toxicology* 107 (2022): 140-149.

- Galdiero, Emilia, et al. "Daphnia magna and Xenopus laevis as in vivo models to probe toxicity and uptake of quantum dots functionalized with gH625." *International Journal of Nanomedicine* 12 (2017): 2717.
- Dumont, James N., et al. "Frog embryo teratogenesis assay: Xenopus (FETAX)—A short-term assay applicable to complex environmental mixtures." *Short-term bioassays in the analysis of complex environmental mixtures III*. Springer, Boston, MA, 1983. 393-405.
- Mouche, Isabelle, Laure Malesic, and Olivier Gillardeaux. "FETAX assay for evaluation of developmental toxicity." *Drug Safety Evaluation*. Humana Press, 2011. 257-269.
- Battistoni, Maria, et al. "Modified Xenopus laevis approach (R-FETAX) as an alternative test for the evaluation of foetal valproate spectrum disorder." *Reproductive Toxicology* 107 (2022): 140-149.
- Atlante di Nieuwkoop & Faber, 1956.
- C.R. McKeown, C.K. Thompson, H.T. Cline; J. Exp. Biol., 220 (2017), pp. 358-368, 10.1242/jeb.151043,View PDFView Record in ScopusGoogle Scholar
- Di Renzo, Francesca, et al. "The agrochemical fungicide triadimefon induces abnormalities in Xenopus laevis embryos." *Reproductive Toxicology* 31.4 (2011): 486-493.
- Nieuwkoop e Faber [NF] [P.D. Nieuwkoop, J. Faber (Eds.), Normal Table of *Xenopus laevis* (Daudin), Publishing Co., Amsterdam: North Holland (1956)Google Scholar
- Abrams, John M., et al. "Programmed cell death during Drosophila embryogenesis." *Development* 117.1 (1993): 29-43.
- Battistoni Maria, et al. "The Ascidian Embryo Teratogenicity assay in Ciona intestinalis as a new teratological screening to test the mixture effect of the co-exposure to ethanol and fluconazole." *Environmental Toxicology and Pharmacology* 57 (2018): 76-85.
- Lambert, Charles C., and Charles L. Brandt. "The effect of light on the spawning of Ciona intestinalis." *The Biological Bulletin* 132.2 (1967): 222-228.
- Team, R. Core. "R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria." <http://www.R-project.org/> (2013).
- de Mendiburu, Felipe. "order. stat 97." *Package 'agricolae'* (2015): 97.

- Pednekar, Prajakta Parag, et al. "Estimation of plasma levels of bisphenol-A & phthalates in fertile & infertile women by gas chromatography-mass spectrometry." *The Indian Journal of Medical Research* 148.6 (2018): 734.
- Corrales, Jone, et al. "„Global Assessment of Bisphenol A in the Environment”." *Dose-Response* 13.3: 1559325815598308.

## RINGRAZIAMENTI

Giunta al termine di questo percorso, desidero ringraziare sentitamente il relatore di tesi Professoressa Oliana Carnevali e il Dipartimento di Scienze e Politiche Ambientali dell'Università degli Studi di Milano, in particolare i gruppi di ricerca diretti dalla Professoressa Elena Menegola e Roberta Pennati. Ringrazio loro per la disponibilità concessami, per la professionalità dimostratami e per aver messo a disposizione i propri laboratori per lo svolgimento del tirocinio di tesi e la realizzazione di questo studio.