



Università Politecnica delle Marche

Dipartimento di Scienze della Vita e dell'Ambiente

Corso di Laurea in Scienze Biologiche



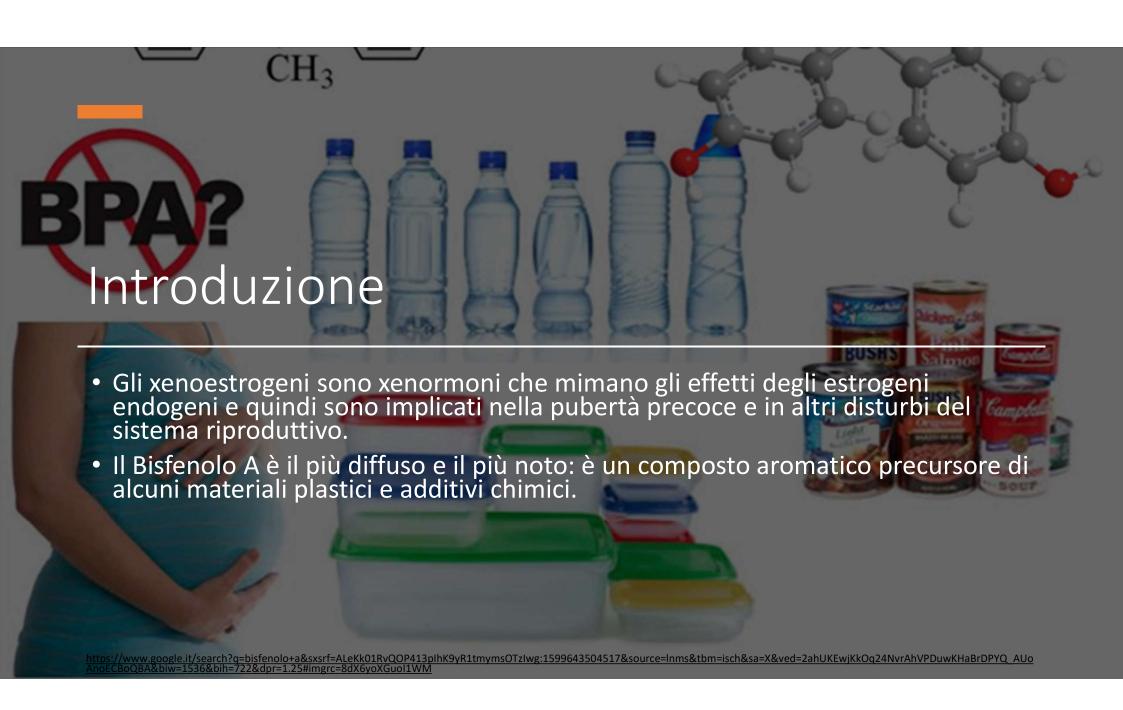
- Bisfenolo A: possibili effetti sui meccanismi molecolari alla base dell'insorgenza di anomalie nello sviluppo embrionale dei suini
- The possible molecular mechanisms of bisphenol A action on porcine early embryonic development

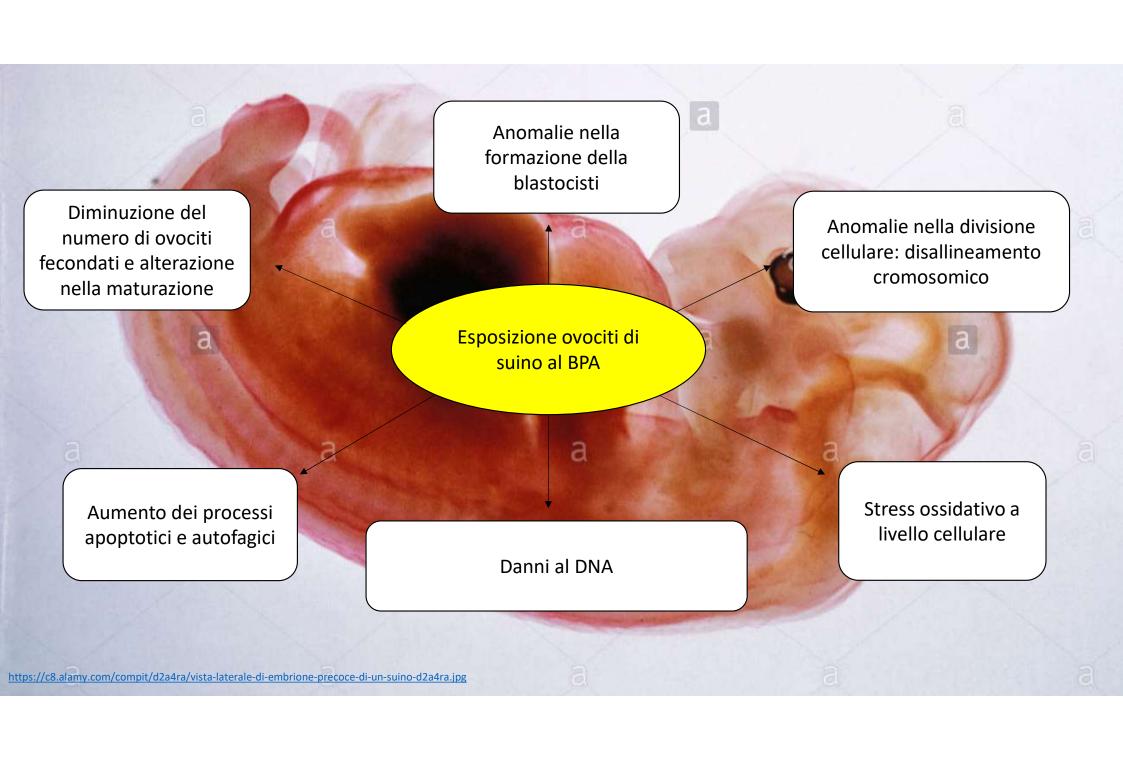
Candidata: Lisa Donatelli Relatore: Dott.ssa Maura Benedetti

Sessione autunnale 2019/2020

Abstract

Il bisfenolo A (BPA) è una sostanza chimica molto utilizzata in tutti i paesi industrializzati. Viene utilizzato nella produzione di plastiche in policarbonato (molto diffuse per le proprietà di trasparenza, resistenza termica e meccanica), utilizzate nei recipienti per uso alimentare, e nelle resine epossidiche che compongono il rivestimento protettivo interno presente nella maggior parte delle lattine per alimenti e bevande. Inoltre, viene utilizzato anche nella carta termica degli scontrini e nei dispositivi odontoiatrici. A causa di questo ampio utilizzo, ad oggi il BPA è tra gli interferente endocrini il più diffuso. Lo scopo del presente studio è quello di analizzare e valutare gli effetti di questa sostanza nello sviluppo embrionale precoce di suini. In questo studio è stato dimostrato che l'esposizione a concentrazioni crescenti di BPA determina una riduzione della formazione di blastocisti. Inoltre, l'alterazione dell'equilibrio redox ha ulteriori conseguenze, quali danni mitocondriali che inducono il rilascio del citocromo c, che rappresenta il segnale per l'avvio dell'apoptosi. Come effetto protettivo nei confronti delle specie reattive dell'ossigeno (ROS), la cellula aumenta i processi autofagici come meccanismo per recuperare energia attraverso l'eliminazione di organelli non più utili o dannosi. Inoltre l'aumento dei ROS determina danni al DNA, rilevabili tramite l'attivazione della via P53-P21. Le conseguenze indotte dall'esposizione al BPA minano il corretto sviluppo embrionale alterandone i processi base, quali la proliferazione cellulare, la morfogenesi e il differenziamento istologico.





Scopo

Valutare il meccanismo attraverso il quale il BPA determina:

- > Stress ossidativo
- > Danno al DNA
- ➤ Modificazioni epigenetiche
- > Apoptosi
- ➤ Autofagia

Alterazione dei processi alla base dello sviluppo embrionale:

- Proliferazione cellulare
- ❖ Differenziamento istologico
- Morfogenesi
- Apoptosi

Materiali e metodi

Raccolta di ovociti, maturazione in vitro e coltura di embrioni

- Aspirati i follicoli e selezionati i COC (+3), poi isolati dai follicoli e coltivati nel terreno di coltura 199 (TCM 199)
- Partenogenesi: attivazione ovociti con due impulsi di corrente continua di 1.1 kV/cm per 60us
- 90 embrioni coltivati in PZM-5 per 8 giorni a 38,5 ° C.

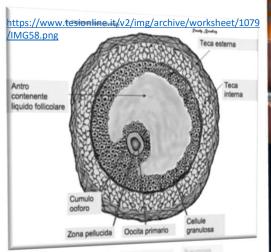
Esposizione

Aggiunto BPA (100/200 μM)

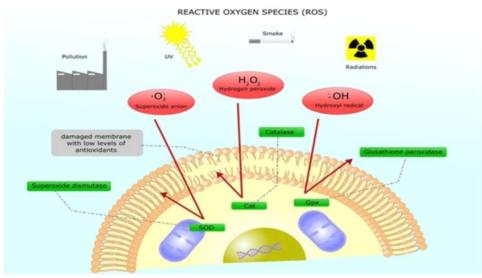
Colorazione ROS

Incubazione blastocisti (n=39) per 15 min in terreno IVC (10 uM di H2 DFC DA) a 37°, poi trasferite in gocce di PBS.

Segnale rilevato in epifluorescenza.





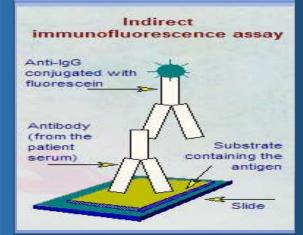


https://www.news-medical.net/image.axd?picture=2019%2F10%2F%40shutterstock 358659155.jpg

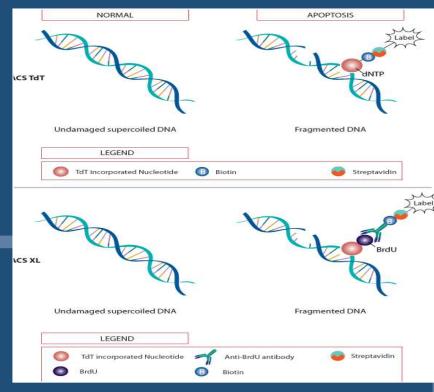
Materiali e metodi

Immunofluorescenza a microscopia confocale.

Embrioni (n=38) incubati per una notte a 4° con anticorpi (anti LC3/ cyt-c/ P53/ OCT4/ 5mC/ IgG).



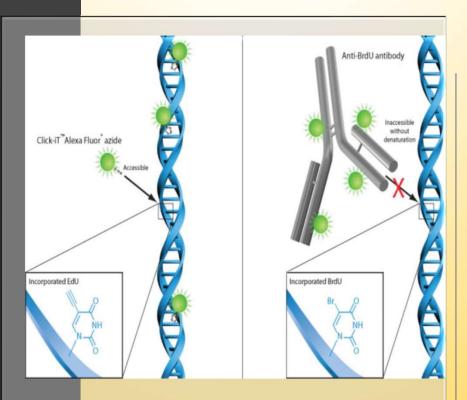
https://lymediseaseguide.net/wpcontent/uploads/2011/08/IFA-lyme-disease-testaccuracy.jpg



Test TUNEL della dUTP. Embrioni incubati con dUTP coniugato con fluorosceina e l'enzima deossinucleotidil transferasi terminale

https://resources.rndsystems.com/images/site/6324.png

Materiali e metodi



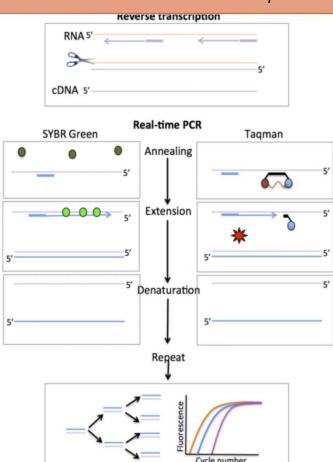
Tasso di proliferazione cellulare: analisi BrdU

Blastocisti (n=32, 7° gg) incubate con 100 μ M di BrdU per 6 ore a T amb. Trattate con 1 N HCl per 30 min e incubate con anti-BrdU a 4 $^\circ$ C. Incubate a 37 $^\circ$ C per 1 ora con anticorpo antitopo di capra.

https://www.jablonskidiagram.com/image/illust_brdu.jpg

RT-PCR

Estratto l'mRNA da 10 blastocisti dell'8° gg. cDNA ottenuto con trascrittasi inversa Super script III. L'espressione genica relativa è stata normalizzata ai livelli di mRNA di *Gapdh*.



https://www.ebi.ac.uk/training/online/sites/ebi.ac.uk.training.online/files/resize/user/18/Figure10-500x659.png

Risultati

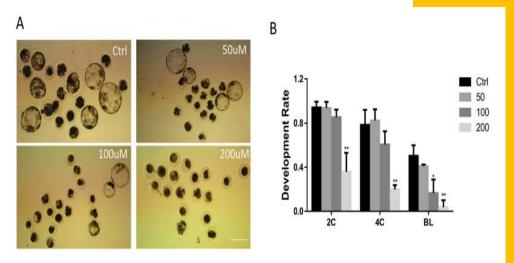
Effetto del BPA sullo sviluppo embrionale precoce dei suini.

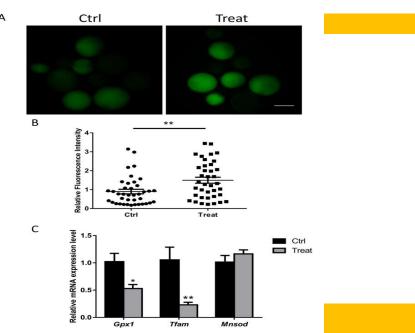
Riduzione significativa della formazione della blastocisti a concentrazioni di 100 e 200 μ M, ma non a 50 μ M, rispetto al controllo.

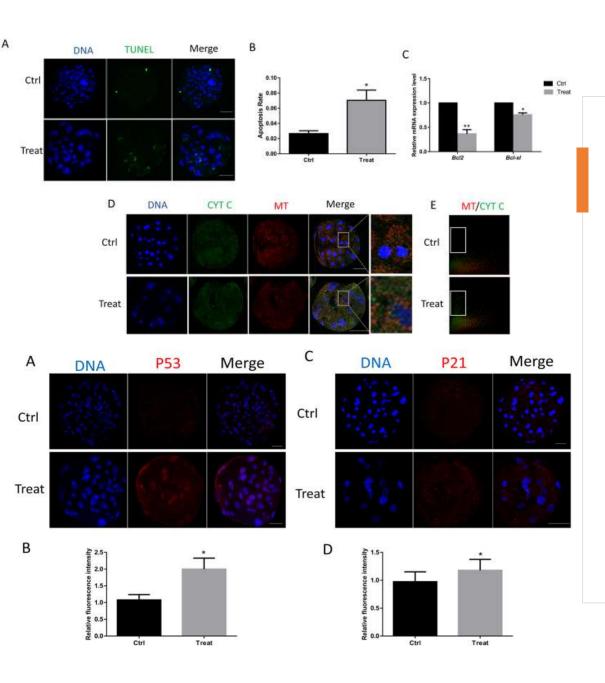
Partenoti arrestati allo stadio di 4 cellule per concentrazioni di 200µM.

Il BPA aumenta la produzione di ROS.

I livelli di mRNA dei geni correlati allo stress ossidativo (*Gpx 1* e *Tfam*, ad eccezione di *Mnsod*) sono diminuiti rispetto al controllo.







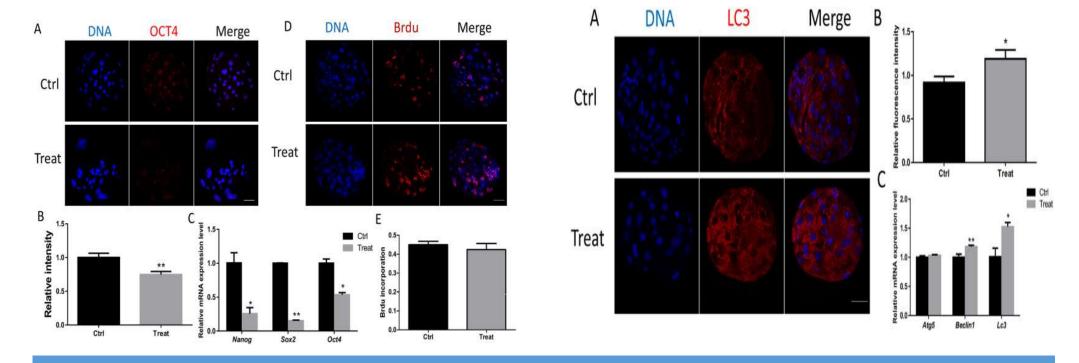
RISULTATI

Effetto dell'esposizione al BPA sull'apoptosi.

- Effetto apoptotico = n° nuclei TUNEL positivi/n° cellule totali: rapporto aumentato significativamente nel gruppo di trattamento rispetto al controllo.
- Ridotta espressione genica di Bcl 2 e Bcl-xl in seguito all'esposizione al BPA.
- Co-localizzazione del cyt c nella blastocisti del controllo rispetto al gruppo trattato.

Attivazione della via P53.

- Aumento dei livelli di P53 nei partenoti trattati rispetto al controllo.
- Aumento dei livelli di P21 (bersaglio di P53) in seguito ad esposizione al BPA



Effetto del trattamento del BPA sulla pluripotenza e sul differenziamento.

- La densità fluorescente di OCT4 è diminuita nel gruppo di trattamento rispetto al controllo.
- Livello di espressione dell'mRNA di Oct4, Nanog, Sox2 si è ridotto significativamente.

RISULTATI

Effetto dell'esposizione al BPA sull'autofagia.

Aumentato in modo significativo rispetto al controllo:

- la fluorescenza relativa di LC3
- l'espressione dell'mRNA di geni correlati all'autofagia.

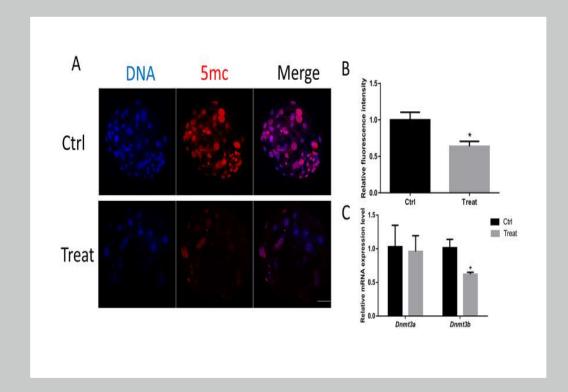
Risultati

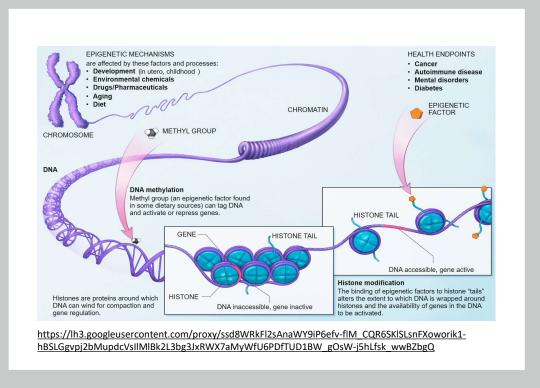
L'esposizione al BPA provoca l'alternanza della metilazione.

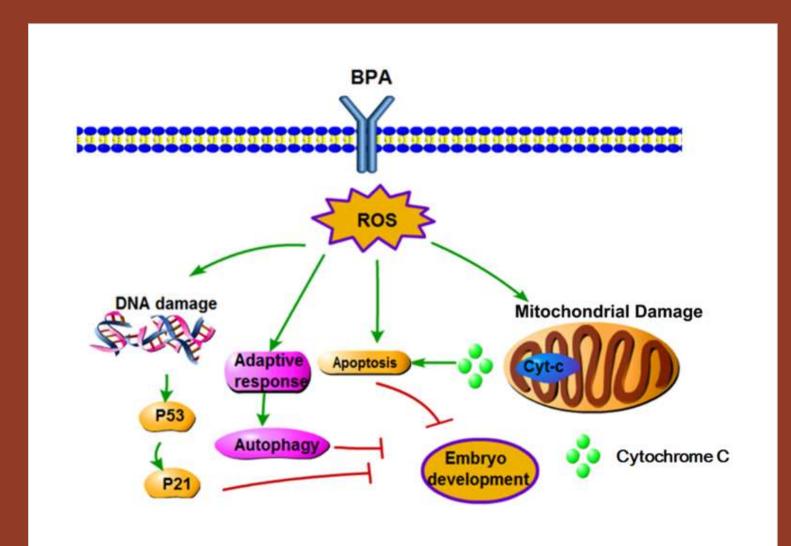
- L'intensità relativa della 5mC è diminuita rispetto al gruppo di controllo.
- L'espressione dell'mRNA per le metil transferasi del DNA si sono ridotti significativamente in seguito ad esposizione al BPA.

Meccanismo alterazione epigenetica.

Il BPA influisce sui meccanismi epigenetici alterando l'accessibilità alle regioni del genoma, sulle quali si legano proteine ed enzimi deputati all'espressione genica e quindi alterando l'espressione del gene.







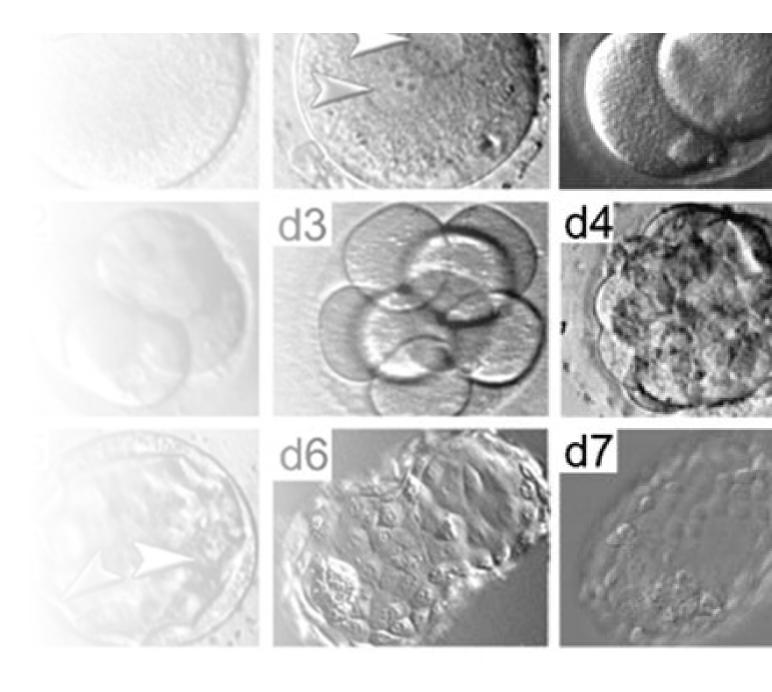
Risultati

Conclusioni

L'esposizione degli embrioni al Bisfenolo A ha causato un aumento dei livelli di ROS con conseguente aumento di stress ossidativo.

Lo squilibrio elettrochimico cellulare ha determinato danni mitocondriali e al DNA, che hanno indotto l'autofagia come meccanismo di recupero energetico.

Il BPA ha provocato un'alterazione nella metilazione del DNA che influisce sulla salute della prole.



Bibliografia

Guo J, Zhao MH, Shin KT, Niu YJ, Ahn YD, Kim NH, Cui XS. The possible molecular mechanisms of bisphenol A action on porcine early embryonic development. Sci Rep. 2017. 17;7(1):8632. doi: 10.1038/s41598-017-09282-2.

https://lh3.googleusercontent.com/proxy/ssd8WRkFl2sAnaWY9iP6efv- flM CQR65KlSLsnFXoworik1 hBSLGgvpj2bMupdcVsllMlBk2L3bg3JxRWX7aMyWfU6PDfTUD1BW gOsW-j5hLfsk wwBZbgQ

https://www.google.it/search?q=bisfenolo+a&sxsrf=ALeKk01RvQOP413plhK9yR1tmymsOTzlwg:1599643504517&source=lnms&tbm=isch &sa=X&ved=2ahUKEwjKkOq24NvrAhVPDuwKHaBrDPYQ_AUoAnoECBoQBA&biw=1536&bih=722&dpr=1.25#imgrc=8dX6yoXGuol1WM

https://www.sciencesetavenir.fr/assets/img/2017/03/30/cover-r4x3w1000-58dd2fe7ef161-049-f0039179.jpg

https://c8.alamy.com/compit/d2a4ra/vista-laterale-di-embrione-precoce-di-un-suino-d2a4ra.jpg

https://www.tesionline.it/v2/img/archive/worksheet/1079/IMG58.png

https://criagyn.com/wp-content/uploads/2018/11/peco2-786x603.jpg

https://www.newsmedical.net/image.axd?picture=2019%2F10%2F%40shutterstock_358659155.jpg

https://lymediseaseguide.net/wp-content/uploads/2011/08/IFA-lyme-disease-test-accuracy.jpg

https://resources.rndsystems.com/images/site/6324.png

https://www.jablonskidiagram.com/image/illust_brdu.jpg

https://www.ebi.ac.uk/training/online/sites/ebi.ac.uk.training.online/files/resize/user/18/Figure10-500x659.png

https://www.ncbi.nlm.nih.gov/core/lw/2.0/html/tileshop_pmc/tileshop_pmc inline.html?title=Click%20on%20image%20to%20zoom&p=PMC3&id=5561233_41598_2017_9282_Fig1_HTML.jpg

https://www.ncbi.nlm.nih.gov/core/lw/2.0/html/tileshop_pmc/tileshop_pmc inline.html?title=Click%20on%20image%20to%20zoom&p=PMC3&id=5561233_41598_2017_9282_Fig2_HTML.jpg

https://www.ncbi.nlm.nih.gov/core/lw/2.0/html/tileshop_pmc/tileshop_pmc_inline.html?title=Click%20on%20image%20to%20zoom<mark>&p=</mark> PMC3&id=5561233_41598_2017_9282_Fig3_HTML.jpg

https://www.ncbi.nlm.nih.gov/core/lw/2.0/html/tileshop_pmc/tileshop_pmc_inline.html?title=Click%20on%20image%20to%20zoom&p=PMC3&id=5561233_41598_2017_9282_Fig4_HTML.jpg

https://www.ncbi.nlm.nih.gov/core/lw/2.0/html/tileshop_pmc_tileshop_pmc_inline.html?title=Click%20on%20image%20to%20zoom&p=PMC3&id=5561233_41598_2017_9282_Fig5_HTML.jpg

https://www.ncbi.nlm.nih.gov/core/lw/2.0/html/tileshop_pmc/tileshop_pmc_inline.html?title=Click%20on%20image%20to%20zoom&p=PMC3&id=5561233_41598_2017_9282_Fig6_HTML.jpg

https://www.ncbi.nlm.nih.gov/core/lw/2.0/html/tileshop_pmc_tileshop_pmc_inline.html?title=Click%20on%20image%20to%20zoom&p=PMC3&id=5561233_41598_2017_9282_Fig7_HTML.jpg

https://lh3.googleusercontent.com/proxy/ssd8WRkFl2sAnaWY9iP6efv-flM_CQR6SKISLsnFXoworik1-hBSLGgvpj2bMupdcVsllMlBk2L3bg3JxRWX7aMyWfU6PDfTUD1BW_gOsW-j5hLfsk_wwBZbgQ

https://www.ncbi.nlm.nih.gov/core/lw/2.0/html/tileshop_pmc/tileshop_pmc_inline.html?title=Click%20on%20image%20to%20zoom&p=PMC3&id=5561233_41598_2017_9282_Fig8_HTML.jpg

https://www.fecondazione.org/wp-content/uploads/2020/04/blastocisti-1.jpg