



UNIVERSITA' POLITECNICA DELLE MARCHE
DIPARTIMENTO di SCIENZE DELLA VITA E
DELL'AMBIENTE

Corso di Laurea

Scienze Ambientali e Protezione Civile (L32)

L'esposizione agli antidepressivi può avere effetti transgenerazionali?
Uno studio con *Danio rerio*

Parental exposure to antidepressants has lasting effects on offspring?
A case study with zebrafish

Tesi di Laurea di:
Gabriele Pierani

Docente Referente:
Prof.ssa Maura Benedetti

Sessione estiva
Anno Accademico 2023/2024

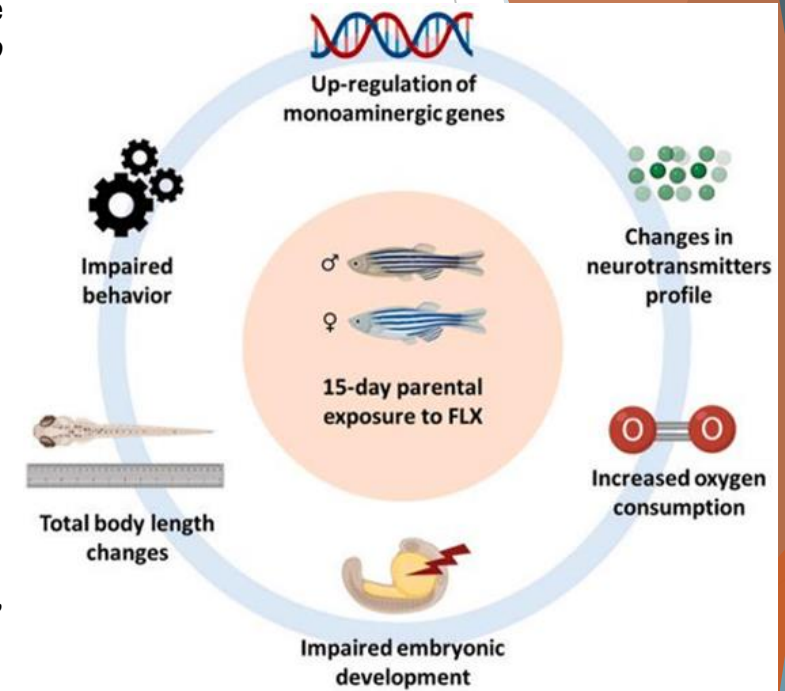
Abstract

I pesci condividono percorsi neurali simili agli esseri umani, rendendoli suscettibili a cambiamenti biochimici e fisiologici dovuti all'esposizione alla fluoxetina. Sebbene molti studi abbiano valutato gli effetti della fluoxetina sui pesci, ad oggi gli effetti sulla prole derivanti da un'esposizione parentale sono poco conosciuti. Questo studio ha valutato gli effetti causati sulla prole di *Danio rerio* da un'esposizione parentale alla fluoxetina di 15 giorni; i principali risultati hanno evidenziato:

- Schiusa precoce;
- Mancata inflazione della vescica natatoria;
- Aumento delle malformazioni;
- Riduzione della frequenza cardiaca e del flusso sanguigno;
- Crescita ridotta;
- Deficit comportamentali (ridotta risposta allo spavento, attività locomotoria basale ridotta, apprendimento non associativo alterato, comportamento antisociale).

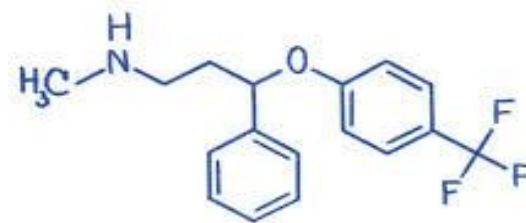
Questi cambiamenti sono collegati a una riduzione dell'ansia e a un aumento dell'espressione dei geni dei recettori monoaminergici e dei livelli di neurotrasmettitori.

Le alterazioni osservate persistono fino all'età adulta, suggerendo potenziali effetti transgenerazionali e multigenerazionali, evidenziando la necessità di ulteriori studi in scenari realistici.



Introduzione

L'inquinamento da farmaci come la fluoxetina, un antidepressivo SSRI comune, è una preoccupazione ambientale crescente. Questi farmaci nelle acque superficiali possono influenzare il sistema nervoso di organismi acquatici. Studi suggeriscono che l'esposizione alla fluoxetina può avere effetti transgenerazionali su comportamento, sviluppo e riproduzione, ma la ricerca è limitata.



Fluoxetine
 $C_{17}H_{18}F_3NO$

Scopo della tesi

- ▶ studiare gli effetti dell'esposizione alla fluoxetina a concentrazioni rilevanti dal punto di vista ambientale su *Danio rerio*
- ▶ Analizzare come le conseguenze dell'esposizione dei genitori alla fluoxetina può influenzare la prole non direttamente esposta, focalizzando le osservazioni su vari parametri di sviluppo e comportamento.
- ▶ Studiare i cambiamenti nei livelli di espressione dei geni del sistema monoaminergico e le alterazioni dei neurotrasmettitori nelle larve e negli adulti di *Danio rerio*.
- ▶ Osservare e misurare le variazioni comportamentali e dello sviluppo fisico includendo aspetti come la schiusa precoce, la mancata inflazione della vescica natatoria, la frequenza di malformazioni, la frequenza cardiaca, il flusso sanguigno e lo sviluppo.
- ▶ Evidenziare la necessità di studi transgenerazionali e multigenerazionali sugli effetti a lungo termine dell'esposizione ai farmaci nell'ambiente acquatico, suggerendo l'importanza di monitorare e rivalutare le conseguenze ecologiche ed evolutive di tali esposizioni

Materiali e metodi

Un gruppo di pesci zebra adulti (18 femmine e 15 maschi) sono stati esposti a 100 e 1000 ng/L di fluoxetina cloridrato, ad una temperatura di 28,5 °C e fotoperiodo di 12 ore di luce e 12 ore di buio.

- Le concentrazioni utilizzate sono ambientalmente realistiche
- la durata dell'esposizione è di due settimane

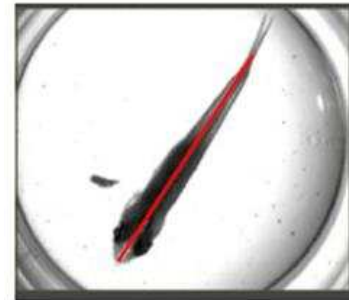
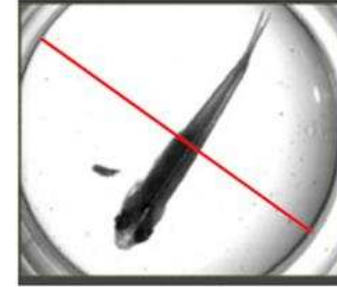


Dopo il periodo di esposizione, gli zebrafish sono stati sciacquati e trasferiti in vasche di allevamento, gli ovuli sono stati raccolti, puliti e controllati allo stereomicroscopio, dove sono emersi embrioni che presentavano uno stadio di sviluppo simile (stadio 2: Blastula) sono stati selezionati e divisi in due gruppi

- Gruppo A - per la valutazione dello sviluppo embrionale
- Gruppo B - per la valutazione nelle fasi successive della vita

Materiali e metodi

- ▶ **Valutazione dello Sviluppo Embrionale (Gruppo A):**
Gli embrioni di zebrafish a 4 ore post-fertilizzazione (hpf) sono stati collocati in piastre a 6 pozzetti e valutati fino a 8 giorni post-fertilizzazione (dpf) per gli endpoint quali: mortalità, malformazioni, schiusa precoce, inflazione della vescica natatoria, attività cardiaca, lunghezza corporea totale e comportamento.
- ▶ **Analisi dell'Attività Cardiaca (Gruppo A):**
L'attività cardiaca e del flusso sanguigno è stata misurata nelle larve a 8 dpf utilizzando il software DanioScope. Le larve sono state immobilizzate in metilcellulosa al 4% e filmate per 30 secondi per l'analisi.
- ▶ **Misurazioni della Lunghezza Corporea Totale (Gruppo A):**
La lunghezza corporea è stata misurata a 8 dpf e ogni 30 giorni per 3 mesi. Le misurazioni sono state effettuate utilizzando vari software e microscopi.



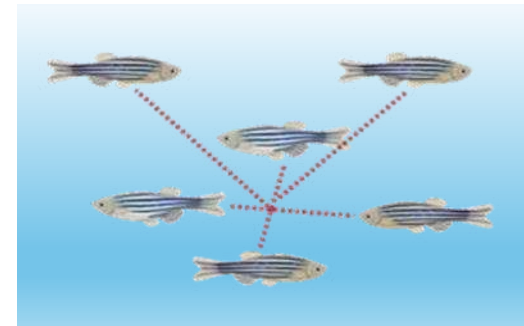
Materiali e metodi

► Valutazione a 8 dpf (Gruppo A) e 1 Mese (Gruppo B)

- risposta vibrazionale di allarme (VSR)
- assuefazione a stimoli vibrazionali
- attività locomotoria basale (BLA)
- risposta motoria visiva (VMR)

► Valutazione a 2 Mesi (Gruppo B) Test svolti:

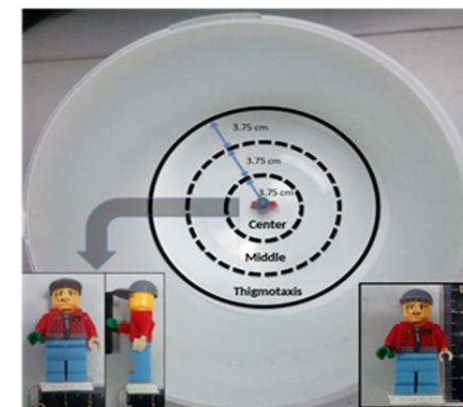
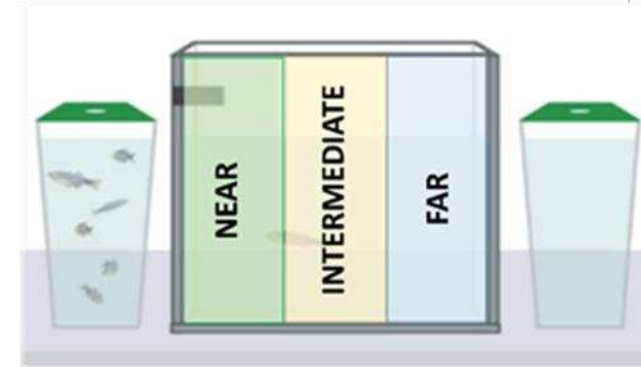
- **Novel Tank Test (NTT):** Valuta l'ansia osservando il comportamento di geotassi, cioè il movimento verso il basso che i pesci mostrano quando vengono posti in un nuovo ambiente.
- **Shoaling Test:** Misura la coesione sociale osservando la distanza media tra i pesci e la distanza del pesce più lontano dal gruppo.



Materiali e metodi

Valutazione a 3 Mesi (Gruppo B): Test svolti:

- ▶ **Social Preference Test:** Utilizza stimoli sociali per osservare la preferenza dei pesci per un banco di conspecifici rispetto a un serbatoio vuoto.
- ▶ **Light-Dark Test:** Valuta l'ansia osservando la preferenza dei pesci per un'area scura rispetto a una luminosa, un comportamento noto come scototassi.
- ▶ **Novel Object Test :** Misura l'ansia e l'audacia osservando l'interazione dei pesci con un oggetto nuovo, come un LEGO®, fissata al centro dell'arena di test



Materiali e metodi

▶ **Test respirometrici:**

eseguiti negli organismi di 2 e 3 mesi, ogni organismo uno è stato posizionato in una siringa riempita con acqua satura di ossigeno. I livelli di ossigeno disciolto sono stati misurati utilizzando un ossimetro

▶ **Preparazione dell'RNA e Analisi qRT-PCR (quantitative real time- PCR):**

L'espressione dei geni monoaminergici è stata valutata a 8 dpf e a 3 mesi di età. L'RNA è stato estratto, sono state poi verificate l'efficienza e la specificità delle sequenze di primer per i sei geni selezionati (slc6a4a, slc6a3, slc18a2, mao, th2, tph1a). L'RNA estratto è stato convertito in cDNA per essere utilizzato nell'analisi qRT-PCR, con cui sono stati quantificati i livelli di espressione genica.

▶ **Estrazione dei Neurotrasmettitori Monoaminergici e Analisi LC-MS (Cromatografia liquida - spettrometria di massa):**

I livelli di neurotrasmettitori monoaminergici sono stati valutati a 8 dpf e a 3 mesi di età, sono stati analizzati utilizzando cromatografia e spettrometria di massa (LC-MS).

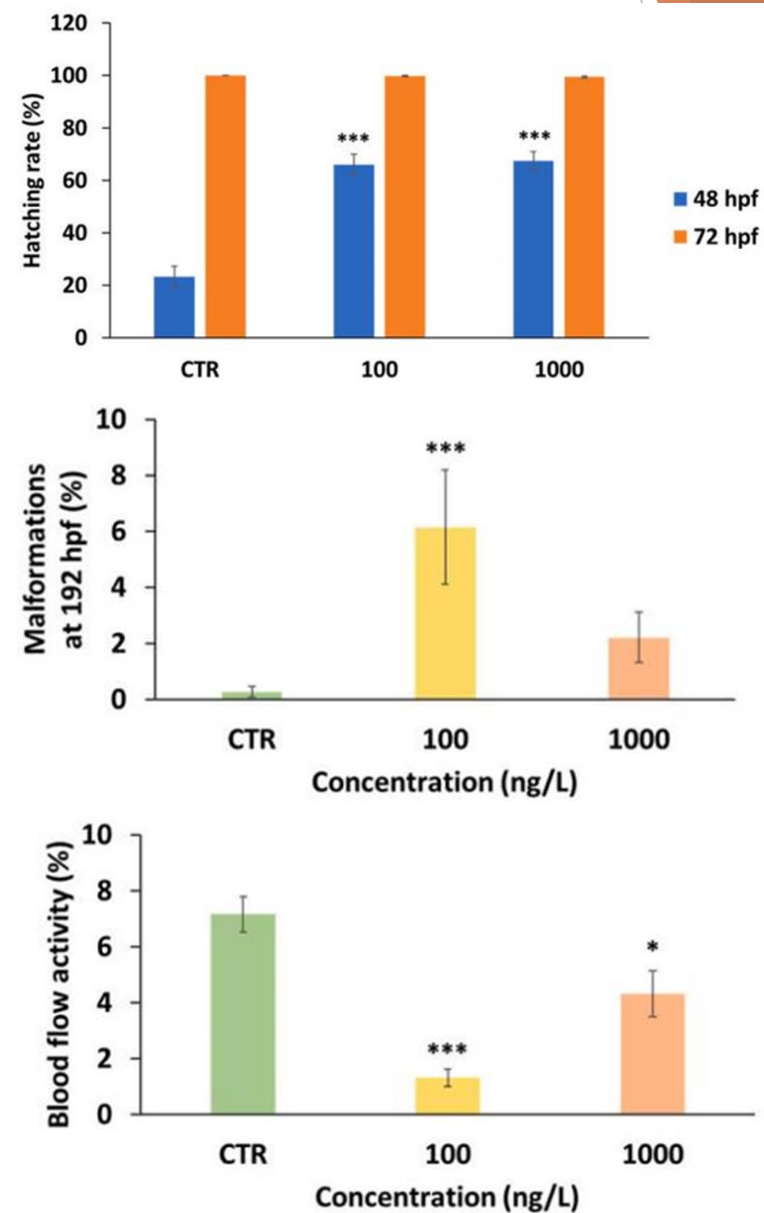
Risultati e discussione:

Effetti sullo Sviluppo Embrionale:

L'esposizione parentale a fluoxetina non ha avuto effetti significativi sulla mortalità diretta della prole, gli effetti riscontrati sono stati:

- ▶ schiusa precoce degli embrioni
- ▶ non-inflazione della vescica natatoria,
- ▶ aumento delle malformazioni,
- ▶ riduzione della frequenza cardiaca e del flusso sanguigno
- ▶ crescita ridotta nella fase larvale

Questi effetti indicano che la fluoxetina può interferire significativamente con lo sviluppo embrionale, suggerendo potenziali implicazioni per la sopravvivenza e la fitness delle popolazioni ittiche in ambienti contaminati.



Risultati e discussione:

Cambiamenti Comportamentali

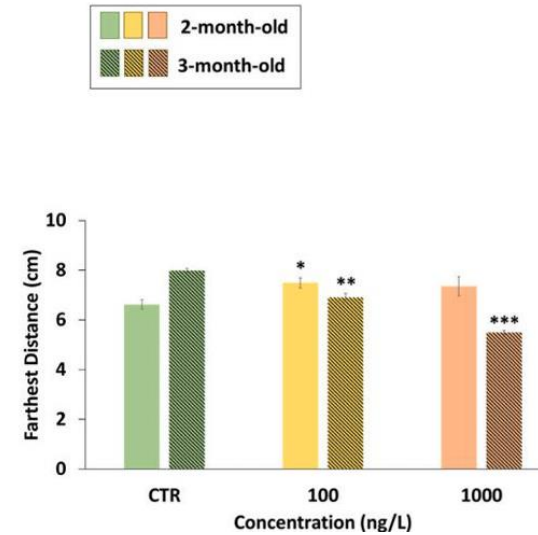
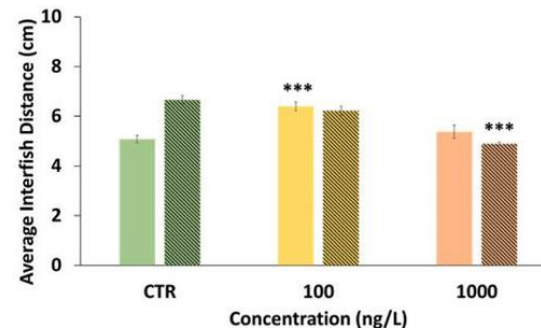
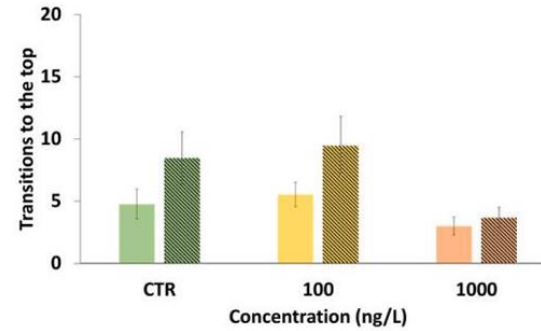
- Risposta allo spavento ridotta
- Diminuzione dell'attività locomotoria basale
- Apprendimento non associativo alterato

Negli stadi di vita successivi sono stati

osservati comportamenti di:

- Geotassi negativa
- Scototassi,
- Riduzione della tigmotassi
- Comportamenti antisociali

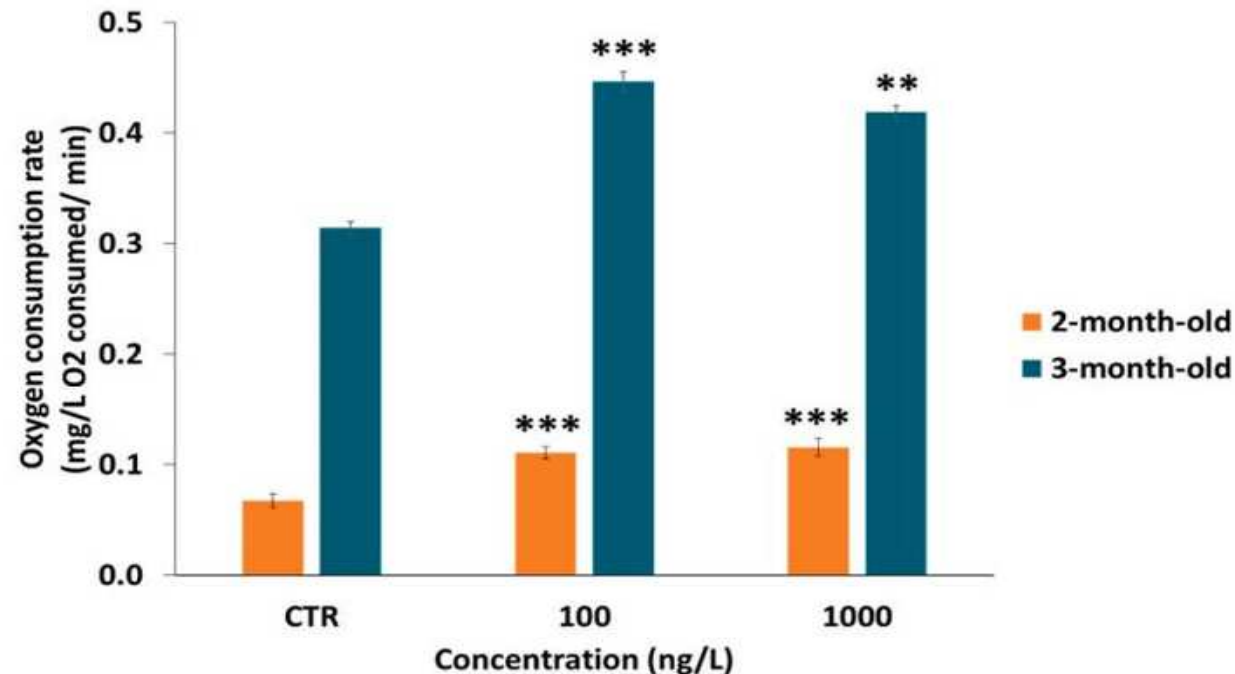
Le alterazioni comportamentali suggeriscono una diminuzione dell'ansia, tali cambiamenti possono influenzare la capacità della prole di rispondere agli stimoli ambientali e sociali, con potenziali ripercussioni sulle dinamiche di popolazione e sulle interazioni ecologiche.



Risultati e discussione:

► Consumo di Ossigeno

L'esposizione parentale alla fluoxetina ha influenzato il consumo di ossigeno nella prole degli zebrafish sia a 2 che a 3 mesi di età. L'aumento del consumo di ossigeno può essere correlato a una maggiore attività metabolica, suggerendo possibili stress metabolici indotti dalla fluoxetina.



Risultati e discussione:

Espressione dei geni Coinvolti nel Sistema Monoaminergico:

L'esposizione parentale alla fluoxetina ha alterato significativamente l'espressione di geni chiave nel sistema monoaminergico nella prole degli zebrafish. In particolare, è stato osservato un aumento dell'espressione dei geni:

-*vmat2*

-*th2*

-*dat*

	8 dpf		3-month-old	
	100 ng/L	1000 ng/L	100 ng/L	1000 ng/L
<i>sert (slc6a4a)</i>	↑	↑ *	↑	↑
<i>mao</i>	↑	↑ *	↑ **	↑ *
<i>tph1a</i>	↑	↑ **	↑	↑
<i>dat (scl6a3)</i>	↑	↑ *	↑ *	↑ *
<i>vmat2 (scl18a2)</i>	↓	↑	↑	↑ *
<i>th2</i>	↑	↑ *	↑	↑ *

Le alterazioni nell'espressione genica possono contribuire ai cambiamenti comportamentali osservati, indicando un'interferenza della fluoxetina nei meccanismi neurochimici fondamentali.

Risultati e discussione:

Neurotrasmettitori Coinvolti nel Sistema Monoaminergico:

L'analisi dei livelli di neurotrasmettitori ha rivelato significativi cambiamenti nei livelli di serotonina e dopamina.

larve di 8 dpf:

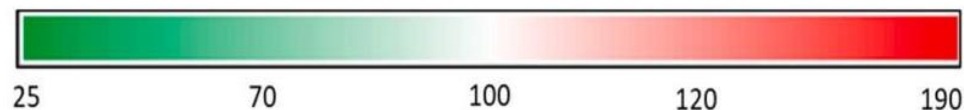
Diminuzione di Serotonina e HVA

Aumento degli altri neurotrasmettitori

Prole a 3 mesi di vita:

Diminuzione significativa nella prole di 1000 ng/L

	8 dpf		3-month-old	
	100 ng/L	1000 ng/L	100 ng/L	1000 ng/L
Serotonin (5-HT)	62.26 *	91.70	77.66	54.11
Tryptophan	141.21 **	104.40	79.49	39.16 ***
Dopamine	167.05 *	189.05 **	91.93	29.84 **
Homovanillic acid (HVA)	84.10	71.48 *	90.77	36.57 ***
Tyrosine	153.93 *	100.15	98.72	61.10 ***
Norepinephrine	136.86	164.51 *	89.87	132.30



Le alterazioni nei livelli di neurotrasmettitori supportano ulteriormente l'ipotesi che la fluoxetina influisce sul sistema nervoso centrale, con potenziali effetti sulle funzioni cognitive e comportamentali.

Conclusioni

I risultati di questo studio hanno dimostrato che l'esposizione degli zebrafish a concentrazioni di fluoxetina rilevanti dal punto di vista ambientale ha effetti sulla loro prole, influenzando lo sviluppo embrionale e alcune risposte comportamentali fondamentali per la sopravvivenza delle larve. Anche a basse concentrazioni, questa esposizione ha causato un aumento dei livelli di espressione dei geni chiave del sistema monoaminergico e alcune alterazioni neurochimiche.

Data questa evidenza, diventa chiara la necessità di condurre studi su esposizioni parentali e multigenerazionali a concentrazioni di fluoxetina rilevanti per l'ambiente. Ulteriori studi di questo tipo su diverse specie acquatiche potrebbero fornire informazioni sui potenziali rischi ambientali associati agli effetti a lungo termine attraverso le generazioni, rafforzando l'importanza di monitorare la presenza di questi psicotropi e altri contaminanti nell'ambiente acquatico.

Ciò richiede una valutazione appropriata delle conseguenze ecologiche dell'esposizione agli antidepressivi nelle popolazioni selvatiche di organismi acquatici.

Bibliografia

Parental exposure to antidepressants has lasting effects on offspring? A case study with zebrafish.

Daniela Correia^a, Marina Bellot^b, Júlia Goyenechea^b, Eva Prats^c, Hugo Morod, Cristian Gómez-Canel^{a,b}, Juliette Bedrossiantz^d, Niki Tagkalidou^e, Carla S.S. Ferreira^a, Demetrio Raldú^a, Inês Domingues^a, Melissa Fariad, Miguel Oliveiraa

<https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2024.141851>

Foto:

- ▶ <https://www.my-personaltrainer.it/salute-benessere/fluoxetina.html>
- ▶ <https://news.mit.edu/2022/smarter-zebrafish-study-1118>
- ▶ <https://ars.els-cdn.com/content/image/1-s2.0-S0045653524007446-mmc1.docx>