



UNIVERSITÀ  
POLITECNICA  
DELLE MARCHE

Dipartimento scienze  
della vita e  
dell'ambiente

---

Corso di Laurea Triennale in Scienze Biologiche

# **Alterazione del metabolismo e dell'adipogenesi in zebrafish esposto a una miscela di inquinanti endocrini durante lo sviluppo**

## **Developmental exposure to a human relevant mixture of endocrine disruptors alters metabolism and adipogenesis in zebrafish**

**Studente:**

Martina Panico

**Relatore:**

Prof. ssa Francesca Maradonna



Uno studio recente del **NCD RisC** ha dimostrato che nel mondo sono considerati **obesi**:

- 50 milioni di ragazze
- 74 milioni di ragazzi
- 40,6 milioni di bambini

**Obesità**: è una condizione multifattoriale che dipende anche da una predisposizione genetica



L'esposizione a «  
»:  
accentua l'adipogenesi  
incrementa la massa grassa  
provoca uno squilibrio omeostatico



L'esposizione a questi  
in fasi precoci  
dello sviluppo comporta:  
un basso peso alla nascita, con crescita  
compensativa nell'infanzia  
sviluppo di patologie in età tardiva



**White adipose tissue (WAT)** è il principale sito di accumulo di energia nel corpo:

- formato da **adipociti**

Cresce secondo tre modalità:

- **IPERTROFIA**: incorpora lipidi negli adipociti
- **IPERPLASIA**: aumenta il numero di adipociti
- la combinazione di ipertrofia e iperplasia

**Il bilancio energetico:**

- equilibrio tra energia immagazzinata ed energia rilasciata
- le sue alterazioni causano disturbi
- l'attività metabolica viene stimata attraverso la **resazurina** (indicatore redox) che riflette lo status metabolico delle cellule

**Obiettivo:**

- valutare l'effetto di contaminanti ambientali in grado di alterare i normali processi fisiologici nell'uomo e nella fauna selvatica



**Esperimento**

- lo **Zebrafish** è stato esposto ad un insieme di contaminanti chimici in combinazione ad una dieta ricca di grassi fino a 17 dpf. Sono stati valutati i seguenti valori:
  - tasso metabolico
  - adiposità viscerale
  - lipidi nel corpo e nel sangue
  - espressione di geni correlati al metabolismo

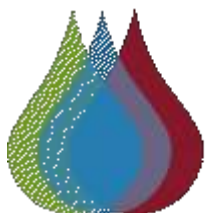
1. **Allevamento pesci:** il **Consiglio Svedese dell'Agricoltura (SJVFS)** e la **Commissione Etica per la ricerca di animali di Uppsala**, hanno approvato l'uso di ceppi selvatici di Zebrafish. Tre coppie si sono riprodotte ed è stato possibile raccoglierne gli embrioni già dopo 1h.
2. **Esposizione:**
  - fotoperiodo di 12h di luce e 12h di buio
  - pesci esposti da 3 hpf fino a 5, 14 e 17 dpf
  - usate piastre petri e beaker in vetro
  - usata acqua del rubinetto arricchita dalla miscela composta dagli inquinanti endocrini
  - monitorati i seguenti parametri:
    - **temperatura:** ~28.7 °C
    - **conducibilità:** ~ 524  $\mu$ S
    - **NO<sub>3</sub>:** < 10 mol/L
    - **NO<sub>2</sub>:** < 1 mg/L
    - **NH<sub>3</sub>:** < 0.3 mg/L
    - **pH:**~ 7.9



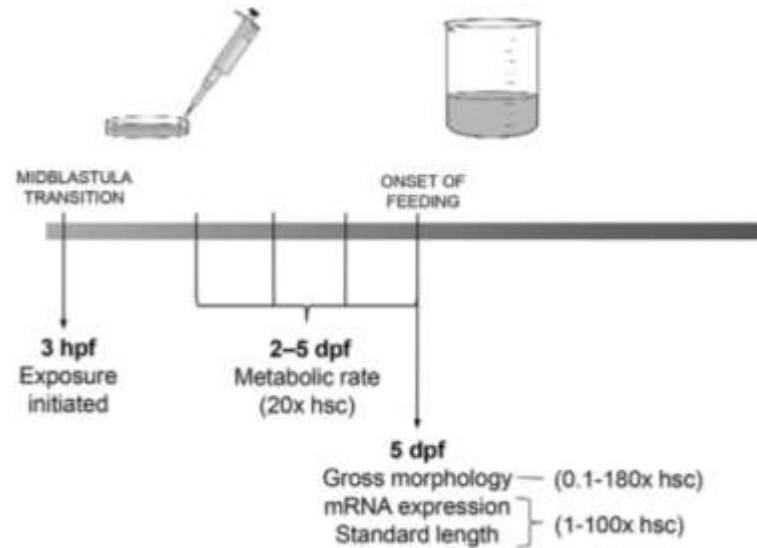
3. Elementi chimici: l'EDC MixRisk ha composto la **miscela G** selezionando sostanze chimiche, presenti nel sangue e nelle urine di una coorte svedese di donne in gravidanza, ipotizzando l'esistenza di una correlazione tra la presenza di questi inquinanti e le alterazioni del peso del feto alla nascita:

- 2 monoetil ftalato (**MEP**)
- Monobutil ftalato (**MBP**)
- Monobenzil ftalato (**MBzP**)
- Mono – etil ftalato (**MEHP**)
- Mono – isonil ftalato (**MINP**)
- Triclosano (**TCS**)
- Perfluoroesano sulfonato (**PFHxS**)
- Acido perfluorooottanoico (**PFOA**)
- Perfluorooottano sulfonato (**PFOS**)
- Dimetil sulfoxide (**DMSO**) (nelle urine)

Le concentrazioni sono espresse in «x hsc» che rappresenta la media geometrica dei livelli sierici delle donne prese in esame



## 4. Processo di sperimentazione



### 3 hpf:

- DMSO
- 130 – 180x hsc
- particolari effetti morfologici

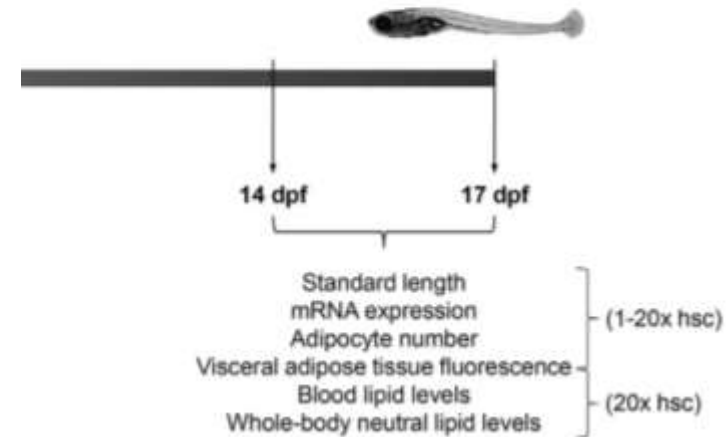
### 2 - 5 dpf:

- 20x hsc
- piastra da 96 pozzetti
- tasso metabolico

### 5 dpf:

- piastre petri
- 1, 10, 100x hsc
- Espressione mRNA

## 4. Processo di sperimentazione



### 14 – 17 dpf:

- 1, 10, 20x hsc
- Golden Pearl e tuorlo d'uovo
- tessuto adiposo ed espressione mRNA

### 14 – 17 dpf:

- 20x hsc
- Nile Red (tessuto adiposo viscerale) e lipidi nel sangue
- Oil Red O (lipidi neutri nel corpo)

## Tasso metabolico:

- 6 pesci su piastra a 96 pozzetti con 400 $\mu$ L di soluzione (*resazurina*, *bicarbonato* e *miscela G a 20x hsc*)
- piastra incubata a 28.5° con coperchio e foglio d'alluminio
- misurazioni di fluorescenza a **2, 24, 48** e **72h** dopo l'incubazione

**Colorazione Nile Red:** in base al numero di adipociti contati, i pesci colorati sono stati divisi in tre categorie:

- 0
- 1 – 6
- > 6



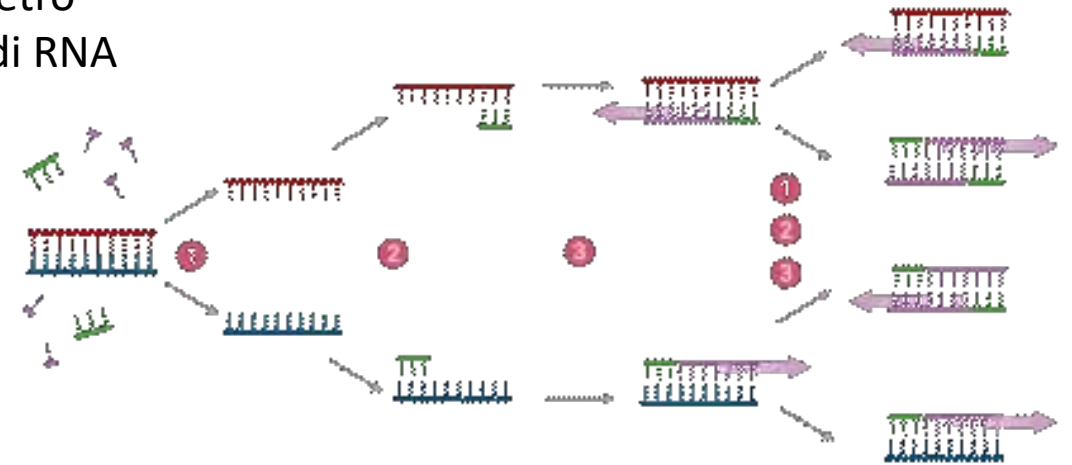
## Colorazione Oil Red O:

- 5 pesci a 17 dpf, sottoposti ad eutanasia, fissati, lavati e colorati con 0,3% di Oil Red O
- piastra da 96 pozzetti e lettore di piastre per misurare l'assorbanza del colorante
- lipidi neutri nel corpo



## RT PCR quantitativa:

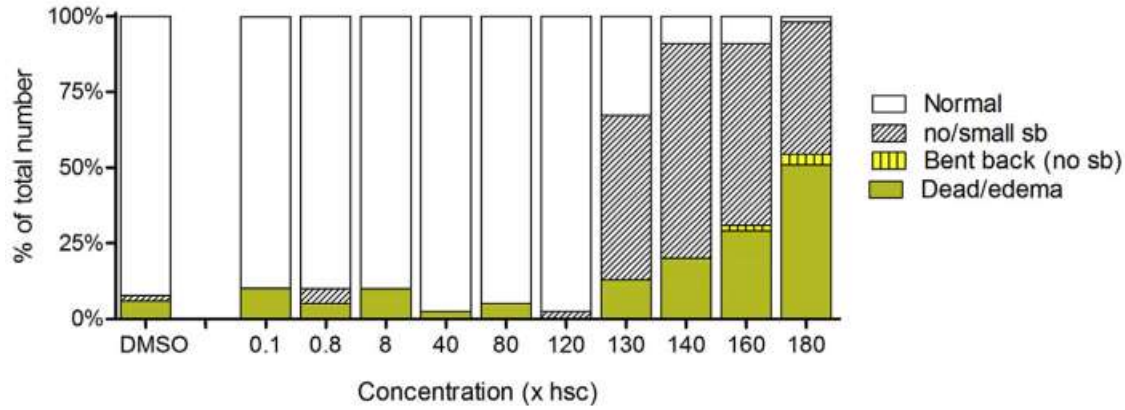
- 4 pesci senza nutrimento fino ai 14 – 17 dpf, soppressi con shock ipotermico e congelati in azoto liquido
- estratto l'**RNA totale** di cui sono state misurate:
  - l'**integrità** mediante elettroforesi
  - la **quantità** e la **purezza** mediante spettrofotometro
- **cDNA** ottenuto con kit di sintesi partendo da 0.5 µg di RNA
- **primer** specifici
- **PCR:**
  - 95° x 4 min (denaturazione)
  - 50° x 30 sec (annealing)
  - 72° x 5 min (estensione prolungata)



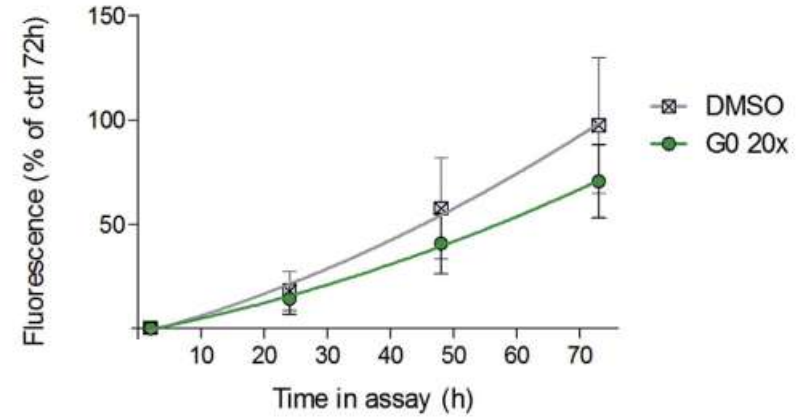
## 5. Statistiche:

- se i dati sono normalmente distribuiti → **ANOVA**
- se i dati non sono normalmente distribuiti → **test di Kruskal – Wallis**
- se nell'esperimento sono stati inclusi solo due gruppi → **t-test non accoppiato**
- distribuzione pesci tra le tre categorie di adipociti → **test esatto di Fisher-Freeman-Halton**

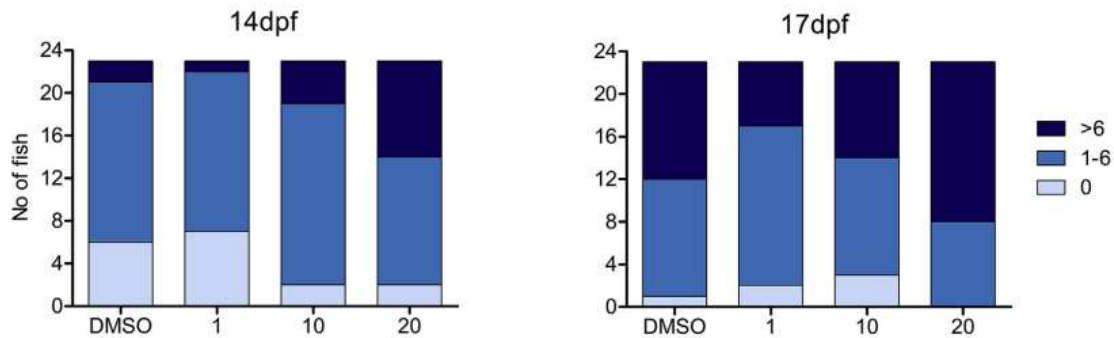
## Effetti morfologici:



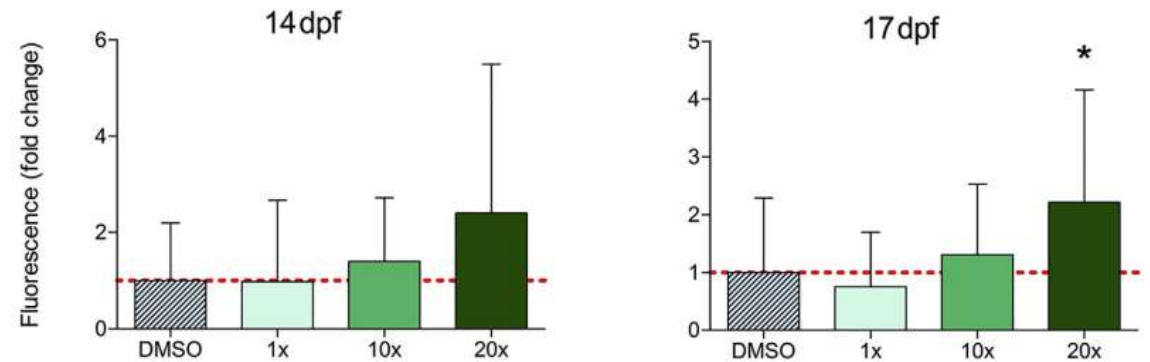
## Tasso metabolico:



## Adiposità a 14 – 17 dpf:



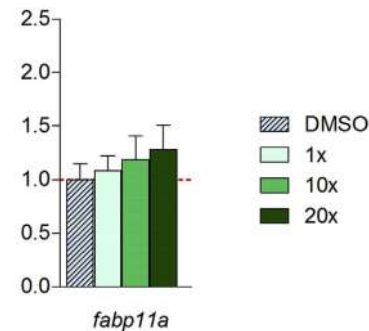
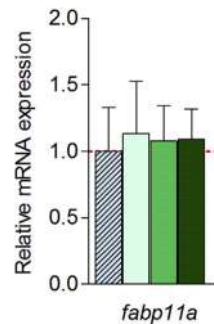
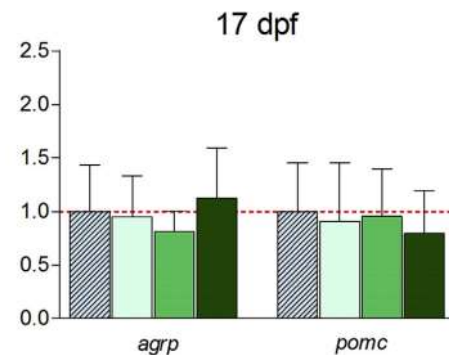
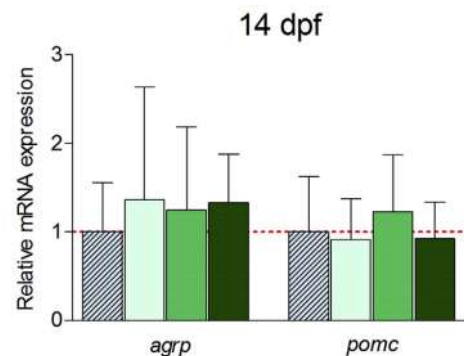
## Adiposità a 14 – 17 dpf:



Effetti lipidi nel sangue 14 – 17 dpf → valore medio: 0,83 (14 dpf) e 0,97 (17 dpf)

Effetti lipidi neutri nel corpo a 17 dpf → valore medio: 1

## Effetto sull'espressione dell'mRNA



- **5 dpf**: effetti solo se esposti a 100x hsc → **lipasi** e i 3 geni di riferimento sottoregolati
- **14 -17 dpf**: nessun effetto sui geni correlati all' appetito (**agrp** e **pomca**)
- **FABP11a** aumentata nei pesci esposti a 10 o 20x hsc



- la miscela G o il DMSO già a 20x hsc riducono il tasso metabolico e stimolano l'adipogenesi nello Zebrafish
- l'esposizione al PFOA dei topi ha evidenziato:
  - ↑ peso
  - ↑ Leptina
  - ↑ insulina negli adulti
- nell'uomo l'associazione tra perfluorati e crescita fetale non è ancora del tutto chiarita

HFD importante fattore che se associato alla miscela G incrementa l'adipogenesi.

Associato al BFA (interferente endocrino) causa:

↑ colesterolo nel fegato

↑ FABP11a

AGRP e POMCA:

- sono coinvolti nella regolazione dell'appetito stimolandolo o sopprimendolo
- non vengono modificati ma sono coinvolti nello studio perché l'esposizione ad obesogeni modifica il comportamento alimentare



La concentrazione della miscela G rappresenta i livelli presenti nel plasma umano

**Distinzione** tra i pesci in acqua con la miscela G disciolta e il feto umano esposto alle sostanze presenti nel sangue

La miscela G altera il metabolismo dei pesci a concentrazioni rilevanti per l'uomo e la fauna selvatica

Necessari **ulteriori studi** sperimentali per capire quali siano le miscele che abbiano lo stesso effetto sul metabolismo umano

# Abstract

È stato suggerito che l'esposizione a sostanze chimiche che alterano il sistema endocrino contribuisca all'aumento globale dell'obesità.

Le complesse miscele chimiche a cui sono esposti gli esseri umani e la fauna selvatica includono una serie di composti che possono avere proprietà obesogeniche. In questo studio è stata esaminata una miscela composta da ftalato-monoesteri, triclosan e composti perfluorurati, progettata nell'ambito del progetto EDC-MixRisk e basata sui livelli sierici e di urine nelle donne in gravidanza di una coorte svedese.

I composti sono stati associati negativamente al peso alla nascita dei bambini. È stato valutato se l'esposizione durante lo sviluppo a questa miscela in combinazione con una dieta ricca di calorie influenzasse il tasso metabolico, i lipidi nel sangue, l'adipogenesi e i livelli di lipidi neutri nello Zebrafish (*Danio rerio*).

Il ceppo selvatico è stato esposto alla miscela da 3 ore dopo la fecondazione a 5, 14 o 17 giorni dopo la fecondazione (dpf) a concentrazioni di acqua corrispondenti a 1, 10, 20 o 100 volte la media geometrica della concentrazione sierica (hsc) nelle donne. L'esposizione alla miscela di 20x hsc ha abbassato il tasso metabolico a 2 e 5 dpf e aumentato il numero di adipociti e la quantità di tessuto adiposo viscerale rispettivamente a 14 e 17 dpf. Inoltre, l'espressione della proteina legante gli acidi grassi 11a è stata aumentata a 17 dpf.

Questo studio mostra che una miscela di inquinanti ambientali rilevante per l'uomo influisce sul tasso metabolico, sull'adipogenesi e sui lipidi di stoccaggio in giovani zebrafish alimentati con una dieta ricca di calorie, dimostrando così il suo potenziale per interrompere il metabolismo