



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

Corso di Laurea in Scienze Biologiche

Studio sulla distribuzione della vitellogenina nella passera giapponese (*Paralichthys olivaceus*), un utile biomarker per la valutazione degli estrogeni negli ambienti marini

*Distribution of vitellogenin in Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*), for biomarker analysis of marine environmental estrogens*

Tesi di Laurea di:
Laura LEONE

Docente Referente
Prof. Maura BENEDETTI

Sessione autunnale
Anno Accademico 2021/2022

Abstract

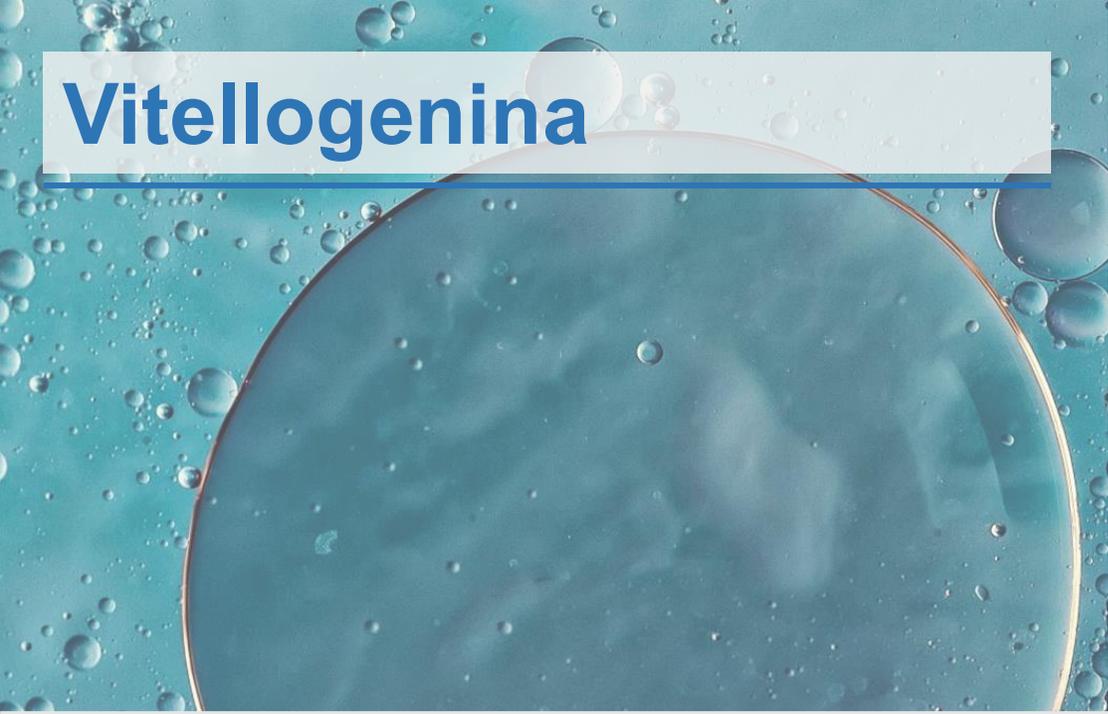
L'inquinamento da estrogeni negli ambienti marini è una tematica ampiamente discussa nel campo della ricerca a causa dei suoi effetti negativi sulla riproduzione degli organismi marini. Per individuare precocemente l'inquinamento causato dagli estrogeni ambientali, in questo studio sono stati utilizzati due metodi: test ELISA (sandwich) e immunofluorescenza diretta. I due metodi sono stati utilizzati per misurare la concentrazione di Vitellogenina presente in una specie marina: la passera giapponese. Utilizzando la Lipovitellina, un derivato della vitellogenina, sono stati preparati gli anticorpi monoclonali, che successivamente, dopo essere stati marcati con la fluoresceina sono stati utilizzati per eseguire il test d'immunofluorescenza per evidenziare a livello istologico la presenza di Vtg nei tessuti. Inoltre con la Lipovitellina e l'anticorpo monoclonale sono stati sviluppati gli immunodosaggi di Vtg. La passera giapponese è stata esposta a diverse concentrazioni di tre estrogeni: 17β -estradiolo (E2), 17α -etinilestradiolo (EE2) e bisfenolo A (BPA); l'induzione della Vtg è stata quantificata con i due metodi precedentemente citati. I risultati dello studio hanno rivelato che la presenza di Vtg si osserva principalmente nella pinna caudale, nel fegato, nel rene, nell'intestino e nella milza. Considerando l'alta concentrazione di Vtg e la facilità di prelievo del campione, la pinna caudale potrebbe essere una nuova alternativa al plasma per la quantificazione di Vtg, mentre rene e fegato sono adatti per la rilevazione istologica di Vtg.

Estrogeni Ambientali



Negli ultimi decenni gli estrogeni ambientali hanno suscitato grande preoccupazione per i loro effetti negativi sullo sviluppo delle gonadi e sulla riproduzione di organismi, inclusi quelli marini. Queste molecole sono composti chimici sia naturali, sia sintetizzati dall'uomo che mimano gli effetti degli ormoni estrogenici e possono causare patologie come l'infertilità e la femminizzazione di individui maschili.

Dato il potenziale rischio ecologico e per la salute umana, è urgente individuare dei metodi affidabili per il rilevamento di questi inquinanti emergenti, che entrano in ambiente attraverso le acque reflue e si distribuiscono lungo la rete trofica fino ad arrivare all'uomo. Ad oggi, negli organismi marini, sono stati sviluppati diversi biomarker di esposizione a questi contaminanti; nei pesci l'analisi della vitellogenina è il biomarker maggiormente utilizzato.



Vitellogenina

La vitellogenina è una proteina specifica, sintetizzata nel fegato degli esemplari femminili sessualmente maturi in risposta all'ormone 17β -estradiolo; dopo la sua produzione, viene rilasciata nella circolazione sanguigna e depositata negli ovociti in via di sviluppo, dove viene scissa in lipovitellina e fosvitina e altre proteine del tuorlo. Pur avendo i recettori estrogenici, in condizioni naturali, gli esemplari maschili non producono questa proteina, ma concentrazioni molto basse di estrogeni ambientali possono causarne l'induzione.



Passera giapponese

Paralichthys olivaceus

La passera giapponese è un pesce bentonico marino ampiamente distribuito nell'Asia nordorientale, è stato scelto come specie bioindicatrice, per la rilevazione degli estrogeni ambientali, grazie alle sue grandi dimensioni, facilità di prelievo, e capacità di sopravvivenza.

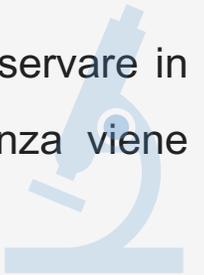
Scopo del lavoro

Lo scopo di questo studio è stato quello di valutare l'attività estrogenica di alcune sostanze chimiche andando a valutare i livelli di vitellogenina nella passera giapponese, attraverso l'applicazione di 2 metodi immunologici (Sandwich Elisa e Immunofluorescenza diretta).

Materiali e Metodi

Metodi

- **Immunofluorescenza diretta (DIF):** è un metodo per l'identificazione di proteine nei tessuti, sfruttano il riconoscimento antigene-anticorpo; l'anticorpo è marcato con un fluoroforo;
- **Sandwich Elisa:** test per rilevare la presenza di una proteina usando anticorpi a cui è legato un enzima generalmente una perossidasi;
- **Western blot:** è una tecnica che permette di identificare una determinata proteina utilizzando anticorpi e elettroforesi. Le bande proteiche separate con l'elettroforesi vengono trasferite dal gel di poliacrilammide ad una membrana di nitrocellulosa e poi marcate con anticorpo specifico per la proteina d'interesse, la cui banda viene riconosciuta;
- **qPCR:** la PCR quantitativa è un metodo che simultaneamente amplifica e quantifica il DNA, permette di osservare in tempo reale la presenza di mRNA all'interno di un campione. Attraverso il numero di cicli di fluorescenza viene quantificato quanto mRNA è presente.



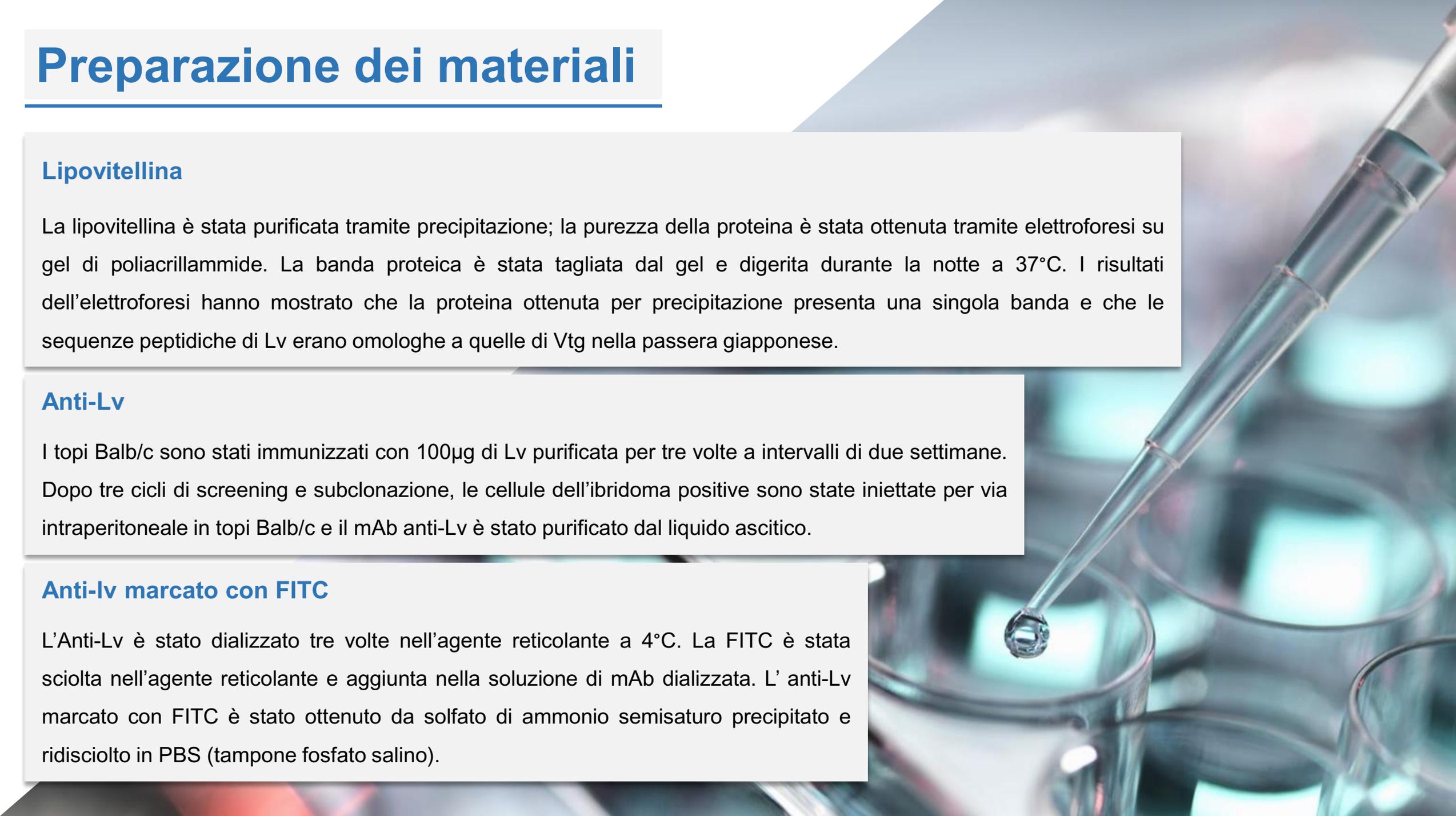
Materiali e Metodi

Esposizione di Laboratorio

Esemplari giovanili e sessualmente maturi (maschi e femmine) sono stati esposti a diverse concentrazioni dei seguenti estrogeni ambientali: 17α -etinilestradiolo; 17β -estradiolo e bisfenolo A, alle concentrazioni di 0,2, 10 e 50 ng/L . Dopo 21 giorni di esposizione da ogni pesce sono stati prelevati fegato, reni, intestino e pinna caudale. Per quantificare la Vtg i tessuti sono stati omogeneizzati e la Vtg negli omogenati è stata misurata tramite test ELISA sandwich e Western blot, la Vtg nelle sezioni di tessuto è stata visualizzata tramite DIF, infine i tessuti sono stati utilizzati per l'estrazione dell'mRNA per quantificare i geni Vtg1 e Vtg2 utilizzando la qPCR(PCR quantitativa in tempo reale).



Preparazione dei materiali



Lipovitellina

La lipovitellina è stata purificata tramite precipitazione; la purezza della proteina è stata ottenuta tramite elettroforesi su gel di poliacrilammide. La banda proteica è stata tagliata dal gel e digerita durante la notte a 37°C. I risultati dell'elettroforesi hanno mostrato che la proteina ottenuta per precipitazione presenta una singola banda e che le sequenze peptidiche di Lv erano omologhe a quelle di Vtg nella passera giapponese.

Anti-Lv

I topi Balb/c sono stati immunizzati con 100µg di Lv purificata per tre volte a intervalli di due settimane. Dopo tre cicli di screening e subclonazione, le cellule dell'ibridoma positive sono state iniettate per via intraperitoneale in topi Balb/c e il mAb anti-Lv è stato purificato dal liquido ascitico.

Anti-lv marcato con FITC

L'Anti-Lv è stato dializzato tre volte nell'agente reticolante a 4°C. La FITC è stata sciolta nell'agente reticolante e aggiunta nella soluzione di mAb dializzata. L' anti-Lv marcato con FITC è stato ottenuto da solfato di ammonio semisaturo precipitato e ridisciolti in PBS (tampone fosfato salino).

Applicazione dei metodi

Test ELISA (sandwich)

Le piastre sono state rivestite con mAb anti-Lv, successivamente sono stati inseriti il campione, la lipovitellina, e l'anticorpo secondario IgG anti-Lv coniugato con l'enzima perossidasi, che si lega all'antigene con formazione dell'immunocomplesso.

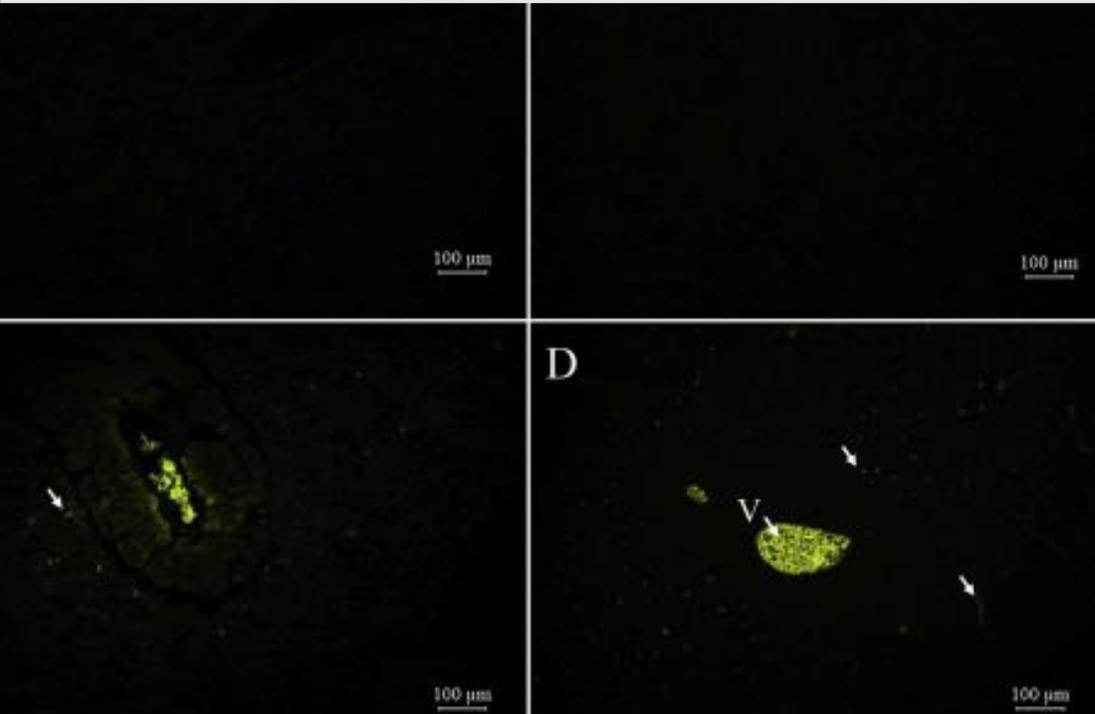
Dopo la formazione dell'immunocomplesso sono stati fatti una serie di lavaggi per eliminare l'antigene in eccesso dai pozzetti ed è stato inserito il substrato per l'enzima perossidasi; l'assorbanza è stata misurata con lettore micropiastre a 450 nm.

Immunofluorescenza diretta (DIF)

Per la rilevazione della vitellogenina il tessuto epatico della passera giapponese è stato fissato in paraformaldeide per la preparazione di sezioni in paraffina, successivamente deparaffinate e idratate.

Dopo l'idratazione le sezioni sono state immerse in un tampone citrato per estrarre l'antigene.

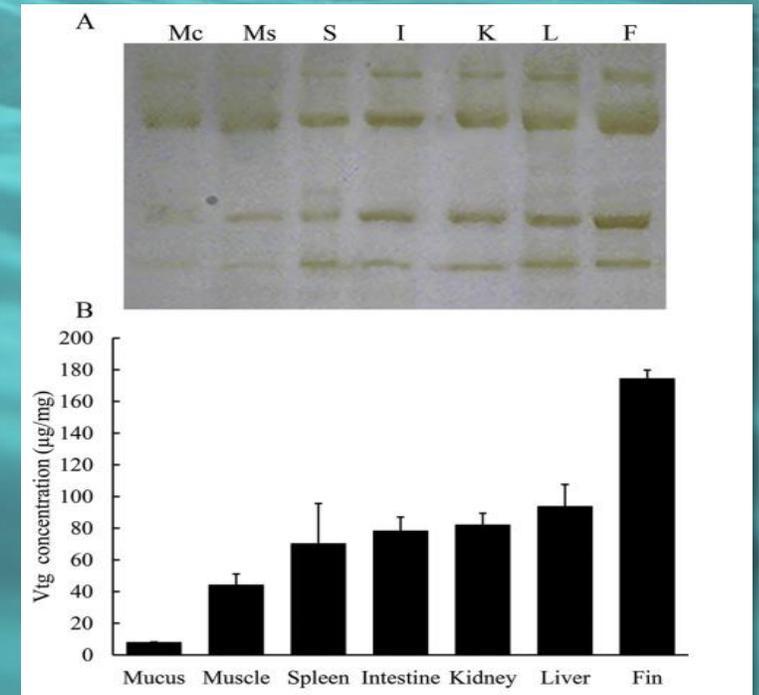
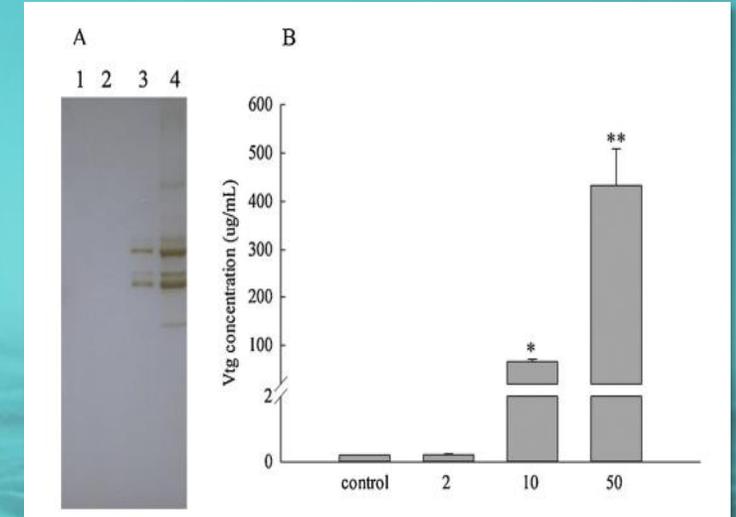
Infine le sezioni di tessuto sono state incubate con anti-Lv marcato con FITC e osservato al microscopio a fluorescenza.



Risultati ELISA e Western blot

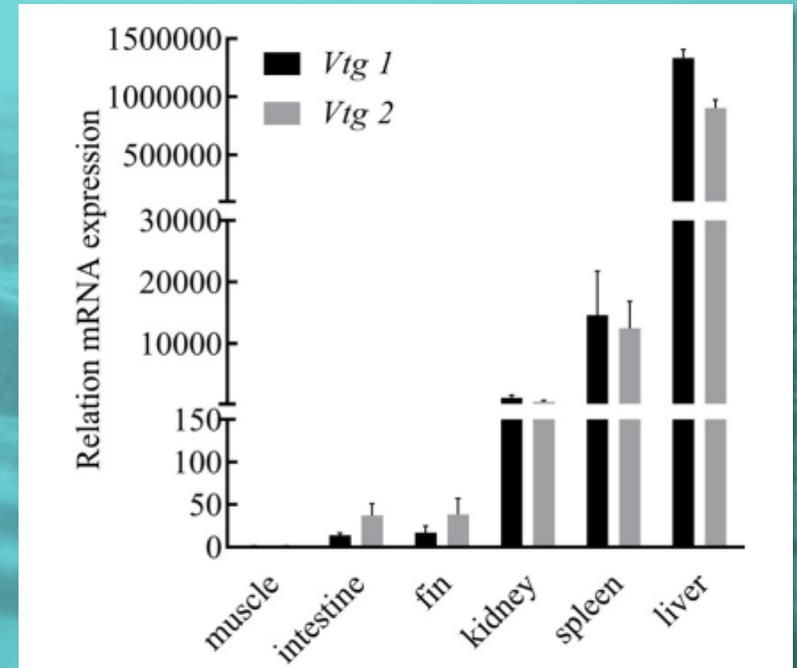
La presenza di vitellogenina è stata misurata nel plasma degli organismi esposti a EE2 alla concentrazione di 10 e 50 ng/L, come si osserva nell'analisi Western blot (A) ed ELISA (B).

Negli esposti a 50 ng/L EE2, si evidenzia la presenza di vitellogenina in diversi tessuti, tra cui la pinna caudale, il fegato, i reni, l'intestino, la milza, il muscolo e il muco superficiale (Western blot ed ELISA). La concentrazione più elevata di vitellogenina è stata misurata nella pinna caudale ($174,37 \pm 9,31 \mu\text{g}/\text{mg}$), seguita dal fegato ($93,69 \pm 14,06 \mu\text{g}/\text{mg}$), rene ($93,69 \pm 14,06 \mu\text{g}/\text{mg}$), intestino ($78,25 \pm 15,18 \mu\text{g}/\text{mg}$), milza ($70,20 \pm 43,87 \mu\text{g}/\text{mg}$) e muscoli ($44,10 \pm 12,00 \mu\text{g}/\text{mg}$).



Risultati qPCR (real time PCR)

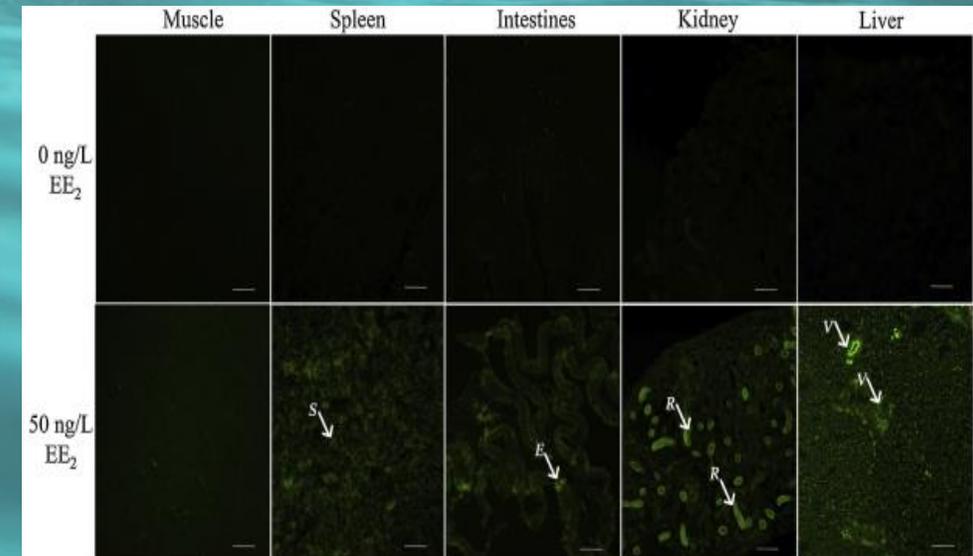
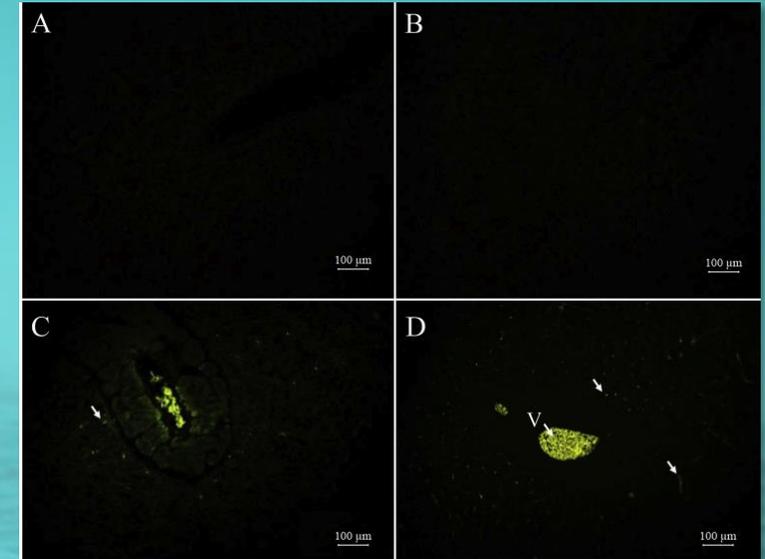
L'mRNA relativo alle due isoforme di Vtg1 e Vtg2 è espresso diversamente nei tessuti testati. I livelli di espressione più alti di Vtg1 e Vtg2 sono stati trovati nel fegato, seguito dalla milza e dai reni. Al contrario, relativamente bassi livelli di trascrizione di Vtg1 e Vtg2 sono stati trovati nella pinna caudale, nell'intestino e nel muscolo.



Risultati DIF

La Vtg non è stata rilevata nel fegato della passera giapponese nei gruppi di controllo e di esposizione a 2 ng/L di EE2; l'esposizione con 10 ng/L di EE2 ha indotto una chiara fluorescenza verde in prossimità dei vasi sinusoidi nel fegato (Fig. 4C). Nel gruppo esposto a 50 ng/L di EE2, è stata osservata una forte fluorescenza verde in prossimità della vena centrale del fegato (Fig. 4D).

I risultati del DIF hanno mostrato che non è stato rilevato alcun segnale fluorescente nei tessuti di passera giapponese del gruppo di controllo. Nei gruppi esposti a 50 ng/L EE2, sono stati osservati forti segnali fluorescenti verdi nel rene e nel fegato, e segnali di fluorescenza relativamente intensi sono stati trovati nella milza e nell'intestino. Al contrario, il muscolo ha mostrato uno scarso segnale di fluorescenza.



Conclusioni

I risultati hanno mostrato che la capacità estrogenica dei diversi composti testati misurata in base all'induzione della Vtg è EE2>E2>BPA; i risultati hanno dimostrato che l'ELISA può essere utilizzato per testare le proprietà estrogeniche delle sostanze chimiche.

E' interessante notare che la pinna caudale terminale contiene la più alta concentrazione di Vtg e grazie alla facilità di prelievo dei campioni con il minor danno possibile questo tessuto può rappresentare un'alternativa al plasma e al fegato per effettuare l'analisi della Vtg, come biomarker specifico.

Il metodo DIF si è rivelato un metodo veloce e sensibile per la rilevazione istologica di Vtg nei tessuti.

Queste tecniche alternative potrebbero essere utilizzate per individuare precocemente l'inquinamento da estrogeni negli ambienti marini.

Bibliografia

- Zhenzhong Z., Wang J., Pan Z., Zhang Y., Zhang X., Tian H., Wang W., Ru S.; “Distribution of vitellogenin in Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*) for biomarker analysis of marine environmental estrogens”, *Aquatic Toxicology* (2019), 105321, <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2019.105321>;
- <https://www.globalseafood.org/advocate/topic/paralichthys-olivaceus/>.

N.B. Alcune immagini sono state estratte dall'archivio di power point.

Grazie per l'attenzione