



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI MESSINA

---

**TESI DI DOTTORATO DI RICERCA IN BIOLOGIA APPLICATA  
E MEDICINA SPERIMENTALE**  
*CURRICULUM IN SCIENZE BIOLOGICHE ED AMBIENTALI*

XXXV CICLO  
SSD BIO/07

***Studio degli effetti embriotossici dei diversi  
inquinanti ambientali emergenti, mediante  
impiego di Fish Embryo Toxicity test – FET***

Candidato:

**DOTT. DAVIDE DI PAOLA**

Relatore:

**Ch.ma Prof.ssa**

**NUNZIACARLA SPANÒ**

Coordinatore:

**Ch.ma Prof.ssa NUNZIACARLA SPANÒ**

---

ANNO ACCADEMICO 2021-2022

## Sommario

<b>RIASSUNTO.....</b>	<b>5</b>
<b>LISTA DELLE ABBREVIAZIONI.....</b>	<b>6</b>
<b>CAPITOLO 1. Introduzione.....</b>	<b>9</b>
<b>1.1. Contaminanti ambientali .....</b>	<b>9</b>
<b>1.2. Policlorobifenili.....</b>	<b>10</b>
<b>1.3. Diossine.....</b>	<b>11</b>
<b>1.4. Pesticidi Organoclorurati.....</b>	<b>14</b>
<b>1.5. Metalli pesanti .....</b>	<b>16</b>
<b>1.6. Farmaci.....</b>	<b>18</b>
<b>1.7. Micotossine .....</b>	<b>22</b>
<b>CAPITOLO 2. Obiettivi della tesi .....</b>	<b>25</b>
<b>CAPITOLO 3. Zebrafish embryo toxicity test .....</b>	<b>26</b>
3.1 OECD e linee guida.....	26
3.2. Zebrafish come modello di tossicità ambientale .....	28
3.3. Studi tossicologici su zebrafish .....	30
<b>CAPITOLO 4. Rischio ambientale da farmaci.....</b>	<b>33</b>
<b>4.1. Oxaliplatino .....</b>	<b>33</b>
<b>4.1 Materiali e metodi.....</b>	<b>35</b>
4.2. Analisi Istopatologiche.....	36
4.3. Estrazione RNA totale e RT-PCR.....	37
4.4. Apoptosi e analisi delle immagini.....	39
4.5. Misurazione di SOD e CAT .....	40

4.6. Analisi dei dati.....	40
<b>4.7. Risultati .....</b>	<b>41</b>
4.7.1. Tasso di sopravvivenza, schiusa e alterazioni morfologiche .....	41
4.7.1 Effetto dell'OXA sul pathway dello stress ossidativo .....	43
4.7.2. Analisi istologica.....	44
4.7.3 Apoptosi .....	45
<b><i>CAPITOLO 6 rischio ambientale da metalli pesanti .....</i></b>	<b>47</b>
<b>6.1. Cromo e Cadmio .....</b>	<b>47</b>
<b>6.2. Materiali e Metodi .....</b>	<b>49</b>
6.2.1 Zebrafish Maintenance and Embryo Collection.....	49
6.2.2 Preparazione delle dosi e protocolli di esposizione.....	49
6.2.3 Fish embryo toxicity test (FET) .....	50
6.2.4 Vitalità, morfologia e tasso di schiusa.....	51
6.2.5. Estrazione dell'RNA totale e RT-PCR .....	52
6.2.6. Rilevazione dei ROS e saggio degli enzimi antiossidanti.....	54
6.2.7 Materiali .....	54
6.2.8 Valutazione statistica.....	54
<b>6.3. Risultati .....</b>	<b>55</b>
6.3.1 Effetto del bisfenolo A su morfologia, vitalità e tasso di schiusa .....	55
6.3.2 Score delle malformazioni, lunghezza del corpo e frequenza cardiaca .....	57
6.3.3 Effetto di BPA, Cd e Cr sull'espressione genica del pathway antiossidante.....	59
6.3.4 Effetto di BPA, Cd e Cr sull'espressione genica del pathway apoptotico.....	61
<b><i>CAPITOLO 7 rischio ambientale da micotossine ed effetto protettivo di <i>H. erinaceus</i> .....</i></b>	<b>62</b>
<b>7.1. Ruolo protettivo dell'<i>Hericium erinaceus</i> sulla tossicità indotta da aflatossina B1.....</b>	<b>62</b>
<b>7.1 Materiali e metodi.....</b>	<b>64</b>
7.1.1 Fish embryo toxicity test (FET) .....	64

7.1.2 Sviluppo e morfologia post esposizione a AFB1 ed Hericium .....	65
7.1.3 Determinazione di MDA e stress ossidativo .....	66
7.1.4 TUNEL.....	66
7.1.5 Isolamento dell'RNA e analisi RT-PCR.....	67
7.1.6 Materiali .....	67
7.1.7 Valutazione statistica.....	67
<b>7.2 Risultati .....</b>	<b>68</b>
7.2.1 Morfologia.....	68
7.2.2 Sopravvivenza, cuore e tasso di schiusa degli embrioni di zebrafish dopo il trattamento con AFB1 ..	70
7.2.3 Effetto dell'AFB1 sulla perossidazione lipidica e sul pathway dello stress ossidativo e azione protettiva dell'Hericium.....	72
7.2.4 Effetto preventivo di Hericium sul processo apoptotico indotto dall'AFB1 nelle larve di zebrafish...	74
<b><i>CAPITOLO 8. Discussione .....</i></b>	<b>76</b>
<b><i>CAPITOLO 9. Conclusioni.....</i></b>	<b>81</b>
<b><i>BIBLIOGRAFIA.....</i></b>	<b>82</b>

## RIASSUNTO

L'inquinamento ambientale è senza dubbio una delle minacce globali più allarmanti dell'ultimo secolo, la grande varietà di contaminanti che raggiungono gli ecosistemi naturali e la penuria di impianti e strumentazioni adeguate per la loro rimozione costituisce un pericolo costante per la salute sia delle specie animali che umana. Gli studi presenti in questo elaborato sono stati svolti con diverse tipologie di contaminanti ambientali tra le classi di inquinanti maggiormente rilevati negli ambienti acquatici utilizzando come modello sperimentale esemplari di larve di zebrafish. A tal fine sono stati impiegati ampi range di concentrazioni e sono state condotte indagini sulla possibile tossicità a bassi dosaggi per periodi prolungati e sono stati osservati i risultati dell'esposizione sinergica a più inquinanti differenti. Al giorno d'oggi, il crescente consumo di agenti antineoplastici è stato correlato alla loro continua immissione negli ambienti naturali. Queste sostanze possono interferire con i processi fisiologici e biochimici delle specie acquatiche durante il loro intero ciclo di vita. I risultati della nostra ricerca hanno dimostrato che l'esposizione prolungata al chemioterapico Oxaliplatino anche a concentrazioni molto basse può indurre un aumento della mortalità e anomalie dello sviluppo, riducendo il tasso di schiusa. Questo studio ha rivelato anche che la combinazione di metalli pesanti quali Cadmio (Cd) e Cromo (Cr) in associazione con Bisfenolo A (BPA) può causare una risposta infiammatoria acuta nelle larve di zebrafish, come dimostrato dalle alterazioni morfologiche e dal pathway di stress ossidativo coinvolto. Inoltre, abbiamo confermato non solo la tossicità causata dall'esposizione all'aflatossina B1 ma anche sottolineato l'effetto potenzialmente protettivo dell'estratto di *Hericium erinaceus*, uno degli estratti fungini più caratterizzati, con particolare attenzione al ruolo sul sistema nervoso.

## LISTA DELLE ABBREVIAZIONI

AD Alzheimer disease

AF Aflatoxins

AFB1 Aflatoxin B-1

AhR Acrylic Hydrocarbons receptor

BW Body Weight

BPA Bisphenol A

CAT Catalase

Cd Cadmium

CARP Carboplatin

CDDP Cisplatin

CEC contaminants of emergency concerns

CISS Centro di Ittiopatologia Sperimentale della Sicilia

Cr Chrome

CTRL Control

DLC Dioxin-like compound

DNA Deoxyribonucleic acid

dpf Days post fertilization

DON Deoxynivalenol

EDC Endocrine disrupting chemicals

EM Electron microscopy

EPA Environmental protection agency

EU European Union

FAO Food and Agricultural Organization

EFSA European Food Safety Authority

FDA Food and Drugs Administration

FET Fish embryo toxicity test

GLP Good laboratory practice

GSH Glutathione

GST Glucose S Transferase

H&E Haematoxylin-eosin

hpf Hours post fertilization

HIV Human immunodeficiency virus

IF Immune fluorescence

ISPRA Istituto Superiore per la Protezione e la Ricerca Ambientale

Kow Partition coefficient

LC50 Lethal concentration 50

LOEC Low concentration effect observed

MCA Multi channel analyzer

MDA Malondialdehyde

MMLV Moloney Murine Leukemia Virus

MS-222 Tricaine methanesulfonate

MSX Multinucleate Sphere unknown X

MT Masson's trichrome

NIEHS National Institute of Environmental Health Sciences

NOEC No observed effect concentration

OMS Organizzazione Mondiale della Sanità

OXA Oxalipatin

PBS Phosphate-buffered saline

PCBs Polychlorinated biphenyls

PCR Polymerase chain reaction

PD Pancreas disease

PhACs Pharmaceuticals active compounds

POC Organochlorine Pesticide

POP Persistent organic pollutants

REACH Registration, Evaluation, Authorization and restriction of Chemicals

ROS Reactive oxygen species

rRNA Ribosomal ribonucleic acid

RT Room temperature

RT-PCR Real Time Polymerase chain reaction

SC Small cell

SDV Sleeping disease virus

SEM Scanning electron microscopy

SOD Superoxidedismutase

SPF Specific pathogen free

SRP Superfund Research Program

ssRNA Single-stranded ribonucleic acid

TBI Traumatic brain injury

TCBS Thiosulfate citrate bile salts sucrose

TCDD 2,3,7,8- tetrachlorodibenzo-p-dioxin

TUNEL terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling

TW Total weight

UNEP United Nations Environment Programme

VA Veterans affairs

W-E Longitudinal gradient

WHO World Health Organization

WWTP waste water treatment plans

WT Wild Type

Zfet Zebrafish embryo toxicity test



# CAPITOLO 1. Introduzione

## 1.1. Contaminanti ambientali

L'inquinamento ambientale è una delle principali sfide della società umana moderna. A seguito dello sviluppo intensivo dell'industria chimica, farmaceutica e agricola, molti composti chimici come pesticidi, ormoni steroidei, antibiotici o coloranti raggiungono l'ambiente acquatico [1]. Sia la catena trofica terrestre che quella dell'ambiente acquatico sono in grado di accumulare alcuni contaminanti ambientali fino a raggiungere concentrazioni tossiche. In particolare ciò si verifica frequentemente all'interno degli ambienti acquatici, poiché risulta molto difficile avere esatta contezza e conseguentemente controllo sull'ingresso dei contaminanti in questa catena rispetto a quella terrestre.

In generale, perché un contaminante possa bioaccumularsi all'interno di un ambiente acquatico sono necessarie almeno tre proprietà speciali: 1) un elevato coefficiente di ripartizione ottanolo-acqua, 2) stabilità chimica nell'acqua e metabolica all'interno degli organismi della catena trofica e 3) una bassa tossicità per gli organismi appartenenti alla catena trofica, in modo che questa non venga interrotta dalla perdita di una specie intermedia[2]. Poche delle migliaia di sostanze chimiche prodotte dall'industria umana soddisfano questi requisiti. Per quanto riguarda le sostanze chimiche di natura organica e, gli esempi più noti di bioaccumulo nelle catene trofiche degli ambienti acquatici sono i policlorobifenili (PCB), le diossine e i pesticidi organoclorurati (POC) come il diclorodifeniltricloroetano (DDT)[3].

## 1.2. Policlorobifenili

I PCB, o policlorobifenili, sono sostanze chimiche organiche tossiche prodotte dall'uomo che hanno effetti pericolosi sia sull'ambiente che sulla salute umana. I PCB persistono nell'ambiente per lunghi periodi e possono percorrere grandi distanze passando attraverso l'aria, l'acqua e persino trasportare dalle specie migratorie. Si accumulano nel tessuto adiposo e si bio-magnificano nei livelli più alti della catena trofica, dove possono costituire un pericolo importante per i predatori principali, come tonni, foche, orsi polari ed anche l'uomo[4]. I PCB sono stati prodotti in grandi quantità tra gli anni Trenta e gli anni Ottanta. Sono stati utilizzati in apparecchiature come trasformatori e condensatori (tipicamente come parte dei sistemi di trasmissione dell'energia elettrica), e in applicazioni come vernici, nell'edilizia, impianti e macchinari. Sebbene la produzione di PCB non sia più consentita, essi rimangono un'eredità tossica per l'ambiente e la nostra salute. Si tratta di un problema globale: è probabile che ogni persona nel mondo abbia una quantità di PCB all'interno del proprio corpo[5]. Ad oggi, sono stati eliminati solo 3 milioni di tonnellate di apparecchiature e materiali contenenti PCB. Nel mondo, 14 milioni di tonnellate, pari all'83% della produzione totale, devono ancora essere smaltite [PCB eliminati (17%) PCB da eliminare (83%) - United Nations Environment Programme (UNEP)].

### 1.3. Diossine

Le diossine sono principalmente sottoprodotti di pratiche industriali, vengono prodotte attraverso una serie di processi di combustione, tra cui anche l'incenerimento improprio dei rifiuti urbani e la combustione della spazzatura, e possono essere rilasciate nell'aria durante processi naturali, come gli incendi boschivi e l'attività vulcanica. Quasi ogni essere vivente è stato esposto alle diossine o ai composti diossina-simili (DLC). I rigorosi controlli normativi sulle principali fonti industriali di diossina hanno ridotto le emissioni nell'aria del 90%, rispetto ai livelli del 1987[6].

Oggi le persone sono esposte alle diossine principalmente attraverso il consumo di alimenti, in particolare prodotti animali, contaminati da queste sostanze chimiche. Le diossine vengono assorbite e immagazzinate nel tessuto adiposo e quindi, si accumulano lungo la catena alimentare. Oltre il 90% dell'esposizione umana avviene attraverso gli alimenti. Prima dell'introduzione di misure e regolamenti, le emissioni di diossine costituivano un grave problema negli Stati Uniti. L'EPA ha collaborato con il settore industriale per vietare i prodotti contenenti diossina e per ridurre le emissioni di diossina. Nel 1979, l'EPA ha vietato la fabbricazione di prodotti contenenti policlorobifenili (PCB), alcuni dei quali sono inclusi nel termine diossina[7].

Sfortunatamente, le diossine si decompongono molto lentamente e le emissioni rilasciate in precedenza rimangono nell'ambiente per diverso tempo. Alcune diossine permangono molto a lungo, sono estremamente resistenti alla degradazione ambientale e sono quindi classificate come inquinanti organici persistenti (POP)[8]. La contaminazione da diossine è un problema crescente in alcuni paesi in via di sviluppo, in particolare a causa della combustione incontrollata e dello smantellamento e riciclo di prodotti elettronici, come ad esempio i computer. Il termine singolare diossina si riferisce al composto più tossico esaminato ovvero la 2,3,7,8-tetraclorodibenzo-p-diossina, (TCDD), o Mutagena: Talking Glossary of

Genetic Terms[9] .L'esposizione alla diossina è stata collegata a una serie di altre malattie, tra cui il diabete di tipo 2, la cardiopatia ischemica e una malattia della pelle simile all'acne chiamata cloracne, costituisce un segno distintivo dell'esposizione alla diossina. Le diossine possono causare problemi nello sviluppo nei bambini, causare problemi riproduttivi e di infertilità negli adulti, provocare aborti spontanei, danneggiare il sistema immunitario e interferire con l'equilibrio ormonale[10].

L'esposizione alle diossine ha effetti diffusi in quasi tutte le specie di vertebrati, in quasi tutti gli stadi dello sviluppo, anche all'interno nel grembo materno. Le diossine sono una famiglia di composti che condividono strutture e caratteristiche chimiche distinte e inoltre sono stati identificati numerosi composti simili alle diossine che sono considerati altamente nocivi e possono causare tossicità e malattie.[11] I ricercatori del NIEHS continuano a esplorare il percorso chimico dettagliato attraverso il quale le diossine danneggiano l'organismo, ma gli scienziati sono ora certi che il primo passo avvenga quando la diossina si lega a una proteina intracellulare nota come recettore degli idrocarburi arilici (AhR). Quando ciò accade, l'AhR può alterare l'espressione, o la funzione, di alcuni geni. Lo squilibrio cellulare che ne deriva porta a un'alterazione della normale funzione cellulare e, in ultima analisi, a effetti negativi sulla salute. Oltre alla TCDD, molte altre sostanze chimiche si legano all'AhR. Circa 400 composti presenti nell'ambiente agiscono sul corpo umano attraverso il recettore AhR. I funzionari della sanità pubblica di tutto il mondo sono preoccupati per gli effetti combinati di più sostanze chimiche che attivano l'AhR e stanno sviluppando standard sanitari che tengano conto del fatto che le persone sono esposte a miscele di DLC, non solo a una alla volta.[12]

Le minacce alla salute pubblica poste dalle diossine sono state evidenziate in modo drammatico nella coscienza pubblica alla fine degli anni '70 e all'inizio degli anni '80. I giornali e le trasmissioni televisive erano ricolmi di storie di veterani malati che erano stati esposti alle diossine attraverso l'Agente Orange, un erbicida e defoliante usato durante la guerra del Vietnam. Le preoccupazioni per l'Agente Orange e altri DLC continuano ancora oggi. La

ricerca sostenuta dal NIEHS e da molti altri, che esamina il legame tra la diossina e gravi malattie, ha contribuito a portare il Dipartimento degli Affari dei Veterani degli Stati Uniti (VA) a riconoscere alcuni tumori e altre problematiche a carico della salute come malattie presuntive associate all'esposizione all'Agente Orange o ad altri erbicidi durante il servizio militare. Le diossine sono state portate alla luce anche nel 1982, quando la città di Times Beach, in Missouri, è stata dichiarata off-limits a causa della contaminazione da diossina[13]. Questo incidente nel Missouri, così come altri, ha contribuito a far approvare la legislazione che ha creato "Superfund", il programma ambientale istituito per affrontare i siti di rifiuti pericolosi abbandonati. Oltre a finanziare il lavoro nei laboratori di tutta la nazione, il NIEHS amministra il Superfund Research Program (SRP)[14]. L'SRP comprende una rete di borse di studio universitarie, progettate per cercare soluzioni ai complessi problemi sanitari e ambientali associati ai siti di rifiuti pericolosi della nazione. La ricerca condotta dall'SRP è uno sforzo coordinato con l'EPA, l'ente federale incaricato di bonificare i peggiori siti di rifiuti pericolosi del Paese, compresi quelli contaminati da diossine. Oggi, i pericoli posti dalle diossine sono scomparsi dall'opinione pubblica. In effetti, la portata del pericolo è diminuita negli Stati Uniti, poiché i controlli ambientali hanno ridotto in modo significativo l'introduzione di nuove fonti industriali di diossina. Tuttavia, il problema non è scomparso e la comunità scientifica ha continuato a lavorare per ridurre le esposizioni e curare le malattie che ne derivano.

#### 1.4. Pesticidi Organoclorurati

Gli organoclorurati sono un gruppo di composti organici a struttura chimica notevolmente diversificata che hanno in comune uno o più atomi di cloro nella molecola. Sono notevolmente stabili nell'ambiente e caratterizzati da bassissima degradabilità. L'emivita degli organoclorurati nel terreno infatti è estremamente lunga (anche oltre 10 anni) e tali prodotti vengono facilmente assorbiti dalle radici delle piante anche anni dopo l'ultima esposizione. Anche piccole quantità di queste sostanze disciolte nelle acque negli anni si concentrano nelle piante acquatiche, nel plancton e nei pesci, con il risultato di trovare alte concentrazioni di POC nei pesci e negli uccelli piscivori che vivono nelle aree contaminate[15, 16].

Queste molecole sono estremamente efficaci come insetticidi e pesticidi (poiché vengono assorbite attraverso la cuticola chitinoso degli insetti), ma il loro effetto duraturo si ripercuote poi a livello ambientale. Molti organoclorurati sono noti, o sospettati, anche di avere effetti cancerogeni nell'uomo e negli animali. Essendo composti organici si diluiscono bene nei solventi organici ed hanno una notevole affinità per i lipidi nei quali si possono accumulare. A causa dei residui riscontrati a livello tissutale di mammiferi e della loro capacità di indurre fenomeni di tossicità cronica, l'uso di questi agenti è stato drasticamente ridotto[17]. In Europa sono oggi permessi solo pochi organoclorurati poiché caratterizzati da bassa persistenza ambientale. Gli organoclorurati dopo assorbimento si legano ad una frazione lipoproteica del siero e la loro concentrazione, soprattutto a seguito di assunzioni protratte, arriva ad un plateau più o meno elevato che rappresenta una situazione di equilibrio dinamico condizionato dalle caratteristiche di metabolizzazione e di escrezione di ciascuna sostanza. In fase di distribuzione nell'organismo, queste sostanze, fortemente liposolubili, sono destinate a produrre fenomeni di accumulo nei tessuti a maggiore disponibilità lipidica (tessuto adiposo, tessuto nervoso, tessuto epatico) ed esercitano la loro azione tossica principalmente come stimolanti del sistema nervoso. Inoltre negli uccelli, soprattutto rapaci o con alimentazioni a base di pesce, tali tossici si sono dimostrati in grado di causare un notevole declino delle popolazioni, da una parte per

la loro azione tossica acuta, ma anche e soprattutto per i loro effetti negativi sulla fertilità. Infatti è stato osservato che alcuni organoclorurati hanno un'azione estrogenica (o anche anti-estrogenica) e sono in grado di alterare i cicli riproduttivi degli uccelli. Inoltre è anche dimostrato che tali sostanze possano provocare l'assottigliamento dello spessore del guscio, con la conseguente rottura dell'uovo durante la cova

## 1.5. Metalli pesanti

La rapida industrializzazione e l'urbanizzazione hanno causato la contaminazione dell'ambiente da parte dei metalli pesanti e i loro tassi di mobilitazione e trasporto nell'ambiente sono notevolmente accelerati dagli anni '40 [18, 19]. Le loro fonti naturali nell'ambiente includono l'erosione delle rocce contenenti metalli e le eruzioni vulcaniche, mentre le principali fonti antropiche includono le emissioni industriali, l'estrazione mineraria, la fusione e le attività agricole come l'applicazione di pesticidi e fertilizzanti fosfatici. Anche la combustione di combustibili fossili contribuisce al rilascio di metalli pesanti come il cadmio (Cd) nell'ambiente [20]. I metalli pesanti sono persistenti nell'ambiente, contaminano le catene trofiche e causano diversi problemi di salute a causa dei loro effetti nocivi. L'esposizione cronica ai metalli pesanti nell'ambiente è una minaccia reale per gli organismi viventi [21]. Le concentrazioni di metalli superiori ai livelli soglia influenzano l'equilibrio microbiologico dei suoli e possono ridurre la fertilità [22].

Il bioaccumulo di metalli pesanti tossici nel biota degli ecosistemi fluviali può avere effetti negativi sugli animali e sull'uomo [23]. Livelli più elevati di metalli pesanti nel biota possono avere effetti negativi sulla salute ecologica delle specie animali acquatiche e contribuire al declino delle loro popolazioni [24]. I metalli pesanti sono forti neurotossine nelle specie ittiche e l'interazione dei metalli pesanti con gli stimoli chimici nei pesci può interrompere la comunicazione dei pesci con il loro ambiente [25]. I metalli pesanti sono stati trovati associati a deformazioni dei pesci sia in ambiente naturale che in laboratorio. In generale, tali deformità hanno effetti negativi sulle popolazioni ittiche, poiché influiscono sulla sopravvivenza, sui tassi di crescita, sul benessere e sulla loro morfologia. Queste malformazioni nei pesci possono servire come eccellenti biomarcatori dell'inquinamento ambientale da metalli pesanti [26]. Hartl [27] osserva che "i metalli, di origine naturale o antropica, sono onnipresenti nell'ambiente acquatico e quindi la comprensione del loro comportamento e della loro



interazione con gli organismi acquatici, in particolare con i pesci, una delle principali fonti di proteine per il consumo umano, è di grande importanza socioeconomica". La loro persistenza e il loro bioaccumulo possono causare effetti negativi sullo sviluppo, la crescita e la riproduzione di vari organismi acquatici [25, 26]. Valori totali di mercurio riscontrati per le specie appartenenti al mar Mediterraneo, si sono rivelati più alti di quelli che si trovano nell'Oceano Atlantico. Oltre al mercurio, nella flora, nella fauna e nei sedimenti, le concentrazioni di metalli pesanti sono generalmente basse. Si Crede che questi livelli di mercurio più elevati siano il risultato Il fatto che l'area sia nella fascia mercurifera Mediterraneo - Himalayana. All'inizio degli anni '70 studi condotti evidenziarono concentrazioni di mercurio molto elevate in alcune zone costiere, in prossimità di porti e aree industriali. Il risultato di una drastica riduzione delle emissioni di mercurio dagli impianti cloro-alcalini verso la fine degli anni '70 ha portato diversi miglioramenti (Hg ha un'emivita da 2 a 5 anni) per la flora e la fauna e per la riduzione di questi contaminanti nei sedimenti (6-33 anni)[28].

## 1.6. Farmaci

La presenza di composti farmaceutici attivi (PhACs) nell'ambiente, come gli antibiotici, gli analgesici e psicofarmaci, è considerata una grave minaccia per la qualità delle acque [29-33]. In qualità di contaminanti di interesse emergente (CEC), i PhACs hanno suscitato l'interesse della comunità scientifica di tutto il mondo negli ultimi due decenni. Sebbene non esistano quasi regolamenti in vigore che trattino lo scarico di questo tipo di microinquinanti nell'ambiente, sono in corso alcuni sforzi nel tentativo di stabilire nuove politiche in merito alla presenza di queste sostanze nell' ambiente.

Questa crescente consapevolezza sta contribuendo a creare un quadro per controllare il rilascio di questi composti. Una valutazione critica del destino e degli effetti ambientali del destino e gli effetti dei PhAC sull'ambiente contribuirà alla futura applicazione dei regolamenti e fornirà una serie di migliori pratiche di gestione relative alla qualità dell'acqua. Unione Europea, con la Direttiva 2008/105/CE e la decisione (UE) 2015/495 del 20 marzo 2015, ha recentemente istituito una lista di controllo di sostanze da monitorare in tutta l'Unione; Essa stabilisce che le sostanze che risultano presentare un rischio significativo debbano essere considerate per l'inclusione in un elenco di sostanze prioritarie [34].

Nella lista di controllo è possibile trovare alcuni antibiotici macrolidi come l'eritromicina o l'analgesico diclofenac. L'ultima versione della lista di controllo contiene tre sostanze già presenti dal 2018 (l'insetticida metaflumizone e gli antibiotici amoxicillina e ciprofloxacina) e presenta diverse sostanze aggiunte nel 2020, tra cui: L'antibiotico sulfametossazolo e l'antibiotico diaminopirimidina trimetoprim; l'antidepressivo venlafaxina e il suo metabolita O-desmetilvenlafaxina; un gruppo di tre farmaci azolici (clotrimazolo, fluconazolo e miconazolo); e sette pesticidi azolici (imazalil, ipconazolo, metconazolo, penconazolo, procloraz, tebuconazolo, tetraconazolo) e i fungicidi famoxadone e dimossistrobina. Basata sul meccanismo introdotto dalla Direttiva 2013/39/UE, la watch list mira a valutare meglio i rischi derivanti dalle sostanze chimiche presenti nelle acque di

superficie. Gli Stati membri devono monitorare queste sostanze almeno una volta all'anno per un massimo di quattro anni.

La proposta della Commissione per l'aggiornamento del 2020 si basa sul lavoro svolto dal Centro comune di ricerca. I farmaci, i loro metaboliti e i prodotti di trasformazione vengono rilasciati nell'ambiente durante il loro ciclo di vita. Dopo che i farmaci sono stati somministrati o consumati, vengono espulsi come una miscela di composti madre e di loro metaboliti (sia biologicamente attivi che inattivi). La gestione e lo smaltimento inappropriato dei farmaci nello scenario domestico è un'altra fonte di inquinamento rilevante [35]: Quando i farmaci non vengono correttamente smaltiti e /o vengono scaricati indiscriminatamente nelle reti domestiche, dalle acque reflue vengono poi trasportati attraverso il sistema fognario e raggiungono gli impianti di trattamento delle acque reflue. A seconda delle caratteristiche del farmaco, il trattamento regolare potrebbe non riuscire a rimuoverlo completamente e vengono quindi scaricati nelle acque superficiali riceventi. I composti possono entrare anche nei sistemi terrestri attraverso gli effluenti fognari e/o i fanghi, quando vengono utilizzati per l'irrigazione o come fertilizzanti per le colture agricole [36].

Il cancro è una delle malattie più diffuse nei Paesi occidentali e molte risorse sono destinate a studiarne il trattamento e, in ultima analisi, la cura. Nonostante i trattamenti chemioterapici siano stati migliorati negli ultimi decenni e siano ora più efficaci e specifici per il paziente, il cancro è ancora una delle malattie più letali al mondo. L'Organizzazione Mondiale della Sanità (OMS) ha pubblicato un rapporto sulla salute mondiale in cui il cancro è la seconda causa di morte (21%) dopo le malattie cardiovascolari (48%) e le malattie respiratorie (12%) nel settore delle malattie non trasmissibili; ([www.who.int](http://www.who.int)).

L'American Cancer Society ha previsto un totale di 1.638.910 di nuovi casi e 577.190 decessi negli Stati Uniti d'America nel 2012, mentre la mortalità annuale per cancro è prevista in diminuzione solo dell'1% [37].

L'enorme aumento delle malattie oncologiche nella popolazione ha portato a un aumento del consumo di farmaci e si può prevedere uno scarico ancora più elevato di questo tipo di sostanze nell'ambiente nei prossimi anni. Nonostante i trattamenti chemioterapici siano somministrati principalmente presso le strutture ospedaliere, è abbastanza comune che i pazienti lascino l'ospedale poche ore dopo aver ricevuto il trattamento. Inoltre, ci sono tipi di cancro come quello alla prostata i cui trattamenti vengono somministrati in strutture ambulatoriali o addirittura a domicilio. Ciò significa che i farmaci antitumorali, i loro metaboliti e i composti correlati (biomarcatori, ecc.) vengono eliminati attraverso le acque reflue di impianti ospedalieri e/o domestici, essendo il destinatario immediato il sistema fognario urbano.

È necessario sottolineare che è stato dimostrato che i farmaci antitumorali hanno potenti effetti citotossici, genotossici, mutageni, cancerogeni, interferenti endocrini e/o teratogeni in diversi organismi, dal momento che sono stati progettati principalmente per interrompere o impedire la proliferazione cellulare, di solito interferendo con la sintesi del DNA. Da questo punto di vista, è importante evidenziare anche la rilevanza dei metaboliti, in quanto spesso hanno un'attività pari o addirittura superiore a quella del composto progenitore. È il caso del principale metabolita del farmaco antitumorale tamoxifene, l'idrossi-tamoxifene, il cui potenziale estrogenico è addirittura superiore a quello osservato per il farmaco stesso [38]. Anche le strutture veterinarie dovrebbero essere considerate come una fonte rilevante di farmaci antitumorali, dal momento che la maggior parte di questi farmaci è utilizzata anche in ambito veterinario, soprattutto per il trattamento del cancro nei cani e nei gatti [39].

La presenza di questi farmaci negli ecosistemi acquatici e i loro effetti sugli organismi in essi presenti, sono stati scarsamente caratterizzati. Sebbene la disponibilità di dati sia piuttosto limitata, le concentrazioni della maggior parte dei farmaci antitumorali variano da < 2 ng/L a 762 µg/L nelle acque riceventi, mentre i livelli nei sedimenti e nei fanghi variano da 0,25 a 42,5 µg/kg [40, 41]. Come già accennato, i farmaci antitumorali sono, in generale,

considerati come composti molto pericolosi, poiché sono progettati per uccidere o provocare gravi danni alle cellule. Questi processi possono provocare, come effetti collaterali, disturbi acuti e alterazioni delle normali funzioni fisiologiche degli organismi esposti (sistema endocrino, sistema immunologico, ecc.).

D'altra parte, gli studi ecotossicologici condotti con sostanze citotossiche come il 5-fluorouracile, hanno rivelato che la più bassa concentrazione osservata (LOEC) in test su alghe e batteri è stata di circa  $10 \mu\text{g L}^{-1}$ , vicina alla concentrazione riscontrata in diversi scarichi fognari [42]. In un altro esempio, la LOEC ottenuta per il tamoxifene nei pesci d'acqua dolce è stata di  $5,6 \mu\text{g L}^{-1}$  [43]. Questa concentrazione è solo una volta superiore a quella che si trova oggi nelle acque reflue (circa  $0,2 \mu\text{g L}^{-1}$ ) [44, 45]. Studi recenti hanno rivelato anche che le miscele di farmaci antitumorali in campioni reali hanno un effetto tossico importante, persino superiore a quello atteso dalla somma della tossicità dei singoli farmaci [46]. Pertanto, la potenziale sinergia non dovrebbe essere trascurata quando si parla di tossicità dei "cocktail" di farmaci in acqua. Sulla base di una valutazione della distribuzione della sensibilità delle specie di 9 composti, i crostacei sono i più sensibili ai farmaci antitumorali.

Il composto più pericoloso è il cisplatino, con una concentrazione di rischio al 5° percentile. Per la *Daphnia magna*, le tossicità acute delle principali classi di farmaci antitumorali sono classificate come complessi di platino > agenti terapeutici endocrini > antibiotici > agenti antimetaboliti > agenti alchilanti. Utilizzando l'analisi del quoziente di pericolosità basata principalmente sulla concentrazione minima di effetto osservata (LOEC), la ciclofosfamide, il cisplatino, il 5-fluorouracile, l'imatinib mesilato, la bicalutamide, l'etoposide e il paclitaxel presentano il rischio più elevato a carico degli organismi acquatici. Sono necessarie ulteriori ricerche per identificare endpoint cronici appropriati per le soglie di valutazione del rischio e per comprendere meglio i meccanismi d'azione, la potenziale tossicità multigenerazionale e il trasferimento trofico negli ecosistemi[47].

## 1.7. Micotossine

Le micotossine sono metaboliti secondari, solitamente nocivi, prodotti da vari funghi e noti per infettare alimenti e mangimi in tutto il mondo [48]. Le micotossine si formano sui residui vegetali che rimangono nei campi o direttamente sulle colture in crescita, e i composti si accumulano durante il raccolto e la successiva conservazione [49]. Quando le colture sono contaminate, si può verificare la cosiddetta micotossicosi, che provoca gravi effetti sulla salute dei vertebrati [50]. Il termine micotossina è stato introdotto per la prima volta nel 1962 in occasione di una crisi veterinaria in Inghilterra, a seguito della quale circa 100.000 pulcini di tacchino morirono a causa di mangimi contaminati con la micotossina Deossinivalenolo (DON) [51]; [48]). Tuttavia, esiste anche un rischio elevato per gli esseri umani, poiché le micotossine possono entrare nella catena alimentare attraverso il consumo diretto di colture infestate o indirettamente attraverso i mangimi contaminati del bestiame [50]. Inoltre, i dati esistenti indicano un legame tra le micotossine e l'insorgenza di carcinomi epatocellulari [52].

È stato mostrato che in Cina e nell'Africa sub-sahariana circa 250.000 persone muoiono ogni anno di carcinoma epatocellulare a causa dell'esposizione quotidiana a micotossine in una quantità di circa 1,4 µg giorno<sup>-1</sup> [53]. Le potenziali contaminazioni si verificano durante la stagione di crescita o dopo il raccolto, con conseguenti perdite annuali di resa e di qualità e pertanto rimane un problema scientifico attuale [50, 54].

L'Organizzazione delle Nazioni Unite per l'alimentazione e l'agricoltura (FAO) stima che fino al 25% delle colture alimentari mondiali vengono contaminate da micotossine ogni anno. Tuttavia, è stato segnalato sempre più spesso che molto più del 25% delle piante può essere infestato da micotossine: Schatzmayr e colleghi [55] hanno documentato un'infestazione di circa il 72% nei mangimi, e Kovalsky et al. [56] ed Eskola et al.[57] hanno addirittura sospettato un'infestazione che colpisce i prodotti alimentari pari o superiore al 79% dei prodotti totali. Di conseguenza, le perdite di alimenti e mangimi già stimate dovute esclusivamente al

mais contaminato da aflatossine (AF) sono state calcolate tra i 52,1 milioni e gli 1,68 miliardi di dollari all'anno solo negli Stati Uniti [58].

L'aumento delle temperature, soprattutto in primavera e in inverno nei climi temperati, può favorire l'infestazione fungina e quindi aumentare il carico di micotossine per le colture agricole [59-61]. L'acquacoltura è un aspetto fondamentale del settore alimentare mondiale e fornisce circa la metà di tutti i prodotti ittici destinati al consumo umano. L'uso di proteine di origine vegetale al posto delle farine di pesce nelle formulazioni dei mangimi commerciali ha acquisito un favore generale negli ultimi anni [62]. Tuttavia la crescente dipendenza da ingredienti di origine vegetale ha aumentato il rischio di introduzione di micotossine nei mangimi durante la produzione e lo stoccaggio [63].

Le micotossine rappresentano un rischio crescente per l'acquacoltura e l'aflatossina, una di queste micotossine, rappresenta il rischio maggiore per i pesci allevati. I mangimi contaminati da aflatossina B<sub>1</sub> - (AFB<sub>1</sub>) hanno effetti dannosi immediati sulla salute dei pesci d'allevamento, ma solleva anche la possibilità di trasmissione degli inquinanti ai consumatori lungo la catena alimentare [64]. Le aflatossine, metaboliti secondari delle muffe *Aspergillus flavus*, *Aspergillus parasiticus* e, in misura minore, *Aspergillus nomius*, sono una classe di composti legati alla piranocumarina [65].

Diversi studi hanno rivelato che la contaminazione da *Aspergillus* e AFB<sub>1</sub> nei mangimi per pesci è diffusa in tutto il mondo. *Aspergillus* è la specie più comune che può essere isolata da mangimi per pesci in Sud America da mangimi per pesci in Sud America, dal 60 al 70% circa, mentre l'AFB<sub>1</sub> viene rilevato nel 55% dei mangimi per pesci completi [66]. Negli Stati Uniti e in Canada, le perdite dovute all'ingestione di mangimi contaminati da micotossine sono elevate, circa 5 miliardi di dollari di animali. In Asia e Africa, i livelli medi di AFB<sub>1</sub> riscontrati erano elevati rispetto, ad esempio, all'Europa, dove i livelli erano trascurabili (0,43 µg/kg). In tutto il mondo, le aflatossine (AF) rappresentano un problema importante per la sicurezza degli alimenti e dei mangimi. Tutte le specie di vertebrati studiate sono sensibili alle AF.

Le principali specie di funghi aflatossigeni identificate sono *Aspergillus flavus*, *Aspergillus parasiticus* e *Aspergillus nomius*. I funghi aflatossigeni producono varie tipologie di sostanze chimiche appartenenti alle AF (AFB1, AFB2, AFG1 e AFG2) e altre micotossine. La crescita di *Aspergillus* in pre-raccolta e la contaminazione delle colture con AF possono essere endemiche in alcune aree. In genere essa è legata a condizioni di coltivazione avverse, danni da parassiti e grandine e crescita fungina durante il trasporto e lo stoccaggio. La distribuzione delle AF negli alimenti e nei mangimi trasportati o immagazzinati può essere molto eterogenea. Sebbene sia regolamentata dalla maggior parte dei governi, gli animali e gli esseri umani possono subire un'esposizione orale non protetta agli AF.

Il metabolita AFB1-epossido forma addotti nel DNA, nell'RNA e nelle proteine. L'AFB1 è il più potente cancerogeno naturale che colpisce il fegato. Inoltre, gli AF sono epatotossici, immunotossici e causano effetti avversi sulla riproduzione. I metaboliti tossici delle AF sono escreti nel latte, compreso quello materno, e possono essere presenti in altri prodotti animali commestibili. Sono stati dimostrati gli effetti negativi interattivi delle AF con le malattie infettive. È improbabile che si verifichino esposizioni sul campo di esseri umani e animali alle AF senza che anche altre micotossine siano presenti rispettivamente negli alimenti o nei mangimi. Altre micotossine possono aumentare la tossicità delle AF.



## CAPITOLO 2. Obiettivi della tesi

L'obiettivo principale di questa tesi è stato quello di valutare l'impatto tossico di alcuni contaminanti, la cui presenza è stata ampiamente documentata nell'ambiente acquatico, utilizzando lo zebrafish come modello di tossicità animale e tramite l'impiego di protocolli FET (Fish Embryo Toxicity test). A tal fine, questo elaborato è volto a sviluppare metodologie e strategie analitiche per la determinazione quantitativa e per l'identificazione provvisoria di effetti potenzialmente tossici di contaminanti in ambienti acquatici. Inoltre, valutare il rischio ambientale e i possibili effetti tossici di contaminanti ambientali testando ampi range di concentrazioni. In conclusione, valutare il possibile effetto sinergico di combinazioni di contaminanti differenti a dosi singolarmente inattive.

## CAPITOLO 3. Zebrafish embryo toxicity test

### 3.1 OECD e linee guida

I dati sulla tossicità acuta dei pesci fanno parte dell'insieme di dati di base richiesti nella valutazione dei pericoli e dei rischi ambientali di prodotti chimici industriali, prodotti fitosanitari, biocidi, prodotti farmaceutici e altri prodotti chimici. Di solito, la tossicità acuta dei pesci viene determinata secondo la linea guida OCSE (TG) 203 (OCSE, 1992) o linee guida equivalenti. In breve, gruppi di 7-10 pesci giovani o adulti (ad esempio, zebrafish, medaka giapponesi, pesci azzurri, trote iridee) sono esposti ad almeno cinque concentrazioni di test per 96 ore, viene calcolata la concentrazione della sostanza chimica che causa la letalità del 50% dei pesci (LC50).

La legislazione sul benessere degli animali in Europa richiede l'incorporazione dei principi delle 3R (riduzione, riciclo, riutilizzo) nei quadri normativi e sottolinea la necessità di sviluppare e convalidare metodi alternativi. La Direttiva europea 2010/63/UE sulla protezione degli animali utilizzati a fini scientifici (UE, 2010) è una normativa orizzontale e quindi applicabile a tutti i quadri normativi dell'UE compresi i test condotti per la sicurezza ambientale.

Sono state discusse le possibilità di sostituire, perfezionare o ridurre i test di tossicità acuta dei pesci nel quadro normativo è stata discussa per molti anni e sono state integrate nelle strategie di sperimentazione. Ad esempio, Il regolamento REACH (ufficialmente regolamento (CE) n. 1907/2006, è un regolamento dell'Unione europea, del 18 dicembre 2006, concernente la registrazione, la valutazione, l'autorizzazione e la restrizione delle sostanze chimiche (in inglese “Registration, Evaluation, Authorisation and restriction of Chemicals”, da cui l'acronimo REACH). prevede che i test sui vertebrati siano ridotti al minimo ed eseguiti solo come ultima risorsa (CE, 2006). Se possibile, i dati esistenti, i metodi in silico e/o in vitro dovrebbero essere utilizzati per ricavare informazioni sulla tossicità acuta per i pesci. Se ciò non è possibile, si ricorre all'uso del test limite, come descritto nel TG 203 dell'OCSE, per le

sostanze chimiche con una LC50 prevista > 100 mg/L (OECD, 1992) oppure l'approccio a soglia secondo il documento guida OECD 126 (OECD, 2010); tuttavia, entrambi si basano ancora sull'uso di pesci giovani o adulti.

Altre alternative si basano sull'uso di embrioni di pesce o linee cellulari di pesce. In particolare, gli embrioni di pesce sono considerati l'alternativa più promettente e da un punto di vista normativo, hanno già sostituito l'uso di pesci giovani/adulti per i test di tossicità acuta degli effluenti in Germania, dove dal 2005 è richiesto il "test delle uova di zebrafish" (Anon., 2005; DIN, 2003; ISO, 2007). Per tenere conto delle possibili sensibilità di specie diverse, Braunbeck et al. [67] hanno precedentemente proposto il test di tossicità sull'embrione di pesce "per diventare multispecie", cioè per adattare il protocollo per lo zebrafish ad altre specie ittiche, come ad esempio il Fathead minnow e medaka giapponese, come elencato nel TG 203 dell'OCSE. Nel 2004, l'OCSE ha incluso lo sviluppo di un nuovo TG "Tossicità dell'embrione di pesce (FET)" per i test sulle sostanze chimiche nel suo programma di linee guida per i test, con la Germania come paese capofila. La bozza del TG FET presentata nel 2006 proponeva l'uso di tre specie zebrafish (*Danio rerio*), pesci rossi (*Pimephales promelas*) e medaka giapponesi (*Oryzias latias*). La bozza di TG specificava 10 embrioni per concentrazione di test, una durata di esposizione di 48 ore e la registrazione dei seguenti endpoint come indicatori di letalità: (a) coagulazione dell'embrione; (b) assenza di formazione di somiti; (c) mancato distacco del germoglio della coda dal sacco vitellino; e d) assenza di battito cardiaco (OECD, 2006a).

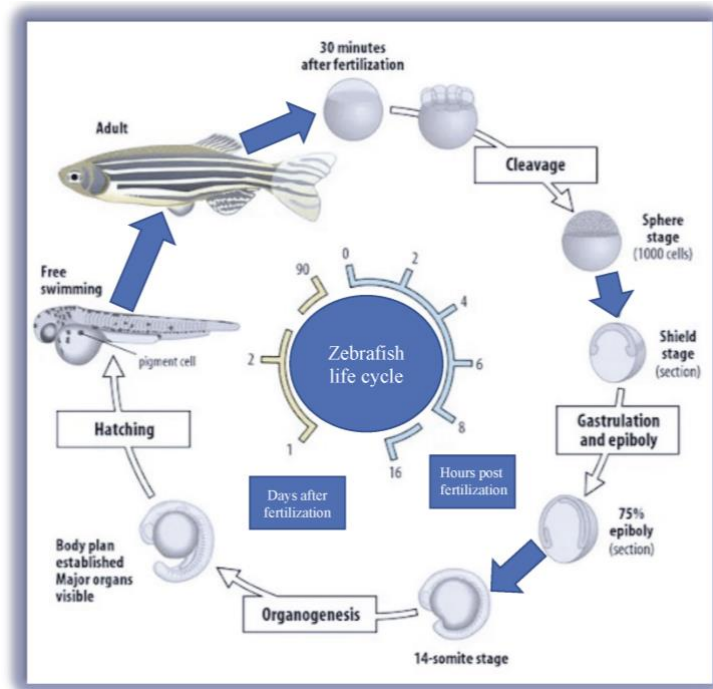
### 3.2. Zebrafish come modello di tossicità ambientale

Nel corso dell'ultimo secolo, i teleostei (pesci ossei) hanno svolto un ruolo importante nella valutazione dei rischi ambientali, compresi gli inquinanti degli ambienti acquatici. Le specie utilizzate per la valutazione della tossicità ambientale comprendono pesci piccoli come i pesci rossi, i medaka e gli zebrafish, nonché pesci di grandi dimensioni come trote, salmoni e pesci gatto.

La biologia alla base della tossicità ambientale nei teleostei è stata ampiamente studiata e ben descritta. La biologia molecolare e la genetica sono state recentemente utilizzate per delucidare i meccanismi di base della tossicità nello zebrafish e nel medaka e per prevedere gli effetti nei mammiferi. Il versatile zebrafish è ora incorporato in programmi biofarmaceutici per la delucidazione di malattie umane e per la scoperta e lo screening preclinico di farmaci. Lo zebrafish (*Danio rerio*), un membro della famiglia dei ciprinidi è originaria dell'Asia meridionale. Gli zebrafish prediligono le acque calde, ma prosperano in molti ambienti e sono stati utilizzati come organismo modello per la ricerca biologica fin dagli anni '30. L'embrione dello zebrafish infatti è stato ampiamente studiato e descritto [68] da allora ed è diventato un modello popolare modello per la biologia dello sviluppo, per la tossicologia e recentemente, per la scoperta di farmaci [69, 70] Inoltre, l'embriogenesi è stata studiata utilizzando diversi schermi genetici su larga scala [71, 72]. Il modello è ormai ben consolidato in molte aree della ricerca biologica. Gli zebrafish sono facili da allevare e poco costosi da mantenere. I pesci adulti crescono fino a 4-5 cm di lunghezza, e raggiungono la maturità sessuale in 3-4 mesi, inoltre, ogni femmina può deporre da 200 a 300 uova a settimana. Gli embrioni di zebrafish si sviluppano rapidamente; l'embriogenesi è completa cinque giorni dopo la fecondazione.

Poiché l'embrione è trasparente, strutture morfologiche e organi interni, tra cui il cervello, gli occhi, il cuore, il fegato e i reni possono essere facilmente visualizzati con la microscopia ottica, senza dover ricorrere alla chirurgia. La tossicità specifica d'organo e la tossicità complessiva dello sviluppo possono essere evinte morfologicamente o quantificate con

l'uso di coloranti. Anche l'induzione enzimatica e l'espressione genica possono essere facilmente monitorate. Inoltre, molti biomarcatori intracellulari, come il glutatione, le specie reattive dell'ossigeno e la formazione di adduttori proteici e del DNA, possono essere studiati nell'intero animale.



Grazie alle sue ridotte dimensioni, un singolo embrione può essere mantenuto in volumi di fluido di appena 100  $\mu$ l per i primi sei giorni di sviluppo e può essere allevato in singoli pozzetti di piastre di microtitolazione.

Gli embrioni di zebrafish sono notevolmente permeabili, piccole molecole aggiunte direttamente all'acqua si diffondono facilmente negli embrioni, semplificando la distribuzione dei farmaci e l'elaborazione dei saggi [73, 74]. Le molecole di grandi dimensioni o lipofile possono essere iniettate in centinaia di embrioni in un'ora. Poiché l'embrione si sviluppa rapidamente, lo screening dei composti può essere completato in pochi giorni. Queste caratteristiche rendono lo zebrafish un modello di vertebrato unico ad alto screening chimico, utile per la scoperta di farmaci preclinici e la valutazione tossicologica preclinica di farmaci [75].

### 3.3. Studi tossicologici su zebrafish

A partire dagli anni Cinquanta, gli zebrafish sono stati per testare la tossicità di sostanze chimiche sintetiche e prodotti naturali [76, 77]. Gli effetti tossici di alcuni metalli (ad esempio, zinco, selenio, mercurio e rame) e di alcuni solventi organici (ad esempio, fenolo, anilina e cicloesano) sono stati anche valutati su modello di zebrafish [78].

Data la praticità e il basso costo di mantenimento e la manipolazione dei zebrafish, sono stati condotti studi successivi in tutte le aree della tossicologia, al fine di comprendere gli effetti avversi delle sostanze chimiche e di prevedere i risultati nell'uomo. Negli esperimenti condotti con zebrafish, la letalità e la malformazione (durante lo sviluppo embrionale) sono state usate come sviluppo embrionale) sono state utilizzate come parametri generali per la valutazione della tossicità. Questi studi hanno dimostrato che gli zebrafish presentano una buona reattività alle dosi di tossicità. Inoltre, l'embrione di zebrafish potrebbe avere un valore predittivo simile a quello dei test di teratogenicità e tossicità nei mammiferi [79, 80].

Tuttavia, poiché sono stati testati pochi composti e non sono stati valutati gli effetti su singoli tessuti e organi, sono necessari ulteriori studi per convalidare ulteriormente la correlazione tra i test di tossicità su zebrafish e mammiferi. Studi ecotossicologici vengono eseguiti per individuare, gestire e monitorare la presenza di inquinanti ambientali in acqua, suolo e rifiuti. Per monitorare direttamente la qualità dell'acqua, del suolo e delle acque reflue sono stati sviluppati test che utilizzano zebrafish [81]. Gli zebrafish sono stati utilizzati anche per valutare i rischi associati ai prodotti e ai sottoprodotti del petrolio e per valutare le condizioni di lavoro nell'industria petrolchimica e mineraria [78, 82, 83]. Inoltre, sono stati studiati su larve di zebrafish, gli effetti di: pesticidi, policlorobifenili (PCB), diossina e alcuni loro derivati [84-87]. Poiché gli zebrafish si sviluppano rapidamente, molti endpoint tossicologici possono essere valutati pochi giorni dopo la fecondazione. Secondo Schultee Nagel [88], i punti finali tossicologici a 72 hpf si dividono in due gruppi principali. Gli endpoint

di tipo I sono utilizzati per la valutazione morfologica generale dello sviluppo e comprendono dello sviluppo e comprendono la coagulazione delle uova, la gastrulazione dell'embrione, la formazione dei somiti, l'estensione della coda, la funzionalità cardiaca, il movimento spontaneo e la frequenza di schiusa.

Gli endpoint di tipo II sono più dettagliati e comprendono la quantificazione del numero di somiti, la circolazione sanguigna, sviluppo degli occhi, movimento spontaneo a 24 hpf, funzione cardiaca misurata dalla frequenza cardiaca, lo sviluppo degli otoliti, lo sviluppo dei melanociti, le malformazioni scheletriche e il ritardo nella schiusa [89]. In Europa, gli zebrafish sono ampiamente accettati come un sistema di analisi per gli studi ecotossicologici. A recenti linee guida dell'Organizzazione per la Cooperazione e lo Sviluppo Economico (OCSE; linee guida 203, 210 e 212); (OECD, 1992 a,c, 1998) raccomandano lo zebrafish per i test di tossicità acquatica. Le diverse linee guida raccomandano di utilizzare zebrafish in vari stadi, come pesci allo stadio di uovo e di sacca, pesci all'inizio della vita e pesci giovani.

Quando si testa una tossicità acuta (letalità), la linea guida 203 (Test di tossicità acuta sui pesci; OECD, 1992a) raccomanda di ottenere la concentrazione letale media (LC50) utilizzando zebrafish  $2,0 \pm 1,0$  cm di lunghezza (cioè pesci da 2 a 3 mesi di età di 2 o 3 mesi), utilizzando un tempo di incubazione di 96 ore. Linea guida 210 (Pesci, test di tossicità nelle prime fasi della vita di tossicità; OECD, 1992c) suggerisce di usare pesci nelle prime fasi di vita, da 4 hpf al 16° giorno, per i test chimici. In breve, gli embrioni 4-hpf vengono esposti a una sostanza chimica, di solito in condizioni di flusso, fino a quando tutti i pesci sono liberi di nuotare e di nutrirsi e si nutrono in modo esogeno. L'osservazione continua fino al 16° giorno. Gli effetti letali e subletali su parametri come la crescita e confrontati con i controlli. Poiché gli stadi larvali e i primi avannotti sono gli stadi più sensibili per valutare gli effetti sullo sviluppo degli xenobiotici, OECD Guideline 212 (Fish, short-term toxicity test di tossicità a breve termine sugli stadi di embrione e di avannotto; OECD, 1998) si concentra sulla tossicità dello sviluppo degli embrioni, da poco dopo la fecondazione fino a 5 giorni dopo la schiusa.

Ogni linea guida include una discussione del principio del test, una descrizione del metodo, delle procedure e dei formati. descrizione del metodo, delle procedure e dei formati per il e l'analisi dei dati. Gli embrioni di zebrafish sono stati utilizzati per valutare la tossicità dei metalli pesanti, dei pesticidi organici e dei reagenti organici [78, 89]. Il livello di non effetto osservato (NOEL) e il livello minimo di effetto osservato (LOEL) sono stati determinati dopo il trattamento con rame, mercurio, piombo, nichel, cromo, zinco e cobalto per 16 giorni, a partire da 4 hpf. Gli effetti del trattamento comprendevano ritardo nella schiusa e tossicità dello sviluppo [89]. I pesticidi organici, come l'astrazina, malathion, il carbaryl e il lindano, sono stati testati e sono stati riportati i valori di LC50 [88-91]. La LC50 di 40 reagenti a base di solventi organici sono stati valutati dopo incubazione per 48 o 96 ore [89]. Sono stati condotti anche studi di tossicità con composti policlorurati di diossina, bifenile e composti antivegetativi [92, 93].

I risultati di questi esperimenti hanno mostrato che l'embrione di zebrafish è sensibile alle tossine ambientali ed è un modello affidabile e conveniente per i test di tossicità. Inoltre, lo zebrafish può essere utilizzato per monitorare e chiarire i meccanismi tossicologici alla base dello sviluppo dell'embrione e per identificare gli organi specifici composti. [88], i punti finali tossicologici a 72 hpf rientrano in due gruppi principali. Gli endpoint di tipo I vengono utilizzati per la valutazione morfologica dello sviluppo e comprendono la coagulazione delle uova, la gastrulazione dell'embrione, la formazione dei somiti, l'estensione della coda, la funzionalità cardiaca, il movimento spontaneo e la frequenza di schiusa. Gli endpoint di tipo II sono più dettagliati e comprendono la quantificazione del numero di somiti, della circolazione sanguigna e della frequenza di schiusa.



## CAPITOLO 4. Rischio ambientale da farmaci

### 4.1. Oxaliplatino

Gli agenti antineoplastici a base di platino sono ampiamente utilizzati in chemioterapia, essi reticolano i filamenti di DNA o formano legami incrociati DNA-proteina nelle cellule tumorali [94, 95] e comprendono cisplatino (CDDP), carboplatino (CARP) e oxaliplatino (OXA). Diversi studi hanno dimostrato che l'esposizione al platino o ai suoi derivati, come il cisplatino, può provocare effetti genotossici e teratogeni durante le prime fasi dello sviluppo embrionale di zebrafish [96, 97].

L'OXA è un agente chemioterapico utilizzato per trattare il cancro del colon o del retto che si è diffuso ed ha prodotto metastasi[98]. Viene spesso utilizzato in combinazione con altri farmaci antitumorali (fluorouracile e leucovorina). La modalità d'azione antitumorale dei farmaci platino-complessi è dovuta allo sviluppo di aggregazioni di platino fra basi adiacenti del DNA, ed è classificata come "agente alchilante". L'OXA inibisce selettivamente la sintesi dell'acido desossiribonucleico (DNA), il contenuto di guanina e citosina si correla con il grado di reticolazione indotto dall'OXA. Ad alte concentrazioni del farmaco, anche la sintesi di RNA cellulare e la sintesi proteica sono sopresse [98]. L'OXA si differenzia dal cisplatino per il fatto che il diaminocicloesano sostituisce i gruppi amminici del cisplatino (dach). Dopo la somministrazione, i farmaci antitumorali vengono escreti nelle urine e nelle feci; l'OXA viene escreto principalmente attraverso i reni: dopo 48 ore, circa la metà della dose somministrata viene rilevata nelle urine, il fegato escreta tra il 2 e il 5% della dose. Nei pazienti con scarsa funzionalità renale, l'eliminazione dell'oxaliplatino è risultata ridotta [99].

Negli impianti di trattamento delle acque reflue, gli escrementi umani sono ritenuti la principale fonte di farmaci negli impianti di trattamento delle acque reflue (WWTP) [100].I farmaci antitumorali vengono eliminati solo parzialmente durante i metodi di trattamento delle acque reflue a causa delle loro caratteristiche chimiche e contaminano le acque di superficie

[101].Di recente, diversi studi hanno dimostrato la presenza di farmaci antitumorali nell'ambiente acquatico a concentrazioni di ng-g L<sup>-1</sup> [40, 41, 102]. Numerosi studi hanno evidenziato concentrazioni crescenti di elementi del gruppo del platino in varie parti dell'ecosistema idrico, cioè nelle acque potabili, sotterranee e superficiali [103].

Le principali fonti di composti di platino nell'ambiente sono le emissioni di catalitiche delle automobili e gli effluenti degli ospedali. Alti livelli di composti del platino cancerogeni, come l'oxaliplatino, che vanno da 4,7 a 145 microgrammi/litro, sono stati in uno studio condotto su campioni di acque reflue provenienti da reparti oncologici ospedalieri [41]. Il bioaccumulo dei farmaci è stato documentato sia in laboratorio [104-106] che sul campo [105, 107]. Solo Steinbach et al., 2013 [108] hanno presentato i dati sul bioaccumulo di un farmaco (verapamil) in animali acquatici (*Cyprinus carpio*) durante le prime fasi di vita. In letteratura sono presenti numerosi dati ecotossicologici sui farmaci antitumorali[47].

Purtroppo, ci sono pochi dati sull'esposizione acuta ai farmaci antitumorali come contaminanti ambientali e sui loro effetti sulla fauna acquatica., in particolare sulle forme più vulnerabili come le larve [109].

## 4.1 Materiali e metodi

OXA (Oxaliplatino SUN, 10 mL) 5 mg/mL è stato acquistato da (SUN Pharmaceutical Industries Europe B.V. Polarisavenue 87 2132 JH Hoofddorp, Olanda). La soluzione è stata diluita in terreno embrionale ottenendo tre concentrazioni che vanno da 0,5 a 0,1 a 0,001 mg/L in piastra da 24 pozzetti (Labsolute, Th. Geyer GmbH & Co. KG, Dornierstr. 4-6 D-71272 Renningen, Germania), una per ogni concentrazione e una piastra con il controllo negativo (non trattato). Per la produzione di embrioni sono stati utilizzati zebrafish maturi wild type (WT) di età pari a 6 mesi.

Gli zebrafish sono stati allevati presso il CISS (Centro di Ittiopatologia Sperimentale della Sicilia), Dipartimento di Scienze Veterinarie, Università di Messina, Italia. Il CISS è accreditato per l'uso e la produzione di modelli acquatici per la ricerca dal 2006 e tutte le procedure sono state eseguite in conformità con le norme UE/63/2010 DL. I pesci sono stati alimentati con cibo secco e vivo due volte al giorno al 3% del peso corporeo (BW). Per una riproduzione di successo, femmine e maschi maturi sono stati accoppiati con un rapporto di 2:1. Il giorno dopo, le uova sono state raccolte, sbiancate e quelle non fecondate sono state scartate.

#### 4.2. Analisi Istopatologiche

Le larve sono state raccolte e fissate in paraformaldeide tamponata al 4% per 24 ore a 4 C °per l'indagine istologica. Successivamente, sono state disidratate, risciacquate e trattate in un ordine crescente di alcool (70-100%), seguito da un lavaggio con xilene. La paraffina è stata utilizzata per incorporare i campioni, che sono stati poi posizionati su blocchi di legno. Il microtomo è stato usato per tagliare sezioni sottili di 5 µm di spessore. Per colorare i vetrini sono state utilizzate ematossilina ed eosina (H&E). Le sezioni di tessuto sono state stese accuratamente su vetrini per fissazione. Successivamente i vetrini sono stati osservati al microscopio ottico (Olympus-CX41, Olympus Italia S.r.l., Segrate, Italia).

### 4.3. Estrazione RNA totale e RT-PCR

L'RNA totale delle larve di zebrafish (10 per gruppo sperimentale di ogni esperimento) è stato omogenato e isolato in 0,50 mL di reagente TRIzol (Invitrogen, Waltham, MA, USA). L'RNA totale è stato isolato secondo le istruzioni del produttore. Il rapporto di assorbanza a 260-280 nm e i modelli di bande su un gel di agarosio all'1% in formaldeide, sono stati utilizzati per verificare la qualità dell'RNA in ogni campione. La qualità dell'RNA è stata valutata mediante elettroforesi su gel e la concentrazione è stata misurata con NanoDrop 2000 (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA, iScript RT-PCR (Bio-Rad, Hercules, CA, USA)), utilizzato per sintetizzare il cDNA first-strand secondo le raccomandazioni del produttore. La master mix per la trascrizione inversa è stata preparata aggiungendo a 1 µg di campione di RNA l'iScript RT Supermix (5 C° RT supermix con RNase H+ Moloney (25 o 100 reazioni) virus della leucemia murina (MMLV) trascrittasi inversa, inibitore della RNasi, dNTP, oligo (dT), primer casuali, tampone, MgCl<sub>2</sub> e stabilizzatori) e acqua priva di nucleasi. La miscela di reazione completa è stata incubata in un termociclatore (priming 5 minuti a 25 C°, trascrizione inversa 20 minuti a 46 C°, RT inattivazione per un minuto a 95 C°). La PCR in tempo reale è stata eseguita con un volume di 20 µL contenente 10-µL di 1 SsoFast EvaGreen Supermix (Bio-Rad, Hercules, CA, USA), 1-µL di cDNA, 7-µL di cDNA. 7 µL di acqua priva di RNasi/DNasi e 500 nM di ciascun primer. Le condizioni di PCR sono state la denaturazione iniziale a 95 C° per 15 minuti, seguita da 45 cicli di amplificazione a 95 C° per 20 s e 60 C° per 40 s. L'estensione finale a 60 C° per 60 s e la permanenza a 4 C° sono state eseguite su StepOnePlus Realtime. sono state eseguite su StepOnePlus Real-Time PCR System (Applied Biosystems, Foster City, La tecnica RT-PCR è stata adattata da uno studio precedente [110]. Ogni gene nel presente studio è stato valutato in triplicato. La sequenza dei primer utilizzati è mostrata nella tabella 1.

**Tabella 1** Primers per RT-PCR

<b>Gene</b>	<b>Primer orientation</b>	<b>Nucleotide sequence</b>
<i>b-actin</i>	forward	5'- AGAGCTATGAGCTGCCTGACG -3'
	reverse	5'- CCGCAAGATTCCATACCCA -3'
<i>casp-3</i>	forward	5'-CCGCTGCCCATCACTA-3'
	reverse	5'-ATCCTTTCACGACCATCT-3'
<i>Bax</i>	forward	5'-GGCTATTTCAACCAGGGTTCC- 3'
	reverse	5'-TGCGAATCACCAATGCTGT-3'
<i>bcl-2</i>	forward	5'- TCACTCGTTCAGACCCTCAT -3'
	reverse	5'- ACGCTTTCACGCACAT -3'

#### 4.4. Apoptosi e analisi delle immagini

La percentuale di morte cellulare è stata ottenuta valutando la fluorescenza secondo la metodologia di Zou et al.[111]. L'acritine orange, un colorante metacromatico specifico per gli acidi nucleici, interagisce con il DNA e l'RNA tramite intercalazione o attrazione elettrostatica. con il DNA e l'RNA tramite intercalazione o attrazione elettrostatica, colora le cellule necrotiche o apoptotiche molto tardive.; pertanto, la colorazione con arancio di acridina è stata utilizzata per rilevare la morte cellulare in embrioni vivi di zebrafish. Gli embrioni sono stati trasferiti in piastre da 24 pozzetti a 96 hpf e trattati con acridine orange per 30 minuti ( $7 \mu\text{g mL}^{-1}$ ), al buio a 28 C. Gli embrioni di zebrafish sono stati poi risciacquati in terreno embrionale fresco per cinque volte. in terreno embrionale fresco per cinque volte e anestetizzati prima della visualizzazione. L'intensità della fluorescenza di ciascuna larva di zebrafish è stata quantificata con il programma Image J (Versione 1.8.0, National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA).

#### 4.5. Misurazione di SOD e CAT

Le larve di ogni piastra sono state scongelate e omogeneizzate in ghiaccio con 180  $\mu$ L di soluzione fisiologica ghiacciata. Il surnatante è stato ottenuto centrifugando l'omogenato a 4000  $\mu$ g per 15 minuti a 4°C. Come già accennato, la concentrazione di SOD e CAT nel surnatante è stata determinata utilizzando kit commerciali (Nanjing Jiancheng Bioengineering Institute, Nanjing, Cina)[112-115].

#### 4.6. Analisi dei dati

Per valutare tutti i dati grezzi del foglio di calcolo è stato utilizzato Microsoft Excel. GraphPad Prism 8.3.1 (GraphPad, San Diego, CA, USA, 2020) è stato utilizzato per costruire e analizzare statisticamente i grafici. Per trovare differenze significative tra i valori medi, è stata eseguita un'analisi anova a due vie della varianza (ANOVA-SNK). I dati sono stati testati per la distribuzione normale con il test di Kolmogorov-Smirnov ( $p < 0,05$ ) e sono stati rappresentati come media errore standard della media (SEM) (valore alfa di 0,05).



## 4.7. Risultati

### 4.7.1. Tasso di sopravvivenza, schiusa e alterazioni morfologiche

La Figura 1A illustra lo sviluppo di embrioni di zebrafish esposti a OXA da 24 a 96 hpf. A 96 hpf, il gruppo trattato con 0,5 mg/L di OXA presentava molti difetti morfogenetici, tra cui curvatura spinale, edema pericardico e deformità della coda. La Figura 1B mostra la sopravvivenza cumulativa degli embrioni dopo l'esposizione all'OXA. In ordine crescente di concentrazione, il tasso di sopravvivenza è stato documentato a 24, 48, 72 e 96 hpf. I dati statistici (software GraphPad Prism8.3.1, San Diego, CA, USA, 2020) sono stati utilizzati per determinare la concentrazione letale mediana (LC50) di OXA a 96 hpf, la LC50 era di 0,5 mg/L, con una mortalità molto più elevata rispetto al gruppo di controllo.

A dosi inferiori a 0,5 mg/L, non è stata osservata una particolare diminuzione del tasso di sopravvivenza (non supera il 25% in modo significativo); ciò dimostra che le concentrazioni più basse non hanno un impatto significativo sullo sviluppo delle larve di zebrafish. Poiché la schiusa è un momento critico dell'embriogenesi di zebrafish, il tasso di schiusa è uno degli indici più importanti per determinare la tossicità di OXA sullo sviluppo di zebrafish. Secondo studi condotti, la schiusa degli embrioni inizia a 48 hpf e si è conclude a 72 hpf.

I nostri risultati hanno mostrato che il 76% del gruppo a 0,001 mg/L tutti gli embrioni si erano schiusi entro 72 hpf, mentre gruppi con concentrazioni di 0,1 mg/l e 0,5 mg/l, il tasso di schiusa era rispettivamente del 75% e del 61%. Pertanto, come mostrato nella Figura 1C, il tasso di schiusa degli embrioni è stato ridotto nelle concentrazioni più elevate di OXA (0,1-0,5 mg/l), soprattutto nel gruppo trattato con la dose più alta (0,5 mg/L). Questi dati hanno mostrato una leggera diminuzione dose-dipendente del tasso di schiusa nei gruppi di 0,1 e 0,5 mg/L rispetto al gruppo di controllo (100% di schiuse a 72 hpf).

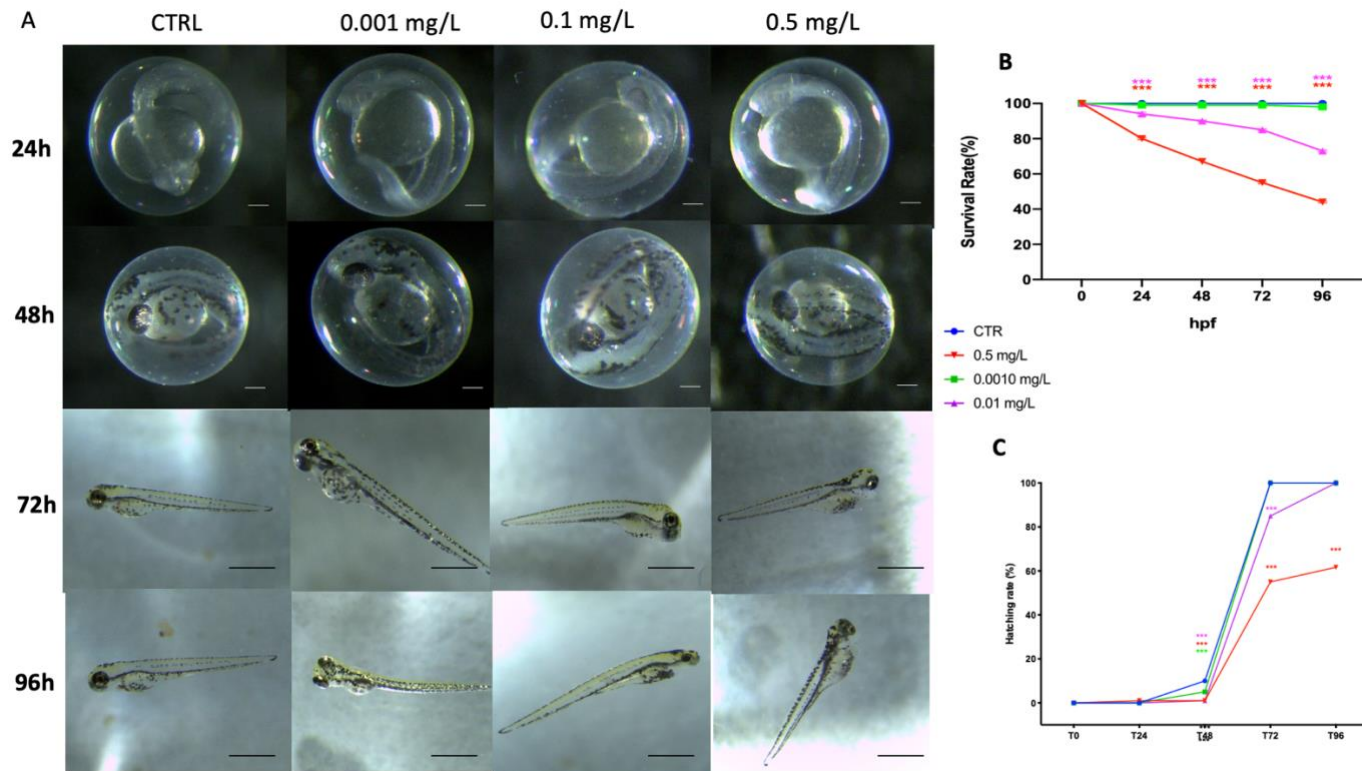


Figura 1. Fenotipi embrionali, mortalità e tasso di schiusa dopo 24-96 ore di esposizione all'OXA. (A) Fenotipi embrionali nei gruppi non esposti e in quelli esposti a OXA. (B) Il tasso di mortalità in embrioni di zebrafish esposti a OXA. (C) Il tasso di schiusa negli embrioni di zebrafish esposti a OXA. L'asterisco indica una differenza statisticamente significativa rispetto al CTRL: \*\*\*  $p < 0.001$

#### 4.7.1 Effetto dell'OXA sul pathway dello stress ossidativo

I risultati hanno mostrato un aumento dei livelli di espressione di SOD e CAT legati al danno ossidativo dopo l'esposizione all'OXA ad alte dosi (0,1 e 0,5 mg/L) (Figura 2). Al contrario, l'OXA a 0,001 mg/L non ha mostrato effetti sullo stress ossidativo nelle larve rispetto al gruppo CTRL (Figura 2).

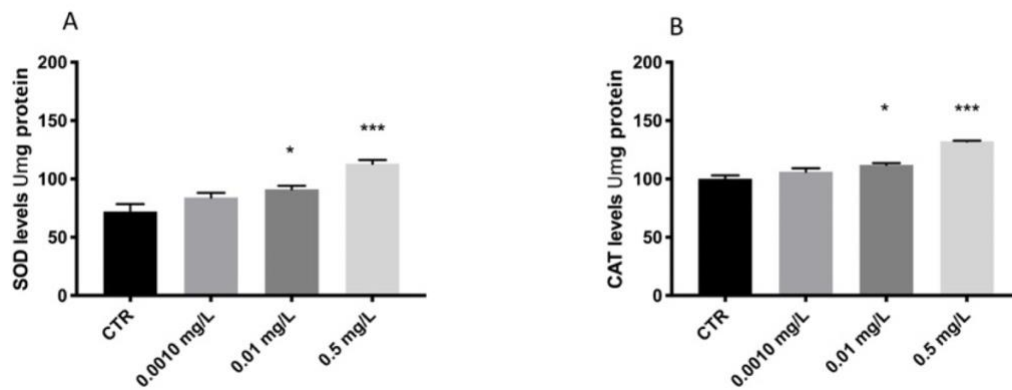


Figura 2. Effetti dell'esposizione all'OXA sulle attività di SOD (A) e CAT (B) nello zebrafish larvale. Lo zebrafish embrionale è stato esposto a OXA per 96 hpf. I dati sono espressi come media SEM di tre repliche (circa 10 larve per replica). L'asterisco denota una differenza statisticamente significativa rispetto al CTRL: \*  $p < 0,05$ , \*\*\*  $p < 0,001$  rispetto al controllo.

#### 4.7.2. Analisi istologica

L'OXA ha prodotto effetti evidenti in modo dose dipendente su cuore, fegato, intestino e muscolo, tra cui una lieve degenerazione del fegato con atrofia a 96 hpf, villi intestinali sfilacciati con desquamazione epiteliale, come rappresentato nella Figura 3. Il gruppo OXA a 0,001 mg/L non ha mostrato alcuna alterazione istologica significativa rispetto al gruppo CTRL, mentre i gruppi a 0,1 e ancora di più il gruppo con la dose più alta (0,5 mg/L di OXA) hanno mostrato cambiamenti istologici (più del 50% dell'intero gruppo) nell'intestino, infiltrati ed edemi a carico del cuore e nel muscolo e perdita di epatociti nel fegato.

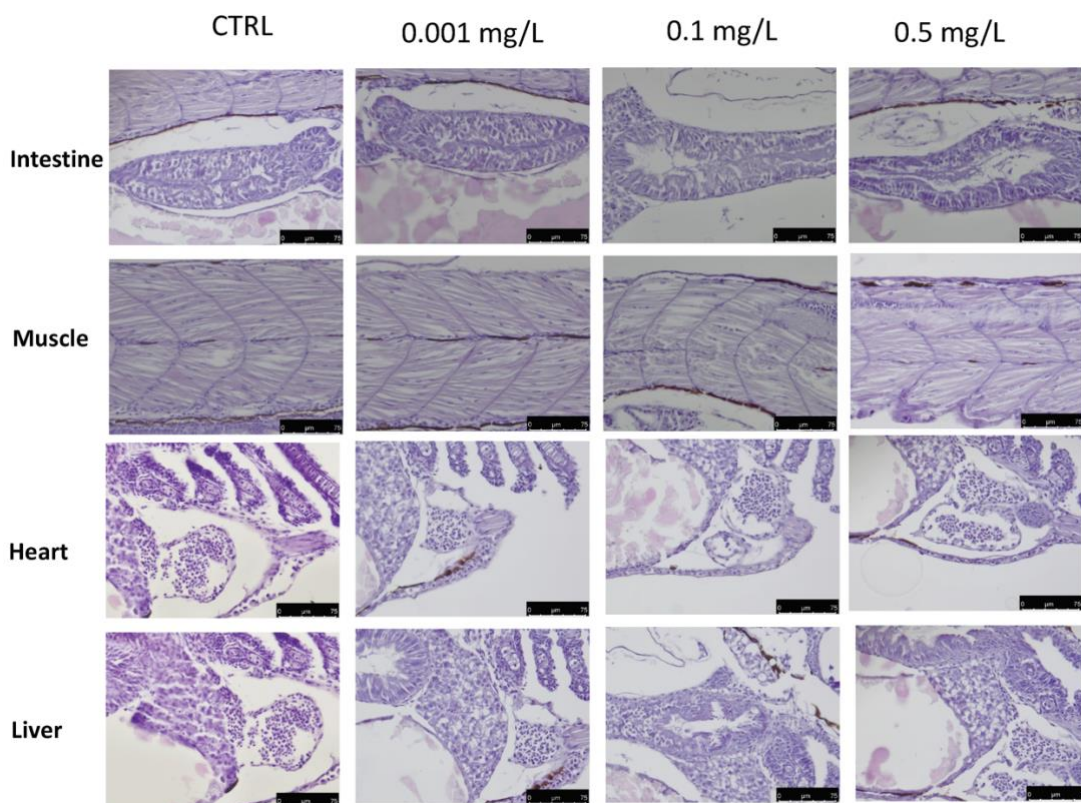


Figura 3. Cambiamenti istopatologici nel cuore, nel fegato, nell'intestino e nei muscoli di larve di zebrafish esposte a OXA a 96 hpf. I dati sono presentati come media SEM, con range interquartile per dati non parametrici di 10 larve per ciascun gruppo. Scale bar 40 ingrandimenti

### 4.7.3 Apoptosi

L'aumento dell'intensità di fluorescenza è stato chiaramente osservato nelle larve di zebrafish esposte a OXA rispetto al CTRL. La morte cellulare è aumentata in modo fortemente dipendente dalla dose dopo l'esposizione all'OXA. Questo valore si è ridotto notevolmente a 0,001 mg/L rispetto ai gruppi 0,1 e 0,5 mg/L.

I risultati indicano che l'OXA induce la morte cellulare negli embrioni di zebrafish in maniera dose dipendente. Inoltre, abbiamo impiegato la RT-PCR per valutare i livelli di espressione dell'mRNA delle larve esposte a diverse concentrazioni di OXA a 96 hpf per determinare le possibili cause degli effetti nocive generati dall'OXA. L'espressione di geni legati all'apoptosi (caspasi-3 e bax) sono aumentati con l'aumentare della dose di OXA, secondo i dati della RT-PCR. Con l'aumento dei livelli di esposizione all'OXA, l'espressione di bcl-2 mRNA di bcl-2 è stato abbassato (Figura 4).

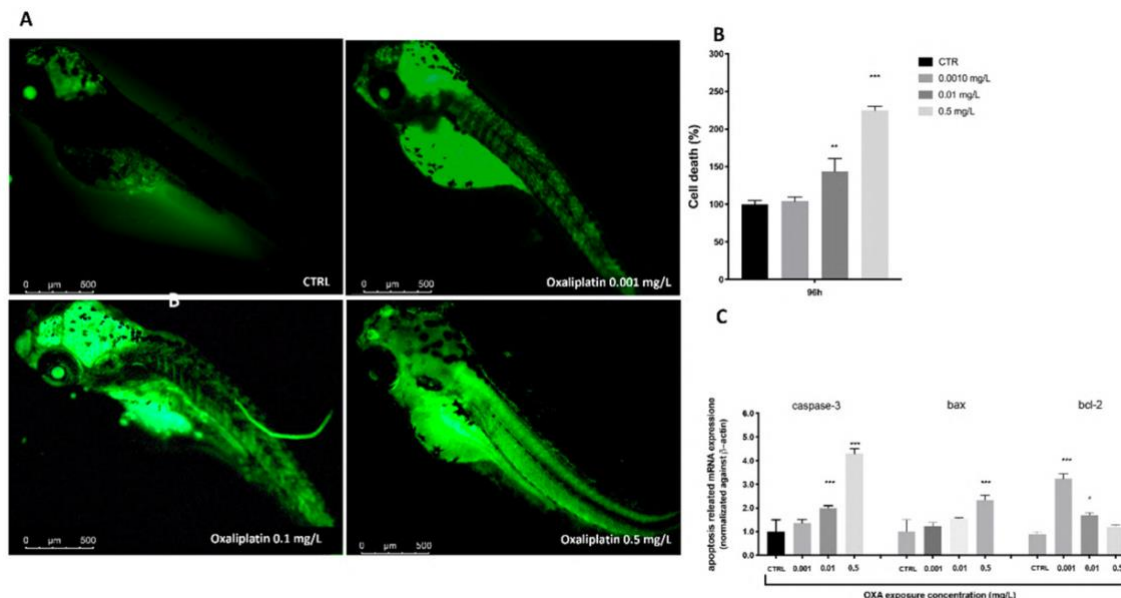


Figura 4. Effetti dell'esposizione a OXA sulla morte cellulare degli embrioni di zebrafish. A 96 hpf, con esposizione a OXA 0,001, 0,1,0,5 mg/L, i livelli di morte cellulare sono stati osservati e fotografati al microscopio a fluorescenza dopo la colorazione con arancio di acridina (A). Istogramma della

percentuale di morte cellulare (B). I risultati sono espressi come media di tre esperimenti indipendenti. Livelli di espressione genica correlati della via apoptotica in embrioni di zebrafish esposti a OXA a concentrazioni di 0,001, 0,1, 0,5 mg/L a 48 hpf (C). Il fold change rispetto al gruppo CTRL è stato utilizzato per riflettere i livelli di espressione dell'mRNA. \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$  rispetto al controllo. Scale bars a 4 ingrandimenti.

## CAPITOLO 6 rischio ambientale da metalli pesanti

### 6.1. Cromo e Cadmio

Diversi settori industriali utilizzano frequentemente sia il cadmio (Cd) che il cromo (Cr), per la produzione di batterie, ghisa, nelle finiture metalliche e in altri prodotti, con conseguente rilascio massiccio di nell'ambiente attraverso diverse vie.[116, 117]. In effetti, sono stati osservati alti livelli di Cd e Cr sono stati osservati nelle acque e nei sedimenti soprattutto nei Paesi in via di sviluppo. Livelli elevati di Cd e Cr disciolti sono stati rilevati nelle acque dolci, con valori compresi tra 10 e 500 ng/L. 10 a 500 ng/L, e in alcune aree industrializzate possono raggiungere 1 mg/L[118, 119].

Studi precedenti hanno dimostrato che il Cd e il Cr possono causare epatotossicità e nefrotossicità, oltre ad alterare i sistemi endocrini. e alterare il sistema endocrino di molti organismi acquatici. Alla base dei molteplici effetti tossici di Cd e Cr c'è il coinvolgimento della via dello stress ossidativo e la conseguente diminuzione delle difese antiossidanti[120, 121].

L'esposizione prolungata ai metalli pesanti può indurre stress ossidativo con conseguente aumento della produzione di specie reattive dell'ossigeno (ROS). L'aumento della produzione di ROS, che ha diversi bersagli (come proteine, lipidi o DNA) può portare a diverse malattie, oltre che alla morte cellulare e all'invecchiamento. morte cellulare e all'invecchiamento. Studi precedenti hanno dimostrato che l'esposizione al BPA può provocare un aumento dello stress ossidativo nel fegato dei ratti maschi[122]. Inoltre, lo stress ossidativo indotto dal BPA è stato osservato anche in modelli di pesce zebra, attraverso analisi biochimiche con marcatori antiossidanti e fosfatasi[122].

Negli organismi che consumano ossigeno, gli enzimi antiossidanti svolgono un ruolo chiave nella prima linea di difesa. Tra i vari enzimi antiossidanti, un ruolo importante è quello della superossido dismutasi (SOD). La SOD converte l'anione superossido ( $O_2^-$ ) in perossido di

idrogeno ( $H_2O_2$ ), che viene poi convertito in  $H_2O$  e  $O_2$  da un altro importante enzima antiossidante, la catalasi (CAT). In diversi organismi acquatici, come molluschi, pesci e policheti, sono stati accertati gli effetti degli xenobiotici sull'espressione degli enzimi SOD e CAT [123-129]. Inoltre, si è visto che i metalli pesanti possono attraversare la membrana emato-encefalica, accumulandosi a livello cerebrale dove possono provocare danni e apoptosi [130-132]. A questo proposito, questi enzimi possono essere utilizzati come biomarcatori dello stress ossidativo indotto da contaminanti ambientali [130]. Come modello di screening dei farmaci negli ultimi anni si sta utilizzando molto lo zebrafish (*Danio rerio*). Il modello dello zebrafish è utile non solo per il breve tempo di generazione e i bassi costi, ma anche per le elevate dimensioni dei pesci, ma anche per le elevate dimensioni del gruppo negli stadi embrionali e larvali, e per la loro trasparenza ottica che permette la visualizzazione di agenti patogeni e lesioni in tempo reale [133]. Nel presente studio, abbiamo analizzato la tossicità acuta di due metalli pesanti (Cd e Cr) e di un EDC (BPA) in larve di pesce zebra. Inoltre, abbiamo analizzato la modulazione trascrizionale delle vie di stress ossidativo e apoptotico dopo l'esposizione allo xenobiotico BPA da solo e in combinazione con metalli pesanti a varie concentrazioni.



## 6.2. Materiali e Metodi

### 6.2.1 Zebrafish Maintenance and Embryo Collection

Mantenimento di zebrafish e raccolta di embrioni Le uova fecondate sono state fornite dal dal Centro di ittiopatologia sperimentale della Sicilia (CISS), Università di Messina. Le uova sono state raccolte e selezionate entro 4 ore dalla fecondazione (hpf) sotto uno stereomicroscopio (Leica M0205C, Multifocus, Wetzlar, Germania). Tutti gli embrioni sono stati ottenuti dalle stesse uova.

### 6.2.2 Preparazione delle dosi e protocolli di esposizione

Il cloruro di cadmio ( $\text{CdCl}_2$ ) (numero di CAS: 654054-66-7) e il bicromato di potassio ( $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ ) sono stati utilizzati per la preparazione delle dosi. ( $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ ) (numero CAS: 7778-50-9) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) sono stati disciolti in acqua distillata e deionizzata. in acqua distillata e deionizzata per ottenere una soluzione madre di 10 mM. La soluzione madre di 100 mM di BPA (CAS 80-05-7) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) è stata ottenuta dissolvendo la polvere di BPA in dimetilsolfossido (DMSO) allo 0,01% (v/v). (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). Il BPA nella soluzione madre è stato diluito con soluzione salina tamponata con fosfato (PBS) 0,01M. (PBS, pH 7,0) e ulteriormente diluito con terreno embrionale (15 mM NaCl, 0,5 mM KCl, 1 mM  $\text{CaCl}_2$ , 1 mM  $\text{MgSO}_4$ , 0,15 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 0,05 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 0,7 mM  $\text{NaHCO}_3$  a pH 7,3) alle concentrazioni testate (10 e 50  $\mu\text{M}$ ). Prima dell'applicazione, entrambe le soluzioni madre sono state diluite in terreno di coltura embrionale fresco per ottenere le concentrazioni finali necessarie (0.5  $\mu\text{M}$  Cd and Cr, 10 e 50  $\mu\text{M}$  BPA)

### 6.2.3 Fish embryo toxicity test (FET)

Il test di tossicità per gli embrioni di pesce (FET) è stato eseguito secondo le norme OECD [31] e ISO 15088. Embrioni di pesce zebra esposti a concentrazioni di BPA (10 e 50  $\mu\text{M}$ ) e dopo BPA 10  $\mu\text{M}$  in combinazione con 0,5  $\mu\text{M}$  di Cd. BPA 10  $\mu\text{M}$  in combinazione con 0,5  $\mu\text{M}$  di Cd e Cr in 1 ml di acqua dolce per 4-96 h post-fertilizzazione. hpf sono stati misurati gli effetti tossici di un periodo di osservazione continuato. Tutte le soluzioni tutte le soluzioni sono state rinnovate e la mortalità embrionale/larvale e il tasso di schiusa sono stati valutati ogni 24 ore. 24 ore, mentre la frequenza cardiaca è stata misurata a 96 hpf. Come descritto in un precedente articolo[134], gli embrioni sani sono stati posti in piastre di coltura da 24 pozzetti (1 embrione in 1 ml di soluzione/pozzetto).

Ogni gruppo comprendeva 20 embrioni e ogni esperimento è stato replicato tre volte. Durante il periodo di esposizione, sono state scattate fotografie degli embrioni con uno stereomicroscopio (Leica M0205C, Multifocus, Wetzlar, Germania) e la percentuale di embrioni anormali è stata contata ogni 24 ore.

#### 6.2.4 Vitalità, morfologia e tasso di schiusa

La salute della larva di zebrafish è stata valutata come precedentemente descritto[135]. Per esaminare il tasso di sopravvivenza e la morfologia degli embrioni/larve, il BPA nella soluzione madre è stato diluito con 0,01 M di soluzione salina tamponata con fosfato (P.T.) con soluzione salina tampone fosfato 0,01 M (PBS, pH7,0) e ulteriormente diluita con Embryo (15 mM NaCl, 0,5 mM KCl, 1 mM CaCl<sub>2</sub>, 1 mM MgSO<sub>4</sub>, 0,15 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0,05 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0,7 mM NaHCO<sub>3</sub> a pH 7,3) alle concentrazioni testate (10 e 50 µM). Gli embrioni WT sani e in normale sviluppo a 4 hpf sono stati raccolti ed esposti a veicolo o a varie concentrazioni di BPA, Cd e Cr nell'acqua delle uova.

Durante il tempo di esposizione, è stato osservato lo sviluppo embrionale e vari parametri, tra cui la mortalità, tasso di schiusa, frequenza del battito cardiaco e anomalie come edema pericardico, pigmentazione e curvatura assiale della colonna vertebrale, nelle larve schiuse [136]. Gli score morfologici sono stati determinati a 96 hpf come precedentemente descritto. Nove endpoint, tra cui forma del corpo, somiti, notocorda, coda, pinne, cuore, occhi, cervello e arcate faringee/mascelle, sono stati esaminati per valutare i fenotipi dello zebrafish e otto esemplari larvali per gruppo sono stati utilizzati per l'assegnazione dei punteggi[137]. Per misurare la frequenza cardiaca, gli embrioni a 48, 72 e 96 hpf sono stati portati a temperatura ambiente e lasciati stabilizzare per 30 minuti prima del conteggio manuale. Per ogni condizione di trattamento dieci embrioni sono stati selezionati a caso e le loro frequenze cardiache sono state misurate per quattro intervalli di 20 s sotto uno stereomicroscopio.

#### 6.2.5. Estrazione dell'RNA totale e RT-PCR

L'RNA totale è stato estratto da tessuti di larve di pesce zebra utilizzando il NanoMag Animal and Fish RNA Isolation Kit (Shannuo Scientific Company, Shanghai, Cina). Un microgrammo di RNA totale è stato sottoposto a sintesi di cDNA utilizzando PrimeScript® RT Master Mix. La PCR in tempo reale è stata eseguita in un volume totale di 20 µL contenente 10 µL di SYBR Green supermix, 1 µL di cDNA, 7 µL di acqua priva di RNasi/DNasi e 500 nM di ciascun primer. L'espressione genica è stata analizzata con il metodo 2DDCT, la b-actina (gene che codifica la betaactina) è stato utilizzato come gene house keeping per la normalizzazione della RT-qPCR. Le sequenze dei primers per la PCR in tempo reale sono mostrate nella Tabella 2.

**Tabella 2** Primers per RT-PCR

<b>Gene</b>	<b>Primer orientation</b>	<b>Nucleotide sequence</b>
<i>b-actin</i>	forward	5'- AGAGCTATGAGCTGCCTGACG -3'
	reverse	5'- CCGCAAGATTCCATACCCA -3'
<i>casp-3</i>	forward	5'-CCGCTGCCCATCACTA-3'
	reverse	5'-ATCCTTTCACGACCATCT-3'
<i>Bax</i>	forward	5'-GGCTATTTCAACCAGGGTTCC-3'
	reverse	5'-TGCGAATCACCAATGCTGT-3'
<i>bcl-2</i>	forward	5'- TCACTCGTTCAGACCCTCAT -3'
	reverse	5'- ACGCTTTCACGCACAT -3'
<i>sod1</i>	forward	5'-GGCCAACCGATAGTGTTAGA-3'
	reverse	5'-CCAGCGTTGCCAGTTTTTTAG-3'
<i>cat</i>	forward	5'-AGGGCAACTGGGATCTTACA-3'
	reverse	5'-TTTATGGGACCAGACCTTGG-3'
<i>gstp2</i>	forward	5'-CACAGACCTCGCTTTTCACAC-3'
	reverse	5'-GAGAGAAGCCTCACAGTCGT-3'
<i>Nrf2</i>	forward	5'-TCGGGTTTGTCCCTAGATG-3'
	reverse	5'-AGGTTTGGAGTGTCCGCTA-3'

#### 6.2.6. Rilevazione dei ROS e saggio degli enzimi antiossidanti

Le larve di ciascun gruppo sono state scongelate e omogeneizzate in ghiaccio con 180  $\mu$ L di soluzione fisiologica ghiacciata. L'omogenato è stato centrifugato a 12.000 g a 4 C° per 10 minuti per ottenere il surnatante. Le concentrazioni di ROS sono state valutate come precedentemente descritto[138]. Il contenuto di SOD e CAT del surnatante è stato analizzato come descritto in precedenza [112-115, 139].

#### 6.2.7 Materiali

Tutti i composti utilizzati in questo studio sono stati acquistati da Sigma-Aldrich Company Ltd.

#### 6.2.8 Valutazione statistica

Tutti i valori nelle figure e nel testo sono espressi come media, errore standard della media (SEM) di n animali. I risultati sono stati analizzati mediante ANOVA a una via seguita da un test post-hoc di Bonferroni per confronti multipli.

## 6.3. Risultati

### 6.3.1 Effetto del bisfenolo A su morfologia, vitalità e tasso di schiusa

Al fine di identificare le concentrazioni adatte, sono stati utilizzati time points nei seguenti esperimenti: Il BPA, in dosi di 10 e 50  $\mu\text{M}$ , è stato applicato per osservare la morfologia delle larve fino a 96 hpf. Lo sviluppo degli embrioni nella CTRL è stato normale: la schiusa è iniziata tra i 48 e i 72 hpf e non è stata evidenziata alcuna mortalità. Come illustrato nella Figura 1, il BPA 10  $\mu\text{M}$  non ha alterato la morfologia dello zebrafish fino a 96 hpf rispetto al gruppo CTRL. I gruppi BPA 50  $\mu\text{M}$  hanno indotto una serie di anomalie negli embrioni di zebrafish.

L'effetto del BPA 50  $\mu\text{M}$  sullo sviluppo embrionale è stato osservato a partire da 48 hpf. Inoltre, quando gli embrioni sono stati trattati con con BPA 50  $\mu\text{M}$ , non è stato osservato alcun tasso di schiusa dopo 96 hpf. Per gli embrioni esposti a BPA 10  $\mu\text{M}$ , non è stata riscontrata alcuna influenza sulla schiusa rispetto a CTRL. Sono state osservate defezioni fenotipiche nel tempo fino a 96 hpf.

Rispetto al gruppo di controllo, il tasso di malformazioni del gruppo BPA 10  $\mu\text{M}$  non ha mostrato alcun cambiamento significativo. Nei gruppi combinati sono state riscontrate anomalie, principalmente un modesto edema del sacco vitellino e un edema pericardico nei gruppi combinati, con BPA 10  $\mu\text{M}$  e Cd 0,5  $\mu\text{M}$  (BPA + Cd) o BPA 10  $\mu\text{M}$  e Cr 0,5  $\mu\text{M}$  (BPA + Cd e Cr 0,5  $\mu\text{M}$  (BPA + Cr). La lunghezza del corpo delle larve è stata misurata a 96 hpf per valutare il grado di sviluppo (Figura 6C). Le lunghezze corporee delle larve a 96 hpf sono risultate significativamente ridotte sia nel gruppo BPA + Cd che in quello BPA + Cr, il che indica che la combinazione di una bassa dose di BPA e metalli pesanti ha inibito significativamente la crescita larvale. Le frequenze cardiache sono state registrate per determinare l'effetto della combinazione di BPA e Cd e Cr sulla funzione cardiaca. Negli embrioni del gruppo BPA 10  $\mu\text{M}$ , così come in quelli del gruppo CTRL, la frequenza cardiaca

non mostrava differenze a 96 hpf. Tuttavia, è stata osservata una significativa bradicardia negli embrioni trattati con BPA + Cd e BPA + Cr rispetto al CTRL (Figura 5).

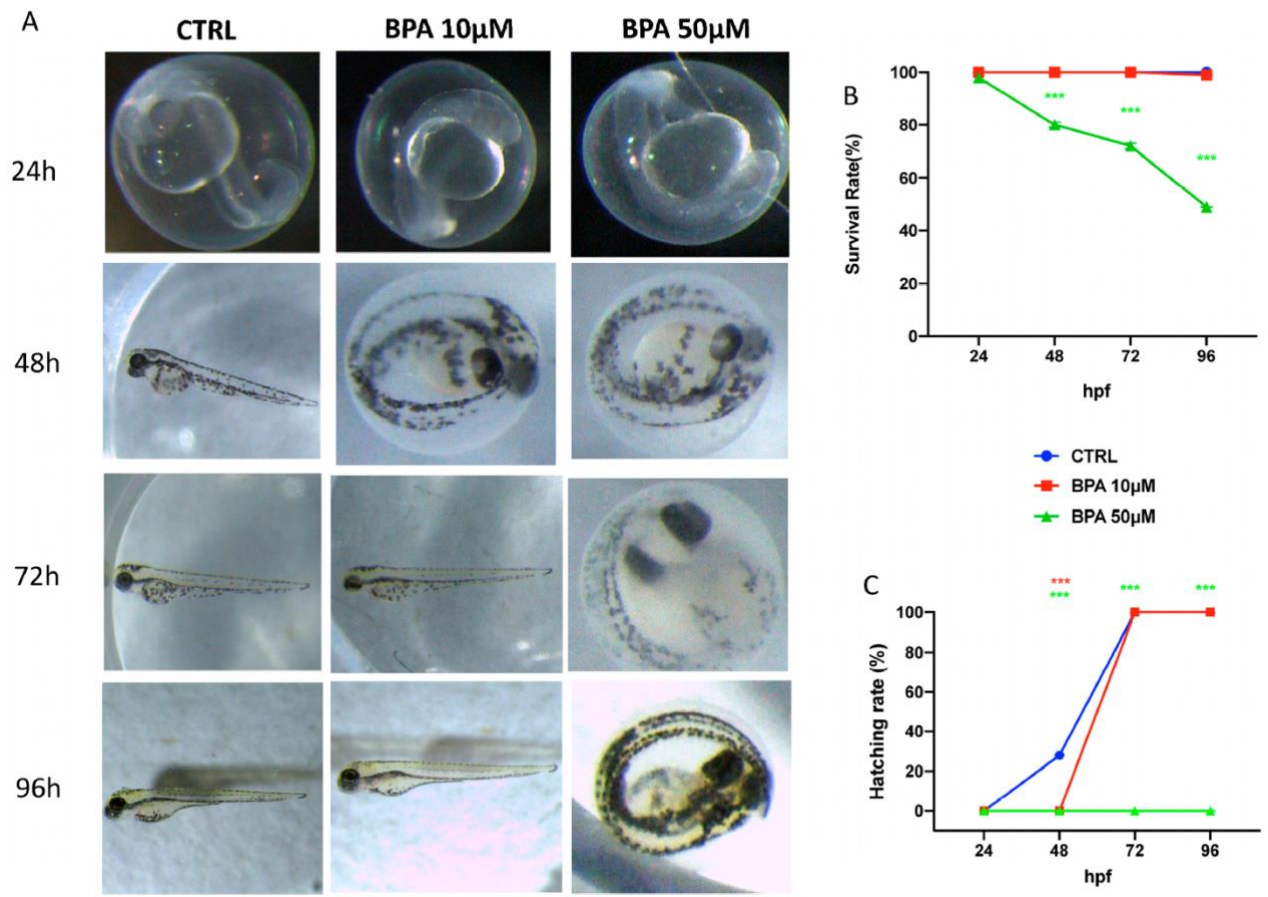


Figura 5. Anomalie morfologiche in zebrafish causate dall'esposizione a diverse dosi di BPA (A), tasso di sopravvivenza (B) e di schiusa (C). Le immagini sono state scattate dalla vista laterale sotto un microscopio a dissezione (ingrandimento 25). Scale bars, 500  $\mu$ m. \*\*\*  $p < 0,001$  rispetto a CTRL.



### 6.3.2 Score delle malformazioni, lunghezza del corpo e frequenza cardiaca

Sono state osservate le malformazioni fenotipiche a vari time points fino a 96 hpf. Rispetto al gruppo di controllo, il tasso di malformazioni del gruppo BPA 10  $\mu\text{M}$  non ha mostrato variazioni significative. Nei gruppi combinati sono state riscontrate anomalie, principalmente un modesto edema a carico del sacco vitellino e un edema pericardico. I gruppi combinati, con BPA 10  $\mu\text{M}$  e Cd 0,5  $\mu\text{M}$  (BPA + Cd) o BPA 10  $\mu\text{M}$  e Cr 0,5  $\mu\text{M}$  (BPA + Cr). La lunghezza del corpo delle larve è stata misurata a 96 hpf per valutare il grado di sviluppo (Figura 6C).

Le lunghezze corporee delle larve a 96 hpf erano gruppo BPA Cr, il che indica che la combinazione di BPA e metalli pesanti ha inibito significativamente la crescita larvale. Le frequenze cardiache sono state registrate per determinare l'effetto della combinazione di BPA e Cd e Cr sulla funzione cardiaca. Negli embrioni del gruppo BPA 10  $\mu\text{M}$ , così come in quelli del gruppo CTRL, la frequenza cardiaca non mostrava differenze a 96 hpf. Tuttavia, è stata osservata una significativa bradicardia negli embrioni trattati con BPA + Cd e + Cr rispetto al CTRL (Figura 6D). Non ci sono differenze sulla morfologia, lunghezza del corpo e frequenza cardiaca nei gruppi con esposizione singola a Cd e Cr (Figura 6A-D).

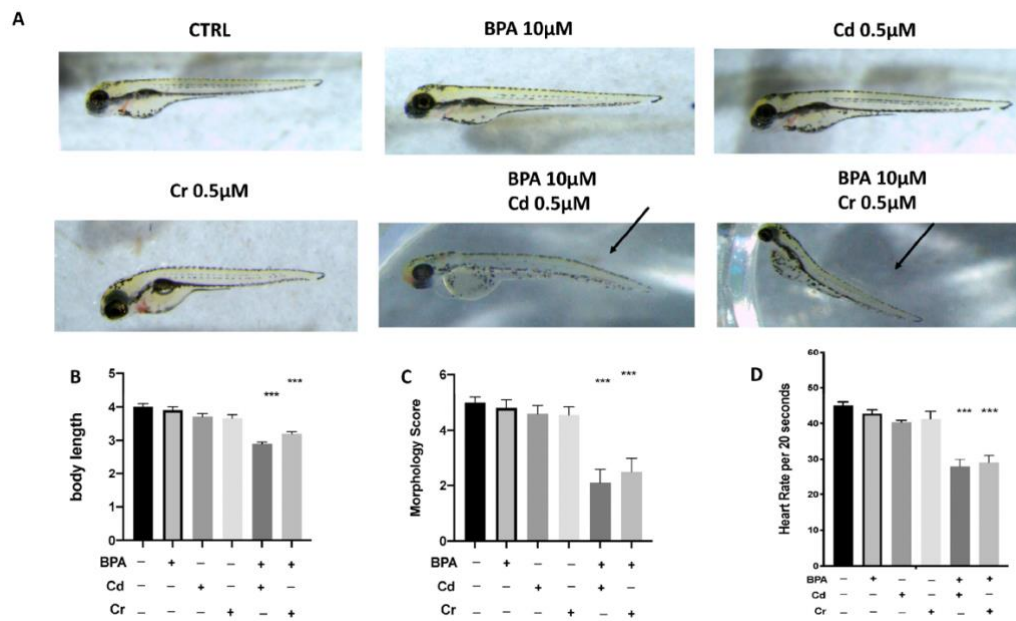


Figura 6. Effetti dell'esposizione singola e congiunta a BPA, Cd e Cr sui cambiamenti morfologici delle larve di zebrafish a 96 hpf. Malformazioni come la curvatura dell'asse corporeo sono indicate dalle frecce (A). viste laterali rappresentative (A), lunghezza del corpo (B), e punteggio morfologico (C) e frequenza cardiaca (D) di larve di zebrafish trattate. \*\*\*  $p < 0,001$  rispetto a CTRL.

### 6.3.3 Effetto di BPA, Cd e Cr sull'espressione genica del pathway antiossidante

I cambiamenti nell'espressione dei geni correlati agli enzimi antiossidanti nelle larve di zebrafish dopo l'esposizione al BPA da solo e in combinazione con Cd e Cr sono mostrati nella Figura 7.

Sia BPA + Cd e BPA + Cr hanno significativamente ridotto i livelli di espressione di *cat*, *sod1e* *gstp2*, rispetto al gruppo CTRL. Tuttavia, non si sono verificati cambiamenti significativi nel livello di espressione dei geni antiossidanti nel gruppo BPA da solo rispetto al gruppo CTRL (Figura 7). Inoltre, l'espressione dell'mRNA di Nrf2, un fattore di trascrizione comune delle difese antiossidanti, è diminuita sia dopo BPA + Cd che dopo BPA + Cr rispetto al gruppo CTRL, mentre nessun effetto è stato evidenziato nel gruppo esposto al solo BPA. Non sono state riscontrate differenze nell'espressione di mRNA correlati allo stress ossidativo sono state riscontrate nei gruppi con esposizione singola a Cd e Cr. Non sono state riscontrate differenze nell'espressione dell'mRNA correlato allo stress ossidativo nei gruppi con esposizione singola a Cd e Cr.

Allo stesso tempo, abbiamo analizzato l'espressione di SOD e CAT e determinato la percentuale di ROS, in seguito all'esposizione a BPA, Cd e Cr individualmente e in sinergia. Abbiamo evidenziato una diminuzione del contenuto di CAT e SOD in seguito alla co-esposizione BPA e Cd o Cr, nonché un aumento della produzione di ROS. Al contrario, i gruppi con singola esposizione ai vari contaminanti (BPA, Cd e Cr), non sono state riscontrate differenze nel contenuto di CAT e SOD e nella produzione di ROS rispetto al gruppo di controllo.

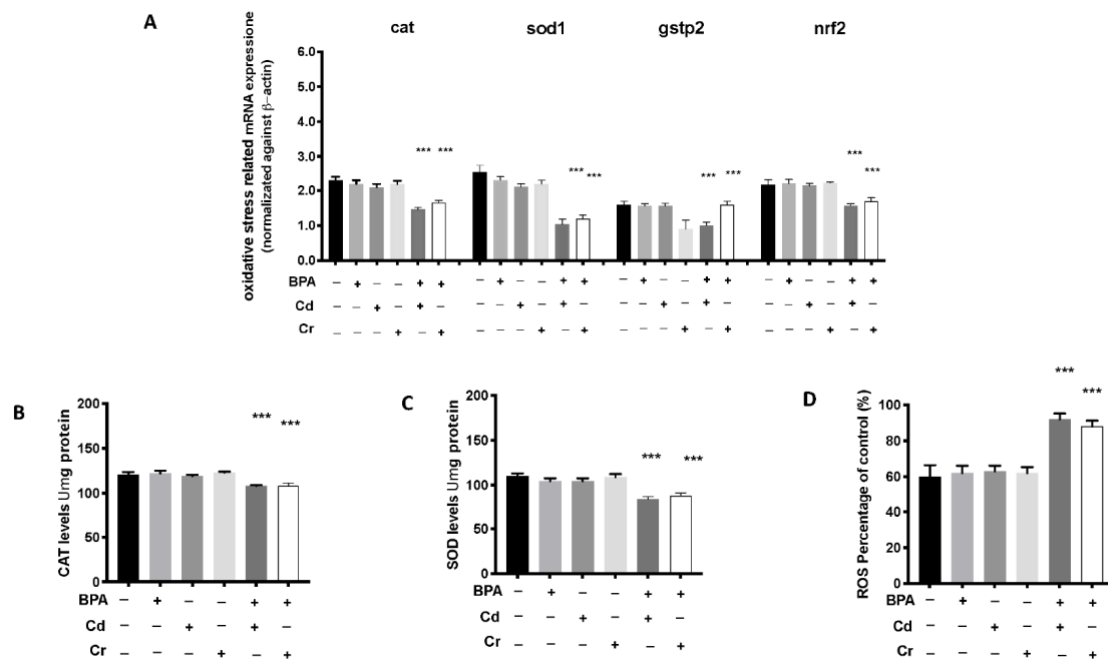


Figura 7. Effetti della singola e della co-esposizione a BPA, Cd e Cr sui livelli di mRNA delle vie ossidative dello stress (cat, sod, gstp2 e nrf2). ossidativo (cat, sod, gstp2 e nrf2) A), sul contenuto di CAT e SOD (B, C) e sulla determinazione dei ROS (D) in zebrafish larvali. Valori = medie  $\pm$  SEM di tre esperimenti indipendenti; \*\*\* a  $p < 0,001$  contro CTRL.

### 6.3.4 Effetto di BPA, Cd e Cr sull'espressione genica del pathway apoptotico

Per indagare i possibili meccanismi di tossicità indotta dalla combinazione di BPA e Cd o Cr, abbiamo utilizzato la RT-PCR per esaminare i livelli di espressione dell'mRNA delle larve esposte da 6 a 120 hpf. I livelli di espressione dell'mRNA dei geni correlati all'apoptosi (caspasi-3, caspasi-9, bax) sono aumentati nel gruppo BPA + CD in misura maggiore al gruppo BPA + Cr, rispetto al gruppo CTRL (Figura 4). Il livello di espressione dell'mRNA di bcl-2 è stato downregolato sia nel gruppo BPA + Cd che in quello BPA + Cr. Inoltre, non vi sono differenze significative tra i geni apoptotici e anti-apoptotici tra il gruppo BPA e il gruppo di CTRL (Figura 8).

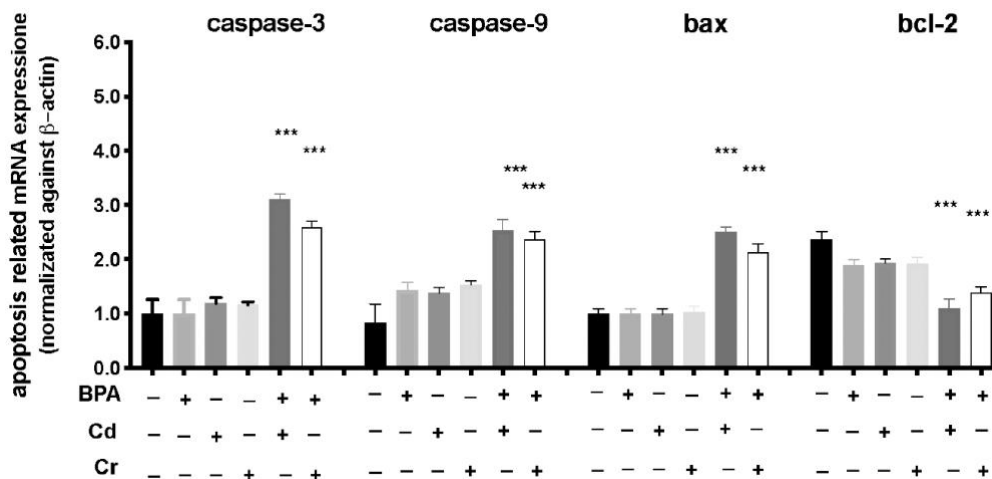


Figura 8. Effetti dell'esposizione singola e congiunta a BPA, Cd e Cr sui livelli di mRNA delle vie apoptotiche (caspasi3 e 9, bax e bcl-2) in zebrafish larvali. (caspasi3 e 9, bax e bcl-2) in zebrafish larvali. Valori = medie SEM di tre esperimenti indipendenti; \*\*\* a  $p < 0,001$  CTRL.

## CAPITOLO 7 rischio ambientale da micotossine ed effetto protettivo di *H. erinaceus*

### 7.1. Ruolo protettivo dell'*Hericium erinaceus* sulla tossicità indotta da aflatoossina B1

Diversi studi hanno dimostrato come l'AFB1 possa causare un aumento dello stress ossidativo quando ingerito in quantità eccessive e ripetutamente in diversi modelli animali murini [140]. Negli ultimi anni, i meccanismi dell'immunotossicità dell'AFB1 sono stati ampiamente descritti, e diversi rapporti hanno suggerito che la sua capacità di pro-ossidazione è la principale base patologica della tossicità dell'AFB1.

Nell'elaborazione metabolica dell'AFB1, l'alterazione del glutatione (GSH) è stata causata da un'alterazione del processo di ossidazione della glutatione-perossidasi (GPx), della superossido dismutasi (SOD), della catalasi (CAT), e della glutatione S-transferasi (GST) potrebbero disturbare l'equilibrio redox cellulare e quindi provocare danni tissutali multipli indotti dallo stress ossidativo [141, 142]. Gli intermedi reattivi prodotti dallo stress ossidativo possono causare danni ossidativi che colpiscono le membrane cellulari, le lipoproteine e altre molecole, portando alla perossidazione lipidica [143]. I prodotti di degradazione della perossidazione lipidica, soprattutto aldeidi come la malondialdeide (MDA), sono stati attenzionati in quanto sono i composti più reattivi [143-145].

Pertanto, la neutralizzazione dello stress ossidativo e l'inibizione dell'apoptosi sono ritenuti obiettivi importanti per la protezione dall'immunotossicità indotta dall'AFB1 [146, 147]. Negli ultimi anni sono stati condotti numerosi studi sulle potenziali azioni antiossidanti dei composti bioattivi, incoraggiandone l'uso sia per il mantenimento della salute umana sia per la prevenzione delle malattie salute umana e per la prevenzione delle malattie attraverso

l'integrazione negli alimenti per animali. In particolare, *Hericium erinaceus* è tra i funghi medicinali più caratterizzati e si concentra sul sistema nervoso [148].

L'attività antiossidante dell'*Hericium erinaceus* è stata dimostrata in diversi modelli sperimentali pre-clinici di disturbi neurodegenerativi come l'epilessia, il morbo di Alzheimer (AD), le lesioni cerebrali traumatiche (TBI) e il morbo di Parkinson [148-150]. Inoltre, studi precedenti su embrioni di zebrafish hanno dimostrato gli effetti protettivi e riparativi dell'*Hericium erinaceus* nella perdita neuronale indotta da esposizione a etanolo [151]. Lo zebrafish (*Danio rerio*) è stato ben accettato come modello generale di pesce e vertebrato per studiare la tossicità chimica e i meccanismi ad essa associati, grazie alla sua facile capacità di essere impanati in laboratorio, la grande fecondità, il rapido sviluppo, il breve ciclo di vita e la trasparenza di uova ed embrioni [152]. Pertanto, è un modello vertebrato eccezionale per la sua elevata somiglianza di sviluppo con i mammiferi [153]. Per questi motivi, la valutazione della tossicità su zebrafish può servire come riferimento significativo non solo per l'uomo ma anche per la sicurezza dei pesci [154]. L'obiettivo di questo studio è stato quello di valutare la tossicità dell'AFB1 su un modello di zebrafish, effetti letali e punti finali sub-letali relativi allo sviluppo embrionale e larvale, e valutare i meccanismi molecolari dell'AFB1 per indurre stress ossidativo e apoptosi. Inoltre, è stato studiato l'effetto potenzialmente protettivo del composto naturale *Hericium* per contrastare il danno ossidativo indotto dall'esposizione all'AFB1.

## 7.1 Materiali e metodi

Il mantenimento di zebrafish e la raccolta degli embrioni da uova fecondate sono stati effettuati all'interno del Centro di ittiopatologia sperimentale della Sicilia (CISS), Università di Messina, Italia. Le uova sono state raccolte e selezionate entro 4 ore dalla fecondazione (hpf) sotto uno stereomicroscopio (Leica M0205C, Multifocal). Tutti gli embrioni sono derivati dallo stesso ovopositore.

### 7.1.1 Fish embryo toxicity test (FET)

È stato eseguito un test di tossicità per gli embrioni di pesce (FET) secondo le norme OECD [155] e ISO 15088. Gli embrioni di pesce zebrato sono stati esposti a concentrazioni di AFB1 (10, 50 e 100 ng/mL) e di estratto di *Herichium* (100 µg/L) in 5 mL di acqua dolce per 4-96 hpf sono stati misurati per gli effetti tossici in un periodo di osservazione continuo. Le soluzioni di AFB1 e *Herichium* venivano e la mortalità embrionale/larvale e il tasso di schiusa sono stati valutati ogni 24 ore. Come descritto in un precedente articolo [134], gli embrioni sani sono stati posti in piastre di coltura a 24 pozzetti. Le fotografie degli embrioni sono state ottenute con uno stereomicroscopio (Leica M0205C, multifocale) e la percentuale di embrioni anormali è stata valutata ogni 24 h. Le biomasse di *H. erinaceus* sono state generosamente fornite da Mycology Research Laboratories Ltd.

(MRL, Luton, Regno Unito) e sono state utilizzate come ricevute per le indagini. L'estratto alcolico di *Herichium* è stato ottenuto come descritto in precedenza [148].



### 7.1.2 Sviluppo e morfologia post esposizione a AFB1 ed Hericium

L'AFB1 (CAS:1162-65-8) è stato acquistato dalla Sigma-Aldrich Company (St. Louis, MO, USA) ed è stato prima disciolto in DMSO a una concentrazione di 6 mg/mL e conservato a 20 C° come soluzione madre. Per esaminare il tasso di sopravvivenza e la morfologia degli embrioni/larve, l'AFB1 in soluzione madre è stato diluito con soluzione salina tamponata con fosfato 0,01 M (PBS, pH7,0) a 0,3 mg/mL ed è stata ulteriormente diluita con terreno embrionale (15mNaCl, 0,5 mM KCl, 1 mM KCl, 1 mM CaCl<sub>2</sub>, 1 mM MgSO<sub>4</sub>, 0,15 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0,05 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0,7 mM NaHCO<sub>3</sub> e pH 7,3) alle concentrazioni testate (10, 50 e 100 ng/mL). Gli embrioni WT (wild type) sani e in normale sviluppo sono stati raccolti a 6h post-fertilizzazione (hpf) e sono stati esposti al veicolo o a varie concentrazioni di AFB1 nel terreno embrionale.

Gli embrioni sani sono stati raccolti a 6 ore dalla fecondazione (hpf) e sono stati esposti a varie concentrazioni di AFB1 nel terreno embrionale. Lo sviluppo embrionale è stato monitorato e parametri come la mortalità, il battito cardiaco e il tasso di schiusa, oltre a potenziali malformazioni. come l'edema pericardico, la pigmentazione e la curvatura assiale della colonna vertebrale nelle larve schiuse sono stati valutati durante il periodo di esposizione [136]. Per misurare la frequenza cardiaca, gli embrioni a 48, 72 e 96 hpf sono stati portati a temperatura ambiente e sono stati lasciati stabilizzare per 30 minuti prima del conteggio manuale. Per ogni condizione di trattamento, dieci embrioni sono stati selezionati a caso e la loro frequenza cardiaca è stata misurata per quattro intervalli di 20 s sotto uno stereomicroscopio.

### 7.1.3 Determinazione di MDA e stress ossidativo

Le 20 larve di ciascun becher sono state scongelate e omogeneizzate con 180 µl di soluzione fisiologica ghiacciata. 180 µl di soluzione fisiologica ghiacciata. L'omogenato è stato centrifugato a 4000 µg a 4 C° per 15 minuti per ottenere il surnatante. Il contenuto di MDA e GSH, SOD, CAT, GPX e GST nel surnatante è stato analizzato utilizzando kit commerciali (Nanjing Jiancheng Bioengineering Institute, Nanjing, Cina) come descritto in precedenza [112-115, 156].

### 7.1.4 TUNEL

Il protocollo di colorazione TUNEL è stato condotto in accordo con le direttive del produttore, Roche. Le sezioni larvali incluse nella paraffina sono state deparaffinate in xilene e reidratate con una serie di alcoli a percentuali decrescenti di etanolo, sono state permeabilizzate con tampone citrato 0,1 M e quindi incubate nella miscela di reazione TUNEL per 60 minuti a 37 C° al buio. Il tessuto è stato quindi risciacquato in PBS per tre volte per 5 minuti e poi osservato utilizzando lunghezze d'onda eccitanti nell'intervallo 520-560 nm (massimo 540; verde) e nell'intervallo 570-620 nm (massimo 580).

### 7.1.5 Isolamento dell'RNA e analisi RT-PCR

L'RNA totale è stato isolato dalle 15 larve di zebrafish utilizzando RNeasy Mini Kit (Qiagen, Milano, Italia) secondo i protocolli del produttore. L'RNA è stato poi quantificato utilizzando un Nanodrop Spectrometer e successivamente una quantità uguale di RNA per ogni campione è stato cDNA utilizzando un kit di sintesi cDNA iScript™ (Bio-Rad, Milano, Italia) secondo i protocolli del produttore iQTM SYBR Green Supermix (Bio-Rad, Milano, Italia). La PCR in tempo reale è stata eseguita utilizzando un sistema di rivelazione Bio-Rad CFX Real-Time PCR (Bio-Rad, Milano, Italia) con primer specificamente progettati per lo zebrafish larvale, come descritto in precedenza [157]

#### Caspasi-9 mRNA

(Forward: AAATACATAGCAAGGCAACC, Reverse: CACAGGGAATCAAGAAAGG);

#### b-actina mRNA

(Forward: AAGTGCGACGTGGACA, Reverse: GTTTAGGTTGGTCGTCGTTTGA).

La variazione di ripiegamento del livello di mRNA è stata determinata utilizzando il metodo di analisi dei dati DDCt [156].

### 7.1.6 Materiali

Tutti i composti utilizzati in questo studio sono stati acquistati dalla Sigma-Aldrich Company Ltd.

### 7.1.7 Valutazione statistica

Tutti i valori nelle figure e nel testo sono espressi come media (SEM) di un numero N di animali. I risultati sono stati analizzati mediante ANOVA a una via, seguita da un test post hoc di Bonferroni per confronti multipli.

## 7.2 Risultati

### 7.2.1 Morfologia

Al fine di identificare le concentrazioni e i tempi adatti per i seguenti esperimenti, sono state aggiunte concentrazioni di AFB1 di 10, 50 e 100 ng/mL nell'acqua degli embrioni e sono state applicate per osservare la morfologia delle larve fino a 96 hpf. e sono state applicate per osservare la morfologia delle larve fino a 96 hpf. Come presentato nella Figura 1, le concentrazioni di AFB1 di 10 e 50 ng/mL non hanno alterato la morfologia dello zebrafish dopo 96 hpf rispetto al gruppo di controllo (Figura 1).

Il gruppo AFB1 100 ng/mL ha indotto una serie di anomalie, tra cui curvatura dell'asse corporeo, edema pericardico e sacco vitellino di grandi dimensioni negli embrioni di zebrafish (Figura 9). La curvatura è stata osservata negli zebrafish esposti all'AFB1 a concentrazioni di 100 ng/mL, e questo particolare fenotipo era osservabile nell'80% delle larve alla concentrazione di AFB1 di 100 ng/mL.

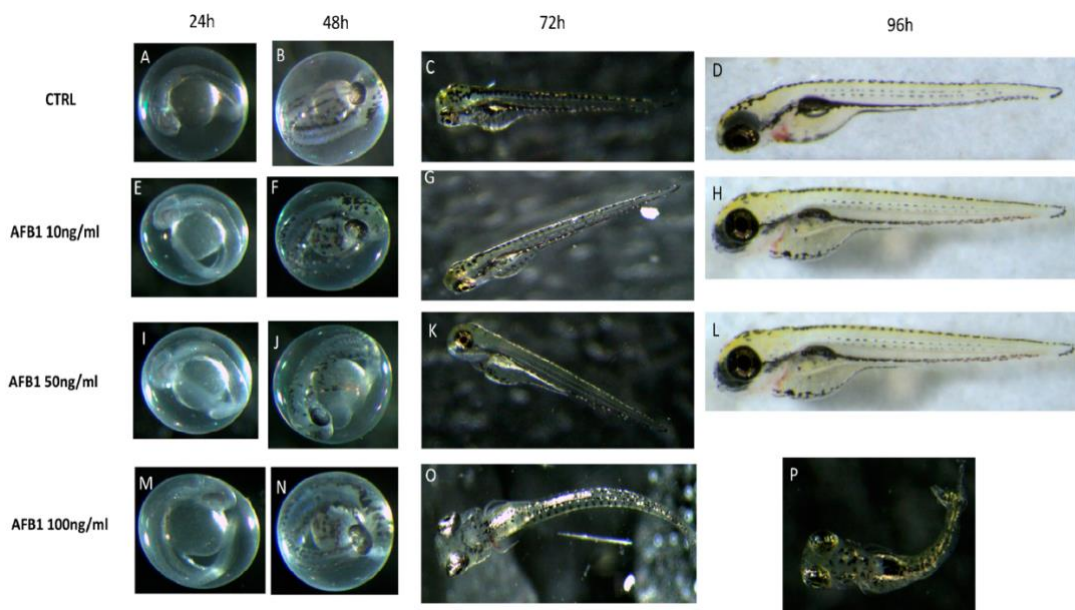


Figura 9. Anomalie morfologiche in zebrafish causate dall'esposizione all'AFB1. Micrografie ottiche (A-P) micrografie (A-P) che mostrano malformazioni fisiche rispetto ai controlli dopo l'incubazione con AFB1 per 96 hpf. con AFB1 per 96 hpf. Non sono state osservate malformazioni a basse dosi di AFB1 dopo 24 hpf (E e I), 48 hpf (F e J), 72 hpf (G e K) e 96 hpf (H e L) e con dosi elevate di AFB1 dopo 24 hpf (M) e 48 hpf (N). Le malformazioni sono state osservate per alte dosi di AFB1 dopo 72 hpf (O) e 96 hpf (P). (A, B, C e D) rappresentano il normale sviluppo degli embrioni di Zebrafish. Le immagini sono state scattate da una vista laterale al microscopio da dissezione (ingrandimento 25). Barra di scala, 500  $\mu$ m. Il gruppo AFB1 100 ng/mL ha indotto una serie di anomalie, tra cui asse del corpo curvatura dell'asse corporeo, edema pericardico e sacco vitellino di grandi dimensioni negli embrioni di zebrafish (Figura 9). La curvatura è stata osservata negli zebrafish esposti all'AFB1 a concentrazioni di 100 ng/mL, e questo particolare fenotipo era osservabile nell'80% delle larve alla concentrazione di AFB1 di 100 ng/mL.

### 7.2.2 Sopravvivenza, cuore e tasso di schiusa degli embrioni di zebrafish dopo il trattamento con AFB1

L'effetto dell'AFB1 sullo sviluppo degli embrioni è stato osservato fino a 96 hpf. Lo sviluppo degli embrioni nel controllo era normale: la schiusa è iniziata a 72 hpf e la mortalità era bassa (Figura 10 A-C). Quando gli embrioni sono stati trattati con varie concentrazioni di AFB1 (10, 50 e 100 ng/mL), il tasso di schiusa è diminuito significativamente nel gruppo ad alta concentrazione. Rispetto al controllo, per gli embrioni esposti a basse concentrazioni (10 e 50 ng/mL), non è stata riscontrata alcuna influenza sulla schiusa. Il ritardo nella schiusa si è verificato dopo 72 ore con il trattamento con AFB1 a una concentrazione di 100 ng/mL. A 96 hpf, circa il 10% degli embrioni rimanenti dei gruppi AFB1 alla concentrazione di 100 ng/mL. trattamento che non si erano schiusi.

Le frequenze cardiache sono state registrate per determinare l'effetto dell'AFB1 sulla funzione cardiaca. Sia nel gruppo di controllo che in quello AFB1 sia negli embrioni di controllo che in quelli trattati con AFB1 10 ng/mL e nel gruppo 50 ng/mL, non ci sono state differenze nella frequenza cardiaca da 48 a 96 hpf. Tuttavia, da 48 a 96 hpf, è stata osservata una significativa bradicardia negli embrioni trattati con 100 ng/mL di AFB1 rispetto ai controlli (Figura 10B). La letalità è stata causata proprio da 1 a 3 dpf a 100ng/mL e nei giorni successivi. Tuttavia, negli embrioni trattati con concentrazioni inferiori a 10 e 50 ng/mL non si sono verificati casi di mortalità a 6dpf. La curva di mortalità dello zebrafish indotta dall'AFB1 è presentata nella Figura 10C.

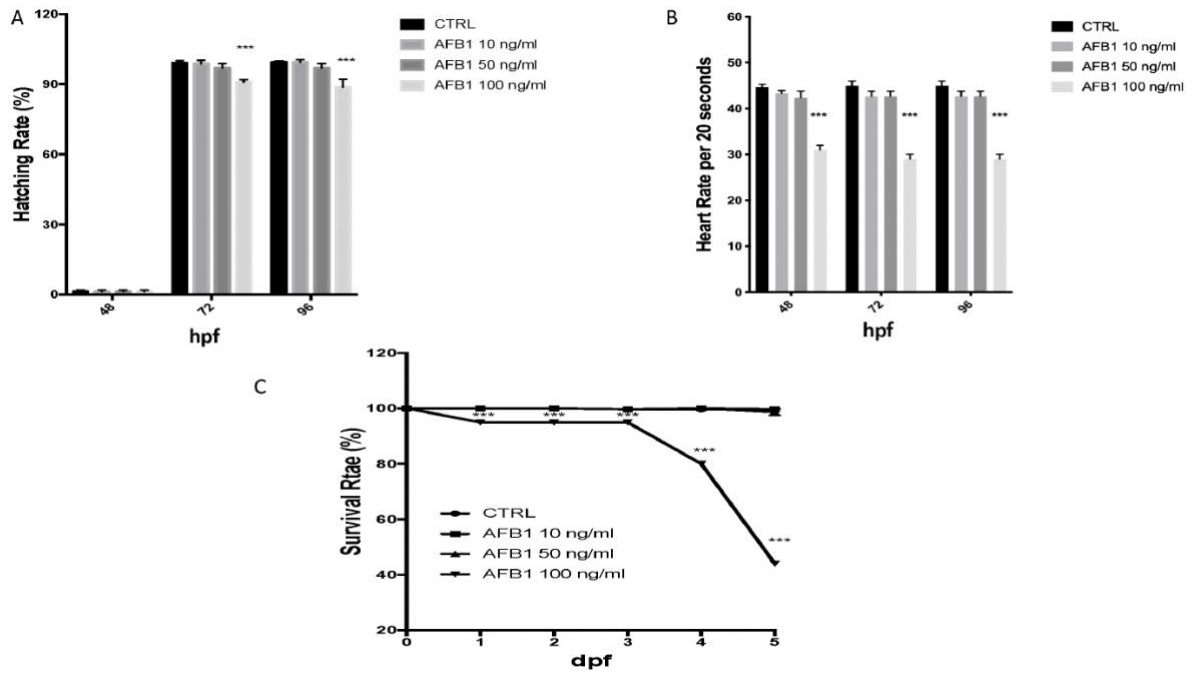


Figura 10. Il tasso di schiusa (A), di cuore (B) e di sopravvivenza (C) degli embrioni è stato determinato al momento designato. tempo. L'asterisco rappresenta una differenza statisticamente significativa rispetto ai controlli: \*\*\* a livello  $p < 0,001$ .

### 7.2.3 Effetto dell'AFB1 sulla perossidazione lipidica e sul pathway dello stress ossidativo e azione protettiva dell'Hericum.

I risultati riportati nella Figura 11 illustrano che i livelli di MDA negli zebrafish larvali sono aumentati significativamente dopo l'esposizione all'AFB1 100 ng/mL a 96 ore rispetto al gruppo di controllo. Tuttavia, l'aumento dei livelli di MDA dopo l'esposizione all'AFB1 è stato inibito dal trattamento con Hericum rispetto al gruppo di controllo (Figura 11A).

In modo corrispondente, il contenuto di GSH e i livelli di GPx sono diminuiti significativamente nelle larve dopo l'esposizione all'AFB1, mentre SOD, CAT e GST sono aumentati in presenza di AFB1 (Figura 11B-D) rispetto al controllo. Il trattamento con Hericum nelle larve dopo l'esposizione all'AFB1 ha diminuito i livelli di MDA, SOD, CAT e GST rispetto al controllo e allo stesso tempo, è stato in grado di aumentare i livelli di GSH e GPx rispetto al gruppo AFB1 100 ng/L (Figura 11E,F).

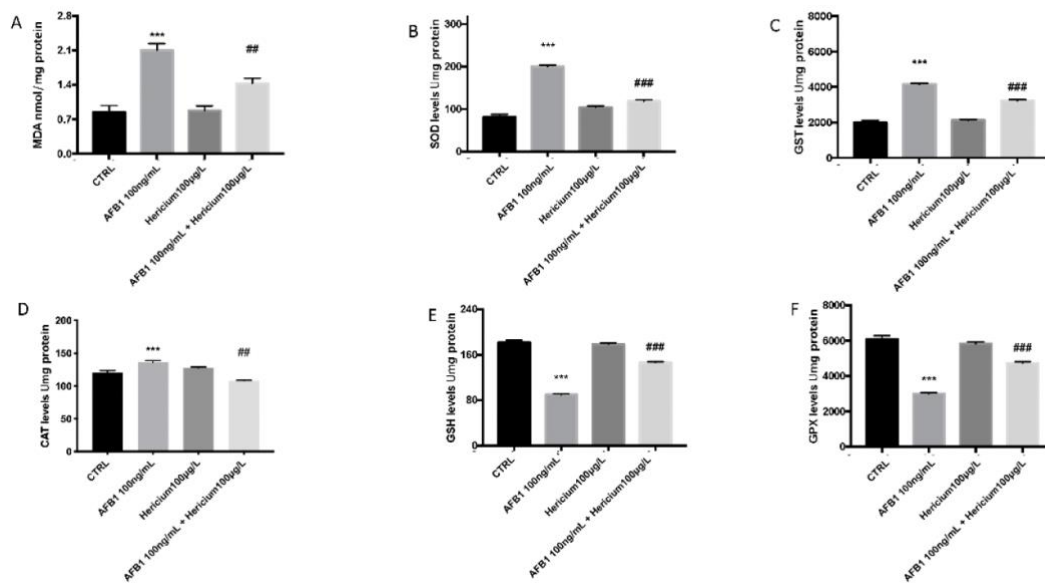


Figura 11. Effetti dell'esposizione ad AFB1 sulla MDA (A); attività di SOD (B), GST (C) CAT (D), GSH (E), e GPx (F) nello zebrafish larvale. Gli zebrafish embrionali sono stati esposti all'AFB1, all'Hericum e a entrambi contemporaneamente per 96 hpf. insieme per 96 hpf. I dati sono espressi come media SEM di quattro repliche (circa 20 larve per replica). L'asterisco rappresenta una differenza



statisticamente significativa rispetto ai controlli: \*\*\* a livello  $p < 0,001$ ; ## a livello  $p < 0,01$ ; ### a livello  $p < 0,001$

#### 7.2.4 Effetto preventivo di Hericium sul processo apoptotico indotto dall'AFB1 nelle larve di zebrafish

Per verificare se l'apoptosi fosse stata indotta negli embrioni di zebrafish in seguito all'esposizione all'AFB1, sono stati eseguiti saggi TUNEL per rilevare le cellule apoptotiche a 96 hpf. Negli embrioni trattati con AFB1 100 ng/mL, è stato rilevato un alto livello di apoptosi nel sacco vitellino, nel tronco e nella coda, mentre negli embrioni di controllo sono state osservate poche cellule marcate (Figura 12 A, B).

Il trattamento con Hericium è stato in grado di ridurre l'apoptosi in termini di cellule marcate dopo l'esposizione all'AFB1 (Figura 12C). Per valutare se l'AFB1 ha indotto l'apoptosi, sono stati esaminati anche i livelli di espressione della caspasi-9. I livelli di caspasi-9 sono risultati significativamente aumentati a 96hpf dopo il trattamento con AFB1 100 ng/mL, invece l'estratto Hericium è stato in grado di ridurre i livelli apoptotici della caspasi-9 a 96 hpf dopo l'esposizione a AFB1 (Figura 12D).

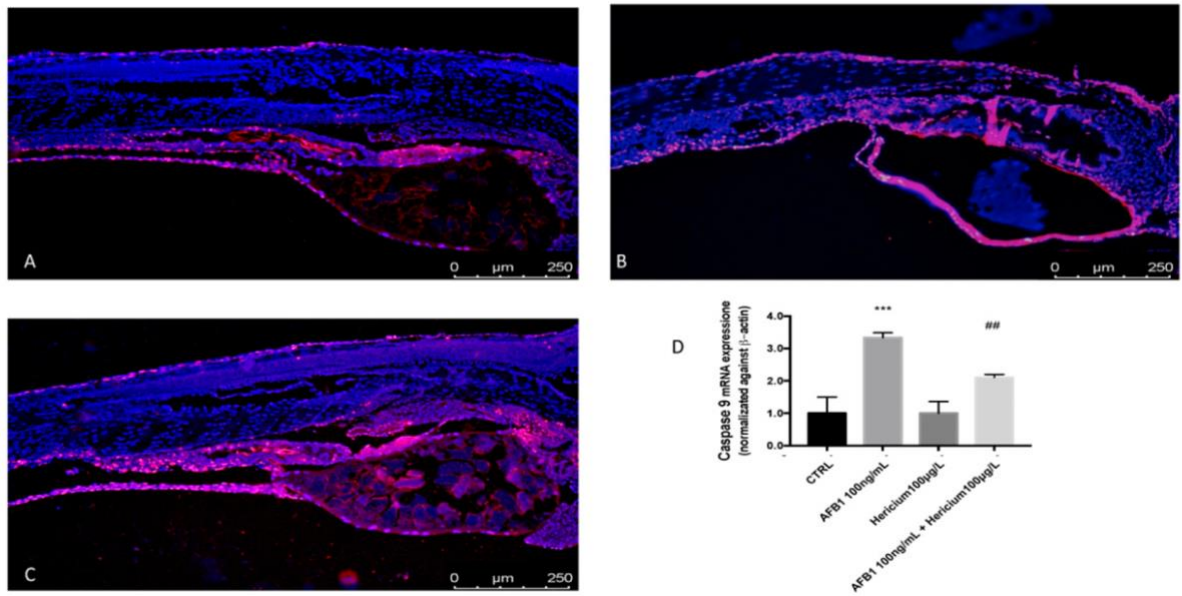


Figura 12. I saggi TUNEL hanno indicato un modello apoptotico anomalo (fluorescenza rossa) in zebrafish 100 ng/mL a 96 hpf. CTRL(A) AFB1 100ng/mL (B) e AFB1 100 ng/mL + Hericium 100µg/L (C). Espressione mRNA dei geni legati all'apoptosi caspasi-9 (D). L'asterisco rappresenta una differenza statisticamente significativa rispetto ai controlli: \*\*\* valore di  $p < 0,001$ ; ## a valore di  $p < 0,01$ .

## CAPITOLO 8. Discussione

Gli approcci a breve termine proposti per minimizzare l'esposizione di uomini, animali ed ecosistemi a diverse tipologie di inquinanti comprendono il monitoraggio degli stessi nell'ambiente e lo studio continuo e costante della loro influenza sulle specie viventi [158-160]. Tra i principali inquinanti ad oggi conosciuti, ritroviamo senza ombra di dubbio, i farmaci utilizzati negli ospedali, il BPA, Cd e Cr. Quest'ultimi in particolare negli ultimi anni sono stati ampiamente utilizzati per la realizzazione di un numero cospicuo di prodotti di consumo tra cui resine epossidiche, vernici e altri prodotti industriali [161, 162]. Ad oggi, sono stati condotti diversi studi sulla tossicità di BPA, Cd e Cr volti ad indagare i loro effetti avversi sulla salute umana ed animale, ma l'esposizione a questi agenti è stata sempre osservata singolarmente e mai in contemporanea. Nel settore dell'acquacoltura invece, uno dei problemi principali che interferiscono con la produttività ittica è la presenza di micotossine nei mangimi [163]. Tuttavia, ad oggi non esistono documenti che attestino con precisione il livello di aflatossine nelle acque di superficie a causa del loro carattere altamente idrofobico. In questo elaborato, utilizzando come modello sperimentale le larve di zebrafish, abbiamo voluto focalizzare la nostra attenzione su differenti contaminanti ambientali al fine di studiarne l'impatto sugli organismi.

In particolare, nel nostro primo studio, abbiamo valutato gli effetti dell'esposizione all'OXA. I risultati ottenuti tramite i ZFET hanno evidenziato che a 0,001 mg/L, i trattamenti con OXA non hanno mostrato alcun segno evidente di tossicità, mentre dosi di 0,1 e 0,5 mg/L hanno influenzato significativamente il tasso di schiusa e lo sviluppo dell'embrione di zebrafish con la comparsa di defezioni che comprendevano edemi al pericardio e malformazioni spinali. Come già dimostrato in altri studi, l'OXA è in grado di interferire e bloccare la sintesi proteica in maniera dose-dipendente [98]. Per questo motivo, è plausibile ritenere che questo meccanismo d'azione sia coinvolto anche nelle defezioni riscontrate nello sviluppo delle larve

e allo stesso tempo nella diminuzione del tasso di schiusa. I primi risultati ottenuti, ci hanno stimolato a proseguire con la nostra ricerca. Ed è per questo che nel secondo studio abbiamo valutato anche l'ipotesi che il BPA, il Cd ed il Cr insieme inneschino un aumento dei danni da stress ossidativo, in dosi singolarmente di norma non efficaci, il che introduce una concreta possibilità che esista un effetto additivo o sinergico tra questi inquinanti. L'esposizione al BPA a 10  $\mu\text{M}$  non ha mostrato segni evidenti di tossicità, mentre alla dose di 50  $\mu\text{M}$  ha fortemente ridotto la sopravvivenza ed il tasso di schiusa a 96 hpf. La combinazione di BPA, Cd e Cr, a dosi di per sé non tossiche, ha mostrato alterazioni nella vitalità cellulare e danno al DNA. Infatti, la co-esposizione di 10  $\mu\text{M}$  BPA e 0,5  $\mu\text{M}$  Cd o 0,5  $\mu\text{M}$  Cr ha aumentato l'incidenza di malformazioni quali lordosi spinale, edema pericardico ed ha portato ad una diminuzione della frequenza cardiaca. Inoltre, la riduzione della lunghezza corporea ha indicato che il BPA in combinazione con l'esposizione al Cd e al Cr potrebbe influenzare la crescita delle larve, il che potrebbe essere spiegato con un ritardo nello sviluppo e nella schiusa. In ultima analisi, volendo esplorare un altro importante contaminante, abbiamo utilizzato concentrazioni di aflatoxine vicine a quelle che si trovano nei mangimi commerciali e che sono note per la loro tossicità sulla base di studi precedentemente eseguiti durante le prime fasi dello sviluppo embrionale delle larve di zebrafish [140, 164]. In accordo con gli studi condotti in precedenza, abbiamo riscontrato che l'AFB1 è altamente tossica, in quanto aumenta l'incidenza della lordosi spinale, l'edema pericardico e una riduzione delle dimensioni della testa [165, 166].

Dopo la conferma dell'effettiva azione tossica di questi contaminanti da un punto di vista morfologico, abbiamo effettuato ulteriori analisi volte ad approfondire i meccanismi molecolari attraverso cui queste sostanze agiscono.

Uno dei principali pathway molecolari su cui abbiamo focalizzato la nostra attenzione è stato lo stress ossidativo. Diversi studi hanno riportato che lo stress ossidativo ha alla base due meccanismi d'azione: un aumento della generazione di ROS e una perdita delle difese antiossidanti cellulari [167, 168]. Tra i principali enzimi antiossidanti, fisiologicamente presenti

nelle cellule, che svolgono un ruolo in prima linea nella difesa contro lo stress ossidativo ritroviamo SOD e CAT.

La SOD è un enzima antiossidante in grado di proteggere l'organismo dai danni ossidativi causati dall'ambiente esterno, eliminare i ROS e prevenire la perossidazione lipidica [115]. In particolare, essa catalizza la conversione dell'anione superossido in ossigeno molecolare e perossido di idrogeno. La CAT è un enzima presente nei perossisomi, che catalizza la reazione del perossido di idrogeno ad acqua e ossigeno molecolare.

Nei nostri studi abbiamo riscontrato che l'esposizione a farmaci, interferenti endocrini, metalli pesanti e micotossine era in grado di alterare significativamente l'attività di questi importantissimi enzimi antiossidanti endogeni.

Risultati analoghi sono stati ottenuti anche nell'analisi di GSH, il più potente antiossidante endogeno non enzimatico, coinvolto nelle reazioni di detossificazione dei perossidi.

Le alterazioni indotte dallo stress ossidativo, non alterano solo l'attività degli enzimi antiossidanti, ma alterano tutta una serie di pathways molecolari, tra cui il più importante il pathway di NRF-2. È stato riportato che un gran numero di geni sono influenzati da Nrf2 nello zebrafish [112]. Inoltre, Nrf2 è una misura di adattamento delle cellule contro lo stress ossidativo indotto dal Cd [169] e anche dal Cr (VI), un precursore del Cr (III) prima di entrare a livello intracellulare [170]. Nel nostro studio, una diminuzione dei livelli di mRNA di Nrf2 è stata confermata sia nei gruppi esposti a BPA + Cd che BPA + Cr, rispetto al gruppo con solo BPA 10  $\mu$ M che invece non ha mostrato alcun effetto sull'Nrf2. Una diminuzione dell'espressione di Nrf2 nel nucleo si è tradotta con una diminuzione dei livelli di proteine antiossidanti, tra cui sod1, CAT e gstp2.

Alcuni tra i processi cellulari altamente influenzati dallo stress ossidativo coinvolgono la perossidazione lipidica e l'apoptosi. La perossidazione lipidica è un processo dovuto ai ROS, i

quali in carenza di un sono in grado di ossidare i lipidi innescando una serie di reazioni a catena, fino a coinvolgere anche le proteine del nucleo centrale ed il DNA.

L'apoptosi è un meccanismo di morte cellulare regolato e ha un ruolo chiave in diversi processi fisiologici e patologici [171]. Nel primo studio abbiamo dimostrato come l'esposizione a una dose di 0,5 mg/L di OXA induca un aumento dei markers legati al processo apoptotico. Infatti, l'esposizione all'OXA ha aumentato sia i livelli di geni legati all'apoptosi (caspasi-3 e bax) sia una diminuzione dell'espressione dell'mRNA del gene antiapoptotico bcl-2. Questo aumento dei marcatori apoptotici è accompagnato anche da un aumento della percentuale di morte cellulare osservato nelle larve esposte all'OXA. Risultati analoghi, sono stati ottenuti anche nello studio con BPA, Cd o Cr. Anche in questo, infatti, è stata rilevata attraverso l'analisi dei livelli di mRNA un aumento dei geni legati all'apoptosi Caspasi 3 e 9, Bax ed una diminuzione di Bcl-2. Studi precedenti hanno suggerito che la produzione di ROS indotta da ioni metallici agisce direttamente sui mitocondri per causare il rilascio di citocromo C dai mitocondri al citosol, che porta all'attivazione della caspasi-9 e all'apoptosi [172]. Le caspasi sono una grande famiglia di proteinasi che svolgono ruoli cruciali nel processo di apoptosi e sono considerate markers dell'apoptosi indotta dallo stress ossidativo negli embrioni di zebrafish [173]. I nostri dati hanno mostrato che l'esposizione BPA con Cd o Cr ha aumentato l'espressione dei geni target che inducono l'apoptosi e ha ridotto l'espressione del fattore anti-apoptotico Bcl-2. Questi risultati suggeriscono che l'induzione dell'apoptosi ha un ruolo chiave nella tossicità evolutiva degli EDC e dei metalli pesanti nelle prime fasi dello sviluppo dei pesci. L'induzione dell'apoptosi negli embrioni di zebrafish trattati con AFB1, è stata rilevata con il metodo TUNEL. Nel nostro studio, un significativo aumento del segnale apoptotico è stato osservato nel tronco, nel sacco vitellino e nella coda dopo l'esposizione all'AFB1.

Studi precedenti hanno suggerito che la produzione di ROS indotta dagli ioni metallici agisca direttamente sui mitocondri per provocare il rilascio di citocromo c dai mitocondri al citosol, che porta all'attivazione della caspasi-9 e all'apoptosi [172]. Altri studi invece hanno

dimostrato la capacità dell'AFB1 di attivare la via apoptotica intrinseca, che è normalmente regolata dall'attivazione della caspasi-9 [174]. Nel nostro elaborato, l'esposizione all'AFB1 porta a entrambe le vie, con conseguente induzione dell'apoptosi accompagnata da un significativo aumento dell'espressione della caspasi-9, in linea con quanto determinato in precedenza [175].

Dopo aver investigato in maniera particolare l'effetto tossico delle micotossine sulle larve di zebrafish abbiamo ipotizzato la riduzione della tossicità mediante un composto naturale estratto da un fungo.

In particolare ci siamo focalizzati sull'utilizzo dell'estratto di *Hericium erinaceus*, un fungo con note proprietà antitumorali, antiossidanti, antinfiammatorie e prebiotiche a livello gastro-enterico, per questo motivo infatti è il fungo di eccellenza per patologie infiammatorie e infettive che coinvolgono la mucosa del sistema digerente.

Come descritto in precedenza, i livelli di CAT, SOD e GST sono risultati significativamente più alti rispetto al gruppo di controllo dopo l'esposizione all'AFB1 a 96 hpf. Al contrario, a 96 hpf, *Hericium* è stato in grado di contrastare l'aumento ossidativo dei livelli di CAT, SOD e GST. I nostri risultati dunque dimostrano la capacità di *Hericium* di inibire le alterazioni derivate dallo stress ossidativo. Questa capacità di ridurre lo stress ossidativo indotto dall'AFB1 si riflette anche nella diminuzione del processo apoptotico e sulla diminuzione dell'espressione dell'mRNA della caspasi-9, spesso legata a una maggiore produzione di ROS.



## CAPITOLO 9. Conclusioni

In questa tesi abbiamo dimostrato che l'esposizione prolungata al chemioterapico oxaliplatino ha indotto tossicità nello sviluppo di larve di zebrafish in maniera dose-dipendente, anche a concentrazioni estremamente basse come dimostrato da un aumento nella mortalità, delle malformazioni morfologiche e un ritardo nella schiusa. Al giorno d'oggi sono molteplici i progressi della scienza analitica che consente la rilevazione di residui di farmaci presenti nell'ambiente e in tal modo di valutare anche l'eventuale eco-tossicità di numerosi prodotti e componenti farmaceutiche che penetrano nell'ambiente anche se a concentrazioni non elevate. Tuttavia, ulteriori studi di eco-farmacovigilanza sono necessari per massimizzare lo screening delle aree maggiormente contaminate e istituire dei protocolli atti al monitoraggio e alla eventuale rimozione di queste sostanze. Le nostre ricerche hanno inoltre suggerito come inquinanti ambientali differenti come metalli pesanti (Cd e Cr) e il BPA mostrino un effetto sinergico a dosi singolarmente non efficaci, promuovendo la diminuzione della difesa antiossidante e contrastando lo sviluppo embrionale delle larve. L'European Food Safety Authority (EFSA) è già al lavoro per produrre una nuova valutazione dei rischi per la salute pubblica connessi alla presenza di BPA negli alimenti, ed è prevista una valutazione finale alla fine del 2022. A completamento di questo elaborato abbiamo inoltre dimostrato che, l'esposizione a AFB1, una delle micotossine responsabili della contaminazione dei mangimi destinati ai pesci, interferisce fortemente con lo sviluppo larvale e induce mortalità dose dipendente. Il trattamento con estratti di *Hericium erinaceus*, un composto derivato da funghi, ha mostrato la caratteristica di ridurre lo stress ossidativo causato da esposizione a AFB1 in larve di zebrafish e allo stesso tempo riducendo l'apoptosi, suggerendo un possibile effetto protettivo di questo derivato bioattivo contro le intossicazioni da micotossine. Investire nella ricerca e nella produzione di estratti naturali biologicamente attivi potrebbe garantire un connubio ideale tra biotecnologie, ecosostenibilità e ambiente.

## BIBLIOGRAFIA

1. Zuccato, E., S. Castiglioni, and R. Fanelli, Identification of the pharmaceuticals for human use contaminating the Italian aquatic environment. *Journal of hazardous materials*, 2005. 122(3): p. 205-209.
2. Verhaar, H.J., C.J. Van Leeuwen, and J.L. Hermens, Classifying environmental pollutants. *Chemosphere*, 1992. 25(4): p. 471-491.
3. Suzuki, T., et al., Environmental pollutants and the immune response. *Nature Immunology*, 2020. 21(12): p. 1486-1495.
4. Lang, V., Polychlorinated biphenyls in the environment. *Journal of Chromatography A*, 1992. 595(1-2): p. 1-43.
5. Borja, J., et al., Polychlorinated biphenyls and their biodegradation. *Process biochemistry*, 2005. 40(6): p. 1999-2013.
6. Schecter, A., et al., Dioxins: an overview. *Environmental research*, 2006. 101(3): p. 419-428.
7. Kulkarni, P.S., J.G. Crespo, and C.A. Afonso, Dioxins sources and current remediation technologies—a review. *Environment international*, 2008. 34(1): p. 139-153.
8. Revich, B. and A. Shelepchikov, Environmental contamination with permanent organic pollutants and human health. *Gigiena i Sanitariia*, 2008(4): p. 26-32.
9. Schwetz, B., et al., Toxicology of chlorinated dibenzo-p-dioxins. *Environmental health perspectives*, 1973. 5: p. 87-99.

10. Hites, R.A., Dioxins: an overview and history. *Environmental science & technology*, 2011. 45(1): p. 16-20.
11. Birnbaum, L.S., The mechanism of dioxin toxicity: relationship to risk assessment. *Environmental health perspectives*, 1994. 102(suppl 9): p. 157-167.
12. Sorg, O., AhR signalling and dioxin toxicity. *Toxicology letters*, 2014. 230(2): p. 225-233.
13. Stellman, J.M., et al., A geographic information system for characterizing exposure to Agent Orange and other herbicides in Vietnam. *Environmental Health Perspectives*, 2003. 111(3): p. 321-328.
14. Marinković, N., et al., Dioxins and human toxicity. *Arhiv za higijenu rada i toksikologiju*, 2010. 61(4): p. 445-452.
15. Shi, Y., et al., Residues of organic chlorinated pesticides in agricultural soils of Beijing, China. *Archives of environmental contamination and toxicology*, 2005. 49(1): p. 37-44.
16. Ernst, W., Effects of pesticides and related organic compounds in the sea. *Helgoländer Meeresuntersuchungen*, 1980. 33(1): p. 301-312.
17. El-Shahawi, M., et al., An overview on the accumulation, distribution, transformations, toxicity and analytical methods for the monitoring of persistent organic pollutants. *Talanta*, 2010. 80(5): p. 1587-1597.
18. Khan, F., et al., Toxic and trace metals (Pb, Cd, Zn, Cu, Mn, Ni, Co and Cr) in dust, dustfall/soil. *Journal of the Chemical Society of Pakistan (Pakistan)*, 2004. 26.

19. Merian, E., Introduction on environmental chemistry and global cycles of chromium, nickel, cobalt beryllium, arsenic, cadmium and selenium, and their derivatives. 1984.
20. Spiegel, H., Trace element accumulation in selected bioindicators exposed to emissions along the industrial facilities of Danube Lowland. *Turkish Journal of Chemistry*, 2002. 26(6): p. 815-824.
21. Rabiou, S.Z. and R. Safianu, Assessment of heavy metals biomagnification in selected aquatic fauna from New Gusau Reservoir, Northern Nigeria. *Bayero Journal of Pure and Applied Sciences*, 2022. 13(1): p. 134-141.
22. Barbieri, M., The importance of enrichment factor (EF) and geoaccumulation index (Igeo) to evaluate the soil contamination. *J Geol Geophys*, 2016. 5(1): p. 1-4.
23. Malik, D. and P.K. Maurya, Heavy metal concentration in water, sediment, and tissues of fish species (*Heteropneustis fossilis* and *Puntius ticto*) from Kali River, India. *Toxicological & Environmental Chemistry*, 2014. 96(8): p. 1195-1206.
24. Luo, J., et al., Essential and nonessential elements in the red-crowned crane *Grus japonensis* of Zhalong Wetland, northeastern China. *Toxicological & Environmental Chemistry*, 2014. 96(7): p. 1096-1105.
25. Baatrup, E., Structural and functional effects of heavy metals on the nervous system, including sense organs, of fish. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Comparative Pharmacology*, 1991. 100(1-2): p. 253-257.
26. Sfakianakis, D., et al., Effect of heavy metals on fish larvae deformities: a review. *Environmental research*, 2015. 137: p. 246-255.

27. Wood, C.M., A.P. Farrell, and C.J. Brauner, Homeostasis and toxicology of essential metals. Vol. 1. 2012: Academic press.
28. Herut, B., et al., Environmental relaxation in response to reduced contaminant input: the case of mercury pollution in Haifa Bay, Israel. Marine pollution bulletin, 1996. 32(4): p. 366-373.
29. Aga, D.S., Fate of pharmaceuticals in the environment and in water treatment systems. 2007: CRC Press.
30. Boxall, A.B., et al., Pharmaceuticals and personal care products in the environment: what are the big questions? Environmental health perspectives, 2012. 120(9): p. 1221-1229.
31. Farré, M., M. Petrovic, and D. Barceló, Recently developed GC/MS and LC/MS methods for determining NSAIDs in water samples. Analytical and bioanalytical chemistry, 2007. 387(4): p. 1203-1214.
32. Barceló, D. and M. Petrovic, Emerging contaminants from industrial and municipal waste: removal technologies. Vol. 5. 2008: Springer.
33. La Farre, M., et al., Fate and toxicity of emerging pollutants, their metabolites and transformation products in the aquatic environment. TrAC Trends in Analytical Chemistry, 2008. 27(11): p. 991-1007.
34. Islas-Flores, H. and L.M. Gómez-Oliván, Legislation Controlling the Discharge of Pharmaceuticals into the Environment. Ecopharmacovigilance, 2017: p. 95-117.

35. Fick, J., et al., Contamination of surface, ground, and drinking water from pharmaceutical production. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 2009. 28(12): p. 2522-2527.
36. Kinney, C.A., et al., Presence and distribution of wastewater-derived pharmaceuticals in soil irrigated with reclaimed water. *Environmental Toxicology and Chemistry: An International Journal*, 2006. 25(2): p. 317-326.
37. López, M.d.C.A. La paradoja farmacéutica: anticancerosos basados en la hipoxia celular. Inhibidores PARP. in *Anales de la Real Sociedad Española de Química*. 2012. Real Sociedad Española de Química.
38. Custódio, J.A., et al., Tamoxifen and hydroxytamoxifen as intramembraneous inhibitors of lipid peroxidation. Evidence for peroxy radical scavenging activity. *Biochemical pharmacology*, 1994. 47(11): p. 1989-1998.
39. Vail, D.M. and E.G. Macewen, Spontaneously occurring tumors of companion animals as models for human cancer. *Cancer investigation*, 2000. 18(8): p. 781-792.
40. Lenz, K., et al., Presence of cancerostatic platinum compounds in hospital wastewater and possible elimination by adsorption to activated sludge. *Science of the Total Environment*, 2005. 345(1-3): p. 141-152.
41. Lenz, K., et al., Fate of cancerostatic platinum compounds in biological wastewater treatment of hospital effluents. *Chemosphere*, 2007. 69(11): p. 1765-1774.
42. Zounková, R., et al., Ecotoxicity and genotoxicity assessment of cytostatic pharmaceuticals. *Environmental Toxicology and Chemistry: An International Journal*, 2007. 26(10): p. 2208-2214.

43. Williams, T.D., et al., Evaluation of the reproductive effects of tamoxifen citrate in partial and full life-cycle studies using fathead minnows (*Pimephales promelas*). *Environmental Toxicology and Chemistry: An International Journal*, 2007. 26(4): p. 695-707.
44. Negreira, N., M.L. de Alda, and D. Barceló, Cytostatic drugs and metabolites in municipal and hospital wastewaters in Spain: filtration, occurrence, and environmental risk. *Science of the total environment*, 2014. 497: p. 68-77.
45. Roberts, P.H. and K.V. Thomas, The occurrence of selected pharmaceuticals in wastewater effluent and surface waters of the lower Tyne catchment. *Science of the Total Environment*, 2006. 356(1-3): p. 143-153.
46. Mater, N., et al., In vitro tests aiding ecological risk assessment of ciprofloxacin, tamoxifen and cyclophosphamide in range of concentrations released in hospital wastewater and surface water. *Environment International*, 2014. 63: p. 191-200.
47. Li, D., et al., Anticancer drugs in the aquatic ecosystem: Environmental occurrence, ecotoxicological effect and risk assessment. *Environment international*, 2021. 153: p. 106543.
48. Zain, M.E., Impact of mycotoxins on humans and animals. *Journal of Saudi chemical society*, 2011. 15(2): p. 129-144.
49. Schrader, S., F. Wolfarth, and E. Oldenburg, Biological control of soil-borne phytopathogenic Fungi and their mycotoxins by soil fauna a review. *Bulletin of University of Agricultural Sciences and Veterinary Medicine Cluj-Napoca. Agriculture*, 2013. 70: p. 291-298.

50. Marin, S., et al., Mycotoxins: Occurrence, toxicology, and exposure assessment. *Food and chemical toxicology*, 2013. 60: p. 218-237.
51. Bennett, J., Mycotoxins, mycotoxicoses, mycotoxicology and Mycopathologia. 1987, Springer. p. 3-5.
52. Imran, M., et al., Mycotoxins—a global one health concern: A review. *Agrobiological records*, 2020. 2: p. 1-16.
53. Shephard, G.S. Mycotoxins worldwide: current issues in Africa. in *Meeting the mycotoxin menace*. 2004. Wageningen Academic Wageningen, The Netherlands.
54. Schaarschmidt, S. and C. Fauhl-Hassek, The fate of mycotoxins during the processing of wheat for human consumption. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 2018. 17(3): p. 556-593.
55. Schatzmayr, G. and E. Streit, Global occurrence of mycotoxins in the food and feed chain: facts and figures. *World Mycotoxin Journal*, 2013. 6(3): p. 213-222.
56. Kovalsky, P., et al., Co-occurrence of regulated, masked and emerging mycotoxins and secondary metabolites in finished feed and maize—An extensive survey. *Toxins*, 2016. 8(12): p. 363.
57. Eskola, M., et al., Worldwide contamination of food-crops with mycotoxins: Validity of the widely cited 'FAO estimate' of 25%. *Critical reviews in food science and nutrition*, 2020. 60(16): p. 2773-2789.
58. Mitchell, N.J., et al., Potential economic losses to the US corn industry from aflatoxin contamination. *Food Additives & Contaminants: Part A*, 2016. 33(3): p. 540-550.



59. De Santis, B., et al., Development of a LC-MS/MS method for the multi-mycotoxin determination in composite cereal-based samples. *Toxins*, 2017. 9(5): p. 169.
60. Magan, N., A. Medina, and D. Aldred, Possible climate-change effects on mycotoxin contamination of food crops pre-and postharvest. *Plant pathology*, 2011. 60(1): p. 150-163.
61. Paterson, R.R.M. and N. Lima, How will climate change affect mycotoxins in food? *Food research international*, 2010. 43(7): p. 1902-1914.
62. Dirican, S., A review of effects of aflatoxins in aquaculture. *Appl. Res. J*, 2015. 1: p. 1191-1196.
63. Barbosa, T.S., et al., Mycobiota and mycotoxins present in finished fish feeds from farms in the Rio de Janeiro State, Brazil. *International Aquatic Research*, 2013. 5(1): p. 1-9.
64. Anater, A., et al., Mycotoxins and their consequences in aquaculture: A review. *Aquaculture*, 2016. 451: p. 1-10.
65. Caceres, I., et al., Aflatoxin biosynthesis and genetic regulation: A review. *Toxins*, 2020. 12(3): p. 150.
66. Fallah, A., et al., Mycoflora, aflatoxigenic strains of *Aspergillus* section *Flavi* and aflatoxins in fish feed. *Quality Assurance and Safety of Crops & Foods*, 2014. 6(4): p. 419-424.
67. Braunbeck, T., et al., Towards an alternative for the acute fish LC50 test in chemical assessment: the fish embryo toxicity test goes multi-species-an update. *ALTEX-Alternatives to animal experimentation*, 2005. 22(2): p. 87-102.

68. Kimmel, C.B., et al., Stages of embryonic development of the zebrafish. *Developmental dynamics*, 1995. 203(3): p. 253-310.
69. Amatruda, J.F., et al., Zebrafish as a cancer model system. *Cancer cell*, 2002. 1(3): p. 229-231.
70. Zhang, C., C. Willett, and T. Fremgen, Zebrafish: an animal model for toxicological studies. *Current Protocols in Toxicology*, 2003. 17(1): p. 1.7. 1-1.7. 18.
71. Driever, W., et al., A genetic screen for mutations affecting embryogenesis in zebrafish. *Development*, 1996. 123(1): p. 37-46.
72. Haffter, P., et al., The identification of genes with unique and essential functions in the development of the zebrafish, *Danio rerio*. *Development*, 1996. 123(1): p. 1-36.
73. Tanguay, R.L., et al., Identification and expression of alternatively spliced aryl hydrocarbon nuclear translocator 2 (ARNT2) cDNAs from zebrafish with distinct functions. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Gene Structure and Expression*, 2000. 1494(1-2): p. 117-128.
74. Parng, C., et al., Zebrafish: a preclinical model for drug screening. *Assay and drug development technologies*, 2002. 1(1): p. 41-48.
75. Fishman, M.C., Zebrafish--the canonical vertebrate. *Science*, 2001. 294(5545): p. 1290-1291.
76. Battle, H.I. and K.K. Hisaoka, Effects of ethyl carbamate (urethan) on the early development of the teleost *Brachydanio rerio*. *Cancer Research*, 1952. 12(5): p. 334-340.

77. HiSAOKA, K.K., The Effects of 2-Acetylaminofluorene on the Embryonic Development of the Zebrafish: II. Histochemical Studies. *Cancer Research*, 1958. 18(6): p. 664-667.
78. Vittozzi, L. and G. De Angelis, A critical review of comparative acute toxicity data on freshwater fish. *Aquatic toxicology*, 1991. 19(3): p. 167-204.
79. Veeneman, G., S. Van Leeuwen, and J. Van Boom, Iodonium ion promoted reactions at the anomeric centre. II An efficient thioglycoside mediated approach toward the formation of 1, 2-trans linked glycosides and glycosidic esters. *Tetrahedron letters*, 1990. 31(9): p. 1331-1334.
80. Ensenbach, U. and R. Nagel, Toxicity of complex chemical mixtures: Acute and long-term effects on different life stages of zebrafish (*Brachydanio rerio*). *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 1995. 30(2): p. 151-157.
81. Nakari, T. and M. Ruoppa, Tervakoski Oy: n jätevesien vaikutuksista seeprakalan mätiin ja kuoriutuneisiin poikasiin sekä kirjolohien elintoimintoihin. 1988.
82. Donnarumma, L., et al., Xenobiotic metabolizing enzyme systems in test fish: III. Comparative studies of liver cytosolic glutathione S-transferases. *Ecotoxicology and environmental safety*, 1988. 16(2): p. 180-186.
83. Lele, Z. and P. Krone, The zebrafish as a model system in developmental, toxicological and transgenic research. *Biotechnology advances*, 1996. 14(1): p. 57-72.
84. Burkhardt-Holm, P., et al., Toxicity of 4-chloroaniline in early life stages of zebrafish (*Danio rerio*): II. Cytopathology and regeneration of liver and gills after prolonged

- exposure to waterborne 4-chloroaniline. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 1999. 37(1): p. 85-102.
85. Wiegand, C., et al., Uptake, toxicity, and effects on detoxication enzymes of atrazine and trifluoroacetate in embryos of zebrafish. *Ecotoxicology and environmental safety*, 2000. 45(2): p. 122-131.
  86. Wiegand, C., et al., Toxicokinetics of atrazine in embryos of the zebrafish (*Danio rerio*). *Ecotoxicology and environmental safety*, 2001. 49(3): p. 199-205.
  87. Andreasen, E.A., et al., Tissue-specific expression of AHR2, ARNT2, and CYP1A in zebrafish embryos and larvae: effects of developmental stage and 2, 3, 7, 8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin exposure. *Toxicological Sciences*, 2002. 68(2): p. 403-419.
  88. Schulte, C. and R. Nagel, Testing acute toxicity in the embryo of zebrafish, *Brachydanio rerio*, as an alternative to the acute fish test: preliminary results. *Alternatives to Laboratory Animals*, 1994. 22(1): p. 12-19.
  89. Gu, J., et al., Titanium dioxide nanoparticle affects motor behavior, neurodevelopment and axonal growth in zebrafish (*Danio rerio*) larvae. *Science of the Total Environment*, 2021. 754: p. 142315.
  90. Dave, G., et al., Ring test of an embryo-larval toxicity test with zebrafish (*brachydanio rerio*) using chromium and zinc as toxicants. *Environmental Toxicology and Chemistry: An International Journal*, 1987. 6(1): p. 61-71.
  91. Dave, G. and R. Xiu, Toxicity of mercury, copper, nickel, lead, and cobalt to embryos and larvae of zebrafish, *Brachydanio rerio*. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 1991. 21(1): p. 126-134.

92. Henry, C.A., et al., Somites in zebrafish doubly mutant for knypek and trilobite form without internal mesenchymal cells or compaction. *Current Biology*, 2000. 10(17): p. 1063-1066.
93. Okamura, H., et al., Toxicity evaluation of new antifouling compounds using suspension-cultured fish cells. *Chemosphere*, 2002. 46(7): p. 945-951.
94. Poklar, N.a., et al., Influence of cisplatin intrastrand crosslinking on the conformation, thermal stability, and energetics of a 20-mer DNA duplex. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 1996. 93(15): p. 7606-7611.
95. Rudd, G., J. Hartley, and R. Souhami, Persistence of cisplatin-induced DNA interstrand crosslinking in peripheral blood mononuclear cells from elderly and young individuals. *Cancer chemotherapy and pharmacology*, 1995. 35(4): p. 323-326.
96. Osterauer, R., et al., Genotoxicity of platinum in embryos of zebrafish (*Danio rerio*) and ramshorn snail (*Marisa cornuarietis*). *Sci Total Environ*, 2011. 409(11): p. 2114-9.
97. Karas, B.F., et al., Cisplatin alkylating activity in zebrafish causes resistance to chorionic degradation and inhibition of osteogenesis. *Aquat Toxicol*, 2020. 229: p. 105656.
98. Raymond, E., et al. Oxaliplatin: mechanism of action and antineoplastic activity. in *Seminars in oncology*. 1998.
99. Jerremalm, E., Biotransformation of the antineoplastic drug oxaliplatin: Importance for effects and side effects. 2008: Institutionen för onkologi-patologi/Department of Oncology-Pathology.

100. Mezzelani, M., S. Gorbi, and F. Regoli, Pharmaceuticals in the aquatic environments: evidence of emerged threat and future challenges for marine organisms. *Marine environmental research*, 2018. 140: p. 41-60.
101. Aguirre-Martínez, G.V., T.A. DelValls, and M.L. Martín-Díaz, General stress, detoxification pathways, neurotoxicity and genotoxicity evaluated in *Ruditapes philippinarum* exposed to human pharmaceuticals. *Ecotoxicology and environmental safety*, 2016. 124: p. 18-31.
102. Aherne, G.W., A. Hardcastle, and A.H. Nield, Cytotoxic drugs and the aquatic environment: estimation of bleomycin in river and water samples. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 1990. 42(10): p. 741-742.
103. Alt, F., et al., A contribution to the ecology and enology of platinum. *Fresenius' journal of analytical chemistry*, 1997. 357(8): p. 1013-1019.
104. Chen, Y., et al., Sediment and salinity effects on the bioaccumulation of sulfamethoxazole in zebrafish (*Danio rerio*). *Chemosphere*, 2017. 180: p. 467-475.
105. Grabicova, K., et al., Bioaccumulation of psychoactive pharmaceuticals in fish in an effluent dominated stream. *Water research*, 2017. 124: p. 654-662.
106. Nakamura, Y., et al., The effects of pH on fluoxetine in Japanese medaka (*Oryzias latipes*): acute toxicity in fish larvae and bioaccumulation in juvenile fish. *Chemosphere*, 2008. 70(5): p. 865-873.
107. Ramirez, A.J., et al., Occurrence of pharmaceuticals and personal care products in fish: results of a national pilot study in the United States. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 2009. 28(12): p. 2587-2597.

108. Steinbach, C., et al., Toxic effects, bioconcentration and depuration of verapamil in the early life stages of common carp (*Cyprinus carpio* L.). *Science of the total environment*, 2013. 461: p. 198-206.
109. Isidori, M., et al., Chemical and toxicological characterisation of anticancer drugs in hospital and municipal wastewaters from Slovenia and Spain. *Environmental Pollution*, 2016. 219: p. 275-287.
110. Zhang, Y., et al., Liver fatty acid binding protein deficiency provokes oxidative stress, inflammation, and apoptosis-mediated hepatotoxicity induced by pyrazinamide in zebrafish larvae. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2016. 60(12): p. 7347-7356.
111. Zou, Y., et al., The synergistic anti-inflammatory activities of agaro-oligosaccharides with different degrees of polymerization. *Journal of Applied Phycology*, 2019. 31(4): p. 2547-2558.
112. Liu, Y., et al., Induction of time-dependent oxidative stress and related transcriptional effects of perfluorododecanoic acid in zebrafish liver. *Aquatic toxicology*, 2008. 89(4): p. 242-250.
113. Jin, Y., et al., Oxidative stress response and gene expression with atrazine exposure in adult female zebrafish (*Danio rerio*). *Chemosphere*, 2010. 78(7): p. 846-852.
114. Jin, Y., et al., Cypermethrin exposure during puberty induces oxidative stress and endocrine disruption in male mice. *Chemosphere*, 2011. 84(1): p. 124-130.
115. Jin, Y., et al., Embryonic exposure to cadmium (II) and chromium (VI) induce behavioral alterations, oxidative stress and immunotoxicity in zebrafish (*Danio rerio*). *Neurotoxicology and teratology*, 2015. 48: p. 9-17.

116. Bagchi, D., et al., Cadmium-and chromium-induced oxidative stress, DNA damage, and apoptotic cell death in cultured human chronic myelogenous leukemic K562 cells, promyelocytic leukemic HL-60 cells, and normal human peripheral blood mononuclear cells. *Journal of biochemical and molecular toxicology*, 2000. 14(1): p. 33-41.
117. Alghasham, A., T.A. Salem, and A.-R.M. Meki, Effect of cadmium-polluted water on plasma levels of tumor necrosis factor- $\alpha$ , interleukin-6 and oxidative status biomarkers in rats: protective effect of curcumin. *Food and Chemical Toxicology*, 2013. 59: p. 160-164.
118. Jones, I., P. Kille, and G. Sweeney, Cadmium delays growth hormone expression during rainbow trout development. *Journal of Fish Biology*, 2001. 59(4): p. 1015-1022.
119. Ma, W., et al., Tissue-specific cadmium and metallothionein levels in freshwater crab *Sinopotamon henanense* during acute exposure to waterborne cadmium. *Environmental Toxicology: An International Journal*, 2008. 23(3): p. 393-400.
120. Woo, S., et al., Effects of heavy metals on antioxidants and stress-responsive gene expression in Javanese medaka (*Oryzias javanicus*). *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 2009. 149(3): p. 289-299.
121. Li, Z.-H., et al., Effects of waterborne cadmium on thyroid hormone levels and related gene expression in Chinese rare minnow larvae. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 2014. 161: p. 53-57.
122. Bindhumol, V., K. Chitra, and P. Mathur, Bisphenol A induces reactive oxygen species generation in the liver of male rats. *Toxicology*, 2003. 188(2-3): p. 117-124.



123. Wu, M., et al., Oxidative stress in zebrafish embryos induced by short-term exposure to bisphenol A, nonylphenol, and their mixture. *Environmental toxicology and chemistry*, 2011. 30(10): p. 2335-2341.
124. Isani, G., et al., Effect of copper exposure on the antioxidant enzymes in bivalve mollusc *Scapharca inaequalvis*. *Veterinary research communications*, 2003. 27(1): p. 691-693.
125. Vale, G., et al., Bioavailability of cadmium and biochemical responses on the freshwater bivalve *Corbicula fluminea*—the role of TiO<sub>2</sub> nanoparticles. *Ecotoxicology and environmental safety*, 2014. 109: p. 161-168.
126. Ken, C.-F., et al., Characterization of fish Cu/Zn-superoxide dismutase and its protection from oxidative stress. *Marine biotechnology*, 2003. 5(2): p. 167-173.
127. Cao, L., et al., Accumulation and oxidative stress biomarkers in Japanese flounder larvae and juveniles under chronic cadmium exposure. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 2010. 151(3): p. 386-392.
128. Won, E.-J., J.-S. Lee, and Y.-M. Lee, Combined effects of cadmium and copper on the expression of antioxidant enzyme—Coding genes in the polychaete, *Perinereis nuntia*. *Toxicology and Environmental Health Sciences*, 2013. 5(1): p. 26-33.
129. Won, E.-J., et al., Three novel superoxide dismutase genes identified in the marine polychaete *Perinereis nuntia* and their differential responses to single and combined metal exposures. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 2014. 107: p. 36-45.
130. Matés, J.M., et al., Roles of dioxins and heavy metals in cancer and neurological diseases using ROS-mediated mechanisms. *Free Radical Biology and Medicine*, 2010. 49(9): p. 1328-1341.

131. Richetti, S.K., et al., Acetylcholinesterase activity and antioxidant capacity of zebrafish brain is altered by heavy metal exposure. *Neurotoxicology*, 2011. 32(1): p. 116-122.
132. Jaishankar, M., et al., Toxicity, mechanism and health effects of some heavy metals. *Interdisciplinary toxicology*, 2014. 7(2): p. 60.
133. Lesley, R. and L. Ramakrishnan, Insights into early mycobacterial pathogenesis from the zebrafish. *Current opinion in microbiology*, 2008. 11(3): p. 277-283.
134. Brundo, M.V., et al., Toxicity evaluation of new engineered nanomaterials in zebrafish. *Frontiers in physiology*, 2016. 7: p. 130.
135. Di Paola, D., et al., Aflatoxin B1 Toxicity in Zebrafish Larva (*Danio rerio*): Protective Role of *Hericium erinaceus*. *Toxins*, 2021. 13(10): p. 710.
136. Kuder, R.S. and H.P. Gundala, Developmental toxicity of deltamethrin and 3-phenoxybenzoic acid in embryo–larval stages of zebrafish (*Danio rerio*). *Toxicology mechanisms and methods*, 2018. 28(6): p. 415-422.
137. Li, J., et al., Xiaoaiping induces developmental toxicity in zebrafish embryos through activation of ER stress, apoptosis and the Wnt pathway. *Frontiers in pharmacology*, 2018. 9: p. 1250.
138. Deng, J., et al., Hexabromocyclododecane-induced developmental toxicity and apoptosis in zebrafish embryos. *Aquatic Toxicology*, 2009. 93(1): p. 29-36.
139. Stucki, G. and M. Alexander, Role of dissolution rate and solubility in biodegradation of aromatic compounds. *Applied and Environmental Microbiology*, 1987. 53(2): p. 292-297.

140. Gugliandolo, E., et al., Evaluation of neuroprotective effects of quercetin against aflatoxin B1-intoxicated mice. *Animals*, 2020. 10(5): p. 898.
141. Mary, V.S., et al., Reactive oxygen species sources and biomolecular oxidative damage induced by aflatoxin B1 and fumonisin B1 in rat spleen mononuclear cells. *Toxicology*, 2012. 302(2-3): p. 299-307.
142. Shen, H.-M., et al., Detection of elevated reactive oxygen species level in cultured rat hepatocytes treated with aflatoxin B1. *Free Radical Biology and Medicine*, 1996. 21(2): p. 139-146.
143. Barrera, G., S. Pizzimenti, and M.U. Dianzani, Lipid peroxidation: control of cell proliferation, cell differentiation and cell death. *Molecular aspects of Medicine*, 2008. 29(1-2): p. 1-8.
144. Fusco, R., et al., Biochemical Evaluation of the Antioxidant Effects of Hydroxytyrosol on Pancreatitis-Associated Gut Injury. *Antioxidants (Basel)*, 2020. 9(9).
145. Cordaro, M., et al., Cashew (*Anacardium occidentale* L.) Nuts Modulate the Nrf2 and NLRP3 Pathways in Pancreas and Lung after Induction of Acute Pancreatitis by Cerulein. *Antioxidants (Basel)*, 2020. 9(10).
146. Rajput, S.A., et al., Ameliorative effects of grape seed proanthocyanidin extract on growth performance, immune function, antioxidant capacity, biochemical constituents, liver histopathology and aflatoxin residues in broilers exposed to aflatoxin B1. *Toxins*, 2017. 9(11): p. 371.

147. Hao, S., et al., Selenium alleviates aflatoxin B1-induced immune toxicity through improving glutathione peroxidase 1 and selenoprotein S expression in primary porcine splenocytes. *Journal of agricultural and food chemistry*, 2016. 64(6): p. 1385-1393.
148. D'Amico, R., et al., *Herichium erinaceus* and *coriolus versicolor* modulate molecular and biochemical changes after traumatic brain injury. *Antioxidants*, 2021. 10(6): p. 898.
149. Jang, H.-J., et al., The neuroprotective effect of *Herichium erinaceus* extracts in mouse hippocampus after pilocarpine-induced status epilepticus. *International journal of molecular sciences*, 2019. 20(4): p. 859.
150. Trovato, A., et al., Redox modulation of cellular stress response and lipoxin A4 expression by *Herichium Erinaceus* in rat brain: Relevance to Alzheimer's disease pathogenesis. *Immunity & Ageing*, 2016. 13(1): p. 1-11.
151. Sun, S.-K., et al., Effect of Water and Ethanol Extracts from *Herichium erinaceus* Solid-State Fermented Wheat Product on the Protection and Repair of Brain Cells in Zebrafish Embryos. *Molecules*, 2021. 26(11): p. 3297.
152. Bambino, K. and J. Chu, Zebrafish in toxicology and environmental health. *Current topics in developmental biology*, 2017. 124: p. 331-367.
153. Shen, C. and Z. Zuo, Zebrafish (*Danio rerio*) as an excellent vertebrate model for the development, reproductive, cardiovascular, and neural and ocular development toxicity study of hazardous chemicals. *Environmental Science and Pollution Research*, 2020. 27(35): p. 43599-43614.

154. Lomba, L., et al., Acute and subacute effects of drugs in embryos of *Danio rerio*. QSAR grouping and modelling. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 2019. 172: p. 232-239.
155. OECD, Test No. 236: Fish Embryo Acute Toxicity (FET) Test. 2013.
156. Gugliandolo, E., et al., Protective effect of silibinin on lipopolysaccharide-induced inflammatory responses in equine peripheral blood mononuclear cells, an in vitro study. *Animals*, 2020. 10(11): p. 2022.
157. Cai, G., et al., The effects of cobalt on the development, oxidative stress, and apoptosis in zebrafish embryos. *Biological trace element research*, 2012. 150(1): p. 200-207.
158. Hylland, K., et al., Integrated chemical and biological assessment of contaminant impacts in selected European coastal and offshore marine areas. *Marine environmental research*, 2017. 124: p. 130-138.
159. Vethaak, A.D., et al., Integrated indicator framework and methodology for monitoring and assessment of hazardous substances and their effects in the marine environment. *Marine environmental research*, 2017. 124: p. 11-20.
160. Klatte, S., H.-C. Schaefer, and M. Hempel, Pharmaceuticals in the environment—a short review on options to minimize the exposure of humans, animals and ecosystems. *Sustainable Chemistry and Pharmacy*, 2017. 5: p. 61-66.
161. Kortenkamp, A., Ten years of mixing cocktails: a review of combination effects of endocrine-disrupting chemicals. *Environmental health perspectives*, 2007. 115(Suppl 1): p. 98-105.

162. Kocaoba, S. and G. Akcin, Removal of chromium (III) and cadmium (II) from aqueous solutions. *Desalination*, 2005. 180(1-3): p. 151-156.
163. Bryden, W.L., Mycotoxin contamination of the feed supply chain: Implications for animal productivity and feed security. *Animal Feed Science and Technology*, 2012. 173(1-2): p. 134-158.
164. Pauletto, M., et al., Curcumin mitigates AFB1-induced hepatic toxicity by triggering cattle antioxidant and anti-inflammatory pathways: A whole transcriptomic in vitro study. *Antioxidants*, 2020. 9(11): p. 1059.
165. Cheng, Y.-C., et al., Aflatoxin B1 interferes with embryonic liver development: Involvement of p53 signaling and apoptosis in zebrafish. *Toxicology*, 2021. 458: p. 152844.
166. Park, S., et al., Neurotoxic effects of aflatoxin B1 on human astrocytes in vitro and on glial cell development in zebrafish in vivo. *Journal of hazardous materials*, 2020. 386: p. 121639.
167. Baillie, T.A. and A.E. Rettie, Role of biotransformation in drug-induced toxicity: influence of intra-and inter-species differences in drug metabolism. *Drug metabolism and pharmacokinetics*, 2010: p. 1010210091-1010210091.
168. Leung, L., A.S. Kalgutkar, and R.S. Obach, Metabolic activation in drug-induced liver injury. *Drug metabolism reviews*, 2012. 44(1): p. 18-33.
169. Zheng, J.-L., et al., Acute exposure to waterborne cadmium induced oxidative stress and immunotoxicity in the brain, ovary and liver of zebrafish (*Danio rerio*). *Aquatic toxicology*, 2016. 180: p. 36-44.

170. Shaw, P., et al., Environmentally relevant concentration of chromium activates Nrf2 and alters transcription of related XME genes in liver of zebrafish. *Chemosphere*, 2019. 214: p. 35-46.
171. Cole, L. and L. Ross, Apoptosis in the developing zebrafish embryo. *Developmental biology*, 2001. 240(1): p. 123-142.
172. Pulido, M.D. and A.R. Parrish, Metal-induced apoptosis: mechanisms. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 2003. 533(1-2): p. 227-241.
173. Wolf, B.B. and D.R. Green, Suicidal tendencies: apoptotic cell death by caspase family proteinases. *Journal of Biological Chemistry*, 1999. 274(29): p. 20049-20052.
174. Dey, D.K. and S.C. Kang, Aflatoxin B1 induces reactive oxygen species-dependent caspase-mediated apoptosis in normal human cells, inhibits *Allium cepa* root cell division, and triggers inflammatory response in zebrafish larvae. *Science of The Total Environment*, 2020. 737: p. 139704.
175. Liu, Y. and W. Wang, Aflatoxin B1 impairs mitochondrial functions, activates ROS generation, induces apoptosis and involves Nrf2 signal pathway in primary broiler hepatocytes. *Animal Science Journal*, 2016. 87(12): p. 1490-1500.

## RINGRAZIAMENTI

A conclusione di questo elaborato, desidero ringraziare con tutto me stesso le persone, senza le quali questo lavoro di tesi non sarebbe stato possibile. Prima fra tutti, il mio Tutor, la Professoressa Nunziacarla Spanò, che in questi tre anni di lavoro, con la sua immensa pazienza, i suoi indispensabili consigli, e le conoscenze trasmesse durante tutto il percorso mi ha aiutato a crescere lavorativamente ed umanamente.

Un grazie particolare anche a tutti i miei colleghi del laboratorio. Avete lasciato un'impronta indelebile nella mia vita e non lo dimenticherò mai.

Ringrazio di cuore la mia famiglia: siete il pilastro su cui posso sempre poggiarmi, la luce che posso sempre guardare nel buio, la strada che posso seguire quando mi sento perso. Grazie per avermi sempre sostenuto e per avermi permesso di portare a termine gli studi.

A te, Elisa, che sei sempre stata al mio fianco anche quando, magari, non lo meritavo.

Ultimo ma non meno importante, vorrei dedicare questo piccolo traguardo a me stesso, alla persona che ero, alla persona che sono, alla persona che sarò. Che possa essere l'inizio di una lunga e brillante carriera professionale.