

ALMA MATER STUDIORUM
UNIVERSITÀ DI BOLOGNA

SCUOLA DI SCIENZE

Corso di laurea magistrale in ANALISI E GESTIONE DELL'AMBIENTE

Campus di Ravenna

**POTENZIALI EFFETTI DEL BISFENOLO A
SUL PROCESSO DI PLACENTAZIONE UMANA**

Tesi di Laurea in
Fisiologia Applicata all'Ambiente

Relatore

Prof.ssa Elena FABBRI

Presentata da

Marilin PROFITA

Correlatore

Dott.ssa Paola VALBONESI

| | |
|---|-----------|
| 1. INTRODUZIONE | 1 |
| <i>1.1. IL BISFENOLO A (BPA)</i> | 2 |
| 1.1.1. Caratteristiche chimiche | 2 |
| 1.1.2. Impiego | 2 |
| 1.1.3. Presenza in ambiente | 3 |
| 1.1.4. Metabolismo del BPA ed effetti sulla salute umana | 4 |
| 1.1.5. Quadro di riferimento normativo sul BPA | 8 |
| <i>1.2. LA PLACENTAZIONE</i> | 11 |
| 1.2.1. Formazione della placenta | 11 |
| 1.2.2. Il trofoblasto villosa ed extravillosa | 13 |
| 1.2.3. Ruolo degli ormoni nella placentazione | 14 |
| <i>1.3. VIA DI SEGNALAZIONE CELLULARE: MAPK</i> | 16 |
| 1.3.1. Vie di trasduzione del segnale | 16 |
| 1.3.2. Le ERK 1/2 | 18 |
| 2. SCOPO DELLA TESI | 21 |
| 3. MATERIALI E METODI | 23 |
| <i>3.1. COLTURE CELLULARI</i> | 23 |
| 3.1.1. Scongellamento delle cellule | 25 |
| 3.1.2. Mantenimento della coltura cellulare | 25 |
| 3.1.3. Congelamento delle cellule | 27 |
| 3.1.4. Semina delle cellule per gli esperimenti | 27 |
| <i>3.2. ESPOSIZIONE DELLE CELLULE A BISFENOLO A</i> | 28 |
| <i>3.3. TEST DI VALUTAZIONE DEL'ESTROGENICITA': E-SCREEN</i> | 29 |
| 3.3.1. Vitalità cellulare: test MTT | 29 |
| <i>3.4. SAGGIO DI MIGRAZIONE</i> | 31 |
| <i>3.5. VALUTAZIONE DELL'ATTIVAZIONE DELLE VIE DI TRASDUZIONE DEL SEGNALE MEDIATE DALLE MAPK TRAMITE WESTERN BLOTTING</i> | 33 |
| 3.5.1. Preparazione del campione | 33 |
| 3.5.2. Dosaggio delle proteine | 34 |
| 3.5.3. Western blotting | 35 |
| 3.5.4. Preparazione dei gel per elettroforesi | 35 |

| | | |
|-----------|---|-----------|
| 3.5.5. | Elettroforesi dei campioni | 37 |
| 3.5.6. | Trasferimento | 38 |
| 3.5.7. | Rivelazione immunologica | 39 |
| 3.5.8. | Rivelazione con chemiluminescenza | 40 |
| 3.5.9. | Analisi densitometrica | 41 |
| 3.6. | <i>ANALISI STATISTICA</i> | 41 |
| 4. | RISULTATI | 42 |
| 4.1. | <i>VALUTAZIONE DEGLI EFFETTI ESTROGENICI DEL BISFENOLO A SULLE CELLULE HTR-8/SVneo</i> | 42 |
| 4.2. | <i>VALUTAZIONE DELLA CAPACITÀ MIGRATORIA DELLE CELLULE HTR-8/SVneo IN PRESENZA DI BISFENOLO A</i> | 44 |
| 4.3. | <i>VALUTAZIONE DELL'ATTIVAZIONE DELLA VIA DI TRASDUZIONE DEL SEGNALE REGOLATO DALLE MAPK (ERK 1/2) IN PRESENZA DI BISFENOLO A</i> | 46 |
| 5. | DISCUSSIONE | 49 |
| 6. | CONCLUSIONI | 53 |
| 7. | BIBLIOGRAFIA | 54 |
| 8. | SITOGRAFIA | 59 |

1. INTRODUZIONE

Ogni giorno vengono immesse in ambiente un numero elevato di sostanze inquinanti rilasciate dalle attività industriali e agricole, le quali possono rappresentare un rischio per la salute dell'uomo, e a causa della loro ubiquità l'esposizione risulta difficile da evitare.

Particolare preoccupazione deriva da quelle sostanze, definite come "interferenti endocrini", che possono interferire e mimare le azioni di ormoni naturali e causare effetti avversi sul normale funzionamento dell'organismo.

Il sistema endocrino regola una moltitudine di processi di sviluppo, metabolismo e riproduzione inclusi lo sviluppo embrionale, la formazione delle gonadi, la differenziazione sessuale, la crescita e la digestione. Gli interferenti endocrini possono influenzare questi processi mediante l'adesione o il blocco dei recettori ormonali (Flint et al. 2012). Infatti i tessuti del sistema riproduttivo femminile, essendo altamente sensibili agli ormoni durante alcune fasi del ciclo ovarico e della gravidanza, sono spesso mirati da sostanze chimiche simili agli estrogeni. In tale contesto, l'esposizione perinatale ad alcune sostanze, in particolare quelle con attività estrogenica, nei tessuti e nei fluidi umani può avere conseguenze di lunga durata in periodi vulnerabili della fase riproduttiva (Newbold et al. 2009).

Esempi di sostanze implicate nell'interferenza endocrina sono i pesticidi/biocidi utilizzati nell'agricoltura, plastificanti/tensioattivi usati nelle industrie chimiche e gli estrogeni sintetici trovati negli alimenti (Bechi et al. 2013). Negli ultimi anni, tra le sostanze potenzialmente contaminanti coinvolte nell'interferenza endocrina, il Bisfenolo A ha ricevuto una maggiore attenzione a causa i suoi effetti negativi sulla salute.

1.1. IL BISFENOLO A (BPA)

1.1.1. Caratteristiche chimiche

Il Bisfenolo A, noto anche come *2,2-bis(4-idrossifenil)propano* (formula chimica $C_{15}H_{16}O_2$, numero CAS 85-05-7, numero EC 201-245-8), è un composto organico aromatico appartenente al gruppo dei fenoli, con peso molecolare di 228,29 g/cm³, punto di fusione di 156° C e punto di ebollizione di 220°C (a pressione di 5 hPa), mostra una buona solubilità nei grassi e bassa solubilità in acqua (Michałowicz 2014).

È sostanza solida bianca e cristallina la cui struttura molecolare (Figura 1) è costituita da un atomo di carbonio tetraedrico centrale con 2 gruppi metilici e 2 gruppi fenolici (Corrales et al. 2015). La presenza di questi gruppi ne determina una buona reattività.

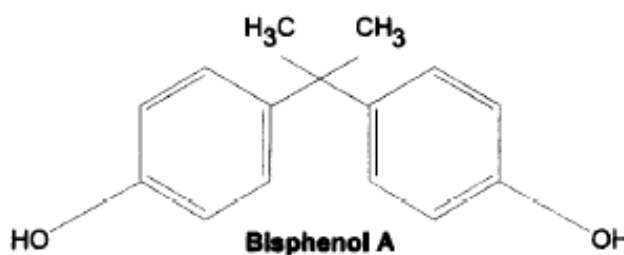


Figura 1: Struttura molecolare del Bisfenolo A (BPA).

1.1.2. Impiego

Il BPA è stato sintetizzato per la prima volta nel 1891 da A.P. Dianin durante alcuni studi sulla ricerca di estrogeni sintetici, ma successivamente sostituito dal Dietilstilbestrolo per i suoi effetti estrogenici più potenti rispetto al BPA (Rubin 2011).

A partire dagli anni '40 il suo impiego ha trovato largo uso commerciale nell'industria delle plastiche. È ampiamente utilizzato come precursore di molti prodotti di resine epossidiche, plastiche in policarbonato e ritardanti di fiamma. Il prodotto finale include adesivi, giocattoli, biberon, bicchieri, bottiglie e contenitori di stoccaggio, apparecchiature mediche ed elettroniche, tubi e sigillanti dentali (Vandenberg et al. 2007).

Nel 2003 la produzione globale di BPA è stata di 3,2 milioni di tonnellate, di cui circa un terzo è stato fabbricato negli Stati Uniti. Il consumo globale di BPA nel 2011 ha superato i 5,5 milioni di tonnellate

(Flint et al. 2012). In tutto il mondo, il BPA genera circa 1 milione di dollari al giorno per aziende come Bayer, Dow Chemical Company, General Electric Plastics e Sunoco Incorporated (Erler e Novak 2010).

1.1.3. Presenza in ambiente

La presenza di BPA in ambiente è collegata esclusivamente all'attività antropica, ma dato il suo largo impiego risulta difficile definire quale sia la fonte principale di esposizione della popolazione; tuttavia, è possibile determinare le modalità d'ingresso del BPA nell'ambiente e nel cibo.

I modi più importanti che contribuiscono alla presenza di BPA nell'ambiente sono la produzione, il trattamento e la trasformazione, nonché la degradazione (idrolisi) di vari polimeri compresi resine epossidiche e policarbonati, il che determina il rilascio di monomeri di BPA in ecosistemi e alimenti. (Michałowicz 2014).

La maggior parte delle contaminazioni nei prodotti alimentari è causata dalla migrazione da contenitori realizzati con BPA. Le resine epossidiche prodotte con BPA vengono utilizzate come vernici per rivestire superfici metalliche a contatto con alimenti e bevande, mentre le plastiche in policarbonato vengono utilizzate in contenitori per alimenti e bevande. (Kang et al. 2006). Il calore e il contatto con composti acidi o basici accelerano l'idrolisi del legame estere che collega le molecole di BPA presente in policarbonato e resine, come avviene nel processo di pastorizzazione e conservazione, nella sterilizzazione, nel riscaldamento a microonde, o nel riscaldamento prima della cottura e il lavaggio dei contenitori, che provocano un aumento della perdita di BPA nei prodotti che vengono consumati. Molecole che non sono completamente polimerizzate durante il processo produttivo, o durante l'uso, possono perdere queste materie plastiche in normali condizioni di utilizzo o essere liberate da polimeri esposti a riscaldamento o spazzolatura o ad una gamma specifica di pH (Mannelli et al. 2015), e restano a contatto con il cibo.

Il BPA è presente anche nell'aria e nelle acque potabili. A causa dello smaltimento di rifiuti di plastica e di metalli, il BPA rappresenta un contaminante importante anche nelle discariche (vom Saal e Hughes 2005) (Erler e Novak 2010). Inoltre l'uso di BPA nelle resine che ricoprono i tubi idrici e serbatoi di stoccaggio per l'acqua sono una fonte plausibile di contaminazione.

Ulteriori fonti di esposizioni a tale sostanza chimica sono rappresentati dalle carte termiche utilizzate per molti scopi, tra cui ricevute e biglietti.

I filtri per sigarette contengono anche livelli relativamente elevati di BPA e quindi possono essere una fonte significativa di esposizione umana. I componenti della sigaretta possono essere assorbiti

nel flusso sanguigno attraverso l'inalazione e l'assorbimento tramite le membrane della mucosa nella bocca e nel tratto respiratorio.

Il BPA è anche un componente di un certo numero di prodotti di consumo realizzati in policarbonato, inclusi occhiali da vista, CD e DVD, stoviglie e utensili in plastica e attrezzature sportive. L'esposizione al BPA può anche avvenire nei bambini che manipolano i giocattoli, tipicamente fatti di plastica in cloruro di polivinile (PVC), esso si trova anche nei detersivi per uso domestico, nei prodotti per la cura personale, nei dispositivi medici e in altre apparecchiature mediche (Vandenberg et al. 2013).

1.1.4. Metabolismo del BPA ed effetti sulla salute umana

L'ingestione è considerata la via principale di esposizione al BPA nell'uomo, e dopo l'ingestione, si pensa che questo venga rapidamente metabolizzato nel fegato dall'uridina 5'-difosfoglicuroniltransferasi (UGT), che catalizza la glucuronazione del BPA (Figura 2), ed infine eliminato dal corpo tramite le urine (Konieczna et al. 2015).

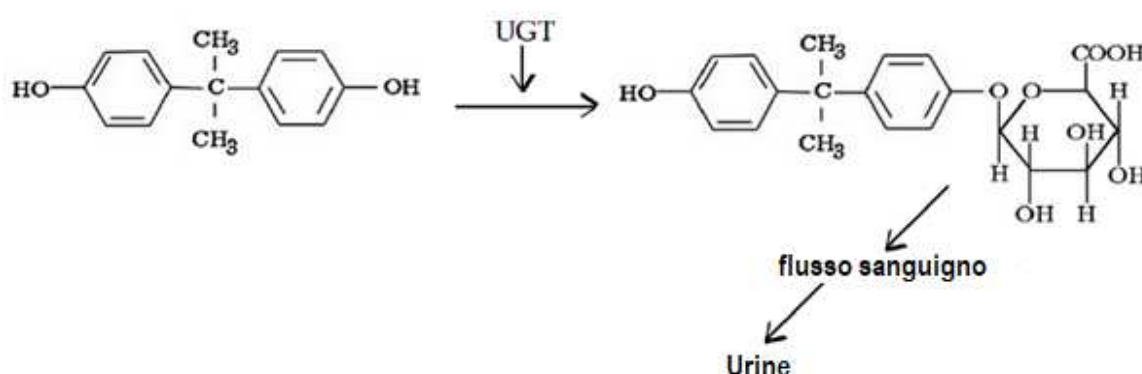


Figura 2: meccanismo di glucuronazione del BPA.

Gli effetti del BPA variano con la dose e con il tempo di esposizione. Il comitato scientifico della Commissione europea ha calcolato nel 2002 che l'assunzione giornaliera di BPA è di circa 1,6 µg/kg di peso corporeo/giorno per i bambini, 1,2 µg/kg di peso corporeo/giorno per i bambini di 4-6 anni e di 0,4 µg/kg di peso corporeo/giorno per gli adulti (European Commission Directorate 2002).

I livelli di dose attualmente accettati dalle autorità di regolamentazione come No Adverse Effect Level (NOAEL)¹ e su cui è tollerabile l'assunzione giornaliera negli Stati Uniti e in Europa è di 5mg/kg di peso corporeo/giorno.

Di seguito vengono elencati i principali meccanismi di azione del BPA e i conseguenti effetti:

➤ Effetti sui recettori degli estrogeni:

Il BPA è un noto interferente endocrino. Esso imita l'azione degli estrogeni con conseguenti effetti negativi sulla riproduzione. La sua azione estrogenica è stata valutata sia negli studi *in vivo* che *in vitro*. È stato dimostrato che il BPA si comporta in modo analogo al 17-β-estradiolo (E2), un estrogeno naturale, e interagisce con i recettori degli estrogeni (ER) attraverso le vie di segnalazione dipendenti dal recettore stesso, in concentrazioni inferiori rispetto all'E2 (Michałowicz 2014).

Sulla membrana cellulare, i recettori ER legano le molecole di BPA formando dei complessi molecolari attivati che interagiscono con altre proteine di segnalazione, le quali mediano gli eventi di trasduzione del segnale, tra cui l'attivazione di segnali extra-nucleari che si traducono nella fosforilazione di ERK/MAPK e AKT. Questi processi sono alla base della morte cellulare e dell'equilibrio della proliferazione regolata da E2.

Un altro esempio di azione del BPA sui ERα è il rilascio di ioni calcio (Ca²⁺) dai depositi intracellulari che può portare a cambiamenti nella motilità cellulare, nei processi di segnalazione e nell'esocitosi. In particolare, nelle cellule pancreatiche, il BPA stimola la produzione del glucagone e attiva dei meccanismi trasduzionali che portano all'apertura di canali di Ca²⁺ influenzandone le oscillazioni della concentrazione citosolica. Fisiologicamente tale fenomeno si verifica quando i livelli di glucosio ematico si abbassano, di conseguenza una sovra-stimolazione causata dal BPA può determinare un aumento della glicemia. La conseguenza fisiologica di queste modulazioni dei meccanismi di azione di E2 indotte dal BPA è diversa in dipendenza del tessuto esaminato.

Il BPA e altri interferenti endocrini mostrano affinità di legame elevate anche per il recettore di transmembrana accoppiato alla proteina G (GPR30), riconosciuto come un recettore per gli estrogeni. (Acconcia et al. 2015).

Recenti studi hanno rilevato il BPA nel plasma materno e fetale, nella placenta, nel liquido amniotico e nel fluido follicolare (Balakrishnan et al. 2010). È stato rilevato anche nel sangue del cordone ombelicale (0,2-9,2 ng/mL), indicando il passaggio del BPA attraverso la barriera placentare, nei tessuti placentari (fino a 104,9 ng/g) e nel liquido amniotico (0-8,38 ng/ml) (Mørck et al. 2010).

¹ NOAEL: No Adverse Effect Level è un parametro che esprime la dose massima che può essere somministrata senza che si osservino effetti avversi.

Secondo uno studio condotto da Rajakumar et al., elevate concentrazioni placentali di BPA sono associate alla preeclampsia² ed elevati livelli plasmatici di BPA sono legati ad aborti spontanei ricorrenti e alla restrizione della crescita intrauterina (Rajakumar et al. 2015).

Pertanto il BPA gioca un ruolo centrale nella patogenesi di diversi disturbi endocrini, tra cui infertilità femminile e maschile, pubertà precoce, tumori ormone-dipendenti come il cancro alla mammella e alla prostata e diversi disturbi metabolici tra cui la sindrome dell'ovaio policistico (Konieczna et al. 2015).

➤ Effetti sugli ormoni tiroidei:

Gli ormoni tiroidei, tra cui la tiroxina (T4) e la triiodotironina (T3), sono essenziali per il normale sviluppo comportamentale, intellettuale e neurologico (Moriyama et al. 2002).

Nel meccanismo genomico, T3 accede al nucleo della cellula per legare con il recettore dell'ormone tiroideo (THR), che disimpegna i corepressori in favore dei coattivatori all'elemento reattivo dell'ormone tiroideo. A sua volta, si verifica la trascrizione del gene ormonale reattivo.

Il BPA riduce il legame del T3 ai THR nucleari e recluta i corepressori dei recettori nucleari al THR, determinando un'inibizione trascrizionale (Acconcia et al. 2015).

➤ Relazione con il diabete di tipo 2:

Esiste una relazione tra esposizione al BPA e diabete di tipo 2. Esso interferisce con il secondo e meno noto sistema di trasduzione dell'E2, che ha luogo attraverso recettori di membrana. In questo modo, come lo stesso E2, può causare un rilevante aumento del rilascio di insulina che, prolungato nel tempo, causa a sua volta la resistenza a livello recettoriale tipica del diabete di tipo 2. Questa alterazione si verifica attraverso un effetto diretto sulle cellule pancreatiche ma anche da una compromissione della trasduzione del segnale dell'insulina a livello dei tessuti periferici (muscolo, fegato, tessuto adiposo) (Fenichel et al. 2013).

➤ Incidenza del cancro:

Alcuni studi hanno riportato una correlazione tra l'aumento dei livelli di BPA nell'ambiente e l'incidenza del cancro nell'uomo. Precedenti studi avevano già identificato il BPA come un mitogeno per tumori ormone-dipendenti come il cancro ovarico.

² Preeclampsia: patologia clinica associata alla presenza di edema, proteinuria o ipertensione nelle donne gravide.

Il BPA esercita la sua attività biologica nelle cellule del carcinoma ovarico attraverso l'attivazione di diverse vie di segnalazione, tra cui le proteine chinasi attivate da mitogeni (MAPK/ERK), e il fosfatidilinositolo 3-chinasi (PI3K/Akt) (Ptak et al. 2014).

➤ Effetti legati all'obesità:

Nell'uomo, benché rapidamente metabolizzato nel fegato in glucuronati o sulfo-coniugati inattivati e teoricamente immediatamente eliminato per escrezione renale, è stato dimostrato che il BPA si accumula nel tessuto adiposo. È stato dimostrato da studi *in vitro* che basse dosi di BPA inibiscono la secrezione di adiponectina nelle cellule di adipociti umani e stimolano la secrezione di interleulina 6 e TNF α , due adipochine infiammatorie, suggerendo il suo possibile coinvolgimento nell'obesità. Negli adipociti si ha un aumento del trasporto di glucosio, attivato dall'insulina, stimolando l'espressione del trasportatore di glucosio GLUT4 nella membrana cellulare.

Infatti, al giorno d'oggi l'esposizione al BPA è emersa come un possibile fattore di rischio in grado di accelerare lo sviluppo dell'obesità e la sindrome metabolica (Fenichel et al. 2013).

➤ Effetti sui recettori non classici:

Per quanto riguarda il coinvolgimento dei recettori degli estrogeni di membrana non classici, alcuni dei principali recettori legati al BPA sono i recettori aril-idrocarburi, recettori attivati dal proliferatore del perossisoma e recettori toll-like. Questi recettori sono espressi nella maggior parte delle cellule immunitarie; cellule dendritiche, macrofagi, cellule B e sottogruppi di cellule T. Ciò consente al BPA di agire sui recettori di molte diverse cellule immunitarie del sistema immunitario innato e adattativo (Xu et al. 2016).

1.1.5. Quadro di riferimento normativo sul BPA

L'Unione Europea per quanto riguarda la regolamentazione delle sostanze chimiche si basa sulle politiche del regolamento europeo n. 1907/2006, meglio definito come REACH (Registrazione, Valutazione, Autorizzazione e Restrizione delle sostanze chimiche).

Le sostanze chimiche utilizzate nella produzione alimentare invece sono gestite separatamente dall'Autorità europea per la sicurezza alimentare (EFSA).

Il REACH è stato proposto nel 2001 e successivamente adottato dalla commissione europea il 1° giugno 2007 con l'obiettivo di mettere a punto tutti i regolamenti precedenti e introdurre nuovi requisiti; è entrato in vigore in ciascun stato membro dell'UE ma, tuttavia, gli stati membri possono applicare norme più restrittive secondo le proprie leggi e sistemi.

La normativa previgente distingueva le sostanze in:

- “esistenti”, immesse sul mercato prima del 1981
- nuove, immesse dopo il 1981.

Mentre per le “nuove” era necessario effettuare alcuni test tossicologici prima della loro immissione sul mercato, per le sostanze “esistenti” tali informazioni non erano richieste, per cui mancavano informazioni di base sulle proprietà chimico-fisiche e sugli aspetti tossicologici e ambientali; inoltre vi erano differenze di applicazione tra i vari Stati membri, ponendo ostacoli agli scambi commerciali.

La valutazione e controllo del rischio tossicologico da sostanze chimiche era a carico della Commissione Europea e degli stati Membri (Regolamento CE 793/93; Regolamento CE 1488/94).

Attualmente l'EFSA fornisce ai gestori del rischio dell'Unione europea (Commissione europea, Parlamento europeo, Stati membri) consulenza scientifica sotto forma di valutazione del rischio, e assistenza tecnica di vario genere in relazione alle sostanze chimiche presenti negli alimenti e nei mangimi.

Prima che le sostanze chimiche possano essere autorizzate nell'UE per l'impiego negli alimenti e nei mangimi, l'EFSA esegue rigorose valutazioni del rischio per determinare quali sostanze possono essere usate in sicurezza e in quali concentrazioni.

Vengono sottoposti a valutazione del rischio anche i contaminanti che sono considerati una possibile fonte di preoccupazione per la salute umana e/o animale. I gestori del rischio possono adottare misure per limitare l'esposizione umana e animale a tali sostanze se l'EFSA indica l'esistenza di loro potenziali effetti nocivi sulla salute.

In base al REACH, le norme chimiche e i requisiti di segnalazione sono diversi per i prodotti chimici prodotti a maggiori volumi e per le sostanze chimiche considerate pericolose (sostanze altamente preoccupanti o SVHC). Per qualsiasi sostanza chimica importata o prodotta in quantità superiori a

1000 kg all'anno, il REACH richiede un processo di registrazione completo. Questa registrazione richiede al produttore o all'importatore di presentare dati specifici sulle proprietà della sostanza chimica. Per le sostanze prodotte o importate in quantità superiori a 10.000 kg all'anno, come il BPA, occorre condurre una valutazione più intensa della sicurezza chimica (European Commission, 2011). Fino a qualche anno fa, il BPA non era considerato un SVHC sulla base del regolamento REACH poiché non vi era alcuna prova della sua "tossicità, cancerogenicità, persistenza o bioaccumulabilità" (Plastics Europe, 2012) e quindi considerato sicuro per i consumatori e per l'ambiente.

Nel 2006 L'EFSA effettua la sua prima valutazione completa dei rischi sul BPA e stabilisce una dose giornaliera tollerabile (DGT) di 0,05 mg/kg di peso corporeo/ giorno (mg/kg pc/d) per questa sostanza (<http://www.efsa.europa.eu/it/topics/topic/bisphenol>).

Nel giugno del 2016 il Comitato degli stati membri dell'ECHA, Agenzia Europea per i prodotti chimici, ha riconosciuto il BPA, già classificato nella lista delle "sostanze estremamente preoccupanti" ai sensi del regolamento REACH per la sua tossicità sul sistema riproduttivo, come *interferente endocrino* (<https://echa.europa.eu/-/msc-unanimously-agrees-that-bisphenol-a-is-an-endocrine-disruptor>).

L'Autorità europea per la sicurezza alimentare ha inoltre condotto ampie valutazioni di rischio sull'uso di BPA come materiale di contatto alimentare. Le relazioni pubblicate nel 2007, nel 2008 e nel 2010 hanno concluso che gli usi correnti di BPA negli imballaggi alimentari non rappresentavano un rischio sostanziale per l'uomo (European Food Safety Authority, 2010).

Per far fronte alle numerose richieste di valutazione riguardo gli effetti del BPA, l'UE ha introdotto vari regolamenti in cui impone delle restrizioni in merito al suo uso:

- Regolamento (CE) n. 1935/2004 del Parlamento europeo e del Consiglio riguardante i materiali e gli oggetti destinati a venire a contatto con i prodotti alimentari: stabilisce i requisiti generali per i materiali e oggetti a contatto con gli alimenti cui questi devono rispondere.
- Regolamento (CE) 1223/2009 del Parlamento europeo e del consiglio sui prodotti cosmetici: inserisce il BPA nell'elenco di sostanze vietate nei prodotti cosmetici.
- Regolamento (UE) n. 10/2011 della Commissione riguardante i materiali e gli oggetti di materia plastica destinati a venire a contatto con i prodotti alimentari: si autorizza l'uso del BPA come monomero in materiali plastici a contatto con alimenti.

- Regolamento di esecuzione (UE) n. 321/2011 della Commissione che modifica il regolamento (UE) n. 10/2011 per quanto riguarda le restrizioni d'uso del Bisfenolo A nei biberon di plastica: ha posto una restrizione sull'uso del BPA nella fabbricazione di biberon per l'infanzia sulla base del principio di precauzione.
- Regolamento (UE) 2016/2235 della Commissione che modifica l'allegato XVII del regolamento (CE) n. 1907/2006 del Parlamento europeo e del Consiglio concernente la registrazione, la valutazione, l'autorizzazione e la restrizione delle sostanze chimiche (REACH) per quanto riguarda il Bisfenolo A: prevede che non sia ammessa l'immissione sul mercato di carta termica con BPA in concentrazione uguale o superiore allo 0,02 % in peso dopo il 2 gennaio 2020.

Non soddisfatti della mancanza di vigilanza da parte di REACH e EFSA, diversi paesi europei (Austria, Danimarca e Svezia) hanno tuttavia stabilito restrizioni nazionali sull'uso di materiali a base di BPA in applicazioni di plastica a contatto con alimenti per quanto riguarda neonati e bambini piccoli. Queste restrizioni nazionali vanno oltre la legislazione europea.

Da gennaio 2015, la Francia ha imposto una restrizione nazionale all'uso del BPA in tutti i materiali a contatto con gli alimenti e ne vieta la fabbricazione, l'importazione e la commercializzazione di qualsiasi prodotto relazionato con l'alimentazione contenente BPA (plastics europe, 2012).

1.2. LA PLACENTAZIONE

1.2.1. Formazione della placenta

La placenta rappresenta la principale sede di scambio di sostanze nutritive e gas tra la madre e il feto. Essa svolge funzioni di protezione, nutrizione, respirazione, escrezione e produzione di ormoni.

È un organo transitorio nel quale si possono distinguere due componenti:

- una *componente fetale della placenta*, che corrisponde al corion villoso,
- una *componente materna della placenta*, che deriva dall'endometrio.

La placenta agisce per fornire l'ossigeno, l'acqua, i carboidrati, gli amminoacidi, i lipidi, le vitamine, i minerali e altri nutrienti al feto, mentre rimuove l'anidride carbonica e altri prodotti di scarto (K. L. Moore et al. 2017). Può aiutare a proteggere il feto contro alcune molecole xenobiotiche, infezioni e malattie materne. Inoltre rilascia gli ormoni nelle circolazioni materne e fetali per mantenere la gravidanza, il metabolismo, la crescita fetale, il parto e altre funzioni (Gude et al. 2004).

A causa della sua posizione strategica nell'utero, essa agisce come una barriera protettiva materno-fetale con l'ambiente esterno. La contaminazione materna con sostanze ambientali può verificarsi mediante assorbimento cutaneo, ingestione di alimenti contaminati o acqua e respirando l'aria contaminata. Pertanto risulta importante valutare la potenziale tossicità di sostanze chimiche inquinanti che possono entrare in contatto con quest'organo (Caserta et al., 2011).

A seguito della fecondazione, lo zigote si dirige verso la cavità uterina e tramite varie divisioni cellulari raggiunge lo stadio di blastocisti (Figura 3), quest'ultimo è caratterizzato da un uno strato cellulare interno, o massa cellulare interna, da cui si origina l'embrione e uno strato cellulare esterno, o trofoblasto, da cui si originano gli annessi embrionali.

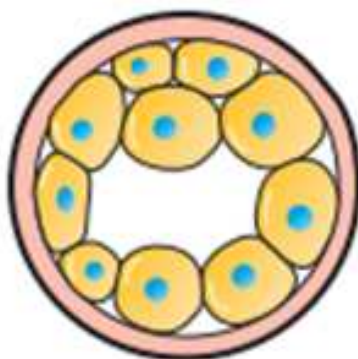


Figura 3: immagine raffigurativa dello stadio di blastocisti.
Fonte:(K. L. Moore et al. 2017).

Raggiunta la cavità uterina, inizia la fase di impianto dell'embrione in cui si verifica l'adesione e l'annidamento della blastocisti nell'endometrio materno. Questo processo è favorito dalle interazioni tra le cellule di trofoblasto e l'endometrio e avviene in un periodo di tempo limitato definito come "finestra di ricettività". Affinché avvenga l'impianto dell'embrione è necessario che le cellule dell'endometrio vengano convertite in decidua (Lunghi et al. 2007).

La decidua corrisponde alla parte dell'endometrio gravidico, e rappresenta la parte di endometrio che si separa dal resto dell'utero dopo il parto; essa è distinta in tre regioni in base al rapporto con la sede dell'impianto:

- La decidua basale, che è quella parte della decidua sottostante al feto che prende stretti rapporti con la placenta (la cosiddetta componente materna della placenta), posta tra miometrio e blastocisti;
- La decidua capsulare, che è quella parte di decidua sovrastante l'embrione che ricopre la blastocisti dopo l'annidamento;
- La decidua parietale, ovvero la decidua rimanente e riveste la parte restante della cavità uterina.

Questa conversione prende il nome di reazione deciduale o decidualizzazione.

Subito dopo l'attaccamento, inizia la placentazione con proliferazione delle cellule di trofoblasto e formazione di uno strato interno di cellule mononucleate rivolto verso l'embrione, detto citotrofoblasto, e uno strato esterno o sinciziotrofoblasto, derivato dalla fusione delle cellule del citotrofoblasto, che secerne enzimi idrolitici i quali degradano la matrice extracellulare endometriale e mediante alcuni prolungamenti citoplasmatici penetra tra le cellule endometriali separandole in modo da favorire l'impianto definitivo dell'embrione (Figura 4).

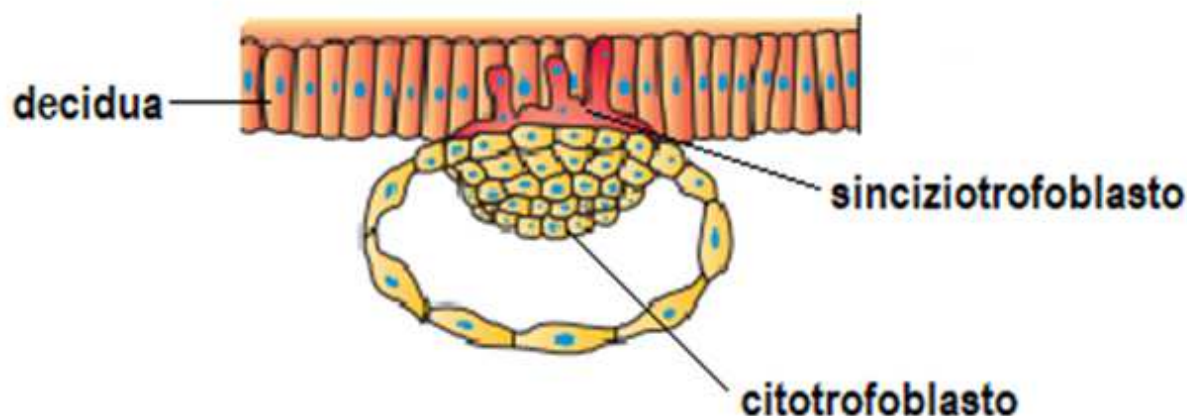


Figura 4: l'immagine mostra la fase di impianto in cui le cellule di trofoblasto iniziano a proliferare. Fonte: (K. L. Moore et al. 2017).

Terminata la fase d'impianto della blastocisti, il sinciziotrofoblasto si estende nell'epitelio endometrico e invade il tessuto connettivo. Si iniziano a formare numerose reti lacunari che si ampliano e confluiscono dando origine così alla circolazione utero-placentale.

Questa rete di lacune costituirà in seguito lo spazio intervilloso dove si riverserà il sangue dei vasi materni in erosione progressiva da parte del trofoblasto. Il sangue materno inizia a circolare dentro e fuori queste reti e permette il nutrimento dell'embrione (Gude et al. 2004).

Le cellule citotrofoblastiche specializzate invadono ulteriormente l'endometrio fino a formare i villi coriali necessari per scambi tra il feto e la madre. In questo modo, la placenta assume progressivamente e temporaneamente le funzioni finali dei polmoni fetali (scambio gassoso), del tratto gastrointestinale (assorbimento dei nutrienti) e dei reni (regolazione del volume dei fluidi ed eliminazione dei metaboliti dei rifiuti) mentre questi organi si stanno sviluppando (Donnelly e Campling 2008).

1.2.2. Il trofoblasto villosa ed extravilloso

Dopo l'impianto e l'inizio della placentazione, le cellule di trofoblasto subiscono un'estesa proliferazione e differenziazione. Dal citotrofoblasto si differenziano due tipi cellulari differenti (Figura 5):

- il *trofoblasto villosa*
- il *trofoblasto extravilloso*.

Nel fenotipo villosa, le cellule citotrofoblastiche rimangono attaccate alla membrana basale, formando un monostrato di cellule epiteliali che proliferano e si differenziano per fusione per formare il sinciziotrofoblasto che copre l'intera superficie dei villi. Il sinciziotrofoblasto è impegnato nell'assorbimento, nello scambio e in specifiche funzioni endocrine; quindi, il trofoblasto villosa costituisce la barriera funzionale tra sangue materno e stroma fetale.

Nel fenotipo extravilloso, le cellule citotrofoblastiche proliferano, si staccano dalla membrana basale e si aggregano in colonne cellulari per attaccarsi alla parete uterina. Da lì, le singole cellule migrano nella decidua e nel miometrio, rimodellando l'endometrio gravidico e la sua vascolarizzazione (Malassiné e Cronier 2002) (Evain-Brion e Malassine 2003).

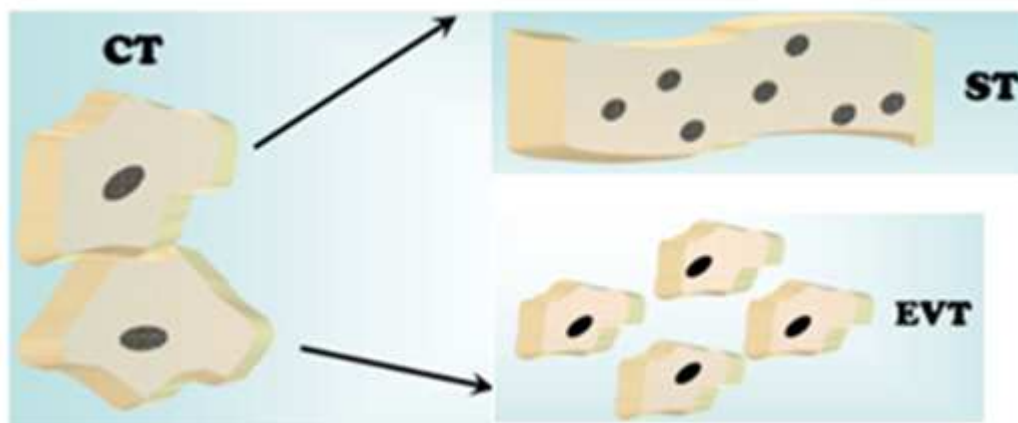


Figura 5: rappresentazione schematica della differenziazione del citotrofoblasto in sinciziotrofoblasto e trofoblasto extravilloso. Fonte: (Lunghi et al. 2007).

Le cellule di trofoblasto extravilloso entrano prima nella decidua e successivamente nello stroma miometrico (trofoblasto interstiziale), dove si fondono per diventare cellule giganti del letto placentare. Successivamente invadono il lume delle arterie per sostituire l'endotelio andando ad incrementare il flusso sanguigno e i nutrienti nella placenta (trofoblasto endoteliale) (Lunghi et al. 2007).

1.2.3. Ruolo degli ormoni nella placentazione

In aggiunta alla funzione di barriera preposta agli scambi materno-fetali, la placenta è implicata nella produzione di ormoni peptidici, quali la gonadotropina corionica, l'ormone somatotropico placentare, l'ormone tireotropo placentare, e ormoni steroidei, quali estrogeni e progesterone (P4) (Gootwine 2004).

In preparazione all'impianto dell'embrione, come precedentemente susposto, l'epitelio uterino si differenzia per un breve periodo in uno stato ricettivo per consentire l'adesione e l'invasione della blastocisti seguita da una reazione deciduale delle cellule stromali dell'endometrio. Questa differenziazione endometriale è principalmente regolata dagli ormoni ovari quali P4 ed estrogeni (Grümmer e Winterhager 2011). In questa fase gli estrogeni possono contribuire alla stimolazione della differenziazione delle cellule di trofoblasto attraverso i recettori degli estrogeni (ER). L'espressione di ER è una caratteristica tipica delle cellule sensibili agli estrogeni, le quali potrebbero essere stimulate a proliferare e modulare funzioni differenziate (Bukovsky et al. 2003). Di conseguenza l'aumento significativo della produzione di 17- β estradiolo (E2) e P4, che si verifica con

l'avanzamento della gravidanza, può giocare un ruolo nella stimolazione della differenziazione delle cellule di trofoblasto e promuovere la funzione placentare.

Durante la gravidanza, il P4 e l'E2 sono largamente prodotti dall'unità feto-placentare fino al termine. Questi ormoni regolano la produzione di fattori di crescita, citochine e molecole di adesione che alterano la superficie endometriale e aprono la finestra dell'impianto.

Il principale modulatore della fase proliferativa è l'E2, che provoca la crescita e l'ispessimento dell'endometrio. Il P4 induce la differenziazione cellulare nell'endometrio iniziato dall'estrogeno E2 durante la fase secretoria; prepara anche le cellule epiteliali per l'attaccamento della blastocisti e provoca la decidualizzazione delle cellule endometriali (Mannelli et al. 2015).

Nella parete uterina sono presenti diversi tipi di leucociti come linfociti T, alcuni linfociti B, macrofagi e cellule natural-killer. Quest'ultime si pensa abbiano un ruolo principale nella modulazione dell'impianto e della placentazione, in quanto interagiscono con le cellule stromali della decidua e con il trofoblasto. Il reclutamento di queste cellule è controllato e dipende dalla presenza di P4.

La proliferazione, migrazione ed invasività delle cellule trofoblastiche extravilluose sono regolate da segnali autocrini e paracrini vari come fattori di crescita, proteine e proteoglicani leganti i fattori di crescita e proteine della matrice extracellulare rilasciati dalle cellule del trofoblasto e della decidua, rispettivamente (Lunghi et al. 2007).

Il sinciziotrofoblasto esercita un ruolo cruciale negli scambi materno-fetali e secreta numerosi ormoni tra cui l'ormone di rilascio della corticotropina, la gonadotropina corionica, la leptina, il trasportatore di glucosio, l'aromatasi, l'ormone lattogeno placentare, l'11 β -deidrogenasi isoenzima 2, gli estrogeni e il P4 che sono necessari per il trofismo dell'endometrio (Rajakumar et al. 2015).

Numerosi studi hanno dimostrato che l'E2 può modulare la produzione di numerosi ormoni placentari, in particolare esso stimola la produzione della gonadotropina corionica e l'ormone somatotropico placentare e la formazione del sinciziotrofoblasto. Tali effetti sono dose dipendenti e specifici.

1.3. VIA DI SEGNALAZIONE CELLULARE: MAPK

1.3.1. Vie di trasduzione del segnale

Gli ormoni sopracitati come l'estradiolo, il progesterone, gli ormoni che regolano la placenta, o le sostanze xenobiotiche, come il BPA, agiscono come stimoli extracellulari attraverso dei recettori proteici specifici presenti sulla membrana plasmatica. Questi recettori si legano al segnale molecolare, lo amplificano e trasmettono l'informazione all'interno della cellula.

Esistono sei tipi generali di segnalazione biologica: le proteine della membrana plasmatica che agiscono tramite 1) i recettori accoppiati alle proteine G, 2) i recettori con attività tirosina chinasi, 3) i recettori con attività guanilina ciclasi, 4) i canali ionici controllati, 5) i recettori di adesione e 6) i recettori nucleari. I primi tre meccanismi, in particolare, sono quelli che agiscono tramite l'espressione di una proteina chinasi (PK).

Le PK appartengono ad un gruppo di proteine che, in risposta ad un segnale, modificano altre proteine aggiungendo loro un gruppo fosfato, ovvero permettono la fosforilazione. La stimolazione delle PK comporta la trasmissione del segnale attraverso l'attivazione a cascata di numerose molecole conosciute come MAPK.

Le proteine chinasi attivate da mitogeni³ (MAPK) sono un gruppo di proteine serina/treonina chinasi (Ser/Thr) che convertono gli stimoli extracellulari in un'ampia gamma di risposte cellulari. Tutte le cellule eucariotiche possiedono percorsi MAPK multipli, che regolano in modo coordinato l'espressione genica, la mitosi, il metabolismo, la motilità, la sopravvivenza, l'apoptosi e la differenziazione (Cargnello e Roux 2011).

Le vie delle MAPK che coinvolgono una serie di reazioni di proteine chinasi (la cosiddetta cascata della MAP chinasi) svolgono un ruolo fondamentale nella regolazione della proliferazione cellulare (Zhang e Liu 2002).

Nei mammiferi sono stati identificati 14 tipi di MAPK divisi in tre gruppi principali: la famiglia delle ERK (Extracellular Regulated Kinase), la famiglia delle MAP chinasi p38, e la famiglia delle JNK (c-Jun N-terminal kinases) o meglio note come SAPK (stress-activated protein kinase) (Figura 6).

Ogni gruppo di MAPK è composto da un sottogruppo di tre chinasi evolutivamente conservate e in sequenza: una MAPK, una MAPK-chinasi (MAPKK) e una MAPKK-chinasi (MAPKKK). Le MAPKKK, che sono proteine Ser/Thr chinasi, sono spesso attivate come risultato della fosforilazione dei residui di treonina (Thr) e tirosina (Tyr) in un motivo -TXY⁴- che è comune alla maggior parte

³ I mitogeni sono segnali extracellulari che inducono la mitosi e la divisione cellulare.

⁴ Il motivo X indica un generico amminoacido diverso da treonina e tirosina, diverso a seconda del tipo di MAPK.

delle MAPK, e/o come risultato della loro interazione con una piccola proteina legante il GTP della famiglia Ras/Rho in risposta a stimoli extracellulari.

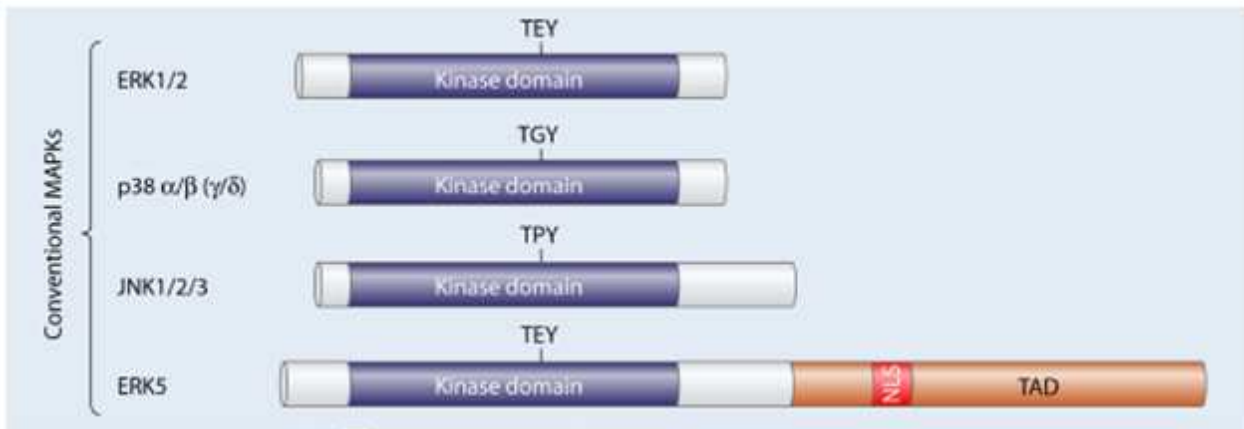


Figura 6: Rappresentazione schematica delle strutture complessive delle MAPK. Tutte contengono un dominio di chinasi Ser / Thr fiancheggiato da regioni N- e C-terminali di diversa lunghezza.
Fonte:(Cargnello e Roux 2011).

L'attivazione della cascata delle MAP chinasi avviene in seguito al legame di segnali extracellulari (ormoni, fattori di crescita e neurotrasmettitori) a livello dei recettori localizzati sulla membrana, che dimerizzano ed interagiscono con delle proteine G, rappresentate da Ras per la via di ERK e dai membri della famiglia Rho per la via di JNK e p38. Queste proteine sono dotate di attività GTP-asi e promuovono la fosforilazione delle proteine a valle. L'attivazione di MAPKKK (MEK chinasi) porta alla fosforilazione e attivazione di un MAPKK (MEK), che quindi stimola l'attività MAPK attraverso la duplice fosforilazione dei residui Thr e Tyr (Figura 7). La fosforilazione di questi residui è essenziale per le attività enzimatiche (Cargnello e Roux 2011).

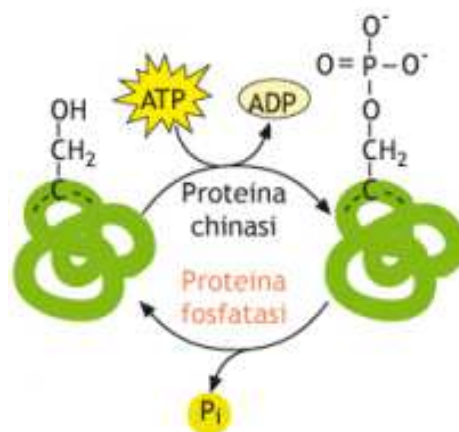


Figura 7: meccanismo di fosforilazione di una proteina chinasi.

La via di Stress-Activated Protein Kinase (SAPK)/ c-Jun N-terminal Kinase (JNK) è attivata in seguito a stimolazione recettoriale da parte di citochine infiammatorie, radiazioni γ e raggi UV (Figura 8).

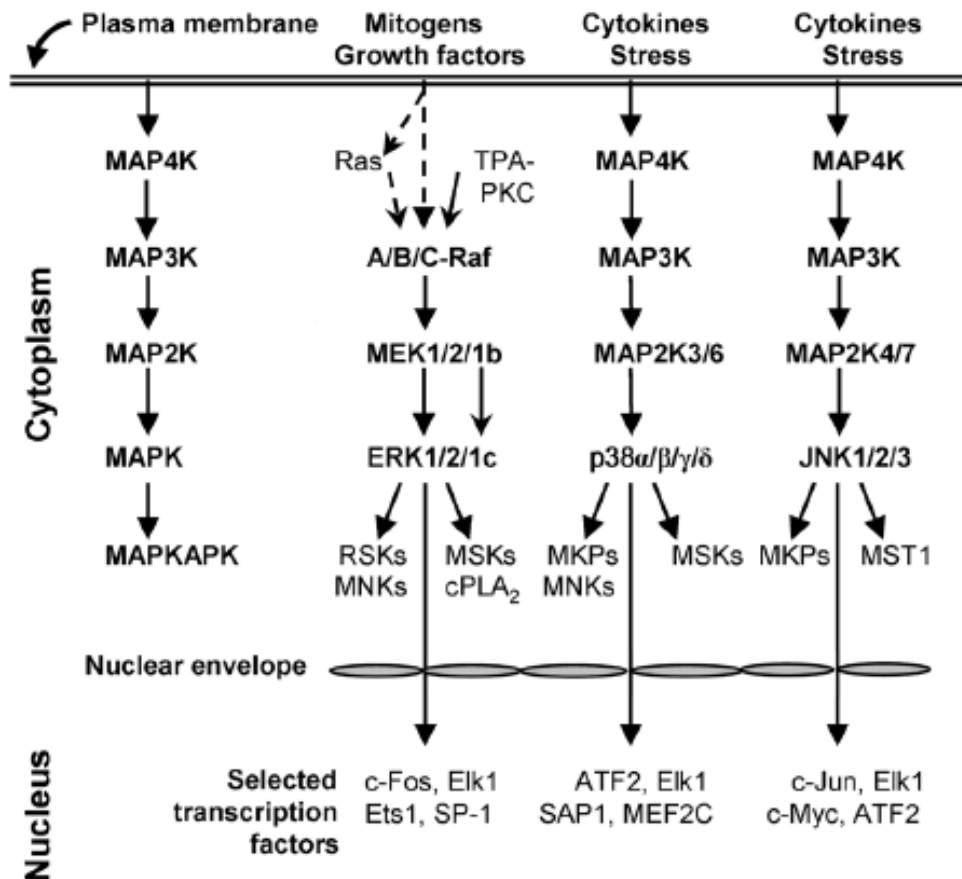


Figura 8: La cascata delle MAPK quali ERK, p38 e JNK che si verifica nel citoplasma possono essere traslocate nel nucleo, catalizzare la fosforilazione di numerose proteine citosoliche e numerosi fattori di trascrizione nucleare. Fonte: (Roskoski 2012).

1.3.2. Le ERK 1/2

Appartengono a questo gruppo di MAPK ampiamente studiato le ERK-1 (note come p44 MAP) e le ERK-2 (p42 MAP). Sono proteine identiche tra loro per l'83%, e a causa del loro alto grado di somiglianza, le ERK-1 e ERK-2 sono generalmente considerate ridondanti dal punto di vista funzionale, sebbene siano state comunque segnalate alcune differenze nella loro specificità di substrato. Queste isoforme possono essere attivate in risposta ad un'ampia varietà di fattori di crescita e mitogeni (Seger e Krebs 1995). Esse sono espresse in varie estensioni in tutti i tessuti, con livelli particolarmente elevati nel cervello, nei muscoli scheletrici, nel timo e nel cuore.

Le ERK1 e ERK2 sono attivate da fattori di crescita, tra cui il fattore di crescita derivato dalle piastrine, il fattore di crescita epidermico ed il fattore di crescita nervoso, e in risposta all'insulina. Sono inoltre attivati dai ligandi per i recettori eterotrimerici accoppiati alla proteina G (GPCR), citochine, stress osmotico e alterazione a livello dei microtubuli (Cargnello e Roux 2011).

Sono attivate principalmente dai recettori presenti nella membrana cellulare, come il recettore con attività tirosina chinasi (RTK). La dimerizzazione indotta dal ligando promuove l'attivazione del recettore e l'autofosforilazione dei residui di Tyr nel dominio intracellulare. Questi residui fosforilati fungono da siti di legame specifici per proteine che contengono domini Src homology 2 (SH2)⁵, come Grb2 (Growth factor receptor-bound protein 2) proteina adattatrice che non possiede attività enzimatica intrinseca. Oltre al suo dominio SH2 la Grb2, contiene anche un secondo dominio di legame per una proteina, chiamato dominio SH3, che si lega ad una regione ricca di proline della Sos, che agisce come un fattore di scambio nucleotidico (GEF). L'Sos è reclutato dal citosol alla membrana plasmatica e stimola lo scambio del GDP (forma inattiva) col GTP (forma attiva) sulla proteina Ras (una proteina G trimerica).

Questo scambio nucleotidico consente a Ras di interagire direttamente con i suoi effettori bersaglio, uno dei quali è Raf (appartenente al gruppo delle MAPKKK). La regolazione di Ras e Raf è fondamentale per il corretto mantenimento della proliferazione cellulare, poiché le mutazioni attivanti in questi geni portano alla oncogenesi. Appena attivato, Raf lega e fosforila le chinasi a doppia specificità MEK 1/2, che a loro volta, fosforilano ERK 1/2 all'interno di un motivo Thr-Glu-Tyr (TEY) conservato nel loro anello di attivazione (Figura 9).

⁵ Src homology 2 (SH2) rappresenta una sequenza di dominio simile ad un'altra proteina tirosina chinasi, Srs.

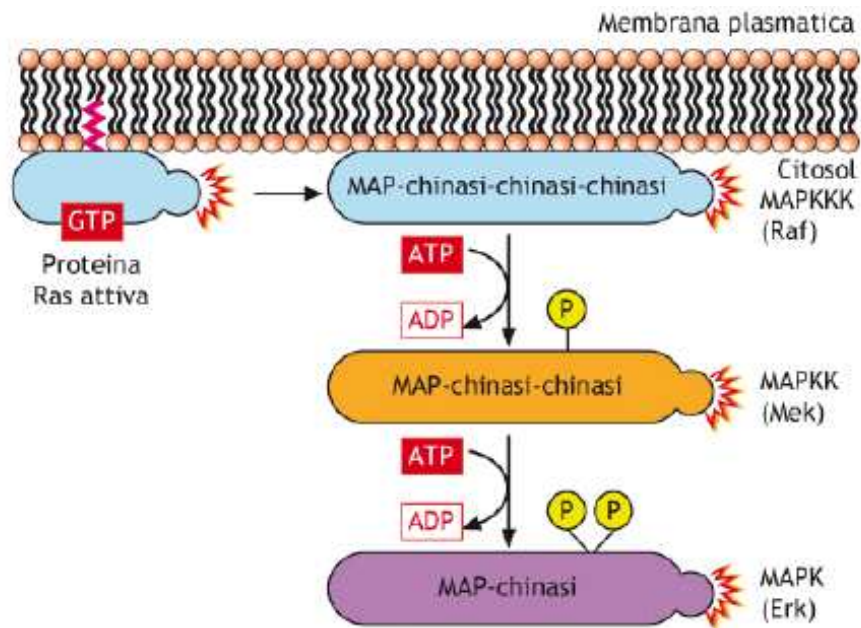


Figura 9: La cascata inizia con una MAPKKK (Raf) che attiva una MAPKK (Mek) che a sua volta attiva una MAPK (Erk).

Le ERK 1/2 attivate si traslocano nel nucleo e transattivano i fattori di trascrizione, modificando l'espressione genica per promuovere la crescita, la differenziazione o la mitosi (Figura 10) (Zhang e Liu 2002).

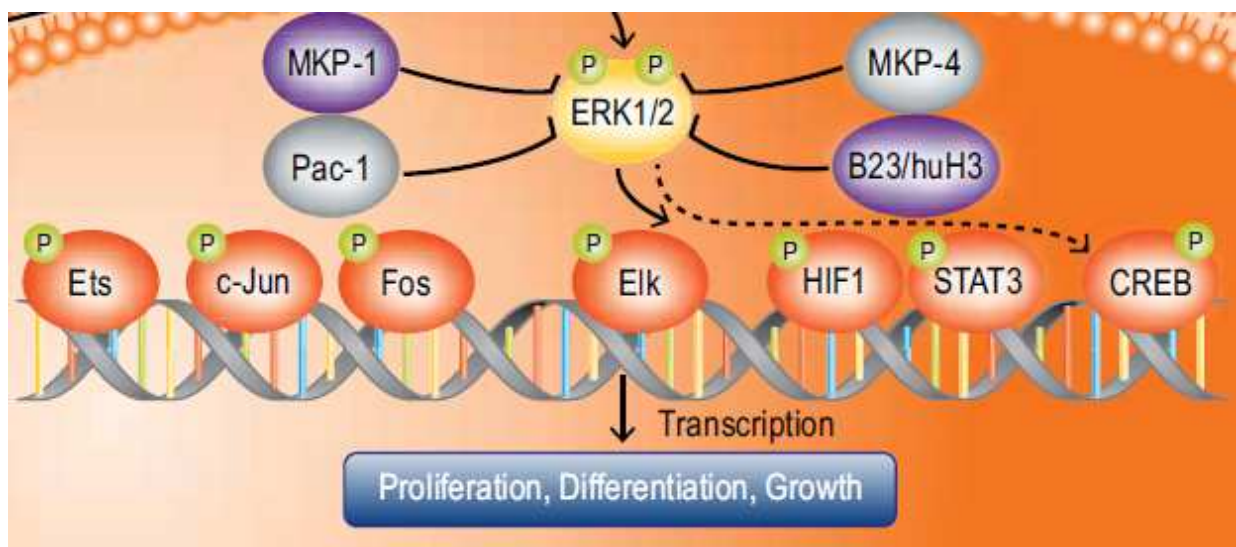


Figura 10: All'interno del nucleo le ERK 1/2 sono in grado di fosforilare numerose proteine che vanno a modulare l'espressione genica. Fonte: (<http://www.abcam.com/pathways/mapk-erk12-interactive-pathway>).

2. SCOPO DELLA TESI

La placenta è un organo che riveste una grande importanza per lo sviluppo dell'embrione, essa interagisce tra la madre e il feto consentendo un adeguato apporto di ossigeno e sostanze nutritive, agisce come barriera protettiva per il feto impedendo il passaggio di sostanze xenobiotiche e, inoltre, è caratterizzata da una specifica regolazione ormonale, essenziale per la gravidanza. Difatti la produzione di ormoni quali estradiolo e progesterone sono fondamentali per il processo di placentazione. Quest'ultimo si verifica nel primo trimestre della gravidanza come risultato di una serie di interazioni tra i tessuti materni e le cellule che danno origine alla placenta, i trofoblasti.

I trofoblasti sono cellule dotate di capacità quali la proliferazione, l'invasione e la migrazione nei tessuti endometriali, e la differenziazione in due tipi cellulari differenti: il sinciziotrofoblasto e il trofoblasto extravillioso. Queste caratteristiche devono essere finemente regolate affinché l'impianto dell'embrione nell'endometrio vada a buon fine; per cui l'esposizione a sostanze che possono interferire con tale meccanismo può compromettere l'intero processo.

Oggetto di questo studio è la valutazione degli effetti mediati dal Bisfenolo A (BPA), un composto organico di sintesi impiegato per la produzione di materie plastiche, su una linea di cellule di trofoblasto extravillioso del primo trimestre, HTR-8/SVneo.

È ben noto che il BPA imita l'azione degli ormoni naturali compromettendo numerosi processi fisiologici tra i quali anche la riproduzione, pertanto un'inconsueta presenza di xenoestrogeni causa un'alterazione dell'omeostasi endocrina. Alcuni studi hanno rilevato la presenza di BPA nel cordone ombelicale, nel fluido amniotico e nella placenta (Rajakumar et al. 2015), e negli ultimi anni la comunità scientifica ha rivolto il suo interesse riguardo i possibili effetti del BPA sull'organismo umano. Dati ottenuti sia *in vivo* che *in vitro* hanno dimostrato che l'esposizione a tale composto determina tumori alla prostata e mammari, pubertà precoce, cambiamenti morfologici dell'ovaio, dell'utero e della vagina, interruzione della ciclicità estrale, obesità, alterazione della ghiandola mammaria (Spagnoletti et al. 2015).

Studi precedentemente condotti presso il Laboratorio di Fisiologia Animale e Ambientale del BiGeA hanno dimostrato che il BPA induce un aumento proliferativo sulle cellule di trofoblasto umano, esercitando quindi la sua azione estrogenica.

Sulla base di queste conoscenze l'obiettivo di questo studio è stato quello di approfondire il ruolo del BPA sulla proliferazione, migrazione e vie di trasduzione del segnale nelle cellule trofoblastiche della linea HTR-8/SVneo. Nel presente lavoro di tesi è stata inizialmente valutata la proliferazione cellulare dei trofoblasti al trattamento con diverse concentrazioni dell'inquinante attraverso l'applicazione del test dell'E-screen. Successivamente è stato valutato l'effetto del BPA sulla capacità delle cellule

trofoblastiche di migrare attraverso una membrana microporosa. Infine, sono stati svolti esperimenti sull'attivazione delle vie di trasduzione del segnale regolato dal sistema delle MAPK (ERK 1/2).

L'importanza di questo studio è quello di fornire maggiori informazioni sugli effetti esercitati dal BPA sulle cellule di trofoblasto e quindi sulla potenziale alterazione esercitata dal BPA sul processo di placentazione.

3. MATERIALI E METODI

3.1. COLTURE CELLULARI

Le cellule impiegate negli esperimenti del seguente lavoro di tesi discendono da colture primarie di trofoblasti umani in cui, attraverso tecniche di ingegneria genetica, è stato annullato il programma genetico della senescenza e quindi della morte cellulare rendendole capaci di proliferare illimitatamente.

La linea cellulare utilizzata è HTR-8/SVneo, la quale deriva da una coltura cellulare mantenuta presso il dipartimento di biologia dell'Università di Ferrara e gentilmente donata dal laboratorio diretto dalla Prof. Carla Biondi. È stata sviluppata presso il laboratorio del Dott. Charles Graham utilizzando cellule trofoblastiche extravilluose del primo trimestre infette da antigene T di virus simian 40 (SV40) (Graham C. H. et al. 1993). Queste cellule presentano una varietà di marcatori caratteristici delle cellule di trofoblasto extravilloso invasivo: il fattore di crescita insulino-simile, l'antigene nucleare delle cellule in proliferazione, l'antigene leucocitario umano e un insieme distinto di integrine.

Una particolarità appartenente a questa linea cellulare è l'elevata capacità proliferativa che raggiunge i 30-32 cicli produttivi pur mantenendo molti caratteri fenotipici della linea parentale dalla quale deriva, dove la senescenza viene raggiunta dopo appena 12-14 passaggi riproduttivi.

Le cellule in coltura *in vitro* richiedono l'impiego di un terreno base, contenente sali, glucosio, amminoacidi e vitamine. Per la coltura delle HTR-8/SVneo viene utilizzato l'RPMI (Roswell Park Memorial Institute) addizionato con:

- *siero fetale bovino (FBS)* al 10% finale, che contiene fattori di crescita (come quello insulinosimili, piastrinico ed epidermico) che hanno la funzione di stimolare la proliferazione, fattori adesivi (tra cui fibronectina e vitronectina), inibitori specifici per la tripsina, albumina, transferrina (essenziale per il metabolismo del ferro), colesterolo, acidi grassi, glucocorticoidi ed elementi minerali in tracce (fra cui Cu, Zn, Co, Mo, Va e Se) che funzionano come cofattori per determinati enzimi cellulari;
- *L-Glutammina*, un amminoacido essenziale fonte principale di carbonio organico, assente nel mezzo base in quanto labile, quindi da aggiungere fresco periodicamente in concentrazione finale di 2 mM;
- *Antibiotici*, quali penicillina e streptomina, per prevenire eventuali contaminazioni batteriche, in concentrazioni finali di 100 U/ml e 100 µg/ml, rispettivamente.

L'RPMI addizionato solo con glutammina viene definito come mezzo base (MB), mentre l'aggiunta degli altri elementi essenziali per la crescita della linea cellulare *in vitro* viene definito come mezzo completo (MC).

Le cellule sono coltivate all'interno di un incubatore a CO₂, ad una temperatura costante di 37°C, in un ambiente umido e in presenza di CO₂ al 5%.

Le operazioni riguardanti i vari passaggi riproduttivi delle cellule sono state fatte in condizioni di sterilità sotto cabina sterile a flusso laminare, preventivamente sterilizzata con lampada a raggi UV.

Infine per poter osservare le cellule è stato utilizzato un microscopio ottico invertito, dotato di obiettivi con contrasto in fase il quale permette di osservare campioni biologici contenuti in piastre o fiasche di coltura, grazie alla particolare disposizione del blocco degli obiettivi alloggiati sotto al tavolo porta oggetti e non sopra, come nei comuni microscopi ottici. Per l'osservazione delle cellule sulla piastra di coltura in genere si impiegano ingrandimenti complessivi tra 50× e 200× (Figura 11).

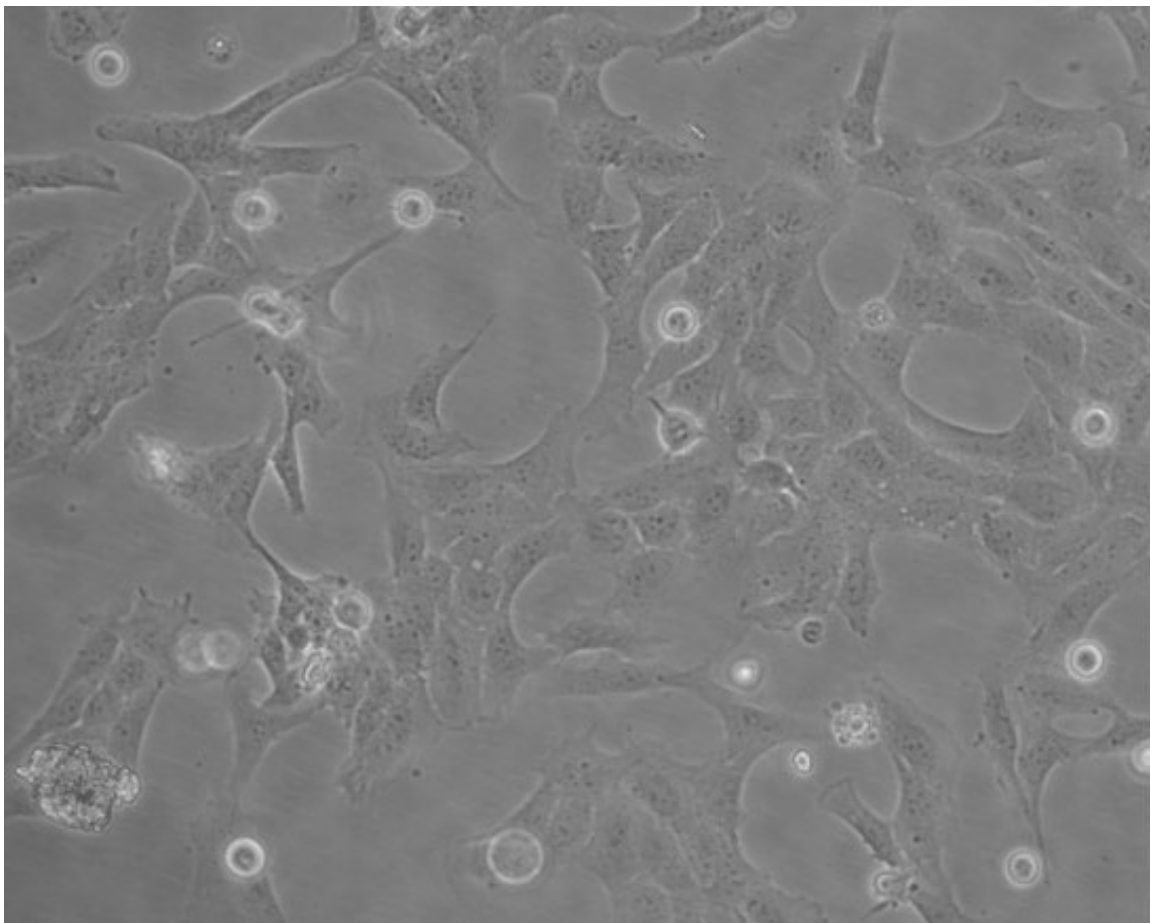


Figura 11: cellule HTR-8/SVneo in coltura viste al microscopio ottico invertito (100×).

Le operazioni che permettono di allestire e mantenere una linea cellulare sono:

- Scongelamento;
- Mantenimento della coltura;
- Congelamento delle cellule per la preparazione di uno stock di riserva;
- Semina delle cellule per gli esperimenti

3.1.1. Scongelamento delle cellule

Lo scongelamento delle cellule è una procedura che permette di ottenere la costituzione di una nuova linea da utilizzare negli esperimenti. Tale operazione deve avvenire nel più breve tempo possibile al fine di preservare le cellule stesse.

Solitamente le cellule, che vengono mantenute in provette crioresistenti (criovial) in congelatore a -80°C , vengono scongelate e trasferite in bagnomaria ad una temperatura di 37°C per un massimo di 5 minuti. Superata questa fase si opera sotto cabina sterile; le cellule vengono immerse in fiasche vuote da 75 cm^2 a cui si aggiungono 20 ml di mezzo completo: i primi 10 ml lentamente, goccia a goccia, per evitare che le cellule subiscano stress osmotico e avendo cura di agitare costantemente la fiasca; i successivi 10 ml vengono aggiunti più velocemente. La fiasca costituirà la linea cellulare di partenza (denominata P0) pronta per favorire la crescita delle cellule. Successivamente viene posizionata in incubatore a 37°C per 24 ore. Trascorso il tempo stabilito è necessario cambiare il terreno di coltura alle cellule per eliminare il DMSO⁶. Da questo momento in poi le cellule proseguiranno in vari passaggi riproduttivi (denominati in ordine numerico P1, P2..Pn) e osservate al microscopio al fine di verificare il raggiungimento della confluenza, ossia dell'occupazione dell'intera superficie disponibile per la crescita nella fiasca.

3.1.2. Mantenimento della coltura cellulare

Derivando da un tessuto solido, i trofoblasti presenti nella coltura cellulare (cellule aderenti) necessitano di aderire ad un supporto come la superficie di una fiasca o i pozzetti di una piastra di coltura, che sono trattati chimicamente in modo da renderli idrofili e carichi negativamente, e poter legare in modo stabile fattori di adesione presenti nel mezzo di coltura delle cellule.

⁶ DMSO: Dimetilsulfossido, composto utilizzato come agente crioprotettivo per la conservazione a lungo termine di cellule umane e animali.

L'impiego di cellule aderenti richiede il periodico distacco dalla fiasca di coltura, quando lo spazio a loro disposizione per crescere sia esaurito e le cellule si trovino così nella condizione definita di "confluenza", nella quale formano un monostrato che ricopre interamente la superficie di adesione.

Innanzitutto occorre osservare le cellule al microscopio ottico invertito per valutare che siano cresciute, e calcolare il fattore di diluizione da adottare per far sì che le cellule giungano a confluenza nel giorno desiderato, in genere all'inizio o alla fine della settimana, per mantenerle in linea o per farle arrivare ad una confluenza del 70-80% nel caso di utilizzo per esperimenti.

Il fattore di diluizione è molto importante, infatti cellule troppo diluite (al di sotto di una densità di 1×10^4 cellule/cm²) vanno incontro a morte, mentre cellule troppo fitte rischiano di diventare sofferenti e meno responsive ai trattamenti sperimentali.

Si procede con il distacco delle cellule dalla fiasca con superficie di adesione di 75 cm² tramite il processo di tripsinizzazione mediato dalla tripsina, un enzima litico capace di degradare le proteine della matrice che contiene le cellule aderenti, rompendo i legami tra le singole cellule e quelli che si formano tra le cellule e la parete trattata della fiasca. La prima operazione consiste nel prendere le cellule dall'incubatore e portarle sotto cappa, svuotare la fiasca dai 20 ml di mezzo completo. La seconda operazione è il lavaggio delle cellule che si trovano adese al fondo della fiasca con 10 ml di D-PBS (Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline, una soluzione tampone contenente KCl 2,67 mM, KH₂PO₄ 1,47 mM, NaCl 137,93 mM, Na₂HPO₄ 8,06 mM) priva di ioni Ca²⁺ e Mg²⁺. Questa operazione ha lo scopo di allontanare questi ioni bivalenti che sono contenuti nel mezzo completo, in quanto rappresentano due fattori indispensabili all'adesione, che inibiscono l'azione enzimatica della tripsina. Segue dunque la tripsinizzazione che viene fatta con 2 ml di una soluzione di tripsina e EDTA allo 0,005% in D-PBS. La reazione di tripsinizzazione ha una durata di 5 minuti, e non deve essere superato tale arco temporale per evitare danni alle cellule stesse, trascorsi i quali è possibile osservare le cellule ormai staccate scivolare lungo la parete della fiasca. Al termine della reazione si aggiungono 18 ml di mezzo completo per ottenere un volume finale di 20 ml. Di queste cellule risospese, una parte viene utilizzata per seminare nuove fiasche al fine di mantenere le cellule in linea, altre in piastre di coltura per impiegarle negli esperimenti. Le cellule vengono infine riposte nuovamente in incubatore a 37°C.

Allo scopo di garantire un nutrimento adeguato alle cellule, dopo circa due giorni dalla semina nelle fiasche è necessario cambiare il mezzo di coltura in quanto parte dei nutrienti sono stati metabolizzati. Questa operazione avviene ovviamente in condizioni di sterilità, sotto cappa a flusso laminare, e consiste nel rimuovere il vecchio mezzo dalla fiasca e nel rimetterne 20 ml di fresco.

3.1.3. Congelamento delle cellule

Raggiunta una buona fase di crescita, le cellule possono essere conservate per andare a costituire uno stock di riserva. È importante disporre di cellule pronte alla generazione di una nuova linea cellulare soprattutto in casi di emergenza come contaminazioni o anomalie nel funzionamento degli incubatori, o semplicemente nel caso non si renda più necessario portare avanti le colture.

Con i trofoblasti, in genere, si preparano aliquote di cellule congelate da 1 ml, diluite in proporzione 1:3, in modo che allo scongelamento si mettano in coltura ed arrivino a confluenza dopo 2 giorni.

Supponendo di partire da 5 fiasche di cellule a confluenza, diluendo 1:3 si ottengono circa 15 criovials. Le cellule vengono congelate in FBS e DMSO al 10%.

Questo processo deve avvenire lentamente, per evitare formazione di cristalli di ghiaccio all'interno della cellula, cristalli che, al momento dello scongelamento, portano alla rottura della membrana plasmatica e viene di solito controllato aggiungendo al terreno di congelamento un agente crioprotettivo permeabile come il DMSO.

Quindi si procede attraverso la tripsinizzazione delle cellule tramite la tripsina, e la risospensione in 18 ml di mezzo completo. A questo punto si trasferiscono le cellule risospese in provette sterili da 50 ml e messe a centrifugare a $1000 \times g$ per 10 minuti (4°C). Il secondo passaggio prevede l'eliminazione del surnatante e la sospensione delle cellule in una soluzione siero/DMSO precedentemente preparata in modo tale da riunire tutti i pellet in una provetta unica.

Da tal momento le cellule vengono poste in ghiaccio e suddivise in aliquote da 1 ml in criovials, infine avvolte in cotone idrofilo e trasferite in contenitori in polistirolo che permettono un congelamento più graduale. Le cellule vengono conservati a -80°C per non oltre 6 mesi.

3.1.4. Semina delle cellule per gli esperimenti

Per poter effettuare la semina delle cellule vengono svolti alcuni calcoli allo scopo di stabilire il numero di pozzetti e le concentrazioni a cui seminare. Il valore della concentrazione viene ottenuto attraverso il conteggio delle cellule vitali valutato mediante la colorazione con Trypan Blue. Tale colorante, infatti, colora solo le cellule danneggiate in quanto quelle vitali possiedono una membrana plasmatica integra che ne impedisce l'ingresso. La conta cellulare viene effettuata con una camera di Burker. Il risultato ottenuto è dato moltiplicando il numero medio di cellule da dieci quadrati distinti per due. In questo modo si ottiene il valore delle cellule per ml della sospensione originale.

La procedura di semina per gli esperimenti prevede la tripsinizzazione delle cellule della fiasca, la diluizione con mezzo di coltura completo all'interno di una provetta sterile e semina della quantità opportuna.

I supporti utilizzati per la semina sono rappresentati da piastre di coltura, le cui dimensioni variano a seconda dell'esperimento condotto:

- Piastre da 24 pozzetti, impiegate per condurre i saggi di vitalità cellulare e saggi per la valutazione della capacità migratoria. Le cellule vengono seminate all'interno di ciascun pozzetto in quantità di 0,5 ml e aggiungendo 0,5 ml di mezzo completo ($0,7 \times 10^4$ cellule/pozzetto);
- Piastre da 6 pozzetti, utilizzate per l'analisi delle proteine tramite Western blotting. In queste piastre le cellule vengono seminate in quantità di 2 ml per pozzetto e aggiungendo 1 ml di mezzo completo ($2,8 \times 10^4$ cellule/pozzetto).

In entrambe le piastre, effettuata la semina, si avvina bene la superficie per fare in modo che le cellule ricoprano l'intera superficie di adesione e si pongono in incubatore per 24 ore, per favorire la crescita fino a semi-confluenza. Il giorno successivo le cellule sono pronte per essere sottoposte agli esperimenti.

3.2. ESPOSIZIONE DELLE CELLULE A BISFENOLO A

Al fine del presente studio, le cellule sono state sottoposte al trattamento con bisfenolo A (BPA) in concentrazioni crescenti, in particolare per la valutazione dell'attività estrogenica sono state utilizzate dosi da 10^{-14} M a 10^{-3} M per 3 giorni in incubatore a 37°C , in presenza o meno di tamoxifene, inibitore del recettore degli estrogeni. Per i saggi di migrazione e western blotting le dosi a cui sono state esposte le cellule vanno da 10^{-13} M a 10^{-5} M.

In tutti gli esperimenti è stata utilizzata la stessa soluzione madre di BPA 10^{-1} M in DMSO, e diluita nelle opportune concentrazioni in mezzo completo, somministrata alle cellule in coltura dopo avere tolto il mezzo di coltura in cui sono cresciute il giorno precedente l'esperimento.

La soluzione madre di tamoxifene utilizzata ha una concentrazione di 5×10^{-3} M e opportunamente diluita fino a raggiungere la dose per l'esperimento di 10^{-7} M.

3.3.TEST DI VALUTAZIONE DEL'ESTROGENICITA': E-SCREEN

L'E-screen permette di evidenziare effetti estrogeno-dipendenti (agonista/antagonista) di sostanze individuali e in miscela, e dei loro eventuali metaboliti, in cellule umane. È un valido strumento per uno screening di primo livello per evidenziare l'attitudine di composti o matrici complesse a riconoscere i recettori estrogenici umani, legarsi ad essi e indurre una catena di reazioni biomolecolari caratterizzate da una relazione dose-risposta i cui prodotti sono strumentalmente misurabili (Istituto Superiore di Sanità 2011).

Il saggio sfrutta il fatto che in cellule mantenute in un mezzo deprivato di estrogeni, l'aggiunta di sostanze estrogeniche induce la proliferazione. L'E-screen confronta la proliferazione cellulare dopo 5 giorni di coltura in presenza o assenza di diverse concentrazioni delle sostanze da testare. La proliferazione può essere valutata semplicemente mediante conta cellulare o determinazione della vitalità cellulare mediante l'MTT assay.

A differenza della procedura applicata per la linea cellulare epiteliale di carcinoma mammario umano (cellule MCF-7), il test E-screen è stato opportunamente adattato per la valutazione della proliferazione sulle cellule HTR-8/SVneo, valutando la vitalità dopo 3 giorni anziché 5.

3.3.1. Vitalità cellulare: test MTT

L'MTT è un test di vitalità cellulare di tipo colorimetrico che permette di stimare il numero delle cellule aventi ancora attività mitocondriale, che quindi sono vitali. Si basa sull'impiego di un indicatore metabolico, l'MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difeniltetrazolio bromide), un sale solubile di tetrazolio di colore giallo che, nelle cellule vitali, è ridotto nel mitocondrio ad opera dell'enzima succinato deidrogenasi, a formare un cristallo insolubile in acqua di color viola, il formazano (Figura 12).

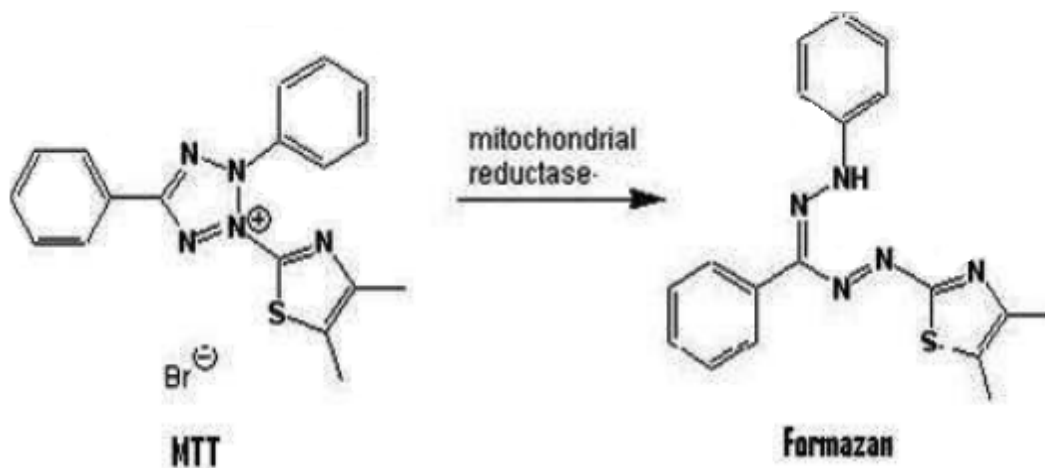


Figura 12: riduzione dell'MTT a formazano

Fonte: (<http://www.biotek.com/resources/articles/quantification-cell-viability-epoch.html>).

I cristalli solubilizzati di formazano sono quantificati con metodo colorimetrico tramite spettrofotometro alla lunghezza d'onda di 570 nm, con correttore di background a 650 nm.

La reazione può avvenire solo nelle cellule metabolicamente attive, e il valore di assorbanza ottenuta può essere correlata al quantitativo di cellule vitali presenti.

Le soluzioni impiegate per svolgere questo saggio sono:

- Soluzione madre: MTT 5mg/ml di RPMI senza rosso fenolo;
- Soluzione di uso: diluizione 10 x della soluzione madre in RPMI senza rosso fenolo;
- Isopropanolo acidificato: 332 μ L HCl 37% in 100 ml isopropanolo.

Dopo l'esposizione delle cellule al BPA per i giorni stabiliti, si tolgono le cellule dall'incubatore e vengono svuotate del mezzo di coltura, si aggiunge successivamente 0,5ml per pozzetto di soluzione di uso di MTT (piastre da 24 pozzetti) e si procede ad incubazione a 37°C per un periodo di 1-1,5 ore.

Al termine dell'incubazione, durante il quale il sale di tetrazolio viene metabolizzato, viene prodotto il formazano, facendo virare il colore della soluzione da giallo a viola intenso. Tale composto forma dei cristalli insolubili nell'ambiente intracellulare a cui le membrane risultano sostanzialmente impermeabili: è quindi permessa l'entrata della molecola nella cellula, ma non l'uscita del prodotto se questo è stato correttamente metabolizzato, cioè se le catene di trasporto elettronico sono ancora metabolicamente attive.

A questo punto occorre rimuovere la soluzione di uso di MTT ed aggiungere 1 ml di isopropanolo acidificato per ogni pozzetto. Quest'ultimo lisa le membrane cellulari facendo fuoriuscire il

formazano. A tal punto si rende necessario mescolare bene più volte la soluzione viola ottenuta, raccoglierla e trasferirla in cuvette sterili. L'intensità della colorazione della soluzione ottenuta è direttamente proporzionale alla concentrazione di formazano ed è quindi espressione della vitalità cellulare. Le letture allo spettrofotometro vengono eseguite a 570 nm e da 650 nm, utilizzando come bianco di lettura la soluzione di isopropanolo acidificato.

La valutazione dell'estrogenicità è stata espressa come effetto proliferativo (Proliferative Effect, PE), ovvero il rapporto tra l'effetto massimo indotto dal BPA e il controllo non trattato (PE=1).

3.4. SAGGIO DI MIGRAZIONE

Il saggio di migrazione è utilizzato per valutare la capacità migratoria dei trofoblasti. Il principio del test è quello di considerare un eventuale effetto di sovra-stimolazione o mancata migrazione in risposta agli stimoli.

La migrazione viene valutata attraverso degli inserti (Millicell® Hanging Inserts), definiti meglio come “cellette di migrazione”, sulle quali è presente una membrana microporosa di policarbonato (8µm).

Questi inserti vengono posti nelle piastre di coltura, e separano l'ambiente in due camere: la prima camera è costituita dalla celletta di migrazione posta all'interno del pozzetto, contenente il mezzo completo di coltura con siero FBS all'1%; la seconda camera è costituita dalla parte inferiore del pozzetto della piastra contenente il terreno di coltura arricchito con siero FBS al 10% finale, che forma un gradiente attrattivo verso il quale le cellule migreranno (Figura 13).

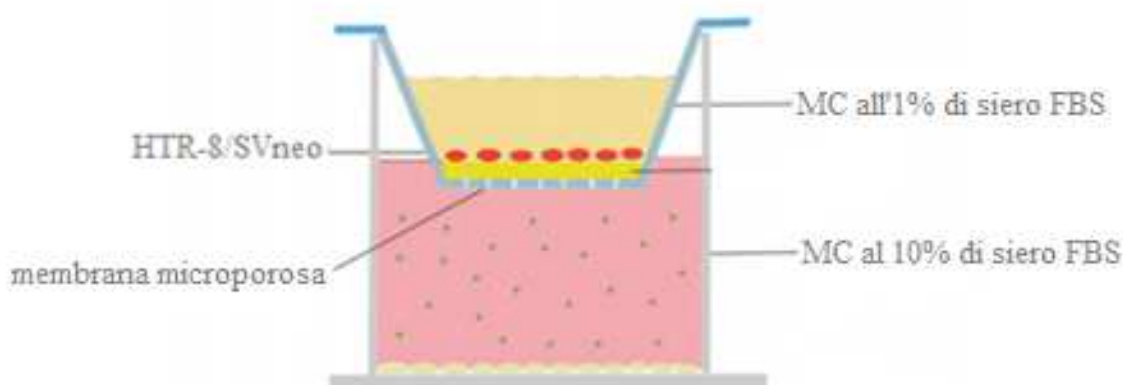


Figura 13: rappresentazione schematica del modello di migrazione.

L'effetto complessivo viene osservato tramite colorazione con crystal violet, un colorante basico solubile in acqua, che lega il DNA in maniera proporzionale alla quantità. Viene utilizzato per quantificare le cellule in coltura e può essere utilizzato per dosaggi colorimetrici tenendo però presente che non può discriminare tra cellule vive e morte.

La procedura sperimentale prevede che dopo l'esposizione a BPA venga tolto il mezzo di crescita dalle piastre e sia lavato ogni pozzetto con una soluzione di PBS per eliminare il siero usato nel mezzo completo di crescita. Successivamente si aggiungono 150 μ L di tripsina per pozzetto, in modo da favorire il distacco delle cellule dalla superficie di adesione, dopo 5 minuti in incubatore, si aggiunge ugual volume di mezzo completo all'1% di siero FBS per bloccare la reazione di tripsinizzazione.

Le cellule in mezzo completo con siero FBS all'1% sono prelevate e seminate nelle cellette di migrazione, ponendo 200 μ L all'interno di ciascun inserto, e avendo cura di mescolare bene per prelevare una quantità rappresentativa e uniforme.

Gli inserti vengono posizionati all'interno dei pozzetti delle piastre da 24, in cui precedentemente era stato aggiunto 750 μ L di mezzo completo con siero FBS al 10%, e posti in incubazione per 24 ore a 37°C.

Trascorse le 24 ore dalla semina si procede rimuovendo il terreno di crescita presente all'interno delle cellette di migrazione ed eliminando dalla superficie superiore della membrana le cellule che non hanno migrato con un bastoncino di cotton fiocch asciutto.

In seguito gli inserti vengono trasferiti in pozzetti contenenti 1 ml di metanolo per favorire il fissaggio delle cellule migranti sulla superficie inferiore della membrana in polycarbonato e lasciati a fissare per 30 minuti. A questo punto si procede con la colorazione delle cellule presenti nella membrana con una soluzione di colorante crystal violet per un tempo di 10 minuti. Il colorante utilizzato penetra all'interno dei nuclei delle cellule che hanno migrato dando una tipica colorazione viola. Per eliminare l'eccesso di colorare si utilizza acqua distillata effettuando diversi passaggi di lavaggio.

La membrana adesso è pronta per essere analizzata, per cui viene rimossa da ciascuna celletta di migrazione attraverso l'uso di un bisturi, e posizionata su un vetrino portaoggetti.

L'analisi viene svolta attraverso l'osservazione a microscopio ottico e ingrandimento 10 x. Per ciascun campione sono state acquisite immagini random di 10 campi della membrana tramite programma "Axion Vision 4.8".

Le immagini acquisite sono state analizzate attraverso il software per analisi di immagine "Scion Image 4.0.2", che permette di quantificare le cellule che hanno migrato in funzione del numero di pixel delle aree che presentano una colorazione marcata rispetto alle aree non colorate.

I dati di migrazione sono stati espressi come rapporto tra il numero di cellule che hanno migrato e il numero di cellule totali e riportati in percentuale di variazione rispetto al controllo.

3.5. VALUTAZIONE DELL'ATTIVAZIONE DELLE VIE DI TRASDUZIONE DEL SEGNALE MEDIANTE DALLE MAPK TRAMITE WESTERN BLOTTING

L'attivazione della via delle MAP chinasi è stata studiata mediante l'utilizzo della tecnica del western blotting e nello specifico le proteine visualizzate sono state le ERK 1/2 (proteine p42-44).

3.5.1. Preparazione del campione

Dopo aver esposto le cellule al trattamento con BPA alle opportune dosi, viene eliminato il mezzo di crescita delle cellule con una pipetta e lavato ogni pozzetto con 1 ml di PBS.

Immediatamente dopo viene aggiunto 1 ml di PBS con ortovanadato di sodio 1 mM (Na_3PO_4 , reagentario per limitare la defosforilazione delle MAP chinasi fosforilate), e si staccano le cellule dal fondo della superficie di adesione adoperando un raschietto, o "cell scraper". Il contenuto di ogni pozzetto viene prelevato e trasferito in provette e centrifugato a $800 \times g$ per 10 minuti a temperatura ambiente allo scopo di raccogliere le cellule, facendole precipitare sul fondo delle provette. In genere per preparare una quantità di campione sufficiente vengono raccolte le cellule derivanti dall'unione di 4 pozzetti da piastre da 6.

A questo punto si elimina il surnatante (SN), allo scopo di estrarre il materiale proteico, e si risospendono le cellule precipitate in 50 μL di una soluzione di lisi contenente:

tampone di lisi (NP-40 1%, sodio deossicolato 0,5%, SDS 0,1%, PBS 10 mM, pH 7,4),

Inibitore delle fosfatasi (NaF 50 mM),

Inibitore delle fosfatasi (Na_3PO_4 1 mM),

Inibitore delle proteasi (Protease Inhibitor Cocktail, soluzione in DMSO, 1%).

Il protocollo prevede che la risospensione venga lasciata a riposare in ghiaccio per 30 minuti, dopodiché si centrifuga per altri 20 minuti a $9000 \times g$ ad una temperatura di 4°C . Si raccoglie il SN e lo si trasferisce in una provetta nuova avendo cura di non prelevare il precipitato depositato sul fondo. Dal SN vengono prelevati 20 μL e messi in una provetta contenente 60 μL di NaOH, per denaturare le proteine. Quest'ultima parte di campione sarà impiegato per la determinazione proteica mediante tecnica del Lowry.

Al SN rimasto viene aggiunto, in proporzione 3:1, un volume di tampone Laemmli 4 \times (tris HCl 1M, pH 6.8; SDS 0,28 M; glicerolo 5,46 M; 2-mercaptoetanololo 20%; blu di bromofenolo 1mM), il quale permette di conferire al campione un elevato peso molecolare (grazie alla presenza del glicerolo), e una colorazione blu intensa (dovuto alla presenza del blu di bromofenolo), in modo da rendere agevoli

le operazioni di caricamento del campione sul gel di elettroforesi; la presenza di SDS (sodio dodecilsolfato) conferisce alle proteine denaturate una carica negativa in modo che, durante l'elettroforesi, si separino solo in base al loro peso molecolare e non alla propria carica. Il campione viene fatto bollire per 5 minuti per completare la denaturazione e infine si divide in aliquote da 40 μL ciascuna e conservato a -20°C fino al momento dell'utilizzo.

3.5.2. Dosaggio delle proteine

La quantificazione delle proteine contenute nei lisati cellulari viene effettuata con una metodica classica come quella di Lowry (Lowry et al. 1951). Questa tecnica permette di valutare la concentrazione delle proteine nel SN quindi di stimare quanti μL di campione bisogna caricare nel gel di elettroforesi per avere una determinata quantità di proteine.

Il metodo è basato sulla formazione di complessi tra lo ione Cu^{2+} che reagiscono in ambiente basico con i gruppi CO-NH_2 delle proteine. In condizioni alcaline il Cu^{2+} è ridotto a Cu^{1+} . Quest'ultimo, attraverso i residui di tirosina e triptofano, catalizza a sua volta la riduzione dei sali di fosfotungstato e fosfomolibdato contenuti nel reattivo di Folin, dando una colorazione violetta. Il solo reattivo di Folin in ambiente basico si legherebbe esclusivamente ad amminoacidi con anello aromatico, quindi la colorazione blu dipenderebbe solamente da questi ultimi. Nel metodo di Lowry, in cui al reattivo di Folin si fa precedere quello contenente Cu^{2+} , l'intera molecola proteica legata al catione reagisce con il reattivo di Folin, in questo modo viene aumentata la sensibilità e la precisione del metodo.

Per la determinazione della concentrazione delle proteine vengono prelevati 20 μL di SN derivato dal lisato cellulare e posti in 60 μL di NaOH 1M. Grazie all'uso di una proteina standard, l'albumina, a concentrazione nota si ottengono i valori di assorbanza di riferimento per determinare la concentrazione proteica dei campioni sperimentali. Si preparano quindi cinque diluizioni di standard di albumina: lo standard 5 contiene 300 μL di H_2O e 300 μL di soluzione madre di albumina (0,5 mg/ml) per ottenere in totale 10 μg di albumina per pozzetto; per diluizioni progressive si preparano altri 4 standard, con 7,5/5/2,5/1 μg albumina/pozzetto. Dopo aver caricato una micropiasta da 96 pozzetti con i campioni sperimentali oppure con l'albumina standard, si prepara una miscela contenente soluzione A (Na^+ , K^+ -Tartato 20%, Na_2CO_3 2% e NaOH 0,4%) + soluzione B (CuSO_4 1%), in proporzione di 100:1 e se ne aggiunge 200 μL per ogni pozzetto, lasciando agire per 10 minuti. Poi si prepara la soluzione C, che contiene 50% di reattivo di Folin (Folin-Ciocalteus Phenol reagent) e 50% di H_2O e se ne aggiungono 20 μL ad ogni pozzetto. Si lascia la micropiasta al buio per 30 minuti e infine si esegue la lettura nel lettore di micropiastre a lunghezza d'onda 660 nm.

Ottenute tutte le letture, si costruisce una curva di taratura e si ricavano le concentrazioni proteiche di ogni campione.

Per determinare la concentrazione proteica del campione si moltiplica il valore ottenuto per il fattore di diluizione del campione in NaOH, che in questo caso è 4, e per $\frac{3}{4}$ (fattore di diluizione del campione in tampone di Laemmli). In base alla concentrazione proteica di ogni campione sperimentale si può così determinare il volume da caricare sul gel per l'elettroforesi, per avere 20 μ L di proteine in ogni pozzetto.

3.5.3. Western blotting

La tecnica del Western blotting permette di indentificare una determinata proteina in una miscela di proteine mediante il riconoscimento da parte di anticorpi specifici. Innanzitutto è necessario separare, tramite elettroforesi, le proteine contenute nel campione in una miscela esclusivamente in base al peso molecolare, quindi trasferirle su un supporto di nitrocellulosa, dove sia possibile la reazione delle proteine di interesse con l'anticorpo specifico e la loro successiva rivelazione.

3.5.4. Preparazione dei gel per elettroforesi

L'elettroforesi viene utilizzata per separare le proteine, a partire da una miscela, in base al loro peso molecolare. La separazione si basa sulla migrazione delle proteine all'interno di una matrice di poliacrilamide, per causa di un campo elettrico. Gli effetti della differente carica delle singole proteine è minimizzato ad opera della loro associazione con l'SDS.

Il gel di poliacrilamide è composto da due parti, una inferiore denominata gel di corsa (RUNNING GEL), contenente poliacrilamide al 12%, in cui avviene la separazione delle proteine, ed una superiore, chiamata gel di caricamento (STACKING GEL), contenente poliacrilamide al 5%, in cui verranno costituiti i pozzetti per il caricamento del campione. La preparazione del gel, così come la corsa elettroforetica ed il trasferimento, avvengono tramite l'uso dell'apparecchiatura Mini Protean III (Figura 14).



Figura 14: apparecchiatura per western blot MiniProtean III.

Prima di tutto viene preparato il supporto entro cui si farà polimerizzare il gel. Si prendono i vetrini e si uniscono a due a due; essi sono mantenuti uniti da un sostegno in plastica che viene fissato su un secondo supporto alla cui base sono presenti due gommini che impediscono la fuoriuscita del liquido. Per il gel di corsa la scelta dell'adeguata percentuale di poliacrilamide è molto importante in quanto permette una migliore separazione delle proteine in base al loro peso. Questo è dovuto al fatto che maggiore sarà la percentuale di poliacrilamide, più saranno fitte le maglie del gel che si formerà, e maggiore sarà la separazione delle bande proteiche. Per proteine con peso molecolare comprese tra 40 e 60 kDa (come quelle analizzate in questo studio) la percentuale idonea di poliacrilamide è 12%. Ogni gel di corsa è stato preparato nel seguente modo:

- *RUNNING GEL con 12% di acrilamide: 3,47 ml di lower buffer (un tampone di corsa), 3,27 ml di acqua distillata, 4,47 ml di poliacrilamide (soluzione madre al 30% contenente 29,2 g di acrilamide, 0,8 g di N'N',Bismetilacrilamide e acqua distillata);*

Si agita delicatamente la provetta in cui sono stati inseriti, e si aggiungono i catalizzatori che permettono la polimerizzazione della soluzione: 40 μ l di ammonio persolfato al 10% e 4,8 μ l di TEMED.

Si agita la provetta rovesciandola delicatamente 2-3 volte e si cola la soluzione tra i due vetrini utilizzando una siringa, facendo attenzione a non fare creare bolle d'aria durante l'aspirazione e l'immissione nei vetri. Per evitare che la parte superiore del gel si asciughi troppo a contatto con

l'aria, si aggiunge acqua distillata. Si lascia riposare per 45 minuti immobile affinché avvenga la polimerizzazione.

A tal punto si toglie l'acqua con carta assorbente senza danneggiare il gel, e si prepara il gel di caricamento:

- *STACKING GEL con acrilamide al 5%: 1,5 ml di upper buffer (tampone di caricamento), 3,7 ml di acqua distillata, 1 ml di poliacrilamide al 30%.*

Si agita delicatamente e si aggiungono i catalizzatori: 30 μ l di ammonio persolfato al 10% e 6 μ l di TEMED.

Si cola il gel tra i due vetri, sopra al gel di corsa già polimerizzato, e si inserisce un pettine che serve a formare i pozzetti entro cui verrà depositato il campione.

Si lascia riposare immobile per 45 minuti, al termine del quale vengono tolti i pettini facendo attenzione a non rovinare i pozzetti appena formati.

3.5.5. Elettroforesi dei campioni

I vetrini contenenti i gel vengono inseriti in un supporto e si procede al caricamento del campione. Nel primo pozzetto vengono caricati 2,5 μ l di marcatore di peso molecolare, mentre nei restanti pozzetti viene aggiunto il campione in quantità di 20 μ g. Il tutto viene inserito nella camera Mini Protean riempita con un tampone di corsa elettroforetica, Running buffer, la cui preparazione avviene attraverso diluizione di una soluzione madre 5 \times così composta:

| | |
|------------|------------------|
| 15,135 g | Tris-base pH 8,3 |
| 72,096 g | Glicina |
| 5 g | SDS |
| fino a 1 L | Acqua distillata |

Lo strumento viene collegato al generatore di corrente per 1,30 h e la corsa viene eseguita ad amperaggio costante (28 mA) in quanto questa condizione è quella che meglio garantisce stabilità per ottenere un fronte lineare. È importante monitorare costantemente la corsa delle proteine (che migrano dall'alto verso il basso, ovvero verso il polo positivo, per effetto della loro carica negativa) e verificare che, trascorso il tempo, il fronte della corsa sia uscito dal gel. Il fronte è formato da proteine a basso peso molecolare (1-2 kDa), ed è riconoscibile grazie alla presenza del colorante blu di bromofenolo nel campione.

3.5.6. Trasferimento

Al termine dell'elettroforesi le proteine sono completamente migrate e separate all'interno delle maglie del gel. A questa segue una fase di trasferimento delle stesse dal gel ad un supporto di nitrocellulosa, per rendere possibile la rivelazione immunologica.

Si pongono i gel in TTB, un tampone di trasferimento (Tris-base 0,03 M, glicina 0,2 M, metanolo 20% v/v, pH 8-8.5), per 15 minuti, così come anche alcuni supporti da utilizzare per il trasferimento (spugne, carta da filtro e nitrocellulosa).

Si procede con la costruzione del "sandwich" (Figura 15), chiamato anche "panino", all'interno di appositi supporti in cui i pannelli presentano una colorazione differente:

- Pannello chiaro
- Spugna
- Carta da filtro
- Foglietto di nitrocellulosa
- Gel
- Carta da filtro
- Spugna
- Pannello scuro.

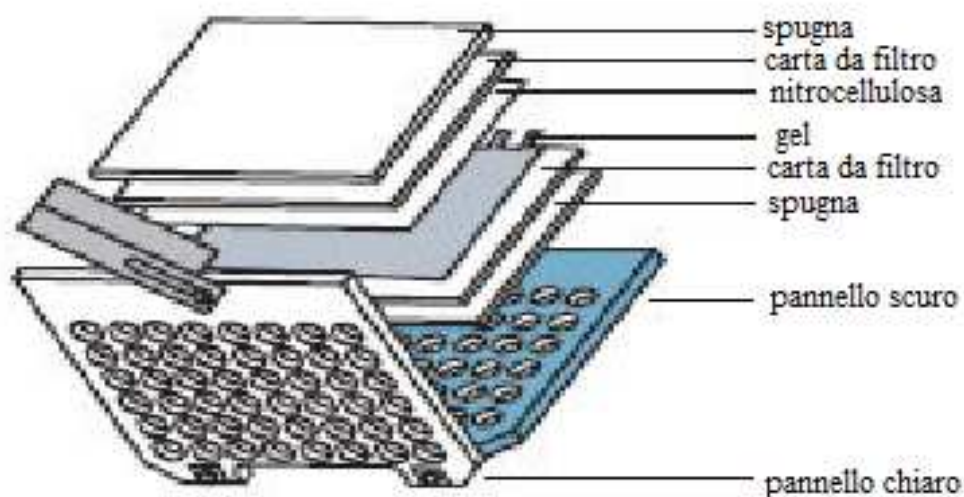


Figura 15: disposizione del "sandwich" per il trasferimento delle proteine.

È indispensabile verificare che tra il gel e la nitrocellulosa non vi siano formate bolle di aria, che potrebbero compromettere il trasferimento proteico.

Nel panino la nitrocellulosa è posizionata verso l'elettrodo positivo (anodo) rispetto al gel, e le proteine, cariche negativamente, si muovono verso l'elettrodo positivo trasferendosi quindi sulla nitrocellulosa. Il panino viene immerso nella camera Mini Protean riempita di tampone TTB e refrigerata. Il trasferimento viene fatto a corrente costante (300 mA) per 60 minuti, quindi si scompone il panino e la nitrocellulosa viene posta in una vaschetta contenente Rosso Ponceau, colorante con il compito di evidenziare le bande proteiche e quindi accertarsi dell'avvenuto trasferimento.

Successivamente si lava la nitrocellulosa in acqua distillata per eliminare l'eccesso di colorante e su di essa si segnano a matita il numero dei pozzetti e il gel corrispondente. Infine si immerge in Tris 1 M per decolorarla completamente, e posta in una soluzione di TBS-Tween (Tris 0,02 M, NaCl 0,14 M, Tween 0,1 % v/v) e albumina al 5%, per 1 ora a temperatura ambiente, in modo da saturare i siti della membrana non occupati dalle proteine cellulari (fase di bloccaggio).

3.5.7. Rivelazione immunologica

La rivelazione immunologica sfrutta la capacità di un anticorpo di legarsi in modo specifico ad un antigene. Prima di incubare la nitrocellulosa con l'anticorpo è necessario effettuare 3 lavaggi da 5 minuti con TBS-Tween 1x in agitazione. Incubare con l'anticorpo primario (anticorpo policlonale sviluppato nel coniglio, anti-fosfoERK1/2 oppure anti ERK1/2 totali) diluito 1:1000 in TBS-Tween + BSA 5% per tutta la notte a temperatura ambiente.

Il giorno successivo si effettuano 3 lavaggi da 10 minuti con TBS-Tween 1x in agitazione per allontanare l'eccesso di anticorpo che non si è legato ai siti specifici e rimane solo quello legato alle proteine di interesse. Si esegue poi l'incubazione con l'anticorpo secondario (anti-rabbit) diluito 1:2000 in TBS-Tween + BSA 5% per 1 ora in agitazione, il quale andrà a legarsi esclusivamente all'anticorpo primario. L'anticorpo secondario ha un enzima coniugato, in grado di catalizzare la reazione con il luminolo, il substrato chemiluminescente, che verrà impiegato nel passaggio successivo. Infine si effettuano 3 lavaggi da 5 minuti e 3 da 10 minuti in TBS-Tween 1x in agitazione per eliminare l'eccesso di anticorpo secondario. Per rivelare la β -tubulina, è stato impiegato un anticorpo primario monoclonale sviluppato nel topo, tenuto in incubazione 1 ora alla diluizione di 1:200, incubato successivamente con l'anticorpo secondario (anti-mouse) diluito 1:6000.

3.5.8. Rivelazione con chemiluminescenza

La luminescenza è definita come l'emissione di luce risultante dalla dissipazione di energia da parte di una sostanza che si trova in uno stato eccitato. Nella chemiluminescenza l'eccitazione è la conseguenza di una reazione chimica. L'enzima perossidasi presente sull'anticorpo secondario, catalizza l'ossidazione del luminolo (una molecola di diacilidrazide ciclica), che viene così a trovarsi in uno stato eccitato, dal quale decade mediante emissione di luce (Figura 16). L'emissione luminosa avviene alla lunghezza d'onda di 428 nm e può essere rilevata mediante l'esposizione in una lastra fotografica sulla quale le bande proteiche vengono facilmente impressionate. L'intensità massima viene raggiunta tra i 5 e i 20 minuti dall'avvenuta reazione, dopodiché il luminolo decade lentamente con un tempo di dimezzamento di circa un'ora.

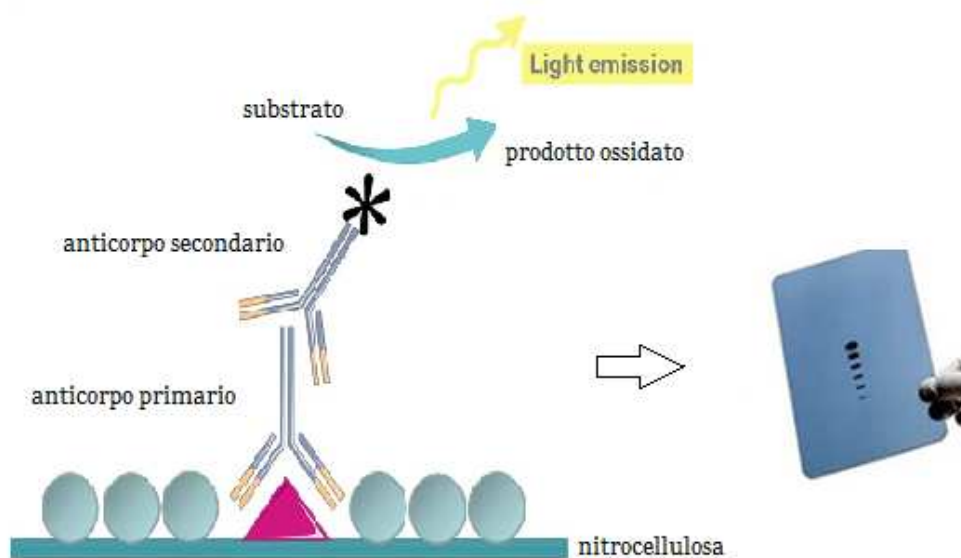


Figura 16: rivelazione immunologica delle proteine tramite chemiluminescenza.

Per la rivelazione è necessario asciugare la membrana di nitrocellulosa (altrimenti l'acqua impedisce il legame con il luminolo) e viene posta in una cameretta oscura su cui è stato inserito un foglio lucido trasparente. Da ora in avanti si opera in camera oscura con luce rossa. Si prepara la miscela di luminolo (in proporzione 1:1,1 ml di soluzione di luminolo 1 + 1 ml di soluzione di luminolo 2), si preleva la soluzione e si distribuisce sulla nitrocellulosa ricoprendola accuratamente. Si applica su di essa un altro foglio lucido trasparente e si applica una pressione per farlo aderire perfettamente sulla nitrocellulosa. A questo punto si prende una lastra fotografica di dimensioni adeguate e si poggia in

corrispondenza della nitrocellulosa per alcuni minuti. Il luminolo, legato all'anticorpo secondario in corrispondenza delle proteine, viene a contatto con la lastra fotografica.

Infine si immerge la lastra in una soluzione di sviluppo per alcuni secondi, si sciacqua in acqua distillata e si immerge in una soluzione di fissaggio per 20 minuti. Alla fine si sciacqua sotto acqua corrente e poi in acqua distillata e si lascia asciugare.

3.5.9. Analisi densitometrica

Quando la foto è ben asciutta, viene acquisita come immagine in formato Tiff tramite uno scanner impostato in modalità "scala di grigi" a 1200 dpi. Si procede con l'analisi densitometrica delle bande per mezzo di un apposito software di immagine, ImageMaster TotalLab v1.00 (Amersham), che fornisce i valori di densità delle bande in termini di area e di intensità e di pixel, le quali verranno successivamente elaborate mediante fogli di calcolo Excel.

3.6. ANALISI STATISTICA

I dati ottenuti sono stati analizzati utilizzando ANOVA a 1 via (analisi della varianza) mediante programma Sigma Plot (ver 13, Systat Software Inc.), seguiti dal test di confronto di Dunnet, considerando con $P < 0.05$ i valori che hanno una differenza statisticamente significativa rispetto al controllo sperimentale. I risultati sono stati espressi come la media \pm l'errore standard (ES). Tutti i risultati riportati sono rappresentativi di almeno tre esperimenti indipendenti eseguiti nelle stesse condizioni.

4. RISULTATI

4.1. VALUTAZIONE DEGLI EFFETTI ESTROGENICI DEL BISFENOLO A SULLE CELLULE HTR-8/SVneo

Tramite il test dell'E-SCREEN opportunamente adattato a questa linea cellulare, è stato valutato l'effetto del Bisfenolo A (BPA) sulle cellule esposte all'inquinante a diverse concentrazioni in incubazione per 3 giorni.

Come mostrato in Figura 17, il test svolto indica che alle concentrazioni più basse, da 10^{-14} a 10^{-12} M, il BPA non ha effetti significativi sulla proliferazione cellulare. Tuttavia questa aumenta significativamente rispetto al controllo non trattato in maniera dose-dipendente, con effetto massimo alla concentrazione 10^{-7} M.

Dalla dose 10^{-5} M si nota un abbassamento dell'effetto proliferativo, fino alle concentrazioni più alte (10^{-4} e 10^{-3} M), alle quali le cellule subiscono un tracollo della vitalità rispetto al controllo non trattato. È possibile che in tali condizioni il BPA eserciti un effetto citotossico sulle cellule.

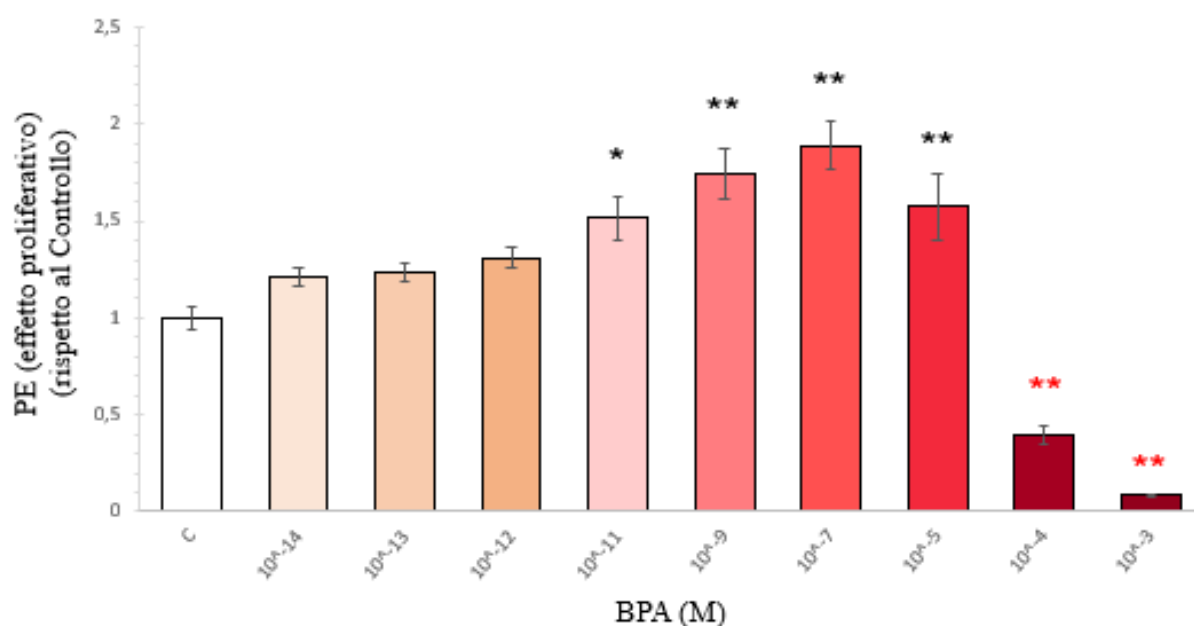


Figura 17: Effetto proliferativo su cellule esposte a Bisfenolo A. Le cellule sono state trattate con BPA a concentrazioni da 10^{-14} a 10^{-3} M per 3 giorni. C= controllo non trattato. I risultati sono espressi come media del PE \pm l'errore standard di 15 esperimenti indipendenti (N=15) condotti in quadruplicato. * $P < 0,05$, ** $P < 0,001$, rispetto al controllo (PE = 1).

Per verificare che l'aumento di proliferazione sia dovuto all'effetto estrogenico indotto dal BPA sono stati effettuati degli esperimenti in presenza di tamoxifene, un inibitore specifico che si lega al recettore degli estrogeni impedendo il legame.

Le cellule sono state esposte a BPA 10^{-9} M in presenza dell'inibitore alla concentrazione di 10^{-7} M per 3 giorni. Come controllo sono state impiegate cellule incubate per 3 giorni sia in presenza (C+T) che in assenza (C) di Tamoxifene 10^{-7} M.

Nella Figura 18 sono riportati i risultati degli esperimenti. È possibile notare come la presenza dell'inibitore abolisce completamente l'effetto estrogenico indotto dal BPA, mantenendo la vitalità cellulare simile ai controlli non trattati.

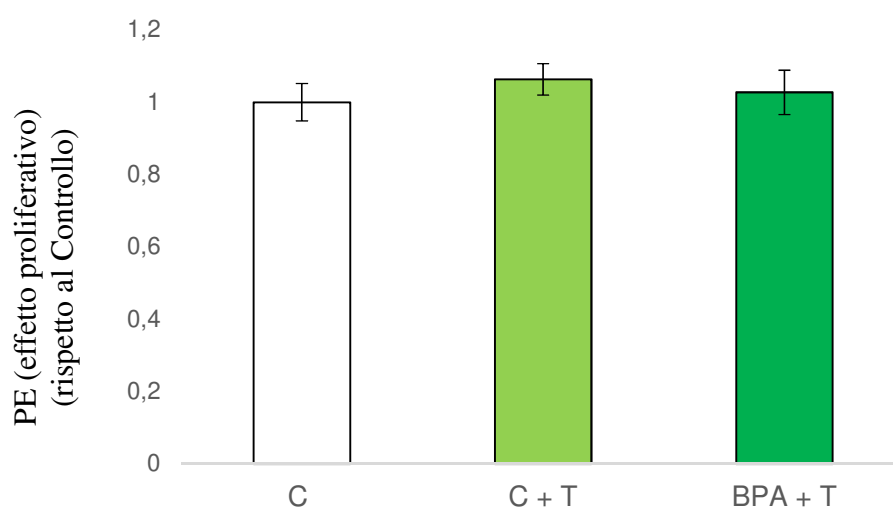
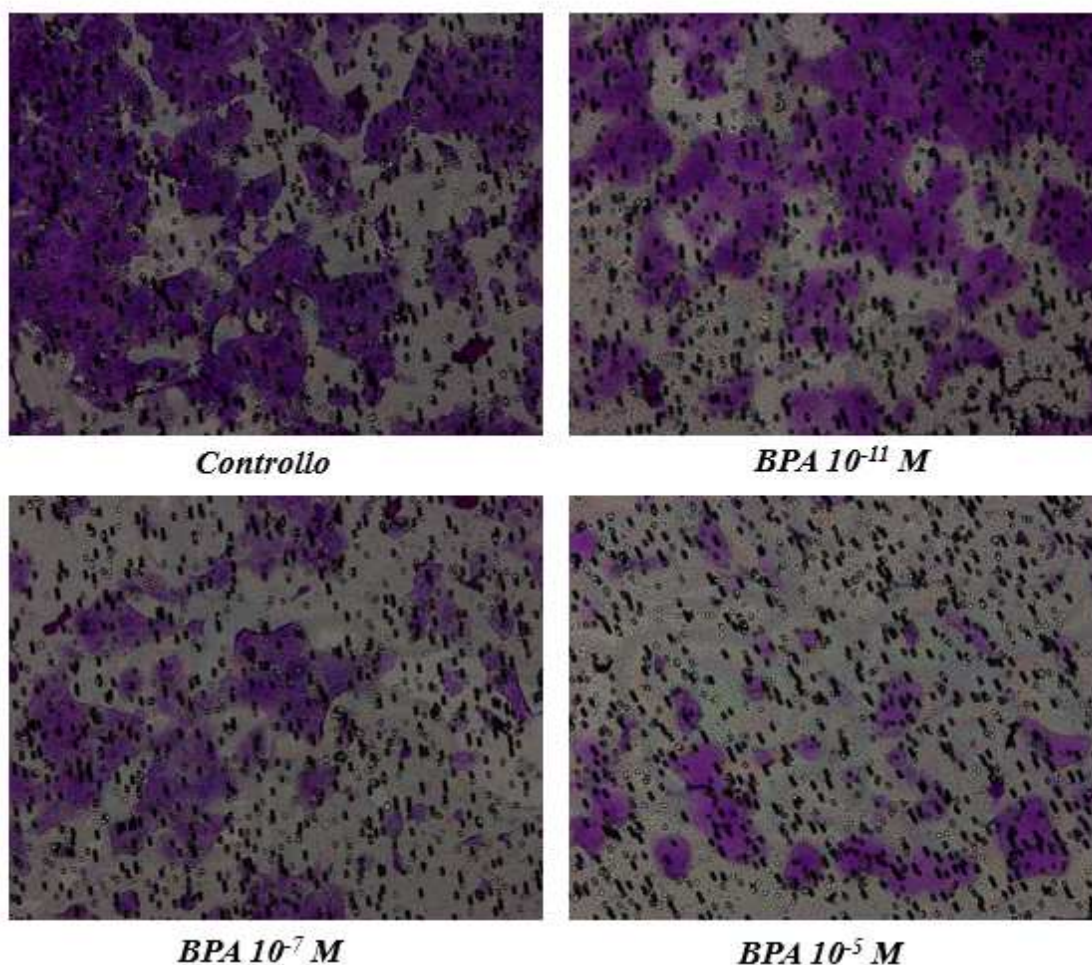


Figura 18: Effetto proliferativo su cellule trattate con tamoxifene. C= controllo non trattato. C + T = controllo esposto a tamoxifene 10^{-7} M. BPA + T = cellule trattate con tamoxifene 10^{-7} M e BPA 10^{-9} M. Le cellule sono state esposte ai trattamenti per 3 giorni. I risultati sono espressi come media del PE \pm l'errore standard di 8 esperimenti indipendenti (N=8) condotti in quadruplicato.

4.2. VALUTAZIONE DELLA CAPACITÀ MIGRATORIA DELLE CELLULE HTR-8/SVneo IN PRESENZA DI BISFENOLO A

Per determinare se il BPA influisca sulla capacità di migrare del trofoblasto nell'interfaccia materno-fetale, è stato svolto un saggio di migrazione con cellule HTR-8/SVneo poste in cellette di migrazione contenente una membrana microporosa in policarbonato, all'interno di camere con mezzo a differente concentrazione di siero in modo da favorire un gradiente migratorio.

I risultati ottenuti dal saggio (Figura 19) suggeriscono che la capacità di migrazione delle cellule diminuisce quando vengono trattate con BPA in concentrazioni di 10^{-7} e 10^{-5} M, in maniera significativa rispetto al controllo non trattato. In particolare, il numero di cellule che hanno attraversato la membrana è diminuito passando al 78% e al 47%, rispettivamente, mentre alle concentrazioni più basse di BPA non stati osservati effetti significativi rispetto al controllo non trattato.

A

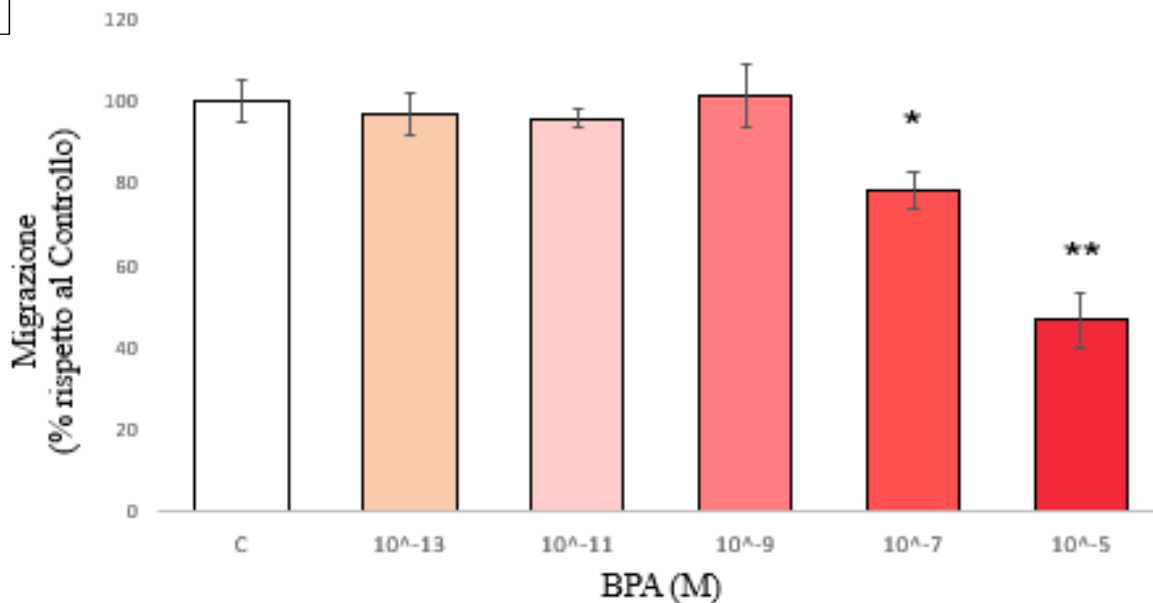
B

Figura 19: Effetto del bisfenolo A sulla migrazione cellulare. Le cellule sono state trattate con BPA a concentrazioni da 10^{-13} a 10^{-5} M per 3 giorni. [A] Immagine rappresentativa della migrazione delle cellule HTR-8/SVneo attraverso una porzione di membrana microporosa delle cellette di migrazione.

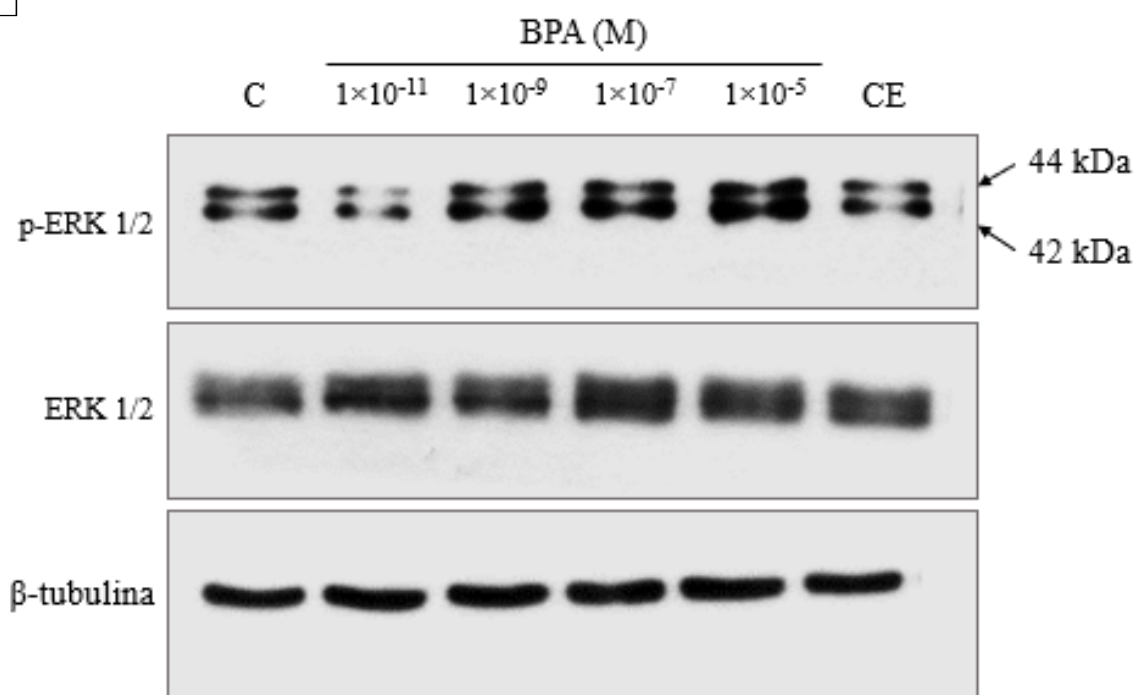
[B] Quantificazione della migrazione cellulare. C=controllo non trattato. I risultati, espressi come percentuale rispetto al controllo, sono la media di 5 esperimenti indipendenti \pm l'errore standard (N=5).

* $P < 0,05$, ** $P < 0,001$, rispetto al controllo.

4.3. VALUTAZIONE DELL'ATTIVAZIONE DELLA VIA DI TRASDUZIONE DEL SEGNALE REGOLATO DALLE MAPK (ERK 1/2) IN PRESENZA DI BISFENOLO A

Al fine di indagare ulteriormente gli effetti del BPA a livello delle vie di trasduzione del segnale mediato dal sistema delle MAPK, le cellule HTR-8/SVneo sono state esposte a diverse concentrazioni di BPA da 10^{-11} a 10^{-5} M per 3 giorni; successivamente i lisati cellulari sono stati sottoposti ad analisi con western blotting utilizzando anticorpi specifici per la cascata MAP chinasi delle ERK 1/2.

Attraverso l'analisi densitometrica delle bande (Figura 20) è possibile osservare un incremento significativo della fosforilazione delle ERK 1/2 in campioni trattati con BPA alle dosi 10^{-9} , 10^{-7} e 10^{-5} M rispetto al controllo. La concentrazione 10^{-11} M, invece, non ha mostrato alcun effetto significativo rispetto al controllo.

A

B

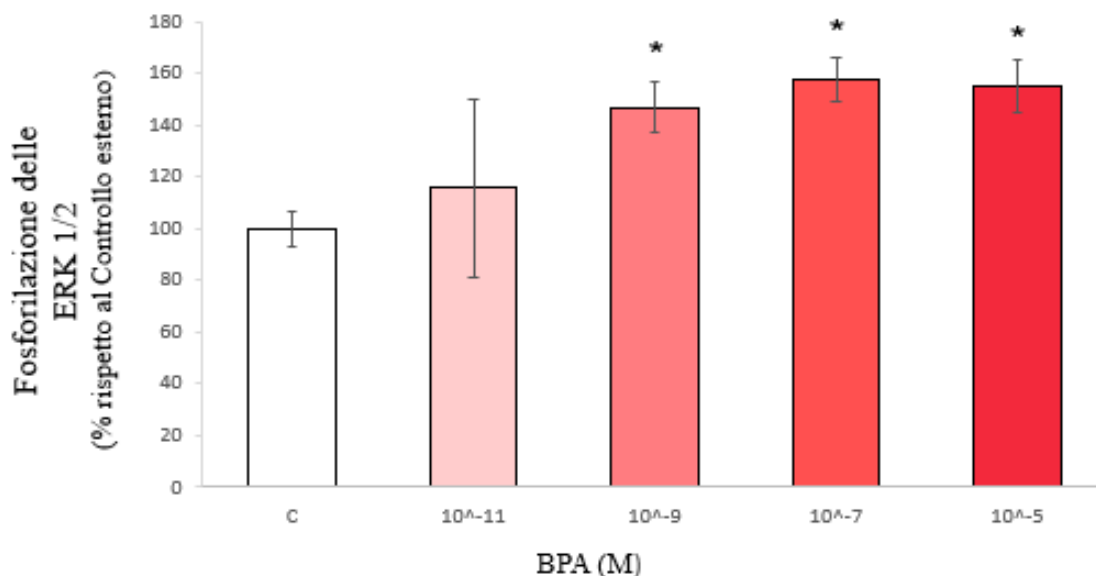


Figura 20: fosforilazione delle ERK 1/2 indotta da bisfenolo A nelle cellule di trofoblasto. Le cellule sono state trattate con BPA a concentrazioni da 10^{-11} a 10^{-5} M per 3 giorni. [A] foto rappresentative dei gel relativi alla valutazione delle ERK 1/2 fosforilate, delle ERK 1/2 totali e del controllo con β -tubulina, per verificare un uguale caricamento di lisato cellulare in ogni pozzetto. C= controllo non trattato. CE = controllo esterno: vista l'intrinseca variabilità in termini di luminosità tra una foto e l'altra ottenute con il western blotting, in ogni gel è stato caricato un controllo esterno rispetto al quale esprimere i dati densitometrici come percentuale. [B] Dati densitometrici relativi alla fosforilazione delle ERK 1/2. L'attività MAPK, valutata come rapporto tra le MAPK fosforilate e quelle totali, è espressa come percentuale di CE. I risultati sono espressi come media di 3 esperimenti indipendenti \pm l'errore standard (N=3). * $P < 0,05$, rispetto al controllo.

Per verificare che la fosforilazione osservata sia dovuta all'attivazione della via delle MAPK indotta dal BPA, è stato valutato l'effetto dell'esposizione in presenza di U0126 [1,4-diamino-2,3-diciano-1,4-bis(2-aminofeniltio)butadiene], un inibitore specifico dell'attivazione delle ERK che agisce bloccando il processo di fosforilazione. I campioni sono stati preventivamente incubati con l'inibitore ad una concentrazione di 10 μ M per 30 minuti, successivamente esposte al BPA alla dose 10^{-9} M. La fosforilazione della via delle MAPK in cellule HTR-8/SVneo in presenza dell'inibitore abolisce l'effetto indotto dal BPA rispetto al controllo sperimentale e al controllo deprivato del siero (CNS), quest'ultimo utilizzato per escludere un eventuale effetto di fosforilazione derivato dalla presenza di fattori di crescita nel mezzo di coltura delle cellule (Figura 21).

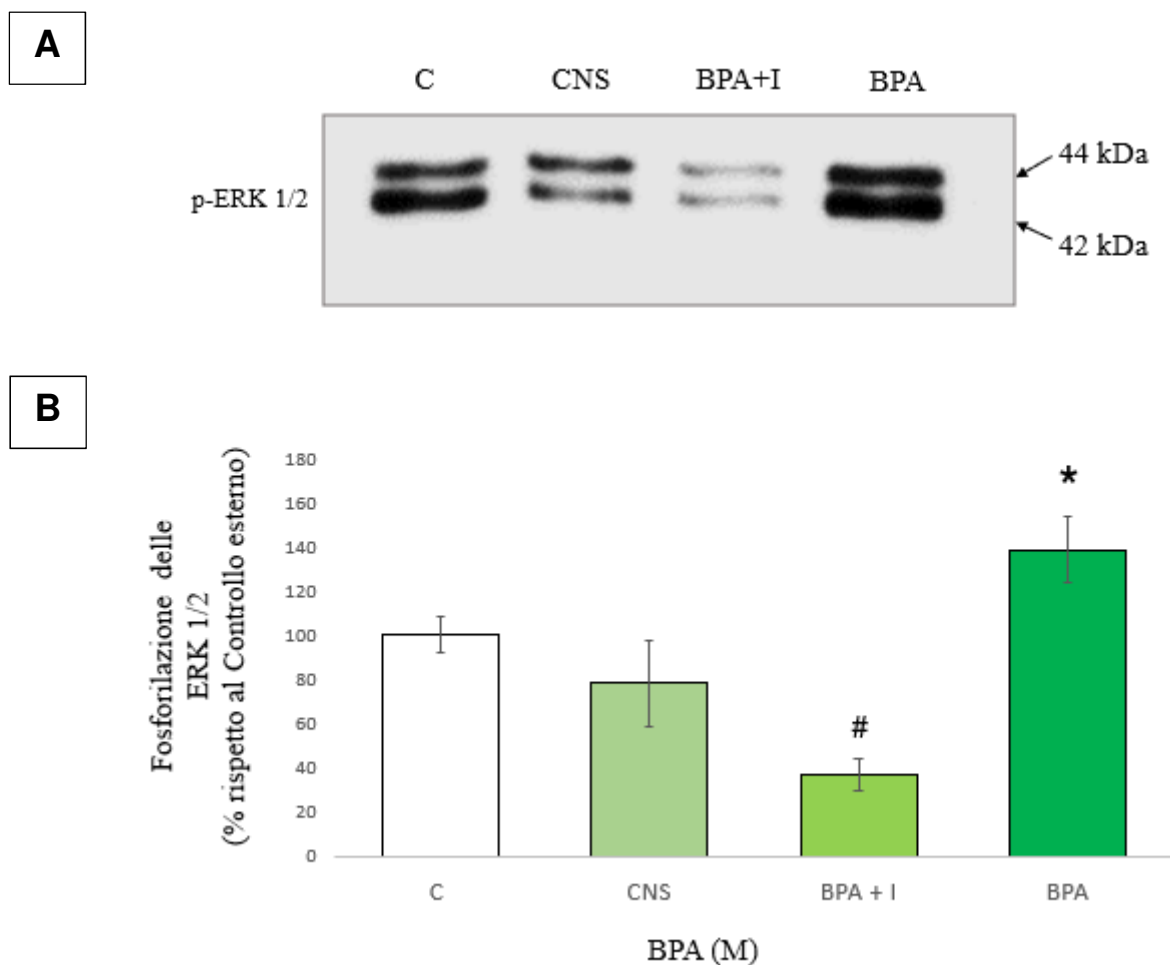


Figura 21: Effetti di inibizione della fosforilazione delle ERK 1/2 in presenza dell'inibitore U0126. Le cellule sono state trattate con BPA alla concentrazione $10^{-9}M$ per 3 giorni. [A] foto rappresentativa del gel relativo alla valutazione delle ERK 1/2 fosforilate in presenza dell'inibitore U0126. C= controllo non trattato. CNS = controllo deprivato dal siero. I= inibitore U0126. [B] Dati densitometrici relativi alla fosforilazione delle ERK 1/2. I risultati sono espressi come media di 3 esperimenti indipendenti \pm l'errore standard (N=3).
* $P < 0,05$, rispetto al controllo; # $P < 0,05$, rispetto al campione trattato con BPA.

5. DISCUSSIONE

L'obiettivo di questo lavoro di tesi è stato quello di definire i possibili effetti del Bisfenolo A (BPA) sulle funzioni svolte dalle cellule trofoblastiche umane durante la placentazione.

La maggior parte degli studi condotti finora sugli effetti del BPA si sono incentrati su attività estrogenica e di tossicità sul sistema riproduttivo, infatti a causa della sua somiglianza strutturale con l'ormone 17 β -estradiolo (E2), il BPA può agire come attore principale nella patogenesi di diversi disturbi genitali e riproduttivi, come alterazioni del tratto riproduttivo maschile e femminile, infertilità femminile e maschile, pubertà precoce, cancro al seno e alla prostata, irregolarità mestruali e sindrome dell'ovaio policistico (Leonardi et al. 2017). Inoltre, la presenza di BPA rilevato nel sangue nelle donne è stata correlata a disturbi riproduttivi come iperplasia endometriale, endometriosi, ricorrenti aborti spontanei e diminuzione del tasso di gravidanza (Aghajanova e Giudice 2011).

Alcune evidenze recenti hanno mostrato ulteriori effetti collaterali tra cui danni al fegato, stress ossidativo e infiammazione, modifica della funzione delle cellule β -pancreatiche e degli ormoni tiroidei, diminuzione della funzionalità intestinale ed effetti di sviluppo dell'obesità. (Le Corre et al. 2015).

Quindi, questo composto xenobiotico può agire sulla maggior parte dei tessuti sensibili agli estrogeni, incluso l'endometrio, e il rischio associato alla sua esposizione è quasi onnipresente.

Diversi studi hanno rilevato la presenza di BPA nel siero materno e nel liquido amniotico, indicando un potenziale passaggio attraverso la barriera placentare (Yamada et al. 2002). Questo fenomeno assume una grande rilevanza, basti pensare che la placenta è l'organo che permette lo scambio di sostanze tra la madre e il feto, ciò significa che la contaminazione materna potrebbe avere come conseguenza l'assorbimento di BPA anche da parte del feto.

Nonostante sia stato identificato in diversi tessuti umani, la presenza del BPA nel tessuto placentare solleva preoccupazioni sulla sua potenziale interferenza sia sullo sviluppo della placenta che sull'intera gravidanza. Il BPA infatti può compromettere la migrazione e l'invasione delle cellule di trofoblasto extravilloso, processi chiave per l'impianto dell'embrione (Spagnoletti et al. 2015). Ulteriori osservazioni hanno chiaramente dimostrato una correlazione esistente tra alterazioni delle funzioni del trofoblasto (differenziazione, invasione, proliferazione, apoptosi) e disturbi in gravidanza. Ad esempio, una limitata invasione dei trofoblasti è associata alla preeclampsia e/o alla restrizione della crescita intrauterina (Morice et al. 2012).

Tuttavia, nonostante le intense ricerche e dati riguardanti i rischi associati al BPA sulla salute riproduttiva, esistono prove insufficienti riguardo i suoi effetti sulla placenta e i relativi meccanismi di formazione. Il presente studio intende fornire approfondimenti a questo proposito.

La linea cellulare HTR-8/SVneo, presa in esame nei nostri studi di laboratorio, rappresenta un modello sperimentale che ben si presta per lo studio *in vitro* della placentazione; queste cellule infatti derivano da una linea di trofoblasto extravilloso del primo trimestre, e sono caratterizzate da un'elevata capacità di migrare, invadere e penetrare nei tessuti materni.

Sulle cellule HTR-8/SVneo, attraverso ricerche preliminari condotte nel Laboratorio di Fisiologia Animale e Ambientale del BiGeA, era stato studiato l'effetto modulativo dell'E2 tramite l'applicazione del test E-screen assay, la metodica più adatta nella valutazione del ruolo degli estrogeni o sostanze estrogeno-mimetiche (usualmente applicato sulla linea cellulare epiteliale di carcinoma mammario MCF-7⁷).

È stato dimostrato che, similmente alle cellule MCF-7, l'E2 induce la proliferazione delle cellule HTR-8/SVneo a partire dalla dose di 10^{-12} M. Questo conferma che la linea cellulare è capace di rispondere agli stimoli estrogenici. Inoltre tali risultati hanno posto una base importante per l'applicazione del test E-screen sulle cellule di trofoblasto per la valutazione di sostanze xenobiotiche aventi attività simil-estrogenica.

Considerato l'effetto "estrogen-like" del BPA ormai confermato in letteratura, è stato impiegato l'E-screen per determinare la responsività delle cellule HTR-8/SVneo all'esposizione con l'interferente. Le osservazioni fatte dimostrano che il BPA determina un aumento della proliferazione sulla linea cellulare in questione.

Sulla base di questi dati sono stati approfonditi gli effetti del BPA sulle capacità di proliferazione, migrazione e attivazione delle vie di segnalazione delle cellule di trofoblasto.

In una prima serie di esperimenti è stato osservato l'effetto sulla proliferazione delle cellule HTR-8/SVneo, costruendo una curva standard di estrogenicità utilizzando diverse concentrazioni di BPA (da 10^{-14} a 10^{-3} M).

Il saggio ha evidenziato che l'inquinante ha un effetto estrogenico significativo a partire già dalla dose 10^{-11} M, con un aumento progressivo della proliferazione all'aumentare della dose fino a raggiungere un effetto proliferativo massimo alla concentrazione di 10^{-7} M. Dosi più alte invece invertono questa tendenza mostrando una diminuzione della vitalità, con effetti citotossici a 10^{-4} e 10^{-3} M. L'effetto del BPA viene bloccato dal trattamento con il tamoxifene, bloccante dei recettori estrogenici, il quale ha prodotto la totale inibizione dell'effetto proliferativo, confermando come atteso il ruolo svolto dal BPA.

Confrontando i risultati ottenuti con quanto osservato negli studi preliminari mediante la stessa metodica, si osserva che le cellule di trofoblasto rispondono al BPA con una sensibilità di poco

⁷ MCF-7: linea cellulare particolarmente responsiva agli estrogeni (17 β -estradiolo - E2)

inferiore rispetto all'E2. Infatti, il massimo dell'attività proliferativa, confrontabile con quella di E2 10^{-8} M, si osserva per il BPA alla concentrazione 10^{-7} M, con una differenza di un solo ordine di grandezza. Inoltre i trofoblasti sono risultati più sensibili all'esposizione al BPA rispetto alle cellule MCF-7, in quest'ultime la concentrazione più bassa a cui è stato osservato un effetto significativo è risultata 10^{-8} M, invece per le HTR-8/SVneo la dose alla quale si riscontra un effetto rilevabile è 10^{-11} M, quindi una sensibilità di circa 1.000 volte superiore.

Queste osservazioni rafforzano l'idea generale che l'esposizione a sostanze estrogeno-mimetiche, come il BPA, induca nelle cellule trofoblastiche una maggiore stimolazione a proliferare.

Noto che una tra le caratteristiche principali delle cellule di trofoblasto è rappresentata dalla migrazione nei tessuti materni per favorire il processo di impianto dell'embrione e di sviluppo della placenta, è stato eseguito uno studio per determinare i possibili effetti che il BPA può indurre sulle capacità migratorie dei trofoblasti.

Dai risultati ottenuti mediante il saggio di migrazione, il BPA causa l'inibizione della migrazione, in maniera dose-dipendente e significativa alle concentrazioni 10^{-7} e 10^{-5} M. La diminuzione della migrazione cellulare può essere attribuibile ad un effetto citotossico del BPA. L'interpretazione di questi dati suggerisce che, nonostante l'aumento della proliferazione delle HTR-8/SVneo, in presenza di tale sostanza le cellule potrebbero perdere la loro capacità di migrare.

Come avviene in tutti i meccanismi di risposta cellulare, l'esplicazione degli effetti cellulari passa attraverso le vie di trasduzione del segnale. È stato ampiamente riportato che i segnali estrogenici del BPA sono mediati da recettori accoppiati alle proteine G (GPR30) e recettori degli estrogeni (ER). Studi recenti hanno rivelato che il BPA induce la fosforilazione di ERK1/2 attraverso GPR30 in cellule di carcinoma mammario umano (Li et al. 2017). Attraverso il legame con i ER, il BPA è in grado di esplicitare effetti multidirezionali sulle funzioni biologiche cellulari. Nella maggior parte dei casi, il BPA esercita i suoi effetti biologici attivando uno di questi due percorsi in modo indipendente. Poiché è stato dimostrato che il BPA è in grado di influenzare la proliferazione e la migrazione delle cellule trofoblastiche, nel lavoro di questa tesi è stato valutato il suo effetto sulle vie funzionali di trasmissione del messaggio mediato dalle MAPK nelle cellule HTR-8/SVneo.

Tramite l'analisi con Western blotting è stato osservato che il BPA induce la fosforilazione delle proteine ERK 1/2 alle dosi 10^{-9} , 10^{-7} e 10^{-5} M. I dati ottenuti sono stati confermati dall'utilizzo dell'inibitore U0126, indicando in questo modo che il BPA è in grado di indurre la fosforilazione delle ERK 1/2.

Le ERK 1/2 partecipano alla regolazione di una grande varietà di processi inclusa la proliferazione cellulare; per cui, avendo osservato che il BPA determina un aumento della proliferazione nelle

cellule HTR-8/SVneo e la fosforilazione delle ERK 1/2, gli effetti di questa sostanza potrebbero verosimilmente essere trasdotti della via di segnalazione delle MAPK.

Ad oggi, i risultati ottenuti sul modello sperimentale da noi utilizzato sono carenti, quindi i nostri dati contribuiscono ad aumentare le conoscenze circa gli effetti biologici del BPA sulla placenta e sui meccanismi che stanno alla base del suo sviluppo.

In letteratura, le uniche informazioni disponibili sugli effetti del BPA sulle HTR-8/SVneo derivano da due recenti ricerche, i cui dati però risultano contrastanti. Un primo studio condotto nel 2015, ha dimostrato che il BPA comporta una diminuzione della migrazione e dell'invasività delle cellule HTR-8/SVneo, in particolare il maggiore effetto è stato riscontrato alla concentrazione 10^{-11} M (Spagnoletti et al. 2015). Differente risulta invece un secondo studio condotto nel 2017, in cui l'esposizione al BPA indica un aumento dose-dipendente della migrazione cellulare alle concentrazioni nell'intervallo 10^{-7} - 10^{-5} M (Lan et al. 2017). È presumibile che le differenti osservazioni siano date dal fatto che sono stati applicati saggi e condizioni sperimentali differenti. Inoltre, per quanto riguarda la proliferazione cellulare, entrambi gli studi non hanno osservato alcun effetto indotto dal BPA.

Le osservazioni da noi riportate sulla proliferazione cellulare sono supportate dall'applicazione di una metodologia particolarmente adatta nella valutazione delle sostanze estrogeniche, l'E-screen assay. Da ciò ne deriva l'importanza di questo lavoro di tesi, in cui per la prima volta è stato possibile dimostrare l'effetto estrogenico del BPA sulla linea cellulare HTR-8/SVneo tramite una metodologia di screening altamente sensibile.

6. CONCLUSIONI

In conclusione, i nostri dati sono una chiara prova del potenziale impatto del Bisfenolo A (BPA) sulla placenta umana. Considerando che le sostanze chimiche, in particolare gli interferenti endocrini come il BPA, entrano in contatto con il feto attraverso il sangue materno, il periodo dello sviluppo fetale e neonatale rappresenta la finestra più vulnerabile dell'esposizione.

Questa ricerca è risultata di grande importanza per il contributo di informazioni fornite sul coinvolgimento del BPA nel processo di placentazione, evento chiave per l'impianto dell'embrione, finora carenti in letteratura.

Il nostro studio si è avvalso per la prima volta dell'E-screen assay per studiare gli effetti estrogenici del BPA sul modello sperimentale HTR-8/SVneo. I risultati della ricerca hanno dimostrato che il BPA è in grado di aumentare la proliferazione cellulare in concentrazioni tra 10^{-11} e 10^{-7} M, concentrazioni realmente misurate nei tessuti e liquidi umani.

Inoltre, poiché il processo di placentazione risulta un evento critico e complesso, l'alterazione della capacità di migrazione del trofoblasto assume un profondo significato nel determinare il successo dell'impianto dell'embrione e dello sviluppo placentale.

I dati ottenuti dallo studio sulla migrazione delle HTR-8/SVneo indicano che l'esposizione al BPA riduce la migrazione delle cellule trofoblastiche. Sebbene questo non sia ancora correlato con studi *in vivo*, è possibile ipotizzare che una ridotta migrazione dei trofoblasti nei tessuti materni possa rappresentare un ostacolo per lo sviluppo della placenta.

Le diverse tipologie di risposta osservate potrebbero essere attivate dalla via di segnalazione delle ERK 1/2, proteine che regolano numerosi processi tra i quali la proliferazione e la migrazione cellulare. I nostri risultati dimostrano che in presenza di BPA le proteine ERK 1/2 vengono fosforilate, presupponendo l'attivazione della cascata enzimatica di segnalazione.

I risultati ottenuti nel presente lavoro, oltre ad avere un valore sul piano conoscitivo, possono essere utili per la messa a punto di nuove regolamentazioni più restrittive per la salvaguardia della salute umana.

7. BIBLIOGRAFIA

- Acconcia, Filippo, Valentina Pallottini, e Maria Marino. 2015. «Molecular Mechanisms of Action of BPA». *Dose-Response* 13 (4). <https://doi.org/10.1177/1559325815610582>.
- Aghajanova, L, e LC Giudice. 2011. «Effect of bisphenol A on human endometrial stromal fibroblasts in vitro». *Reproductive biomedicine online* 22 (3). <https://doi.org/10.1016/j.rbmo.2010.12.007>.
- Balakrishnan, Biju, Kimiora Henare, Eric B. Thorstensen, Anna P. Ponnampalam, e Murray D. Mitchell. 2010. «Transfer of Bisphenol A across the Human Placenta». *American Journal of Obstetrics and Gynecology* 202 (4):393.e1-393.e7. <https://doi.org/10.1016/j.ajog.2010.01.025>.
- Bechi, N., G. Sorda, A. Spagnoletti, J. Bhattacharjee, E.A. Vieira Ferro, B. de Freitas Barbosa, M. Frosini, et al. 2013. «Toxicity Assessment on Trophoblast Cells for Some Environment Polluting Chemicals and 17 β -Estradiol». *Toxicology in Vitro* 27 (3):995–1000. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2013.01.013>.
- Bukovsky, Antonin, Maria Cekanova, Michael R Caudle, Jay Wimalasena, James S Foster, Donald C Henley, e Robert F Elder. 2003. «Expression and localization of estrogen receptor-alpha protein in normal and abnormal term placentae and stimulation of trophoblast differentiation by estradiol». *Reproductive biology and endocrinology : RB&E* 1 (febbraio):13. <https://doi.org/10.1186/1477-7827-1-13>.
- Cargnello, Marie, e Philippe P. Roux. 2011. «Activation and Function of the MAPKs and Their Substrates, the MAPK-Activated Protein Kinases». *Microbiology and Molecular Biology Reviews : MMBR* 75 (1):50–83. <https://doi.org/10.1128/MMBR.00031-10>.
- Corrales, Jone, Lauren A. Kristofco, W. Baylor Steele, Brian S. Yates, Christopher S. Breed, E. Spencer Williams, e Bryan W. Brooks. 2015. «Global Assessment of Bisphenol A in the Environment: Review and Analysis of Its Occurrence and Bioaccumulation». *Dose-Response* 13 (3):155932581559830. <https://doi.org/10.1177/1559325815598308>.
- Donnelly, Leo, e Gillian Campling. 2008. «Functions of the placenta». *Anaesthesia & intensive care medicine* 9 (3):124–127.

- Erler, Cheryl, e Julie Novak. 2010. «Bisphenol A Exposure: Human Risk and Health Policy». *Journal of Pediatric Nursing* 25 (5):400–407. <https://doi.org/10.1016/j.pedn.2009.05.006>.
- European Commission Directorate. 2002. «Opinion of the Scientific Committee on Food on Bisphenol A».
- Evain-Brion, Danièle, e André Malassine. 2003. «Human Placenta as an Endocrine Organ». *Growth Hormone & IGF Research* 13 (agosto):S34–37. [https://doi.org/10.1016/S1096-6374\(03\)00053-4](https://doi.org/10.1016/S1096-6374(03)00053-4).
- Fenichel, Patrick, Nicolas Chevalier, e Françoise Brucker-Davis. 2013. «Bisphenol A: An Endocrine and Metabolic Disruptor». *Annales d'Endocrinologie* 74 (3):211–20. <https://doi.org/10.1016/j.ando.2013.04.002>.
- Flint, Shelby, Tricia Markle, Sarah Thompson, e Elizabeth Wallace. 2012. «Bisphenol A Exposure, Effects, and Policy: A Wildlife Perspective». *Journal of Environmental Management* 104 (agosto):19–34. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2012.03.021>.
- Gootwine, E. 2004. «Placental Hormones and Fetal–placental Development». *Animal Reproduction Science* 82–83 (luglio):551–66. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2004.04.008>.
- Graham C. H., Hwley T. S., Hawlwy R. G., MacDougall J. R., Kerbel R. S., Khoo N., e Lala P. K. 1993. «Establishment and characterization of first trimester human trophoblast cells with extended lifespan». *Esperimental cell research*, 206,204-211.
- Grümmer, Ruth, e Elke Winterhager. 2011. «Blastocyst-Mediated Induction of Endometrial Connexins: An Inflammatory Response?» *Journal of Reproductive Immunology* 90 (1):9–13. <https://doi.org/10.1016/j.jri.2011.02.010>.
- Gude, Neil M., Claire T. Roberts, Bill Kalionis, e Roger G. King. 2004. «Growth and Function of the Normal Human Placenta». *Thrombosis Research* 114 (5–6):397–407. <https://doi.org/10.1016/j.thromres.2004.06.038>.
- Istituto Superiore di Sanità. 2011. «rapporti ISTISAN 11-18».
- Kang, Jeong-Hun, Fusao Kondo, e Yoshiki Katayama. 2006. «Human Exposure to Bisphenol A». *Toxicology* 226 (2–3):79–89. <https://doi.org/10.1016/j.tox.2006.06.009>.

- Keith L. Moore, T.V.N. Persaud, e Mark G. Torchia. 2017. *Lo sviluppo prenatale dell'uomo. Embriologia ad orientamento clinico*. 10° ed. Edra.
- Konieczna, Aleksandra, Aleksandra Rutkowska, e D. Rachon. 2015. «Health risk of exposure to Bisphenol A (BPA)». *Roczniki Państwowego Zakładu Higieny* 66 (1).
- Lan, Xi, Li-Juan Fu, Jun Zhang, Xue-Qing Liu, Hui-Jie Zhang, Xue Zhang, Ming-Fu Ma, Xue-Mei Chen, Jun-Lin He, e Lian-Bing Li. 2017. «Bisphenol A exposure promotes HTR-8/SVneo cell migration and impairs mouse placentation involving upregulation of integrin- β 1 and MMP-9 and stimulation of MAPK and PI3K signaling pathways». *Oncotarget* 8 (31):51507.
- Le Corre, L., P. Besnard, e M.-C. Chagnon. 2015. «BPA, an Energy Balance Disruptor». *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 55 (6):769–77.
<https://doi.org/10.1080/10408398.2012.678421>.
- Leonardi, Alberto, Marta Cofini, Donato Rigante, Laura Lucchetti, Clelia Cipolla, Laura Penta, e Susanna Esposito. 2017. «The Effect of Bisphenol A on Puberty: A Critical Review of the Medical Literature». *International Journal of Environmental Research and Public Health* 14 (9). <https://doi.org/10.3390/ijerph14091044>.
- Li, Xiaoqian, Yina Wang, Pu Wei, Dongyan Shi, Shuang Wen, Fengjiao Wu, Lixin Liu, Ninghe Ye, e Hong Zhou. 2017. «Bisphenol A Affects Trophoblast Invasion by Inhibiting CXCL8 Expression in Decidual Stromal Cells». *Molecular and Cellular Endocrinology*, luglio.
<https://doi.org/10.1016/j.mce.2017.07.016>.
- Lowry, Oliver H., Nira J. Rosebrough, A. Lewis Farr, e Rose J. Randall. 1951. «Protein measurement with the Folin phenol reagent». *Journal of biological chemistry* 193 (1):265–275.
- Lunghi, Laura, Maria E. Ferretti, Silvia Medici, Carla Biondi, e Fortunato Vesce. 2007. «Control of human trophoblast function». *Reproductive Biology and Endocrinology* 5 (1):6.
- Malassiné, André, e Laurent Cronier. 2002. «Hormones and human trophoblast differentiation». *Endocrine* 19 (1):3–11.

- Mannelli, Chiara, Anna Z Szóstek, Karolina Lukasik, Claudiopietro Carotenuto, Francesca Ietta, Roberta Romagnoli, Cristina Ferretti, Luana Paulesu, Sławomir Wołczynski, e Dariusz Jan Skarzynski. 2015. «Bisphenol A Modulates Receptivity and Secretory Function of Human Decidual Cells: An *in Vitro* Study». *Reproduction* 150 (2):115–25. <https://doi.org/10.1530/REP-14-0601>.
- Michałowicz, Jaromir. 2014. «Bisphenol A – Sources, Toxicity and Biotransformation». *Environmental Toxicology and Pharmacology* 37 (2):738–58. <https://doi.org/10.1016/j.etap.2014.02.003>.
- Morice, L., D. Benaitreau, M.-N. Dieudonné, C. Morvan, V. Serazin, P. de Mazancourt, R. Pecquery, e E. Dos Santos. 2012. «Effets antiprolifératifs et proapoptotiques du bisphénol A dans les cellules trophoblastiques humaines JEG-3». *Immuno-analyse & Biologie Spécialisée* 27 (4):168–76. <https://doi.org/10.1016/j.immbio.2012.04.004>.
- Moriyama, Kenji, Tetsuya Tagami, Takashi Akamizu, Takeshi Usui, Misa Saijo, Naotetsu Kanamoto, Yuji Hataya, Akira Shimatsu, Hideshi Kuzuya, e Kazuwa Nakao. 2002. «Thyroid Hormone Action Is Disrupted by Bisphenol A as an Antagonist». *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 87 (11):5185–90. <https://doi.org/10.1210/jc.2002-020209>.
- Mørck, Thit J., Giuseppina Sorda, Nicoletta Bechi, Brian S. Rasmussen, Jesper B. Nielsen, Francesca Ietta, Erik Rytting, Line Mathiesen, Luana Paulesu, e Lisbeth E. Knudsen. 2010. «Placental Transport and *in Vitro* Effects of Bisphenol A». *Reproductive Toxicology* 30 (1):131–37. <https://doi.org/10.1016/j.reprotox.2010.02.007>.
- Newbold, Retha R., Wendy N. Jefferson, e Elizabeth Padilla-Banks. 2009. «Prenatal exposure to bisphenol a at environmentally relevant doses adversely affects the murine female reproductive tract later in life». *Environmental health perspectives* 117 (6):879.
- Ptak, Anna, Marta Hoffmann, Izabella Gruca, e Justyna Barć. 2014. «Bisphenol A Induce Ovarian Cancer Cell Migration via the MAPK and PI3K/Akt Signalling Pathways». *Toxicology Letters* 229 (2):357–65. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2014.07.001>.

- Rajakumar, Chandrew, Haiyan Guan, David Langlois, Maria Cernea, e Kaiping Yang. 2015. «Bisphenol A Disrupts Gene Expression in Human Placental Trophoblast Cells». *Reproductive Toxicology* 53 (giugno):39–44. <https://doi.org/10.1016/j.reprotox.2015.03.001>.
- REGOLAMENTO (CE) N. 1935/2004 DEL PARLAMENTO EUROPEO E DEL CONSIGLIO del 27 ottobre 2004 riguardante i materiali e gli oggetti destinati a venire a contatto con i prodotti alimentari e che abroga le direttive 80/590/CEE e 89/109/CEE.
- REGOLAMENTO (CE) n. 1223/2009 DEL PARLAMENTO EUROPEO E DEL CONSIGLIO del 30 novembre 2009 sui prodotti cosmetici.
- REGOLAMENTO (UE) N. 10/2011 DELLA COMMISSIONE del 14 gennaio 2011 riguardante i materiali e gli oggetti di materia plastica destinati a venire a contatto con i prodotti alimentari.
- REGOLAMENTO DI ESECUZIONE (UE) N. 321/2011 DELLA COMMISSIONE del 1 aprile 2011 che modifica il regolamento (UE) n. 10/2011 per quanto riguarda le restrizioni d'uso del bisfenolo A nei biberon di plastica.
- REGOLAMENTO (UE) 2016/2235 DELLA COMMISSIONE del 12 dicembre 2016 che modifica l'allegato XVII del regolamento (CE) n. 1907/2006 del Parlamento europeo e del Consiglio concernente la registrazione, la valutazione, l'autorizzazione e la restrizione delle sostanze chimiche (REACH) per quanto riguarda il bisfenolo A.
- Roskoski, Robert. 2012. «ERK1/2 MAP Kinases: Structure, Function, and Regulation». *Pharmacological Research* 66 (2):105–43. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2012.04.005>.
- Rubin, Beverly S. 2011. «Bisphenol A: An Endocrine Disruptor with Widespread Exposure and Multiple Effects». *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* 127 (1–2):27–34. <https://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2011.05.002>.
- Saal, Frederick S. vom, e Claude Hughes. 2005. «An Extensive New Literature Concerning Low-Dose Effects of Bisphenol A Shows the Need for a New Risk Assessment». *Environmental Health Perspectives* 113 (8):926–33. <https://doi.org/10.1289/ehp.7713>.
- Seger, Rony, e Edwin G. Krebs. 1995. «The MAPK signaling cascade.» *The FASEB journal* 9 (9):726–735.

- Spagnoletti, Antonella, Luana Paulesu, Chiara Mannelli, Leonardo Ermini, Roberta Romagnoli, Marcella Cintorino, e Francesca Ietta. 2015. «Low Concentrations of Bisphenol A and Para-Nonylphenol Affect Extravillous Pathway of Human Trophoblast Cells». *Molecular and Cellular Endocrinology* 412 (settembre):56–64. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2015.05.023>.
- Vandenberg, Laura N., Russ Hauser, Michele Marcus, Nicolas Olea, e Wade V. Welshons. 2007. «Human Exposure to Bisphenol A (BPA)». *Reproductive Toxicology* 24 (2):139–77. <https://doi.org/10.1016/j.reprotox.2007.07.010>.
- Vandenberg, Laura N., Patricia A. Hunt, John Peterson Myers, e Frederick S. vom Saal. 2013. «Human exposures to bisphenol A: mismatches between data and assumptions». *Reviews on Environmental Health* 28 (1). <https://doi.org/10.1515/reveh-2012-0034>.
- Xu, Joella, Guannan Huang, e Tai L. Guo. 2016. «Developmental Bisphenol A Exposure Modulates Immune-Related Diseases». *Toxics* 4 (4). <https://doi.org/10.3390/toxics4040023>.
- Yamada, Hideto, Itsuko Furuta, Emi H. Kato, Soromon Kataoka, Yasuteru Usuki, Gen Kobashi, Fumihiro Sata, Reiko Kishi, e Seiichiro Fujimoto. 2002. «Maternal serum and amniotic fluid bisphenol A concentrations in the early second trimester». *Reproductive toxicology* 16 (6):735–739.
- Zhang, Wei, e Hui Tu Liu. 2002. «MAPK signal pathways in the regulation of cell proliferation in mammalian cells». *Cell research* 12 (1):9–18.

8. SITOGRAFIA

- <http://www.efsa.europa.eu/it/topics/topic/bisphenol>
- <https://echa.europa.eu/-/msc-unanimously-agrees-that-bisphenol-a-is-an-endocrine-disruptor>
- <http://www.biotek.com/resources/articles/quontification-cell-viability-epoch.html>
- <http://www.abcam.com/pathways/mapk-erk12-interactive-pathway>

Come ogni percorso che si conclude è d'obbligo per me la parola FINE.

Ma prima che questo avvenga, è doveroso spendere due parole di ringraziamento.

*Vorrei ringraziare sentitamente la Prof.ssa **Elena Fabbri** per avermi permesso di realizzare questo lavoro e dato una grande opportunità nel vivere questa esperienza nell'ambito della ricerca. Rappresenta una persona che ho stimato fin dal primo giorno di lezione e le sono immensamente grata per la sua disponibilità e gentilezza mostratami.*

*Un ringraziamento speciale va alla Dott.ssa **Paola Valbonesi** che in questo lavoro ha avuto un ruolo fondamentale. Grazie per tutto quello che mi ha trasmesso: le sue conoscenze, la sua infinita disponibilità, il suo sostegno, la sua pazienza, i suoi preziosi consigli, e la sua passione e dedizione. In questo percorso al suo fianco mi ha fatto sentire fiera e orgogliosa del mio lavoro, mettendomi sempre a mio agio e permettendomi di essere costantemente partecipe in ogni attività svolta.*

Alla mia famiglia, che sono il mio punto di riferimento e mi hanno sostenuta e permesso di percorrere e concludere questo cammino.

E infine, un grazie a tutte le persone che hanno reso unico e indimenticabile questo percorso di vita!

Fine.