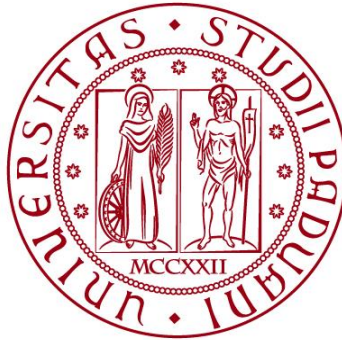


UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA

DIPARTIMENTO DI BIOLOGIA
Corso di Laurea in Biotecnologie



ELABORATO DI LAUREA

**STUDIO DELLA TOSSICITÀ DEL BENZO[A]PIRENE
MEDIANTE METODICHE IN VITRO**

Tutor: Prof.ssa Mery Giantin
Dipartimento di Biomedicina Comparata e Alimentazione

Laureanda: Marah Tiberio

ANNO ACCADEMICO 2022/2023

INDICE

1. ABSTRACT	3
2. STATO DELL'ARTE	4
3. MATERIALI E METODI	8
3.1 STUDIO 1 (Y. Sun et al., 2021)	8
3.2 STUDIO 2 (AL. Caipa Garcia et al., 2022)	10
4. RISULTATI E DISCUSSIONE	12
4.1 STUDIO 1 (Y. Sun et al., 2021)	12
4.2 STUDIO 2 (AL. Caipa Garcia et al., 2022)	14
5. CONCLUSIONE	20
6. BIBLIOGRAFIA	22

1. ABSTRACT

Gli idrocarburi policiclici aromatici sono una classe di composti che viene generata dalla combustione incompleta di materiale organico. Una delle principali molecole appartenenti a questa famiglia è il benzo[a]pirene (B[a]P): si tratta di una sostanza cancerogena per l'uomo presente in maniera ubiquitaria nell'ambiente, difatti è possibile esporsi a tale sostanza attraverso il contatto con l'aria inquinata, l'acqua, il terreno e gli alimenti. Data l'ampia distribuzione del B[a]P ed i numerosi effetti tossici che l'esposizione ad esso comporta nell'uomo, vari studi sono stati condotti al fine di comprendere meglio i meccanismi d'azione di questa sostanza. In questo elaborato di tesi vengono presentati due studi *in vitro* volti a caratterizzare gli effetti del B[a]P in diversi tessuti. Nello specifico, nel primo studio scelto sono state utilizzate colture bidimensionali di cellule epiteliali respiratorie umane e, nel secondo organoidi umani derivanti da tessuto gastrico, pancreatico, epatico, intestinale e renale. I risultati ottenuti in entrambi gli studi hanno dimostrato la nocività del B[a]P per l'uomo ma, per quanto concerne la cancerogenesi indotta da questa molecola, rimangono ancora molti punti da comprendere ed approfondire.

2. STATO DELL'ARTE

Il benzo[a]pirene (B[a]P) è una delle molecole che meglio rappresenta il gruppo degli idrocarburi policiclici aromatici (IPA). Si tratta di un composto costituito da cinque anelli benzenici e, per il quale, a seconda del posizionamento del quinto anello, è possibile distinguere due isomeri: il B[a]P oppure il benzo[e]pirene che vedono il benzene legato rispettivamente al legame *a* ed *e* del primo anello benzenico (Figura 1).

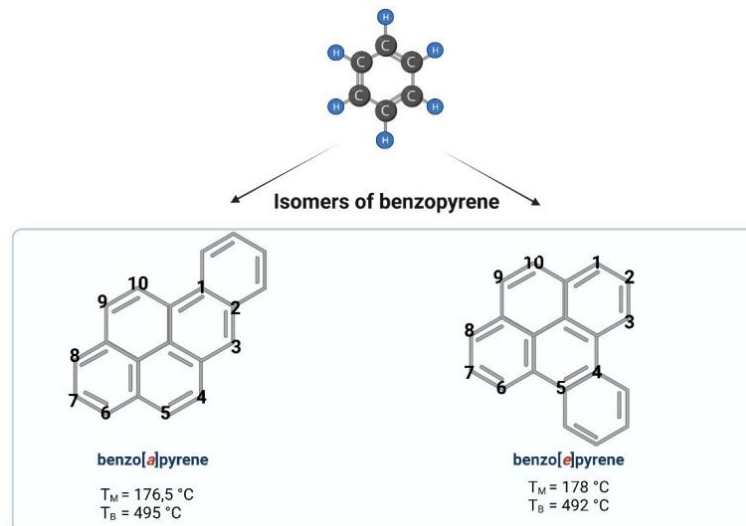


Figura 1. Struttura chimica del benzopirene

Una singola molecola di benzene si trova in forma liquida ma il B[a]P, essendo costituito da più anelli benzenici, è caratterizzato da uno stato solido che genera una struttura molto stabile ed altamente idrofobica. Per quest'ultima ragione il B[a]P si trova in basse concentrazioni nelle superfici acquose, mentre è possibile individuarlo facilmente nei sedimenti acquatici, nel suolo, nell'aria sia outdoor sia indoor. Per la sua natura, è fortemente legato alla frazione organica del suolo ma non penetra negli strati più profondi di esso e viene così scarsamente assorbito dalle radici delle piante (Fismes J et al, 2002).

Il B[a]P, come altri IPA, viene prodotto mediante combustione di combustibili fossili, legno ed altri materiali organici.

L'esposizione dell'uomo a questa molecola sta diventando sempre più frequente e le sorgenti d'emissione antropogeniche stanno prevalendo nettamente su quelle naturali, come incendi ed eruzioni vulcaniche. Il B[a]P è stato infatti individuato anche all'interno del fumo di sigaretta, scarico di motori a diesel, alimenti a base di carbone, affumicati e grigliati, e scarti industriali. Nei mammiferi le vie di esposizione più frequenti sono quella orale, ossia mediante l'ingestione di alimenti contaminati durante la fase di preparazione e lavorazione ad elevate temperature, quella respiratoria (basti pensare che ogni anno l'inquinamento dell'aria indoor causa 3.5-4 milioni di morti nel mondo; Cohen et al, 2017).

L'emivita del benzo[a]pirene corrisponde a meno di 1-6 giorni nell'atmosfera, meno di 1-8 ore nell'acqua ma più di 5-10 anni nei sedimenti e oltre 14-16 mesi nel terreno.

L'uomo è esposto a questa sostanza per via inalatoria, orale o mediante contatto con il derma e induce nell'uomo molteplici effetti tossici.

Lo studio della tossicocinetica del benzo[a]pirene nell'uomo ha permesso di comprendere che questa molecola è assorbita rapidamente (T_{max} , 0.5-1 h) e che altrettanto rapidamente viene escreta (emivita 46.5 ± 58.2 h); inoltre è sottoposta ad un metabolismo molto complesso. La tossicocinetica ha mostrato una correlazione lineare tra dose e risposta (Vermillion Maier et al, 2022).

La biotrasformazione del B[a]P può essere suddivisa in tre fasi principali (Figura 2).

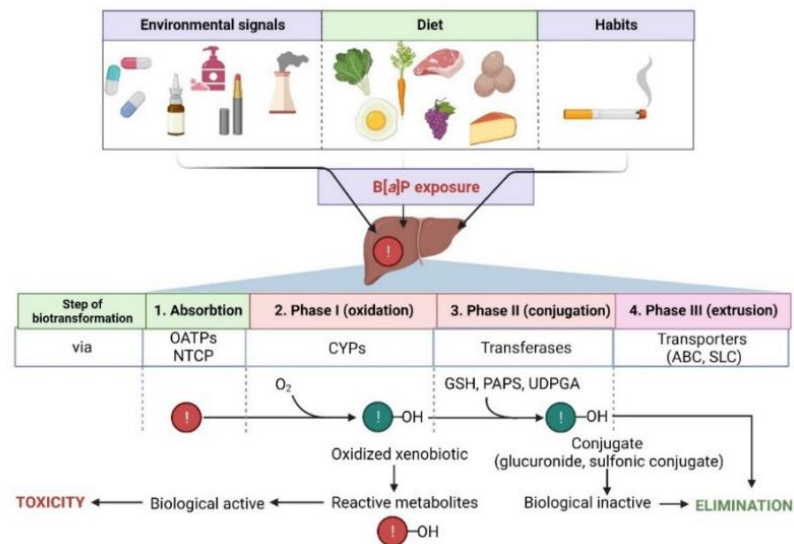


Figura 2. Passaggi della biotrasformazione del B[a]P

Il primo step consiste nell'ossidazione del B[a]P mediante il coinvolgimento della famiglia CYP1 del citocromo P450 e dell'eossido idrolasi microsomiale: in questo modo l'IPA viene trasformato in composti fenolici ma in concomitanza vengono anche prodotti ROS, specie reattive dell'ossigeno dannose per il nostro organismo.

Un ruolo di particolare rilievo tra i vari complessi enzimatici è occupato da CYP1A1, che detiene un elevato livello di attività nei mammiferi. Esso determina una reazione alquanto pericolosa, l'eossidazione di B[a]P nella posizione 7,8, producendo il B[a]P-7,8-eossido. Quest'ultimo, successivamente ed in presenza dell'eossido idrolasi microsomiale, viene convertito in diidrodiole (DHD), substrato della seconda reazione di ossidazione CYP-dipendente. In questo modo si genera il 7β,8α-diidro-9α,10α-eossi-7,8,9,10-tetraidrobenzo[a]pirene (BPDE): si tratta di un metabolita cancerogeno, in grado di legare il DNA e formare addotti al DNA che potrebbero portare ad errori nella replicazione e conseguente mutagenesi. Inoltre, il metabolismo del B[a]P potrebbe generare metaboliti elettrofili con potenziale carcinogenico.

Oltre alla famiglia del CYP, al metabolismo del B[a]P partecipano anche altri enzimi quali mono-ossigenasi flaviniche, prostaglandine H-sintetasi, lipo-ossigenasi.

La seconda fase è rappresentata dalla reazione di coniugazione mediata dalla famiglia enzimatica delle transferasi: i prodotti ottenuti con il primo step metabolico vengono uniti a composti endogeni, quali glutatione (GSH) e acido glucuronico. In questo modo vengono generati composti di natura idrofila e biologicamente inattive, più facilmente eliminabili dal nostro organismo e meno dannosi per esso.

Nella terza fase avviene l'eliminazione dei metaboliti mediante trasportatori, tra i più rilevanti ricordiamo la famiglia di proteine ATP-binding cassette (ABC) (Esteves F et al, 2021).

Il benzo[a]pirene è uno xenobiotico che può indurre effetti molto tossici se entra in contatto con il nostro organismo. La fondazione IARC (International Agency for Research on Cancer) ha classificato il B[a]P come cancerogeno del gruppo I, ovvero come una sostanza in grado di causare tumore sia negli animali che nell'uomo.

I meccanismi di tossicità del benzo[a]pirene (Figura 3) sono associati al pathway coinvolto nel metabolismo di questa molecola. Due vie in particolar modo sono importanti: il meccanismo diolo-eossido e il meccanismo radicale-cationico.

Il primo consiste in una serie di trasformazioni che vedono come substrato di partenza il B[a]P, il quale viene trasformato prima in B[a]P-7,8-eossido da CYP1A1 e CYP1B1, poi in B[a]P-7,8-diolo mediante eossido idrolasi e, infine, sempre con l'azione dei due CYP sopracitati, in B[a]P-7,8-diolo-9,10-eossido. Quest'ultimo è in grado di reagire con il DNA generando una molteplicità di addotti cis e trans, i quali possono essere sia stabili che instabili.

Il secondo meccanismo invece è quello radicale-cationico: esso consiste nell'ossidazione di un singolo elettrone di B[a]P mediante l'azione di CYP o perossidasi, in un radicale cationico del carbonio 6.

Un ulteriore meccanismo coinvolto nella tossicità del B[a]P è l'interazione di esso con il recettore arilico per gli idrocarburi (AhR). Si tratta di un recettore citosolico che in forma inattiva è legato a varie proteine, quali il chaperone molecolare HSP90, il cochaperone p23 e XAP2, con i quali forma un complesso. AhR è in grado di riconoscere numerose sostanze chimiche nell'ambiente e per questa ragione viene definito un *seniore ambientale*. Il legame di un ligando endogeno al recettore determina la sua attivazione, con conseguente dissociazione dal complesso e traslocazione dal citoplasma verso il nucleo. In questo compartimento AhR dimerizza e genera un complesso in grado di legare la proteina traslocatrice nucleare (ARNT). Solo a questo punto viene attivata l'espressione di un gruppo di geni, in particolar modo quelli per CYP1 e AhR stesso, ma questo comporta la produzione di ROS e attiva la risposta proinfiammatoria delle citochine: questo suggerisce che B[a]P abbia un ruolo nella cancerogenesi.

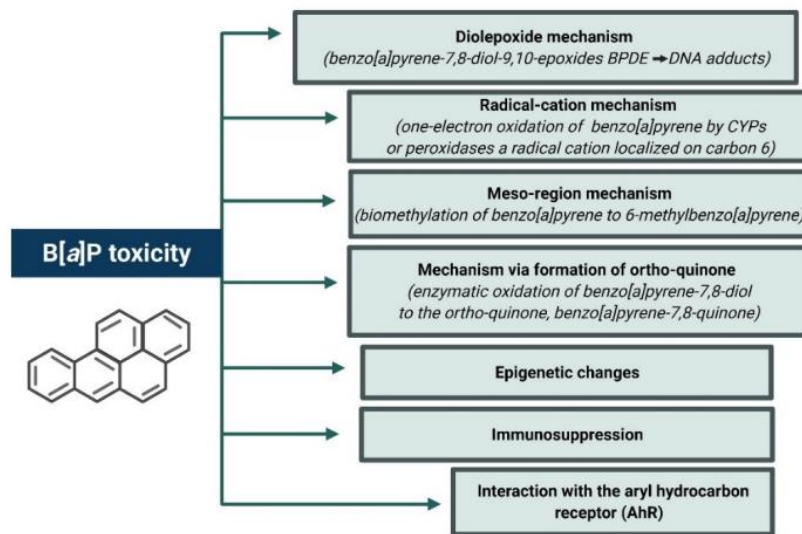


Figura 3. Meccanismi di tossicità del B[a]P

Inoltre, diversi studi hanno dimostrato come il B[a]P sia epigenotossico, infatti esso sconvolge il processo di metilazione dell'epigenoma, cioè l'insieme dei meccanismi di regolazione che consente di esprimere i geni del nostro corpo. La metilazione del DNA è un processo molto importante per la regolazione dei geni ed è sensibile all'azione degli inquinanti ambientali.

Un'altra proprietà del B[a]P è la neurotossicità: questa molecola infatti è caratterizzata da un elevato livello di liposolubilità che, unita alla capacità di deposito nei tessuti ricchi di lipidi, permette alla molecola di superare la barriera emato-encefalica e raggiungere il cervello. Questo costituisce una minaccia, in quanto comporta la possibilità che il B[a]P generi prodotti potenzialmente reattivi all'interno di questo organo così prezioso.

Per quanto riguarda l'ambito della riproduzione, soggetti maschi esposti a B[a]P presentano mutazioni negli spermatozoi: queste alterazioni possono generarsi durante le divisioni mitotiche e meiotiche ed aumentano la probabilità di ottenere una progenie con anomalie o patologie. Nei soggetti di sesso femminile, invece, l'esposizione a B[a]P può comportare la compromissione delle funzioni ovariche, con conseguenze dirette sulla maturazione degli oociti che possono anche andare incontro a morte.

Infine, è importante ricordare che il benzo[a]pirene ha effetti teratogeni ed è quindi in grado di indurre alterazioni rispetto allo sviluppo fisiologico del feto: nel pesce del riso (*Oryzias latipes*) sono state identificate anomalie cardiovascolari e dello sviluppo ed una curvatura anomala della colonna vertebrale (Yamaguchi A et al, 2020). Inoltre in uno studio epidemiologico è stata rilevata una ridotta crescita ed un maggiore rischio di aborto spontaneo precoce nelle madri (Perera FP et al, 2005).

Il presente elaborato ha l'obiettivo di analizzare alcuni particolari meccanismi d'azione del benzo[a]pirene mediante l'utilizzo di approcci differenti: la classica coltivazione in vitro e le innovative colture 3D, gli organoidi.

3. MATERIALI E METODI

3.1 STUDIO 1 (Y. Sun et al., 2021)

L'esposizione al benzo[a]pirene aumenta il rischio di sviluppare malattie respiratorie, le quali sono caratterizzate da una produzione elevata di muco. Si tratta di una soluzione composta da lipidi, zuccheri e proteine, in cui è presente un'elevata quantità di mucina, una glicoproteina. Questa viene codificata da molteplici geni, tra i quali MUC5AC e MUC5B sono i predominanti nelle vie respiratorie aeree dell'uomo.

In questo studio viene investigato l'effetto di B[a]P sull'espressione di MUC5AC in cellule epiteliali delle vie respiratorie umane (NCI-H292) e, in particolar modo, il meccanismo attraverso il quale viene indotta l'espressione del gene codificante la mucina. Vengono approfonditi la via di segnale di ERK, che induce l'elevata espressione di MUC5AC, il recettore AhR e le specie reattive dell'ossigeno ROS che sono associate a questo processo.

Coltura cellulare

La linea cellulare utilizzata in questo studio è la NCI-H292, cellule epiteliali umane delle vie respiratorie. Esse sono state mantenute nel mezzo di crescita RPMI 1640, con il 10% di FBS, penicillina (100 U/mL) e streptomina (100 µg/mL).

Valutazione dell'espressione dell'mRNA di MUC5AC e della relativa proteina

L'espressione dell'mRNA di MUC5AC e del suo prodotto proteico è stata analizzata mediante tre differenti tecniche.

- Real-time PCR quantitativa (qPCR): è stato estratto l'RNA totale e da esso ricavato il cDNA. È stata poi effettuata l'analisi dei geni target MUC5AC, ERK, CREB, AhR, CYP1A1 e CYP1B1. L'espressione relativa ai geni target è stata calcolata utilizzando il metodo $2^{-\Delta\Delta C_t}$ il quale prevede l'utilizzo di un *gene reference*, la β -actina.
- Western blotting: il monostrato cellulare è stato inizialmente lavato con tampone fosfato salino PBS. Successivamente per l'isolamento delle proteine totali è stato usato il buffer RIPA Lysis Buffer (Beyotime, China) mentre per le proteine citoplasmatiche è stato utilizzato un kit (Beyotime). Le proteine isolate sono state separate con SDS-PAGE e trasferite in membrane PVDF (polivinilidenefluoruro) in cui sono state bloccate con siero albumina bovina. A seguito di tre lavaggi, è stata eseguita l'incubazione con gli anticorpi, *overnight* a 4°C. Dopo ulteriori tre lavaggi si è passati all'incubazione con gli anticorpi secondari, per 2 h a temperatura ambiente. Infine, è stato aggiunto il reagente al fine di visualizzare le bande immunoreattive.
Gli anticorpi primari utilizzati sono i seguenti: anti-MUC5AC, anti- β -actina, anti-(p)-ERK1/2, anti-ERK1/2, anti-(p)-p90RSK, anti-RSK1/2/3, anti-CREB, anti-AhR e anti-istone H3.

- Tecniche di immunochimica: a seguito del fissaggio, le cellule sono state lavate tre volte con PBS (0.1% Triton X-100) e bloccate con PBS contenente 10% siero di capra e 0.1% Triton X-100, per 30 minuti a temperatura ambiente. Successivamente sono stati applicati i seguenti passaggi, ciascuno anticipato da tre lavaggi con PBS: incubazione con l'anticorpo anti-MUC5AC (Abcam, USA) per 2 h a 37°C, incubazione con l'anticorpo anti-IgG di coniglio (Abcam) ed infine la cattura di foto mediante microscopio.

Saggio per valutare l'attività del promotore di MUC5AC

Al fine di studiare l'attività del promotore del gene MUC5AC è stato condotto un saggio con luciferasi. Le cellule sono state seminate in una piastra da 24 pozzetti e, a seguito di incubazione *overnight*, hanno raggiunto una confluenza del 70%. Sono state quindi transfettate con due plasmidi: un reporter di luciferasi per il promotore di MUC5AC e un reporter di luciferasi per CRE (cAMP-response element). Il giorno seguente le cellule sono state trattate con 10 μ M di B[a]P e, dopo 24 ore, analizzate con un doppio sistema di rilevazione di fluorescenza.

Misurazione dei ROS totali e mitocondriali

A seguito di un trattamento con B[a]P, le cellule sono state lavate tre volte con PBS. Per rilevare i ROS cellulari totali è stato applicato un reagente (Abcam) rilevante lo stress ossidativo, mentre per rilevare i ROS mitocondriali è stato usato mitoSOX (Thermo Fisher Scientific, USA) per 10 minuti a 37°C. Le cellule sono state lavate con PBS per tre volte e poi sono state catturate le immagini al microscopio a fluorescenza invertito al fine di rilevare i ROS totali, mentre in quello confocale per i ROS mitocondriali.

Analisi statistica

I dati sono stati analizzati mediante il software "GraphPad Prism 8.0" (Dotmatics, Boston, Massachusetts) e ci si è basati su tre replicati indipendenti. I risultati sono stati rappresentati utilizzando la media \pm la deviazione standard (SD). Al fine di analizzare le differenze tra i due gruppi è stata applicato il T-test, mentre per comparazioni multiple è stato usato il test ANOVA, seguito dal post-test di Bonferroni.

3.2 STUDIO 2 (AL. Caipa Garcia et al., 2022)

Gli organoidi sono colture 3D multicellulari formate da cellule staminali e cellule epiteliali tessuto-specifiche che riproducono struttura, composizione e funzione dei tessuti dai quali derivano. In questo modo si ottengono dei sistemi *in vitro* che mimano in modo più realistico, rispetto alle colture 2D, le caratteristiche e le dinamiche presenti *in vivo*.

Sebbene studi precedenti avessero già utilizzato questa tecnologia per studiare gli effetti degli agenti ambientali, questo è il primo studio che si concentra in particolar modo sul B[a]P. In questo progetto sono stati utilizzati molteplici organoidi, derivanti rispettivamente da tessuti normali di stomaco, pancreas, fegato, colon e rene, al fine di studiarne la capacità di metabolizzare il B[a]P. Ci si è focalizzati specialmente sullo studio della capacità degli organoidi di produrre addotti al DNA (dG-N²-BPDE), sull'induzione delle proteine coinvolte nella risposta al danno al DNA (DDR) e sulla modulazione dell'espressione di geni coinvolti in pathway quali DDR, apoptosi e metabolismo degli xenobiotici.

Coltura di organoidi

Al fine di generare le colture dei vari organoidi utilizzati in questo studio, sono stati prelevati differenti tessuti umani da donatori provenienti da Regno Unito e Paesi Bassi. Il numero di donatori per ciascun tipo di organoide oscilla tra 1 e 2: D88 e D95 per il tessuto gastrico, D39 e D44 per il tessuto pancreatico, un unico donatore D4 per il tessuto epatico, D21 e D50 per il tessuto renale ed infine D311 e D351 per il tessuto del colon.

Gli organoidi sono cresciuti in piastre da 24 pozzetti, incorporati in gel BME2 (Cultrex, Minneapolis, USA) o Matrigel (Corning, USA) e sovrapposti ad un terreno di crescita, sostituito ogni 2-3 giorni, e specifico per la tipologia di organoide. Circa ogni settimana le cellule sono state prelevate e ripiastrate mediante sistemi meccanici o con digestione enzimatica con TrypLE (Gibco, Waltham, USA). Successivamente, il terreno è stato integrato con l'inibitore della proteina chinasi p-associato Y27632 10 µM (Stem Cell Technologies, Vancouver, Canada). Il differenziamento dell'organoide del fegato in epatociti è stato eseguito come descritto da *Huch et al (2015)*.

Trattamento con B[a]P e valutazione della vitalità cellulare

La soluzione madre di B[a]P (Sigma, St Louis, USA) è stata conservata in aliquote con DMSO (dimetilsolfossido) 25 mM alla temperatura di -20°C fino all'utilizzo. Questa soluzione è stata poi aggiunta alle colture di organoidi in quantità tale da raggiungere la concentrazione desiderata. Il trattamento ha avuto una durata di 48 h ed i controlli del solvente sono stati eseguiti con 0.5% DMSO.

Per misurare la vitalità delle cellule è stato eseguito un saggio (CellTiter-Glo 3D Cell Viability Assay) in cui il reagente è stato aggiunto dopo 48h di trattamento in rapporto 1:2 con il terreno. A seguito di un periodo di incubazione di 48h è stata prelevata e trasferita un'aliquota, la cui luminescenza è stata analizzata con il lettore GloMax Explorer (Promega, Madison, Wisconsin).

Analisi dell'espressione genica degli enzimi farmaco-metabolizzanti e analisi dei metaboliti

Per valutare la modulazione dell'espressione dei geni CYP1A1 e NQO1 negli organoidi trattati con B[a]P, è stato condotto un approccio in Real time PCR.

La RT-qPCR è stata eseguita utilizzando TaqMan Gene Expression Master Mix (Applied Biosystems, Waltham, USA); ogni reazione è stata riprodotta in triplicato utilizzando piastre con 96 o 384 pozzetti mediante i termociclatori ABI Prism 7500 o 7900HT Fast Real-Time (Applied Biosystems). L'espressione dei geni è stata normalizzata con quella del *gene housekeeping* GAPDH e analizzata secondo il metodo del $2^{-\Delta\Delta C_t}$ (Livak and Schmittgen, 2001). I risultati sono stati riportati come fold change, ossia come rapporto tra l'espressione relativa nei campioni trattati ed i controlli.

Per l'analisi dei metaboliti del B[a]P, è stata utilizzata la tecnica della cromatografia liquida ad alta prestazione (HPLC) con rilevatore a fluorescenza e sono stati quantificati i seguenti metaboliti: 7,8-diidrodiolo e sul tetrololo-1.

Analisi della variazione dell'espressione di DDR

Il trattamento degli organoidi con B[a]P comporta l'attivazione della risposta al danno al DNA (DDR) con conseguente espressione delle relative proteine coinvolte in questo processo. In particolar modo sono state prese in considerazione le proteine p-p53, pCHK2, p21 e γ -H2AX; come controllo è stato utilizzato GAPDH. L'analisi dell'espressione di queste proteine è stata effettuata mediante metodica western blotting.

Gli organoidi sono stati trattati per 48 h con una concentrazione di B[a]P tale da ottenere i livelli di vitalità cellulare pari al 30%, 50% e 80%. Successivamente sono stati raccolti ed è stata eliminata la matrice di membrana grazie all'incubazione con TryLe a 37°C per 10 minuti. Il pellet di organoidi è stato poi lavato con PBS e lisato in una soluzione contenente Tris, EDTA, sodio dodecil solfato, glicerolo, proteasi Halt™ e Phosphate Inhibitor Cocktail (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA). Sono stati utilizzati gli anticorpi primari: anti-p-p53, anti-p-CHK2, anti-p21, anti-p-H2AX, anti-GAPDH.

Analisi degli addotti del DNA

A seguito del trattamento con B[a]P di 48h, gli organoidi sono stati raccolti ed il loro DNA è stato isolato mediante estrazione con fenolo-cloroformio. I campioni sono stati analizzati mediante LC-ESI-MS/MS (Liquid Chromatography - Electrospray Ionization - Mass Spectrometry): si tratta di un metodo che combina la risoluzione di separazione della HPLC all'elevata precisione della spettrometria di massa. L'addotto su cui ci si è focalizzati è il dG-N²-BPDE ed è stato quantificato con l'analisi del catione MS² mediante l'utilizzo dello spettrometro di massa.

Analisi statistica

L'analisi statistica è stata effettuata mediante l'utilizzo del software "GraphPad Prism" 8.4.3 e 9 (Dotmatics, Boston, Massachusetts). Sono stati utilizzati i test statistici t-test e ANOVA seguiti dal post-test di Bonferroni.

4. RISULTATI E DISCUSSIONE

4.1 STUDIO 1 (Y. Sun et al., 2021)

Da questo studio è risultato che la stimolazione con B[a]P aumenta sensibilmente l'espressione dell'mRNA di MUC5AC in modo dose e tempo dipendente. Inoltre, coerentemente a quanto appena detto, il western blotting e la tecnica immunochimica hanno dimostrato anche l'aumento dei livelli di proteina MUC5AC. Entrambi gli incrementi avvengono mediante attivazione di AhR e promozione della trascrizione di CYP1, che comportano un aumento dei ROS mitocondriali e l'attivazione dell'asse ERK/RSK/CREB.

B[a]P induce l'espressione di MUC5AC mediante ERK

Il western blotting riportato nella *Figura 4* ha dimostrato che il trattamento con B[a]P attiva il pathway ERK/p90RSK: difatti a seguito della stimolazione con esso è stato rilevato l'aumento della fosforilazione di ERK1/2 e p90RSK. Inoltre, l'utilizzo di U0126, inibitore di MEK1/2, ha ridotto l'espressione di MUC5AC, sia a livello di mRNA che di proteina, e lo stesso esito è stato ottenuto silenziando il gene ERK1/2.

Dimostrato il fatto che B[a]P comporta l'aumento di MUC5AC, si è passati all'analisi del meccanismo che renda questo possibile. B[a]P aumenta l'attività della luciferasi nelle cellule trasfettate con il gene reporter di MUC5AC e nelle cellule trasfettate con il gene per la sequenza CRE. Silenziando il gene CREB mediante l'utilizzo di un siRNA, è stata diminuita l'espressione di MUC5AC indotta da B[a]P. Questo ha confermato il coinvolgimento del segnale ERK/RSK/CREB nell'espressione di MUC5AC indotta da B[a]P.

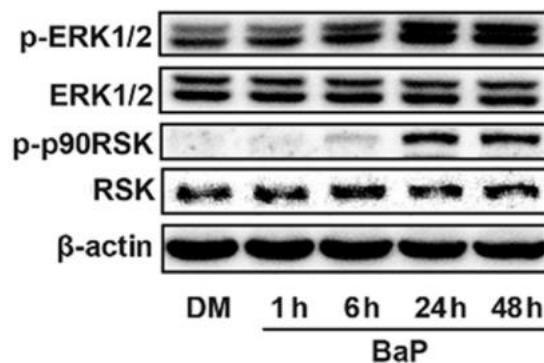


Figura 4. Western blotting delle proteine p-ERK1/2, ERK1/2, p-p90RSK e RSK

Produzione di ROS indotta da B[a]P conseguente all'attivazione di ERK

I mitocondri sono la sede principale dello stress ossidativo e in questo esperimento è stato evidenziato che il trattamento con B[a]P aumenta sensibilmente il livello cellulare di ROS, compresi quelli mitocondriali, in modo tempo dipendente (*Figura 5A e B*). L'aggiunta dell'antiossidante mitoTEMPO, specifico per i ROS mitocondriali, ha determinato la diminuzione della produzione di questi ultimi e la fosforilazione di ERK1/2 e p90RSK, comportando la diminuzione di MUC5AC indotta da B[a]P. Il perossido di idrogeno H₂O₂, uno

tra i ROS più comuni, è stato aggiunto alle cellule come controllo positivo, al fine di paragonare la sua azione a quella del B[a]P: esso ha aumentato l'mRNA del gene della mucina e le proteine di MUC5AC, (p)ERK1/2 e (p)p90RSK, effetto contrario rispetto a quanto si ottiene con l'utilizzo di un inibitore di ROS. In questo modo è stato dimostrato che la produzione di ROS mitocondriale indotta da B[a]P contribuisce all'attivazione di ERK e alla produzione di MUC5AC.

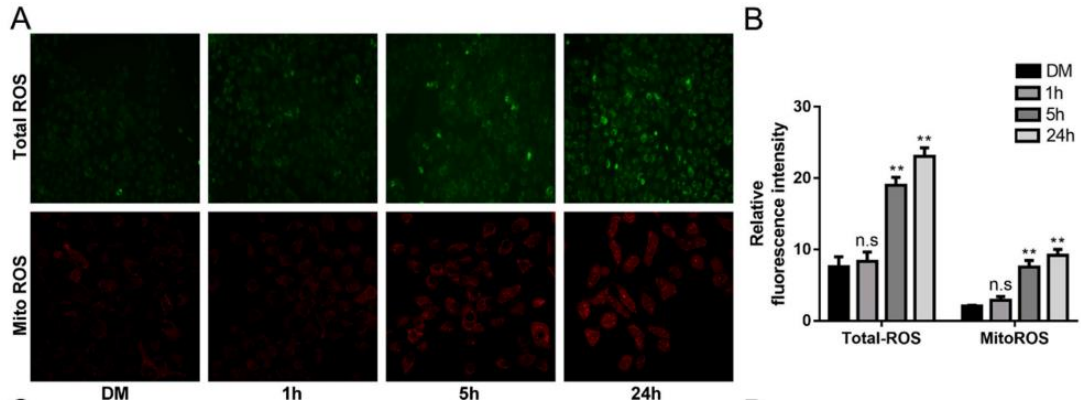


Figura 5. A) Effetti di B[a]P (10 μM) sulla produzione totale di ROS (verde) e sui ROS mitocondriali (rosso) misurate nei tempi indicati da sonde specifiche. B) Intensità relativa della fluorescenza. n.sP: > 0.05. **: P < 0,01.

L'inibizione di CYP1 riduce l'espressione di MUC5AC e di ROS indotte da B[a]P

La famiglia di enzimi CYP1 è indotta da B[a]P, in quanto essi mediano il metabolismo delle sostanze endogene e possono quindi indurre la produzione di ROS. A seguito dell'esposizione a B[a]P, i livelli di mRNA relativi a CYP1A1 e CYP1B1 sono aumentati (Figura 6). Utilizzando Alizarina, inibitore della famiglia dei CYP1, si blocca l'aumento dell'espressione dell'mRNA e della proteina MUC5AC indotti da B[a]P. Inoltre, l'utilizzo di questa molecola blocca l'accumulo di ROS mitocondriali indotto da B[a]P ed aumenta l'espressione di (p)ERK e (p)p90RSK. In conclusione, si può affermare che B[a]P induce la trascrizione di CYP1, la quale potrebbe regolare il livello mitocondriale di ROS.

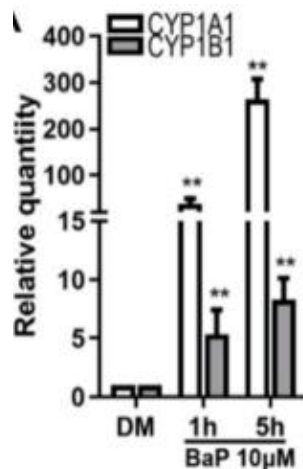


Figura 6. Cellule NCI-H292 trattate con B[a]P per il tempo indicato ed il relativo livello di mRNA di CYP1A1 e CYP1B1 rilevato con RT-qPCR. **: P < 0,01.

L'attivazione dell'asse ROS/ERK/MUC5AC, indotto da B[a]P, è associato all'attività di AhR

B[a]P è un ligando naturale molto affine al recettore AhR e ne promuove la traslocazione dal citosol al nucleo: difatti, a seguito dell'esposizione a questo IPA, l'espressione del recettore nel nucleo è aumentata (Figura 7). Inoltre, per valutare se l'espressione della proteina MUC5AC indotta da B[a]P e l'attivazione del pathway ERK fossero dipendenti da AhR, sono stati utilizzati un inibitore di AhR e un siRNA per AhR. L'utilizzo di questi ultimi ha attenuato l'espressione di MUC5AC, (p)ERK1/2, (p)p90RSK indotti da B[a]P. Il silenziamento di AhR ha abbassato sensibilmente la produzione di ROS mitocondriale. I risultati hanno permesso di affermare che B[a]P attiva l'asse ROS/ERK/MUC5AC in modo AhR-dipendente.

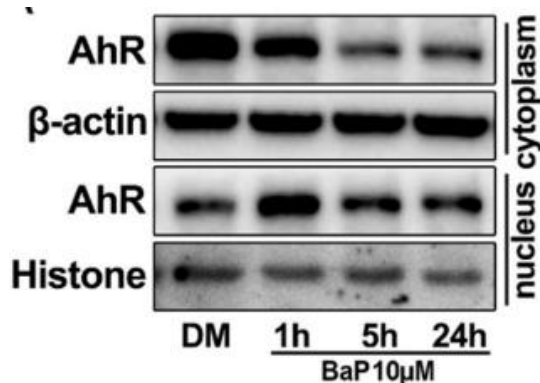


Figura 7. Cellule NCI-H292 esposte a B[a]P per il tempo indicato. Western blotting rappresentativo della proteina AhR nel nucleo e nel citoplasma.

4.2 STUDIO 2 (AL. Caipa Garcia et al., 2022)

Da questo studio è risultato che gli organoidi derivanti dai diversi tessuti umani sviluppano differenti risposte citotossiche all'esposizione al B[a]P ma tutte condividono due aspetti in particolare. Il primo è l'incremento dell'espressione dei geni codificanti per gli enzimi CYP1A1 e NQO1 che si occupano del metabolismo degli xenobiotici. Il secondo consiste nella presenza dei metaboliti 7,8-diidrodiole e tetrole-I-1 in tutti gli organoidi analizzati, rappresentando quindi l'abilità di questi ultimi di metabolizzare il B[a]P. Quest'ultimo aspetto è stato confermato inoltre dall'attivazione del pathway di risposta al danno del DNA (DDR) e dalla formazione di addotti del DNA.

Vitalità cellulare degli organoidi

La vitalità delle cellule costituenti gli organoidi di tessuto umano è stata valutata a seguito di esposizione a crescenti concentrazioni di B[a]P (0-50 µM). Sono state registrate delle differenze, sia in relazione alla diversa costituzione tissutale, che alla provenienza del campione in termini di donatore.

Gli organoidi risultati più suscettibili alla citotossicità del B[a]P sono quelli gastrico e del colon. Al contrario, non è stata rilevata tossicità negli organoidi del fegato, sia quello differenziato che indifferenziato.

Sulla base dei risultati riportati nella *Figura 8*, le concentrazioni di B[a]P corrispondenti ad una vitalità cellulare del 20-40% e del 40-60% sono state selezionate per l'esecuzione di ulteriori test in ciascuna tipologia di organoide. Nei casi in cui non fosse evidente il valore del parametro IC₅₀ o questo fosse troppo elevato, sono state scelte arbitrariamente due concentrazioni: 12.5 e 50 μM.

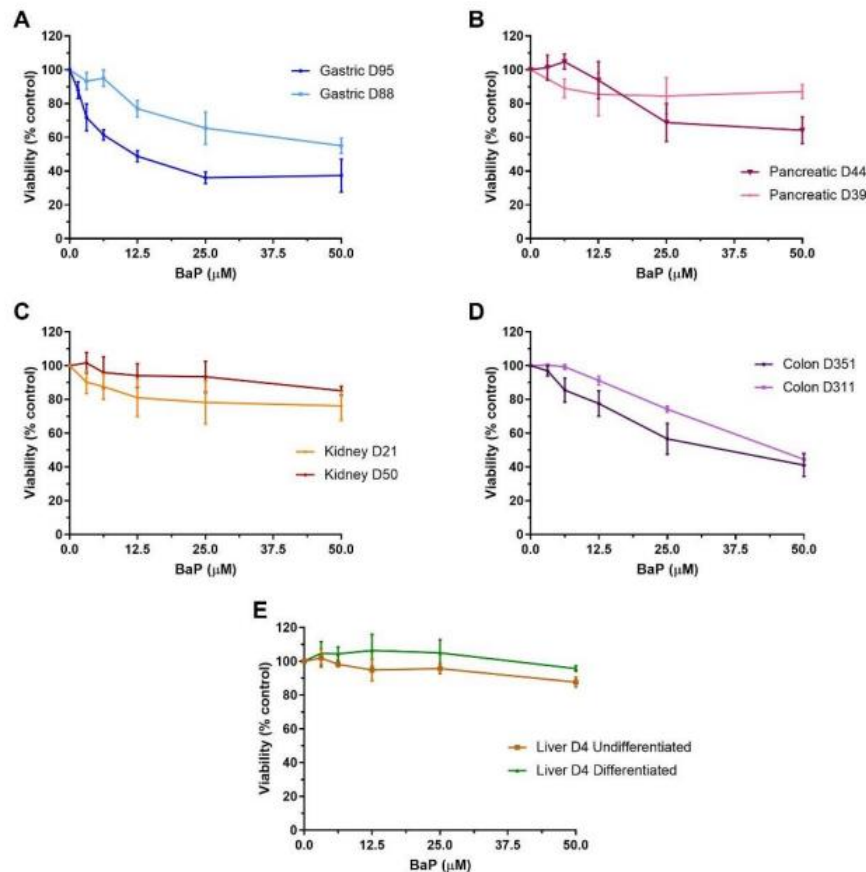


Figura 8. Vitalità cellulare degli organoidi in seguito a trattamento con B[a]P di 48 h.

Espressione degli enzimi metabolizzanti gli xenobiotici

Dall'analisi svolta mediante RT-qPCR è risultato che in tutti gli organoidi esposti a B[a]P si è verificato un aumento concentrazione-dipendente dell'espressione degli enzimi CYP1A1 e NQO1 (*Figura 9*). Risultano sempre evidenti, come nel caso della vitalità cellulare, le differenze tra i vari organoidi, in quanto costituiti da tessuti diversi e derivanti da differenti donatori.

Per quanto riguarda l'espressione del gene CYP1A1, è significativo l'esito ottenuto nell'organoide del rene derivante dal donatore D50: alla concentrazione di 50 μM di B[a]P si ottiene un valore di ~30000 fold mentre alla concentrazione minore un valore di ~1500 fold. Per quanto riguarda l'espressione del gene NQO1, sempre negli organoidi del rene sono riscontrabili i

valori più elevati: con la concentrazione di 50 μM di B[a]P comporta un valore di fold pari a $\sim 10,4$ - $10,8$ rispettivamente nei casi di D50 e D21.

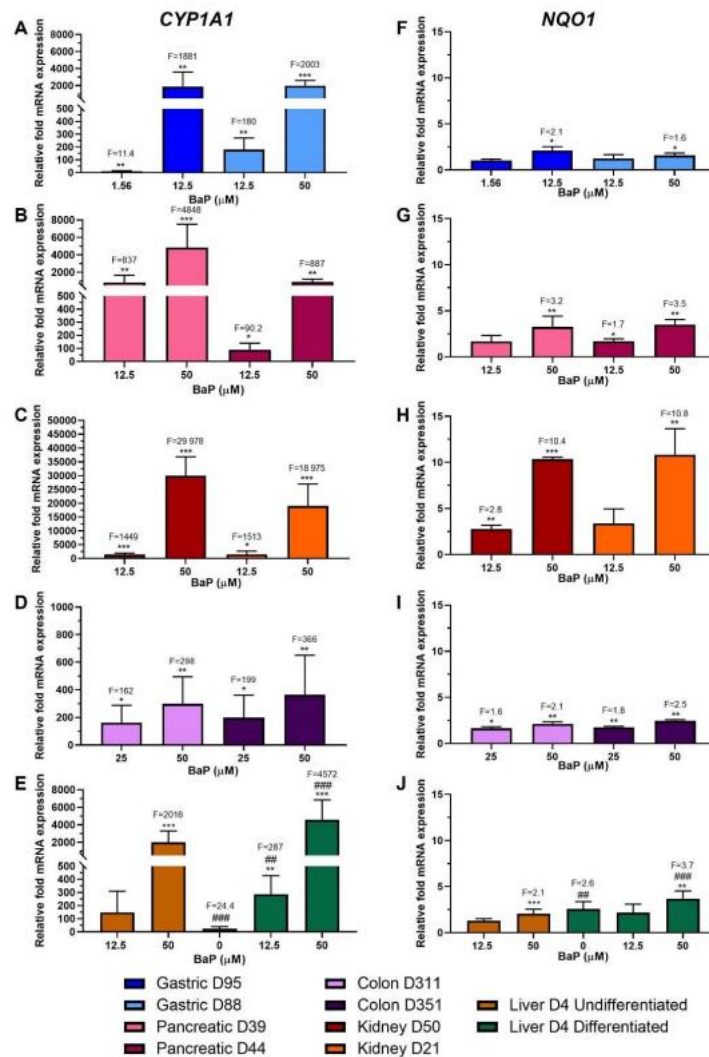


Figura 9. Espressione dei geni CYP1A1 e NQO1 negli organoidi in seguito a trattamento con B[a]P di 48h.

*. $P < 0,05$. **. $P < 0,01$. ***. $P < 0,001$ comparati al controllo non trattato.
 ##. $P < 0,01$. ####. $P < 0,001$ comparati al controllo di fegato indifferenziato.

Induzione delle proteine DDR

Negli organoidi trattati con B[a]P, mediante la metodica western blotting è stata studiata l'induzione delle proteine DDR: in particolare, gli studi sono stati effettuati sulle proteine p-p53, pCHK2, p21 e γ -H2AX.

In questo studio, in aggiunta alle concentrazioni utilizzate nella RT-qPCR, è stata selezionata ulteriormente una concentrazione di B[a]P, ovvero quella che corrisponde ad una vitalità cellulare pari al 60-80% o, nel caso in cui il valore di IC_{50} non fosse visibile, è stato scelto arbitrariamente il valore di 25 μM (Figura 10).

Tutte le proteine DDR sono state indotte negli organoidi dello stomaco e del rene. Per quanto riguarda il primo organo, l'induzione delle proteine p-p53, p-21 e p-CHK2 si è rivelata concentrazione-dipendente in entrambe le colture, mentre

γ -H2AX lo è stata solamente nell'organotide D88. Circa il secondo organo, l'induzione di γ -H2AX è stata rilevata ma ha assunto un valore costante all'aumentare dei valori della concentrazione; inoltre, l'induzione di p-CHK2 nell'organotide D21 ha raggiunto il valore massimo alla minima concentrazione di B[a]P.

Solo una parte delle proteine DDR, invece, è stata indotta negli organoidi del colon: sia in D351 che in D311 sono state rilevate pCHK2 e γ -H2AX, mentre solo in D311 sono state indotte p-p53 e p21. La stessa induzione parziale è stata riscontrata negli organoidi del pancreas e del fegato. Nel primo caso entrambi gli organoidi non hanno presentato induzione della proteina p21 mentre in tutte le restanti sì, anche se con valori differenti tra le due colture. Nel secondo caso, nel fegato indifferenziato sono state indotte pCHK2 e γ -H2AX mentre i valori di p53 sembrano diminuire al crescere della concentrazione di B[a]P; in quello differenziato tutte le proteine hanno livelli di induzione inferiori rispetto all'indifferenziato, tranne per quanto riguarda γ -H2AX che risulta essere stato indotto.

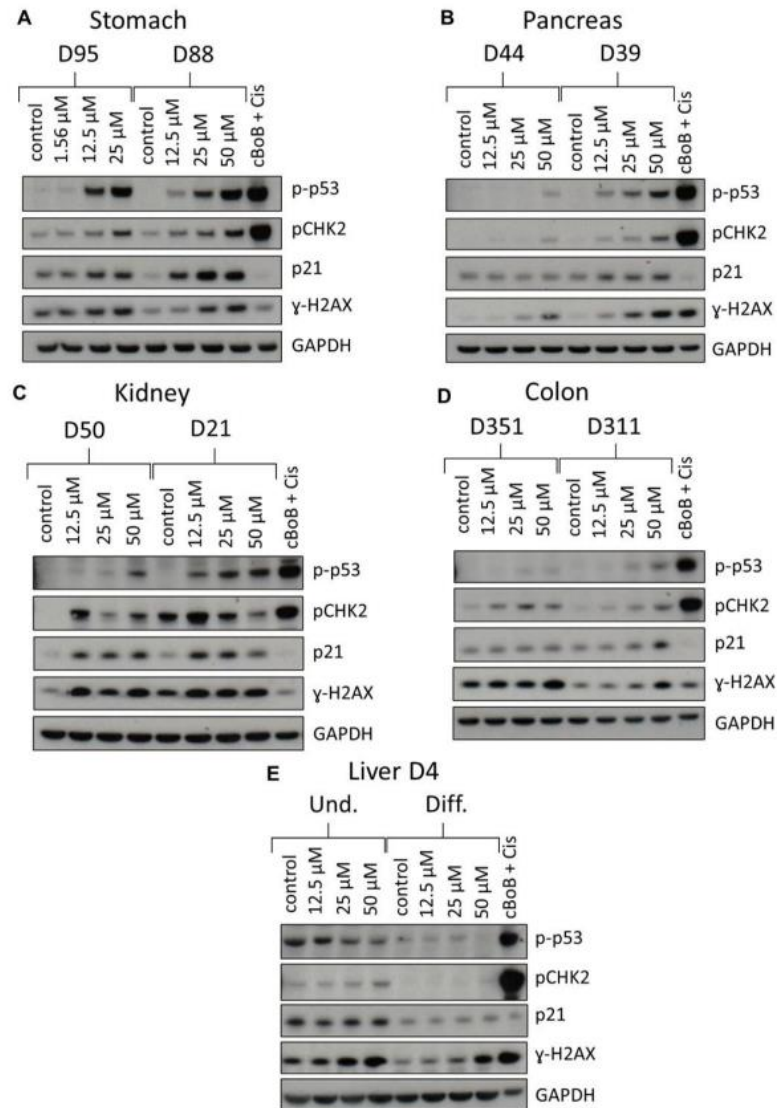


Figura 10. Analisi delle proteine DDR mediante western blotting in organoidi trattati con B[a]P. GAPDH utilizzato come controllo di caricamento.

Analisi dei metaboliti di B[a]P

I metaboliti che sono stati analizzati al fine di valutare la capacità di metabolizzare il B[a]P sono due: il 7,8-diidrodio, precursore del composto BPDE, ed il tetrol-I-1, prodotto di idrolisi del BPDE. Come si può vedere nella *Figura 11*, essi sono stati rilevati in tutti i diversi organoidi e la loro produzione si è rivelata dipendente dalla concentrazione dell'IPA. I valori relativi ai due metaboliti sono risultati simili negli organoidi gastrici e del colon, di entrambi i donatori; nel caso degli organoidi del rene i valori simili sono stati rilevati tra il diolo di D50 e quello di D21.

Formazione di addotti al DNA

Il trattamento degli organoidi con il B[a]P ha comportato la creazione di addotti al DNA in ogni tipo di tessuto in modo concentrazione-dipendente e con vari livelli a seconda della tipologia di organo e del donatore. L'organoide pancreatico del donatore D39 è quello in cui sono stati prodotti più addotti al DNA, ben 889 per 10^7 nucleosidi alla concentrazione di 50 μM di B[a]P. Al contrario, l'organoide del colon è quello in cui è stata prodotta la minore quantità di addotti. I valori ottenuti sono riportati nella *Figura 11*.

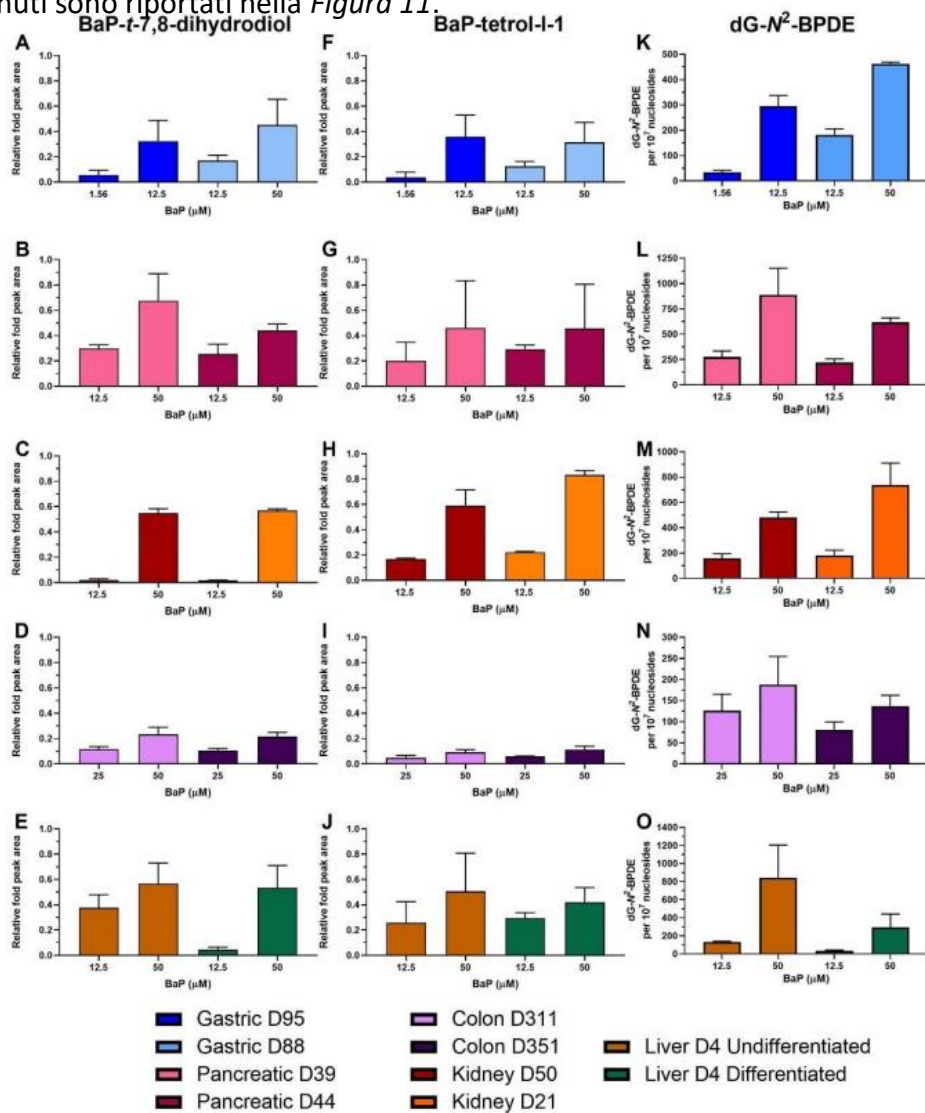


Figura 11. Metaboliti di B[a]P e livelli di addotto al DNA in organoidi trattati con B[a]P.

Espressione genica

Per investigare in modo più approfondito la risposta tessuto-specifica è stata valutata la variazione di espressione dei geni più coinvolti nei processi di instabilità genomica, risposta al danno al DNA e allo stress ossidativo, apoptosi, arresto del ciclo cellulare, di proliferazione e di metabolismo degli xenobiotici (Figura 12). Gli organoidi relativi al pancreas, al rene ed al colon sono quelli in cui sono state rilevate le variazioni più significative nell'espressione dei geni. Negli organoidi gastrici e del fegato, differenziato ed indifferenziato, sono state registrate invece le variazioni maggiori tra il confronto dei due diversi donatori.

I geni coinvolti nelle variazioni maggiori sono stati *NQO1* e *UGT1A*. Il primo ha avuto livelli di espressione simili in tutti gli organoidi tranne in quello renale, per il quale sono stati registrati livelli sensibilmente più elevati; solamente però i dati relativi agli organoidi di pancreas, colon e fegato indifferenziato (alla concentrazione maggiore di B[a]P) sono significativi dal punto di vista biologico, assieme ai dati degli organoidi del rene in entrambe le concentrazioni. Questo perché i valori dell'espressione genica in forma log2 sono maggiori di 1. Il gene *UGT1A*, coinvolto nella detossificazione di B[a]P, è risultato indotto in tutti gli organoidi raggiungendo il valore più elevato in quello pancreatico; il valore di espressione minore è stato registrato negli organoidi dello stomaco.

Sono stati inoltre analizzati: *TXNRD1*, coinvolto nella risposta allo stress ossidativo; *MDM2*, un regolatore della via di attivazione di p53; *CDKN1A*, il quale codifica per la proteina p21 (che è un inibitore delle chinasi ciclina-dipendente); *BBC3*, un gene pro-apoptotico.

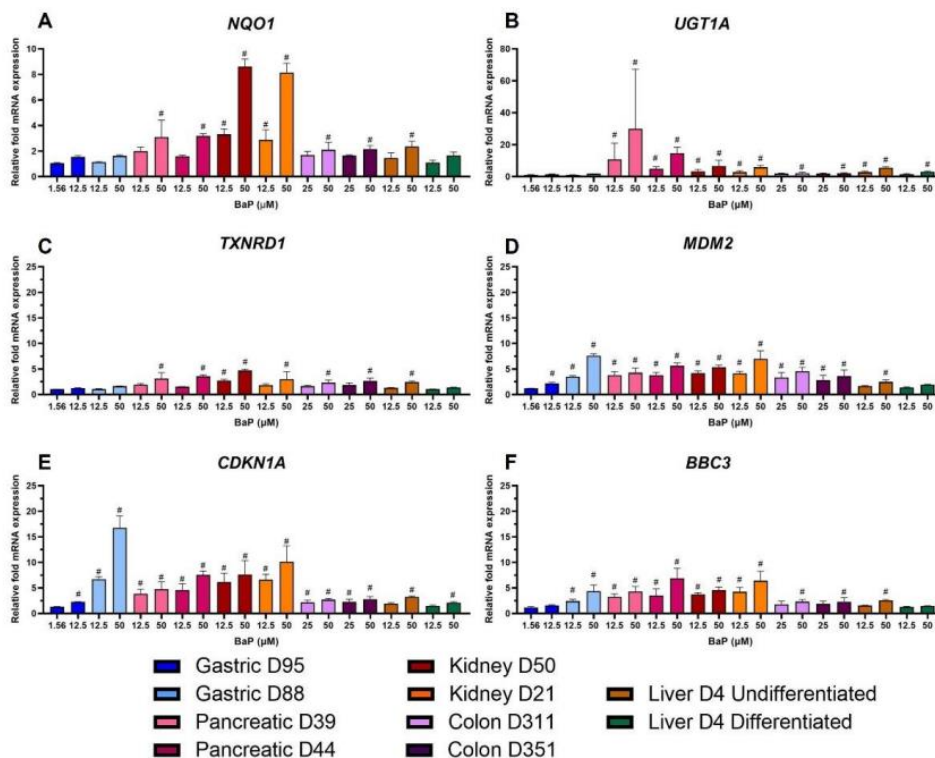


Figura 12. Effetti del B[a]P sull'espressione di geni coinvolti nel metabolismo degli xenobiotici, nella risposta allo stress ossidativo, nella trascrizione, nella proliferazione, nel controllo del ciclo cellulare e nell'apoptosi.

5. CONCLUSIONE

I contesti e le occasioni in cui l'uomo può entrare in contatto con il benzo[a]pirene sono talmente numerosi che è praticamente impossibile evitarne l'esposizione. La comunità scientifica però ha le idee molto chiare circa questa molecola: i numerosi anni di studio alle spalle riguardanti questo composto hanno confermato quanto questo costituisca una seria minaccia per la nostra specie, oltre che per quella animale. Sono molteplici gli studi che hanno analizzato le caratteristiche molecolari del B[a]P e la sua interazione con l'uomo, in termini di meccanismi d'azione ed effetti tossici. I due articoli scientifici trattati in questo elaborato ne sono proprio un esempio.

Lo studio 1 (*Y. Sun et al., 2021*) è stato condotto *in vitro* su una linea cellulare dell'epitelio respiratorio umano con l'obiettivo di comprendere l'effetto dell'esposizione di queste cellule al B[a]P, approfondendo soprattutto i meccanismi con cui questa molecola induce l'espressione del gene MUC5AC. I risultati ottenuti hanno permesso di affermare il ruolo determinante di AhR, ROS mitocondriali e dell'attivazione del pathway ERK nell'aumento dell'espressione di MUC5AC indotto da B[a]P. L'esposizione a questo IPA, perciò, comporta un incremento nella produzione di muco, generando la possibilità di sviluppare una patologia respiratoria.

Lo studio 2 (*AL. Caipa Garcia et al., 2022*) è stato condotto sempre *in vitro* ma non prevedeva più l'utilizzo di una semplice coltura cellulare, bensì di colture umane tridimensionali che meglio rappresentano la realtà di un organismo complesso: gli organoidi. L'obiettivo di questo lavoro scientifico è stato quello di indagare circa la capacità dei tessuti gastrico, pancreatico, epatico, intestinale e renale, di metabolizzare il B[a]P. Difatti, questa molecola necessita di un'attivazione metabolica affinché possa esercitare i suoi effetti, inclusi quelli tossici. Dalle analisi effettuate è risultato che l'esposizione al B[a]P comporta in tutti gli organoidi esaminati, seppur con valori differenti, l'induzione dei geni farmaco-metabolizzanti, delle proteine DRR, la formazione dei metaboliti del B[a]P e degli addotti al DNA. È stato possibile affermare perciò che tutti gli organoidi, qui presi in esame, sono stati in grado di bioattivare il B[a]P permettendogli di esercitare successivamente i suoi effetti tossici e cancerogeni.

Nel complesso si può constatare che questi studi hanno confermato gli effetti nocivi che il B[a]P causa all'uomo, approfondendone i meccanismi molecolari di funzionamento. L'utilizzo di organoidi composti da tessuto umano in relazione allo studio di questa specifica sostanza è stato innovativo e si è rivelato un ottimo sistema per investigare la risposta cellulare alle sostanze cancerogene ed all'organotropismo. La comunità scientifica ha quindi a disposizione uno strumento molto promettente che può utilizzare per eseguire ulteriori ricerche riguardo la cancerogenesi dovuta al B[a]P. Dallo studio 2 (*AL. Caipa Garcia et al., 2022*), difatti, non è possibile dichiarare quali tra gli organi analizzati siano potenziali target di un processo di cancerogenesi nell'uomo. È plausibile però

ipotizzare che le differenze osservate nelle varie risposte tissutali determinino la specificità tumorale di B[a]P.

Gli aspetti da chiarire sono ancora molteplici e l'utilizzo degli organoidi di tessuto umano potrebbe costituire il mezzo che permetterà di fare luce su questi meccanismi ancora sconosciuti all'uomo.

6. BIBLIOGRAFIA

Caipa Garcia AL, Kucab JE, Al-Serori H, Beck RSS, Fisher F, Hufnagel M, Hartwig A, Floeder A, Balbo S, Francies H, et al. Metabolic activation of benzo[a]pyrene by human tissue organoid cultures. *Int. J. Mol. Sci.* **2022** Jan 24, 606. doi: 10.3390/ijms24010606

Cohen AJ, Brauer M, Burnett R, Anderson HR, Frostad J, Estep K, Balakrishnan K, Brunekreef B, Dandona L, Dandona R, et al. Estimates and 25-year trends of the Global Burden of disease attributable to ambient air pollution: an analysis of data from the Global Burden of diseases study 2015. *Lancet* **2017**, 389, 1907–1918. doi: 10.1016/S0140-6736(17)30505-6

Esteves F, Rueff J, Kranendonk M. The Central Role of Cytochrome P450 in Xenobiotic Metabolism— A Brief Review on a Fascinating Enzyme Family. *JoX* **2021**, 11, 94–114. doi: 10.3390/jox11030007

Fismes J, Perrin-Ganier C, Empereur-Bissonnet P, Morel JL. Soil-to-Root Transfer and Translocation of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons by Vegetables Grown on Industrial Contaminated Soils. *J. Environ. Qual.* **2002**, 31, 1649–1656. doi: 10.2134/jeq2002.1649

Huch M, Gehart H, van Boxtel R, Hamer K, Blokzijl F, Verstegen MMA, Ellis E, van Wenum M, Fuchs SA, de Ligt J, et al. Long-term culture of genome-stable bipotent stem cells from adult human liver. *Cell* **2015**, 160, 299–312. doi: 10.1016/j.cell.2014.11.050

Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods* **2001**, Dec;25(4):402-8. doi: 10.1006/meth.2001.1262

Perera FP, Tang D, Rauh V, Lester K, Tsai WY, Tu YH, Weiss L, Hoepner L, King J, Del Priore G, et al. Relationships among Polycyclic Aromatic Hydrocarbon–DNA Adducts, Proximity to the World Trade Center and Effects on Fetal Growth. *Environ. Health Perspect.* **2005**, 113, 1062–1067. doi: 10.1289/ehp.7908

Sun Y, Shi Z, Lin Y, Zhang M, Liu J, Zhu L, Chen Q, Bi J, Li S, Ni Z, Wang X. Benzo[a]pyrene induces MUC5AC expression through the AhR/mitochondrial ROS/ERK pathway in airway epithelial cells. *Ecotoxicology and Environmental Safety.* **2021** Jan 210, 111857. doi: 10.1016/j.ecoenv.2020.111857

Vermillion Maier ML, Siddens LK, Pennington JM, Uesugi SL, Anderson KA, Tidwell LG, Tilton SC, Ognibene TJ, Turteltaub KW, Smith JN, et al. Benzo[a]pyrene (BaP) metabolites predominant in human plasma following escalating oral micro-dosing with [¹⁴C]-BaP. *Environ. Int.* **2022**, 159, 107045. doi: 10.1016/j.envint.2021.107045

Yamaguchi A, Uchida M, Ishibashi H, Hirano M, Ichikawa N, Arizono K, Koyama J, Tominaga N. Potential Mechanisms Underlying Embryonic Developmental Toxicity Caused by Benzo[a]Pyrene in Japanese Medaka (*Oryzias latipes*). *Chemosphere* **2020**, 242, 125243. doi: 10.1016/j.chemosphere.2019.125243