

Studio degli effetti miscela sullo sviluppo embrionale *in vitro* di due composti con diverso meccanismo d'azione (fluconazolo ed etanolo) utilizzando due diversi modelli sperimentali: coltura di embrioni di ratto e esposizione di embrioni di *Ascidia*

M. Battistoni, S. Mercurio, F. Di Renzo, R. Pennati, E. Menegola

Università degli Studi di Milano, Dipartimento di Bioscienze, Milano, Italia

Scopo di questo lavoro è stato quello di valutare *in vitro* gli effetti miscela sul potenziale teratogeno della co-esposizione a Fluconazolo (FLUCO, fungicida azolico ampiamente utilizzato in ambito clinico) ed a concentrazioni sub-teratogene di Etanolo (Eth). Nella prima parte di questo studio, embrioni post-impianto di ratto sono stati esposti *in vitro* a concentrazioni crescenti di FLUCO (62.5-125-250-500 μ M), alla concentrazione non effetto di Eth (1 μ L/mL) o sono stati co-esposti a FLUCO 62.5-125-250-500 μ M ed Eth (1 μ L/mL). Al termine del periodo di coltura (48 ore) gli embrioni sono stati esaminati morfologicamente e processati per valutare l'espressione dei geni specificamente coinvolti nel metabolismo dell'Acido Retinoico (*adh7*, *cyp26a1*, *cyp26b1*, *cyp26c1*) o la distribuzione delle loro proteine nell'embrione. Eth da solo non ha indotto effetti avversi sullo sviluppo embrionale. I gruppi esposti a FLUCO 125-250-500 μ M mostravano specifiche anomalie a livello dell'apparato branchiale, comparabili a quelle precedentemente documentate e correlate ad un probabile aumento di RA. Gli effetti erano dose-dipendenti sia per la frequenza degli embrioni malformati che per la gravità delle malformazioni osservate. FLUCO 62.5 è stata individuata come la NOAEL (No Observed Adverse Effect Level). Gruppi co-esposti a FLUCO ed Eth mostravano un aumento significativo dell'effetto teratogeno rispetto ai gruppi esposti al solo FLUCO. In seguito alla co-esposizione con Eth, FLUCO 62.5 μ M mostrava più del 35% degli embrioni anomali. Tale concentrazione non era più identificabile come NOAEL. L'analisi dell'espressione genica ha rivelato che la sola esposizione a Eth o a FLUCO 62.5 μ M alterava l'espressione di geni coinvolti nel catabolismo di RA (*cyp26a1*, *cyp26c1*) e che tale alterazione peggiorava in seguito alla co-esposizione. La immunocolorazione per CYP26a1 e CYP26c1 non ha evidenziato differenze nelle aree embrionali coinvolte nella loro espressione, che risultavano sovrapponibili nell'area cefalica ai territori di espressione del marker delle cellule delle creste neurali (CRABP1). I dati ottenuti mostrano che la co-esposizione con Eth alla concentrazione sub-teratogena può aumentare il potenziale teratogeno del FLUCO. Questi risultati sono di particolare rilevanza considerando che FLUCO ed Eth non condividono lo stesso meccanismo d'azione: FLUCO interferisce con il catabolismo di RA, mentre Eth potrebbe interferire con la sintesi endogena di RA. L'analisi dell'espressione dei geni correlati al metabolismo di RA suggerisce che l'effetto miscela indotto da FLUCO ed Eth potrebbe essere spiegato da un accumulo di RA dovuto all'azione delle due sostanze.

Nella seconda parte di questo studio, embrioni dell'*ascidia Ciona intestinalis* (Chordata, Tunicata) sono stati esposti *in vitro* dallo stadio di neurula allo stadio di larva natante a concentrazioni crescenti di FLUCO (31.5-62.5-125-250-500 μ M), alla concentrazione non effetto di Eth (1 μ L/mL) o sono state co-esposte a FLUCO 62.5-125-250-500 μ M ed Eth (1 μ L/mL). Al termine del periodo di coltura (15 ore) le larve sono state esaminate morfologicamente. Eth da solo non ha indotto effetti avversi sullo sviluppo embrionale, mentre i gruppi esposti a FLUCO mostravano specifiche anomalie a livello delle strutture anteriori, comparabili a quelle già documentate e correlate all'esposizione a RA. È stato osservato un significativo aumento di larve con malformazioni gravi nei gruppi co-esposti alle miscele di FLUCO ed Eth. I dati preliminari ottenuti sembrano indicare l'*ascidia* come un adeguato modello alternativo per lo screening teratogeno delle miscele ottenute da fungicidi azolici: viene confermata l'ipotesi di un ruolo chiave dell'Eth nell'aumentare il potenziale teratogeno del FLUCO, puntando l'attenzione su un possibile impatto ambientale dei fungicidi azolici.