



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI NAPOLI  
FEDERICO II

**DOTTORATO DI RICERCA IN  
BIOLOGIA AVANZATA**

Indirizzo Biologia Evoluzionistica  
**XXVII CICLO**

**TESI DI DOTTORATO**

**Effetti del pesticida 2,2-Bis(4-Clorofenil)-1,1-Dicloroetilene (DDE)  
sulla morfologia, funzionalità e dinamica mitocondriale  
nel testicolo e nel fegato di ratto**

**Effects of pesticide 2,2-Bis(4-chlorophenyl)-1,1-dichloroethylene (DDE)  
on the liver and testicular mitochondrial bioenergetics,  
morphology and dynamics in the rat**

Relatore:

Ch.ma Prof.ssa Rosalba Putti

Dottoranda:

Dott.ssa Raffaella Sica

Coordinatore del corso:

Ch.mo Prof. Luciano Gaudio

Anno accademico 2013-2014

## Indice

---

RIASSUNTO .....	5
ABSTRACT.....	8
1 I PESTICIDI .....	12
1.1 Classificazione dei pesticidi .....	12
1.2 I pesticidi organoclorurati .....	13
1.3 DDT e DDE .....	13
1.4 Proprietà chimico – fisiche del DDT .....	15
1.5 Trasformazione del DDT .....	15
1.6 Biotrasformazione nel metabolismo dei mammiferi .....	17
1.7 Effetti del DDE .....	17
1.8 Effetti del DDE sul fegato e sul testicolo.....	18
SCOPO .....	21
2 IL FEGATO.....	24
2.1 Istologia del fegato.....	25
2.2 Sistema vascolare epatico e sistema biliare epatico .....	27
2.3 Le cellule epatiche .....	29
2.4 Funzioni del fegato .....	31
3 LE GONADI MASCHILI E LA SPERMATOGENESI.....	34
3.1 Struttura del testicolo nei Mammiferi.....	34
3.2 La spermatogenesi dei Mammiferi .....	35
3.3 Testicolo di ratto .....	36
4 MITOCONDRI E DINAMICA MITOCONDRIALE .....	39

4.1	I mitocondri .....	39
4.2	Regolazione della respirazione cellulare .....	40
4.3	Il network mitocondriale ed i processi di fusione e fissione .....	41
4.4	Fusione, fissione e apoptosi.....	44
4.5	Proteine di fissione mitocondriale: Drp1 e Fis1.....	47
4.6	Mitofusina.....	48
4.7	OPA1 .....	49
4.7.1	Funzioni della proteina OPA1 .....	51
4.8	Mitocondri e fertilità .....	53
5	MATERIALI E METODI.....	56
5.1	Modello sperimentale.....	56
5.2	Prelievo e preparazione dei campioni.....	58
5.3	Reazione immunoistochimica .....	58
5.4	Microscopia elettronica.....	59
5.4.1	Semifini .....	61
5.4.2	Ultrasottili.....	62
5.4.3	Colorazione.....	63
5.5	Determinazione del contenuto epatico di trigliceridi .....	64
5.6	Dosaggio proteico .....	64
5.7	Misura dell'attività respiratoria nei mitocondri isolati.....	64
5.8	Determinazione dell'effetto del DDE <i>in vitro</i> sui mitocondri isolati.....	65
5.9	Determinazione di q ed $\eta$ .....	66
5.10	Dosaggio Tbars .....	66
5.11	Analisi della produzione di H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> Mitocondriale .....	68
5.12	Determinazione del contenuto serico di testosterone .....	68

5.13	Real Time PCR .....	70
5.14	Analisi delle proteine mediante Western Blot .....	74
5.14.1	Preparazione degli omogenati di fegato e di testicolo.....	75
5.14.2	Preparazione dei mitocondri e del citosol da fegato.....	75
5.15	Blue native page.....	76
5.15.1	Preparazione dei mitocondri.....	77
5.15.2	Preparazione dei gel in gradiente .....	78
5.16	2D SDS Page .....	81
5.16.1	Preparazione dei gel della 2D.....	81
5.17	Analisi statistiche .....	82
6	RISULTATI E DISCUSSIONE .....	84
	Risultati relativi al fegato .....	84
6.1	Studi di funzionalità mitocondriale .....	84
6.2	Studi di morfologia e dinamica mitondriale .....	88
	Indagine ultrastrutturale .....	88
	Indagine tramite western blot .....	90
	Risultati relativi al testicolo .....	92
6.3	Studi di funzionalità mitocondriale .....	92
6.4	Studi di dinamica mitocondriale, morfologia e funzionalità testicolare. ..	93
	CONCLUSIONI.....	95
	TAVOLE .....	99
	Bibliografia .....	134

## RIASSUNTO

Il 2,2-Bis(4-Clorofenil)-1,1-Dicloroetilene (DDE), è il principale metabolita prodotto dalla degradazione del DDT e presenta un'elevata liposolubilità, una scarsa idrosolubilità e una grande resistenza alla fotossidazione, caratteristiche che lo rendono molto stabile e persistente nell'ambiente e che gli permettono di avere un'elevata capacità di bioaccumulo. Infatti nonostante nei paesi occidentali DDT e DDE siano stati banditi da molti anni, il DDE in particolare si ritrova ancora nei tessuti grassi degli organismi, uomo compreso.

Gli effetti del DDE si evidenziano a livello del tessuto nervoso, delle ghiandole endocrine, del fegato e dell'apparato riproduttore. In questo studio l'attenzione è stata focalizzata sul fegato e sul testicolo di ratti. In particolare, dal momento che il DDT ed il DDE agiscono a livello mitocondriale, presumibilmente agendo come disaccoppianti, nel mio progetto di ricerca ho deciso di utilizzare i mitocondri come possibili biomarkers del danno tossico da pesticidi e chiarire il meccanismo tramite il quale il DDE può eventualmente indurre danno a livello mitocondriale e cellulare. Sono stati scelti i mitocondri epatici poichè il fegato è l'organo deputato, fra l'altro, ai processi di detossificazione e quelli del testicolo dal momento che i pesticidi hanno effetto anti-androgenico e che nei mitocondri avviene la prima tappa del processo di steroidogenesi. Ho valutato gli effetti del DDE sulla bioenergetica mitocondriale ed ho verificato le possibili variazioni delle proteine della dinamica mitocondriale, un campo di studi che negli ultimi quindici anni ha avuto un forte impulso, considerate le strette interrelazioni fra dinamica e funzionalità mitocondriale. Ho, altresì, seguito al microscopio elettronico le eventuali alterazioni ultrastrutturali di questi organelli causate dalla somministrazione del DDE.

Il protocollo sperimentale ha previsto di valutare sia gli effetti acuti con una forte dose di DDE, sia quelli cronici con somministrazioni di dosi minime e continue, come avviene per gli organismi viventi nell'ambiente naturale. L'effetto acuto è stato valutato su mitocondri di fegato isolati a cui *in vitro* è stata somministrata una dose di DDE di 157 nmol/mg proteina. Gli studi *in vivo* ed *ex vivo* (con l'isolamento dei mitocondri dei ratti in studio) sono stati eseguiti sul fegato e sul testicolo di ratti Wistar alimentati con differenti tipi di diete per un periodo di 4 settimane. L'uso di differenti diete è stato pensato per valutare l'impatto del DDE, molto liposolubile, associato a diete iperlipidiche. Le diete sono state le seguenti: standard di laboratorio N, ricca in lardo D, con l'aggiunta di DDE alle stesse (N+DDE, D+DDE). La dose di DDE utilizzata per gli studi *in vivo* è stata di 10 mg/kg di peso corporeo dell'animale.

Gli studi *in vitro* sui mitocondri epatici mostrano una significativa diminuzione delle capacità respiratorie, danneggiando sia la via respiratoria NADH-linked che FADH<sub>2</sub>-linked, una ridotta capacità di ossidare gli acidi grassi e un severo danno all'integrità dei mitocondri.

Il trattamento cronico *ex vivo* con dosi basse di DDE provoca un adattamento funzionale nei ratti trattati. I mitocondri, infatti, presentano un aumento della capacità di ossidare acidi grassi; ciononostante si può rilevare mediamente un modesto danno all'integrità mitocondriale come indicato dall'abbassamento dell'RCR. Altro aspetto è l'aumento dello stress ossidativo, con aumento dell'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e dei perossidi lipidici nei trattati con DDE.

Per quanto concerne l'effetto del DDE sulla dinamica e sulla morfologia mitocondriale, è noto ormai che i mitocondri sono organelli dinamici, la cui forma e dimensioni, lunghezza e numero sono variabili e controllati dai processi di fissione e fusione. Questi due processi sono regolati da grandi GTPasi che sono rispettivamente Mfn1 e 2 ed OPA1 per la fusione delle membrane mitocondriali esterne ed interne, e Drp1 e Fis1 per la fissione mitocondriale.

Lo studio delle proteine della dinamica, tramite western blot, evidenzia che esse variano negli animali trattati sia con semplice dieta iperlipidica che con DDE, rispetto ai ratti di controllo. In particolare, nella sola dieta iperlipidica si nota un aumento di Drp1 ed una diminuzione della Mfn2, il che sta ad indicare uno spostamento verso il processo di fissione che quindi prevale sulla fusione. A livello morfologico si nota un maggior numero di mitocondri piccoli, circolari rispetto ai tubulari più lunghi. Nei trattati con DDE (D+DDE e N+DDE) aumentano sia Drp1 sia Mfn2 ad indicare che in questi animali, c'è una maggiore biogenesi mitocondriale, probabilmente come meccanismo adattativo per riparare i danni indotti dal pesticida: i mitocondri si frammentano per eliminare parti danneggiate e si fondono con altri mitocondri per recuperare molecole perdute.

A livello ultrastrutturale si notano varie forme di alterazioni dei mitocondri nei ratti D+DDE e N+DDE: mitocondri donut, che si formano in condizioni di stress ossidativo e mitocondri con processi di bulging, cioè erniazioni che vengono interpretate come immagini testimonianti l'apertura del poro di transizione di permeabilità. La proteina OPA1 oltre ad intervenire nel processo di fusione mitocondriale, è implicata anche nel rimodellamento delle creste, processo indipendente da quello della fusione. Studi recenti hanno evidenziato la presenza di diverse isoforme di OPA1, fra cui OPA1-L (100 KDa) intramembrana e la forma solubile OPA1-S (80 KDa), che formano un complesso oligomerico legato alla membrana mitocondriale interna (m.m.i.) a livello delle giunzioni delle creste che è in grado di tenere chiuse le creste. Western blot, per OPA1, nel fegato, mostrano come ci sia una diminuzione di

OPA1-L negli animali trattati col DDE rispetto agli animali N, e come a questo corrisponda un aumento di OPA1-S (80 KDa) rispetto ai controlli.

In condizioni normali l'oligomero di OPA1 tiene chiuse le giunzioni e tiene prigioniero all'interno delle creste il citocromo c. I western blot da me allestiti mostrano una diminuzione di citocromo c mitocondriale negli animali trattati col DDE alla quale corrisponde un aumento di cit.c citosolico, probabilmente dovuto al forte stress ossidativo provocato dal DDE che causa la disoligomerizzazione di OPA1 e l'apertura delle creste. Generalmente questi eventi innescano, poi, il processo di apoptosi. Tramite real time PCR e western blot ho valutato l'espressione di un marker più tardivo dell'apoptosi, Chop/Gadd153. I risultati ottenuti mostrano un aumento sia del messaggero che della proteina negli animali trattati con il DDE.

Infine, per quanto riguarda il testicolo, come per il fegato, ho valutato le capacità respiratorie dei mitocondri isolati relative allo stato 4 (in assenza di ADP), allo stato 3 (in presenza di ADP) ed il rapporto di controllo respiratorio o RCR (dato dal rapporto stato3/stato 4), indice di integrità dei mitocondri. I risultati ottenuti mostrano che dopo 4 settimane di trattamento non si ha nessuna variazione significativa dello stato 4 della respirazione in presenza di piruvato, come substrato, anche se si osserva una tendenza alla diminuzione nei due gruppi di ratti trattati con DDE. Per quanto riguarda lo stato 3 si osservano invece delle variazioni significative tra i gruppi sperimentali. In particolare si osserva una diminuzione significativa della respirazione in stato 3 in entrambi i gruppi trattati con DDE. Anche l'indice di integrità mitocondriale RCR, è diminuito in entrambi i gruppi trattati con il DDE.

I risultati sulle proteine della dinamica mitocondriale in parte ricalcano quelli ottenuti nel fegato. Anche per OPA1, si evidenzia una diminuzione dell'isoforma lunga OPA1-L, un aumento dell'isoforma corta OPA1-S ed un aumento correlato di citocromo c citosolico.

Il dosaggio dei livelli di testosterone con il metodo Elisa indica che essi si riducono negli animali trattati col DDE, confermando il ruolo anti-androgenico del pesticida.

Da questo mio studio emerge che la dose di pesticida a cui l'animale è sottoposto è molto importante perché dosi alte danneggiano seriamente la funzionalità e l'integrità dei mitocondri, dosi basse, almeno per il periodo di tempo da me saggiato, sono abbastanza tollerate, causando un adattamento funzionale dei mitocondri che rispondono con un aumento della biogenesi. In questo contesto anche l'aumento dell'apoptosi sembra rientrare nel meccanismo di adattamento che tende ad eliminare le cellule seriamente danneggiate ripristinando fin quando possibile l'omeostasi tissutale.

## ABSTRACT

2,2-Bis(4-chlorophenyl)-1,1-Dichloroethylene (DDE), is the principal metabolite produced by the degradation of DDT. It has a high lipid solubility, a low solubility in water and a high resistance to photo-oxidation, characteristics that make it very stable and persistent in the environment and that allow it to have a high capacity of bioaccumulation. In fact, although in the western countries DDT and DDE have been banned for many years, the DDE, in particular, can still be found in the fatty tissues of organisms, including humans.

The effects of DDE can be seen on the nervous tissue, on the endocrine glands, on the liver and on the reproductive system. In this study, attention was focused on the liver and on the testes of rats. In particular, since DDT and DDE act on mitochondria, presumably as uncouplers, my research is intended to use the mitochondria as possible biomarkers of the toxic damage by pesticides and clarify the mechanism by which the DDE may cause damage to mitochondria and cells. We have chosen the liver mitochondria as the liver is the main organ involved in detoxification processes and the mitochondria of the testis because pesticides have an anti-androgenic effect and it is just in the mitochondria that occurs the first stage of the process of steroidogenesis. I have analysed the effects of DDE on mitochondrial bioenergetics and I verified the possible variation of mitochondrial protein dynamics, a field of research that, in the past fifteen years, had a strong impulse, since there is a strict interrelationship between dynamics and mitochondrial function. I also analysed, using the electron microscopy, the ultrastructural alterations of these organelles, caused by the administration of DDE.

The experimental protocol has enabled us to estimate either the acute effects due to the administration of a strong dose of DDE or the chronic effects due to the administration of low and continuous doses, as it really happens in the living organisms in the natural environment. The acute effect was studied in the liver mitochondria to which, *in vitro*, has been administered a dose of DDE 157 nmol/mg protein. The studies *in vivo* and *ex vivo* (with the isolation of the mitochondria of the rats) were performed on the liver and the testis of male Wistar rats fed with different types of diets for a period of 4 weeks. Different diets were used to estimate the impact of DDE, which is highly liposoluble, associated with high fat diets, and they were: standard laboratory diet (N), a diet rich in lard (D) and diets with the addition of DDE (N+DDE and D+DDE). The dose of DDE used for *in vivo* studies was 10 mg/kg-bw.

*In vitro* studies on liver mitochondria showed a significant decrease in respiratory capacity and showed damage to both the pathway NADH-linked and FADH<sub>2</sub>-linked, a reduced ability to oxidize fatty acids and a severe damage to the integrity of mitochondria.



The chronic treatment *ex vivo* with low doses of DDE causes a functional adaptation in rats. The mitochondria, in fact, have an increased ability to oxidize fatty acids; but you can detect a modest mitochondrial damage as indicated by the decrease of RCR. Another aspect is the increase of the oxidative stress: with an increase of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and the lipid peroxides in rats treated with DDE.

Regarding the effect of DDE on dynamics and on the mitochondrial morphology, it is known that mitochondria are dynamic organelles whose shape, size, length and number are variable and controlled by the processes of fission and fusion. Both these processes are regulated by a large GTPases: Mfn1 and Mfn2 for the fusion of the outer mitochondrial membrane and OPA1 for the fusion of the internal mitochondrial membrane; Drp1 and Fis for mitochondrial fission.

The study of the proteins of dynamics, by western blot analysis, shows that they change in the animals treated either with the only fat diet or with DDE, if compared to control rats. In particular, with a high fat diet there is an increase of Drp1 and a decrease of Mfn2: this indicates that the fission process prevails on fusion. If the morphological level is considered you can also note a greater number of small and circular mitochondria compared to the tubular and longer ones. In rats treated with DDE (D+DDE and N+DDE) both Drp1 and Mfn2 increase: this shows that there is an increase of mitochondrial biogenesis, probably as an adaptive mechanism to repair the damage caused by the pesticide. Mitochondria remove the damaged parts by the fission and recover the lost molecules by their fusion with other mitochondria.

If the ultrastructural level is considered you can note various forms of alterations of mitochondria in D+DDE and N+DDE rats: donut mitochondria, which generate during the oxidative stress and mitochondria with bulging, herniations which testify the opening of the permeability transition pore. The protein OPA1 is also involved in the remodeling of the cristae, an independent process from the fusion one. Recent studies have highlighted the presence of different isoforms of OPA1, among which OPA1-L (100 kDa), intramembrane, and the soluble form OPA1-S (80 kDa), which form an oligomeric complex linked to the inner mitochondrial membrane at the level of the junctions of the cristae which is able to hold the cristae closed. As regards OPA1, in the liver, western blots show a decrease of OPA1-L in the animals treated with DDE if compared to N animals, and this corresponds to an increase of OPA1-S (80 kDa).

In normal conditions the oligomer of OPA1 holds the junctions closed and retains the cytochrome c within the cristae. Western blots show a decrease of mitochondrial cytochrome

c in the animals treated with the DDE, which corresponds to an increase of cytosolic cytochrome c. This phenomenon is probably due to the strong oxidative stress caused by DDE, which causes the OPA1 desoligomerization and, as a consequence, the opening of the cristae. Generally these events lead to the apoptosis. By real time PCR and western blot I evaluated the expression of a marker of apoptosis, which intervenes later, Chop/Gadd153. The results show an increase both in the messenger and in the protein of the animals treated with the DDE.

In the testis, as in the liver, I evaluated the respiratory capacity of isolated mitochondria in 4 state (in the absence of ADP), in 3 state (in the presence of ADP), and the respiratory control ratio or RCR (given by the ratio 3 state/4 state), an index of mitochondrial integrity. The results show that there isn't a significant variation in the 4 state of respiration in the presence of pyruvate as substrate, but there is only a decreasing trend in the two groups of rats treated with DDE. Regarding the state 3 significant variations have been observed in the experimental groups. In particular there is a significant decrease in the 3 state of respiration in both groups treated with DDE. The index of mitochondrial integrity RCR decreased in both groups treated with the DDE.

The results on the proteins of the mitochondrial dynamics are similar to those obtained in the liver. Even in this case, regarding OPA1, a reduction of long isoform OPA1-L, an increase of short isoform OPA1-S and an increase of cytosolic cytochrome c are shown.

The dosage of testosterone with Elisa indicates that its levels are reduced in animals treated with DDE, confirming the anti-androgenic role of pesticide.

My results show that the dose of pesticide administered to animals is very important. High doses cause serious damages to the mitochondrial functionality and mitochondrial integrity; low doses (at least for the period of time tested by me) are quite tolerated, causing a functional adaptation of the mitochondria which react with an increase of biogenesis. Also an increase of apoptosis seems to be part of the adaptation mechanism because it eliminates the cells seriously damaged and restores, until it is possible, tissue homeostasis.

## **CAPITOLO 1**

---

### **Pesticidi**

## 1 I PESTICIDI

Come “pesticida” si definisce un prodotto di origine naturale o chimico sintetico usato in agricoltura per proteggere le colture da organismi dannosi e impedire che vengano distrutte da malattie e infestazioni.

Si tratta di sostanze a composizione chimica molto diversa, che vanno da estratti di piante come il piretro, a sali e oli minerali, fino a composti organici molto sofisticati. I pesticidi leggeri (non persistenti) sono composti rapidamente biodegradabili, mentre i pesticidi pesanti (persistenti) sono composti che rimangono nell'ambiente per periodi di tempo relativamente lunghi.

La loro persistenza dipende da molti fattori: il tipo di suolo, l'umidità, il PH e l'estensione delle colture, ed è determinante per stabilire l'intervallo di sicurezza, ossia il tempo che deve intercorrere tra l'ultimo trattamento e la raccolta.

Per la loro stessa natura i pesticidi possono risultare pericolosi all'uomo o agli altri animali, in quanto il loro scopo è di uccidere o danneggiare gli organismi viventi. Possono essere assorbiti per inalazione, per contatto cutaneo o attraverso l'apparato digerente.

La tossicità acuta viene classificata in base alla dose letale DL50, cioè la dose in grado di uccidere il 50% degli animali di laboratorio che l'hanno assorbita. Questo sistema tuttavia tiene conto solo della tossicità acuta, e non comprende gli effetti a lunga scadenza, l'azione cancerogena, l'azione mutagena sul patrimonio genetico, l'azione teratogena su embrioni e feti.

### 1.1 Classificazione dei pesticidi

I pesticidi si possono suddividere, in base all'attività svolta, in:

- **ANTIPARASSITARI** che a loro volta si distinguono in:

#### 1. Insetticidi:

- a) Organoclorurati (tra cui il DDT);
- b) Organofosforici, sono una classe di composti caratterizzati da una persistenza di breve durata (si degradano nel giro di poche settimane). Hanno una tossicità acuta per uomo e mammiferi, molto maggiore rispetto agli organoclorurati.

#### 2. Battericidi

#### 3. Acaricidi

#### 4. Rodenticidi

#### 5. Molluschicidi

## **6. Nematocidi**

## **7. Fungicidi o Anticrittogamici**

- **DISERBANTI (ERBICIDI)**

Sono sostanze utilizzate per uccidere le erbe infestanti (o malerbe), generalmente salvaguardando le colture.

- **FITOREGOLATORI**

Detti anche regolatori delle piante, sono prodotti di sintesi che promuovono, inibiscono o comunque modificano determinati processi naturali delle piante (crescita, fioritura, ecc).

### **1.2 I pesticidi organoclorurati**

I pesticidi organoclorurati sono composti di sintesi che posseggono nella loro molecola più atomi di cloro. Il loro meccanismo d'azione si esercita a livello dei neuroni aprendo i canali del  $\text{Na}^+$  e innescando negli insetti un impulso nervoso continuo ed incontrollabile. A causa dell'uso massiccio in agricoltura, della loro stabilità chimica e della scarsa biodegradazione, questi composti sono presenti in tutto l'ecosistema e sono particolarmente tossici per gli organismi acquatici.

I pesticidi organoclorurati rientrano nella categoria degli inquinanti indicati con il termine di inquinanti organici persistenti "POP" (*Persistent Organic Pollutants*). Si tratta di composti organici chimicamente stabili, fortemente tossici e con lunghi "tempi di vita" nell'ambiente. Fra i più conosciuti POP vi sono, oltre ai Pesticidi Organoclorurati (fra cui il DDT ed EsaCloroBenzene) i PoliCloroBifenili (PCB), le PoliCloroDibenzoDiossine (PCDD), i PoliCloroDibenzoFurani (PCDF), gli Idrocarburi Policiclici Aromatici (IPA).

### **1.3 DDT e DDE**

Il para-diclorodifeniltricloroetano (DDT) è il più famoso degli insetticidi utilizzati dall'uomo e rientra nella convenzione di Stoccolma sulle sostanze inquinanti persistenti (POP). Durante la II guerra mondiale, l'uso del DDT impedì l'esplosione di epidemie perchè si dimostrò molto efficace contro le zanzare veicoli della malaria e della febbre gialla, contro i pidocchi vettori del tifo esantematico (epidemico o petecchiale) e contro le pulci, vettori della peste. L'Organizzazione Mondiale della Sanità ha stimato che l'uso del DDT in quel periodo aveva salvato la vita di oltre cinque milioni di persone.

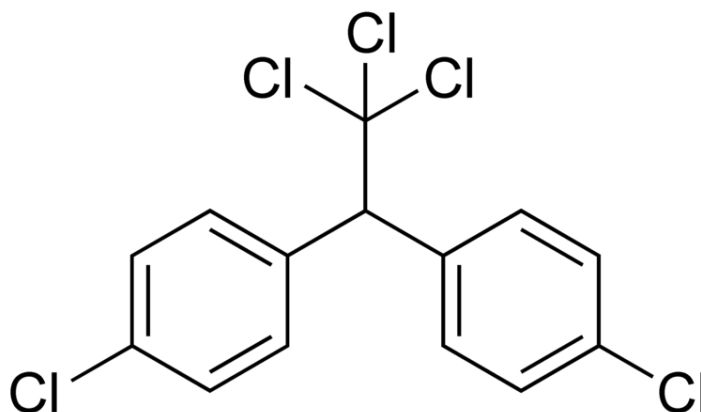
Il DDT e i suoi metaboliti sono anche contaminanti Persistenti, Bioaccumulabili e Tossici (PBT), vale a dire sostanze tossiche scarsamente biodegradabili che possono entrare nella catena alimentare ed accumularsi fino a livelli nocivi per la salute umana e per

l'ecosistema. La loro azione, prolungata nel tempo anche per mesi e anni dopo l'applicazione, si esplica per contatto ma anche per ingestione. Per le loro proprietà lipofile e la persistenza nell'ambiente, il DDT ed i composti ad esso correlati sono soggetti a bioaccumulo. L'elevata bioconcentrazione negli organismi viventi porta ad una progressiva biomagnificazione del DDT negli organismi al vertice della catena alimentare. La biomagnificazione, infatti, è l'amplificazione di un contaminante passando dai livelli più bassi a quelli più alti di una catena trofica. Il DDT è molto solubile nei solventi organici e nei grassi, ma gran parte del DDT accumulato nei tessuti adiposi è in realtà il suo metabolita DDE, composto lipofilo più stabile e resistente alla biodegradazione. La progressione dei composti organoclorurati attraverso la catena alimentare nella dieta dell'uomo è ben nota; sebbene questi composti abbiano una solubilità in acqua relativamente bassa, la loro lipofilità rende i crostacei e i molluschi in grado di assorbirli e concentrarli nel tessuto adiposo. In tal modo essi passano ai livelli più alti della catena alimentare marina fino ai pesci e, infine, ai mammiferi marini come foche e balene, e altri taxa di cui si nutrono anche gli esseri umani. La pericolosità di questi composti è aggravata dall'elevata capacità di trasferimento attraverso tutti i comparti ambientali (aria, acqua, suolo e biota). Studi condotti in diversi paesi hanno mostrato che la principale modalità di esposizione umana a questi composti è la dieta; i frutti di mare, i pesci e la carne sono le maggiori fonti alimentari di questi contaminanti per parte della popolazione mondiale. Infatti, l'uomo è attualmente esposto al DDT e ai suoi metaboliti in primo luogo attraverso il cibo (Turci et al., 2010). Dopo la pubblicazione, nel 1962, del libro di Rachel Carson *Primavera silenziosa*, in cui veniva descritta la progressiva estinzione del tordo americano che si nutriva dei vermi della terra contaminati dal DDT usato massivamente dagli agricoltori, la presa di coscienza ambientalista portò dopo varie battaglie alla sua messa al bando ad eccezione dell'uso necessario per la sanità pubblica. Attualmente l'uso del DDT è vietato negli Stati Uniti, Europa e Canada, ma può essere rilasciato in atmosfera dai paesi in cui ne è ancora consentita la produzione e l'uso, per esempio il Messico. I prodotti di degradazione del DDT possono presentare persistenza e tossicità elevate, come nel caso del DDE (2,2-Bis(4-Clorofenil)-1,1-Dicloroetilene) e il DDD (diclorodifeniledicloroetano). Attualmente il DDT è impiegato mediante irrorazioni mirate per ridurre la diffusione della malaria dovuta alla presenza delle zanzare negli stati in cui è ancora presente, e del tifo le cui conseguenze per la salute sono ben più gravi ed immediate (potenzialmente letali) della potenziale tossicità del DDT.

Nel 2006, infatti, l'OMS (Organizzazione Mondiale della Sanità) ha dichiarato che il DDT, se usato correttamente, non comporterebbe rischi per la salute umana e che il pesticida dovrebbe comparire accanto alle zanzariere e ai medicinali come strumento di lotta alla malaria.

#### 1.4 Proprietà chimico – fisiche del DDT

Con il termine DDT (figura 1) è indicato generalmente il composto dalla nomenclatura IUPAC 1,1,1-tricloro-2,2-bis(p-clorofenil)etano. La sua struttura consente l'esistenza di svariate forme isomeriche.



**Figura 1:** Struttura del DDT.

Tutti gli isomeri del DDT sono di colore bianco, di tessitura cristallina, insapori, con leggero odore di composto aromatico clorurato e con formula bruta  $C_{14}H_9Cl_5$ . La massa molecolare è pari a 4,5g/mol; il punto di fusione del p,p'-DDT è di 108,5-109°C; la tensione di vapore a 20°C è di  $1,9 \cdot 10^{-7}$  mmHg.

Il DDT è solubile nei solventi aromatici e clorati; moderatamente solubile in solventi organici polari ed in petrolio. La sua persistenza è dovuta:

- alla sua bassa tensione di vapore;
- alla conseguente lenta evaporazione;
- alla limitata reattività nei confronti della luce e delle sostanze chimiche presenti nell'ambiente;
- alla sua bassissima solubilità in acqua.

#### 1.5 Trasformazione del DDT

Il DDT e i suoi metaboliti primari, DDE e DDD, sono sostanze di sintesi e non sono presenti in natura finché l'uomo non ve li immette.

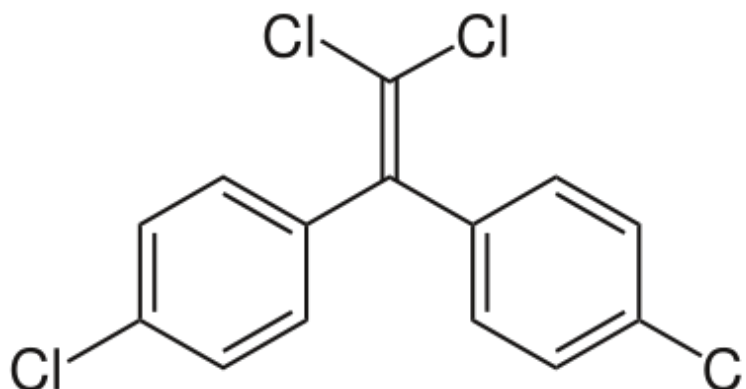
Mentre il DDD fu usato come pesticida, ma meno diffusamente rispetto al DDT, il DDE

deriva principalmente dalla degradazione del DDT.

Molte specie animali riescono a metabolizzare il DDT mediante eliminazione di HCl:

- un atomo di idrogeno viene rimosso da uno dei due atomi di carbonio dell'etano;
- un atomo di cloro viene rimosso dall'altro atomo di carbonio, con conseguente formazione del derivato DDE.

Il DDT è sottoposto a idrolisi mediante reazione catalizzata da basi, con un'emivita di 81 giorni a pH 9; il prodotto dell'idrolisi è il DDE (figura 2).



**Figura 2:** Struttura del DDE.

Il DDT si diffonde in atmosfera in seguito alle operazioni di nebulizzazione nelle aree del mondo in cui è ancora utilizzato. Inoltre, DDT e metaboliti possono derivare dalla volatilizzazione dei residui presenti nel suolo e nelle acque superficiali, per lo più come conseguenza dell'uso pregresso. Quando si depositano nel suolo, DDT, DDE e DDD sono fortemente assorbiti, ma possono anche ritornare volatili, soprattutto in suoli umidi; inoltre, a causa del forte legame con il suolo, DDT, DDE e DDD rimangono maggiormente negli strati superficiali del terreno e solo una piccola percentuale (anche se non irrilevante) può penetrare in profondità. A causa delle loro caratteristiche chimiche, il DDT e i suoi prodotti di degradazione, possono percorrere lunghe distanze. Il DDT, e in particolare il DDE, come già accennato in precedenza, si accumulano nelle piante e nei tessuti grassi di pesci, uccelli e mammiferi.

La biodegradazione può avvenire sia in condizioni aerobiche che anaerobiche a causa di microrganismi del suolo tra i quali batteri, funghi e alghe. Microrganismi del suolo, come *Aerobacter aerogenes*, *Pseudomonas fluorescens*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* hanno anche dimostrato di avere capacità di degradare il DDT in condizioni aerobiche ed anaerobiche, formando acido 4-clorobenzoico e DDE, rispettivamente. Il DDE, il metabolita principale del DDT, è spesso resistente alla biodegradazione in condizioni aerobiche e anaerobiche.



## **1.6 Biotrasformazione nel metabolismo dei mammiferi**

Vi sono due vie principali di trasformazione:

- perdita di una molecola di acido cloridrico con trasformazione in DDE;
- degradazione in DDA attraverso il DDD.

Il metabolita principale delle vie urinarie in tutti i mammiferi, compreso l'uomo è il DDA. Si può aggiungere che, malgrado grandi progressi, la chimica analitica non ha ancora permesso di delucidare pienamente la natura degli altri metaboliti urinari.

Invece nei tessuti grassi umani si accumula il DDE come dimostrato da Pearce et al., (1952) che hanno dichiarato di ignorare se i composti rilevati provenissero dalla degradazione parziale dei residui di DDT sulle piante o se erano stati formati nell'organismo durante la digestione o dopo l'assorbimento. Si sa ora che certi alimenti contengono DDE, ma che l'uomo può anche metabolizzarlo a partire dal DDT. Il meccanismo esatto di questa biotrasformazione è ancora poco conosciuto.

La diffusione nell'organismo avviene principalmente attraverso il sistema circolatorio e linfatico: DDT, DDE e DDD, legandosi alle lipoproteine seriche, presentano un elevato volume di distribuzione, un accumulo negli organi con quantità diversa di lipidi (fegato, tessuto adiposo, sistema nervoso centrale, reni e tessuto muscolare), un'emivita tissutale molto lunga e una lenta metabolizzazione.

È stato calcolato che il DDT dovrebbe sparire entro 10-20 anni se il suo uso cessasse completamente in tutto il mondo, ma il suo metabolita DDE dovrebbe persistere per tutta la durata della vita (Smith, 1991). Per cui il DDT è considerato come uno dei 12 inquinanti organici persistenti nella Convenzione UNEP di Stoccolma (UNEP, 2001; Yang et al., 2008).

Il processo di detossificazione messo in atto dal fegato sarà descritto in seguito, nel paragrafo 2.4.

## **1.7 Effetti del DDE**

Tra gli effetti acuti del DDT vi è quello di essere rapidamente assorbito dal tratto gastrointestinale e tale assorbimento aumenta considerevolmente in presenza di grasso (ATSDR, 1994). Nei ratti, singole dosi di 150 mg/kg di DDT fanno aumentare i livelli di enzimi epatici, causano una riduzione della funzione tiroidea e nelle scimmie provocano cambiamenti nella biochimica del sistema nervoso. Singole dosi di 50-160 mg/kg producono tremori, convulsioni e paralisi nei roditori. Il DDE è la forma che si ritrova in misura preponderante nei tessuti umani (Rogan e Chen, 2005) e nel siero di oltre il 90% della

popolazione nel nord America. Gli effetti del DDE si evidenziano a livello del tessuto nervoso, delle ghiandole endocrine, del fegato e dell'apparato riproduttore dove agisce da distruttore endocrino, interferendo con la funzione riproduttiva degli animali, pesci, rettili, uccelli, roditori e uomo (Vonier et al., 1996; Lundholm, 1997; Bouwman et al., 2012). Nell'uomo il DDE si accumula nel tessuto grasso (Pearce et al., 1952): quando si accumula nel tessuto adiposo materno, è rilasciato nel sangue ed è in grado di superare la barriera placentare raggiungendo il feto (Acosta et al., 2009). Karmaus (2009) ha evidenziato una relazione positiva fra livelli di DDE materni e il BMI delle figlie femmine adulte. Alcuni autori hanno messo in evidenza relazioni tra lo sviluppo della sindrome metabolica ed il diabete di 2° tipo con i livelli serici di POC (Dirinck et al., 2010). Analisi condotte negli USA, in Canada ed in Svezia hanno mostrato anche che la prevalenza del diabete in una popolazione aumenta all'aumentare dei livelli serici di DDT e DDE (Philibert et al., 2009). Infine molti studi mostrano come il DDE induca cancro colon-rettale (Song et al., 2014).

## **1.8 Effetti del DDE sul fegato e sul testicolo**

Poiché il fegato è il principale organo responsabile dei processi di detossificazione di agenti chimici e veleni, quando ingeriti o inalati, in cui quasi tutte le sostanze farmacologiche sono modificate o degradate, mi sono prefissata di studiare l'effetto del DDE sui mitocondri di tale organo e su quelli del testicolo che subisce l'effetto anti-androgenico del DDE con riduzione dei livelli di testosterone, ormone sintetizzato proprio a partire dai mitocondri.

- **Fegato**

Il fegato si mostra sensibile all'esposizione a pesticidi con epatomegalia ed induzione del citocromo P-450 2B (CYP2B) (Qualls et al., 1998) insieme con fenomeni necrotici ed aumentati livelli di ALT e AST, gli enzimi indicatori di danno epatocellulare. Dosi non letali di PBC provocano un aumento della richiesta energetica che si esplica nella mobilitazione dei substrati dai depositi. L'incremento del metabolismo energetico, dovuto all'induzione di enzimi detossificanti (Citocromo P450 family), causa un aumento della respirazione cellulare che costituisce la fonte principale di ATP. L'attività intensa e consistente del mitocondrio che è costretto a lavorare di più per detossificare la cellula dall'esposizione ai PBC, ha come conseguenza immediata un aumento della produzione di ROS. È noto infatti che i mitocondri sono uno dei siti di maggior produzione delle specie reattive dell'ossigeno. Infatti nello stesso studio si è osservato un aumento dei livelli di radicali liberi che provocano disfunzione mitocondriale prima e disfunzione cellulare poi (Nault et al., 2012).

A livello mitocondriale uno studio al microscopio elettronico aveva messo in evidenza come i pesticidi ne danneggiassero le membrane (Byczkowsky, 1977) il che comportava danno e una certa percentuale di morte cellulare. Per compensare ciò s'innestava un processo rigenerativo con ipertrofia ed iperplasia con un aumento di peso del fegato che secondo alcuni autori avrebbe potuto contribuire all'insorgenza di tumori epatici (Schulte-Hermann, 1974). Gli effetti del DDT e del DDE sulla bioenergetica mitocondriale interferiscono con i processi respiratori (Cutkomp et al. 1971; Cheng and Cutkomp, 1977). Parker (1960), Byczkowski (1973, 1977, 1978) nei mitocondri del fegato di ratto hanno considerato DDT e DDE come disaccoppianti della fosforilazione ossidativa. Pardini et al. (1980), hanno trovato che il DDT e i suoi metaboliti inibiscono la catena di trasporto mitocondriale, riducendo secondariamente la respirazione e la fosforilazione ossidativa. In particolare il DDT agirebbe a livello della NADH-coenzima Q reductasi (complesso 1) della catena respiratoria secondo Narayan et al., (1984). Secondo Ferreira et al. (1997), invece, il DDE interagisce con la succinato deidrogenasi (complesso II) riducendo la respirazione ed il potenziale di membrana; solo dosi elevate aumentano la permeabilità ai protoni disaccoppiando l'ossidazione dalla fosforilazione. Infine il DDE secondo Mota et al. (2011) inibisce entrambi i complessi 1 e 2 (NADH-coenzima Q reductasi e succinato deidrogenasi). Studi di microscopia elettronica su fegati di ratti prelevati dopo trattamento con PBC, hanno evidenziato una morfologia mitocondriale anormale e un aumento del Reticolo Endoplasmatico Liscio (Singh et al., 2000).

- **Testicolo**

Il DDE ha effetto antiandrogeno, tuttavia, il meccanismo attraverso il quale l'esposizione al p, p'-DDE può causare tossicità riproduttiva maschile rimane sconosciuto (Quan C et al., 2014). Studi precedenti hanno dimostrato che p, p'-DDE potrebbe indurre l'apoptosi delle cellule di Sertoli nel ratto mediante la via mitocondriale (Song Y et al., 2011).

L'uso del DDT per la sanificazione di zone endemiche per la zanzara ha effetti evidenti in alcune aree urbane del Sud Africa, dove è ancora utilizzato per l'irrorazione al fine di debellare la malaria (Assogba et al., 2014). In questi casi il suo utilizzo è stato associato ad una diminuzione dei parametri dello sperma negli uomini giovani e ad un significativo aumento di malformazioni urogenitali nei neonati. Tali influenze ambientali negative possono non solo causare una riduzione temporanea o permanente del liquido seminale in termini quantitativi, ma può anche avere un effetto negativo sul DNA degli spermatozoi.

Negli anni 70 fu individuato l'effetto negativo del DDT che produsse atrofia del pene e dei testicoli che causarono l'estinzione degli alligatori dell'Alabama (Semenza et al., 1997; Milnes et al., 2005; Guillette et al., 1996; Guillette 2006).

Il DDT ed il DDE, in particolare, sono potenti antagonisti del recettore degli androgeni, inibendo così l'attività trascrizionale androgeno-indotta e l'azione degli androgeni durante lo sviluppo (nei ratti in fase puberale ed adulta) (Turci et al., 2010). Per tale motivo sono classificati anche come interferenti endocrini, infatti esperimenti *in vivo* di esposizione a tali pesticidi hanno evidenziato una serie di effetti che coinvolgono gli aspetti funzionali e strutturali dell'apparato riproduttore indotti da risposte estrogeno-simili. Studi sulla fertilità realizzati nei ratti maschi adulti esposti al p,p'-DDT, ad una dose orale giornaliera di 50 e 100 mg/Kg per peso corporeo per 10 giorni e 7,5 mg/kg per peso corporeo per 36 settimane, hanno mostrato un insieme di anomalie strutturali e funzionali dose e tempo-dipendente, rispetto agli animali di controllo. Tali anomalie riguardano la riduzione del peso delle vescicole seminali correlate con la riduzione della produzione di testosterone nei testicoli e del numero e della percentuale di spermatozoi presenti nell'epididimo, l'aumento degli ormoni LH (luteinizzante) ed FSH (follicolo stimolante), fino ad arrivare ad una completa sterilità degli animali nel caso dell'esposizione a 36 settimane. L'aumento dei livelli delle gonadotropine può essere giustificato da un'alterata inibizione del meccanismo di feedback negativo esercitato di norma dagli steroidi sull'asse ipotalamico-pituitario (Kelce et al., 1995).

Già in passato, studi hanno dimostrato che l'esposizione al DDE di ratti in fase puberale può indurre apoptosi cellulare (Palin et al., 1982). In particolare è stato dimostrato sui ratti il coinvolgimento del DDE sull'induzione dell'apoptosi mediata dai mitocondri nelle cellule del Sertoli (Palin et al., 1982). Le specie reattive dell'ossigeno (ROS) e la perossidazione lipidica indotta dal DDE potrebbero svolgere un ruolo fondamentale nell'avvio dell'apoptosi (Shi et al., 2013). La bioenergetica dei mitocondri testicolari mostra che essi sono molto sensibili al DDE e che potrebbero essere usati per valutare in maniera adeguata gli effetti degli inquinanti ambientali sulla fertilità maschile (Mota et al., 2011).

## SCOPO

Il danno cellulare indotto da pesticidi contenuti all'interno di alimenti di origine vegetale ed animale, e le conseguenze associate all'assunzione seppur minima ma cronica di tali sostanze, sono ad oggi oggetto di vari studi per poter comprendere quali possano essere gli effetti a breve e a lungo termine sull'organismo.

Per quanto ho esposto sopra, focalizzerò la mia attenzione sulla sensibilità dei mitocondri ai pesticidi studiandone le possibili alterazioni morfologiche e funzionali indotte dal DDE sia per quanto riguarda la bioenergetica che la morfologia e la dinamica mitocondriale, un campo di ricerca che negli ultimi quindici anni ha avuto un grosso impulso dal momento che c'è interrelazione fra dinamica, morfologia e funzionalità mitocondriale (Bach et al., 2003; Garnier et al., 2005). Un altro importante aspetto per utilizzare i mitocondri come biomarkers di danno tossicologico da pesticidi sta nel fatto che frazioni di mitocondri isolate sono adatte allo screening tossicologico per predire la tossicità e la sicurezza chimica di un composto ed i dati ottenuti dai mitocondri si correlano con i parametri citotossici riportati per le cellule in coltura e per l'intero organismo, contribuendo così alla riduzione dell'uso degli animali nei laboratori di ricerca (Gazzoti et al., 1975; Argese et al., 1995; Pereira et al., 2009).

In particolare, nel mio progetto di ricerca ho stabilito di utilizzare i mitocondri testicolari ed epatici per valutarne l'eventuale differenza di sensibilità al pesticida e chiarire il meccanismo tramite il quale il DDE può indurre danno a livello mitocondriale. Ho scelto i mitocondri testicolari perchè il rilascio di contaminanti ambientali può contribuire ad una ridotta fertilità maschile; dunque, essi potrebbero essere utilizzati come un modello primario tossicologico per una corretta valutazione degli effetti degli agenti tossici ambientali sulla bioenergetica delle cellule del testicolo e sulla fertilità maschile. Ho scelto i mitocondri epatici in quanto il fegato, è il principale organo responsabile dei processi di detossificazione di agenti chimici e veleni, quando ingeriti o inalati, in cui quasi tutte le sostanze farmacologiche sono modificate o degradate. È per questo motivo e per il ruolo di primaria importanza svolto da questo organo nei processi di detossificazione, che la parte preponderante dei miei studi ha riguardato il fegato.

Oggetto di studio e valutazione sono stati sia gli effetti acuti, con una sola dose di DDE, sia quelli cronici con somministrazioni di dosi minime e continue di DDE per simulare quanto avviene per gli organismi viventi nell'ambiente naturale. Inoltre, considerata l'elevata liposolubilità del pesticida, gli studi *in vivo* sono stati effettuati su ratti alimentati con differenti tipi di diete, standard di laboratorio (N), ricca in lardo (D), con l'aggiunta o meno di

DDE alle stesse (N+DDE, D+DDE) per valutare se vi sono differenze negli effetti del DDE sommati a quelli di diete a differente contenuto lipidico.

Nei capitoli successivi descriverò brevemente l'anatomia microscopica di fegato e testicolo per poi descrivere i mitocondri.

## **CAPITOLO 2**

---

### **Il fegato**

## 2 IL FEGATO

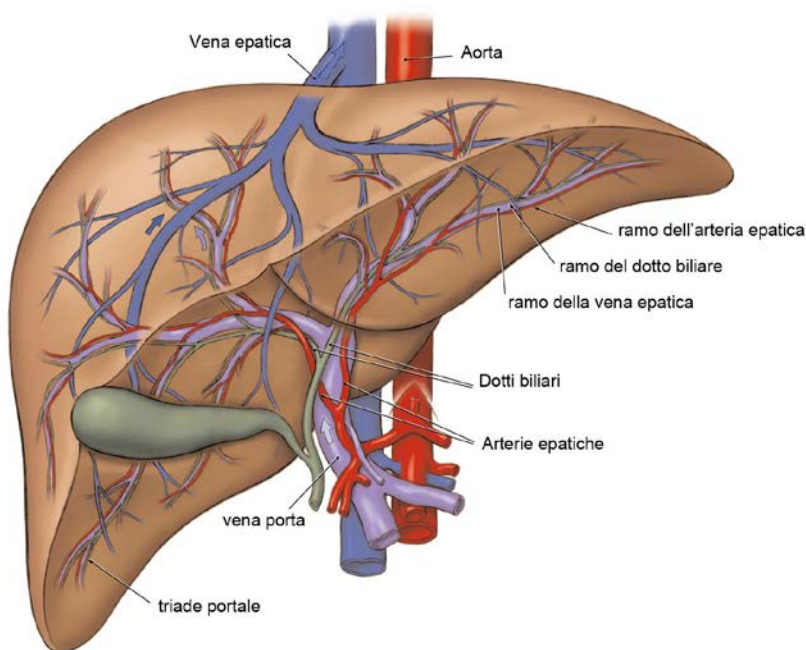
Il fegato (figura 3) è l'organo che svolge alcune fra le più complesse funzioni del corpo umano.

Esso è un organo unico, il cui peso è di circa 1500 grammi e per questo rappresenta la ghiandola più grande del corpo. Circa il 6-7% del suo peso è costituito da glicogeno, per un totale approssimativo di 100 grammi. Ottempera ad un ruolo metabolico di primo piano, fondamentale per il corretto funzionamento dell'intero organismo.

Il fegato è localizzato a livello della parte alta dell'addome destro, ha come compito fondamentale quello di drenare il sangue di provenienza intestinale, catturare le sostanze nutritive (derivanti dalla dieta) in esso contenute, metabolizzarle e distribuirle agli altri organi; svolge, inoltre, importanti funzioni di detossificazione di sostanze chimiche e pesticidi ed è considerato il “laboratorio chimico dell'organismo”.

Esso riceve sia sangue arterioso, ricco in ossigeno, tramite *l'arteria epatica*, sia sangue venoso, tramite la *vena-porta*, che raccoglie il sangue ricco di sostanze nutritive proveniente dall'apparato digerente e dalla milza. Il sangue in uscita dal fegato giunge poi alle *vene sovraepatiche* che confluiscono nella *vena cava inferiore*.

Nel fegato si trovano inoltre le *vie biliari* che raccolgono la *bile* prodotta dalle cellule epatiche, la quale viene convogliata, attraverso piccoli dotti situati nel fegato (*canalicoli biliari*), in dotti via via più grandi fino al *coledoco* e da questo infine all'intestino.



**Figura 3:** Anatomia fegato.



In comunicazione con il coledoco vi è il *dotto cistico*, il quale permette l'entrata e l'uscita della bile dalla colecisti (o cistifellea), formazione grossolanamente a forma di pera situata subito al di sotto della faccia inferiore del fegato.

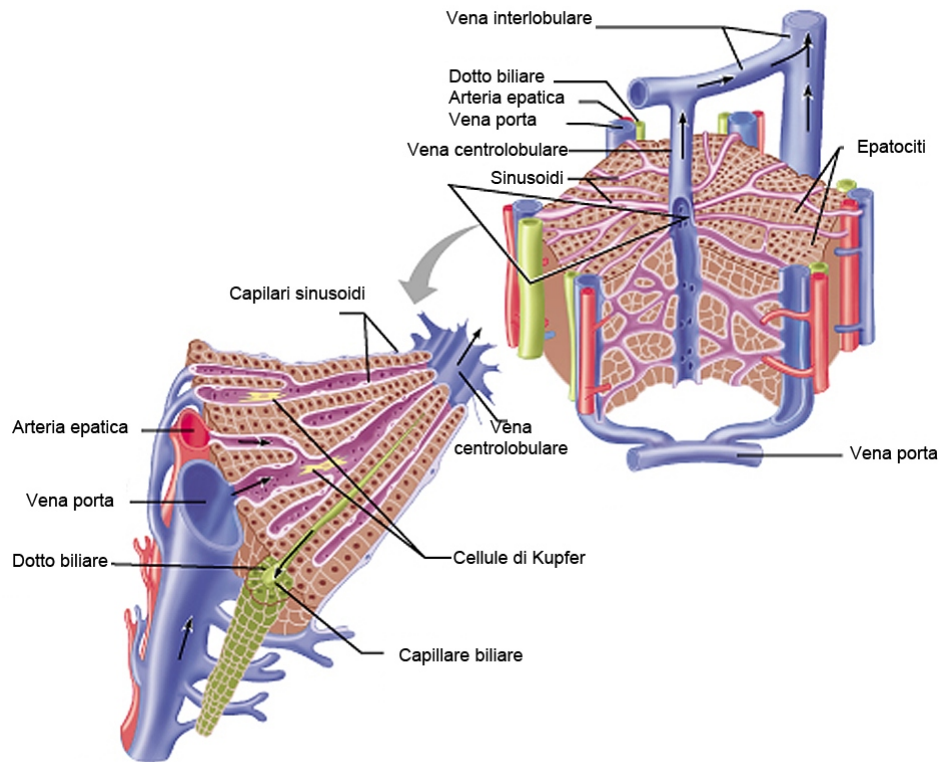
Quando il fegato si ammala, manifesta i primi sintomi di malattia solo quando più del 70% delle cellule epatiche è stato in qualche modo danneggiato, cosa che richiede tempo; infatti, quest'organo ha una dimensione tale che solo circa il 30% del fegato è necessario per svolgere le funzioni cui è sottoposto. È, fra l'altro, l'unico organo del nostro organismo che rigenera, cioè è in grado di ricrescere. Purtroppo, però, soprattutto quando ci sono fattori lesivi che aggrediscono il fegato in modo costante e cronico, senza dare segnali di allarme, la crescita del fegato può essere anomala e può arrivare a presentare grosse cicatrici dando luogo a quella che viene chiamata cirrosi epatica (figura 4).



**Figura 4:** Fegato normale a destra e fegato affetto da cirrosi avanzata a sinistra.

## 2.1 Istologia del fegato

La maggior parte delle ghiandole a secrezione esocrina viene suddivisa dal tessuto connettivo in lobi e lobuli più piccoli fra di loro ben distinti, il cui parenchima è costituito da ammassi di cellule epiteliali che formano acini alle estremità delle ramificazioni dei dotti escretori. La struttura del fegato invece, nonostante la sua caratteristica di ghiandola esocrina, è alquanto differente: al suo interno è presente una quantità ridotta di connettivo rispetto alle classiche ghiandole esocrine ed il tessuto epiteliale che lo costituisce ha un aspetto abbastanza uniforme in tutto l'organo. Tuttavia è possibile riscontrare delle entità strutturali ripetitive costituite da aree a forma di esagoni irregolari che costituiscono i cosiddetti lobuli epatici (figura 5).



**Figura 5:** Schematizzazione dei lobuli epatici.

Le lamine di cellule parenchimali che li costituiscono, (epatociti), si dispongono radialmente attorno ad una venula centro-lobulare. In corrispondenza degli angoli formati dall'interazione di queste aree poligonali, troviamo gli spazi portali, rappresentati da strutture triangolari di tessuto connettivo in cui si riscontrano un piccolo dotto biliare, un ramo dell'arteria epatica e un ramo della vena porta (vena interlobulare). L'irrorazione delle lamine di epatociti è determinata da un flusso ematico centripeto all'interno dei vari lobuli, grazie ai sinusoidi epatici che permettono quindi l'irrorazione delle singole cellule del lobulo in modo da fornirvi nutrienti e ossigeno. Queste unità poligonali, furono definite come lobuli epatici circa un secolo fa; oggi, la definizione che vi è attribuita è quella di lobulo classico, così da distinguerla da altre unità funzionali riscontrate nel corso degli anni. Un'interpretazione alternativa dell'organizzazione epatica infatti, poneva nel secolo scorso la definizione di lobulo epatico in maniera nettamente differente; esso rappresentava infatti la massa di cellule adiacenti ad uno spazio portale. Questa unità strutturale, definita come lobulo portale, presenta una struttura grossolana in sezione, di forma triangolare, ed include settori di tre lobuli classici adiacenti.

Dagli anni '50 la struttura funzionale del fegato è considerata l'acino epatico (Rappaport et al., 1954) che consiste in una struttura grossolanamente ovoidale di cellule

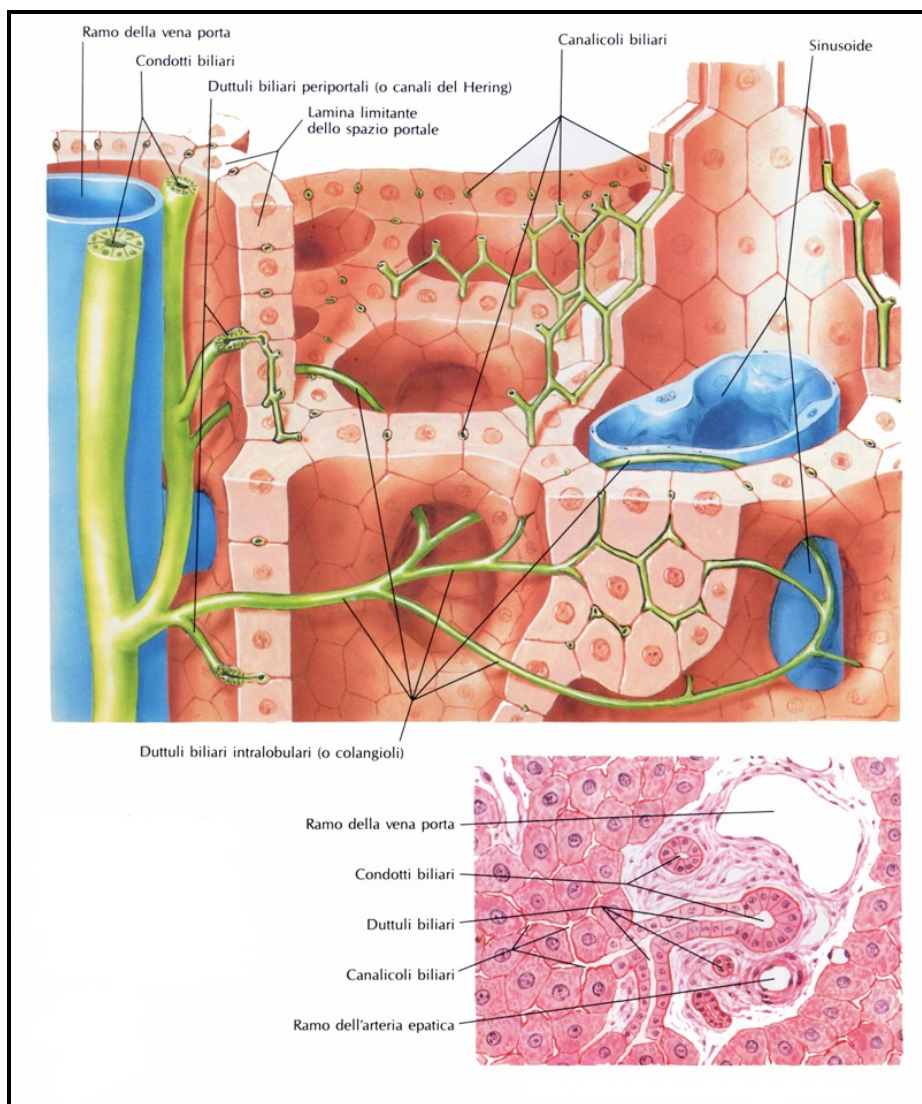
parenchimali situato intorno ad un'arteriola terminale, venula e dotto biliare che si diramano da uno spazio portale. Alle due estremità dell'acino si trova un vaso corrispondente alla vena centrale del lobulo classico, la quale nell'analisi dell'ultrastruttura dell'acino, prende il nome di venula epatica terminale.

## 2.2 Sistema vascolare epatico e sistema biliare epatico

Il sangue proveniente dallo stomaco e dall'intestino, ricco di nutrienti e povero di ossigeno, entra nei sinusoidi epatici proveniente dalle branche della *vena portale epatica* e si mescola con il sangue, ricco di ossigeno e povero di nutrienti, proveniente dalle *arterie epatiche*. Dal sangue gli epatociti possono prelevare l'ossigeno e i nutrienti, che sono accumulati, detossificati, usati per produrre energia o usati per sintetizzare nuove molecole. Le molecole prodotte dagli epatociti, o modificate negli epatociti, sono rilasciate nei sinusoidi epatici o nei canalicoli biliari. Il sangue misto nei sinusoidi epatici fluisce verso la vena centrale, dove lascia il lobulo e successivamente esce dal fegato attraverso le vene epatiche. La *bile* prodotta dagli epatociti, costituita principalmente da prodotti derivati dal metabolismo, fluisce attraverso i canalicoli biliari verso la triade epatica ed esce dal fegato attraverso i dotti epatici.

Il sangue perciò fluisce dalla triade verso il centro di ogni lobulo, mentre la bile fluisce dal centro del lobulo verso la triade. Il sangue proveniente dai capillari all'interno della maggior parte dei visceri addominali, come lo stomaco, l'intestino e la milza viene convogliato attraverso un sistema di vasi sanguigni al fegato. All'interno del fegato, il sangue scorre attraverso una serie di capillari dilatati chiamati *sinusoidi*.

Un *sistema portale* è un sistema vascolare che inizia e finisce con letti capillari e non ha un meccanismo di pompa come il cuore tra i letti capillari. Il sistema portale che comincia con i capillari nei visceri e finisce con capillari sinusoidali nel fegato è il *sistema portale epatico* (figura 6).



**Figura 6:** Sistema vascolare del fegato.

La *vena porta*, la più grande vena del sistema, si forma dall'unione della *vena mesenterica superiore* che drena il sangue dall'intestino tenue e della *vena splenica* che drena il sangue dalla milza. La vena splenica riceve la *vena mesenterica inferiore* che drena il sangue dall'intestino crasso e le *vene pancreatiche* che drenano il sangue dal pancreas. La vena porta riceve anche le *vene gastriche* prima di entrare nel fegato.

Il sangue dai sinusoidi del fegato è raccolto in *vene centrali* che si aprono nelle *vene epatiche*. Le vene epatiche si aprono nella vena cava inferiore.

### 2.3 Le cellule epatiche

Nel fegato si riconoscono principalmente quattro tipi di cellule: epatociti, cellule di Kupffer, cellule di Ito, pit cells e fibroblasti. Mi limiterò alla sola descrizione degli epatociti.

Gli epatociti sono le cellule più numerose presenti a livello dell'organo e presentano, in condizioni normali, forma poliedrica, contorni ben definiti e misurano circa 20-25  $\mu\text{m}$ , che dalla periferia del lobulo si spingono fino alla vena centrolobulare, anastomizzate tra loro e interposte al decorso dei sinusoidi. Le facce degli epatociti sono a stretto contatto fra loro e, da un lato (su di un versante detto polo biliare) delimitano i capillari biliari, mentre dall'altro prospettano verso le pareti sinusoidali. Sulle facce degli epatociti rivolte verso i sinusoidi, dette poli vascolari, sono presenti piccole vescicole di pinocitosi e numerosi corti microvilli che aumentano la superficie della membrana plasmatica a contatto con il plasma. I microvilli si proiettano nello *spazio di Disse* che separa l'endotelio sinusoidale dalle lamine cellulari. Si crea così un intricato sistema di spazi pericapillari e intercellulari dove il filtrato plasmatico si raccoglie e circola e dove avvengono gli scambi tra epatociti e sangue. Le superfici cellulari che delimitano i canalicoli biliari sono a contatto tra di loro e sono pianeggianti ad eccezione di una piccola area dove sono scavati a doccia. La giustapposizione delle incavature a doccia di due cellule contigue delimita la parete del capillare biliare, nel cui lume sporgono i brevi microvilli del polo biliare degli epatociti.

Gli epatociti sono uniti da *giunzioni serrate* per impedire che la bile si infiltri tra gli spazi intercellulari in quanto tossica, e *giunzioni comunicanti* che suggeriscono l'attuazione di un accoppiamento elettrico.

Il *nucleo* è disposto al centro della cellula e contiene uno o più nucleoli ben sviluppati; spesso si ritrovano anche epatociti binucleati.

Al pari delle altre cellule, nel citoplasma epatocitario si trovano tutti gli organuli cellulari che qui assumono una localizzazione precisa in relazione ad una specifica funzione dell'epatocita. Ad esempio le vescicole dell'apparato del Golgi sono localizzate in prossimità del polo biliare in quanto sono impegnate in funzioni secretive.

I *lisosomi* sono organuli cellulari deputati alla digestione di materiale extra o intracellulare. Si possono definire "l'apparato digerente della cellula". Si tratta di piccole vescicole (tra 25-50 nm e 1  $\mu\text{m}$ ), che si formano per gemmazione dalle membrane del Golgi. I lisosomi contengono una grande varietà di enzimi, chiamati idrolasi acide, capaci di digerire praticamente tutti i tipi di molecole biologiche (proteine, lipidi, acidi nucleici, glucidi). Questi enzimi sono prodotti nel RER e rielaborate dal Golgi e funzionano a  $\text{pH} < 5$ . Per far funzionare

questi enzimi, le vescicole lisosomiali sono dotate di pompe protoniche che portano all'interno della vescicola (contro gradiente) ioni  $H^+$  provenienti dal citosol.

I *perossisomi* sono simili ai lisosomi, anche nelle dimensioni (0,5  $\mu m$  circa), ma hanno enzimi diversi. Sono così chiamati perchè, grazie agli enzimi perossidasi, riescono a convertire l'acqua ( $H_2O$ ) in acqua ossigenata ( $H_2O_2$ ). Oltre alle perossidasi, i perossisomi contengono altri enzimi, tra cui la catalasi che converte l' $H_2O_2$  in  $H_2O$  e le ossalasi. I perossisomi sono prodotti secondo due modalità (Smith et al., 2013), sintesi de novo dal RE e per divisione (fissione tramite DRP1 a Fis1). I perossisomi hanno la funzione di degradare gli acidi grassi, l'alcol ed altri componenti dannosi. Per questo, sono maggiormente presenti nelle cellule del fegato e dei reni, due importanti filtri del nostro organismo. Al microscopio elettronico, i perossisomi si differenziano dai lisosomi per l'aspetto delle vescicole. Infatti, rispetto ai lisosomi, il contenuto delle vescicole dei perossisomi non è omogeneo, ma presenta un core elettrondenso riconducibile ad enzimi quali l'urato ossidasi, la catalasi, la D-amminoacido ossidasi.

Il *reticolo endoplasmatico* è presente nel fegato in entrambe le sue forme in maniera abbondante ma variabile a seconda della funzione che deve svolgere l'epatocita in quel momento. Sappiamo infatti che il *reticolo endoplasmatico liscio* ha sulla sua membrana gli enzimi implicati nella sintesi del colesterolo a partire dai lipidi assorbiti dal sangue attraverso il polo vascolare dell'epatocita. Il *reticolo endoplasmatico rugoso* e i ribosomi liberi sono invece impegnati nella sintesi delle proteine plasmatiche, quali albumina e fibrinogeno, riversate in circolo attraverso il polo vascolare.

I *mitocondri* sono numerosi e di diversa forma (sferica, bastoncellare o filamentosa) a seconda della diversa posizione che la cellula occupa nel lobulo e quindi della sua attività metabolica. C'è infatti da tener conto che la struttura e il metabolismo degli epatociti variano in rapporto alla loro distanza dall'afflusso del sangue portale. Nel lobulo classico le cellule epatiche in posizione più periferica hanno un metabolismo più elevato e un maggior numero di mitocondri, poichè maggiormente favorite a ricevere sangue arterioso rispetto agli epatociti delle zone intermedie e delle zone circostanti la vena centrolobulare. Inoltre, gli enzimi glicolitici sono maggiormente presenti negli epatociti disposti vicino alla vena centrale, mentre quelli gluconeogenici sono espressi principalmente negli epatociti in zona periportale.

Nei preparati istologici si osservano piccole aree citoplasmatiche chiare corrispondenti a zone di accumulo di glicogeno. Nel citoplasma epatocitario sono inoltre visibili anche goccioline lipidiche, la cui quantità è inversamente proporzionale a quella del glicogeno.

In diversi casi patologici, quali steatoepatiti, gli epatociti presenti per lo più in zona pericentrale, risultano gonfi e hanno dimensioni duplicate o triplicate rispetto a quelli adiacenti; mostrano inoltre un citoplasma chiaro con nucleo centrale (talvolta picnotico) e corpi di Mallory (inclusioni eosinofile). La causa di tale modifiche risiede in una degenerazione a livello citoscheletrico, probabilmente nei filamenti intermedi (Lackner et al. 2008). Gli epatociti che si presentano particolarmente rigonfi sono degenerati o in corso di degenerazione e vengono detti *epatociti balloons*.

Nel fegato, oltre agli epatociti, sono presenti altri tipi di cellule come le Kupffer, macrofagi che presiedono alla difesa immunitaria, le cellule di Ito che accumulano vitamina A, le pit cells corrispondenti ai natural killers ed i fibroblasti.

## **2.4 Funzioni del fegato**

Il fegato svolge importanti funzioni digestive ed escretorie, accumula e processa le sostanze nutritive, sintetizza nuove molecole, detossifica il sangue da sostanze chimiche dannose e molto altro ancora.

Fra le funzioni del fegato vi è quella della detossificazione: molte sostanze ingerite sono dannose per le cellule del corpo; inoltre, il corpo stesso produce metaboliti che, se si accumulano, sono tossici. Il fegato rappresenta la principale linea di difesa contro molte di queste sostanze tossiche, esso detossifica molte sostanze alterandone la loro struttura per renderle meno tossiche o render la loro eliminazione più facile. L'ammoniaca, per esempio, è un prodotto secondario del metabolismo degli amminoacidi, è tossica e non è facilmente rimovibile dal sangue a livello dei reni. Gli epatociti captano l'ammoniaca dal sangue e la trasformano in urea, che risulta meno tossica e viene riversata nel sangue e quindi eliminata tramite i reni con l'urina. Altre sostanze sono rimosse dal circolo sanguigno ed escrete dagli epatociti nella bile.

Il fegato è capace di compiere la trasformazione del DDT, del DDE, del DDD. I processi di detossificazione nel fegato vengono attivati dal legame degli xenobiotici con specifici recettori nucleari come PXR (pregnane X receptor) e CAR (costitutive androstane receptor); questi recettori ampiamente espressi nel fegato interagiscono con sequenze consenso di DNA (PBREM) e inducono la trascrizione dell'enzima citocromo P450, degli enzimi della coniugazione e delle molecole trasportatrici (Honkakoski et al., 1998). Evidenze scientifiche nei ratti hanno confermato l'ipotesi che il DDE induca nel fegato, attraverso il legame con i recettori CAR e PXR, l'espressione genica del citocromo P450, di geni per la proliferazione cellulare e dello stress ossidativo (Wyde et al., 2003). Il citocromo P450, una

monossigenasi microsomiale, è il più importante sistema enzimatico coinvolto nelle reazioni delle prime fasi e quindi, gli organelli cellulari deputati alla detossificazione delle sostanze xenobiotiche sono i microsomi. L'aumento della sintesi degli enzimi microsomiali, coinvolti nel processo di detossificazione, si riflette in una proliferazione del reticolo endoplasmatico con conseguente ipertrofia dei lobuli epatici nonché epatomegalia (Miyawaki et al., 2011).

L'aumento dei processi di detossificazione richiede una maggiore quantità di energia e quindi una maggiore attività mitocondriale di produzione di energia.

Il processo di detossificazione avviene attraverso due fasi:

- dapprima i composti lipofili vengono modificati strutturalmente dagli enzimi utilizzati nei processi di detossificazione (in particolare enzimi della fase I) attraverso varie reazioni (ossidazioni, riduzioni, idrolisi ecc), dando luogo a metaboliti intermedi reattivi;
- in seguito gli enzimi della fase II, con reazioni di coniugazione, formano legami covalenti con composti come il glutatione, l'acido glucuronico e/o gli aminoacidi. I coniugati sono più solubili in acqua rispetto alle sostanze di partenza e quindi più facilmente escreti nella bile.



## **CAPITOLO 3**

---

### **Le gonadi maschili e la spermatogenesi**

### 3 LE GONADI MASCHILI E LA SPERMATOGENESI

#### 3.1 Struttura del testicolo nei Mammiferi

Nei vertebrati, la gonade maschile o testicolo presenta differenti tipi di organizzazione pertanto, a seconda dell'animale preso in considerazione, avremo un'organizzazione di tipo ampollare, cistica o tubulare. Nei mammiferi, ratto compreso, troviamo un'organizzazione di tipo tubulare. L'unità fondamentale di tale organizzazione è il tubulo seminifero, un cilindro cavo lungo e sottile, la cui parete è costituita da una membrana propria e da un epitelio pluristratificato in cui risiedono e si sviluppano le cellule germinali (CG) destinate a formare i gameti maturi, gli spermatozoi (SPZ). Nei tubuli seminiferi avviene il processo di maturazione delle CG; i tubuli seminiferi sono caratterizzati da un epitelio pluristratificato (epitelio seminifero, ES) e da un lume nel quale sono rilasciati gli spermatozoi. Le CG sono osservabili a diversi livelli a partire dalla base del tubulo fino al lume e sono circondate dal citoplasma di cellule somatiche, le cellule di Sertoli. Esternamente, i tubuli sono circondati da una lamina basale, costituita da uno o più strati di cellule mioidi che si contraggono ritmicamente, e da un tessuto fibroso ricco di collagene che le separa dall'interstizio (Davidoff et al., 1990). Le contrazioni peristaltiche del tubulo seminifero che si generano, sostengono il trasporto degli spermatozoi alla rete testis, dalla quale poi originano i condotti efferenti per l'epididimo (Holstein et al., 1996).

Le cellule di Sertoli hanno una forma colonnare e la base rivolta verso la lamina. Durante il periodo embrionale e fino alla pubertà le CS si dividono per mitosi; nella gonade matura esse presentano un citoplasma esteso per l'intera altezza dell'epitelio e sono caratterizzate da ramificazioni che circondano le cellule germinali (De França et al., 1993; Ye et al., 1993). Le loro funzioni principali sono di nutrimento, sostegno e protezione delle CG con le quali instaurano contatti dovuti principalmente alla presenza di N-caderine (Wayne et al., 2008). Inoltre, le cellule di Sertoli formano tra loro giunzioni serrate o occludenti: durante il processo di divisione e differenziamento, le cellule germinali si spostano progressivamente dalla regione basale della membrana fino alla loro destinazione nel compartimento luminale. I contatti Sertoli-Sertoli portano, inoltre, alla formazione di una barriera, la *barriera emato-testicolare*. Questa barriera delimita due regioni dell'epitelio seminifero: 1) compartimento basale contenente cellule diploidi (spermatogoni e spermatociti I fino allo stadio di preleptotene); 2) compartimento luminale che contiene spermatociti I in uno stadio successivo al preleptotene, spermatociti II, spermatidi e spermatozoi. La barriera emato-testicolare, separando l'ambiente interno dell'organismo dalla regione del tubulo dove avviene la

spermiogenesi, impedisce agli antigeni di membrana delle cellule germinali non diploidi di passare nel torrente circolatorio, evitando il rischio di una reazione autoimmune: essa è alterata ad esempio in casi di cirrosi epatica derivante da una degenerazione di epatite autoimmune non curata (Castilla et al., 2004). Le CG si sviluppano come un sincizio, dato che dopo la divisione restano connesse le une alle altre per mezzo di ponti intercellulari; tale processo di divisione incompleta assicura lo sviluppo sincrono e consente una comunicazione rapida tra le cellule. Ampie aree dei tubuli contengono, così, un elevato numero di CG allo stesso grado di maturazione, permettendo l'identificazione di diversi stadi in un ciclo dell'epitelio seminifero.

I tubuli seminiferi convergono anatomicamente verso l'ilo del testicolo, dove assumono un andamento rettilineo e sono detti tubuli retti. Questi continuano poi con la rete testis, a cui seguono i canali efferenti, l'epididimo e il vaso deferente o dotto di Wolf, che prosegue con l'uretra. Tra i tubuli seminiferi è localizzato tessuto connettivo molto vascolarizzato, il tessuto interstiziale, caratterizzato da gruppi di cellule di Leydig, di forma poligonale, che producono e secernono androgeni (Davidoff et al., 1993). Inoltre, la tunica albuginea, un tessuto connettivo di tipo fibroso, forma una guaina di protezione intorno al testicolo (Middendorff et al., 2002). Infine, all'esterno il testicolo è avvolto dalla tunica vaginale, membrana sierosa di origine peritoneale.

### **3.2 La spermatogenesi dei Mammiferi**

La spermatogenesi è il processo di sviluppo e differenziamento delle cellule germinali in spermatozoi ed avviene all'interno dell'epitelio seminifero. Nei Mammiferi essa è di tipo continuo: nella parete dei tubuli dei testicoli maturi si osserva la presenza complessiva di cellule germinali a tutti gli stadi di differenziamento, distribuite secondo un ordine che procede dalla membrana basale verso il lume del tubulo in base alle divisioni mitotiche che avvengono a intervalli regolari a carico degli spermatogoni, e alle ondate meiotiche sincrone delle CG successive. La successione è la seguente: spermatogoni (SPG), spermatociti I (SPCI), spermatociti II (SPCII), spermatidi (SPT), spermatozoi (SPZ).

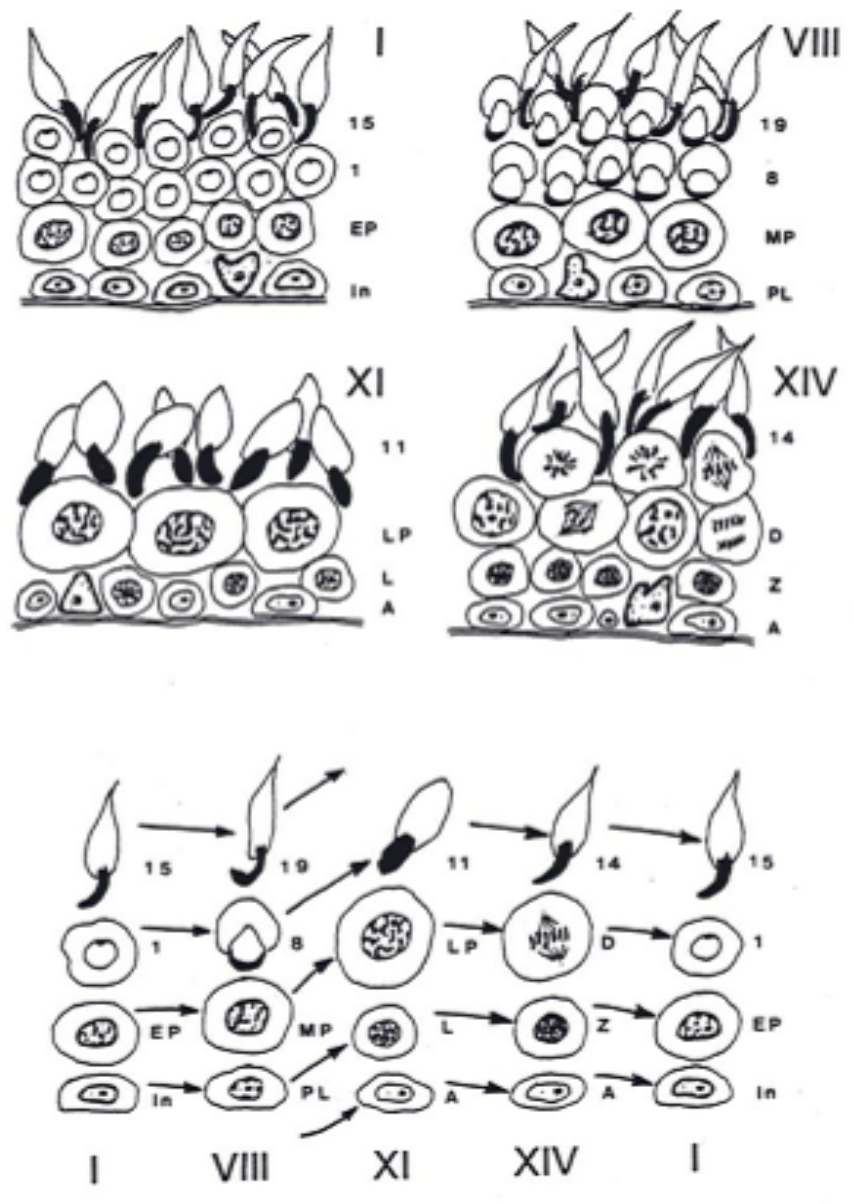
In tutta l'area del tubulo seminifero una nuova generazione di spermatogoni inizia a moltiplicarsi prima ancora che le cellule della generazione precedente siano diventate spermatozoi, dando inizio a una nuova ondata spermatogenica. Ciò, come già accennato, spiega la sovrapposizione, in una stessa area, delle cellule germinali a stadi diversi di differenziamento.

### **3.3 Testicolo di ratto**

Anche nel ratto troviamo, come già detto precedentemente, un'organizzazione a tubuli seminiferi.

Sezioni trasverse dei tubuli seminiferi nei Mammiferi, mostrano che le cellule germinali sono raggruppate in associazioni cellulari comprendenti 4 o 5 tipi cellulari, ognuna delle quali si trova in un preciso stadio differenziativo. Nel ratto, un'associazione cellulare occupa per l'intera sezione un tratto del tubulo, nell'uomo queste associazioni sono disposte secondo una spirale di Archimede (Nieschlag et al., 1992). La distanza tra due identiche e consecutive associazioni cellulari lungo un tubulo seminifero costituisce l'onda dell'epitelio seminifero. L'intervallo di tempo che intercorre tra la comparsa di due associazioni cellulari identiche in un determinato segmento di tubulo seminifero è definito ciclo dell'epitelio seminifero (Kierszbaum, 1994).

Per quanto concerne l'istologia del testicolo, nel ratto esso è organizzato in maniera tale che in una sezione trasversale si susseguono 14 stadi (Leblond and Clermont, 1952) ognuno dei quali è costituito da 4 differenti associazioni cellulari di cellule germinali a vario stadio di maturazione che nel loro complesso costituiscono il ciclo dell'epitelio seminifero (figura 7). La lunghezza del ciclo spermatogenetico nel ratto è di circa 13 giorni.



**Figura 7:** Illustrazione delle associazioni cellulari costituite da 4 delle 14 fasi del ciclo della spermatogenesi. (Male Reproductive System).

## **CAPITOLO 4**

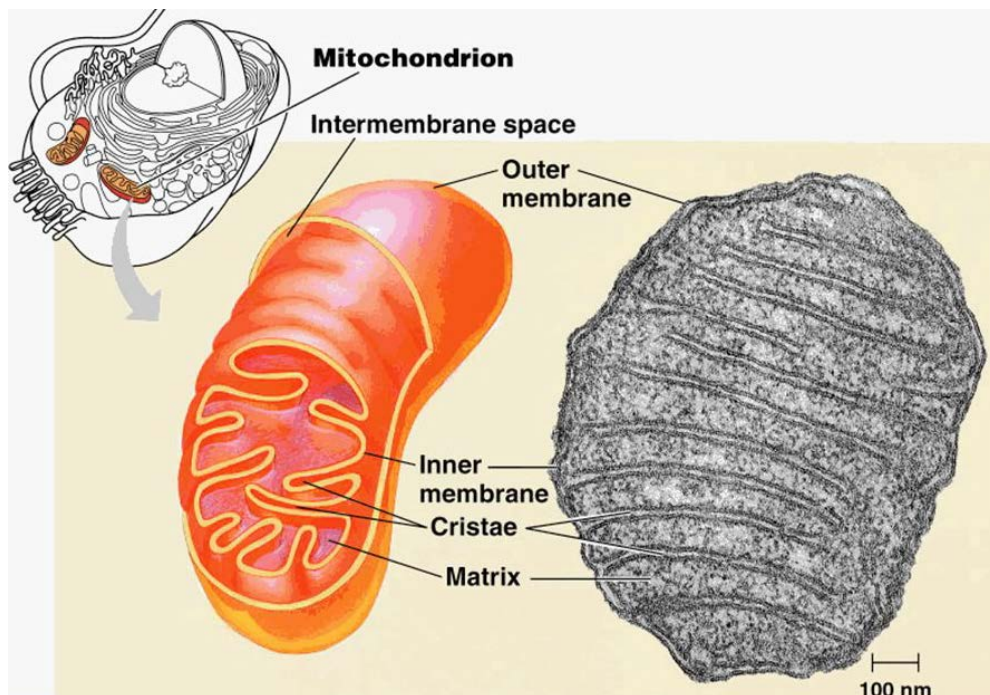
---

### **Mitocondri e dinamica mitocondriale**

## 4 MITOCONDRI E DINAMICA MITOCONDRIALE

### 4.1 I mitocondri

I mitocondri (figura 8) sono organelli citoplasmatici in grado di svolgere molteplici funzioni. La più importante tra esse consiste nell'estrarre energia dai substrati organici che gli arrivano per produrre un gradiente ionico che viene sfruttato per produrre adenosina trifosfato (ATP).



**Figura 8:** Struttura di un mitocondrio. (Campbell, 10th edition)

La struttura dei mitocondri è peculiare: sono formati da due membrane, quella esterna permette il passaggio di piccole molecole, quella interna è selettivamente permeabile e ripiegata in estroflessioni chiamate creste mitocondriali, che ne aumentano la superficie. Le due membrane identificano due differenti regioni: lo *spazio intermembrana*, quello delimitato dalla membrana esterna e quella interna, e la *matrice*, circoscritto dalla membrana interna.

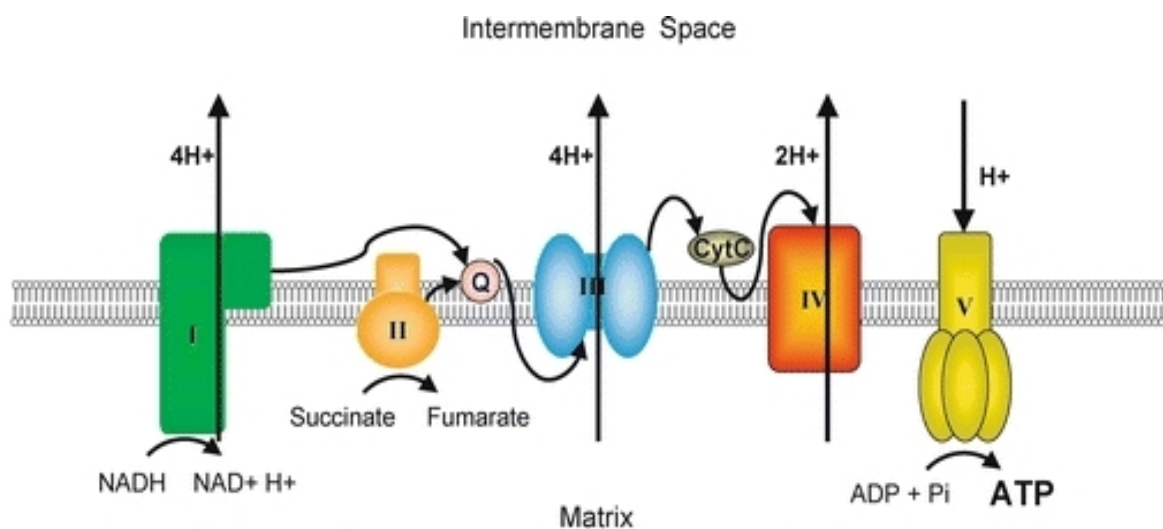
La membrana interna si presenta sotto forma di numerosi avvolgimenti, rientranze e sporgenze, queste sono dette appunto *creste mitocondriali*. La funzione di queste strutture è aumentare la superficie di membrana che permette di disporre un numero maggiore di complessi di ATP sintetasi.

La produzione di energia viene svolta utilizzando i principali prodotti della glicolisi e della  $\beta$ -ossidazione degli acidi grassi. Durante la fosforilazione ossidativa, i trasportatori ridotti di elettroni NADH e FADH<sub>2</sub> (prodotti dal catabolismo dei substrati energetici)

trasferiscono, con un meccanismo a navetta, i loro equivalenti di riduzione nella matrice mitocondriale.

Cinque complessi enzimatici sono inclusi nella membrana mitocondriale interna (I, II, III, IV e V). I complessi I e II ricevono gli elettroni dall'ossidazione, rispettivamente, del NADH e del succinato e li trasferiscono ad un trasportatore di elettroni lipidico, il coenzima Q. Il complesso III ossida la forma ridotta del coenzima Q e riduce il citocromo c, un trasportatore proteico di elettroni. Il complesso IV accoppia l'ossidazione del citocromo c alla riduzione dell'ossigeno molecolare ad acqua.

Le reazioni catalizzate dai complessi I, III e IV forniscono anche l'energia per trasportare i protoni ( $H^+$ ) nello spazio intermembrana, rendendolo più acido della matrice mitocondriale. La dissipazione del risultante gradiente protonico, con il rientro degli  $H^+$  nella matrice, attraverso uno specifico canale ionico presente nel complesso V, genera l'energia che è usata da questo complesso per promuovere la sintesi endoergonica di ATP, a partire da adenosina difosfato (ADP) e fosfato inorganico (figura 9).



**Figura 9:** Complessi della catena respiratoria. (Cuperus et al., 2010).

## 4.2 Regolazione della respirazione cellulare

Il trasporto degli elettroni, nella gran parte delle condizioni fisiologiche, è strettamente accoppiato alla fosforilazione. La concentrazione di ATP e ADP dipende dalla velocità con cui gli elettroni vengono trasportati lungo la catena di trasporto e dal consumo di ossigeno che viene trasformato in acqua. Infatti, ad una diminuzione delle concentrazioni di ADP, quindi ad aumento dell'ATP, si ha un rallentamento della velocità di fosforilazione detto stato 4 della respirazione o stato di riposo. Ciò porta ad un incremento del gradiente protonico ai due lati



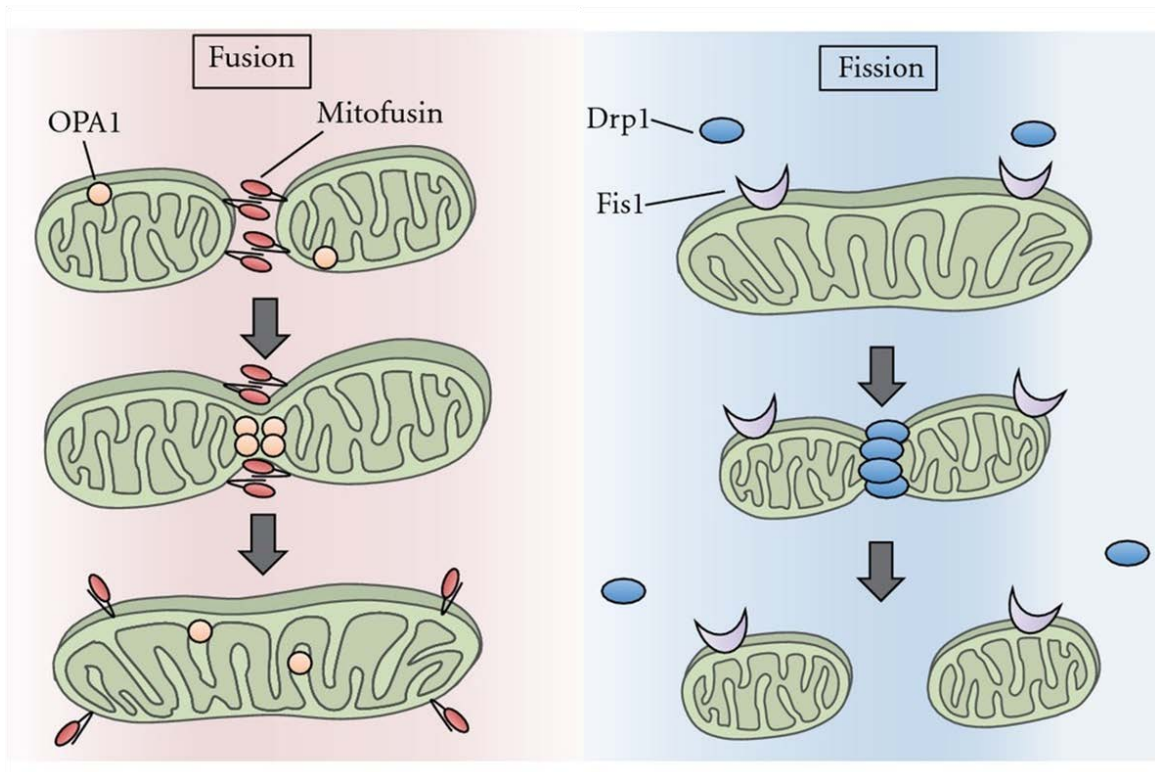
della membrana interna. Viceversa ad un aumento della concentrazione di ADP, dovuta ad una richiesta di energia della cellula, aumenta la velocità di fosforilazione, andando a stimolare il flusso di elettroni attraverso il complesso IV e quindi la produzione di ATP: questo è detto stato 3 della respirazione. Il controllo della velocità di trasporto degli elettroni da parte dell'ADP è detto controllo da parte dell'accettore o controllo respiratorio. I mitocondri hanno un'affinità molto elevata per l'ADP e continuano a fosforilarlo, purchè siano presenti tutti gli altri componenti necessari alla fosforilazione ossidativa. Il rapporto tra la velocità di respirazione del mitocondrio ad elevate concentrazione di ADP e la velocità in assenza di ADP viene detto RCR o indice di controllo da parte dell'accettore. Questo rapporto può oscillare tra valori  $>$  di 5 in un mitocondrio in cui le membrane cellulari sono intatte, a valori  $<$  di 1 quando i mitocondri sono danneggiati. Infatti il mitocondrio perde la capacità di fosforilare l'ADP. Quindi quest'indice rappresenta una misura utile per verificare l'integrità dei mitocondri (Estabrook et al., 1967).

La dipendenza della velocità di consumo di ossigeno dalla concentrazione di ADP è detta controllo dell'accettore della respirazione ed indica l'accoppiamento dell'ossidazione con la fosforilazione. Tra i fattori che influenzano il grado di accoppiamento termodinamico, la permeabilità della membrana mitocondriale interna a ioni  $H^+$  svolge un ruolo molto importante. Tuttavia, l'accoppiamento tra l'ossidazione dei substrati e la sintesi dell'ATP non è pari al 100%. Infatti, una parte dell'energia è persa sotto forma di calore mediante delle reazioni che consentono di dissipare il gradiente protonico senza portare alla consueta sintesi di ATP. Si verifica, quindi, un vero e proprio disaccoppiamento della fosforilazione ossidativa.

Un metodo per valutare il disaccoppiamento basale è il calcolo di  $q$  (grado di accoppiamento della fosforilazione ossidativa) ed  $\eta$  (efficienza termodinamica); come verrà descritto in seguito.

### **4.3 Il network mitocondriale ed i processi di fusione e fissione**

I mitocondri sono organelli dinamici il cui numero, la cui misura e posizione, variano all'interno di ciascun tipo cellulare, anche in risposta alle diverse richieste di energia da parte della cellula stessa. I mitocondri, dunque, si fondono e si dividono continuamente a formare un network dinamico attraverso i due processi di fusione e fissione (figura 10).



**Figura 10:** Processi di fusione e fissione mitocondriale. (Kanamaru et al., 2012).

La fissione e la fusione mitocondriale sono due processi fondamentali per il mantenimento della morfologia e distribuzione dei mitocondri ed anche per la proliferazione e differenziazione cellulare. Morfologie mitocondriali anormali si ritrovano in molte malattie, così come mutazioni nelle proteine che regolano fusione e fissione causano malattie nell'uomo (Alexander et al., 2000; Delettre et al., 2000; Zuchner et al., 2004).

Il processo di fusione va distinto in due fasi, ovvero, la fusione della membrana interna e la fusione della membrana esterna. Studi condotti in lievito hanno evidenziato che nella fusione delle membrane esterne intervengono tre proteine: Fzo1 inserita sulla membrana esterna, Mgm1 inserita sulla membrana interna e Ugo1. Le prime due hanno attività GTPasica e sono simili alla dinamina coinvolta nella fusione delle vescicole cellulari.

Il processo di fusione mitocondriale è necessario per il mantenimento della rete dei mitocondri e per il buon funzionamento di questi organelli. Infatti, una rete fittamente interconnessa, può facilitare il trasferimento del potenziale di membrana da regioni povere a regioni ricche di ossigeno (Skulachev, 2001). In *Drosophila*, per esempio, la fusione è necessaria durante lo sviluppo, perchè regola la spermatogenesi. Infatti, bloccando la fusione, mediante la mutazione del gene fuzzy onion (Fzo), si ottengono dei maschi sterili (Hales and Fuller, 1997).

Inoltre è noto che un eccesso di fissione e la mancanza di fusione, comportano la rottura della rete mitocondriale con conseguente perdita del DNA mitocondriale, difetti nella catena respiratoria e un aumento delle specie reattive dell'ossigeno (ROS) (Yaffe, 1999).

Tuttavia, i meccanismi molecolari che regolano l'equilibrio dinamico tra fissione e fusione, non sono ancora stati chiariti completamente. Studi condotti in *lievito*, *Drosophila* e *Caenorhabditis elegans*, hanno identificato una serie di fattori chiave, il cui ruolo è fondamentale per i processi di fusione e fissione.

Nelle cellule di mammifero, la fissione mitocondriale, è regolata dalla proteina Dynamin-related protein 1 (Drp1) (nel lievito Dnm1), una grande proteina ad attività GTPasica (Smirnova et al., 1998; Smirnova et al., 2001) la cui sequenza amminoacidica presenta delle significative similitudini con quella delle dinamine. Le dinamine sono delle proteine che regolano il traffico vescicolare e l'endocitosi, tuttavia le funzioni molecolari in cui sono coinvolte le dinamine e Drp1 non sono del tutto chiarite.

Dnm1 normalmente si trova nel citoplasma e si accumula sui mitocondri, nei siti di fissione (Smirnova et al., 2001), il suo reclutamento a livello dei mitocondri, avviene attraverso la proteina mitocondriale Fis1 (hFis1 nell'uomo), una piccola proteina di fissione caratterizzata all'estremità C-terminale da un'elica transmembrana (Mozdy et al., 2000). Sebbene Fis1 e Drp1 siano i regolatori chiave della fissione mitocondriale nei mammiferi, anche altre proteine sono coinvolte in questo processo. Ulteriori proteine coinvolte nel meccanismo di fissione sono, Mdv1 e Caf4. Fis1, distribuita in modo uniforme lungo la membrana esterna, espone il dominio N-terminale verso il citoplasma ed è richiesta per reclutare Dnm1 e non solo, anche Mdv1 e Caf4 ai mitocondri (Mozdy et al., 2000). Drp1 è una proteina essenziale per la fissione mitocondriale, contiene un dominio GTPasico all'estremità N-terminale, un dominio intermedio idrofilico e un dominio GED all'estremità C-terminale (GTPase effector domain) (Okamoto and Shaw, 2005). Diversi studi dimostrano che l'associazione di Drp1 ai mitocondri sia labile e dinamica, e che l'attività GTPasica sia essenziale per la fissione mitocondriale (Otsuga et al., 1998). Drp1 interagisce con se stessa, e l'oligomerizzazione è in parte mediata dal dominio GED (Fukushima et al., 2001). I mutanti Dnm1, nel lievito *S. cerevisiae*, presentano un unico mitocondrio interconnesso e a forma di rete (Yoon and McNiven, 2001).

Il meccanismo di fusione, utilizza un set di proteine effettrici evolutivamente conservate ma diverse da quelle di fissione. Tra queste ci sono le proteine transmembrana ad attività GTPasica Mfn1 e Mfn2 (Santel and Fuller, 2001).

Mfn è caratterizzata da un dominio N-terminale, ad attività GTPasica, simile a quello delle dinamine e un dominio C-terminale omologo a Fzo, il quale contiene un dominio transmembrana. In diversi esperimenti è stato visto che in alcune linee cellulari, la coespressione di Mfn2 e del dominante negativo di Drp1 risulta in mitocondri interconnessi e allungati (Santel and Fuller, 2001).

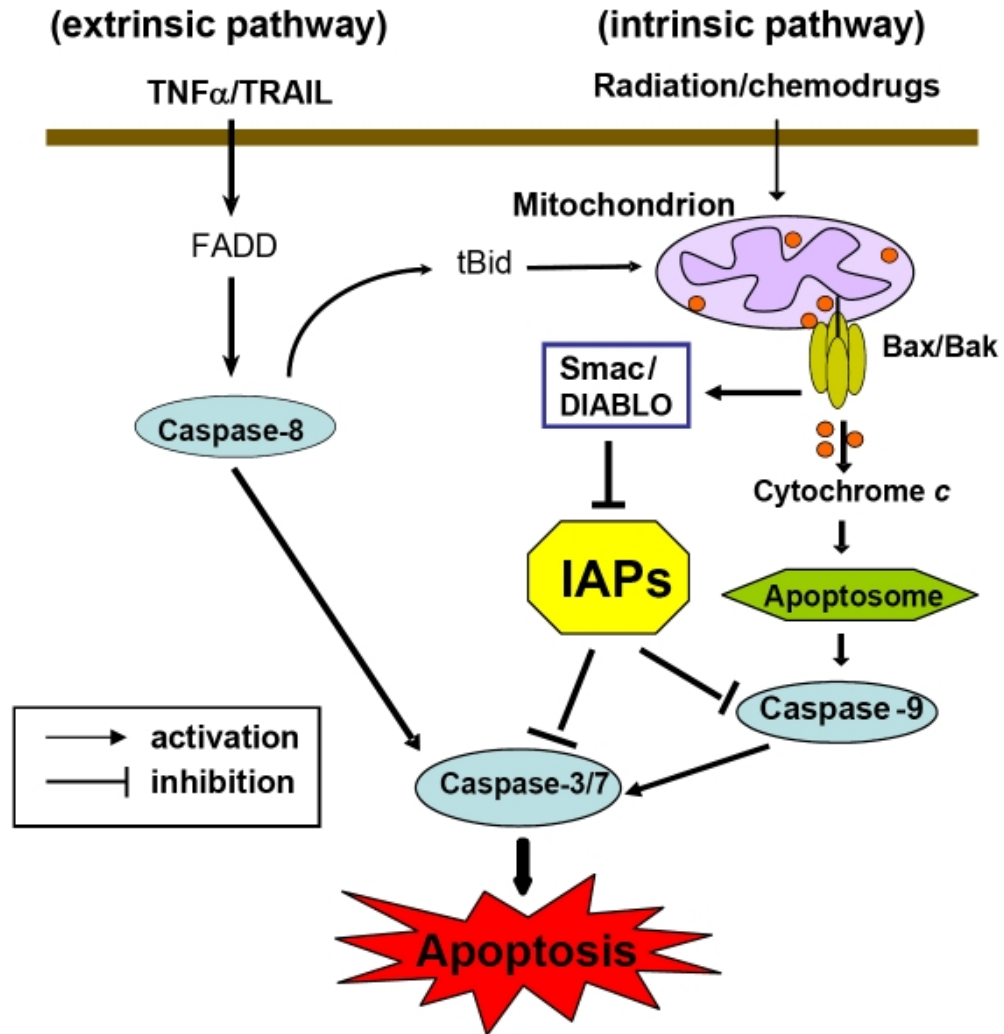
OPA1 è un altro fattore implicato nella fusione mitocondriale, si tratta di una proteina ad attività GTPasica. Nel lievito la delezione dell'ortologo di OPA1, MGM1, comporta un'estesa frammentazione mitocondriale, la perdita del DNA mitocondriale, una respirazione deficitaria ed un'abnorme struttura delle creste (Wong et al., 2000).

Infine, i mitocondri svolgono un ruolo centrale nell'attivazione e nel controllo della morte cellulare programmata (apoptosi); uno degli step dell'apoptosi infatti, è rappresentato dalla frammentazione (fissione) mitocondriale (Youle and Karbowski, 2005).

#### **4.4 Fusione, fissione e apoptosi**

I mitocondri *in vivo* vanno incontro a cicli continui di fusione e fissione e ciò rende omogenea la loro popolazione, con il mantenimento di una corretta funzionalità mitocondriale, quindi l'equilibrio tra fusione e fissione, rappresenta un requisito fondamentale per la sopravvivenza della cellula in quanto la sua completa inibizione provoca morte cellulare.

I mitocondri sono infatti coinvolti in ambedue le modalità di morte cellulare: la necrosi e l'apoptosi. Un fattore chiave della via apoptotica è il *citocromo c*, collocato nello spazio intermembrana, elettrostaticamente associato alla citocromo c reduttasi, alla citocromo c ossidasi e alla cardiolipina (lipide asimmetricamente distribuito sulla faccia interna della m.m.i.). Il rilascio del citocromo c nel citoplasma determina la fase finale dell'apoptosi attraverso l'attivazione di particolari enzimi proteolitici definiti caspasi (Acehan et al., 2002). Il mantenimento dell'integrità funzionale e strutturale della membrana mitocondriale interna ed esterna è dunque essenziale per impedire la fuoriuscita del citocromo c. La permeabilità della m.m.e. può essere alterata dall'inserimento di proteine appartenenti alla famiglia Bcl-2 in grado di formare pori. I membri antiapoptotici della famiglia Bcl2 tendono ad inibire il rilascio delle proteine mitocondriali, rilascio che viene favorito dai membri proapoptotici della famiglia, quali Bid, Bax, Bad (Korsmeyer et al., 1999). I principali attivatori della via intrinseca apoptotica sono le proteine della famiglia Bcl2 ed i fattori di rilascio mitocondriali, quali il citocromo c, l'apoptosis inducing factor (AIF) e la proteina Smac/DIABLO (Yao et al., 2009) (figura 11).



**Figura 11:** Ruolo dei mitocondri nei processi apoptotici. (Yao et al., 2009).

L’inserimento delle proteine formanti pori può spiegare il passaggio di piccole proteine, quali il citocromo c, ma non rende conto della fuoriuscita di proteine più grandi o di complessi di proteine, quali si osservano durante l’apoptosi. A tali fenomeni appare contribuire in modo determinante il poro di transizione della permeabilità mitocondriale (PTP). La sua struttura non è ancora stata identificata ma si ipotizza che esso consista in un canale  $\text{Ca}^{2+}$  dipendente, voltaggio dipendente e ciclosporina A (CsA) sensibile, del diametro di 3 nm situato a livello della membrana mitocondriale interna. L’apertura del PTP determina profonde alterazioni del metabolismo energetico, quali disaccoppiamento della fosforilazione ossidativa e deplezione dell’ATP, condizioni che rendono difficile la sopravvivenza cellulare (Solange Desagher and Jean-Claude Martinou, 2000), ma totalmente recuperabile se il poro si chiude (Halestrap, 2006).

L’apoptosi, unitamente alla necrosi, viene innescata da una serie di fattori. Fra gli altri la produzione di un elevato livello di radicali liberi, denominati “reactive oxygen species”

(ROS). Ad esempio nell'ischemia miocardica, causata da una diminuzione del flusso sanguigno e da un conseguente ridotto apporto di ossigeno, si verificano drastiche modifiche del metabolismo con conseguente accumulo di radicali liberi nelle regioni interessate. Un importante bersaglio delle ROS nel danno ischemico sono i mitocondri che rappresentano anche il principale sito di produzione di queste molecole all'interno della cellula. L'inibizione della catena respiratoria mitocondriale favorisce infatti la formazione delle ROS. Un'ulteriore fonte delle ROS sono le monoaminossidasi (MAO), enzimi localizzati a livello della m.m.e. che, catalizzando l'ossidazione delle ammine biogene, hanno come prodotto di reazione fisiologico il perossido di idrogeno ( $H_2O_2$ ). Le ROS, ed in particolare il radicale idrossile, sono dannosi per la loro capacità di interagire con moltissime macromolecole come lipidi, DNA e proteine.

I mitocondri, come già detto in precedenza, sono costituiti da una membrana esterna e da una membrana interna, separate da uno spazio intermembrana. La membrana mitocondriale esterna interagisce mediante l'interfaccia con il citoplasma e con gli elementi citoscheletrici importanti per il movimento dei mitocondri all'interno della cellula. Questa mobilità è essenziale per la distribuzione dei mitocondri durante la divisione cellulare e per posizionare i mitocondri in regioni cellulari ad intensa domanda energetica. I mitocondri scivolano lungo i filamenti d'actina usando chinesine e dineine dipendenti dall'idrolisi di ATP. La morfologia dei mitocondri è invece il risultato dei processi di fusione e fissione, controllati da una serie di proteine i cui livelli e funzioni sembrano influenzare le vie mitocondriali di morte cellulare.

I processi di fusione e fissione mitocondriali sono anche strettamente connessi ad eventi importanti dell'apoptosi. Infatti nella maggior parte delle tipologie cellulari i mitocondri sono organizzati all'interno di una rete di organelli, ma già all'inizio del processo apoptotico tale rete tende a frammentarsi (Frank et al., 2001). Questi cambiamenti morfologici mitocondriali sembrano essere rilevanti per il rilascio del citocromo c e di altre proteine proapoptotiche che una volta nel citosol stimolano l'attivazione delle caspasi (Cereghetti et al., 2006). Questo rilascio è controllato dalle proteine della famiglia Bcl2, che comprende proteine anti- e proapoptotiche (Danial et al., 2004). Non è chiaro come fisicamente interagiscano le proteine coinvolte nel rimodellamento mitocondriale con le Bcl2, ma studi di sovraespressione dimostrano che le mitofusine interagiscono con Bax e Bak, due proteine proapoptotiche appartenenti alla famiglia Bcl2 (Neuspiel et al., 2005; Sugioka et al., 2004).

Recenti studi nell'ambito delle membrane mitocondriali hanno portato a considerare la relazione tra i processi di fusione e fissione mitocondriale ed il poro di transizione della membrana mitocondriale (PTP). L'apertura del PTP determina una profonda alterazione del

metabolismo energetico in quanto provoca la depolarizzazione della membrana mitocondriale ed una deplezione nei livelli di produzione di ATP. Si verifica, inoltre, un processo definito swelling (rigonfiamento) della matrice: con l'apertura del PTP si verifica l'ingresso di soluti e di acqua nella matrice mitocondriale. Il rigonfiamento di questo spazio determina un'espansione della m.m.i., la quale, avendo una superficie maggiore alla m.m.e., non può più essere contenuta da questa, determinandone la rottura. L'apertura del PTP viene oggi comunemente ritenuto un evento determinante nella morte cellulare sia per apoptosi, sia per necrosi (Bernardi et al., 2006). La riorganizzazione delle creste a livello della m.m.i permette il rilascio di componenti a basso peso molecolare quali citocromo c ed AIF (apoptotic inducing factor), tra i maggiori attivatori della via di morte cellulare (Susin et al., 1996). Il citocromo c, come già detto, è una proteina fondamentale per la catena di trasporto degli elettroni ed è localizzata normalmente nello spazio intermembrana dei mitocondri ed il suo rilascio sembra subordinato al rimodellamento delle creste (Scorrano et al., 2003; Scorrano et al., 2002). Il meccanismo molecolare alla base di tale rilascio non è ben conosciuto ed è anche associato al rigonfiamento della matrice (Mannella, 2006; Scorrano et al., 2002). Le proteine della famiglia Bcl2 hanno mostrato interazioni con le proteine che formano il poro e che regolano il rilascio del citocromo c e di altri fattori proapoptotici come AIF (Lorenzo et al., 1999).

Le proteine della famiglia Bcl2 inoltre colocalizzano con numerose proteine di fusione e recenti evidenze indicano che i fattori che promuovono la fusione sono antiapoptotici, mentre quelli che promuovono la fissione sono proapoptotici (Delivani et al., 2006; Estaquier et al., 2006).

#### **4.5 Proteine di fissione mitocondriale: Drp1 e Fis1**

Drp1 è una grande proteina ad attività GTPasica che oligomerizza grazie all'idrolisi del GTP, in tal modo forma una spirale a livello del sito di scissione. A tal riguardo, mutazioni che impediscono l'idrolisi del GTP, generano mitocondri dalla forma allungata ed interconnessi; inoltre la concentrazione di Drp1 in questi mutanti risulta molto bassa (Santel et al., 2001). È stato proposto che l'attività GTPasica sia accoppiata al meccanismo di curvatura della membrana mitocondriale e di fissione. Un'altra ipotesi riguardante Drp1 è che utilizzi l'idrolisi del GTP come meccanismo regolatorio per l'attivazione di altre proteine non ancora identificate. Drp1 risiede normalmente a livello citoplasmatico ed è priva di sequenze di ancoraggio mitocondriale (Dimmer et al., 2006). Come già detto, viene reclutata sul lato della membrana mitocondriale esterna attraverso il legame con Fis, una piccola proteina di fissione mitocondriale costituita da un' $\alpha$ -elica transmembrana al C-terminale. Un aumento di Fis

induce una frammentazione mitocondriale e rilascio di citocromo c, suggerendo che la fissione mitocondriale stimoli anche l'apoptosi (James et al., 2003; Lee et al., 2004). Sembra che Fis1 svolga un ruolo di adattatore nella formazione di complessi oligomerici ad alto peso molecolare di Drp1. La traslocazione di Drp1 è mediata da vari stimoli, quali ad esempio la defosforilazione del residuo serinico 637 da parte dell'enzima calcineurina (Cereghetti et al., 2008). Secondo un recente modello Drp1 si associa in anelli o spirali intorno al tubulo mitocondriale, dove si racchiude strettamente inducendo la frammentazione del mitocondrio. Il meccanismo alla base del processo di fissione della membrana mitocondriale interna non è ancora stato caratterizzato ma potrebbe coinvolgere altre proteine, quali MD433 nel lievito. Nonostante sia ipotizzabile che ci sia un meccanismo di coordinazione tra attivazione di fusione e fissione mitocondriale, la fusione si avvale di un distinto gruppo di molecole effettrici.

#### **4.6 Mitofusina**

Le mitofusine (Mfn1 e 2) hanno un ruolo essenziale nei processi di fusione dei vertebrati contribuendo al corretto sviluppo morfologico e funzionale dei mitocondri (Santel and Fuller, 2001). Il ruolo protettivo della fusione mitocondriale è dimostrato dal fatto che organelli danneggiati riguadagnano la loro piena funzionalità quando si fondono con mitocondri integri e funzionali. Nelle cellule deficienti in Mfn queste fusioni avvengono in maniera molto ridotta. Senza la fusione mitocondriale le differenze casuali fra singoli mitocondri possono accumularsi ed interessare la funzionalità della cellula (Chen et al., 2003). Infatti, mentre in colture di fibroblasti deficienti in Mfn la massa di mitocondri mostra normali livelli di respirazione ed accoppiamento, misurati con l'elettrodo di Clark, quando si misurano singoli mitocondri, si evidenzia che molte cellule contengono una percentuale di mitocondri non funzionali con perdita del potenziale di membrana. Inoltre, l'uso di coloranti sensibili al potenziale di membrana ha dimostrato che si hanno perdite occasionali e transitorie di potenziale in regioni ristrette del mitocondrio (Loew, 1999). Le mitofusine hanno sia funzioni sovrapponibili che differenti, ad esempio diverse espressioni nei tessuti (Santel et al., 2003).

Mfn2 è una proteina transmembrana con i domini N-terminale e C-terminale esposti verso il citosol; la delezione del dominio transmembrana e del dominio C-terminale porta ad una forma tronca di mitofusina localizzata nel citosol. La fusione dei mitocondri si verifica in molti tipi di cellule, Mfn2 gioca un ruolo centrale nel metabolismo mitocondriale e potrebbe essere associata con il processo apoptotico e con l'obesità, infatti la riduzione dell'espressione



della Mfn2 potrebbe spiegare in questo modo la presenza di alterazioni metaboliche associate all'obesità (Bach et al., 2003; Lionetti et al., 2014).

La Mfn2 overespressa provoca un significativo incremento del diametro mitocondriale che arriva fino a 1µm. Anche la struttura interna è danneggiata: mentre le creste mitocondriali appaiono normali nei mitocondri più piccoli, sono gonfie nei mitocondri di media taglia e sono difficili da identificare nei mitocondri più grandi. Questo potrebbe portare ad una rilocalizzazione delle creste della membrana interna alla periferia nei mitocondri grandi (Rojo et al., 2002).

Cellule con mancanza di fusione hanno i processi respiratori compromessi (Chen et al., 2005) e la dinamica mitocondriale svolge il ruolo di regolare l'attività di trasporto degli e<sup>-</sup> (Yu et al., 2006), dimostrando ancora una volta gli stretti e complicati rapporti fra forma e funzione.

Anche l'overespressione di Mfn2 induce in epatociti in coltura, per circa il 50%, la formazione di mitocondri tubulari un po' più lunghi del normale e per l'altro 50% un ammasso di mitocondri strettamente raggruppati in regione perinucleare. Quest'ammasso indotto dalla Mfn2 era formato dall'aggregazione di piccoli mitocondri frammentati, che presentavano un abbassamento del potenziale di membrana e rilasciavano citocromo c innescando l'apoptosi. Tali piccoli mitocondri sono il risultato dell'espressione di Drp1 che prevale sulla fusione bloccata con un effetto dominante negativo dalla sovraespressione di Mfn2. Questi differenti aspetti che i mitocondri assumono fanno ipotizzare che la morfologia mitocondriale può essere considerata come un fattore che controlla la loro funzionalità.

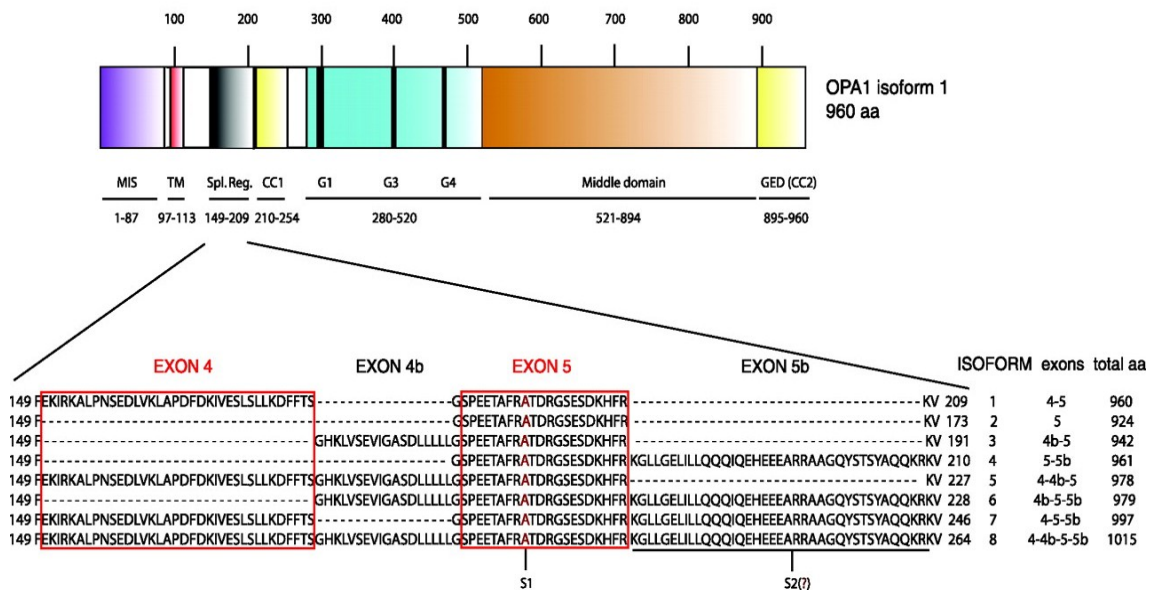
#### **4.7 OPA1**

OPA1 è una GTPasi di 120 KDa localizzata nella m.m.i. e nello spazio intermembrana (Olichon et al., 2003). OPA1 è il prodotto del gene che se mutato è responsabile dell'atrofia ottica dominante ereditaria (ADOA) conosciuta anche come malattia di Kjer di tipo I, che colpisce maggiormente le cellule gangliari della retina e causa progressiva cecità dovuta alla perdita di queste cellule (Amati-Bonneau et al., 2009). OPA1 è mutata nel 90% dei casi di atrofia ottica dominante e la maggior parte dei pazienti presenta mutazioni del dominio GTPasico, della regione coiled coil della proteina. Il 50% delle mutazioni identificate portano alla generazione di una proteina tronca e ciò fa ipotizzare che l'aploinsufficienza sia la causa della malattia (Ferrè et al., 2005). Inoltre l'alta frequenza di mutazioni non senso negli ultimi tre esoni porta alla formazione di proteine tronche in grado di agire da dominanti negativi.

Il gene che codifica per OPA1 è composto da 30 esoni che, mediante splicing alternativo degli esoni 4, 4b e 5b, determinano l'espressione di almeno 8 isoforme di mRNA con modalità tessuto specifica nell'uomo (Delettre et al., 2002) (figura 12) e di 4 isoforme nel topo (Akepati et al., 2008).

La proteina tradotta contiene delle sequenze di indirizzamento alla matrice mitocondriale (mitochondrial targeting sequences, MTS) che precedono il dominio transmembrana della proteina e che sono necessarie per il passaggio della proteina, codificata a livello nucleare, in matrice. Le sequenze MTS vengono clivate nella matrice ad opera di peptidasi mitocondriali e le risultanti isoforme lunghe della proteina rimangono ancorate alla m.m.i. La proteina è costituita da cinque domini principali: la sequenza di indirizzamento MTS, una regione transmembrana (HD), il dominio GTPasico, la regione centrale ed un dominio coiled coil al C-terminale.

La regione centrale della dinamina ricopre un ruolo di regolazione dell'attività GTPasica e i domini coiled coil sono implicati nelle interazioni con altre proteine.



**Figura 12:** Domini e motivi individuati nella proteina di fusione mitocondriale umana Opa. (Liesa et al., 2009)

Le diverse isoforme hanno un pattern di espressione variabile nei differenti tessuti e cellule. In particolare nel cuore predominano le isoforme contenenti l'esone 4 (Olichon et al., 2007). *In vivo* si ha il clivaggio a livello dei siti S1 ed S2 delle isoforme lunghe di OPA1, generando così più isoforme corte con diverse funzioni. Sono state identificate diverse proteasi coinvolte nel processamento di tale proteina. La proteasi YME1L1, appartenente alla famiglia delle AAA-proteasi (ATPase associated with diverse cellular activities) e presente

nello spazio intermembrana dei mitocondri, regola il clivaggio al sito S2. A livello del sito S1 risultano invece coinvolte AAA-proteasi di matrice (paraplegina, AFG3L1, AFG3L2) e la proteasi romboide PARL (romboide presenilin-associated rhomboid-like protease). Più recentemente è stata scoperta la peptidasi OPA1, che, a livello della m.m.i., media il processamento di OPA1 quando le AAA-proteasi sono assenti o inattive (Ehstes et al., 2009). Data l'identificazione di diverse isoforme di OPA1, si ipotizza che la proteina sia bi o multi-funzione e che per questo motivo la sua attività dipenda da quale isoforma predomina, l'isoforma lunga OPA1-L di ~100 KDa e l'isoforma corta OPA1-S di ~80 KDa (Scorrano et al., 2002).

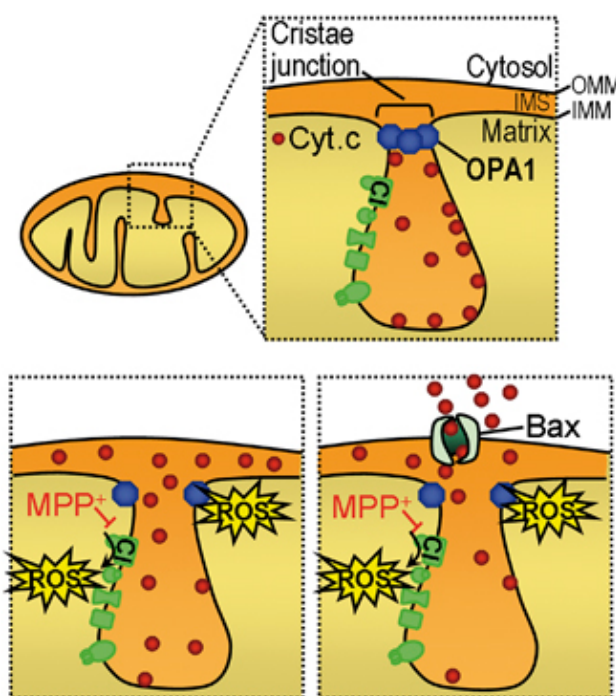
#### **4.7.1 Funzioni della proteina OPA1**

La proteina OPA1 è coinvolta in molteplici processi cellulari, quali: la fusione della m.m.i., il rimodellamento delle creste mitocondriali ed il processo di apoptosi. La mancanza della proteina OPA1 provoca frammentazione della rete mitocondriale. Un recente lavoro ha dimostrato che in una linea cellulare knock-out per OPA1, il fenotipo viene ripristinato in seguito all'espressione dell'isoforma 1 della proteina (Alexander et al., 2000). L'espressione di OPA1 promuove quindi il processo di fusione mitocondriale che avviene grazie al dominio GTPasico e al C-terminale coiled coil. La necessità del dominio coiled coil suggerisce che le interazioni proteina-proteina siano importanti per la fusione mediata da OPA1. OPA1 sembra agire da fattore di fusione mitocondriale interagendo con le proteine di fusione della membrana esterna, ed in particolare con Mfn-1 (Cipolat et al., 2004).

È stato inoltre identificato il ruolo di OPA1 nel controllo della via mitocondriale delle creste in corso di apoptosi. Recentemente è stato infatti scoperto che OPA1 è in grado di ritardare la morte cellulare programmata indipendentemente dal suo effetto fusogeno. Quest'inibizione dipende dal dominio GTPasico di OPA1 e si esercita a livello della mobilizzazione del citocromo c dalle creste allo spazio intermembrana. Le creste presentano alla loro base giunzioni tubulari il cui mantenimento correla con la formazione di oligomeri che, in corso di apoptosi sono rapidamente destabilizzati (Frezza et al., 2006). Tali oligomeri comprendono una forma solubile di OPA1, liberata nello spazio intermembrana e generata in seguito al clivaggio delle isoforme lunghe di OPA1 da parte della proteasi PARL (Cipolat et al., 2004). Questi risultati suggeriscono che interferendo con la funzione GTPasica di OPA1, necessaria per la sua azione antiapoptotica, sia possibile aumentare il rilascio di citocromo c. Inoltre riguardo al processo di apoptosi, OPA1 sembra interagire con effettori apoptotici come ad esempio Bid, una proteina della famiglia delle Bcl2 (Frezza et al., 2006). Il meccanismo di

assemblaggio e disassemblaggio degli ologomeri di OPA1 rimane ancora incompreso (Yamaguchi and Perkins, 2009). Il coinvolgimento di OPA1 in tale processo è provato dal fatto che il silenziamento di OPA1 mediante RNA interfering ha un profondo impatto sulla vitalità delle cellule e causa la frammentazione mitocondriale, la dissipazione del potenziale di membrana mitocondriale, cambiamenti ultrastrutturali e morte cellulare (Chen et al., 2005; Cipolat et al., 2004; Griparic et al., 2004; Olichon et al., 2003).

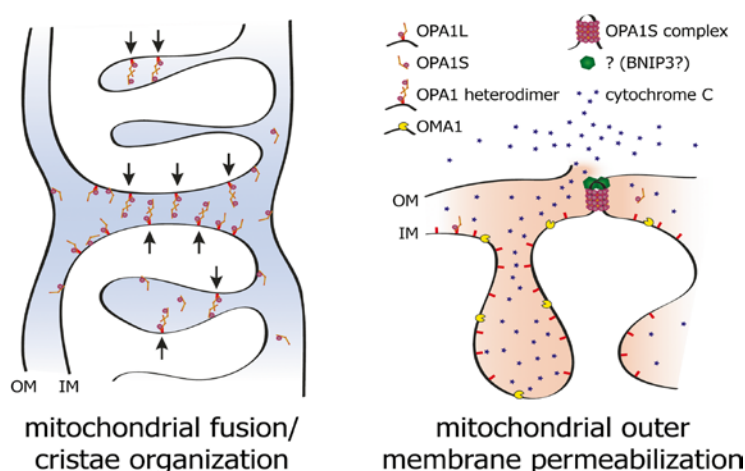
In uno studio del 2012, Ramonet et al., riportano la disoligomerizzazione di OPA1 collegata all'inibizione del complesso I dipendente da un'aumentata produzione di ROS mitocondriale (figura 13), suggerendo che OPA1 può essere un obiettivo di stress ossidativo mitocondriale dal momento che le ROS portano alla disoligomerizzazione di OPA1, all'apertura delle giunzioni delle creste, alla perossidazione dei fosfolipidi della m.m.i. come la cardiolipina, a cui il citocromo c è normalmente legato, con conseguente liberazione del citocromo c nel citosol.



**Figura 13:** Rappresentazione schematica del meccanismo proposto di mobilitazione del citocromo c OPA1-dipendente legata a inibizione complesso I. (Ramonet et al., 2012).

Anche secondo Alavi et al., (2013), OPA1-L e la forma solubile OPA1-S formano un complesso legato alla m.m.i. che è in grado di tenere chiuse le creste. Il clivaggio proteolitico di OPA1-L a OPA1-S solubile, permetterebbe, inoltre, la formazione di un complesso OPA1-S, che probabilmente insieme con un altro fattore, BNIP3, promuoverebbe la permeabilizzazione della membrana mitocondriale esterna, rilascio del citocromo, e morte

cellulare portando la membrana mitocondriale interna in prossimità della membrana mitocondriale esterna, facilitando in tal modo gli stati di emi-fusione delle membrane che sono energeticamente favorevoli per la permeabilizzazione della membrana (figura 14).



**Figura 14:** Modello molecolare della duplice funzione di OPA1 nella fusione della membrana mitocondriale interna (IM) e nel rilascio del citocromo C con conseguente morte cellulare. (Alavi et al., 2013).

#### 4.8 Mitochondri e fertilità

Gli spermatozoi hanno il ruolo di raggiungere l'ovocita e fecondarlo. Si presentano con un volume ridotto grazie alla rimozione di tutte le strutture superflue, ad eccezione di quelle essenziali, come i mitocondri. I mitocondri assicurano il movimento flagellare, grazie all'energia fornita dall'idrolisi dell'ATP (Ford, 2006; Turner et al., 2006).

Eventuali alterazioni o danni a livello dei mitocondri hanno un effetto negativo sulla funzionalità dei gameti maschili. Nei soggetti in cui gli spermatozoi hanno una funzionalità ridotta è stato osservato un collo più corto; a livello molecolare il difetto è stato identificato in una riduzione dell'attività dei complessi I, II e IV della catena respiratoria mitocondriale (Ruiz-Pesini et al., 1998).

In particolare, è stato osservato che una riduzione della funzionalità spermatica è accompagnata da una riduzione della funzionalità mitocondriale e che esiste, addirittura, una correlazione tra la percentuale di motilità e funzionalità mitocondriale (Ferramosca et al., 2012). Un aumento della motilità degli spermatozoi sembrerebbe richiedere un incremento della capacità respiratoria mitocondriale.

In bibliografia ho trovato un solo lavoro sulla dinamica mitocondriale effettuato nel testicolo dei mammiferi in animali selvatici (Honda e Hirose, 2003). Negli invertebrati, in

*Drosophila* uno studio ha descritto ampiamente la morfogenesi mitocondriale e la loro riorganizzazione durante la spermatogenesi con la formazione, a partire da piccoli mitocondri che si aggregano e poi si fondono, del Nebenkern costituito da due derivati mitocondriali, che si avvolgono l'un l'altro (Fuller et al., 1993). Successivamente i mitocondri si distribuiscono lungo l'assonema e Drp1 è fondamentale in questo passaggio, perchè attraverso l'idrolisi del GTP permette ai derivati mitocondriali di separarsi. È stata rilevata una maggiore espressione di Drp1 proprio alla fine della fase a cipolla negli spermatidi rotondi; è in questo stadio che la proteina risulta essere fondamentale per la rottura dei collegamenti tra i due derivati mitocondriali (Aldridge et al., 2007).

## Capitolo 5

---

### Materiali e metodi

## 5 MATERIALI E METODI

### 5.1 Modello sperimentale

Per effettuare i trattamenti programmati i ratti sono stati suddivisi in gruppi, a cui è stato somministrato oralmente DDE, ad eccezione degli esemplari usati come controllo. Il disegno sperimentale ha previsto trattamenti *in vitro* ed *in vivo*.

**a) Esperimenti *in vitro*.** Sono stati eseguiti per valutare l'effetto acuto di 157 nmol/mg di DDE (tale dose è stata scelta perchè in precedenti studi era stata indicata come dose end-point per l'effetto del DDE sui mitocondri) (Mota et al., 2011), sulla funzionalità di mitocondri isolati dagli epatociti o dal testicolo. Simultaneamente sono stati misurati i parametri respiratori di mitocondri non trattati, usati come controllo.

**b) Esperimenti *in vivo*.** Come modelli sperimentali, sono stati utilizzati 32 ratti maschi Wistar di 60 giorni di età, del peso di circa 300g. Poichè l'esposizione al DDE generalmente è il risultato dell'introduzione di bassi dosi attraverso il cibo, nel mio studio ho scelto di somministrare DDE a dosi basse in particolare a 10 mg/kg pc. È da precisare che tale dose di 10 mg/Kg pc corrisponde all'assunzione giornaliera accettabile (ADI= acceptable daily intake). Inoltre, è stato già riportato che la somministrazione di tale dose per via orale per 6 settimane non influenza lo sviluppo fisico, la maturazione sessuale e parametri metabolici serici in ratti maschi durante il periodo puberale e quando somministrata per 4 settimane a ratti anziani non produce segni di tossicità. In base a questi dati riportati in letteratura nel mio lavoro di tesi, il disegno sperimentale ha previsto misurazioni della funzionalità mitocondriale somministrando ai ratti il DDE nella dose di 10 mg/kg pc per un periodo di 4 settimane.

I ratti sono stati suddivisi in 4 gruppi di trattamento, costituiti ciascuno da 8 animali:

- **Gruppo di ratti N:** sottoposti ad un trattamento con dieta standard di laboratorio.
- **Gruppo di ratti D:** sottoposti ad un trattamento con dieta ad elevato contenuto di grassi, ricca in lardo (40%).
- **Gruppo di ratti D+DDE:** sottoposti ad un trattamento con dieta ad elevato contenuto di grassi, ricca in lardo (40%) a cui veniva somministrata una dose di DDE pari a 10mg/kg di peso corporeo.



- **Gruppo di ratti N+DDE:** sottoposti ad un trattamento con dieta standard di laboratorio a cui veniva somministrata una dose di DDE pari a 10mg/kg di peso corporeo.

Il contenuto energetico della dieta standard di laboratorio somministrato ai ratti N e N+DDE è di 15,47 KJ/g, mentre il contenuto energetico delle diete iperlipidiche somministrate ai ratti D e D+DDE è di 19,23 KJ/g. Il DDE è stato disciolto in una piccola quantità di olio di mais, ben miscelato e somministrato per via orale. La stessa quantità di olio di mais è stata somministrata giornalmente anche ai gruppi di ratti non sottoposti a trattamento con il DDE.

Tutti i ratti sono stati stabulati individualmente, acclimatati in una stanza a temperatura controllata (24°C) e sottoposti ad un ciclo circadiano luce-buio (12 ore luce /12 ore buio).

Durante il periodo di trattamento sono stati controllati sia il peso corporeo che la quantità di cibo introdotta, sottraendo dalla quantità aggiunta giornalmente quella lasciata e quella eventualmente caduta nella gabbia durante il pasto. Alla fine del periodo sperimentale i ratti sono stati anestetizzati mediante un'iniezione intraperitoneale di cloralio idrato (40mg/100g di peso corporeo) e sono stati sacrificati mediante decapitazione.

Trattamento, stabulazione e sacrificio degli animali sono stati eseguiti in conformità alle linee guida del Ministero della Sanità Italiana.

	<b>Dieta controllo</b>	<b>Dieta iperlipidica</b>
		<i>g/100g dieta</i>
<b>Energia (KJ/g)</b>	15,47	19,23
<b>Proteine %</b>	29	29
<b>Lipidi %</b>	10	45
<b>Carboidrati %</b>	61	26

## 5.2 Prelievo e preparazione dei campioni

La preparazione dei campioni atti alle valutazioni istologiche ha previsto innanzitutto il *prelievo* del fegato e del testicolo. Degli organi prelevati, una parte è stata congelata in azoto liquido e poi conservata a  $-80^{\circ}\text{C}$ , e l'altra è stata posta nel fissativo Bouin o Carnoy per il fegato e Bouin per il testicolo, per i campioni da usare in microscopia ottica oppure in gluteraldeide per i campioni da usare in microscopia elettronica. Dal campione incluso in paraffina per la microscopia ottica o in epon per la microscopia elettronica, sono state ricavate sezioni utilizzate per diversi tipi di colorazione o per effettuare reazioni immunoistochimiche.

## 5.3 Reazione immunoistochimica

Dal campione incluso in paraffina, sono state ricavate sezioni spesse  $5\ \mu\text{m}$ , le quali, distese su vetrini, sono state utilizzate per diversi tipi di colorazione o per effettuare reazioni immunoistochimiche.

La reazione immunoistochimica da me utilizzata è basata sulla metodica PAP (perossidasi-antiperossidasi) e quella basata sull'uso di polimeri. Questa tecnica permette di rilevare la presenza di determinate proteine mediante il legame di anticorpi specifici. A questi ultimi si legano, poi, anticorpi secondari i quali legano a loro volta o il complesso per ossidasi-antiperossidasi o polimeri di destrano a cui sono legati gli anticorpi secondari e gli enzimi con attività perossidasi. Questi enzimi agiscono sul perossido d'idrogeno e su un donatore di elettroni quale il cromogeno DAB (3,3'-diaminobenzidina), permettendo lo sviluppo di colore laddove è avvenuto il legame.

Prima di iniziare, i vetrini sono stati posti in stufa per 1 ora a  $60^{\circ}\text{C}$  per migliorare l'aderenza delle sezioni sul vetrino stesso. A seconda degli anticorpi usati, i vetrini possono essere incubati in tampone citrato a  $70^{\circ}\text{C}$  in microonde. Questa metodica consente lo smascheramento degli antigeni, laddove questi fossero stati modificati durante la fissazione. Successivamente le sezioni sono state sparaffinate, idratate e circondate mediante l'utilizzo di una PAP-pen. Su ogni sezione è stata posta una piccola quantità di *peroxidase block* (perossido d'idrogeno al 6% che consente di inattivare l'attività perossidasi endogena presente nel tessuto) per 5 minuti. Successivamente, le sezioni istologiche sono state incubate per 5 minuti con protein block o BSA (albumina di siero bovino) che inibisce un'eccessiva reattività di fondo dovuta ad un legame non specifico degli anticorpi primari con proteine particolarmente reattive (es. collagene che posseggono siti di interazione per una grande

quantità di proteine). A questo punto le sezioni sono state incubate overnight a 4°C con un determinato anticorpo primario diluito in PBS.

Il giorno seguente, è stata posta su ogni fetta di tessuto una goccia di post-primay block per 30 minuti, al fine di migliorare l'efficienza di legame tra l'anticorpo primario e il successivo secondario. È stato eseguito poi ancora un lavaggio in PBS dei vetrini per 8 minuti. A questo punto, viene aggiunto il novolink-polymer, costituito da un polimero di destrano a cui sono legate numerose molecole sia di Ab secondario, sia di enzima perossidasi. Per la rilevazione della perossidasi, e quindi del legame degli anticorpi secondari ai primari, è stato utilizzato il cromogeno DAB (diamminobenzidina), attivato dall'aggiunta di soluzione substrato contenente acqua ossigenata al 3%. Inizialmente la perossidasi forma un complesso con il perossido d'idrogeno che reagisce con il donatore d'elettroni, il DAB. Quest'ultimo si ossida e lo shift dei doppi legami sulla molecola, le consente di spostare il suo spettro di assorbimento nella radiazione rossa consentendo la formazione di un precipitato di colore rosso-mattone a livello dei siti in cui è avvenuta la reazione. I vetrini, disidratate le sezioni, sono stati infine montati con vetrino coprioggetto e osservate al microscopio ottico per poi acquisirne le immagini digitali al microscopio (mediante l'ausilio di software Zeiss Axiovision) collegato a una telecamera.

#### **5.4 Microscopia elettronica**

Il microscopio elettronico si basa essenzialmente sugli stessi principi di quello ottico ma fornisce ingrandimenti maggiori. I moderni microscopi riescono a raggiungere una risoluzione di circa 0,2 nm. La sorgente luminosa è sostituita da elettroni. Tali elettroni per essere utilizzati come mezzo di analisi di un preparato, sono sottoposti, appena lasciato un filamento metallico portato all'incandescenza, a una forte differenza di potenziale. Le lenti di vetro del microscopio ottico sono sostituite da campi magnetici, cioè sono costituite da un solenoide che crea un campo le cui linee di forza fanno convergere gli elettroni in un punto detto fuoco. Gli elettroni, per percorrere la distanza tra la sorgente, le lenti e lo schermo, non devono incontrare ostacoli materiali per cui l'ambiente interno al microscopio deve essere posto sotto vuoto. Poiché il materiale da esaminare è posto sotto vuoto (i raggi elettronici sono capaci di propagarsi solo nel vuoto e sono forniti di scarso potere penetrante) esso deve essere preventivamente fissato, disidratato e ridotto in fettine molto sottili e ciò impedisce l'uso del microscopio elettronico su preparati viventi. L'immagine fornita dal microscopio è invisibile all'occhio umano. Gli elettroni in parte assorbiti e in parte deviati dal campione, che deve essere di spessore ridotto e, opportunamente deviati dalle lenti, contribuiscono a formare

un'immagine su uno schermo fluorescente (cioè uno schermo che converte la radiazione elettronica, non visibile, in radiazione fotonica in luce verde, visibile) oppure impressionano una lastra fotografica. L'immagine fornita appare in bianco e nero con varie tonalità di grigio in corrispondenza della maggiore o minore trasparenza agli elettroni delle strutture cellulari.

Le cavie sono state sacrificate attraverso la dissezione anatomica e i tessuti di nostro interesse sono stati trattati al fine di analizzarli. Dopo l'espianto, è stato operato un sezionamento del tessuto mediante pinzette o forbici per evitare deformazioni del campione. Una volta selezionati, i campioni sono stati fissati in *Gluteraldeide* 2,5% in tampone fosfato di Millonig per 45'-60'. La *fissazione* ha il compito di mantenere inalterate, per quanto possibile, le caratteristiche strutturali del campione ed evitare stress chimici e fisici. Il fissativo più utilizzato per la microscopia elettronica è la *gluteraldeide*. Tale fissativo è adatto per tutti i campioni ma ha una lenta penetrazione nei tessuti. La soluzione madre di *gluteraldeide* va tenuta sempre in frigorifero a una temperatura di 4°C. È consigliabile preparare la soluzione in tampone non prima di 12 h dall'uso e conservarla in frigorifero a 4°C per evitare qualsiasi tipo di alterazione. La *gluteraldeide* è capace solo di fissare le strutture proteiche per cui occorre una seconda fissazione con tetrossido di osmio per preservare le strutture lipidiche e in particolar modo le membrane. Con una pipetta Pasteur si aspira la *gluteraldeide* presente nel contenitore in cui sono alloggiati i frammenti di tessuto e si sostituisce con il tampone che è stato usato per preparare il fissativo, si eseguono dei lavaggi e, alla fine si aggiunge una soluzione di tetrossido di osmio all'1-2% sempre preparata con il medesimo tampone lasciandolo agire per 1-2 h a temperatura ambiente.

Il passaggio successivo è la *disidratazione*, operando con dei passaggi in soluzione di cloruro di sodio allo 0,5% per 10' e poi in soluzioni di alcool in una scala crescente di concentrazioni: 50, 70, 90 e 100%. È molto importante mantenere i campioni sempre bagnati da un minimo di liquido in modo che non secchino, alterandone la morfologia.

Dopo aver finito la disidratazione del campione, dobbiamo sostituire l'alcool con l'*ossido di propilene*. Con una pipetta Pasteur si toglie l'alcool di disidratazione e si inserisce l'ossido di propilene, facendo 3 passaggi di 5' ognuno. Nel frattempo si prepara una miscela di resina e ossido di propilene al 50% che verrà aggiunta al nostro campione dopo aver fatto i passaggi in ossido di propilene. La provetta contenente i nostri campioni dovrà essere tenuta aperta per tutta la notte a temperatura ambiente, in modo che l'ossido di propilene evapori lentamente, ottenendo un'infiltrazione del preparato in resina pura.

L'ultimo passaggio è l'*inclusione*, che permette di impregnare e "intrappolare" il campione in un materiale abbastanza duro e omogeneo tale da poter essere tagliato in fette molto sottili. Tale materiale è in genere costituito da resine; quelle più comunemente usate sono di tipo epossidico termoindurente, in particolare l'*Epon* e l'*Araldite*. Queste sostanze sono preparate partendo da soluzioni di monomeri, sostanze elasticizzanti che servono per migliorare la consistenza finale del polimero e da un acceleratore chimico per la reazione di polimerizzazione.

L'*Epon* è costituito da tre tipi diversi di sostanze:

- *Epon 812*
- *DDSA*(anidride dodecilsuccinica)
- *MNA*(anidride metilnadica)

Si versano in una bottiglia di plastica 24,25 mL di Epon 812, 9,25 mL DDSA e 16,5 mL MNA, per un volume totale di 50 mL; infine si aggiunge BDMA (benzidilmetilammine). La soluzione così ottenuta si pone su un agitatore meccanico che permette di ottenere una miscela perfetta: è importante ottenere una miscela omogenea in ogni sua parte in modo tale da ottenere un'impregnazione ottimale del campione.

A questo punto si preleva il campione dal contenitore in cui era stato prima posto con delle pinzette e si ripone nelle cellette di formelle. Una volta sistemato il campione in tali cellette, la formella si pone nella stufa per 3 giorni a 60°C.

#### **5.4.1 Semifini**

Il taglio delle sezioni fini per il microscopio elettronico è preceduto dalla preparazione di sezioni semifini, la cui osservazione al microscopio ottico permette di controllare la riuscita delle operazioni precedenti e selezionare i campi utili da destinare all'esame ultrastrutturale.

Per fare il taglio di semifini e fini si utilizza l'ultramicrotomo, in grado di eseguire sezioni da 1-3 µm sino a circa 60 nm di spessore. Quest'apparecchio ha un braccio che scorre dall'alto verso il basso, che a ogni giro si avvicina alla lama secondo un'impostazione micrometrica decisa dall'operatore, con un errore di pochi nm. Il campione, incluso in *Epon*, è fissato nel giusto spazio del braccio porta campione che a sua volta si pone nella slitta dell'ultramicrotomo.

Il primo passo da fare è la *sgrossatura* che consiste nell'eliminazione con una lametta o con la stessa lama della resina in eccesso sia intorno al tessuto sia eventualmente sopra fino a ottenere il totale scoperchiamento del campione. Queste e tutte le operazioni di taglio successive vanno eseguite con l'ausilio degli oculari stereoscopici dello strumento. Dopo la sgrossatura rendiamo piana la superficie del campione per far emergere in sezione tutta l'area del campione stesso. Per fare ciò usiamo una lama di vetro che preventivamente tagliamo con il taglialame. Una volta tagliato un numero sufficiente di sezioni, si raccolgono e si mettono su una goccia d'acqua preparata su un vetrino portaoggetti in modo tale da distendere le fette senza formare pieghe. I vetrini con le sezioni nella goccia d'acqua sono essiccati su una piastra riscaldante in modo che, evaporando l'acqua, le fettine aderiscano perfettamente al vetrino. Dopo che l'acqua è evaporata, sempre sulla piastra riscaldante, si aggiunge al campione una goccia di colorante e si fa stare per circa 1 minuto. Dopo di che si lava il colorante in eccesso con una spruzzetta per evitare la formazione di precipitati. Si fa asciugare nuovamente il vetrino sulla piastra riscaldante e le sezioni sono così pronte per l'osservazione al microscopio ottico per la selezione di aree d'interesse per l'indagine ultrastrutturale.

#### **5.4.2 Ultrasottili**

Una volta osservato la semifine e deciso la zona d'interesse, possiamo procedere al taglio delle sezioni fini.

Si riduce la superficie della piramide alla misura voluta utilizzando una lametta. La superficie di taglio non deve comunque superare le dimensioni di circa 2 mm<sup>2</sup>. La punta della piramide deve avere una forma trapezoidale o quadrata ed è importante che la piramide abbia due lati paralleli in modo tale da poterli allineare con il filo della lama durante l'avvicinamento e il taglio.

Il parallelismo del primo lato della piramide con il filo della lama che incontra è il più importante, perchè riduce gli effetti dell'attrito dati dall'impatto fra lama e campione; mentre il parallelismo del secondo lato permette il formarsi di un nastro di sezioni più facilmente raccogliabili sulla griglia.

Una volta fatta la piramide, il portacampione viene montato sul braccio rotante dell'ultramicrotomo. A questo punto si avvicina il più possibile la lama di diamante al pezzo senza toccare la punta della piramide e, con la micrometrica, guardando nell'oculare, si completa l'avvicinamento e s'inizia a tagliare. Spostiamo il braccio portacampione in basso in modo che non si corra il rischio di bagnare la punta della piramide e riempiamo la vaschetta della lama con acqua distillata in abbondanza fino a formare un menisco convesso, quindi con

l'aiuto di un ciglio si sparge l'acqua in modo che aderisca a tutta la vaschetta e bagni completamente la lama. Con una pipetta Pasteur si toglie l'acqua in eccesso fino ad avere la superficie della vaschetta completamente piatta e illuminata. Questo permette di visualizzare bene le sezioni e il loro colore e facilita inoltre il loro scorrimento nell'acqua evitando che intralcino il taglio.

Lo spessore delle fettine si può intuire anche dal colore delle fette: le fettine più sottili appaiono bianche-argentee, mentre, le più spesse appaiono dorate. Ottenuto un nastro costituito da un numero sufficiente di fettine, interrompiamo il taglio e con un ciglio stacciamo tale nastro dal filo della lama.

Con una pinzetta a punte sottili e antistatiche, prendiamo i retini di nichel o di rame rispettivamente per le fettine più spesse o per quelle più sottili e si pesca il nastro di fettine nella vaschetta in cui si alloggia la lama e contenente l'acqua. Una volta che le fette sono adese al retino, questo viene posto su carta assorbente con le sezioni rivolte verso l'alto in modo da eliminare l'acqua in eccesso. Dopo l'asciugatura all'aria per un po' di tempo, i retini sono conservati in un contenitore porta retini.

### 5.4.3 Colorazione

Per aumentare il contrasto delle diverse strutture cellulari al microscopio elettronico a trasmissione, si colorano le sezioni con sali di metalli pesanti, quali *acetato di uranile e citrato di piombo*. Si mettono due gocce di *acetato di uranile* su un pezzo di parafilm posizionato all'interno di una capsula Petri, si immerge il retino contenente le sezioni. Si copre la capsula Petri con un coperchio scuro in modo tale da non far penetrare la luce che può favorire la formazione di precipitati. I retini si tengono immersi per 10'-15' nell'*acetato di uranile*, poi con la pinzetta si prelevano e si lavano con acqua deionizzata e acqua bidistillata. Si pongono poi tali retini su carta da filtro. Quando asciughiamo le griglie, dobbiamo stare attenti a mantenere sempre la faccia dei retini con le fette rivolte verso l'alto, per evitare che tali fette siano rovinate dalla carta da filtro e per non curvare i retini.

La seconda fase della colorazione si esegue nella soluzione di *citrato di piombo*. Si versano 2-3 gocce di *citrato di piombo* sul parafilm e si inserisce il retino. Quando coloriamo con il *citrato di piombo*, dobbiamo mettere in un angolo della capsula Petri dell'idrossido di sodio in pasticche, il quale assorbe la CO<sub>2</sub> presente nella capsula Petri impedendo al *citrato di piombo* di precipitare sotto forma di carbonato di piombo. Si consiglia di far galleggiare i retini sulla goccia di piombo con la faccia su cui sono adese le fettine rivolta verso il basso limitando, per quanto possibile, la formazione di precipitati. Dopo 5'-10' si lavano

nuovamente i retini con acqua bidistillata, si lasciano asciugare un po' su carta da filtro e si pongono nel corretto porta retini per la conservazione. I retini così colorati sono osservati al microscopio elettronico collegato a una telecamera per poi acquisirne le immagini.

Tutte le immagini acquisite sono state altresì utilizzate per effettuare la misura del diametro dei mitocondri mediante l'ausilio del software Zeiss Axiovision.

### **5.5 Determinazione del contenuto epatico di trigliceridi**

L'estrazione dei lipidi dal fegato è stata effettuata mediante omogeneizzazione in una miscela di cloroformio-metanolo (2:1). L'omogenato è stato agitato a temperatura ambiente per 2 ore. La fase organica e la fase acquosa sono state separate mediante l'aggiunta di 0,2 volumi di NaCl e una successiva centrifugazione a 2400 rpm per 20 minuti a 21°C. La fase acquosa viene eliminata per aspirazione e l'interfaccia viene lavata con una miscela di cloroformio:metanolo: NaCl 0,58% . La fase lipidica così ottenuta viene posta in provette di vetro da cui si fa evaporare cloroformio. Sottraendo il peso della provetta vuota dal peso complessivo della provetta contenente i lipidi si ottiene il contenuto lipidico estratto dal tessuto. Questa valutazione, è servita per ottenere un dato importante sull'accumulo epatico di grasso dei singoli animali dei differenti 4 gruppi in trattamento.

### **5.6 Dosaggio proteico**

Il contenuto proteico della frazione mitocondriale è stato determinato con il metodo di Hartree (Lowry modificato), utilizzando l'albumina di siero bovino come proteina standard. Questo metodo combina la reazione del biuretto con la reazione di Folin-Ciocalteu. In condizioni alcaline lo ione rame bivalente forma un complesso con legami peptidici in cui si riduce ad uno ione monovalente. Ione monovalente rame ed i gruppi radicali di tirosina, triptofano e cisteina reagiscono con reagente Folin per produrre un prodotto instabile che diventano ridotti al blu di molibdeno/tungsteno. La modifica rispetto al metodo di Lowry consiste in un aumento della concentrazione di tartrato sodico-potassico e nella utilizzazione di temperature più elevate; ciò consente di ottenere una curva di taratura lineare per un più ampio intervallo di valori delle concentrazioni.

### **5.7 Misura dell'attività respiratoria nei mitocondri isolati**

I mitocondri sono stati utilizzati per valutare il consumo d'ossigeno polarograficamente, mediante l'utilizzo dell'elettrodo di Clark (Yellow Springs Instruments, Yellow Springs, Oh, USA). Tale elettrodo è costituito da un catodo di platino e da un anodo



d'argento, entrambi immersi in una soluzione di KCl (0,1 M) e separati dalla soluzione in esame, tramite una membrana di teflon, permeabile solo all'ossigeno. Quest'ultimo diffonde attraverso la membrana dalla soluzione presente nella camera di misura al compartimento dell'elettrodo. In tal modo, l'ossigeno al catodo si riduce e origina una corrente proporzionale all'attività dell'ossigeno presente in soluzione, nel momento in cui è applicato agli elettrodi un voltaggio di 0,5–0,8 volts. All'anodo, infatti, sono prodotti quattro elettroni a loro volta utilizzati per ridurre una molecola di ossigeno al catodo. La tensione di ossigeno al catodo, quindi, tende ad azzerarsi promuovendo la diffusione dell'ossigeno verso il catodo. L'elettrodo di Clark consente, quindi, di misurare i rapidi cambiamenti che si riscontrano nell'utilizzazione dell'ossigeno da parte dei sistemi cellulari e subcellulari. Le misure sono state realizzate in camere termostate ad una temperatura di 30°C utilizzando, per il fegato, un mezzo di incubazione contenente KCl 80 mM; Hepes 50 mM; EGTA 1 mM; K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 5 mM; pH 7; 0,1% (p/v) di BSA.

## **5.8 Determinazione dell'effetto del DDE *in vitro* sui mitocondri isolati**

In una prima fase sperimentale sono stati isolati i mitocondri dai ratti di controllo per effettuare misurazioni del consumo di ossigeno mitocondriale in assenza ed in presenza di DDE. Per effettuare le determinazioni in assenza di DDE, prima di procedere alla misura del consumo di ossigeno, i mitocondri sono indotti a consumare i substrati endogeni, mediante una preincubazione di qualche minuto, alla fine della quale sono aggiunti i substrati respiratori succinato (substrato del pathway respiratorio FADH<sub>2</sub>-linked) alla molarità 10 mM in presenza di rotenone (3,75 μM) per bloccare l'attività del complesso I della catena respiratoria al fine di determinare la capacità respiratoria mitocondriale del pathway FADH<sub>2</sub>-linked. Le misure sono state effettuate in assenza (Stato 4 o stato non fosforilante della respirazione) o in presenza (Stato 3 o stato fosforilante della respirazione) di 0,6 mM di ADP. In tal modo è stato possibile misurare il Rapporto del Controllo Respiratorio (RCR, velocità dello stato 3 diviso velocità stato 4) in accordo con il metodo di Estabrook, e pertanto verificare l'integrità dei mitocondri isolati. Il consumo di ossigeno è espresso in nmoli di O<sub>2</sub> al minuto per mg di proteine mitocondriali. Sono state condotte anche misurazioni in presenza di succinato, rotenone ed oligomicina (2,57 μM) per inibire l'ATP sintetasi e misurazione in presenza del disaccoppiante Carbonilcianuro-p-trifluoro-metossifenildrazone (FCCP) (1 μM). Tali misurazioni sono state utilizzate per determinare i parametri relativi al grado di accoppiamento (q) ed all'efficienza termodinamica (η) come indicato successivamente. Per misurare la massima capacità respiratoria in presenza di un substrato NADH-dipendente è

stata effettuata la misurazione della massima capacità respiratoria in presenza di glutammato (10 mM), malato (2,5 mM) e ADP (0,6 mM). È stata anche valutata la massima capacità della catena di trasporto respiratoria in presenza di acidi grassi utilizzando come substrato la palmitoilcarnitina (40 mM) in presenza di malato (2,5 mM) e e ADP (0,6 nM). Tutte le misurazioni precedentemente descritte sono state valutate anche in presenza di DDE. In questo caso, i mitocondri sono stati indotti a consumare i substrati endogeni, mediante una preincubazione di qualche minuto, alla fine della quale è stato aggiunto DDE (157 nmol/mg di proteine). Tale dose è stata scelta perchè in precedenti studi era stata indicata come dose endpoint per l'effetto del DDE su mitocondri isolati dal fegato. Dopo 2 minuti dall'aggiunta di DDE sono stati aggiunti i substrati come precedentemente riportato.

### 5.9 Determinazione di $q$ ed $\eta$

È stato determinato il grado di accoppiamento termodinamico e l'efficienza della fosforilazione ossidativa usando il metodo di Cairns. Il grado di accoppiamento termodinamico è espresso dalla costante  $q$ , calcolata attraverso la seguente equazione:

$$q = \left[ 1 - \left( J_{sh} / J_{unc} \right) \right]^{1/2}$$

dove  $J_{sh}$  rappresenta il consumo di ossigeno in presenza di oligomicina la quale inibisce l'ATP sintetasi, e  $J_{unc}$  indica il consumo di ossigeno in presenza di FCCP (disaccoppiante) che dissipa il gradiente protonico.

L'efficienza termodinamica ottimale è simboleggiata da  $\eta$  che è stata calcolata utilizzando la seguente equazione:

$$\eta = \frac{q^2}{(1 + \sqrt{(1 - q^2)^2})}$$

ovvero l'efficienza di conversione del substrato in energia.

### 5.10 Dosaggio Tbars

Le aldeidi prodotte dalla lipoperossidazione lipidica (come la malondialdeide, MDA) sono molecole chimicamente reattive e in grado di reagire formando legami covalenti con le proteine e gli acidi nucleici, perciò contribuiscono ad aumentare il danno radicalico; la loro misurazione può essere considerata un buon indice di lipoperossidazione lipidica. Il metodo più frequentemente utilizzato è il saggio con l'acido tiobarbiturico (TBA): in condizioni acide

e ad elevata temperatura (90-100°C) la MDA reagisce con il TBA. La concentrazione del composto che si forma (MDA-TBA addotto) è determinata con una lettura spettrofotometrica a 540-530 nm.

I campioni vengono preparati pesando 25 mg di tessuto e omogeneizzandoli in eppendorf con 250 µL di RIPA contenente inibitori di proteasi. Vengono, successivamente, centrifugati a 1600g per 10 minuti a 4°C, utilizzando il surnatante per la misura. Gli standard vengono invece preparati diluendo 250 µL di MDA standard con 750 µL di acqua ottenendo una soluzione stock di 125 µM da qui vengono preparati 8 differenti standard aggiungendo in ognuno concentrazioni differenti di MDA diluito:

STANDARD:	CONCENTRAZIONE MDA (µM)
A	0
B	0,625
C	1,25
D	2,5
E	5
F	10
G	25
H	50

La reazione (per 32 campioni) è stata innescata mescolando, in provette da 15 mL resistenti al calore:

- 4 mL di Color Reagente (ottenuta sciogliendo 530 mg di TBA in 50 mL di TBA Idrossido di Sodio e 50 mL di TBA Acido Acetico);
- 100 µL di campione o standard;
- 100 µL di SDS solution (Sodio-Dodecil-Solfato).

Le provette vengono centrifugate a 4°C e 1600g per 10 minuti e infine viene effettuata la lettura allo spettrofotometro alla lunghezza d'onda di 540 nm.

### **5.11 Analisi della produzione di H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> Mitocondriale**

È stato considerato come indicativo della produzione mitocondriale di ROS il rilascio di H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, che si forma dalla trasformazione dei radicali liberi dell'ossigeno ad opera della SOD. La velocità del rilascio mitocondriale di H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> è stata determinata misurando l'incremento della fluorescenza (eccitazione a 312 nm, emissione a 420 nm) provocato dall'ossidazione dell'acido omovanillinico ad opera dell'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in presenza della Perossidasi Di Rafano. Il buffer di incubazione, pH 7.4, è composto da: KCl 80Mm, Hepes 50 mM, EGTA 1Mm, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 5mM, MgCl<sub>2</sub> 2mM, BSA 0,3 %, Temperatura di 37°C e un Volume finale di 1,5 mL.

In tale buffer sono state incubate

- proteine mitocondriali = 0,25 mg/mL
- perossidasi di rafano = 12 U/mL
- acido omovanillinico = 0,1 Mm
- SOD = 50 U/mL.

Dopo 10 secondi dall'incubazione sono stati aggiunti 20 µL di succinato. La fluorescenza è stata letta al fluorimetro, dotato di una cella termo staticamente controllata ed interfacciato con un PC IBM- compatibile. La curva standard è stata ottenuta aggiungendo quantità note di H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> per tarare lo strumento in presenza di acido omovanillinico e perossidasi di rafano.

### **5.12 Determinazione del contenuto serico di testosterone**

La determinazione del contenuto serico di testosterone è stata determinata mediante l'utilizzo del kit Testosterone EIA. Questo kit è un dosaggio immune competitivo per la determinazione quantitativa del testosterone nei fluidi biologici. Utilizza un anticorpo monoclonale legato covalentemente a fosfatasi alcalina per il riconoscimento del testosterone. Dopo l'incubazione della piastra a temperatura ambiente, l'eccesso di reagenti è lavato via e viene aggiunto il substrato. Dopo un breve tempo di incubazione la reazione enzimatica viene stoppata e il colore giallo sviluppatosi viene letto in un microplate reader a 405 nm. L'intensità del colore giallo è inversamente proporzionale alla concentrazione di testosterone

presente. La misura dell'assorbanza relativa è usata per calcolare la concentrazione di testosterone.

### **Preparazione dei reagenti**

#### **1. Testosterone standard**

Partendo dalla soluzione di testosterone standard, è stata preparata una diluizione seriale nel seguente modo:

- Pipettare 1 mL di diluent standard nel tubo1.
- Pipettare 750 µL di diluent standard nel tubo2.
- Togliere 40 µL di diluent standard dal tubo1 e aggiungere 40 µL dello stock 50pg/mL di testosterone.
- Vortexare il tubo1 e prelevare 250 µL da questa eppendorf e aggiungerli al tubo2.
- Proseguire con una diluizione seriale a 5 punti.

Gli standard ottenuti sono i seguenti: 2000 – 500 – 125 – 31,25 – 7,81 pg/mL.

#### **2. Buffer di lavaggio**

È stato preparato diluendo 5 mL dello stock di buffer di lavaggio con 95 mL di acqua milliQ.

#### **Procedura del dosaggio**

Tenere tutti i reagenti a temperatura ambiente per circa 30 minuti prima di utilizzarli.

Tutti gli standard e i campioni devono essere preparati in duplicato.

1. Pipettare 100 µL di diluent standard nell'NSB e nel Bo (0 pg/mL standard).
2. Pipettare 100 µL di ciascun standard negli appositi pozzetti.
3. Pipettare 100 µL di ciascun campione negli appositi pozzetti.
4. Pipettare 50 µL di Assay Buffer nei pozzetti NSB.
5. Pipettare 50 µL di anticorpo giallo in ciascun pozzetto, eccetto il bianco, TA e NSB.
6. Incubare la piastra a temperatura ambiente su una piastra agitante per 1 ora a circa 500 rpm.
7. Pipettare 50 µL di blue coniugato in ogni pozzetto eccetto nel bianco e TA.
8. Incubare la piastra a temperatura ambiente su una piastra agitante per 1 ora a circa 500 rpm.
9. Svuotare il contenuto dei pozzetti e lavare aggiungendo 400 µL di soluzione di lavaggio in ciascun pozzetto. Ripetere per altre due volte, per un totale di 3 lavaggi.

10. Dopo l'ultimo lavaggio, svuotare o aspirare il contenuto residuo nei pozzetti e poggiare la piastra capovolta su carta da filtro per eliminare del tutto i residui del buffer di lavaggio.
11. Aggiungere 5  $\mu$ L di blue coniugato al pozzetto TA.
12. Aggiungere 200  $\mu$ L del substrato pNpp in ogni pozzetto. Incubare a 37°C per 1 ora senza agitare. La piastra deve essere coperta con l'apposita pellicola sigillante fornita.
13. Aggiungere 50  $\mu$ L di soluzione di stop. La piastra va letta immediatamente dopo.
14. Prima bisogna leggere il bianco e poi effettuare le letture a 405 nm, preferibilmente con correzione tra 570 e 590 nm.

### **Calcolo dei risultati**

Per la determinazione del contenuto serico di testosterone sono stati eseguiti i seguenti calcoli:

1. Calcolare il valore di densità ottica (OD) relativa agli standards e ai campioni nel seguente modo:

$$\text{Assorbanza netta} = \text{Assorbanza di legame} - \text{Assorbanza NSB}$$

2. Calcolare il legame di ogni standard come % di massimo legame (Bo) usando la seguente formula:

$$\% \text{ legame} = \text{Assorbanza netta} / \text{Assorbanza di legame (Bo)}$$

3. Usare il Logit-Log come % di legame contro la concentrazione di testosterone negli standards. Creare la retta di taratura per ogni punto standards e calcolare la concentrazione di testosterone per interpolazione lineare.

## **5.13 Real Time PCR**

### **Estrazione dell'RNA dai tessuti di ratto**

Le molecole di RNA, al contrario di quelle di DNA, sono strutture estremamente labili, facilmente degradabili dalle RNAsi, enzimi cellulari ubiquitari, con attività ampia e notevole resistenza alla denaturazione. L'estrazione degli RNA dunque è una procedura sperimentale molto delicata che impone condizioni di sterilità e di particolare accuratezza, come l'uso di vetreria e reagenti sterili. Per l'estrazione dell'RNA totale dai tessuti di ratto è stato utilizzato il TRIZOL (Invitrogen), una soluzione monofasica di fenolo (tossico e corrosivo), guanidina isotiocianato (irritante) e altri componenti che permette l'isolamento dell'RNA (ma anche DNA e proteine) da campioni di cellule e di tessuto di origine umana, animale, batterica e vegetale. Il Trizol permette di preservare durante l'omogenizzazione dei campioni l'integrità dell'RNA grazie alla sua elevata efficacia nell'inibire l'attività delle

RNAsi, mentre distrugge le cellule e dissolve i componenti cellulari. Questo reattivo permette, inoltre, di eseguire la precipitazione sequenziale di RNA, DNA e proteine da un singolo campione in modo da poter recuperare in singolo esperimento tutti e tre i tipi di macromolecole.

La procedura sperimentale utilizzata per l'estrazione dell'RNA dai campioni prevede l'omogenizzazione di piccole quantità di tessuto di fegato di ratto, in cui sono stati precedentemente aggiunti 500  $\mu$ L di Trizol, mediante l'utilizzo di un apposito strumento detto polytron IKA T-10 basic con sonda S10N; l'omogenizzazione viene eseguita in ghiaccio per evitare il surriscaldamento dei campioni. Al termine dell'omogenizzazione i campioni vengono lasciati 5 minuti a temperatura ambiente (RT) per permettere la dissociazione delle proteine ribosomiali dagli acidi nucleici e poi trattati con 100  $\mu$ L di cloroformio, vortexati energicamente per 15 secondi e lasciati nuovamente a RT per altri 2-3 minuti. I campioni vengono poi centrifugati a 9700 rpm per 15 minuti a 4°C per permettere la separazione dell'RNA dal DNA e dalle proteine; al termine della centrifuga infatti i campioni si presentano stratificati in tre diverse fasi: una chiara fase acquosa contenente RNA, un'interfase contenente i lipidi e detriti cellulari e una fase organica rossa contenente DNA e proteine. Si preleva accuratamente la fase acquosa (contenente RNA) e la si inserisce in una nuova eppendorf a cui si aggiungono successivamente 250  $\mu$ L di isopropanolo; si lascia agire l'intero sistema overnight (O.N.) a -20°C. Il giorno successivo si recuperano i campioni e li si centrifugano a 9700 rpm per 10 minuti a 4°C per permettere la precipitazione dell'RNA sottoforma di un pellet bianco che sarà visibile sul fondo dell'eppendorf al termine della centrifuga. Si procede rimuovendo il surnatante, lavando il pellet con 1 mL di etanolo al 75% e vortexandolo energicamente per risospesare l'RNA. Successivamente si centrifugano i campioni per 5 minuti a 6000 rpm a 4°C, si elimina nuovamente il surnatante e si lascia evaporare l'etanolo residuo. Infine quando il pellet diventa trasparente, e l'etanolo è completamente evaporato, viene risospeso accuratamente in 250  $\mu$ L di H<sub>2</sub>O sterile (RNAsi free) ed incubato a 55°C per 10 minuti. A questo punto i campioni possono essere utilizzati per esperimenti di RT-PCR, Northern blot, clonaggio molecolare ecc. oppure conservati nel -80°C per future analisi.

### **Quantificazione dell'RNA estratto**

L'RNA estratto dai tessuti viene successivamente quantificato al NanoDrop, uno spettrofotometro UV-Visibile completamente innovativo, capace di lavorare con microvolumi di campione, fino a 1  $\mu$ L. Inoltre la capacità di lavorare anche a concentrazioni estremamente

elevate consente di eliminare totalmente l'utilizzo delle cuvette ed il ricorso a diluizioni, garantendo tuttavia una quantificazione molto accurata. Il Nanodrop sfrutta una nuova tecnologia, basata sulla tensione superficiale che piccoli volumi di liquidi esercitano quando si trovano collocati tra due superfici vicine. In tal modo una goccia di campione posizionata sull'apposita piastra di lettura crea una colonna di liquido a diretto contatto con due fibre ottiche, e può essere analizzata in modo semplice e veloce.

Nel nostro caso la quantizzazione dei campioni è stata effettuata misurando l'assorbanza a  $\lambda = 260$  nm ( $A_{260}$ ) di un volume pari a 2  $\mu$ L di RNA; tale lunghezza d'onda rappresenta l'assorbanza massima degli acidi nucleici. È stata inoltre valutata la purezza dell'RNA e l'assenza di contaminanti proteici analizzando il rapporto  $A_{260}/A_{280}$ , cioè il rapporto tra l'assorbanza degli acidi nucleici e quella delle proteine; tale rapporto deve essere compreso tra 1,8-2,0; rapporti superiori indicano una contaminazione da proteine.

### **Retrotrascrizione**

La retrotrascrizione consiste nella sintesi di una molecola di DNA a partire da una di RNA ad opera di un particolare enzima detto trascrittasi inversa. Tale enzima, chiamato anche "DNA polimerasi RNA-dipendente" è stato finora identificato nel genoma dei retrovirus, dai quali viene utilizzata per copiare l'informazione contenuta nel genoma retrovirale in una molecola di DNA a doppio filamento che può così integrarsi nel genoma della cellula ospite. La retrotrascrizione è utilizzata anche in biologia molecolare per ottenere DNA complementare (cDNA), a partire da mRNA purificato, che può essere utilizzato per il clonaggio e la manipolazione del gene corrispondente.

Nel nostro caso gli RNA estratti sono stati retrotrascritti in cDNA usando il kit iScript cDNA synthesis (BIORAD), seguendo le indicazioni riportate sul data sheet della casa fornitrice. La retrotrascrizione dei campioni è stata effettuata su 1  $\mu$ g di RNA, utilizzando 4  $\mu$ L di 5x iScript reaction mix, 1  $\mu$ L di iScript reverse transcriptasi e portando a volume finale di 20  $\mu$ L con acqua sterile. L'amplificazione dei cDNA prodotti prevede due incubazioni sequenziali della mix di reazione, una di 5 minuti a 25°C e l'altra di 30 minuti a 42°C. La reazione di sintesi del filamento di cDNA è stata interrotta mediante un'ulteriore incubazione di 5 secondi a 85°C. I campioni sono stati successivamente conservati a -20°C fino al seguente utilizzo.



### **Analisi dell'espressione genica di Chop/Gadd153**

La real-time PCR, denominata anche PCR quantitativa, è una tecnica in grado di misurare in tempo reale la concentrazione iniziale di una sequenza di DNA target in un campione biologico, sfruttando lo stesso meccanismo di duplicazione delle cellule. La reazione di amplificazione avviene in tre fasi successive:

- nella fase di denaturazione i due filamenti di DNA si separano,
- nella fase di appaiamento i primers si attaccano alle sequenze complementari al gene target,
- nella fase di allungamento la Taq si lega ai primers e rapidamente copia il DNA.

Durante la reazione di PCR la quantità di DNA cresce in modo esponenziale, per poi raggiungere un plateau oltre il quale non si osserva nessun incremento dei prodotti. La real-time misura l'amplificazione ad ogni ciclo di reazione durante la fase esponenziale della PCR, quando cioè l'efficienza di amplificazione è influenzata minimamente dalle variabili di reazione, permettendo di ottenere risultati molto più accurati rispetto alla PCR tradizionale "end point". Per valutare in tempo reale la quantità di DNA a doppio filamento presente dopo ogni ciclo di sintesi, nella miscela di reazione è presente il Sybr Green, un composto fluorescente intercalante del DNA, la cui fluorescenza aumenta considerevolmente nel momento in cui la molecola si intercala nel solco minore della doppia elica. La fluorescenza emessa è direttamente proporzionale alla quantità di amplificato che, a sua volta, è proporzionale alla quantità di DNA iniziale presente nel campione. Tale fluorescenza è rilevata da specifici strumenti che eccitano i fluorocromi e convogliano quindi la fluorescenza emessa ad appositi software che la convertono in una rappresentazione in tempo reale della cinetica d'amplificazione.

Nel nostro caso per l'amplificazione dei cDNA retrotrascritti a partire dall'RNA estratto dai tessuti epatici di ratto sono stati utilizzati 4 µL di campione diluito 1:10, 1 µL di primer F 10 µM e 1 µL di primer R 10 µM del gene Chop e 10 µL di SYBER GREEN, portati a un volume finale di 20 µL con acqua sterile. Per ogni campione è stato effettuato il doppio biologico. I primers utilizzati sono i seguenti (Wei et al., 2006):

- primer F CHOP: CCAGCAGAGGTCACAAGCAC
- primer R CHOP: CGCACTGACCACTCTGTTTC

Per l'amplificazione dei geni è stato utilizzato il termociclatore IQ5 (BIORAD) e il programma IQ5, composto da due cicli successivi:

- 1) Primo ciclo a singolo step di 2 minuti a 94°C;
- 2) Secondo ciclo di tre step, ripetuti 40 volte (15 secondi a 95°C, 15 secondi a 55°C, 20 secondi a 72°C).

#### **5.14 Analisi delle proteine mediante Western Blot**

Il Western blot è una tecnica immunochimica che permette di valutare l'espressione quantitativa di una determinata proteina e la sua localizzazione in una miscela di proteine precedentemente sottoposte ad elettroforesi. I western blot sono stati eseguiti sia su lisati di testicolo, sia sul citosol e sui mitocondri estratti da fegato.

Nel gel, in presenza del detergente sodio dodecil solfato (SDS) che denatura le proteine, avviene la separazione delle proteine in funzione della loro massa, annullando le cariche degli amminoacidi che influenzano la migrazione in quanto l'SDS carica tutte le proteine negativamente. Esse migrano tutte verso il polo positivo, ma la differente posizione nel gel dipenderà a questo punto da una sola variabile e cioè la massa, in quanto la variabile "carica" è stata annullata. I campioni proteici che sono stati caricati nei pozzetti, sono stati diluiti in Laemly buffer, e prima di essere caricati sul gel sono stati denaturati a 90-95°C per 5 minuti. Per rendere possibile l'individuazione della proteina di interesse, è stata carica anche una miscela di proteine a peso noto ovvero un marker la cui corsa è resa controllabile grazie alla netta separazione delle bande delle varie proteine in esso contenute, che si presentano visivamente colorate. In ogni caso, la corsa dei nostri campioni può essere seguita con l'ausilio del Lemly in quanto contiene blu di bromofenolo. La corsa elettroforetica è stata effettuata a 200 V, 60 mA/gel per 1h/2h, utilizzando TGS (TrisGlicina-SDS) come tampone, di cui è stata riempita la camera elettroforetica. Dopo la corsa elettroforetica, il materiale proteico è stato trasferito su una membrana di nitrocellulosa con un processo detto *blotting*. Il blottaggio è stato effettuato utilizzando un voltaggio di 100 V, 350 mA per 1h e 30 minuti. La membrana ottenuta è stata, quindi, lavata per 5 minuti nel tampone TBS-Tween e poi incubata a temperatura ambiente per 1 ora in una soluzione di TBS-Tween e latte al 5% per ottenere il blocco dei siti aspecifici tra la nitrocellulosa e le proteine. Successivamente la membrana è stata incubata tutta la notte a 4°C con anticorpo primario nel tampone TBS-Tween-latte 2%. In seguito per allontanare l'anticorpo non legato, la membrana è stata sottoposta a 4 lavaggi con TBS-Tween di 15 minuti ciascuno. Terminati i lavaggi, il filtro è stato incubato per 1 ora a temperatura ambiente con l'anticorpo secondario appropriato, coniugato con l'enzima perossidasi di rafano diluito 1:3000 in TBS-Tween e latte. Anche questa volta, per allontanare

l'anticorpo secondario non legato, sono stati effettuati gli stessi 4 lavaggi prima menzionati. Per rilevare il segnale della proteina viene utilizzata la reazione di chemiluminescenza effettuata grazie a una soluzione contenente luminolo, acido cumarico e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. La membrana è stata, quindi, incubata con questo mix per 5 minuti e poi è stata sottoposta a scannerizzazione mediante *C-DiGit Chemiluminescent Western Blot Scanner (LI-COR)*. Le densità ottiche relative alle bande immunoreattive sono state determinate mediante *Image Studio Software* e normalizzate rispetto alla  $\beta$ -actina (nel caso di proteine analizzate su omogenato tissutale) oppure rispetto alla COX IV (nel caso di proteine di omogenato mitocondriale), utilizzando un metodo densitometrico semi-quantitativo.

#### **5.14.1 Preparazione degli omogenati di fegato e di testicolo**

Dal tessuto prelevato al momento del sacrificio e conservato a -80°C, ne sono stati prelevati 150 mg e questi sono stati omogeneizzati, usando il politron, in 1 mL di Lysis Buffer. È stata poi effettuata una centrifugazione a 12000 rpm per 10 min a 4°C nella centrifuga refrigerata ed è stato prelevato il soprannatante. Nel frattempo è stato preparato il gel in percentuale adeguata al tipo di proteina da evidenziare. È stato effettuato il *dosaggio proteico* per conoscere la concentrazione di proteine contenute nel campione e, quindi, per calcolare la quantità di campione da caricare in ogni pozzetto. Il dosaggio è stato condotto secondo il metodo di Hartree. Tale metodo combina la reazione del biuretto con quella del Folin-Ciocalteu, ed il colore che si sviluppa proviene dalla riduzione degli acidi fosforungsticici e fosfomolibdici a blu di tungsteno e di molibdeno, operata dal complesso Cu-proteina, dal triptofano e dalla tirosina delle proteine in ambiente alcalino. L'intensità del colore sviluppato è direttamente proporzionale alla concentrazione proteica nel campione.

#### **5.14.2 Preparazione dei mitocondri e del citosol da fegato**

Subito dopo il sacrificio, il fegato è stato prelevato, finemente sminuzzato ed omogeneizzato in una soluzione contenente mannitolo 220 mM, saccarosio 70 mM, HEPES 20 mM, EDTA 2 mM e 0,1% (peso/volume) di albumina di siero bovina libera da acidi grassi (BSA) a pH 7.4 (diluizione 1:10), in un omogenizzatore Potter Elvehjem (Heidolph, Kelheim, Germania) settato a 500 rpm (4 colpi/min). L'omogenato è stato, poi, filtrato attraverso delle garze sterili e privato di cellule intatte e nuclei attraverso una centrifugazione a 1000g per 10 minuti a 4°C; i surnatanti ottenuti sono stati di nuovo centrifugati a 3000g per 10 minuti a 4°C per permettere la precipitazione dei mitocondri. Il pellet mitocondriale così

ottenuto è stato lavato due volte ed infine risospeso in un tampone contenente LiCl 80 mM, HEPES 50 mM, Tris P 5 mM, EGTA 1 mM, 0,1% (peso/volume) di albumina di siero bovina libera da acidi grassi a pH 7.0. Caratterizzazioni microscopiche ed enzimatiche hanno mostrato che la nostra procedura di isolamento (centrifugazione a 3000g per 10 minuti) fornisce una frazione cellulare che è costituita essenzialmente da mitocondri.

Per l'ottenimento della frazione citosolica, è stata effettuata un'ulteriore centrifuga del surnatante residuo dalla centrifuga precedente, a 10000g per 10 minuti a 4°C, al termine della quale è stato recuperato il surnatante ottenuto.

Mitocondri e citosol sono stati aliquotati prima di dosarli secondo protocollo di dosaggio proteico descritto precedentemente, aggiungendo inibitori delle proteasi in proporzione al volume di mitocondri e surnatante ottenuti.

### **5.15 Blue native page**

La Blue native è un'elettroforesi che si effettua in condizioni native e che permette quindi di separare su un gel di acrilamide i complessi proteici. Le proteine, durante un BN-PAGE, non sono separate in base al rapporto carica/massa ma in base alle dimensioni del gradiente del gel di acrilamide. Il Blue coomassie infatti conferisce carica negativa alle proteine e la migrazione decelera gradualmente con la distanza di corsa e con la diminuzione delle dimensioni dei pori del gradiente del gel. Le singole MPC (Multi Protein Complex) devono fermarsi quasi completamente quando si avvicinano al loro limite specifico di migrazione dipendente dalla dimensione dei pori del gel.

Si chiama "blue" perchè sia il campione, sia il buffer di corsa sono preparati con il blue di Coomassie che, come l' SDS, dona una carica negativa alle proteine ma non le denatura.

Il blotting di questo gel darà informazioni sull'assemblaggio di complessi proteici. Inoltre, una volta che ha corso questo gel, si può fare la 2D, che è un SDS-page: si taglia la lane di interesse e la si dispone ruotandola di 90° tra due vetrini con gel con SDS; questo provoca la denaturazione delle proteine e quindi la separazione delle subunità che formavano i complessi. A fine corsa bisognerà effettuare un blotting normale e quello che si avrà è che tutte le proteine che si trovano sulla stessa riga verticale fanno (per lo più) parte dello stesso complesso.

Nel nostro caso, lo scopo è stato la determinazione dei complessi della proteina OPA1 mediante 1D BN-PAGE per valutarne il peso molecolare.

### 5.15.1 Preparazione dei mitocondri

Partendo dai mitocondri ottenuti come descritto precedentemente, sono stati pesati 0,2 mg di sospensione mitocondriale e in ogni campione sono stati aggiunti 43,75  $\mu\text{L}$  di una mix costituita da:

- 20  $\mu\text{L}$  di acido aminocaproico 0,75 M (pH 7)
- 20  $\mu\text{L}$  Bis-Tris 50 mM (pH 7)
- 3,75  $\mu\text{L}$  10% n-dodecyl- $\beta$ -D-maltopyranoside

I campioni sono stati vortexati ogni 5-10 minuti per 30 minuti tenendoli sempre in ghiaccio e successivamente sono stati centrifugati alla massima velocità per 30 minuti a 2-4°C. È stato prelevato il surnatante e sono stati aggiunti ad ognuno:

- 0,5  $\mu\text{L}$  di aprotinina
- 0,5  $\mu\text{L}$  di pepstatina
- 0,5  $\mu\text{L}$  di leupeptina
- 2,5  $\mu\text{L}$  di NaOVA
- 2,5  $\mu\text{L}$  di PMSF

È stato effettuato il dosaggio proteico come descritto precedentemente e sono stati aggiunti ad ogni campione già dosato 2,5  $\mu\text{L}$  di 5% comassie blue in 0,5 M di acido aminocaproico (pH 7). I campioni sono stati aliquotati e conservati a -80°C.

### 5.15.2 Preparazione dei gel in gradiente

Sono stati preparati gel in gradiente di *separating* 4-13%. Per un singolo gel:

4%	Componenti	13%
Vf= 2,55 mL		Vf= 2,15 mL
0,41 mL	30% acrilammide	0,94 mL
0,71 mL	H <sub>2</sub> O milliQ	0,013 mL
1,3 mL	1M acido aminocaproico pH 7	1,07 mL
0,13 mL	1M Bis-Tris pH 7	0,49 mL
11,2 µL	APS 10%	13,4 µL
1,36 µL	Temed	1,34 µL

Dopo il caricamento del *separating* gel, è stato coperto fino all'orlo del vetrino con isopropanolo al 50% in H<sub>2</sub>O milliQ. Dopo circa 1 ora e 30 minuti si sciacqua abbondantemente con H<sub>2</sub>O di fonte e poi con H<sub>2</sub>O distillata tra i vetrini per eliminare l'eccesso di isopropanolo che impedirebbe la successiva polimerizzazione dello *stacking*.

*Stacking gel* (Vf= 5 mL)

- 0,7 mL 30% acrilamide
- 1,6 mL H<sub>2</sub>O milliQ
- 0,25 mL 1M Bis-Tris pH 7
- 40 µL 10% APS
- 10 µL Temed

Si carica lo stacking, si lascia mezz'ora e dopo mezz'ora si sciacquano i vetrini con H<sub>2</sub>O milliQ per eliminare eventuali residui di acrilammide che potrebbero influire sulla migrazione delle proteine.

A questo punto si caricano i campioni secondo dosaggio proteico, dopo aver versato la soluzione catodica bianca al centro. Si fa migrare a 30 V e 0,06 A per 30 minuti dopo i quali si cambia il catodo bianco con quello blu. La migrazione proseguirà ad 80 V e 0,06 A fino a metà del gel; dopodichè si cambierà nuovamente la soluzione catodica blu con quella bianca e mantenendo gli stessi parametri di corsa si attenderà che il fronte di migrazione blu esca totalmente dal gel. La corsa durerà circa 6 ore per gel da 1mm.

Una volta ultimata la corsa elettroforetica in condizioni native 1D:

- un gel è stato tagliato in due metà: una metà è stata colorata con blu comassie per mettere bene in evidenza tutte le bande delle proteine e per poterlo usare come gel di confronto della seconda metà che invece verrà blottata;
- l'altro gel è stato tagliato lo stesso a metà: una metà è stata utilizzata per ricavare le lane per la seconda dimensione e l'altra metà è stata anch'essa colorata con blu comassie.

#### - **Colorazione dei gel successiva ad elettroforesi nativa**

Bisogna considerare che le proteine presenti all'interno delle maglie del gel sono altamente diffusibili ed è per questo motivo che vanno fissate al gel con il processo di *fixing*. Le fasi della colorazione sono le seguenti:

- 1) Fissaggio delle proteine mediante immersione del gel in *fixing solution* per 30 minuti su basculante;
- 2) Immersione del gel nella *blue comassie solution* per 15 minuti su agitatore basculante;
- 3) Sciacquare con H<sub>2</sub>O milliQ per eliminare l'eccesso di colorante
- 4) Decolorazione mediante *destaining solution* per eliminare l'eccesso di blu eventualmente legato all'acrilammide.
- 5) Acquisizione del gel mediante scanner.

## **Blotting della 1D**

Il blottaggio della 1D viene effettuato a 4°C, 80 V, 0,35 A per due ore. Le membrane seguiranno da questo punto in poi gli stessi passaggi di un western blot classico.

### - **Buffer recipes Blue native page**

*Tutte le soluzioni devono essere preparate con H<sub>2</sub>O milliQ.*

- **Soluzione catodica**

*Per un Vf= 500 mL (pH 7)*

*4,5g di tricina*

*1,57g di Bis Tris*

*Di questi 500 mL, 250 mL costituiranno il buffer catodo bianco e nei rimanenti 250 mL si aggiungeranno 0,05g di blue comassie e sostituiranno il buffer catodo blu.*

- **Soluzione anodica**

*Per un Vf= 1L (pH 7)*

*7,8g di Bis tris*

- **Fixing solution**

*Per un Vf= 200 mL*

*20 mL di acido acetico glaciale*

*80 mL di etanolo 100*

- **Blu comassie solution**

*Per un Vf= 100 mL*

*8 mL di acido acetico glaciale*

*25 mL di etanolo100*

*0,116g di blue comassie*



- ***Destaining solution***

*Per un Vf= 150 mL*

*12 mL di acido acetico glaciale*

*37,5 mL di etanolo100*

## **5.16 2D SDS Page**

Terminata la 1D, le lane che saranno utilizzate per la 2D dovranno subire un processo di denaturazione/riduzione delle proteine in esse contenute. Vengono quindi immerse innanzitutto in una soluzione di *denaturing buffer* (pH 6,8) la cui composizione per un Vf= 20 mL è la seguente:

- 0,152g di DTT
- 0,121g di Trizma base
- 0,0004g di blu di bromo fenolo
- 0,4g di SDS
- 2 mL di glicerolo

### **5.16.1 Preparazione dei gel della 2D**

Le singole lane vengono tagliate e poste in capsule petri di vetro ricoprendole di denaturing buffer pre-riscaldato a circa 70°C; si lasciano così per 15 minuti. In seguito si pongono le capsule in microonde e si fa “bollire” per 20 secondi, dopodichè si lasciano altri 15 minuti le lane nella denaturing buffer solution calda. Sono gel omogenei al 10% preparati secondo classico protocollo di elettroforesi in SDS, in vetrini dello spessore di 1,5mm polimerizzati a temperatura ambiente per due ore coperti con isopropanolo 50.

A questo punto si pone la lane della 1D ormai denaturata sul gel preparato per la 2D. La lane dovrà essere ruotata di 90° stando attenti a mettere le bande ad alto peso molecolare sulla sinistra del gel vicino al marker. La lane dovrà essere inglobata nello stacking gel SDS page (protocollo classico) per circa 30-45 minuti. I parametri di corsa della 2D utilizzati sono: 100V, 120 milliA fino a fine corsa.

Una volta ultimata la corsa elettroforetica si prosegue con il bloccaggio dei gel per due ore a 4°C come per un classico western blot seguendo questi parametri: 80V, 350 milliA per 2 ore. Le membrane seguiranno da questo punto in poi gli stessi passaggi di un western blot classico.

### **5.17 Analisi statistiche**

Le analisi statistiche sono state compiute usando il sistema d'analisi Anova. Il confronto tra i singoli gruppi è stato fatto tramite il Newmann-Keuls. Il livello minimo di significatività scelto è stato  $P < 0,05$ . Tutte le analisi sono state compiute usando il programma Graphpad Prism (Graphad software inc., San Diego, CA, USA).

## Capitolo 6

---

### Risultati e Discussione

## 6 RISULTATI E DISCUSSIONE

Durante il periodo di dottorato, ho valutato l'effetto del pesticida DDE sull'integrità e sulla funzionalità dei mitocondri epatici e testicolari di ratto sia *in vitro* che *in vivo* in seguito a somministrazione del DDE per 4 settimane, in presenza e in assenza di elevato contenuto lipidico nella dieta, rispetto ad animali controllo.

Per semplificare riporterò i risultati dividendoli in due sottocapitoli, quello relativo al fegato e quello relativo al testicolo.

### Risultati relativi al fegato

#### 6.1 Studi di funzionalità mitocondriale

La prima fase sperimentale, è stata dedicata alla valutazione dell'effetto acuto del DDE somministrato *in vitro* ai mitocondri isolati dal fegato di ratto sulle capacità respiratorie dei mitocondri isolati.

La figura 1a mostra i risultati relativi alle capacità respiratorie di mitocondri isolati *in vitro* in presenza di succinato (substrato che fornisce informazioni relative alla via respiratoria FADH<sub>2</sub>-linked). Sono riportati dati relativi allo stato 4 (in assenza di ADP), allo stato 3 (in presenza di ADP) ed il rapporto di controllo respiratorio o RCR (dato dal rapporto stato3/stato 4), che è indice di integrità dei mitocondri. Lo stato 4 e lo stato 3 sono stati valutati prima in assenza di DDE e poi, in misure successive, sono stati valutati in presenza di DDE alla dose di 157 nmol/mg di proteine, come indicato nella sezione Materiali e Metodi. Tale dose è stata scelta perchè in precedenti studi era stata descritta come dose end-point per l'effetto del DDE sui mitocondri. I risultati riportati in figura 1a sono normalizzati per il valore delle misurazioni in assenza di DDE. Come si può osservare, l'aggiunta di DDE *in vitro* ai mitocondri induce una significativa diminuzione dello stato 4 (-41%), dello stato 3 (-67%) ed anche dell'RCR (-40%) indicando un danno non solo della capacità respiratoria ma anche all'integrità dei mitocondri. In figura 1b viene riportato l'istogramma relativo al grado di accoppiamento termodinamico (q) ed all'efficienza termodinamica di conversione dell'energia (η). Anche in questo caso si osserva una significativa diminuzione di entrambi i parametri (-10% per q, e -27% per η) in seguito all'aggiunta *in vitro* di DDE, indicando un disaccoppiamento mitocondriale ed un minore grado di efficienza nel produrre ATP.

In figura 2 sono riportate le massime capacità respiratorie (stato 3 in presenza di ADP) usando come substrato il glutammato (substrato che fornisce indicazioni relative alla via respiratoria NADH-linked) e la palmitoilcarnitina (substrato che fornisce indicazione sulla

capacità di ossidazione degli acidi grassi). I risultati, normalizzati rispetto alla misura effettuata in assenza di DDE, indicano che l'aggiunta di DDE induce una significativa diminuzione dello stato 3 della respirazione sia in presenza di glutammato (-75%) che della palmitoilcarnitina (-43%).

Nella seconda fase sperimentale ho valutato gli effetti di una bassa dose di DDE somministrata per via orale in maniera cronica (4 settimane) *in vivo* al modello sperimentale animale (ratto). La dose utilizzata è stata di 10 mg/kg di peso corporeo in quanto in studi precedenti era stata indicata come dose corrispondente alla assunzione giornaliera ammissibile per l'uomo. In particolare ho valutato gli effetti del DDE somministrato contemporaneamente a dieta standard o a dieta iperlipidica.

In figura 3a sono riportati i risultati relativi al guadagno di peso corporeo alla fine del periodo sperimentale ed i dati per ciascun gruppo sperimentale evidenziano che nei gruppi trattati con dieta iperlipidica (con o senza esposizione al DDE) si osserva un significativo aumento del guadagno di peso corporeo rispetto ai due gruppi di animali che ricevevano diete standard di laboratorio. È interessante notare che questo maggior guadagno di peso corporeo osservato in entrambi i gruppi (D e D+DDE) alimentati con dieta iperlipidica non è dovuto ad un aumento dell'energia assunta. Infatti, nonostante la dieta iperlipidica sia ovviamente ipercalorica, si osserva uno stesso introito energetico sia nei gruppi alimentati con dieta standard (gruppi N ed N+DDE) sia nei gruppi alimentati con dieta iperlipidica (figura 3b). Il maggiore guadagno di peso corporeo è dovuto invece alla maggiore introduzione di lipidi che si osserva nei gruppi D e D+DDE rispetto ai gruppi di controllo. A differenza di studi precedentemente condotti con altri pesticidi che indicavano un loro effetto obesogeno (Langer et al., 2014), la dose di DDE da me utilizzata non favorisce la tendenza all'obesità nei gruppi alimentati con dieta standard di laboratorio (al contrario si osserva una tendenza alla diminuzione del guadagno di peso corporeo, figura 3a: N+DDE) né incrementa ulteriormente l'obesità nel gruppo alimentato con dieta iperlipidica (figura 3a: D+DDE). Questa differenza di risultato rispetto a studi precedenti può essere dovuta sia al tipo di pesticida utilizzato, che alla dose ed al tempo di esposizione.

A livello epatico la dose di DDE e la durata di trattamento usati inducono una leggera tendenza all'epatomegalia, evidente soprattutto nei ratti che hanno ricevuto il DDE (figura 4a, +7% nei ratti N+DDE, +20% nei ratti D+DDE), mentre la dieta iperlipidica da sola non comporta epatomegalia (D). Per quanto riguarda il contenuto lipidico epatico e quindi lo sviluppo di steatosi epatica, questa si sviluppa nei ratti alimentati con dieta iperlipidica

indipendentemente se sono trattati o meno con il DDE che da solo non sembra comportare sviluppo di steatosi epatica (figura 4b).

Negli esperimenti *ex vivo* con mitocondri isolati dal fegato di tutti i gruppi di ratti utilizzati, si osserva un aumento dello stato 4 della respirazione in presenza di succinato, come substrato, nei ratti trattati con il DDE (figura 5a): tale aumento risulta essere rispettivamente del 16% e del 21% nei ratti N+DDE e nei ratti D+DDE. Per quanto riguarda lo stato 3 non ci sono variazioni significative tra i diversi gruppi sperimentali (figura 5b), mentre per il valore di RCR si nota una lieve tendenza a diminuire nei gruppi trattati con il DDE (11% e 16% rispettivamente nei gruppi N+DDE ed D+DDE) (figura 5c).

Questi risultati indicano che, differentemente da quanto accade quando dosi massimali di DDE vengono aggiunti *in vitro* ai mitocondri di fegato, il trattamento cronico *in vivo* con dosi basse di DDE non porta a diminuzioni delle capacità respiratorie in presenza di succinato, bensì ad un aumento dello stato 4 mitocondriale con conseguente diminuzione dell'RCR, indice di integrità mitocondriale. È da notare che lo stato 4 respiratorio è un indice grezzo della conduttanza protonica attraverso la membrana mitocondriale interna e quindi del disaccoppiamento mitocondriale. Per valutare in modo più appropriato, il grado di accoppiamento mitocondriale ho determinato anche la misurazione del consumo di ossigeno mitocondriale con oligomicina, per inibire l'ATP sintetasi, ed in presenza del disaccoppiante artificiale FCCP, in modo da poter calcolare, come descritto nella sezione Materiali e Metodi, il grado di accoppiamento ( $q$ ) e l'efficienza termodinamica ( $\eta$ ). I risultati da me ottenuti con basse dosi di DDE indicano una diminuzione di tali parametri in entrambi i gruppi trattati col DDE (figura 6), confermando un disaccoppiamento mitocondriale. Tali risultati confermano l'incremento dell'attività respiratoria ossidativa sia della depolarizzazione trovati da altri ricercatori con bassi dosaggi dei pesticidi (Byczkowski 1973, 1977, 1978; De Mello 1987; Tiemann 1998).

Ho poi valutato le massime capacità respiratorie (in presenza di ADP) con substrati NADH-linked o lipidici. È interessante notare che nei gruppi trattati con il DDE si osserva una diminuzione della massima capacità respiratoria con il glutammato (substrato NADH-linked) (figura 7a), mentre si nota un aumento della massima capacità di ossidare i grassi (palmitoilcarnitina, figura 7b).

Il pathway di respirazione NADH-linked usando il glutammato quindi risulta danneggiato in presenza di trattamento con il DDE, indipendentemente dal tipo di dieta, probabilmente per un danno a livello dell'attività della NADH deidrogenasi, come già suggerito da Narayan et al., (1984) e Mota et al., (2011). La massima capacità di ossidare i

grassi che è aumentata nei ratti alimentati con dieta iperlipidica, aumenta anche in presenza di DDE con entrambi i tipi di dieta. Nei ratti trattati con dieta iperlipidica, l'aumento della capacità di ossidare i grassi può essere dovuto alla stimolazione del pathway della palmitoil-carnitina da parte dell'eccesso di substrati lipidici provenienti dalla dieta, d'altra parte l'aumento di tale capacità in presenza di DDE (gruppi N+DDE e D+DDE) può essere dovuto alla necessità del fegato di far fronte alle aumentate richieste energetiche da parte dei processi di detossificazione. È interessante notare che, in seguito al trattamento cronico con il DDE, il fegato ossida gli acidi grassi come accade in altre situazioni di stress, quali condizioni di digiuno prolungato, di malattia, e durante i periodi di maggiore attività fisica. Tale aumento dell'ossidazione degli acidi grassi contribuisce probabilmente alla tendenza ad un minore accumulo di lipidi a livello epatico che si osserva nei ratti trattati con il DDE.

I livelli di stress ossidativo, infine, sono stati determinati misurando la produzione di acqua ossigenata ed il contenuto di perossidi lipidici. Per l'acqua ossigenata, la produzione è aumentata in tutti i gruppi sperimentali rispetto al controllo (figura 8a), anche i perossidi lipidici aumentano in tutti i gruppi sperimentali e in particolare nei gruppi trattati con DDE indipendentemente dalla dieta (figura 8b). Quest'innalzamento dei livelli nei gruppi trattati con il DDE indicano il maggior grado di stress che gli animali subiscono. Tali risultati sono in accordo con dati precedenti di letteratura che suggerivano che le specie reattive dell'ossigeno (ROS) e la perossidazione lipidica aumentano in seguito alla somministrazione di DDE (Nault et al., 2012). La generazione di ROS in siti dove abbondano i lipidi (D+DDE) a sua volta induce perossidazione lipidica con produzione di derivati aldeidici altamente reattivi (come la malondialdeide, MDA) che esercitano diversi effetti negativi sugli epatociti e danneggiano ulteriormente la catena respiratoria, direttamente o indirettamente attraverso il danno ossidativo al genoma mitocondriale. Questo genera nuovamente grandi quantità di ROS con l'instaurarsi di un circolo vizioso (Begrache et al., 2006). Probabilmente nei gruppi di ratti trattati con diete e DDE in cui sono abbondanti le ROS s'instaura un meccanismo di adattamento per cui viene indotto il disaccoppiamento mitocondriale (come dimostrato dalla diminuzione dei parametri  $q$  ed  $\eta$ ) per ridurre la differenza di voltaggio ai lati della membrana mitocondriale ed evitare il raggiungimento della soglia limite oltre la quale si generano le ROS. Questo meccanismo non riesce completamente ad evitare la formazione delle ROS ma probabilmente riduce l'aumento con andamento esponenziale.

## 6.2 Studi di morfologia e dinamica mitocondriale

### Indagine ultrastrutturale

Sezioni istologiche di fegato mostrano che il DDE danneggia gli epatociti inducendo vacuolizzazione, apoptosi o necrosi. Partendo da questi risultati sono andata ad indagare se la morfologia dei mitocondri e il contenuto di proteine della dinamica mitocondriale venissero alterate dal pesticida. Mi sono servita della microscopia elettronica per studiare l'ultrastruttura dei mitocondri e dei western blot per le variazioni del contenuto delle proteine della dinamica.

Ho misurato il diametro maggiore medio (dm) dei mitocondri con il sistema di analisi di immagine Axiovision (figura 9a) e li ho divisi in tre differenti popolazioni a seconda della loro lunghezza (<500 nm; 500-1000 nm; >1000 nm), calcolando per ogni gruppo in studio le percentuali di appartenenza per ognuna delle tre popolazioni (figura 9b).

Nel gruppo N i mitocondri sono tubulari o ovoidali, con creste lamellari e matrice mediamente densa agli elettroni (e<sup>-</sup>). Alcune immagini suggeriscono eventi sia di fusione che di fissione mitocondriale. Nel citoplasma si notano dei perossisomi (figura 10a).

Nel gruppo D i mitocondri presentano diametro minore di quelli del gruppo N (figura 9a), aspetto che spiegherò a proposito della dinamica mitocondriale. I mitocondri D mostrano matrice densa agli e<sup>-</sup>, creste "ad occhielli", cioè generalmente più corte e più dilatate. In diverse micrografie si possono cogliere più immagini riferibili a processi di fissione mitocondriale; nel citoplasma sono visibili gocce lipidiche intorno alle quali i mitocondri sembrano avvolgersi (figura 10b).

Nei gruppi trattati con il DDE, (D+DDE e N+DDE) i mitocondri mostrano vari gradi di alterazione dell'ultrastruttura. Accanto ad epatociti con mitocondri di aspetto normale sono evidenti mitocondri che presentano nello spazio intracristallino formazioni paracristalline (figura 11a), inoltre mitocondri "donut" a ciambella (figura 11a), altri con numero ridotto di creste, o con creste disorganizzate. Ancora si evidenziano mitocondri in vari stadi di degenerazione: la matrice diventa progressivamente più trasparente agli e<sup>-</sup>, le creste sembrano staccarsi dalla m.m.i. ed avere una disposizione più centrale (figura 11b). In altre immagini le creste sembrano letteralmente dissolversi nella matrice finché tutta la struttura del mitocondrio si perde ed esso sembra completamente vuoto (figura 11c). In altre micrografie è possibile osservare i punti di rottura della m.m.e con protusione della m.m.i. e l'erniazione della matrice (figura 11d-e-f). Nelle micrografie degli animali trattati con DDE si osservano più numerose immagini che suggeriscono fusione mitocondriale, numerosi perossisomi (figura 11g) e



diversi autofagosomi (figura 11h). Alcune cellule sembrano andare incontro a morte, infatti si possono osservare nuclei pre-apoptotici o apoptotici (figura 12).

Per quanto riguarda i mitocondri donut, la loro formazione sembra dovuta a condizioni di stress ossidativo in seguito a depolarizzazione della m.m.i e secondo Liu et al., in seguito all'apertura del poro di transizione di permeabilità (MPTP) (Liu et al., 2011).

Ancora, Ahmad et al. (2013) hanno evidenziato al microscopio confocale in cellule epiteliali di polmone umano, BEAS-2B, tre differenti forme di mitocondri, tubulari, donut e rotondi "blob" dopo trattamento con rotenone, inibitore del complesso I, e di antimicina, inibitore del complesso III, per provocare un aumento della generazione di ROS. In condizioni normali le cellule presentano mitocondri tubulari; una condizione di stress moderato, invece, provoca la trasformazione in donut; il blob, invece, si ottiene in condizione di forte stress ossidativo. Mentre la forma donut è reversibile e le cellule non vanno in apoptosi, la blob è irreversibile. Gli autori concludono che la forma donut dei mitocondri può essere un marker precoce dello stress cellulare, mentre la blob un marker di irreversibile tossicità. Nelle immagini di microscopia elettronica è più difficile riconoscere la forma blob perché molte sezioni trasversali di mitocondri tubulari possono dare la falsa impressione di essere perfettamente rotondi. Per quel che concerne le varie forme di degenerazione mitocondriale esse rappresentano vari aspetti della transizione di permeabilità mitocondriale con l'apertura del poro, seguita dalla rottura della m.m.e. (Halestrap et al., 2006; Sesso et al., 2012).

La rottura della m.m.e. è preceduta o seguita secondo altri autori (Kaasik et al., 2006) dalla transizione di permeabilità (MPT) della m.m.i. dovuta alla sua improvvisa perdita di permeabilità selettiva che permette l'entrata di molecole di soluto <1,5 KDa e che produce rigonfiamento dei mitocodri (swelling) a causa dell'acqua richiamata nella matrice, eventi causati dal MPTP, poro che è un canale proteico fra la m.m.i. e quella esterna. I primi studi sul MPTP sono stati eseguiti in cellule epatiche, cardiache e nervose e collegati a morte cellulare (Bernardi et al., 1999; Ouyang et al., 1997). La MPT riconosce come agenti effettori lo stress ossidativo e uno squilibrio nel livello di  $Ca^{+2}$  mitocondriale (Halestrap et al., 2006; Sesso et al., 2012). Il DDE provoca stress ossidativo come dimostrato dall'aumento dell' $H_2O_2$  e della perossidazione lipidica per cui anche nei mitocondri del fegato dei ratti trattati con DDE è presente una certa percentuale di MPT, che può essere reversibile dopo l'insulto, per esempio senza provocare la rottura della m.m.i. o irreversibile condannando l'epatocita a morte (Halestrap 2006). Nel corso di questo studio ho potuto verificare che negli animali trattati con il DDE avviene certamente l'apoptosi ma non è così massiccia da compromettere tutto il fegato, almeno nel corso delle 4 settimane di trattamento, quindi posso concludere che

la MPTP è per lo più reversibile ed il poro si chiude permettendo in molti casi la vitalità cellulare.

### **Indagine tramite western blot**

L'analisi densitometrica delle proteine della dinamica mitocondriale tramite western blot, mostra che esse variano nei differenti gruppi in studio. In tutti i gruppi in trattamento, sia quelli con la semplice dieta che quelli con DDE, si ha un aumento significativo della proteina di fissione Drp1 (figura 13a) rispetto al gruppo N; il valore significativamente più elevato è presente nel gruppo D+DDE. Il contenuto di Mfn2, proteina coinvolta nella fusione, nel gruppo D è significativamente il più basso di tutti gli altri gruppi, mentre è significativamente più elevato negli animali trattati con DDE, in particolare è massimo nel gruppo D+DDE (figura 13b). Considerando la tabella delle percentuali (figura 9b) e la lunghezza media dei mitocondri dei gruppi in studio (figura 9a), la minore lunghezza dei mitocondri del gruppo D dovuta ad una maggiore fissione conferma il lavoro di Lionetti et al., 2014 sulle diete iperlipidiche come meccanismo di adattamento per ossidare una maggiore quantità di grassi. Il dm più grande dei mitocondri dei gruppi trattati con DDE che presentano un maggior contenuto sia di Drp1 che di Mfn2 mi fa ipotizzare che questi animali mettano in atto, anche in questo caso, un meccanismo di adattamento contro lo stress ossidativo indotto dal pesticida, dando impulso alla biogenesi mitocondriale per opporsi all'effetto del DDE che, come abbiamo visto, fa degenerare una certa percentuale di mitocondri. Nel caso degli N+DDE forse c'è anche una maggiore tendenza alla fusione per recuperare mitocondri che hanno perduto in parte molecole importanti, che riacquistano proprio fondendosi con altri organelli integri.

Molte micrografie elettroniche mostrano perdita di creste e disorganizzazione delle stesse. Nel rimodellamento delle creste interviene la proteina della dinamica mitocondriale OPA1. L'analisi densitometrica del western blot dei lisati mitocondriali per OPA1 (figura 14), mostra una diminuzione dell'isofoma OPA1-L (100 KDa) negli animali trattati col DDE rispetto agli animali N, e come a questo corrisponda un aumento dell'isoforma corta di OPA1-S (80 KDa).

Con la tecnica del BNPAGE, gel effettuato in condizioni native, ho messo in evidenza gli oligomeri di OPA1 nei vari gruppi di animali a circa 360 KDa e 480 KDa, il cui contenuto diminuisce nei ratti trattati, rispetto agli N (figura 15a). Per vedere poi, il contenuto delle varie isoforme di OPA1 negli oligomeri ho effettuato una seconda dimensione in condizioni

denaturanti (figura 15b) ruotando la lane di interesse della prima dimensione, come descritto in precedenza nella sezione Materiali e Metodi.

I risultati dell'analisi densitometrica mi hanno permesso di notare come, nei ratti di controllo (N) ci sia una maggiore presenza di OPA1-L (100 KDa) e una minore di OPA1-S (80 KDa); nei trattati c'è una diminuzione di OPA1-L (100 KDa) e un aumento di OPA1-S (80 KDa) graduale da D fino a N+DDE. Quando OPA1 è assemblata negli oligomeri mantiene chiuse le giunzioni delle creste, quando invece l'isoforma L viene scissa, si disassemblano gli oligomeri, facendo aprire le giunzioni delle creste (Naotada et al., 2006; Frezza et al., 2006). Dunque, posso ipotizzare, tenendo a mente anche le immagini di microscopia elettronica, che lo stress ossidativo ha causato la scissione proteolitica di OPA1-L, la disoligomerizzazione del complesso e in alcuni casi portando alla scomparsa delle creste con rilascio del citocromo c che potrebbe dare il via al processo apoptotico. Questo ruolo di OPA1 è assolutamente indipendente da quello sulla fusione.

A questo punto mi è corso l'obbligo di valutare se fosse avvenuto il rilascio di citocromo c sia nei lisati di soli mitocondri che nei lisati citosolici. L'analisi densitometrica dei western blot ha mostrato che ad una diminuzione di citocromo c a livello mitocondriale negli animali trattati col DDE, corrisponde un aumento di citocromo c a livello citosolico (figura 16). Questo dato concorda con gli altri risultati da me ottenuti, mostrando come negli animali trattati con DDE si abbia maggiore rilascio di citocromo c ed apoptosi, dato che conferma quanto già riportato in letteratura (Olichon et al., 2003).

Come ulteriore conferma dell'innescamento dell'apoptosi, ho valutato l'espressione del marker più tardivo dell'apoptosi, Chop/Gadd153, e i risultati ottenuti sia per quanto riguarda l'mRNA tramite real-time PCR (figura 17a) che la proteina tramite western blot (figura 17b), mostrano un aumento significativo di entrambi negli animali trattati con DDE. La scelta di Chop, oltre al suo ruolo di indurre l'apoptosi (Maytin et al., 2001) è dovuta al fatto che recentemente tale fattore si è rivelato come un elemento di risposta dello stress mitocondriale attivando la trascrizione di geni di chaperonine mitocondriali (Quan Zhao et al., 2002).

## Risultati relativi al testicolo

### 6.3 Studi di funzionalità mitocondriale

Anche a livello testicolare, ho innanzitutto effettuato la valutazione delle capacità respiratorie dei mitocondri isolati dal testicolo dei ratti *in vivo*.

Per quanto riguarda il peso del testicolo (figura 18), non si osserva nessuna variazione significativa tra i diversi gruppi sperimentali.

Mi sono poi soffermata a valutare gli effetti dei diversi trattamenti sulla funzionalità mitocondriale nel testicolo.

Per quanto riguarda la funzionalità respiratoria dei mitocondri isolati dal testicolo, nelle figure 19a, 19b, 19c, sono riportati i risultati relativi alle capacità respiratorie in presenza di piruvato (substrato che fornisce informazioni relative alla via respiratoria NADH-linked). Sono riportati dati relativi allo stato 4 (in assenza di ADP) (figura 19a), allo stato 3 (in presenza di ADP) (figura 19b) ed il rapporto di controllo respiratorio o RCR (dato dal rapporto stato3/stato 4), che è indice di integrità dei mitocondri (figura 19c). Dopo 4 settimane di trattamento non si ha nessuna variazione significativa dello stato 4 della respirazione in presenza di piruvato, anche se si osserva una tendenza alla diminuzione nei due gruppi di ratti trattati con DDE (figura 19a). Variazioni significative tra i gruppi sperimentali si osservano, invece, per quanto riguarda lo stato 3 (figura 19b). In particolare si osserva una diminuzione significativa della respirazione in stato 3 in entrambi i gruppi trattati con DDE. Infatti nei ratti N+DDE si osserva una diminuzione dello stato 3 del 35% rispetto ai ratti di controllo N, mentre nei ratti D+DDE si osserva una diminuzione dello stato 3 del 44% rispetto ai ratti alimentati solo con una dieta iperlipidica (D). Anche l'indice di integrità mitocondriale RCR, si riduce significativamente in entrambi i gruppi trattati con il DDE (figura 19c), infatti nei ratti N+DDE si osserva una diminuzione dello stato 3 del 27% rispetto ai ratti di controllo N, mentre nei ratti D+DDE si osserva una diminuzione dello stato 3 del 19% rispetto ai ratti alimentati solo con una dieta iperlipidica (D). Questi risultati indicano che, il trattamento cronico *in vivo* con dosi basse di DDE per 4 settimane porta a diminuzioni delle capacità respiratorie in presenza di piruvato, in particolare dello Stato 3 con conseguente diminuzione dell'RCR, indice di integrità mitocondriale. Questi miei dati concordano con quelli di Mota et al. (2011) sugli effetti del DDE sui mitocondri del testicolo. Fra gli effetti che il pesticida potrebbe esercitare vi è la ridotta motilità degli spermatozoi dal momento che esiste una correlazione tra la percentuale di motilità degli spermatozoi e la funzionalità mitocondriale (Ferramosca et al., 2012).

#### **6.4 Studi di dinamica mitocondriale, morfologia e funzionalità testicolare.**

Per semplicità ho suddiviso gli stadi del ciclo spermatogenetico in fase precoce, E (stadi I-VI) fase di maturazione, M (stadi VII-VIII, che corrisponde al rilascio degli spermatozoi nel lume del tubulo seminifero) e fase tardiva, L (stadi IX-XIV). Non vi sono grosse differenze fra i testicoli N e quelli trattati. Spesso le differenze sono sottili e non facilmente apprezzabili. Le immunocolorazioni evidenziano immunoreattività per tutte e tre le proteine della dinamica mitocondriale in studio. La presenza di immunoreattività per tali proteine è cellulo-specifica e stadio specifico. L'immunocolorazione per OPA1 (figura 20a) mostra la sua localizzazione sia nelle cellule di Sertoli, sia negli spermatidi allungati negli stadi più precoci (E); negli spermatociti primi e negli spermatidi allungati nella fase di maturazione (M); nel citoplasma delle cellule di Sertoli e negli spermatidi allungati negli stadi medio-tardivi (ML).

Honda e Hirose (2003) hanno ritrovato elevate espressione di Drp1 e Mfn2 nel testicolo di ratti prepuberali ed adulti. Secondo gli autori i continui cicli di fusione e fissione porterebbero ad una omogenizzazione dei mitocondri in un preciso stadio della spermatogenesi (spermatidi rotondi ed allungati, VIII-XII). Anche se non si è compreso il significato di questo fenomeno, gli autori lo collegano alla necessità di omogenizzare la popolazione di mitocondri paterni per ubiquitarli in modo da poter essere poi eliminati nel citoplasma della cellula uovo, assicurando così l'eredità mitocondriale materna (Honda e Hirose., 2003). Naturalmente la presenza delle proteine della dinamica mitocondriale durante la spermatogenesi può essere correlata all'esigenza della ripartizione dei mitocondri durante le divisioni cellulari e quando si distribuiscono lungo l'assonema con andamento a spirale.

Dall'analisi densitometrica dei western blot per Drp1 si osserva che il contenuto di tale proteina è massimo negli esemplari N+DDE seguito dai D+DDE (figura 21a) ed è significativo rispetto agli altri due gruppi in studio. Per la Mfn2 il contenuto significativamente più elevato è presente negli N+DDE (figura 21b). Vi sono chiaramente delle differenze rispetto al fegato fra queste proteine che mostrano una specificità di organo, ma comunque anche qui nei ratti trattati con il DDE si manifesta una tendenza a favorire cicli di fissione e fusione (Honda e Hirose, 2003).

L'analisi densitometrica dei western blot di lisati citosolici per OPA1-L ed OPA1-S, mostra una graduale e significativa riduzione di OPA1-L, che è massima in N+DDE, mentre un significativo aumento di OPA1-S rispetto ad N e D si evidenzia nei ratti trattati con DDE. Come nel fegato, quindi, questa proteina subisce la scissione proteolitica di OPA1-L e disoligomerizza (figura 22a). Anche l'analisi densitometrica di lisati citosolici del western per il citocromo c evidenzia come esso aumenti significativamente negli animali trattati con DDE

rispetto agli N (figura 22b) Anche nel testicolo c'è liberazione di citocromo c nel citoplasma con possibile innesco del processo apoptotico. Immunocolorazioni per la caspasi 3 attivata (figura 23) mostrano una marcata positività per le cellule di Sertoli, spermatociti e spermatidi allungati. In letteratura ci sono diversi lavori che descrivono l'induzione dell'apoptosi da parte del DDE sulle cellule del testicolo ed in particolare delle Sertoli (Song et al., 2008; Shi et al., 2009; Shi et al., 2013).

Dal momento che, i mitocondri nel testicolo sono importanti per la produzione di androgeni in quanto una delle prime tappe del processo di steroidogenesi avviene a livello mitocondriale, mi sono chiesta se in questi mitocondri con l'attività respiratoria depressa potesse essere inficiata la sintesi degli androgeni. Per questo ho determinato i livelli di testosterone circolanti mediante dosaggio Elisa. La produzione di androgeni è ridotta, come è possibile notare in figura 24a, soprattutto negli animali trattati col DDE, confermando il ruolo anti-androgenico del pesticida (Roy et al., 2004). Inoltre, le cellule di Leydig (figura 24b) che sono la sede della produzione del testosterone, negli animali trattati col DDE sono ipotrofiche, più piccole rispetto a quelle degli animali non trattati col DDE (Schell et al., 2014).

Un abbassamento del livello degli androgeni si può evidenziare anche a livello morfologico andando a ricercare variazioni anche sottili di quegli aspetti istologici che dipendono proprio da un'adeguata secrezione di androgeni. La presenza di spermatidi allungati a livello basale nel citoplasma delle cellule di Sertoli (figura 25) è indice di ritenzione degli spermatidi dovuta alla diminuzione di testosterone; infatti quando si abbassa il livello di testosterone, si ha un ritardo nel rilascio degli spermatozoi, gli spermatozoi vengono rilasciati più lentamente ed alcuni spermatidi sono trattiene a livello basale e poi fagocitati nelle cellule di Sertoli. Un altro fenomeno a cui si assiste in questi casi, è il rilascio di un gran numero di cellule non mature nel lume dei tubuli seminiferi (Russell and Clermont, 1977).

## CONCLUSIONI

Nel corso dei tre anni di dottorato ho studiato gli effetti del pesticida 2,2-Bis(4-Clorofenil)-1,1-Dicloroetilene (DDE) ancora presente nell'ambiente a causa della sua lenta degradazione e della capacità di bioaccumularsi nei tessuti animali.

Ho effettuato questa ricerca per verificare se i mitocondri sono sensibili all'azione dei pesticidi da poter essere usati come biomarkers di danno tossicologico. A questo scopo ho cercato di chiarire come il DDE agisca sulla bioenergetica mitocondriale e se provochi alterazioni a carico della morfologia e della dinamica mitocondriale, e se, infine, tali alterazioni possano o meno danneggiare o portare a morte le cellule degli organi interessati.

Il mio protocollo di ricerca, ha previsto studi *in vitro* isolando mitocondri da epatociti e trattandoli con una singola forte dose di DDE, e studi *in vivo* ed *ex vivo* isolando mitocondri da fegato e testicolo di ratti alimentati con differenti tipi di diete e/o con aggiunta di DDE per quattro settimane.

Gli studi *in vitro* con una dose acuta di DDE sulla bioenergetica mitocondriale hanno mostrato una significativa diminuzione delle capacità respiratorie (danneggiando sia la via respiratoria FADH<sub>2</sub>-linked che quella NADH-linked), una significativa diminuzione della capacità di ossidare gli acidi grassi e un severo danno all'integrità dei mitocondri.

Il trattamento cronico *ex vivo* ed *in vivo* con dosi basse di DDE per 4 settimane ha provocato una serie di effetti di seguito riportati.

- a) Un aumento della capacità di ossidare acidi grassi probabilmente utile a rispondere all'aumentata richiesta energetica per i processi di detossificazione.
- b) Un aumento del grado di disaccoppiamento come suggerito dall'aumento dello stato 4 (in assenza di ADP) e dalla diminuzione del grado di accoppiamento (q); tale disaccoppiamento è utile, perlomeno fino ad un certo limite, a rallentare l'aumento delle ROS dovuto alla disfunzione mitocondriale.
- c) Comunque un danno, anche se mediamente moderato, all'integrità mitocondriale (diminuzione dell'RCR), che i mitocondri cercano di riparare aumentando la biogenesi, cioè aumentando sia i processi di fusione che di fissione, come dimostrano l'aumento di Drp1 e di Mfn2.
- d) Stress ossidativo come dimostrato dall'aumento dell'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e della perossidazione lipidica.
- e) Un aumento dell'apoptosi in alcuni gruppi di epatociti, come dimostrato dall'aumento del citocromo c liberato nel citosol probabilmente in seguito alla scissione dell'isoforma L della proteina OPA1, che si riduce, mentre aumenta l'isoforma corta

S, portando al disassemblaggio dell'oligomero di OPA1, che, quando è integro, tiene chiuse le giunzioni delle creste. OPA1 è responsabile sia della fusione della m.m.i. sia del rimodellamento delle creste.

- f) Le micrografie elettroniche mostrano, negli epatociti di animali trattati con il DDE, la presenza di mitocondri alterati in vario grado. Sono presenti mitocondri *donut* (mitocondri a forma di ciambella che si formano in condizioni di stress), mitocondri con creste disorganizzate o con poche creste e anche mitocondri che presentano l'apertura del poro di transizione di permeabilità, spesso con rottura della m.m.e. Queste immagini insieme con il disassemblaggio degli oligomeri di OPA1 e il rilascio di citocromo c concorrono ad indicare che viene innescata l'apoptosi. Però sappiamo dalla letteratura che non tutte le cellule che presentano mitocondri in tali condizioni vanno incontro a morte, se il poro si chiude infatti la cellula sopravvive.
- g) Anche l'aumento del messaggero e della proteina di Chop/Gadd153 un marker tardivo dell'apoptosi conferma che nei ratti trattati con DDE si ha un aumento dell'apoptosi, rispetto agli animali di controllo.

Per quanto ho illustrato, posso ipotizzare che, *in vivo* il trattamento cronico con il DDE da un lato provoca stress ossidativo che induce un certo grado di apoptosi, dall'altro gli animali rispondono con una serie di meccanismi adattativi quali un moderato disaccoppiamento mitocondriale che permette di abbassare lo stress ossidativo, un'aumentata capacità di ossidare i grassi per ricavare energia per i processi di detossificazione ed un aumento della biogenesi mitocondriale. Anche un certo grado di apoptosi può essere fisiologico e viene messo in atto proprio per eliminare le cellule con mitocondri irrimediabilmente danneggiati.

Il trattamento cronico *in vivo* con DDE ha indotto delle variazioni di funzionalità mitocondriale anche a livello del testicolo, con un mediamente modesto danno all'integrità mitocondriale. Tale danno è correlato anche alla diminuzione dei livelli di testosterone poiché il primo step del processo di steroidogenesi avviene a livello mitocondriale. Tuttavia, anche nel testicolo i mitocondri mettono in atto un meccanismo di adattamento, aumentando i cicli di fusione e fissione come ho potuto osservare dall'aumento delle proteine della dinamica mitocondriale Drp1 e Mfn2. Come per il fegato anche nel testicolo ho riscontrato, un aumento dell'isoforma S di Opa1 con aumento di citocromo c citosolico e maggiore reattività per la caspasi 3 attivata nelle immunocolorazioni, rispetto ai ratti di controllo. Questo mi ha permesso di concludere che, anche a livello testicolare c'è un incremento degli eventi apoptotici tramite la via mitocondriale.



Posso, quindi, concludere affermando che i mitocondri si dimostrano sensibili biomarkers del danno da pesticidi e che il DDE agisce su di essi in maniera dose-dipendente, inibendo a dosi alte sia il complesso I che II della catena respiratoria e danneggiando seriamente la loro integrità; a dosi basse il danno provocato dal DDE è generalmente modesto, esso agisce principalmente come disaccoppiante, provocando modificazioni delle proteine della dinamica mitocondriale che tentano di ristabilire l'omeostasi con cicli di fusione e fissione che incidono sulla morfologia mitocondriale.

I risultati del trattamento col dde forniscono un'ulteriore conferma che i veleni mitocondriali alterano la loro morfologia e che questa riflette un'alterazione degli stati funzionali dei mitocondri.

## Tavole

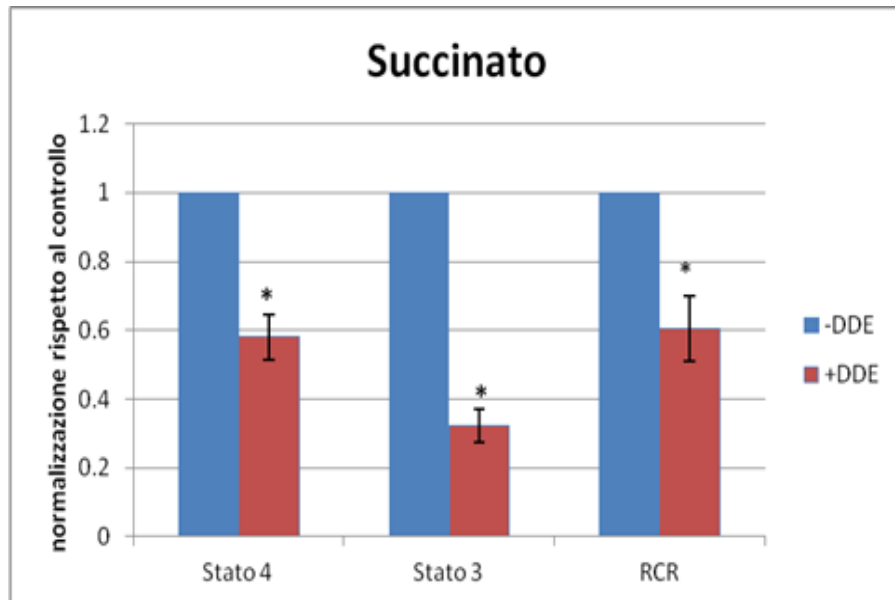
---

## TAVOLE

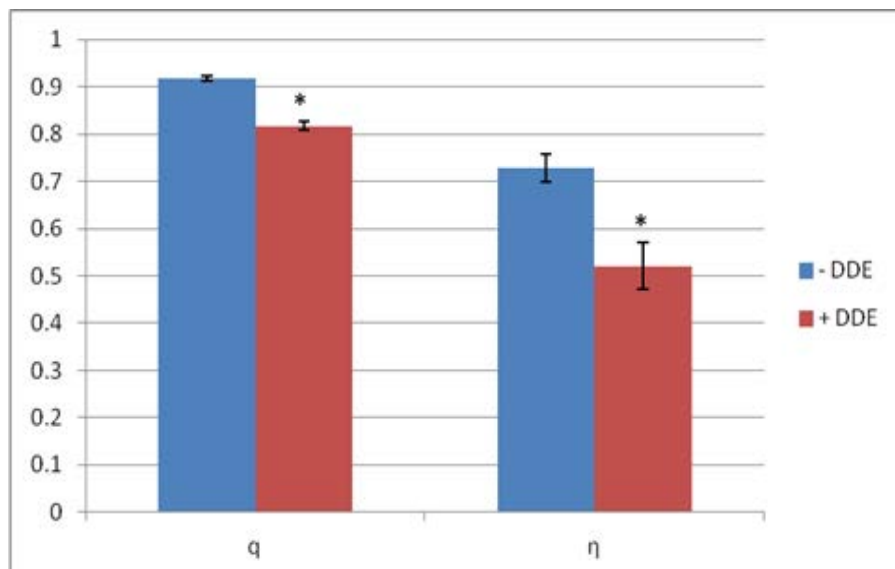
### FIGURA 1: EFFETTO DEL DDE *IN VITRO*.

Effetto sulle capacità respiratorie mitocondriali in presenza di un substrato del pathway FADH<sub>2</sub>-linked e sul grado di accoppiamento.

a)



b)



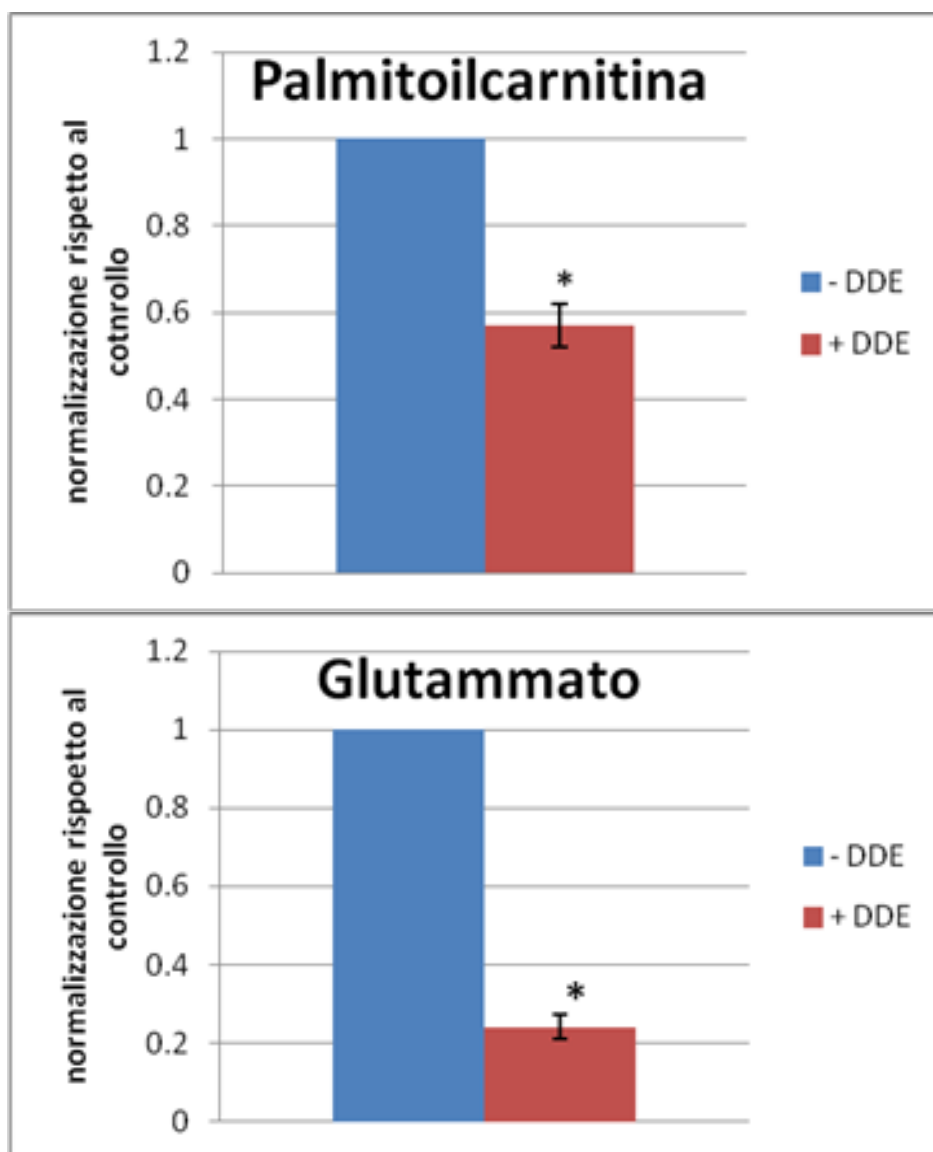
I dati sono relativi a 8 differenti esperimenti e sono espressi come medie ± ES.

I dati dello stato 3, stato 4 ed RCR sono stati espressi in nmoli di O<sub>2</sub> al minuto per mg di proteine mitocondriali e successivamente normalizzati rispetto ai dati ottenuti in assenza di DDE.

\*P<0,05 rispetto al risultato in assenza di DDE.

## FIGURA 2 : EFFETTO DEL DDE *IN VITRO*.

Effetto sulle massime capacità respiratorie mitocondriali usando come substrato il glutammato (via NADH-linked) e palmitoilcarnitina (ossidazione degli acidi grassi).



I dati sono relativi a 8 differenti esperimenti e sono espressi come medie  $\pm$  ES.

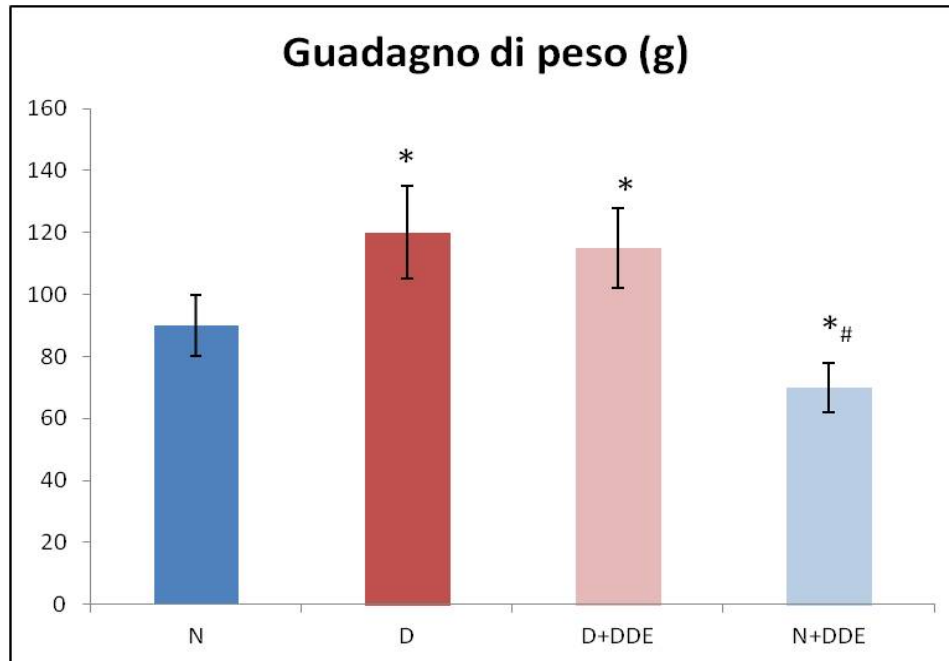
I dati sono stati espressi in nmoli di  $O_2$  al minuto per mg di proteine mitocondriali e successivamente normalizzati rispetto ai dati ottenuti in assenza di DDE.

\* $P < 0,05$  rispetto al risultato in assenza di DDE.

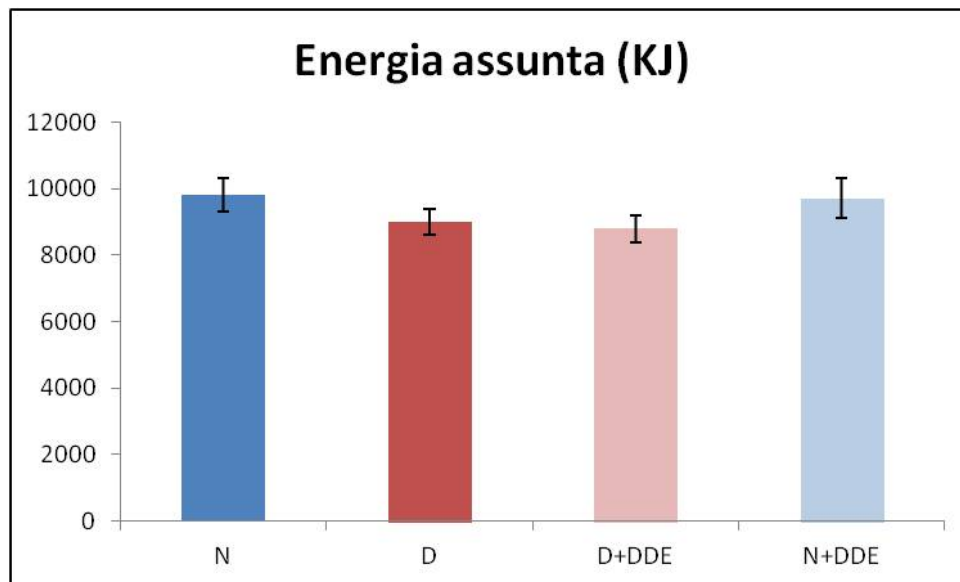
### FIGURA 3: EFFETTO DEL DDE *IN VIVO* (4 SETTIMANE).

Effetto della somministrazione simultanea di DDE e dieta iperlipidica sul guadagno di peso corporeo e sull'assunzione di energia.

a)



b)



I dati sono relativi a 8 differenti ratti per gruppo e sono espressi come medie  $\pm$  ES.

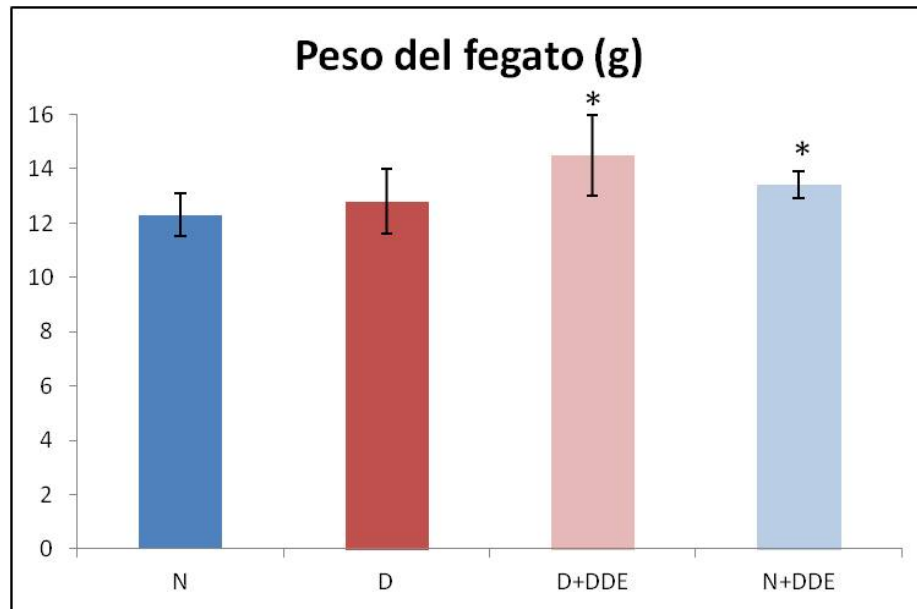
\* $P < 0,05$  rispetto ai ratti trattati con dieta standard (N).

# $P < 0,05$  rispetto ai ratti trattati con dieta standard + DDE (N+DDE).

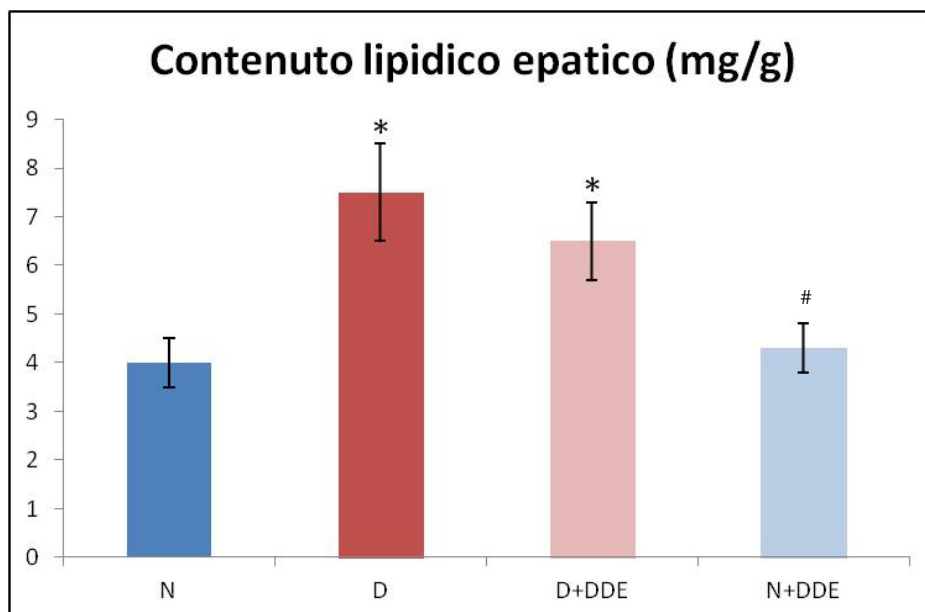
**FIGURA 4: EFFETTO DEL DDE *IN VIVO* (4 settimane).**

Effetto della somministrazione simultanea di DDE e dieta iperlipidica sul peso del fegato e sul contenuto lipidico.

a)



b)



I dati sono relativi a 8 differenti ratti per gruppo e sono espressi come medie  $\pm$  ES.

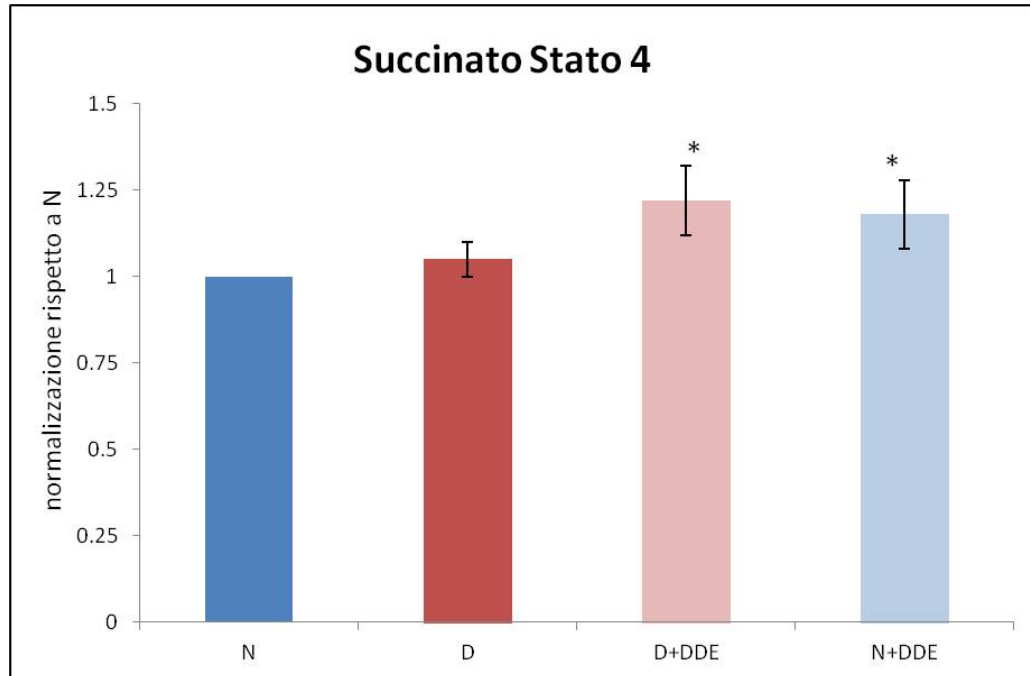
\* $P < 0,05$  rispetto ai ratti trattati con dieta standard (N).

# $P < 0,05$  rispetto ai ratti trattati con dieta iperlipidica (D).

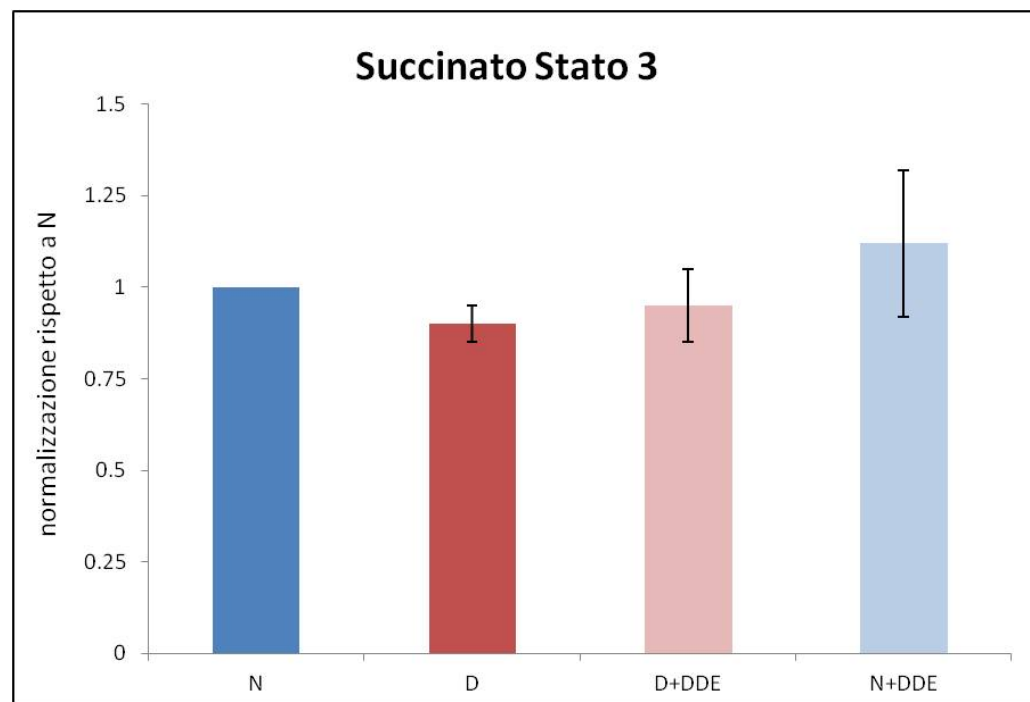
**FIGURA 5: EFFETTO DEL DDE *IN VIVO* (4 settimane).**

Effetto della somministrazione simultanea di DDE e dieta iperlipidica sulle capacità respiratorie mitocondriali in presenza di un substrato del pathway FADH<sub>2</sub>-linked.

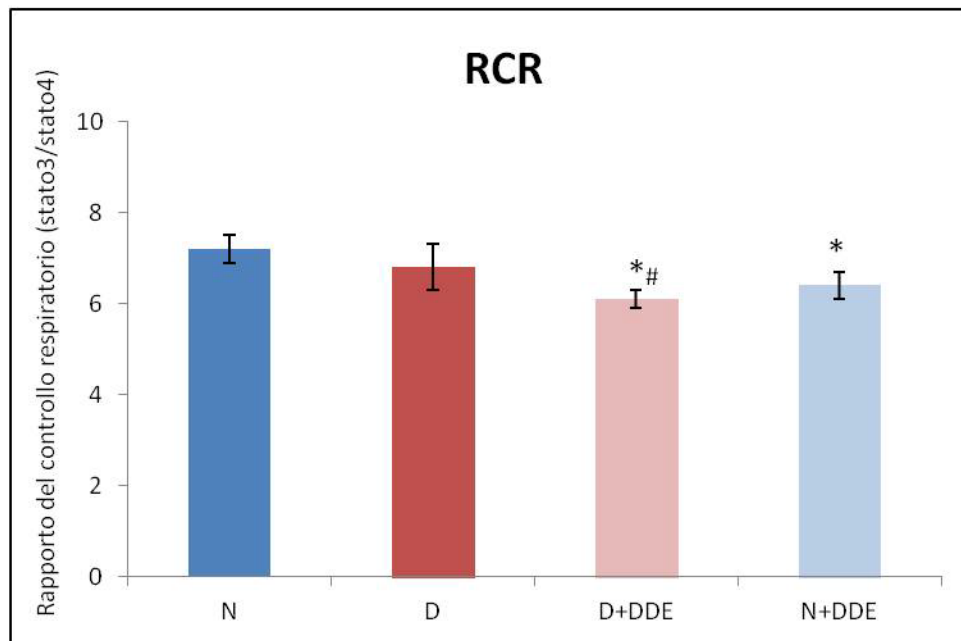
a)



b)



c)



I dati sono relativi a 8 differenti ratti per gruppo e sono espressi come medie $\pm$  ES.

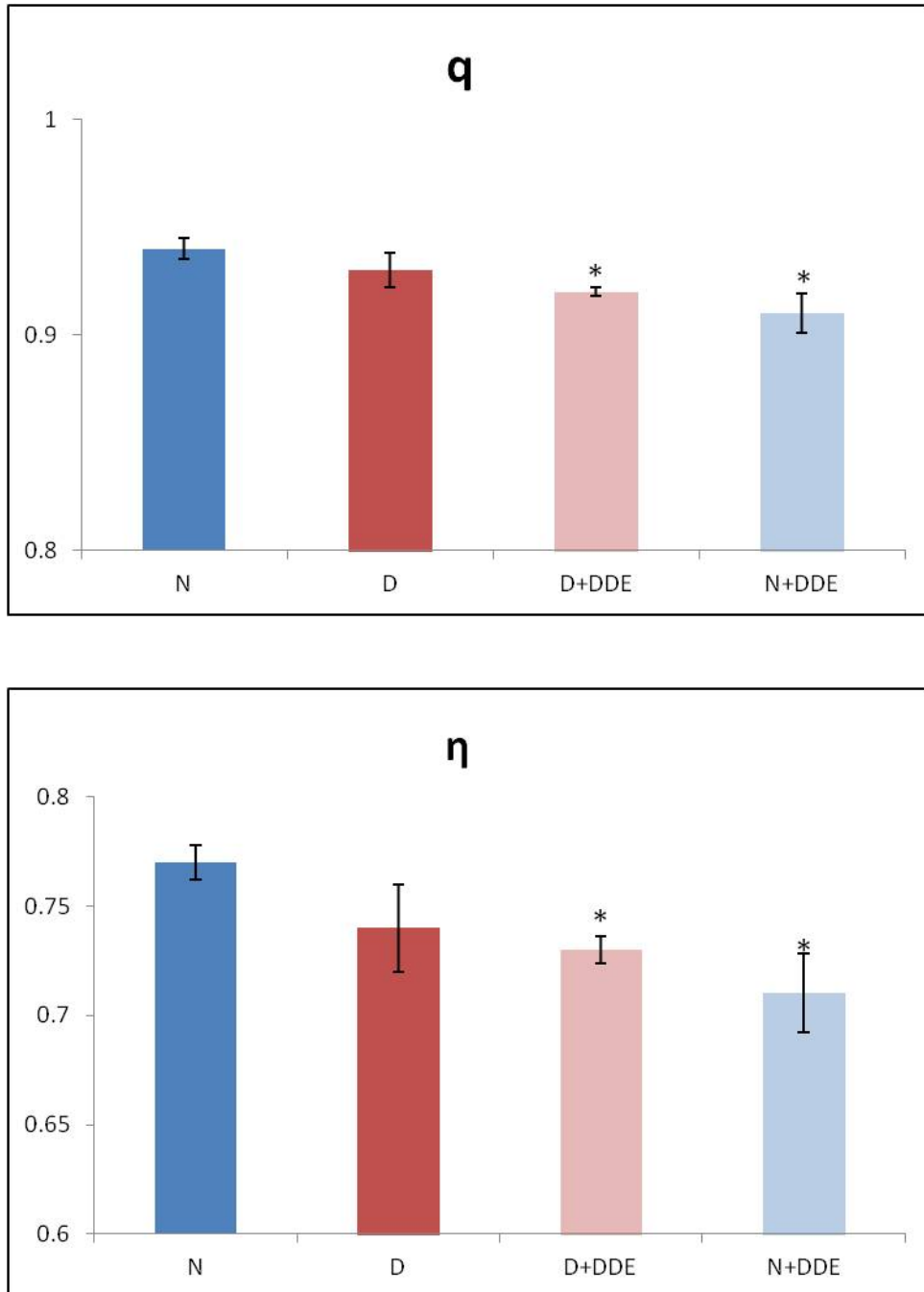
\*P<0,05 rispetto ai ratti trattati con dieta standard (N).

#P<0,05 rispetto ai ratti trattati con dieta iperlipidica (D).



**FIGURA 6: EFFETTO DEL DDE *IN VIVO* (4 settimane).**

Effetto della somministrazione simultanea di DDE e dieta iperlipidica sul grado di accoppiamento mitocondriale.



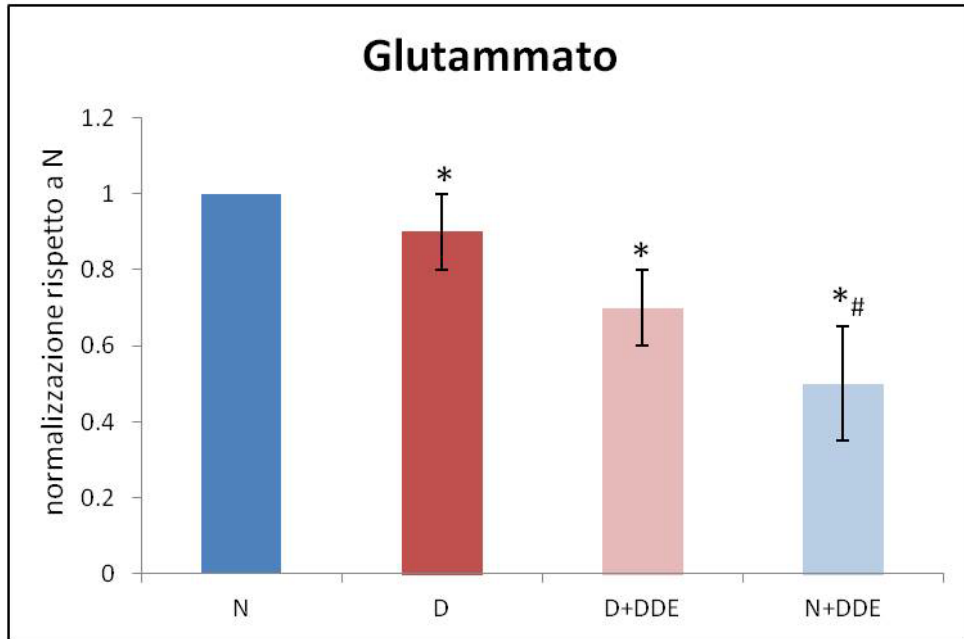
I dati sono relativi a 8 differenti ratti per gruppo e sono espressi come medie  $\pm$  ES.

\* $P < 0,05$  rispetto ai ratti trattati con dieta standard (N).

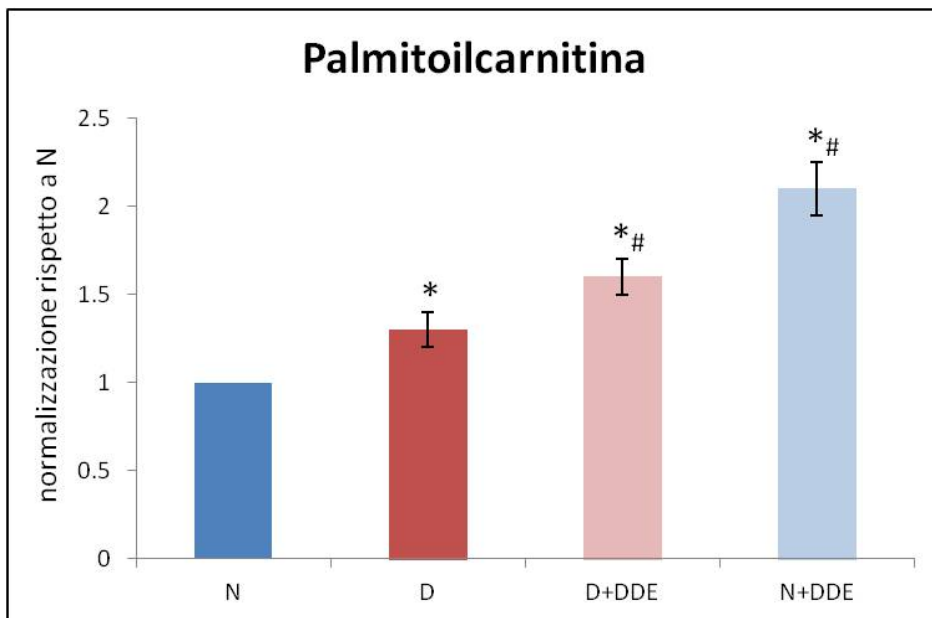
**FIGURA 7: EFFETTO DEL DDE *IN VIVO* (4 settimane).**

Effetto della somministrazione simultanea di DDE e dieta iperlipidica sulle massime capacità respiratorie mitocondriali usando come substrato il glutammato (via NADH-dipendente) e palmitoilcarnitina (ossidazione degli acidi grassi).

a)



b)



I dati sono relativi a 8 differenti ratti per gruppo e sono espressi come medie  $\pm$  ES.

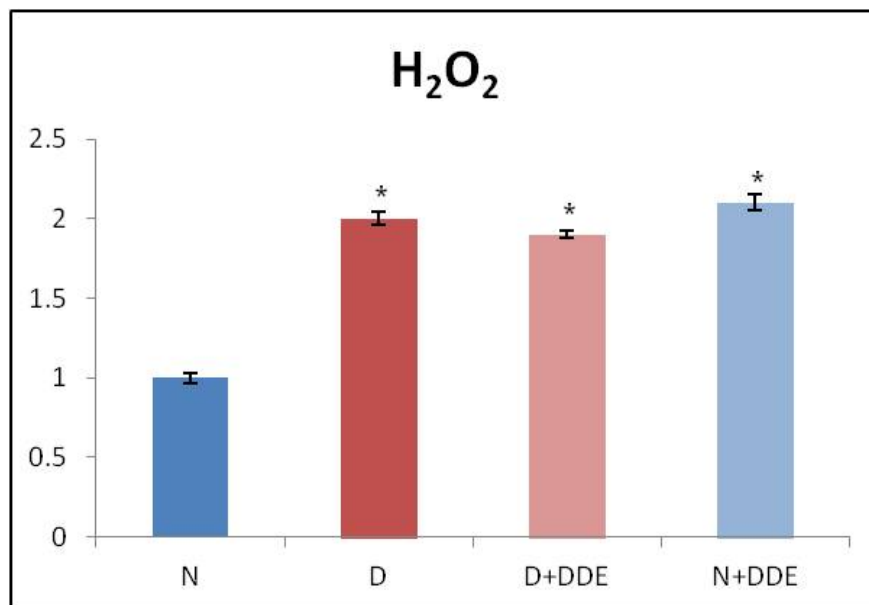
\* $P < 0,05$  rispetto ai ratti trattati con dieta standard (N).

# $P < 0,05$  rispetto ai ratti trattati con dieta iperlipidica (D).

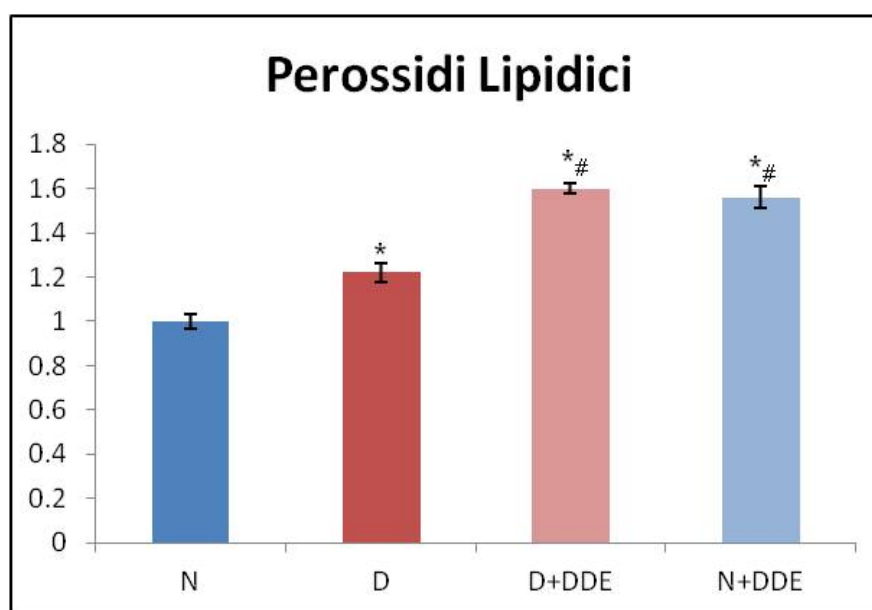
**FIGURA 8: EFFETTO DEL DDE *IN VIVO* (4 settimane).**

Effetto della somministrazione simultanea di DDE e dieta iperlipidica sulla produzione di ROS e di perossidi lipidici.

a)



b)



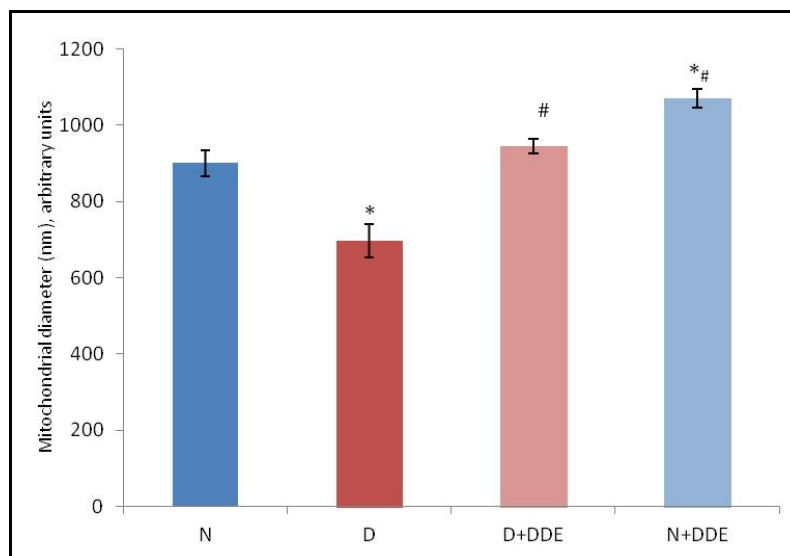
I dati sono relativi a 8 differenti ratti per gruppo e sono espressi come medie  $\pm$  ES.

\*P<0,05 rispetto ai ratti trattati con dieta standard (N).

#P<0,05 rispetto ai ratti trattati con dieta iperlipidica (D).

**FIGURA 9:** Diametro mitocondriale maggiore medio (a) e percentuali delle tre popolazioni di mitocondri (con diametro <500 nm, compreso tra 500 e 1000 nm, >500 nm) per ciascun gruppo di animali (b).

a)



I dati sono relativi a 8 differenti ratti per gruppo e sono espressi come medie  $\pm$  ES.

\* $P < 0,05$  rispetto ai ratti trattati con dieta standard (N).

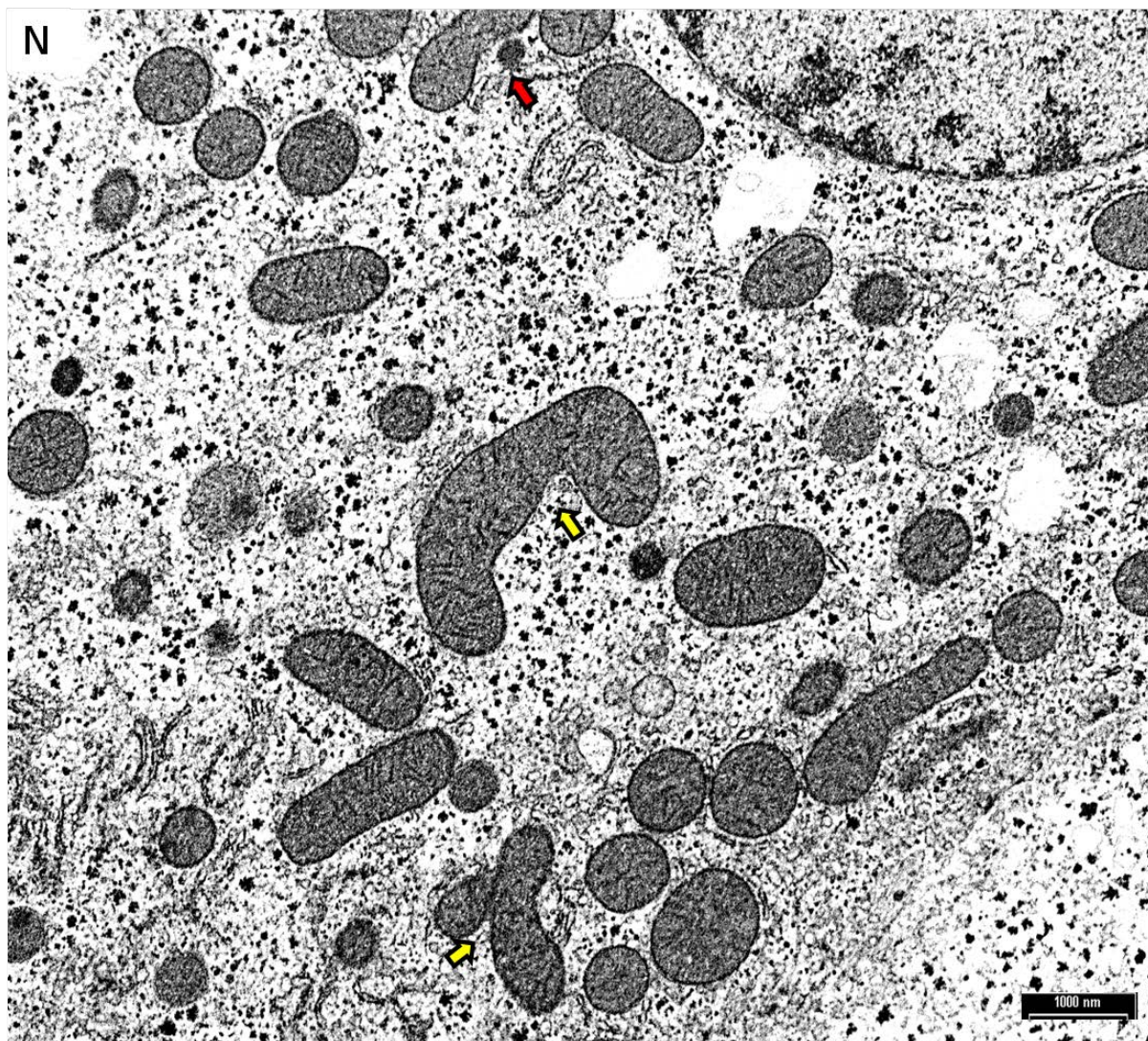
# $P < 0,05$  rispetto ai ratti trattati con dieta iperlipidica (D).

b)

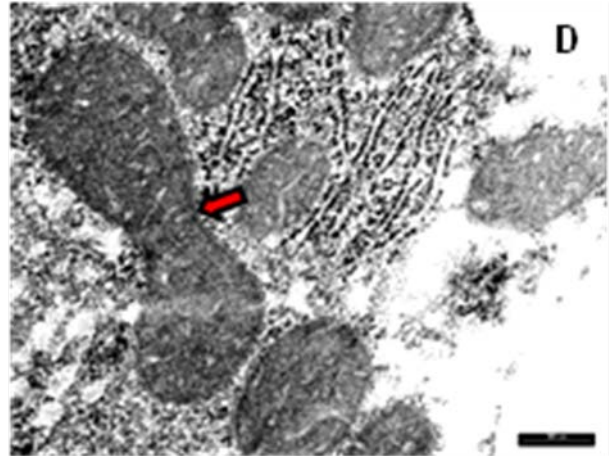
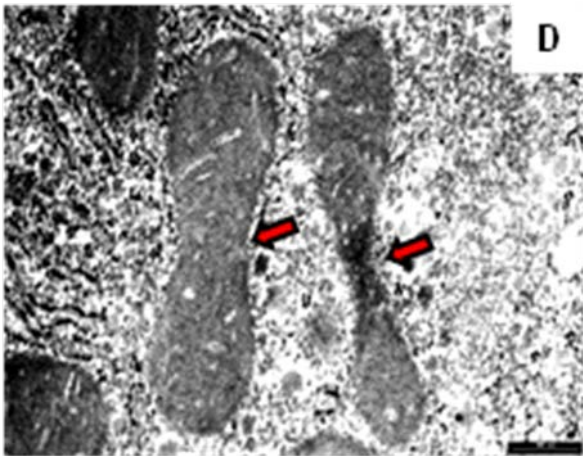
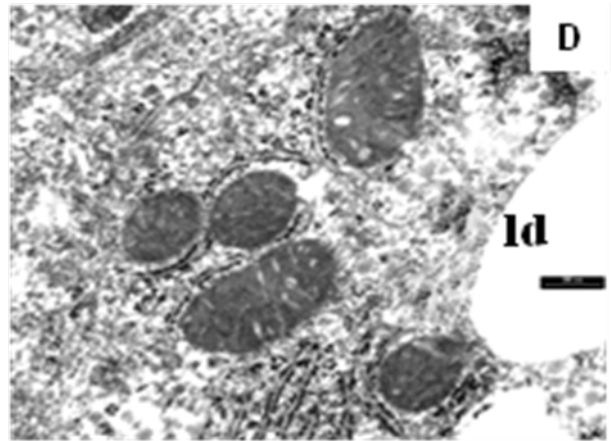
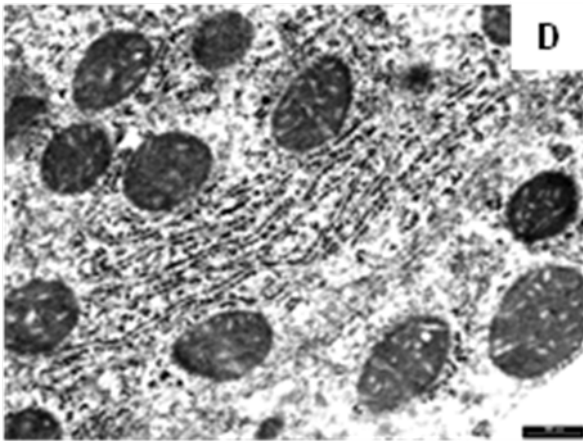
<b>Diametro Mitocondri (nm)</b>	<b>%</b>
<b>N &lt;500</b>	<b>9%</b>
<b>D &lt;500</b>	<b>28%</b>
<b>D+DDE &lt;500</b>	<b>6%</b>
<b>N+DDE &lt;500</b>	<b>2%</b>
<b>N 500-1000</b>	<b>65%</b>
<b>D 500-1000</b>	<b>59%</b>
<b>D+DDE 500-1000</b>	<b>61%</b>
<b>N+DDE 500-1000</b>	<b>49%</b>
<b>N &gt;1000</b>	<b>26%</b>
<b>D &gt;1000</b>	<b>13%</b>
<b>D+DDE &gt; 1000</b>	<b>33%</b>
<b>N+DDE &gt;1000</b>	<b>49%</b>

**FIGURA 10:** Immagini di microscopia elettronica di epatociti di animali N (a) e D (b).

a)

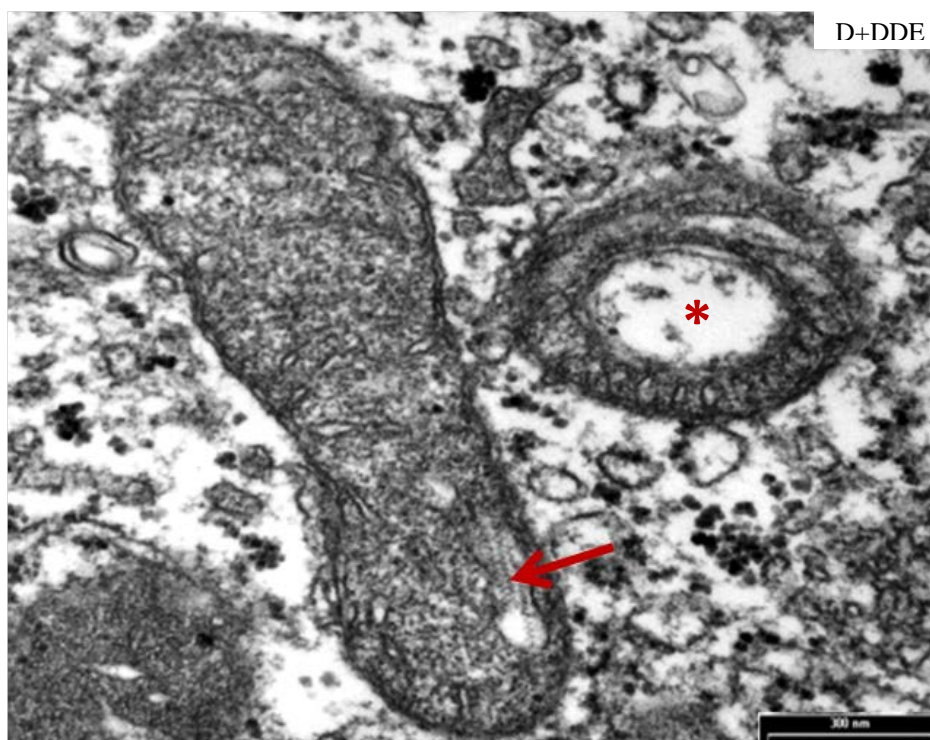


b)

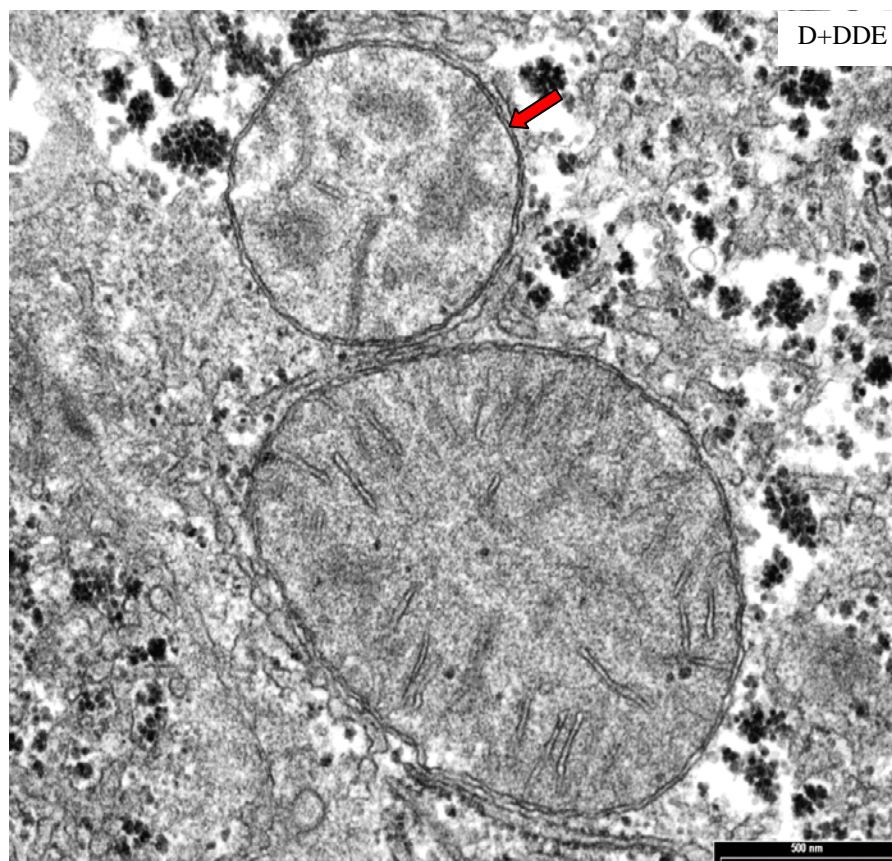


**FIGURA 11:** Immagini di microscopia elettronica di epatociti di animali D+DDE ed N+DDE in cui si osservano mitocondri con alterazioni di vario grado/tipo.

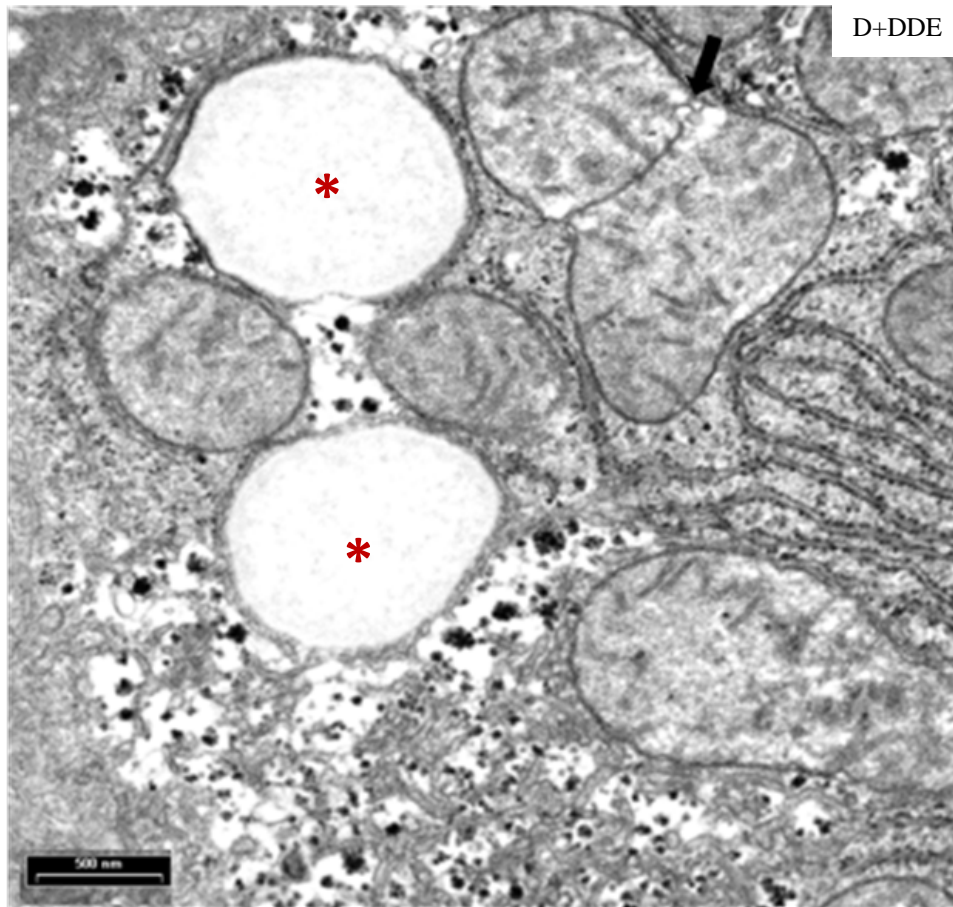
a)



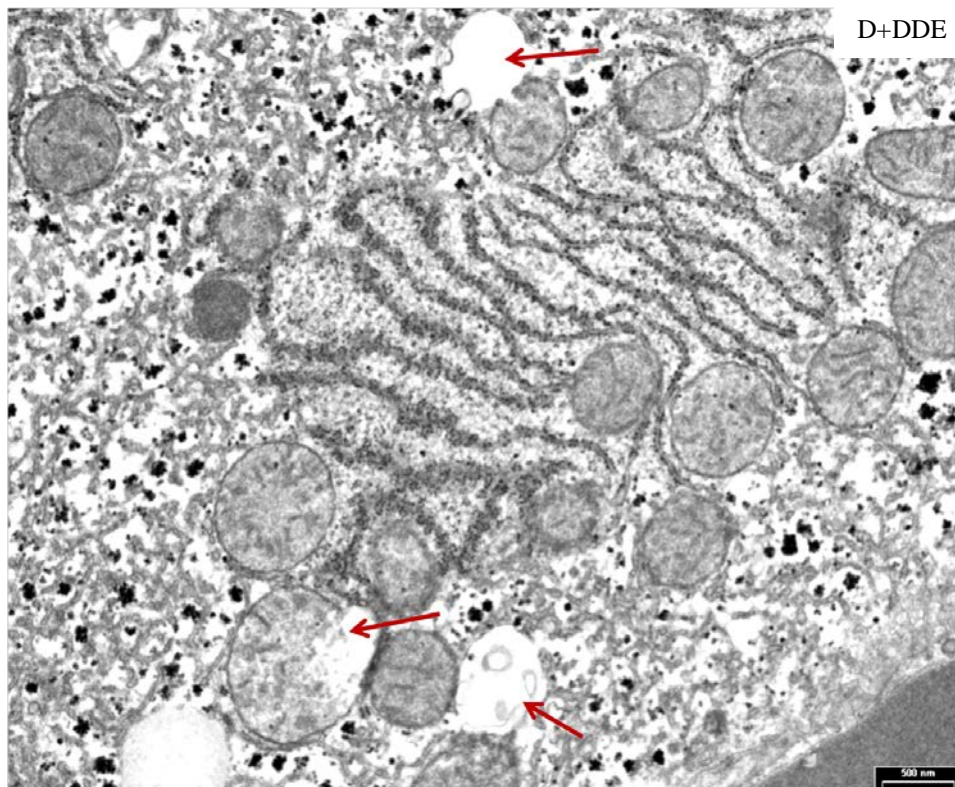
b)



c)

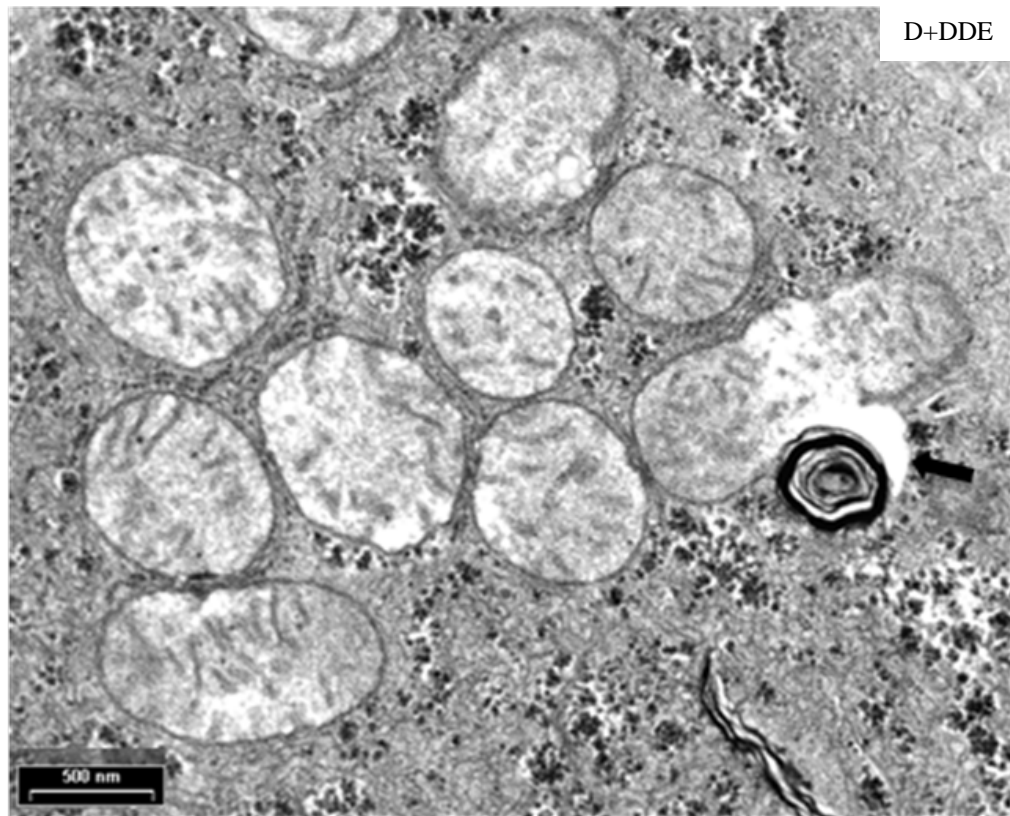


d)

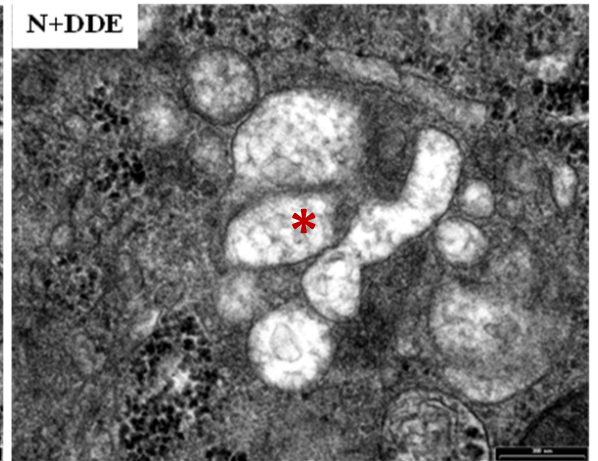
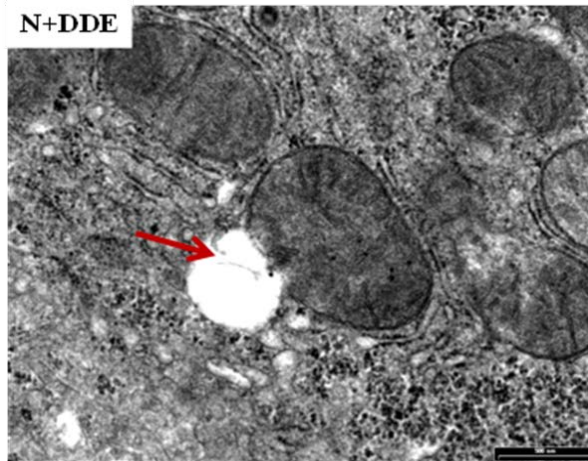
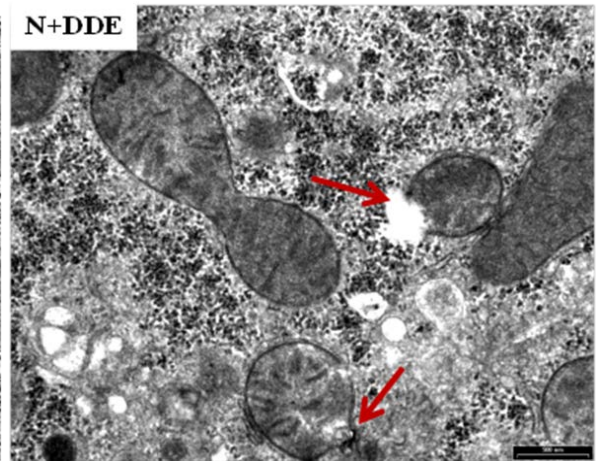
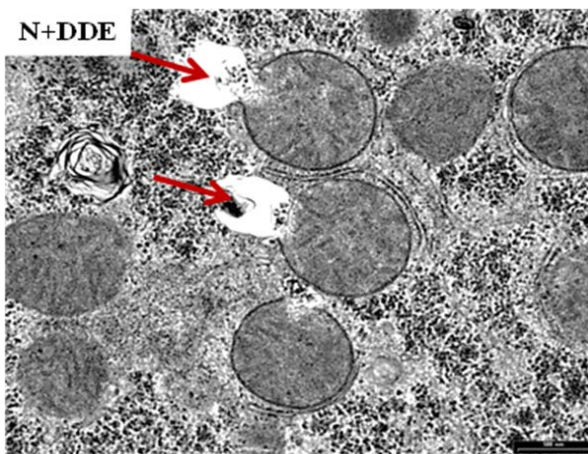




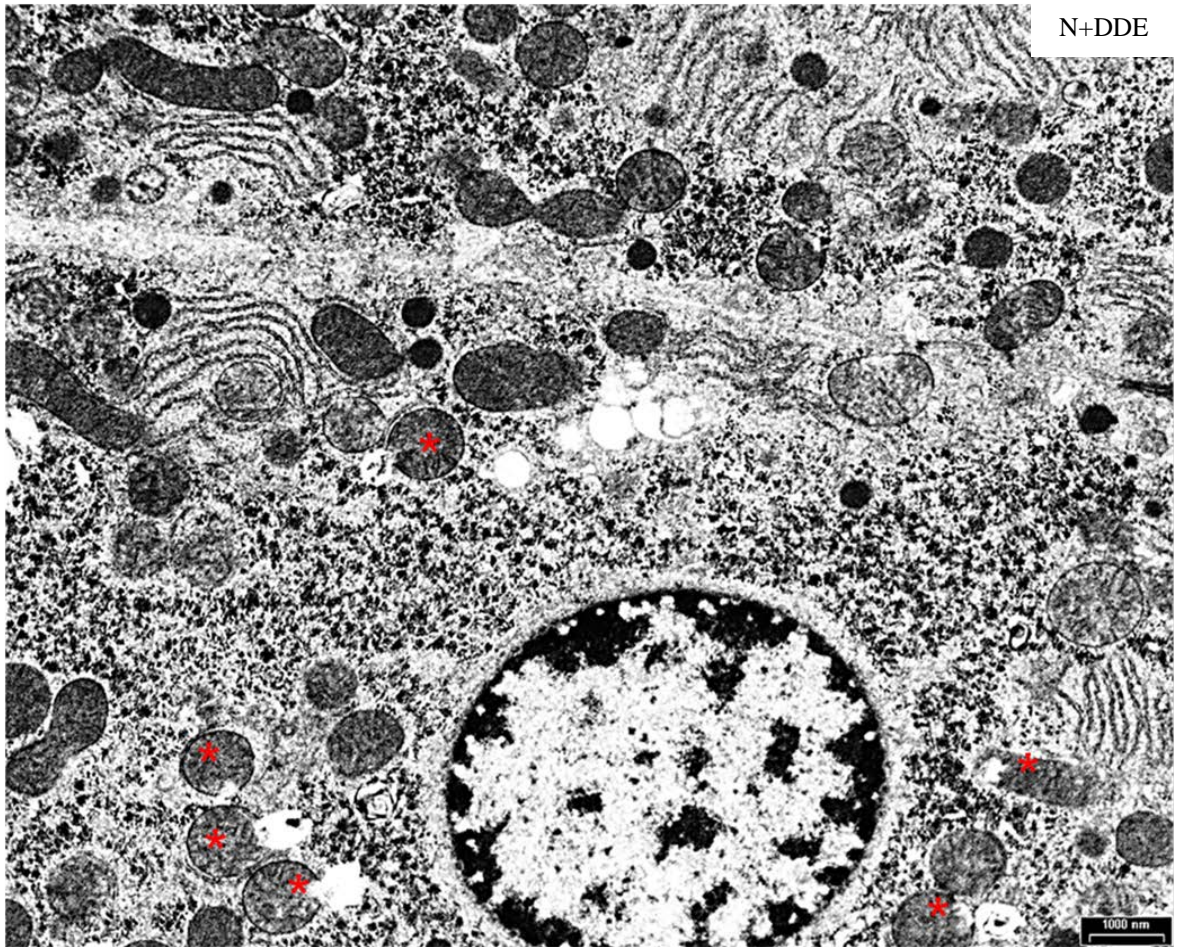
e)



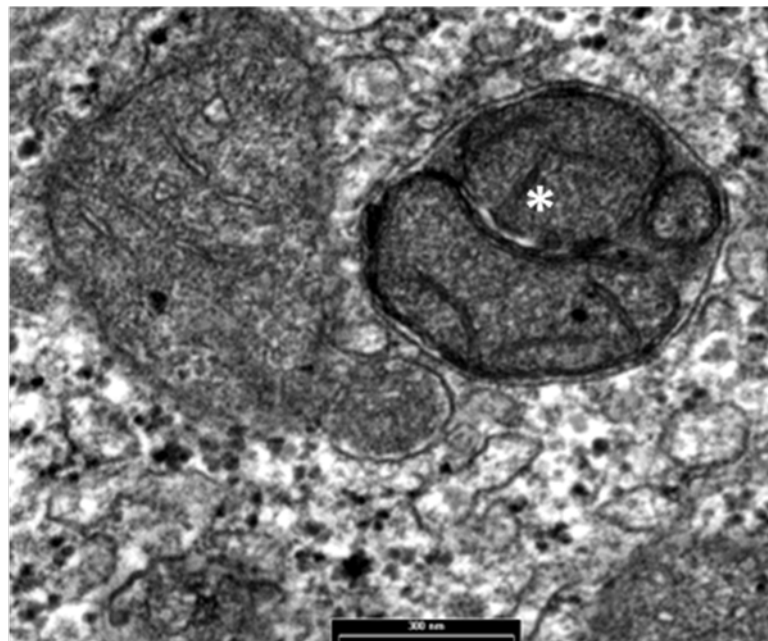
f)



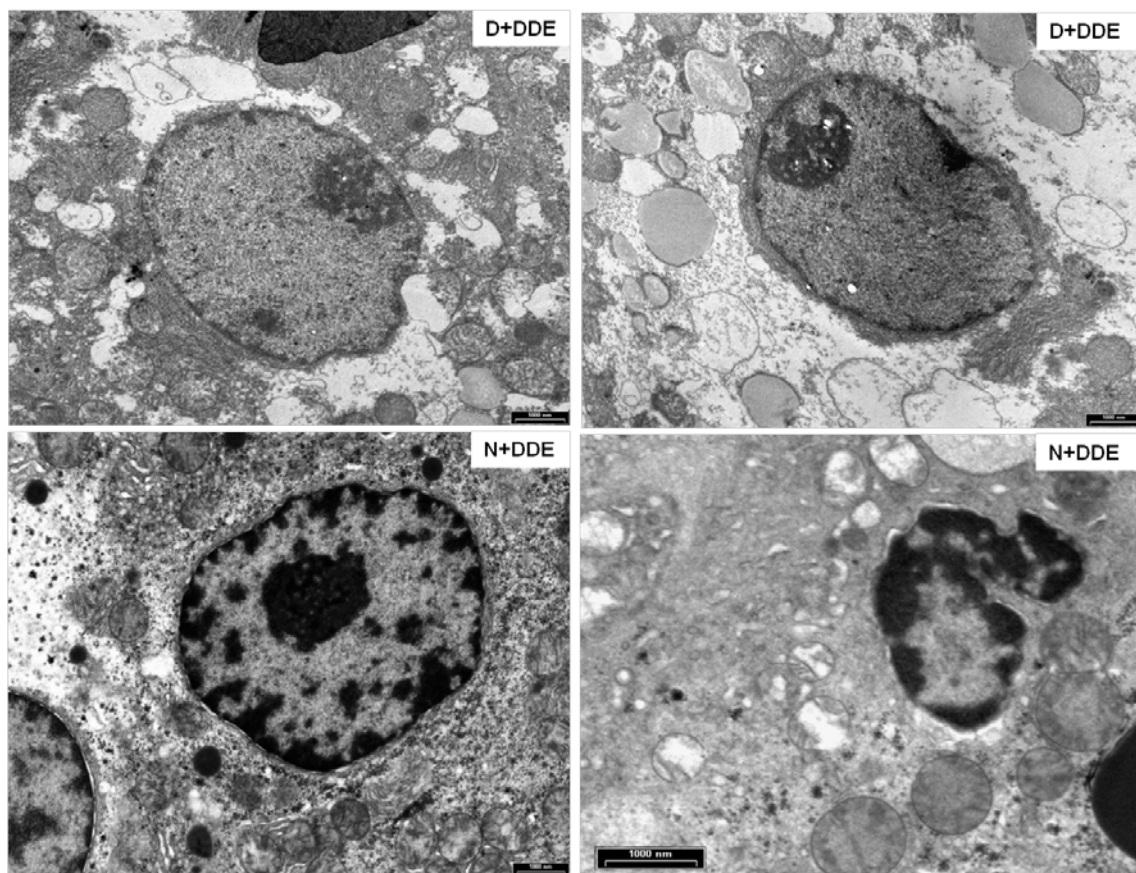
g)



h)

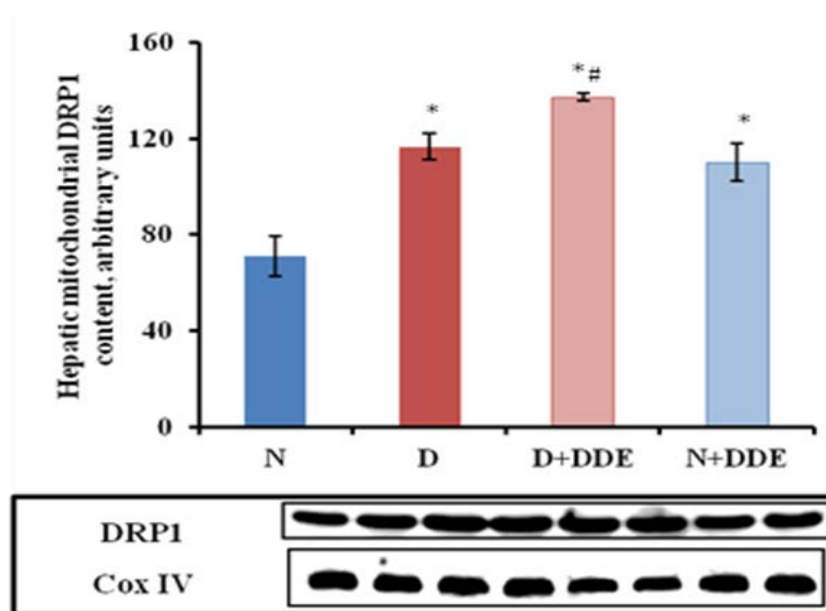


**FIGURA 12:** Immagini di microscopia elettronica di animali trattati con DDE (D+DDE, N+DDE) relative ad epatociti con nuclei preapoptotici o apoptotici.



**FIGURA 13:** Western blot relativo alle proteine della dinamica mitocondriale Drp1 coinvolta nel processo di fissione e Mfn2 coinvolta nel processo di fusione.

a)

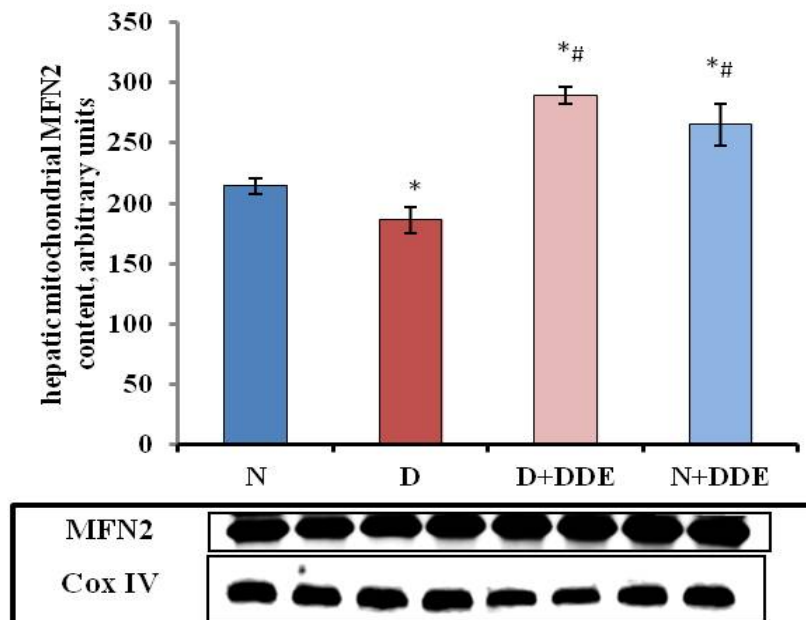


I dati sono relativi a 8 differenti ratti per gruppo e sono espressi come medie  $\pm$  ES.

\*P<0,05 rispetto ai ratti trattati con dieta standard (N).

#P<0,05 rispetto ai ratti trattati con dieta iperlipidica (D).

b)

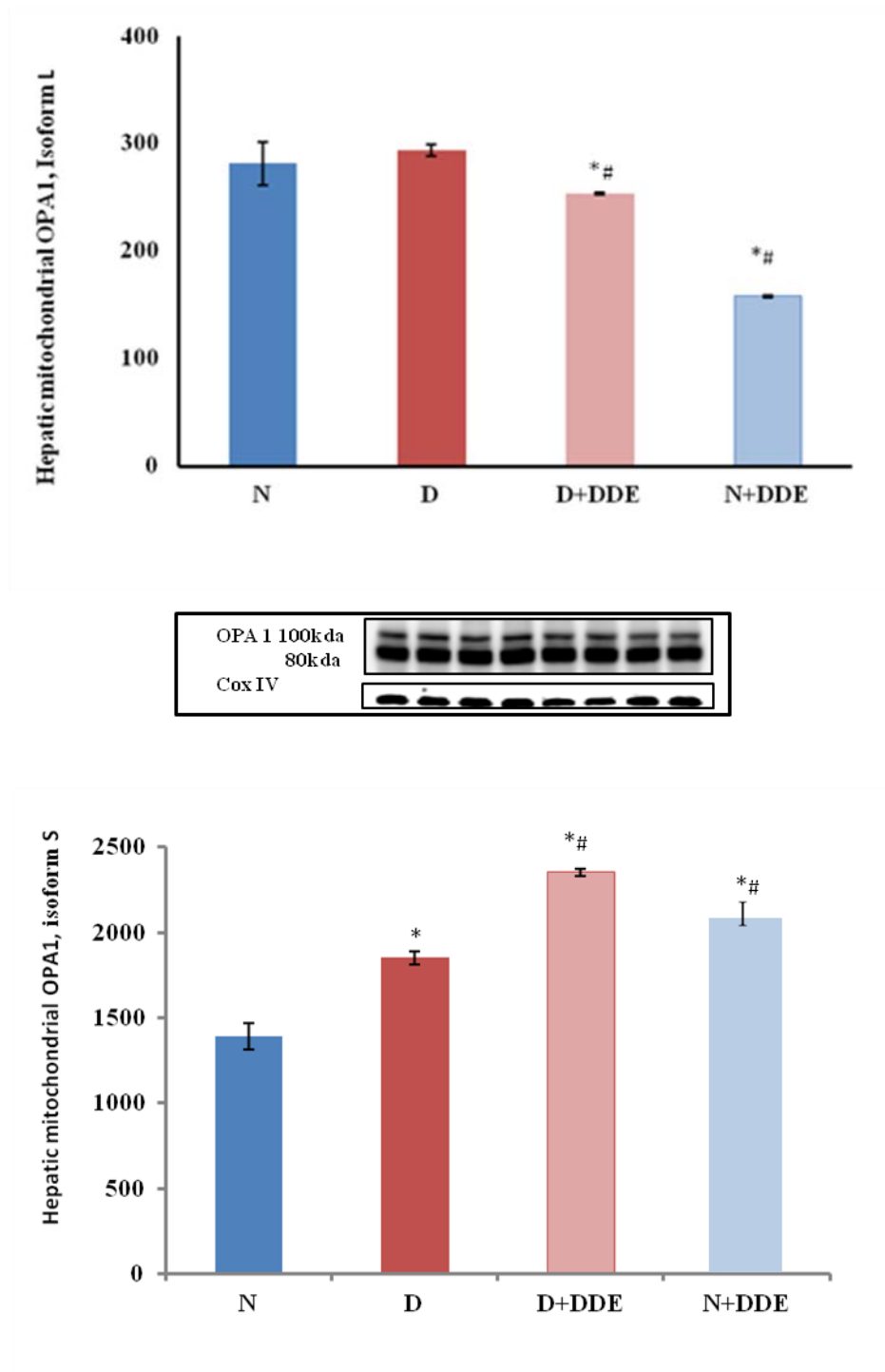


I dati sono relativi a 8 differenti ratti per gruppo e sono espressi come medie  $\pm$  ES.

\*P<0,05 rispetto ai ratti trattati con dieta standard (N).

#P<0,05 rispetto ai ratti trattati con dieta iperlipidica (D).

**FIGURA 14:** Western blot per la proteina OPA1, implicata oltre che nel processo di fusione, nel processo di rimodellamento delle creste mitocondriali.



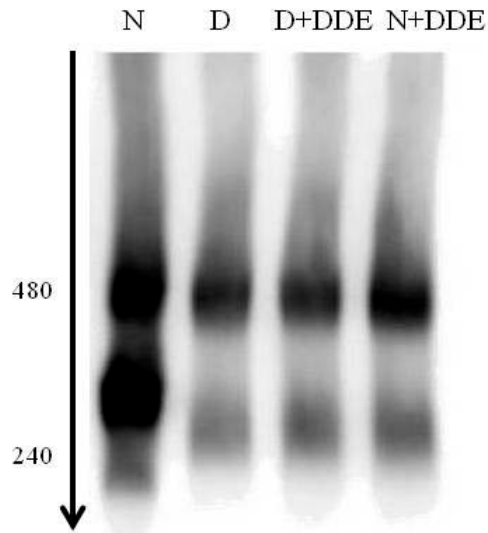
I dati sono relativi a 8 differenti ratti per gruppo e sono espressi come medie  $\pm$  ES.

\* $P < 0,05$  rispetto ai ratti trattati con dieta standard (N).

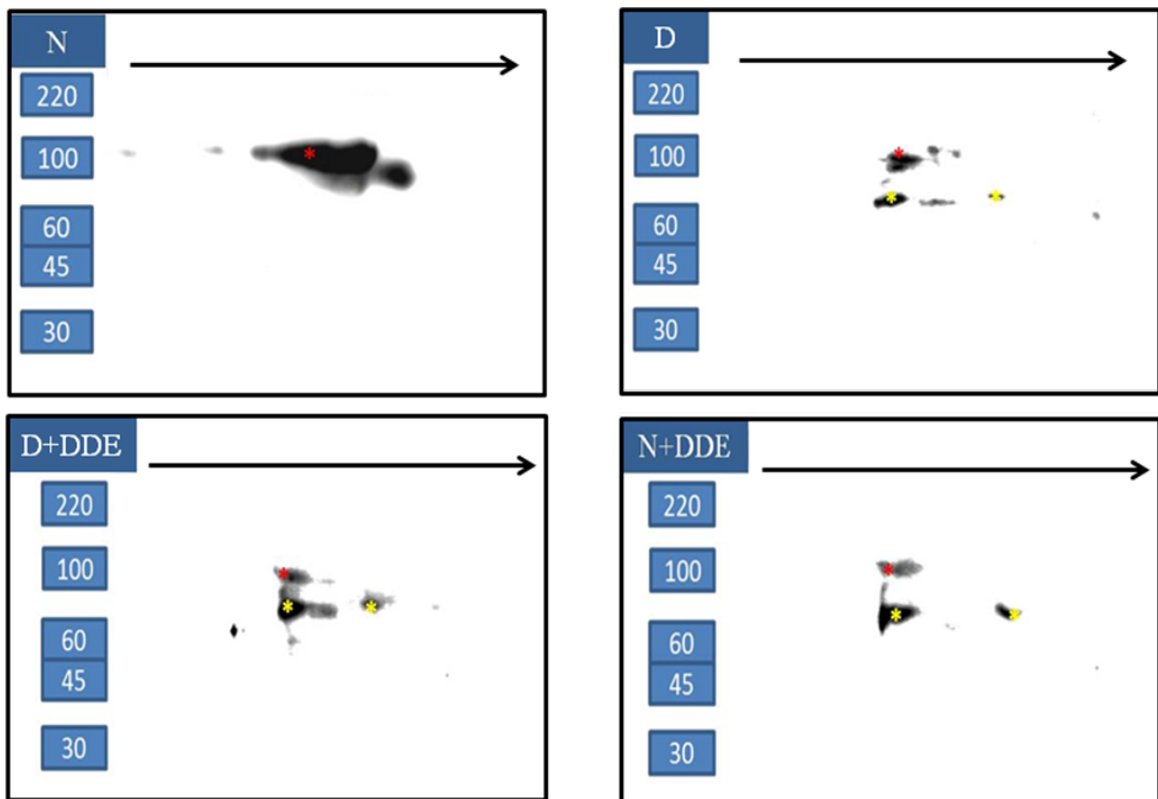
# $P < 0,05$  rispetto ai ratti trattati con dieta iperlipidica (D).

**FIGURA 15:** Blue Native Page (a) che mette in evidenza gli oligomeri di OPA1 e relativo 2D SDS Page (b) che mette in evidenza le subunità di OPA1 presenti negli oligomeri.

a)



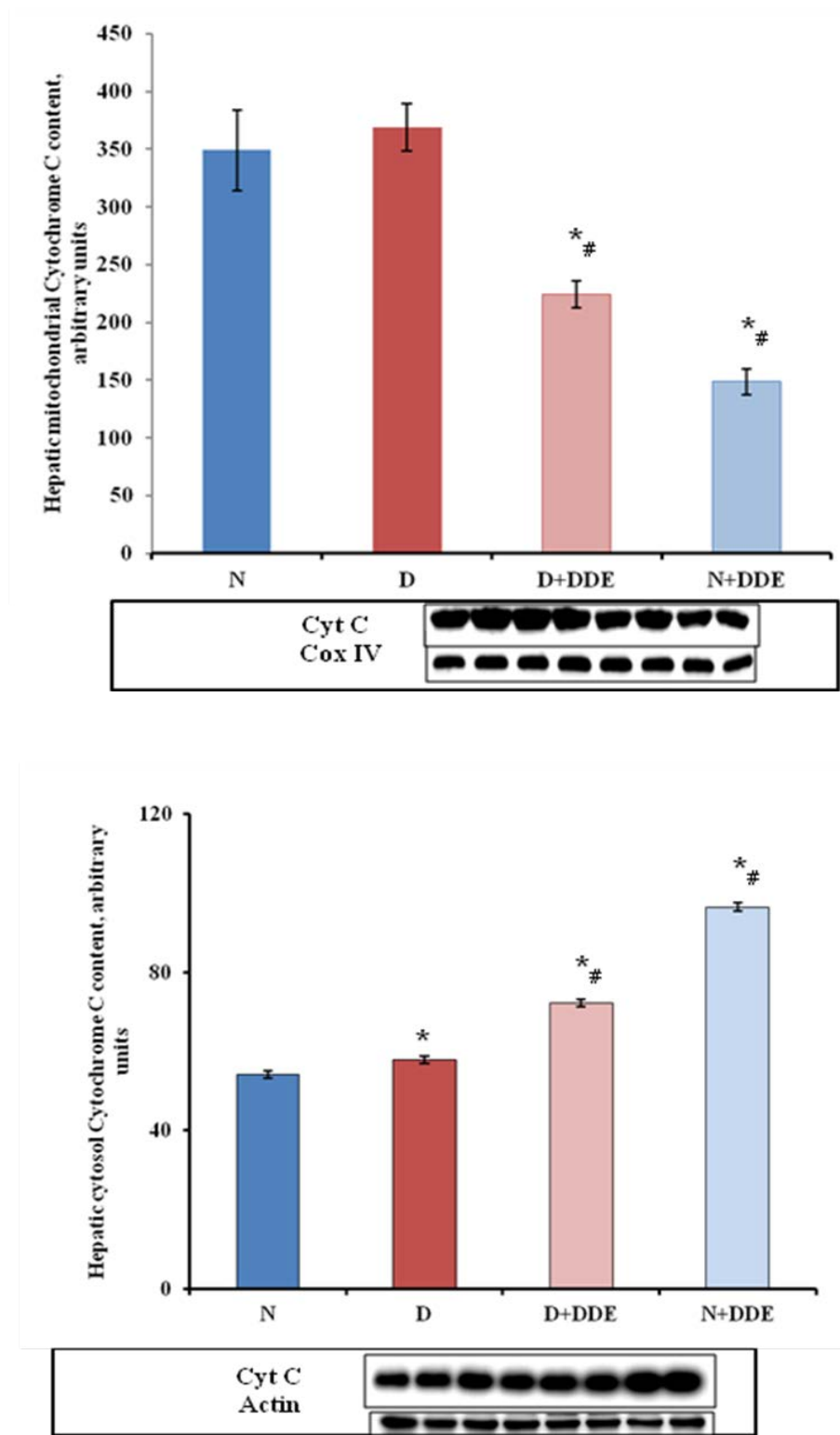
b)



\* Opa1 100 KDa

\* Opa1 80 KDa

**FIGURA 16:** Western blot per il Citocromo c mitocondriale e citocromo c citosolico.



I dati sono relativi a 8 differenti ratti per gruppo e sono espressi come medie  $\pm$  ES.

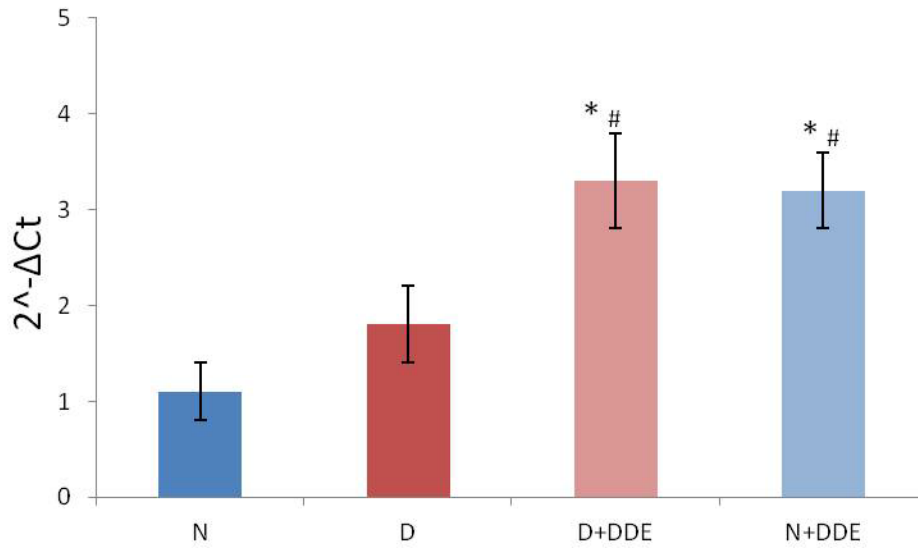
\* $P < 0,05$  rispetto ai ratti trattati con dieta standard (N).

# $P < 0,05$  rispetto ai ratti trattati con dieta iperlipidica (D).

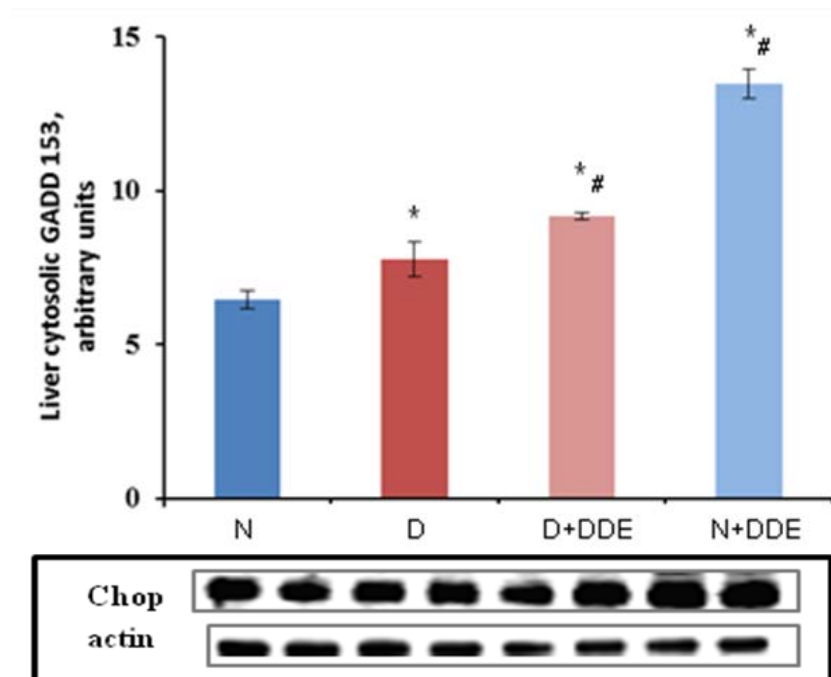


**FIGURA 17:** Real Time PCR e Western Blot per il marker apoptotico Chop/Gadd153.

a)



b)

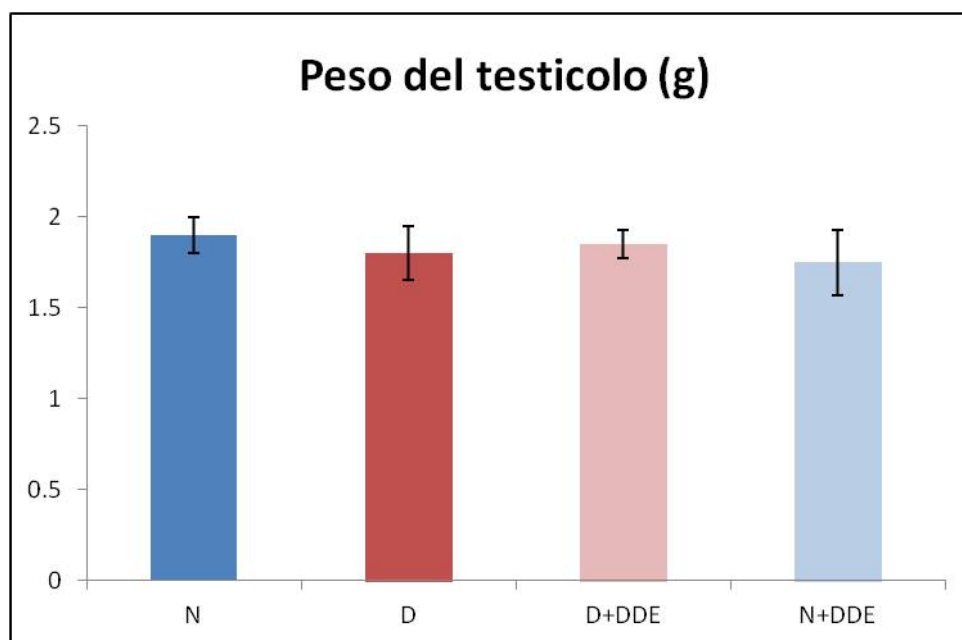


I dati sono relativi a 8 differenti ratti per gruppo e sono espressi come medie  $\pm$  ES.

\* $P < 0,05$  rispetto ai ratti trattati con dieta standard (N).

# $P < 0,05$  rispetto ai ratti trattati con dieta iperlipidica (D).

**FIGURA 18:** Peso del testicolo nei diversi gruppi sperimentali.



I dati sono relativi a 8 differenti ratti per gruppo e sono espressi come medie  $\pm$  ES.

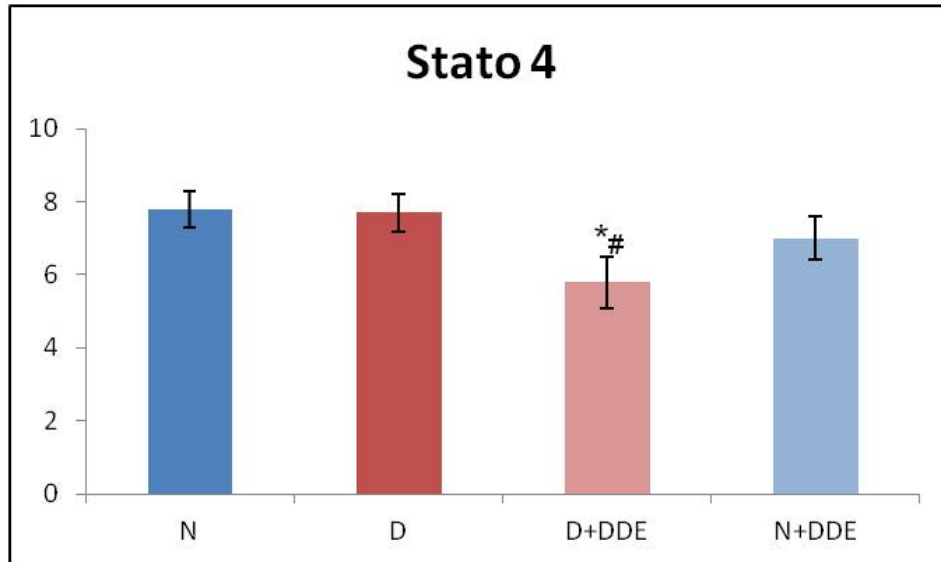
\* $P < 0,05$  rispetto ai ratti trattati con dieta standard (N).

# $P < 0,05$  rispetto ai ratti trattati con dieta iperlipidica (D).

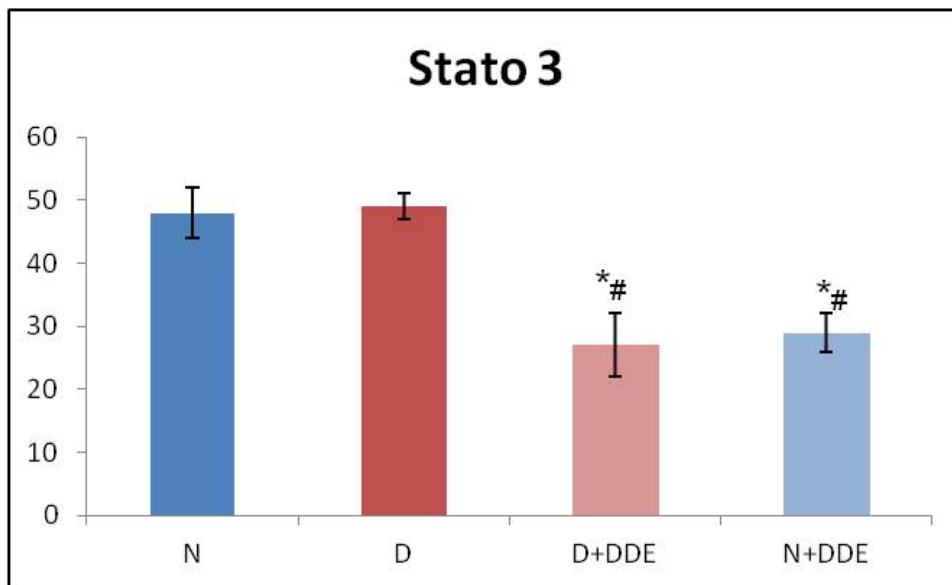
**FIGURA 19: EFFETTO DEL DDE *IN VIVO* (4 settimane).**

Effetto della somministrazione simultanea di DDE e dieta iperlipidica sulle capacità respiratorie mitocondriali in presenza di un substrato del pathway NADH-linked.

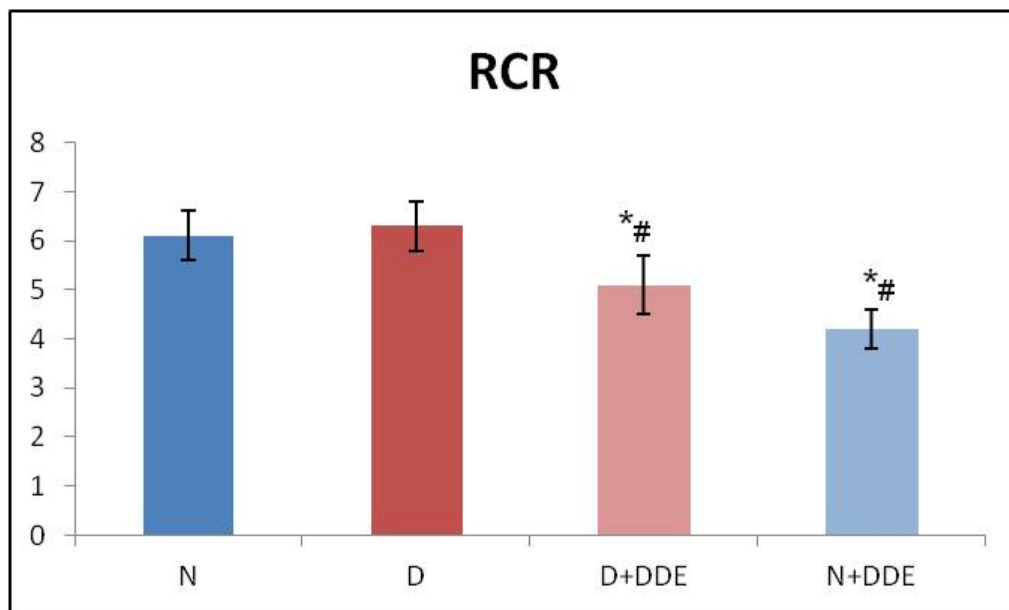
a)



b)



c)



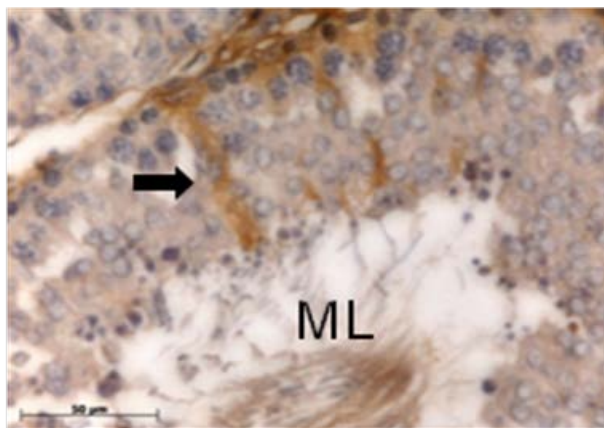
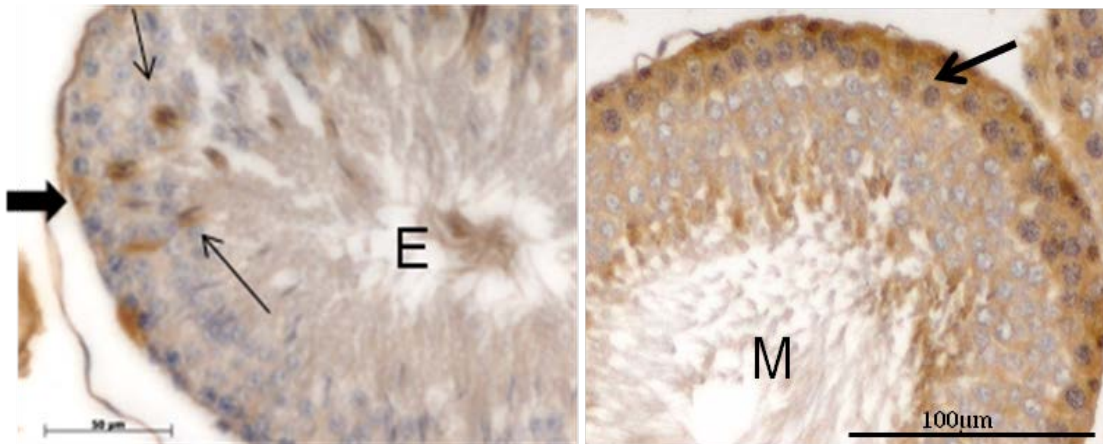
I dati sono relativi a 8 differenti ratti per gruppo e sono espressi come medie $\pm$  ES.

\*P<0,05 rispetto ai ratti trattati con dieta standard (N).

#P<0,05 rispetto ai ratti trattati con dieta iperlipidica (D).

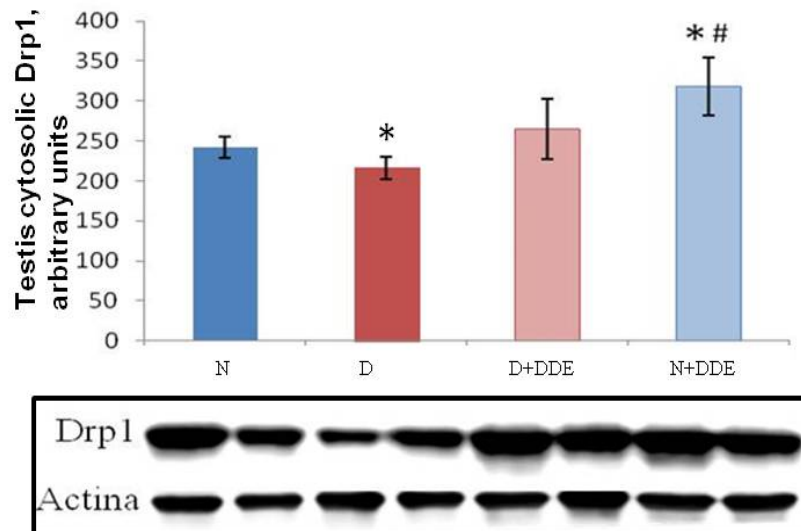
**FIGURA 20:** Immunocitochimica per OPA1.

a)

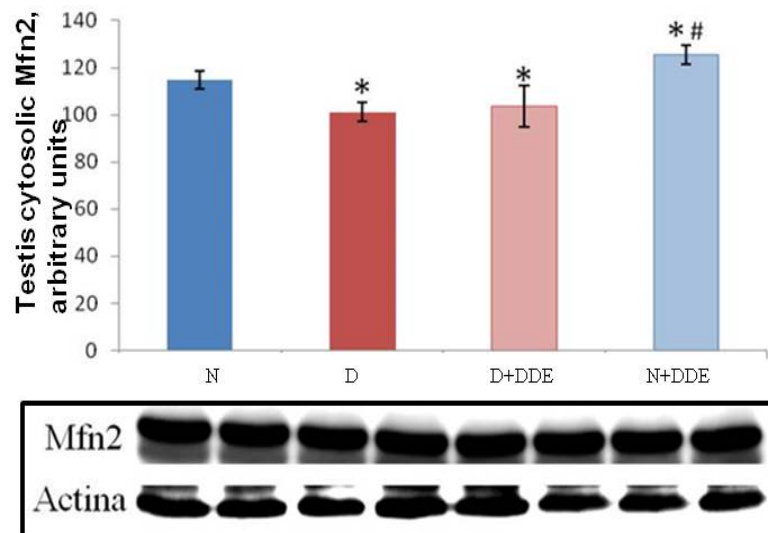


**FIGURA 21:** Western blot relativo alle proteine della dinamica mitocondriale Drp1 coinvolta nel processo di fissione (a) e Mfn2 coinvolta nel processo di fusione (b).

a)



b)



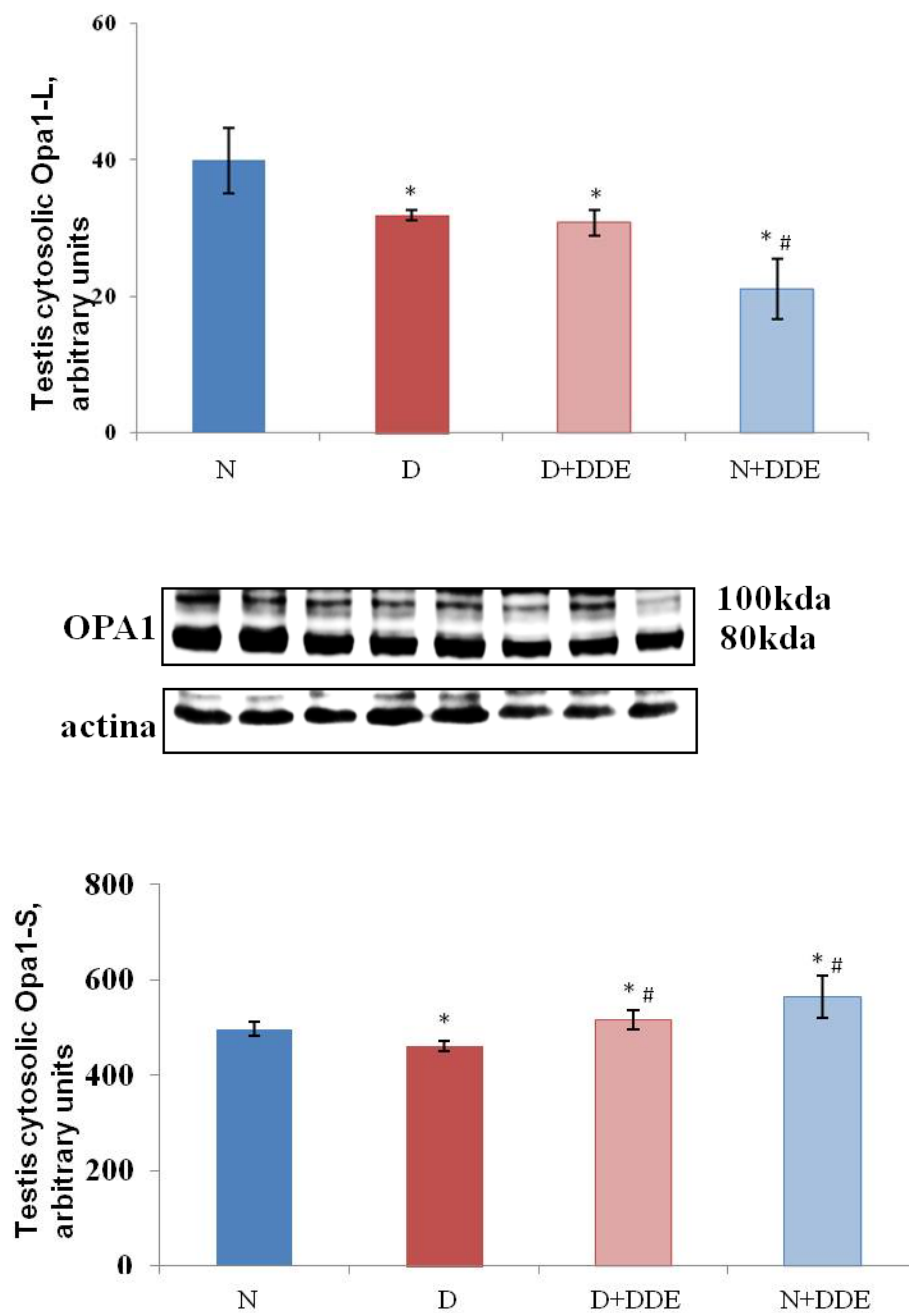
I dati sono relativi a 8 differenti ratti per gruppo e sono espressi come medie  $\pm$  ES.

\* $P < 0,05$  rispetto ai ratti trattati con dieta standard (N).

# $P < 0,05$  rispetto ai ratti trattati con dieta iperlipidica (D).

**FIGURA 22:** Western blot per OPA1 (a) e per il citocromo c (b).

a)

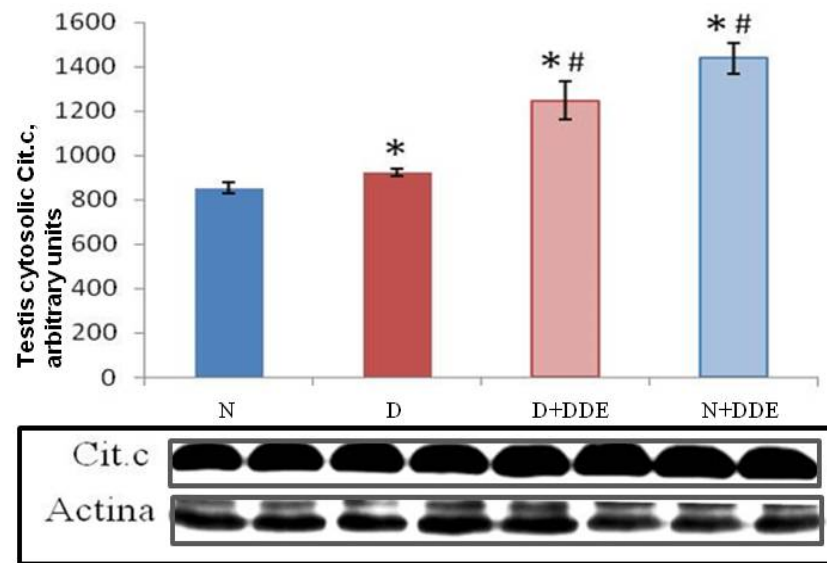


I dati sono relativi a 8 differenti ratti per gruppo e sono espressi come medie  $\pm$  ES.

\*P<0,05 rispetto ai ratti trattati con dieta standard (N).

#P<0,05 rispetto ai ratti trattati con dieta iperlipidica (D).

b)



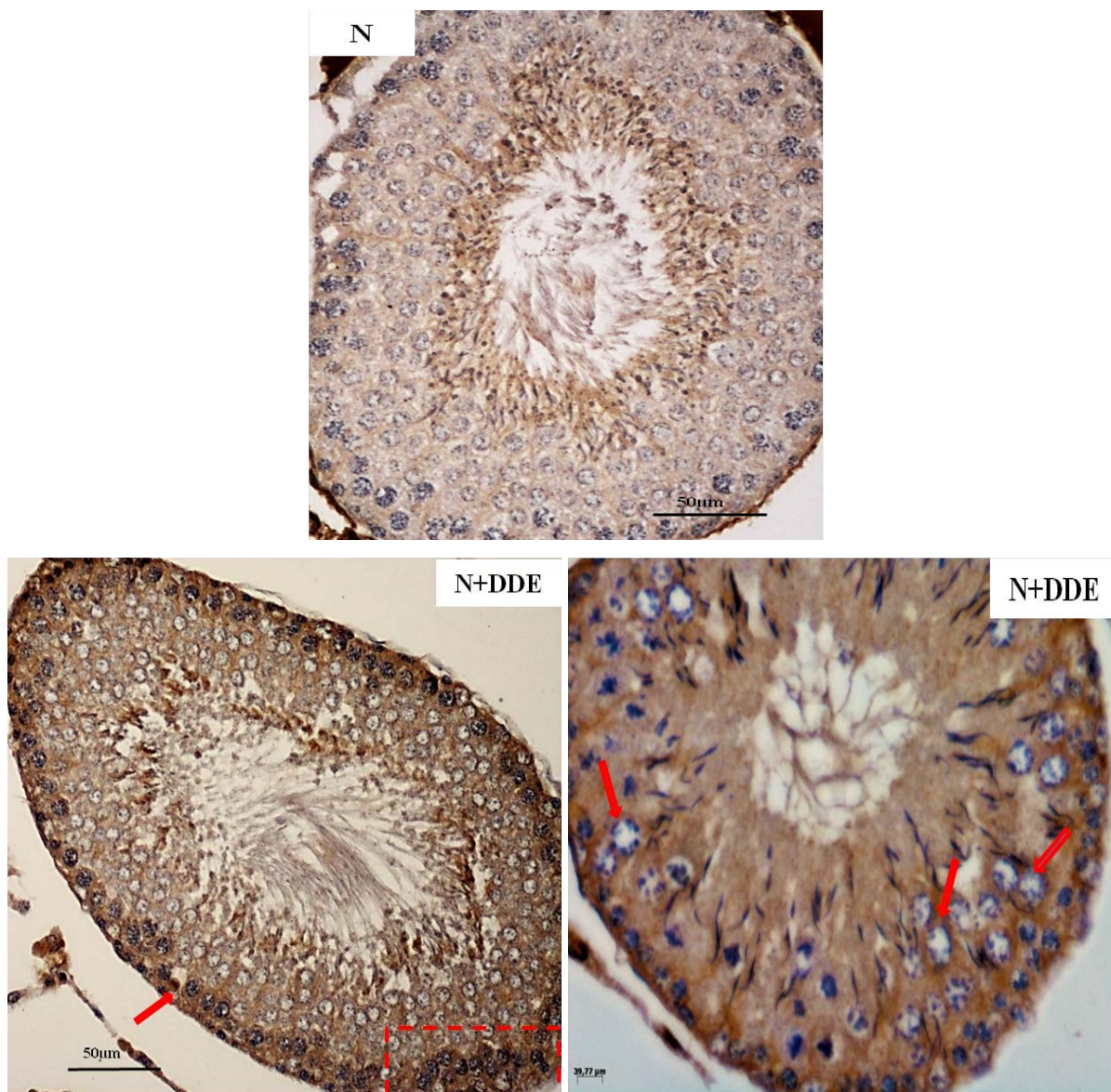
I dati sono relativi a 8 differenti ratti per gruppo e sono espressi come medie  $\pm$  ES.

\* $P < 0,05$  rispetto ai ratti trattati con dieta standard (N).

# $P < 0,05$  rispetto ai ratti trattati con dieta iperlipidica (D).

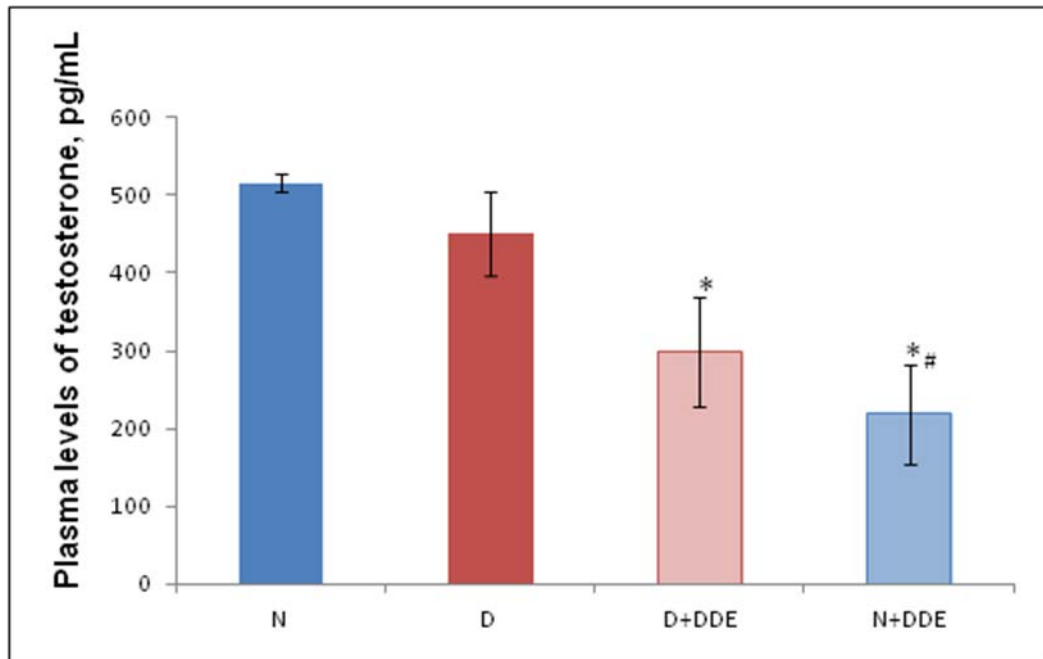


**FIGURA 23:** Immunocitochimica per Caspasi-3 attivata.



**FIGURA 24:** Dosaggio Elisa relativo ai livelli plasmatici di testosterone (a) e morfologia delle cellule di Leydig, sede della produzione del testosterone (b).

a)

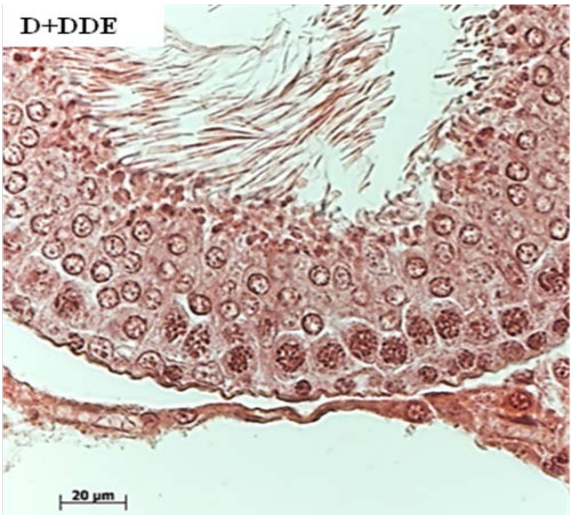
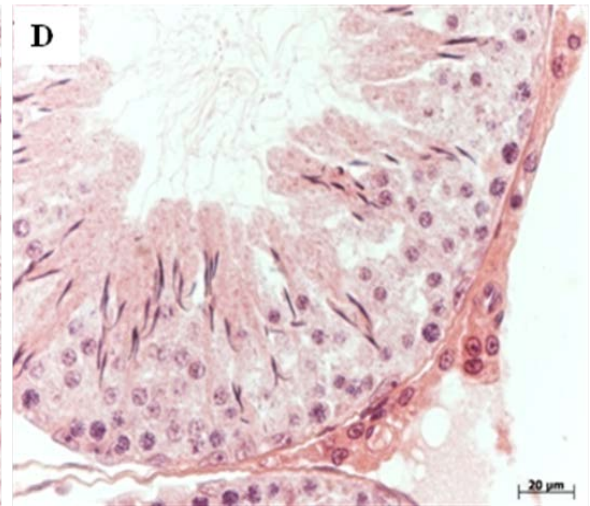
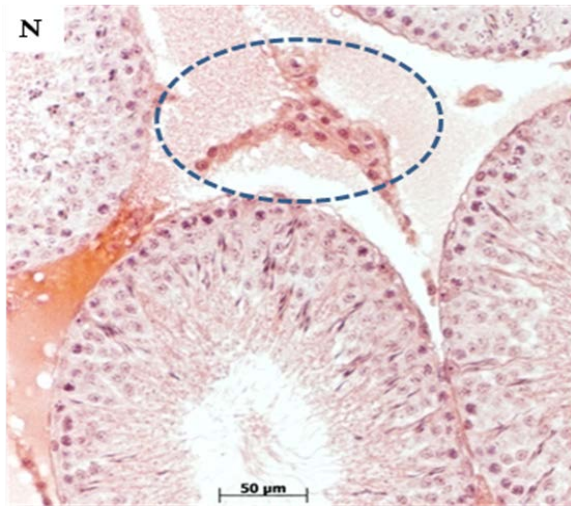


I dati sono relativi a 8 differenti ratti per gruppo e sono espressi come medie  $\pm$  ES.

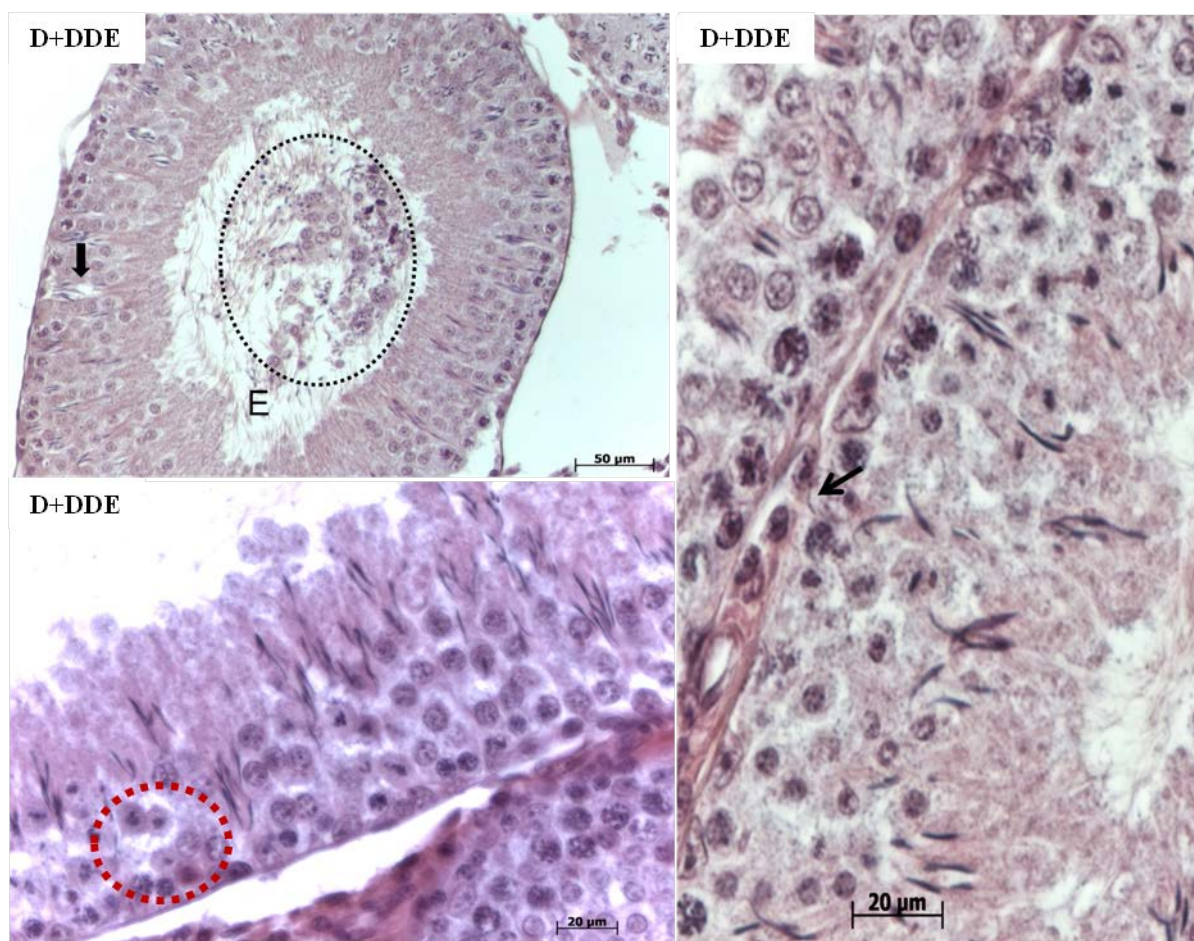
\* $P < 0,05$  rispetto ai ratti trattati con dieta standard (N).

# $P < 0,05$  rispetto ai ratti trattati con dieta iperlipidica (D).

b)



**FIGURA 25:** Effetti dei ridotti livelli di testosterone sulla morfologia testicolare.



## Bibliografia

---

## Bibliografía

- Acehan D., Jiang X., Morgan D.G., Heuser J.E., Wang X., Akey C.W. “Three-dimensional structure of the apoptosome: implications for assembly, procaspase-9 binding, and activation”. *Mol Cell* 2002, 9: 423-432.
- Acosta-Maldonado B., Sánchez-Ramírez B., Reza-López S., Levario-Carrillo M. “Effects of exposure to pesticides during pregnancy on placental maturity and weight of newborns: a cross-sectional pilot study in women from the Chihuahua State, Mexico”. Aug; 28, 2009.
- Agency for Toxic Substances and Diseases Registry (ATSDR)/US Public Health Service. “Toxicological Profile for 4,4'-DDT, 4,4'-DDE, 4, 4'-DDD”. ATSDR. Atlanta, GA; 1994.
- Ahmad T, Aggarwal K, Pattnaik B, Mukherjee S, Sethi T, Tiwari BK, Kumar M, Micheal A, Mabalirajan U, Ghosh B, Sinha Roy S, Agrawal A. “Computational classification of mitochondrial shapes reflects stress and redox state”. *Cell Death Dis.* 2013 Jan 17;4:e461. doi: 10.1038/cddis.2012.213.
- Akepati VR, Müller EC, Otto A, Strauss HM, Portwich M, Alexander C. “Characterization of OPA1 isoforms isolated from mouse tissues”. *J Neurochem.* 2008 Jul;106(1):372-83. doi: 10.1111/j.1471-4159.2008.05401.x. Epub 2008 Jul 1.
- Alavi Marcel V. and Fuhrmann Nico. “Dominant optic atrophy, OPA1, and mitochondrial quality control: understanding mitochondrial network dynamics”. *Molecular Neurodegeneration* 2013, 8:32.
- Aldridge AC1, Benson LP, Siegenthaler MM, Whigham BT, Stowers RS, Hales KG. “Roles for Drp1, a dynamin-related protein, and milton, a kinesin-associated protein, in mitochondrial segregation, unfurling and elongation during *Drosophila* spermatogenesis”. *Fly (Austin).* 2007 Jan-Feb;1(1):38-46. Epub 2007 Jan 29.
- Alexander C., Votruba M., Pesch U. E. A., Thiselton D. L., Mayer S., Moore A., Rodriguez M., Kellner U., Leo-Kottler B., Auburger G., Bhattacharya S. S., Wissinger B. “OPA1, encoding a dynamin-related GTPase, is mutated in autosomal dominant optic atrophy linked to chromosome 3q28”. *Nature Genet.* 26: 211-215, 2000.
- Amati-Bonneau P., Milea D., Bonneau D., Chevrollier A., Ferré M., Guillet V., Gueguen N., Loiseau D., De Crescenzo M.A., Verny C., Procaccio V., Lenaers

- G., Reynier P. “OPA1-associated disorders: phenotypes and pathophysiology”. *Int J Biochem Cell Biol.* 2009 Oct;41(10):1855-65. doi: 10.1016/j.biocel.2009.04.012. Epub 2009 Apr 21.
- Argese E., Betticol C., Ghelli A., Todescheni R. and Miana P. “Submitochondrial particles as toxicity biosensors of chlorophenols”. *Environ Toxicol Chem* 14: 363-368, 1995.
  - Assogba B.S., Djogbénu L.S., Saizonou J., Milesi P., Djossou L., Djegbe I., Oumbouke W.A., Chandre F., Baba-Moussa L., Weill M., Makoutodé M. “Phenotypic effects of concomitant insensitive acetylcholinesterase (ace-1 R) and knockdown resistance (kdr R) in *Anopheles gambiae*: a hindrance for insecticide resistance management for malaria vector control”. *Parasit Vectors.* 2014 Dec 3;7(1):548.
  - Bach D., Pich S., Soriano F.X., Vega N., Baumgartner B., Oriola J., Daugaard J.R., Lloberas J., Camps M., Zierath J.R. “Mitofusin-2 determines mitochondrial network architecture and mitochondrial metabolism. A novel regulatory mechanism altered in obesity”. *J. Biol. Chem.*, 278, 17190–17197 (2003).
  - Begriche K., Igoudjil A., Pessayre D., Fromenty B. “Mitochondrial dysfunction in NASH: causes, consequences and possible means to prevent it”. *Mitochondrion.* 2006 Feb;6(1):1-28. Epub 2006 Jan 5.
  - Bereiter-Hahn J., Vöth M. “Dynamics of mitochondria in living cells: shape changes, dislocations, fusion, and fission of mitochondria”. *Microsc Res Tech.* 1994 Feb 15; 27(3):198-219.
  - Bernardi P., Scorano L., Colonna R., Petronilli V., Di Lisa F. “Mitochondria and cell death: Mechanistic aspects and methodological issues”. *Eur. J. Biochem.* 264: 687–701; 1999.
  - Bernardi P., Krauskopf A., Basso E., Petronilli V., Blachly-Dyson E., Di Lisa F. “The mitochondrial permeability transition from *in vitro* artifact to disease target”. *FEBS J.* 273, 2077–2099 10.1111/j.1742-4658.2006.05213 (2006).
  - Bouwman H., Kylin H., Sereda B., Bornman R. “High levels of DDT in breast milk: intake, risk, lactation duration, and involvement of gender”. *Environ Pollut.* 2012 Nov;170:63-70. doi: 10.1016/j.envpol.2012.06.009. Epub 2012 Jul 4.

- Byczkowski J. "The effect of p,p'-DDT (dicophane) and its main metabolites on the respiration of rat liver mitochondria". *Archiv für Toxikologie* (1973-06-01) 31: 137-145 , June 01, 1973.
- Byczkowski J. Z. "Biochemical and ultrastructural changes in biological membranes induced by p,p'-DDT (chlorophenotatum) and its metabolites". *Pol. J. Pharmacol Pharm* 29:411-417; 1977.
- Byczkowski J. Z., Tłuczkiwicz J. "Comparative study of respiratory chain inhibition by DDT and DDE in mammalian and plant mitochondria". *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*. July 1978, Volume 20, Issue 1, pp 505-512.
- Campbell N. A., Reece, J. B., Mitchell L. G. "Biology (10th Edition)". Tenth Edition.
- Castilla-Cortazar I., Diez N., Garcia-Fernandez M., Puche J.E., Diez-Caballero F., Quiroga J., Diaz-Sanchez M., Castilla A., Casares A.D., Varela-Nieto I., Prieto J., Gonzalez-Baron S. "Hematotesticular barrier is altered from early stages of liver cirrhosis: effect of insulin-like growth factor 1". *World J Gastroenterol*. 2004 Sep 1;10(17):2529-34.
- Cereghetti G.M., Scorrano L. "The many shades of mitochondrial death". *Oncogene* 25:4717-24 (2006).
- Cereghetti G.M., Stangherlin A., Martins De Brito O., Chang C.R., Blackstone C., Bernardi P., Scorrano L. "Dephosphorylation by calcineurin regulates translocation of Drp1 to mitochondria". *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, 105:15803-15808 (2008).
- Chen H, Detmer SA, Ewald AJ, Griffin EE, Fraser SE, Chan DC. "Mitofusins Mfn1 and Mfn2 coordinately regulate mitochondrial fusion and are essential for embryonic development". *J Cell Biol*. 2003 Jan 20;160(2):189-200. Epub 2003 Jan 13.
- Chen H, Chan DC. "Emerging functions of mammalian mitochondrial fusion and fission". *Hum Mol Genet*. 2005 Oct 15;14 Spec No. 2:R283-9.
- Cheng E.Y., Cutkomp L.K., Koch R.B. "Effect of an imported fire ant venom component on respiration and oxidative phosphorylation of mitochondria". *Biochem Pharmacol*. 1977 Jun 15;26(12):1179-80.
- Cheung E.C., Joza N., Steenaart N.A., McClellan K.A., Neuspiel M., McNamara S., MacLaurin J.G., Rippstein P., Park D.S., Shore G.C., McBride H.M., Penninger



- J.M., Slack R.S. “Dissociating the dual roles of apoptotic inducing factor in maintaining mitochondrial structure and apoptosis”. *EMBO J.* 2006 Sep 6;25(17):4061-73. Epub 2006 Aug 17.
- Cipolat S., Martins De Brito O., Dal Zilio B., Scorrano L. “OPA1 requires mitofusin 1 to promote mitochondrial fusion”. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2004 Nov 9; 101(45):15927-32.
  - Creasy D. M., Foster P.M.D. “Male Reproductive System. In *Handbook of Toxicologic Pathology*” (R. C. a. W. M. Haschek WM, Ed.), pp. 785-786. Academic Press, San Diego (2002).
  - Cuperus R., Leen R., Tytgat G.A., Caron H.N., Van Kuilenburg A.B. “Fenretinide induces mitochondrial ROS and inhibits the mitochondrial respiratory chain in neuroblastoma”. *Cell Mol Life Sci.* 2010 Mar;67(5):807-16. doi: 10.1007/s00018-009-0212-2. Epub 2009 Nov 26.
  - Cutkomp L.K., Yap H.H., Cheng E.Y., Koch R.B. “ATPase activity in fish tissue homogenates and inhibitory effects of DDT and related compounds”. *Chem Biol Interact.* 1971 Nov;3(6):439-47.
  - Danial N.N. and Korsmeyer S.J. “Cell death: critical control points”. *Cell.* 116:205–219; 2004.
  - Davidoff M.S., Breucker H., Holstein A.F., Seidl K. “Cellular architecture of the lamina propria of human seminiferous tubules”. *Cell Tissue Res.* 1990 Nov;262(2):253-61.
  - Davidoff M.S., Schulze W., Middendorff R., Holstein A.F. “The Leydig cell of the human testis--a new member of the diffuse neuroendocrine system”. *Cell Tissue Res.* 1993 Mar;271(3):429-39.
  - De França L.R., Ghosh S., Ye S.J., Russell L.D. “Surface and surface-to-volume relationships of the Sertoli cell during the cycle of the seminiferous epithelium in the rat”. *Biol Reprod.* 1993 Dec;49(6):1215-28.
  - Delettre C., Lenaers G., Griffoin J.M., Gigarel N., Lorenzo C., Belenguer P., Pelloquin L., Grosgeorge J., Turc-Carel C., Perret E., Astarie-Dequeker C., Lasquelléc L., Arnaud B., Ducommun B., Kaplan J., Hamel C.P. “Nuclear gene OPA1, encoding a mitochondrial dynamin-related protein, is mutated in dominant optic atrophy”. *Nat. Genet.*, (2000), 26:207–210.

- Delettre C., Lenaers G., Pelloquin L., Belenguer P., Hamel C.P. “OPA1 (Kjer type) dominant optic atrophy: a novel mitochondrial disease.” *Mol Genet Metab.* 2002 Feb;75(2):97-107.
- Delivani P., Adrain C., Taylor R.C., Duriez P.J., Martin S.J. “Role for CED-9 and Egl-1 as regulators of mitochondrial fission and fusion dynamics”. *Mol Cell.* 2006 Mar 17;21(6):761-73.
- De Mello W.C. “Cell-to-cell coupling assayed by means of electrical measurements”. *Experientia.* 1987 Oct 15;43(10):1075-9.
- Desagher S., Martinou J.C. “Mitochondria as the central control point of apoptosis”. *Trends in Cell Biology; Volume 10, Issue 9, 1 September 2000, Pages 369–377.*
- Dirinck E., Jorens P.G., Covaci A., Geens T., Roosens L., Neels H., Mertens I., Van Gaal L. Dirinck. “Obesity and persistent organic pollutants: possible obesogenic effect of organochlorine pesticides and polychlorinated biphenyls”. *Obesity (Silver Spring).* 2011 Apr;19(4):709-14. doi: 10.1038/oby.2010.133. Epub 2010 Jun 17.
- Duvezin-Caubet S., Jagasia R., Wagener J., Hofmann S., Trifunovic A., Hansson A., Chomyn A., Bauer M.F., Attardi G., Larsson N.G., Neupert W., Reichert A.S. “Proteolytic processing of OPA1 links mitochondrial dysfunction to alterations in mitochondrial morphology”. *J Biol Chem.* 2006 Dec 8;281(49):37972-9. Epub 2006 Sep 26.
- Ehses S., Raschke I., Mancuso G., Bernacchia A., Geimer S., Tondera D., Martinou J.C., Westermann B., Rugarli E.I., Langer T. “Regulation of OPA1 processing and mitochondrial fusion by m-AAA protease isoenzymes and OMA1”. *J Cell Biol.* 2009 Dec 28;187(7):1023-36. doi: 10.1083/jcb.200906084.
- Estabrook RW. “Methods in Enzymology J”. 10:41-47, (1967).
- Estaquier J., Arnoult D. “CED-9 and EGL-1: a duo also regulating mitochondrial network morphology”. *Mol Cell.* 2006 Mar 17;21(6):730-2.
- Ferramosca A., Focariello A., Piomboni R., Copola P., Zara L. “Oxygen uptake by mitochondria in demembranated human spermatozoa: a reliable tool for the evaluation of sperm respiratory efficiency”. *Int J Androl* 31,337-345, (2008).
- Ferramosca A., Provenzano A., Coppola SP., Zara L. “Mitochondrial respiratory efficiency is positively correlated with human sperm motility”. *Urology* 79,809-814, (2012).

- Ferré M., Amati-Bonneau P., Tourmen Y., Malthière Y., Reynier P. “eOPA1: an online database for OPA1 mutations”. *Hum Mutat.* 2005 May;25(5):423-8.
- Ferreira F.M., Madeira V.M., Moreno A.J. “Interactions of 2,2-bis(p-chlorophenyl)-1,1-dichloroethylene with mitochondrial oxidative phosphorylation”. *Biochem Pharmacol.* 1997 Feb 7;53(3):299-308.
- Ford W.C. “Glycolysis and sperm motility: does a spoonful of sugar help the flagellum go round?” *Hum Reprod Update.* 2006 May-Jun;12(3):269-74. Epub 2006 Jan 11.
- Frank S., Gaume B., Bergmann-Leitner E.S., Leitner W.W., Robert E.G., Catez F., Smith C.L., Youle R.J. “The role of dynamin-related protein 1, a mediator of mitochondrial fission, in apoptosis”. *Dev Cell.* 2001 Oct;1(4):515-25.
- Frezza C., Cipolat S., Martins De Brito O., Micaroni M., Beznoussenko G.V., Rudka T., Bartoli D., Polishuck R.S., Danial N.N., De Strooper B., Scorrano L. “OPA1 controls apoptotic cristae remodeling independently from mitochondrial fusion”. *Cell.* 2006 Jul 14;126(1):177-89.
- Fukushima N.H., Brisch E., Keegan B.R., Bleazard W., Shaw J.M. “The GTPase effector domain sequence of the Dnm1p GTPase regulates self-assembly and controls a rate-limiting step in mitochondrial fission”. *Mol Biol Cell.* 2001 Sep; 12(9):2756-66.
- Fuller M.T., Bate M., Martinez-Arias A. “Spermatogenesis, in *The Development of Drosophila*”. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, pp. 71–147 (1993).
- Garnier A., Fortin D., Zoll J., N'Guessan B., Mettauer B., Lampert E., Veksler V., Ventura-Clapier R. “Coordinated changes in mitochondrial function and biogenesis in healthy and diseased human skeletal muscle”. *FASEB J.* 2005 Jan;19(1):43-52.
- Gazzoti P., Malmstrom K., Crompton M. “Membrane Biochemistry: A Laboratory Manual on Transport and Bioenergetics” (eds. Carafoli E and Semenza G), pp. 62-69. Springer Verlag, New York, 1979.
- Griparic L., Van Der Wel N.N., Orozco I.J., Peters P.J., Van Der Bliek A.M. “Loss of the intermembrane space protein Mgm1/ OPA1 induces swelling and localized

- constrictions along the lengths of mitochondria". *J Biol Chem.* 2004 Apr 30;279(18):18792-8. Epub 2004 Feb 16.
- Guillette L.J., Pickford D.B., Crain D.A., Rooney A.A., Percival H.F. "Reduction in penis size and plasma testosterone concentrations in juvenile alligators living in a contaminated environment". *Gen Comp Endocrinol.* 1996 Jan;101(1):32-42.
  - Guillette L.J. "Endocrine disrupting contaminants--beyond the dogma". *Environ Health Perspect.* 2006 Apr;114 Suppl 1:9-12.
  - Hales K.G., Fuller M.T. "Developmentally regulated mitochondrial fusion mediated by a conserved, novel, predicted GTPase". *Cell.* 1997 Jul 11; 90(1):121-9.
  - Halestrap A.P. "Calcium, mitochondria and reperfusion injury: a pore way to die". *Biochem Soc Trans.* 2006 Apr;34(Pt 2):232-7.
  - Holstein A.F., Maekawa M., Nagano T., Davidoff M.S. "Myofibroblasts in the lamina propria of human semi-niferous tubules are dynamic structures of heterogeneous phenotype". *Arch Histol Cytol.* 1996 May;59(2):109-25.
  - Honda S., Hirose S. "Stage-specific enhanced expression of mitochondrial fusion and fission factors during spermatogenesis in rat testis". *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2003;311:424-432.
  - Honkakoski Paavo, Moore Rick, Washburn Kimberly A., Negishi Masahiko. "Activation by Diverse Xenochemicals of the 51-Base Pair Phenobarbital Responsive Enhancer Module in the CYP2B10 Gene". *Mol Pharmacol.* 1998 Apr;53(4):597-601.
  - Hoppins S., Lackner L., Nunnari J. "The machines that divide and fuse mitochondria". *Annu Rev Biochem.* 2007; 76:751-80.
  - Goyal G., Fell B., Sarin A., Youle R.J., Sriram V. "Role of mitochondrial remodeling in programmed cell death in *Drosophila melanogaster*". *Dev Cell.* 2007 May;12(5):807-16.
  - Inoue K., Nakada K., Ogura A., Isobe K., Goto Y., Nonaka I., Hayashi J.I. "Generation of mice with mitochondrial dysfunction by introducing mouse mtDNA carrying a deletion into zygotes". *Nat Genet*26: 176-181 (2000).
  - James D.I., Parone P.A., Mattenberger Y., Martinou J.C. "hFis1, a novel component of the mammalian mitochondrial fission machinery". *J Biol Chem.* 2003 Sep 19;278(38):36373-9. Epub 2003 Jun 3.

- Kaasik A., Safiulina D., Zharkovsky A., Veksler V. “Regulation of mitochondrial matrix volume”. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2007 Jan;292(1):C157-63. Epub 2006 Jul 26.
- Kanamaru Y., Sekine S., Ichijo H., Takeda K. “The phosphorylation-dependent regulation of mitochondrial proteins in stress responses”. *J Signal Transduct.* 2012;2012:931215. doi: 10.1155/2012/931215. Epub 2012 Jul 15.
- Kelce W., Stone C., Laws S., et al. “Persistent DDT metabolite p,p'-DDE is a potent androgen receptor antagonist”. *Nature*; 375:581-585,1995.
- Kierszenbaum A. L. “Mammalian spermatogenesis *in vivo* and *in vitro*, a partnership of spermatogenic and somatic cell lineages”. *Endocr. Rev.* 15, 116-134; 1994.
- Korsmeyer S.J., Gross A., Harada H., Zha J., Wang K., Yin X.M., Wei M., Zinkel S. “Death and survival signals determine active/inactive conformations of pro-apoptotic BAX, BAD, and BID molecules”. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol.* 1999;64:343-50.
- Lackner C., Gogg-Kamerer M., Zatloukal K., Stumptner C., Brunt E.M., Denk H. “Ballooned hepatocytes in steatohepatitis: the value of keratin immunohistochemistry for diagnosis”. *J Hepatol.* 2008 May; 48(5):821-8.
- Langer P., Ukropec J., Kocan A., Drobna B., Radikova Z., Huckova M., Imrich R., Gasperikova D., Klimes I., Trnovec T. “Obesogenic and diabetogenic impact of high organochlorine levels (HCB, p,p'-DDE, PCBs) on inhabitants in the highly polluted Eastern Slovakia”. *Endocr Regul.* 2014 Jan;48(1):17-24.
- Leblond C.P., Clermont Y. “Definition of the stages of the cycle of the seminiferous epithelium in the rat”. *Ann N Y Acad Sci.* 1952 Nov 20;55(4):548-73.
- Lee Y.J., Jeong S.Y., Karbowski M., Smith C.L., Youle R.J. “Roles of the mammalian mitochondrial fission and fusion mediators Fis1, Drp1, and OPA1 in apoptosis”. *Mol Biol Cell.* 2004 Nov;15(11):5001-11. Epub 2004 Sep 8.
- Liesa M., Palacín M., Zorzano A. “Mitochondrial dynamics in mammalian health and disease.” *Physiol Rev.* 2009 Jul;89(3):799-845. doi: 10.1152/physrev.00030.2008.
- Lionetti L., Mollica M.P., Donizzetti I., Gifuni G., Sica R., Pignalosa A., Cavaliere G., Gaita M., De Filippo C., Zorzano A., Putti R. “High-lard and high-fish-oil diets differ in their effects on function and dynamic behaviour of rat hepatic mitochondria”.

PLoS One. 2014 Mar 24;9(3):e92753. doi: 10.1371/journal.pone.0092753. eCollection 2014.

- Liu C., Shi Y., Li H., Wang Y., Yang K. “p,p'-DDE disturbs the homeostasis of thyroid hormones via thyroid hormone receptors, transthyretin, and hepatic enzymes”. *Horm Metab Res.* 2011 Jun;43(6):391-6. Epub 2011.
- Liu X., Hajnóczky G. “Altered fusion dynamics underlie unique morphological changes in mitochondria during hypoxia-reoxygenation stress”. *Cell Death Differ.* 2011 Oct; 18(10):1561-72. doi: 10.1038/cdd.2011.13. Epub 2011 Mar 4.
- Lorenzo H.K., Susis S.A., Penninger J., Kroemer G. “Apoptosis inducing factor (AIF): a phylogenetically old, caspase-independent effector of cell death”. *Cell Death Differ.* 1999 Jun;6(6):516-24.
- Loew, L.M. “Potentiometric membrane dyes and imaging membrane potential in single cells”. *Fluorescent and Luminescent Probes for Biological Activity.* W.T. Mason, editor. Academic Press, London. 210–221; 1999..
- Lundholm C.D. “DDE-induced eggshell thinning in birds: effects of p,p'-DDE on the calcium and prostaglandin metabolism of the eggshell gland”. *Comp Biochem Physiol C Pharmacol Toxicol Endocrinol.* 1997 Oct;118(2):113-28.
- Mannella Carmen A. “Structure and dynamics of the mitochondrial inner membrane cristae”. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)*; Volume 1763, Issues 5–6, May–June 2006, Pages 542–548.
- Middendorff R., Müller D., Mewe M., Mukhopadhyay A.K., Holstein A.F., Davidoff M.S. “The tunica albuginea of the human testis is characterized by complex contraction and relaxation activities regulated by cyclic GMP”. *J Clin Endocrinol Metab.* 2002 Jul;87(7):3486-99.
- Milnes M.R., Bryan T.A., Medina J.G., Gunderson M.P., Guillette L.J. “Developmental alterations as a result of in ovo exposure to the pesticide metabolite p,p'-DDE in Alligator mississippiensis”. *Gen Comp Endocrinol.* 2005 Dec;144(3):257-63. Epub 2005 Aug 22.
- Miyawaki I., Matsumoto I., Horie H., Inada H., Kimura J., Funabashi H., Seki T. “Toxicological approach for elucidation of clobazam-induced hepatomegaly in male rats”. *Regul Toxicol Pharmacol.* 2011 Aug;60(3):323-31. doi: 10.1016/j.yrtph.2011.04.009. Epub 2011 May 7.

- Mota P.C., Cordeiro M., Pereira S.P., Oliveira P.J., Moreno A.J., Ramalho-Santos J. “Differential effects of p,p'-DDE on testis and liver mitochondria: implications for reproductive toxicology”. *Reprod Toxicol.* 2011 Jan; 31(1):80-5. doi: 10.1016/j.reprotox.2010.09.010. Epub 2010 Oct 15.
- Mozdy A.D., McCaffery J.M., Shaw J.M. “Dnm1p GTPase-mediated mitochondrial fission is a multi-step process requiring the novel integral membrane component Fis1p”. *J Cell Biol.* 2000 Oct 16; 151(2):367-80.
- Narayan S., Dani H. M., Misra Bull U. K. “Effect of Intratracheally Administered DDT and Endosulfan on Pulmonary and Hepatic Respiratory Cytochromes”. *Environ. Contam. Toxicol.* (1984) 33:193-199.
- Nault R., Al-Hameedi S., Moon T.W. “Effects of polychlorinated biphenyls on whole animal energy mobilization and hepatic cellular respiration in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*”. *Chemosphere.* 2012 May;87(9):1057-62. doi: 10.1016/j.chemosphere.2012.02.012. Epub 2012 Mar 10.
- Neuspiel M., Zunino R., Gangaraju S., Rippstein P., McBride H. “Activated mitofusin 2 signals mitochondrial fusion, interferes with Bax activation, and reduces susceptibility to radical induced depolarization”. *J Biol Chem.* 2005 Jul 1. Epub 2005 May 4; 280(26):25060-70.
- Nieschlag E., Behre H.M., Weinbauer G.F., Gudermann T., Simoni M., Spiteri-Grech J., Cooper T.G. “Report of the 7th European Workshop on Molecular and Cellular Endocrinology of the Testis”. *Mol Cell Endocrinol.* 1992 Sep;87(1-3):R25-42.
- Okamoto K., Shaw J.M. “Mitochondrial morphology and dynamics in yeast and multicellular eukaryotes”. *Annu Rev Genet.* 2005; 39:503-36.
- Olichon A., Emorine L.J., Descoins E., Pelloquin L., Bricchese L., Gas N., Guillou E., Delettre C., Valette A., Hamel C.P., Ducommun B., Lenaers G., Belenguer P. “The human dynamin-related protein OPA1 is anchored to the mitochondrial inner membrane facing the inter-membrane space”. *FEBS Lett.* 2002 Jul 17; 523(1-3):171-6.
- Olichon A., Baricault L., Gas N., Guillou E., Valette A., Belenguer P., Lenaers G. “Loss of OPA1 perturbs the mitochondrial inner membrane structure and integrity, leading to cytochrome c release and apoptosis”. *J Biol Chem.* 2003 Mar 7;278(10):7743-6. Epub 2002 Dec 31.

- Olichon A., Landes T., Arnauné-Pelloquin L., Emorine L.J., Mills V., Guichet A., Delettre C., Hamel C., Amati-Bonneau P., Bonneau D., Reynier P., Lenaers G., Belenguer P. “Effects of OPA1 mutations on mitochondrial morphology and apoptosis: relevance to ADOA pathogenesis”. *J Cell Physiol.* 2007 May;211(2):423-30.
- Otsuga D., Keegan B.R., Brisch E., Thatcher J.W., Hermann G.J., Bleazard W., Shaw J.M. “The dynamin-related GTPase, Dnm1p, controls mitochondrial morphology in yeast”. *J Cell Biol.* 1998 Oct 19; 143(2):333-49.
- Ouyang Y. B., Kuroda S., Kristian T., Siesjo B. K. “Release of mitochondrial aspartate aminotransferase (MAST) following transient focal cerebral ischemia suggests the opening of a mitochondrial permeability transition pore”. *Neurosci.Res. Commun.* 20: 167–173; 1997.
- Palin K.J., Wilson C.G., Davis S.S. “The effects of oils on the lymphatic absorption of DDT”. *JPharm Pharmacol* 1982; 34: 707-710.
- Pardini R.S., Heidker J.C., Baker T.A., Payne B. “Toxicology of various pesticides and their decomposition products on mitochondrial electron transport”. *Arch Environ Contam Toxicol.* 1980;9(1):87-97.
- Parker V.H. “1:1:1-Trichloro-2:2-di-(p-chlorophenyl)ethane (DDT) and rat adipose tissue”. *Biochem J.* 1960 Oct;77(1):74-8.
- Pearce G.W., Mattson A.M., Hayes W.J. “Examination of human fat for the presence of DDT”. *Science* 116:254-256, 1952.
- Pereira S.P., Pereira G.C., Moreno A.J., Oliveira P.J. “Can drug safety be predicted and animal experiments reduced by using isolated mitochondrial fractions?” *Altern Lab Anim.* 2009 Sep;37(4):355-65.
- Philibert A., Schwartz H., Mergler D. “An exploratory study of diabetes in a First Nation community with respect to serum concentrations of p,p'-DDE and PCBs and fish consumption”. *Int J Environ Res Public Health.* 2009 Dec;6(12):3179-89. doi: 10.3390/ijerph6123179. Epub 2009 Dec 11.
- Qualls C.W., Lubet R.A., Lochmiller R.L., Elangbam C.S., Lish J.W., Nims R.W. “Cytochrome P450 induction in feral Cricetid rodents: a of field and laboratory investigations”. *Comp Biochem Physiol Pharmacol Toxicol Endocrinol.* 1998 Nov;121(1-3):55-63.



- Quan C., Shi Y., Wang C., Wang C., Yang K. “p,p'-DDE damages spermatogenesis via phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase depletion and mitochondria apoptosis pathway”. *Environ Toxicol.* 2014 Nov 20. doi: 10.1002/tox.22072.
- Ramonet D., Perier C., Recasens A., Dehay B., Bovè J., Costa V., Scorrano L., Vila M. “Optic atrophy 1 mediates mitochondria remodeling and dopaminergic neurodegeneration linked to complex I deficiency”. *Cell Death and Differentiation* (2013) 20, 77–85; doi:10.1038/cdd.2012.95; published online 3 August 2012.
- Rappaport A.M., Borowy Z.J., Lougheed W.M., Lotto W.N. “Subdivision of hexagonal liver lobules into a structural and functional unit; role in hepatic physiology and pathology”. *Anat Rec.* 1954 May; 119(1):11-33.
- Rogan W.J., Chen A. “Health risks and benefits of bis(4-chlorophenyl)-1,1,1-trichloroethane (DDT)”. *Lancet.* 2005 Aug 27-Sep 2;366(9487):763-73.
- Rojo M., Legros F., Chateau D., Lombès A.” Membrane topology and mitochondrial targeting of mitofusins, ubiquitous mammalian homologs of the transmembrane GTPase Fzo”. *J Cell Sci.* 2002 Apr 15; 115(Pt 8):1663-74.
- Ruiz-Pesini E., Diez C., Lapena A.C., Perez-Martos A., Montova J., Alvarez E., Arenas J., Lopez-Perez M.J. “Correlation of Sperm Motility with Mitochondrial Enzymatic activities”. *Clin Chem* 44,1616-1620,(1998).
- Russell L.D., Clermont Y. “Degeneration of germ cells in normal, hypophysectomized and hormone treated hypophysectomized rats”. *ANAT REC* 1977 Mar;187(3):347-66.
- Santel A., Fuller M.T. ”Control of mitochondrial morphology by a human mitofusin”. *J Cell Sci.* 2001 Mar; 114(Pt 5):867-74.
- Santel A, Frank S, Gaume B, Herrler M, Youle RJ, Fuller MT. “Mitofusin-1 protein is a generally expressed mediator of mitochondrial fusion in mammalian cells”. *J Cell Sci.* 2003 Jul 1;116(Pt 13):2763-74. Epub 2003 May 20.
- Schulte-Hermann R. “Induction of liver growth by xenobiotic compounds and other stimuli”. *CRC Crit Rev Toxicol.* 1974 Sep;3(1):97-158.
- Scorrano L., Ashiya M., Buttle K., Weiler S., Oakes S.A., Mannella C.A., Korsmeyer S.J. “A distinct pathway remodels mitochondrial cristae and mobilizes cytochrome c during apoptosis”. *Dev Cell.* 2002 Jan; 2(1):55-67.

- Scorrano L. and Korsmeyer S.J. “Mechanisms of cytochrome c release by proapoptotic BCL-2 family members”. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 304:437–444; 2003.
- Semenza J.C., Tolbert P.E., Rubin C.H., Guillette L.J., Jackson R.J. “Reproductive toxins and alligator abnormalities at Lake Apopka, Florida”. *Environ Health Perspect.* 1997 Oct;105(10):1030-2.
- Sessa A., Belizàrio J.E., Marques M.M., Higuchi M.L., Schumacher R.I., Colquhoun A., Ito E., Kawakami J. “Mitochondrial swelling and incipient outer membrane rupture in preapoptotic and apoptotic cells”. *Anat Rec (Hoboken)*. 2012 Oct;295(10):1647-59. doi: 10.1002/ar.22553. Epub 2012 Aug 21.
- Shi Y.Q., Li H.W., Wang Y.P., Liu C.J., Yang K.D. “p,p'-DDE induces apoptosis and mRNA expression of apoptosis-associated genes in testes of pubertal rats”. *Environ Toxicol.* 2013 Jan;28(1):31-41. doi: 10.1002/tox.20694. Epub 2011 Mar 7.
- Singh A., Connell B.J., Chu I. “PCB 128-induced ultrastructural lesions in the rat liver”. *J Submicrosc Cytol Pathol.* 2000 Jan;32(1):145-52.
- Skulachev V.P. “Mitochondrial filaments and clusters as intracellular power-transmitting cables”. *Trends Biochem Sci.* 2001 Jan; 26(1):23-9.
- Smirnova E., Griparic L., Shurland D.L., Van Der Blik A.M. “Dynamin-related protein Drp1 is required for mitochondrial division in mammalian cells”. *Mol Biol Cell.* 2001 Aug; 12(8):2245-56.
- Smirnova E., Shurland D.L., Ryazantsev S.N., Van Der Blik AM. “A human dynamin-related protein controls the distribution of mitochondria”. *J Cell Biol.* 1998 Oct 19; 143(2):351-8.
- Smith A.G. “Chlorinated Hydrocarbon Insecticides”. In Hayes WJ, Jr and Laws ER, Jr, Eds. *Handbook of Pesticide Toxicology, Vol. 2 Classes of Pesticides.* New York, Academic Press, Inc. 1991.
- Smith J.J., Aitchison J.D. “Peroxisomes take shape”. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2013 Dec;14(12):803-17. doi: 10.1038/nrm3700.
- Song G., Chen G.G., Chau D.K., Miao J., Lai P.B. “Bid exhibits S phase checkpoint activation and plays a pro-apoptotic role in response to etoposide-induced DNA damage in hepatocellular carcinoma cells”. *Apoptosis.* 2008 May;13(5):693-701. doi: 10.1007/s10495-008-0195-8.

- Song Y., Shi Y., Yu H., Hu Y., Wang Y., Yang K. “p,p'-Dichlorodiphenoxydichloroethylene induced apoptosis of Sertoli cells through oxidative stress-mediated p38 MAPK and mitochondrial pathway”. *Toxicol Lett.* 2011 Apr 10;202(1):55-60. doi: 10.1016/j.toxlet.2011.01.020. Epub 2011 Jan 28.
- Song L., Liu J., Jin X., Li Z., Zhao M., Liu W. “p,p'-Dichlorodiphenyldichloroethylene Induces Colorectal Adenocarcinoma Cell Proliferation through Oxidative Stress”. *PLoS ONE* 9(11): e112700. doi:10.1371/journal.pone.0112700; (2014).
- Sugioka R., Shimizu S., Tsujimoto Y. “Fzo1, a protein involved in mitochondrial fusion, inhibits apoptosis”. *J Biol Chem.* 2004 Dec 10; 279(50):52726-34. Epub 2004 Sep 30.
- Susin S.A., Lorenzo H.K., Zamzami N., Marzo I., Snow B.E., Brothers G.M., Mangion J., Jacotot E., Costantini P., Loeffler M., Larochette N., Goodlett D.R., Aebersold R., Siderovski D.P., Penninger J.M., Kroemer G. “Molecular characterization of mitochondrial apoptosis-inducing factor”. *Nature.* 1999 Feb 4;397(6718):441-6.
- Tates A. D. “Cytodifferentiation during Spermatogenesis in *Drosophila melanogaster*: An Electron Microscope Study”. Rijksuniversiteit, Leiden 1971.
- Tiemann U., Pöhland R., Küchenmeister U., Viergutz T. “Influence of organochlorine pesticides on transmembrane potential, oxidative activity, and ATP-induced calcium release in cultured bovine oviductal cells”. *Reprod Toxicol.* 1998 Sep-Oct;12(5):551-557.
- Turci R., Businaro J., Minoia C., Sturchio E., Ficociello B., Signorini S., Colosio C., Imbriani M. “Interferenti endocrini; schede monografiche: DDT, DDE e DDD”. *Ital Med Lav Erg;* 32:2, 93-144,2010.
- Turner RM , “Reproduction Fertility and Development”. 18:25-38,(2006).
- UNEP, 2001.
- Vonier P.M., Crain D.A., McLachlan J.A., Guillette L.J., Arnold S.F. “Interaction of environmental chemicals with the estrogen and progesterone receptors from the oviduct of the American alligator”. *Environ Health Perspect.* 1996 Dec;104(12):1318-22.

- Wayne Vogl A., Vaid Kuljeet S., Guttman Julian A. “The Sertoli Cell Cytoskeleton”. *Molecular Mechanisms in Spermatogenesis. Advances in Experimental Medicine and Biology* Volume 636, 2008, pp 186-211.
- Wei Y., Wang D., Topczewski F., Pagliassotti M.J. “Saturated fatty acids induce endoplasmic reticulum stress and apoptosis independently of ceramide in liver cells”. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2006 Aug;291(2):E275-81. Epub 2006 Feb 21.
- Wong ED, Wagner JA, Gorsich SW, McCaffery JM, Shaw JM, Nunnari J. “The dynamin-related GTPase, Mgm1p, is an intermembrane space protein required for maintenance of fusion competent mitochondria”. *J Cell Biol.* 2000 Oct 16;151(2):341-52.
- Wyde M.E., Bartolucci E., Ueda A., Zhang H., Yan B., Negishi M., You. L. “The environmental pollutant 1,1-dichloro-2,2-bis (p-chlorophenyl)ethylene induces rat hepatic cytochrome P450 2B and 3A expression through the constitutive androstane receptor and pregnane X receptor”. *Mol Pharmacol.* 2003 Aug;64(2):474-81.
- Yaffe M.P. “The machinery of mitochondrial inheritance and behavior”. *Science*; 1999 Mar 5;283(5407):1493-7.
- Yamaguchi R., Perkins G. “Dynamics of mitochondrial structure during apoptosis and the enigma of OPA1”. *Biochim Biophys Acta.* 2009 Aug;1787(8):963-72. doi: 10.1016/j.bbabi.2009.02.005. Epub 2009 Feb 24.
- Yang Song , Xianmin Liang, Yafei Hu, Yinan Wang, Haige Yu, Kedi Yang. “p,p'-DDE induces mitochondria-mediated apoptosis of cultured rat Sertoli cells”. *Toxicology* 253, 53-61 2008.
- Yao Dai, Theodore S. Lawrence, Liang Xu. “Overcoming cancer therapy resistance by targeting inhibitors of apoptosis proteins and nuclear factor-kappa B”. *Am J Transl Res.* 2009; 1(1): 1–15.
- Ye S.J., Ying L., Ghosh S., De França L.R., Russell L.D. “Sertoli cell cycle: a re-examination of the structural changes during the cycle of the seminiferous epithelium of the rat”. *Anat Rec.* 1993 Oct;237(2):187-98.
- Yoon Y., McNiven M.A. “Mitochondrial division: new partners in membrane pinching”. *Curr Biol.* 2001 Jan 23; 11(2):R67-70.
- Youle Richard J. and Karbowski Mariusz. “Mitochondrial fission in apoptosis”. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 6, 657-663 (August 2005).

- Yu T., Robotham J.L., Yoon Y. “Increased production of reactive oxygen species in hyperglycemic conditions requires dynamic change of mitochondrial morphology”. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2006;103:2653–2658.
- Zuchner S., Mersiyanova I.V., Muglia M., Bissar-Tadmouri N., Rochelle J., Dadali E.L., Zappia M., Nelis E., Patitucci A., Senderek J., Parman Y., Evgrafov O., Jonghe P.D., Takahashi Y., Tsuji S., Pericak-Vance M.A., Quattrone A., Battaloglu E., Polyakov A.V., Timmerman V., Schroder J.M., Vance J.M. “Mutations in the mitochondrial GTPase mitofusin 2 cause Charcot-Marie-Tooth neuropathy type 2A”. *Nat. Genet.*, 36 (2004), pp. 449–451.