



---

MECCANISMI MOLECOLARI DI RISPOSTA ALLO STRESS ENERGETICO ED  
OSSIDATIVO INDOTTI DALL'AZIONE SINERGICA DI TEBUCONAZOLO ED  
ECONAZOLO IN CELLULE MURINE DEL SERTOLI (TM4).

---

Tesi di Dottorato in Medicina Sperimentale (XXXII ciclo)  
SSD BIO/13



Dipartimento di scienze cliniche applicate e biotecnologiche

*Candidata*

Dott.ssa Sabrina Petricca

*Relatore*

Prof. Roberto Iorio

*Coordinatore del Corso*

Prof.ssa Mariagrazia Perilli

A.A. 2018/2019



## Sommario

1. Introduzione .....	2
<b>1.1. Composti azolici: struttura e meccanismo d'azione</b> .....	4
<b>1.2. Insorgenza e distribuzione degli Azoli: una classe emergente di inquinanti</b> .....	6
<b>1.3. Provvedimenti delle agenzie governative e legislazione</b> .....	7
<b>1.4. Vie di esposizione al TEB e dosi interne</b> .....	9
<b>1.5. Azoli ad uso farmacologico</b> .....	10
<b>1.6. Biodisponibilità e accenni alla farmacocinetica degli azoli</b> .....	11
<b>1.7. Importanza dei residui multipli e delle mixture</b> .....	11
<b>1.8. Studi sperimentali: effetti avversi e tossicità</b> .....	12
<b>1.9. Cenni sui meccanismi di morte cellulare</b> .....	17
<b>1.10. AMPK e metabolismo energetico</b> .....	17
<b>1.11. AMPK: struttura, profili di espressione e attività</b> .....	18
<b>1.12. Ruoli funzionali di AMPK</b> .....	20
<b>1.13. Cross-talk tra AMPK ed autofagia</b> .....	22
<b>1.14. Regolazione della dinamica mitocondriale da parte di AMPK</b> .....	24
<b>1.15. AMPK, molecola ponte tra autofagia ed omeostasi mitocondriale</b> .....	25
<b>1.16. Uno sguardo alla pathway lisosomiale</b> .....	26
2. Scopo del lavoro .....	27
3. Materiali e Metodi.....	29
<b>3.1. Chimici</b> .....	29
<b>3.2. Anticorpi</b> .....	29
<b>3.3. Colture cellulari e trattamenti</b> .....	30
<b>3.4. Determinazione della vitalità cellulare e valutazione delle interazioni</b> .....	30
<b>3.4.1. Teoria dell'indipendenza di Bliss</b> .....	31
<b>3.4.2. Calcolo del Combination Index</b> .....	32
<b>3.5. Analisi in citometria a flusso</b> .....	33
<b>3.5.1. Analisi del ciclo cellulare</b> .....	33
<b>3.5.2. Determinazione dell'apoptosi mediante saggio con Annexin-V-FITC</b> .....	33
<b>3.5.3. Determinazione del <math>\Delta\Psi_m</math></b> .....	34
<b>3.6. Rilevamento intracellulare delle specie reattive dell'ossigeno (ROS)</b> .....	34
<b>3.7. Rilevamento della concentrazione intracellulare degli adenilati</b> .....	34
<b>3.8. Analisi dell'espressione proteica mediante Western Blot</b> .....	35
<b>3.9. Microscopia confocale a fluorescenza</b> .....	35
<b>3.10. Analisi statistiche</b> .....	36
4. Risultati.....	37

<b>4.1.</b>	<b><i>Effetti citotossici indotti dall'azione sinergica di TEB ed ECO in cellule TM4.....</i></b>	<b>37</b>
<b>4.2.</b>	<b><i>La combinazione TEB/ECO induce l'arresto del ciclo cellulare in fase G0/G1 e l'attivazione di apoptosi in cellule TM4.....</i></b>	<b>40</b>
<b>4.3.</b>	<b><i>La combinazione TEB/ECO promuove un incremento dell'attività autofagica in cellule TM4.....</i></b>	<b>43</b>
<b>4.4.</b>	<b><i>L'autofagia indotta dal trattamento combinato TEB/ECO ha un ruolo essenziale nel mantenere la sopravvivenza delle cellule TM4.....</i></b>	<b>43</b>
<b>4.5.</b>	<b><i>Coinvolgimento dell'asse AMPK/ULK1 nell'autofagia MIX-indotta .....</i></b>	<b>46</b>
<b>4.6.</b>	<b><i>L'attivazione di AMPK è associata a variazioni dello stato energetico cellulare .....</i></b>	<b>49</b>
<b>4.7.</b>	<b><i>Disfunzionalità mitocondriale e stress ossidativo indotto dagli azoli nelle cellule TM4.....</i></b>	<b>51</b>
<b>4.8.</b>	<b><i>La combinazione TEB/ECO induce frammentazione mitocondriale e variazioni nelle dinamiche lisosomiali .....</i></b>	<b>54</b>
<b>5.</b>	<b>Discussione .....</b>	<b>56</b>
<b>6.</b>	<b>Conclusioni .....</b>	<b>63</b>
<b>7.</b>	<b>Bibliografia.....</b>	<b>65</b>



---

## 1. Introduzione

---

Negli ultimi decenni, l'esposizione ad una pletera di inquinanti chimici, sia nell'ambiente di lavoro che in quello domestico, sta rivestendo un ruolo sempre più di rilievo tra i fattori di rischio per la salute dell'uomo. Molte le fonti di tossicità ambientale i cui residui tossici si ritrovano presenti nel cibo, nell'acqua e nell'aria. Queste fonti includono composti organici e inorganici, di origine naturale ed artificiale, la cui esposizione può avere risvolti dannosi sugli organismi viventi.

Un aspetto ulteriore è rappresentato dai livelli di permanenza di questi xenobiotici nell'organo o tessuto sensibile al suo assorbimento; per alcune sostanze chimiche, infatti, l'eliminazione può essere una questione di giorni o mesi; per altre, il tasso di eliminazione è così basso che tali composti possono persistere all'interno dell'organismo anche per tutta la vita e causare così effetti deleteri.

I pesticidi rappresentano la maggiore fonte di tossicità ambientale. La ormai ben nota persistenza di questi composti, nonché i potenziali rischi ambientali ad essi associati, hanno favorito una crescita esponenziale delle ricerche sui loro effetti (Köhler e Triebkorn, 2013). La loro scarsa bio-degradabilità sfocia conseguentemente in situazioni di bio-accumulo, rese ancora più complesse dal fenomeno di "bio-magnification", quindi di propagazione all'interno della catena alimentare. In breve, dato che questi inquinanti non risultano essere facilmente biodegradabili, la sostanza chimica si accumula nel deflusso del suolo e quindi nei sedimenti; di conseguenza i sistemi idrici ed anche l'ambiente marino si inquinano e forme di vita, come pesci e molluschi, li accumulano facilmente nei loro tessuti. Infine, questo effetto viene ulteriormente amplificato quando anche gli animali a monte della catena alimentare assorbono la sostanza chimica, espletando il fenomeno di "bio-magnification", conosciuto anche come contaminazione diffusa.

La contaminazione diffusa è una delle più gravi minacce per la salute degli esseri umani e degli ecosistemi, riconosciute in campo internazionale (European Commission, 2006; ISPRA, 2012). La diffusione sui singoli nodi della rete alimentare può determinare difetti e disturbi cronici nelle piante e negli animali, con effetti a medio e lungo termine, espandendosi,

pertanto, nel cibo e nei mangimi destinati agli allevamenti (European Commission, 2001; Wiebe, 2003; European Commission, 2004; Van Lexmond et al., 2015). I valori di contaminazione diffusa sono veramente difficili da raccogliere, poiché generalmente si tratta di emissioni assai diluite in atmosfera, scarsamente rintracciabili da monitoraggi diretti e più facilmente rilevabili solo da un'analisi completa della "valutazione del ciclo vitale" (LCA) (Cherubini et al., 2009; Zucaro et al., 2009; Margni et al., 2002; APAT 2004) delle sostanze in esame.

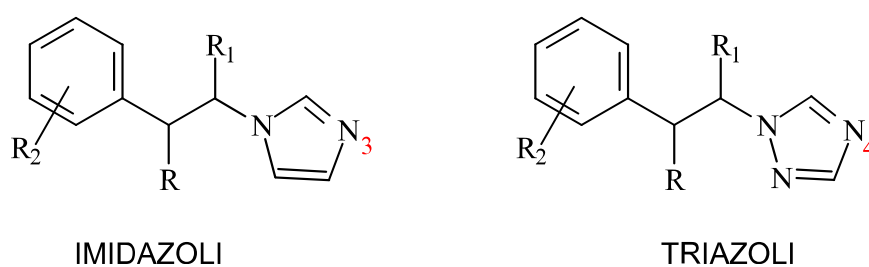
Il problema delle conseguenze per la salute umana da esposizione "cronica" a pesticidi, ovvero dell'esposizione a dosi minime, ma prolungate nel tempo, non riguarda solo la popolazione esposta per motivi lavorativi, ma la popolazione nella sua totalità (Hutter and Moshammer, 2018), essendo queste molecole o i loro metaboliti, spesso egualmente o ancor più tossici e persistenti (Mesnage et al., 2014), ormai stabilmente presenti sia nelle matrici ambientali (aria, acqua, suolo) che nella catena alimentare, come potenzialmente nell'organismo umano. Una mole crescente di evidenze scientifiche conferma come l'esposizione cronica a pesticidi possa comportare alterazioni di svariati organi e sistemi dell'organismo umano quali quello nervoso, endocrino, immunitario, renale, cardiovascolare, respiratorio e riproduttivo (Muñoz-Quezada et al. 2013, Alavanja et al. 2013, Corsini et al. 2013, Kjeldsen et al. 2013, Wang et al. 2014). Esistono molte evidenze del fatto che sia la fertilità maschile sia quella femminile potrebbero essere a rischio all'aumentare dell'esposizione ai pesticidi (Abell et al. 2000; Oliva et al. 2001).

È noto, a riguardo, che gli xenobiotici ambientali possono agire sul sistema riproduttivo maschile con diversi meccanismi d'azione, sia genetici che epigenetici, come interferenti endocrini o, ancora, come induttori di stress ossidativo. Ricerche sperimentali indicano come molti pesticidi assurgano il ruolo di interferenti endocrini che disturbano il funzionamento e l'omeostasi ormonali (Mnif et al. 2011; Mandrich et al. 2014).

In questo contesto troviamo la classe dei composti azolici. Questi rappresentano un gruppo di molecole idrofobiche di sintesi ampiamente utilizzate per combattere le infezioni fungine, sia in campo sanitario che agrochimico.

### 1.1. **Composti azolici: struttura e meccanismo d'azione**

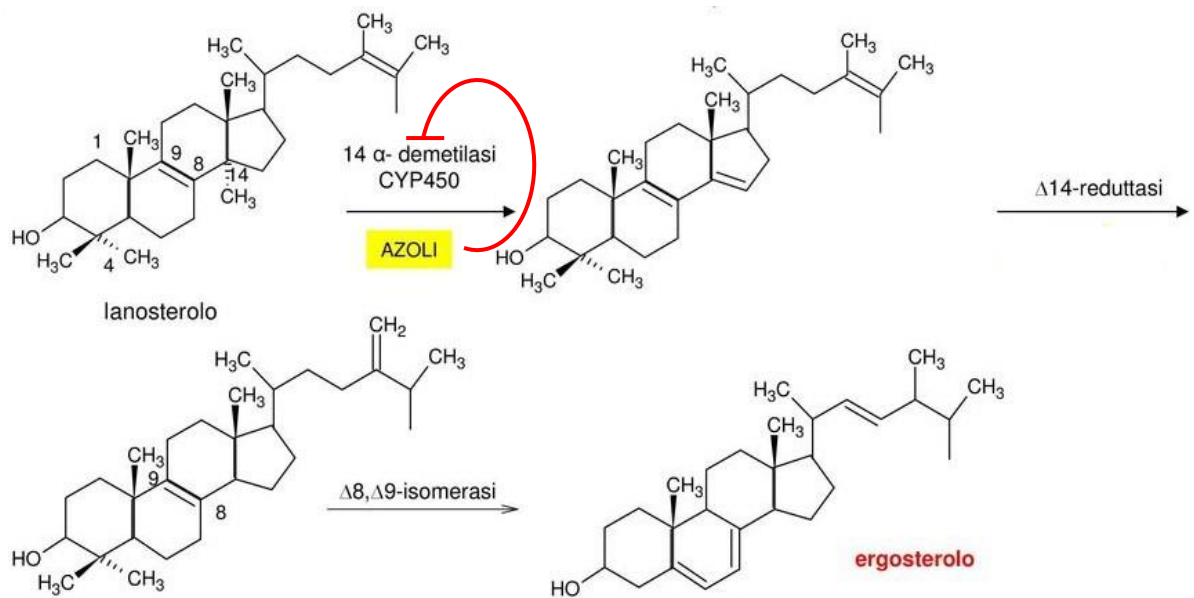
Strutturalmente i composti azolici consistono in formazioni eterocicliche aromatiche, distinguibili in due sottoclassi: triazoli ed imidazoli. Entrambe hanno una composizione a catena di carbonio associata al caratteristico fulcro della loro struttura chimica, ovvero il tipico anello pentatomico azotato, in cui N1 è legato almeno ad un gruppo lipofilo aromatico o arilalchilico, mediante un linker di 1 o 2 atomi di carbonio; il centro reattivo, includente diversi atomi di azoto all'interno dei legami, va a formare, quindi, un imidazolo (con 2 atomi di N, non adiacenti) o un triazolo (con 3 atomi di N, adiacenti) (Fig. 1). Tali strutture rappresentano il centro reattivo di queste molecole, che risultano così altamente predisposte per le reazioni di accoppiamento (Schnurch et al. 2007).



**Fig. 1. Struttura chimica delle due classi azoliche, imidazolica e triazolica.**

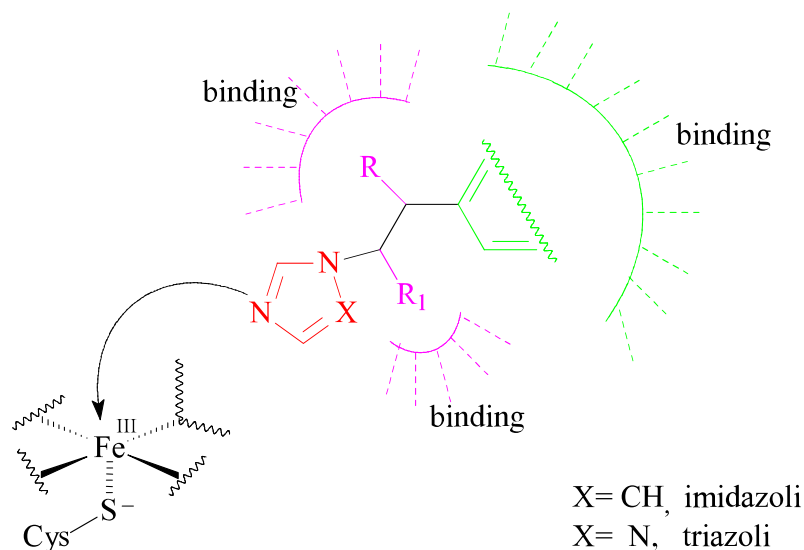
La struttura 1,2,3- o 1,2,4-triazolica risulta essere molto stabile in condizioni sia basiche che acide, per cui questi composti sono considerati come scaffold per la creazione di nuove strutture eterocicliche di sintesi, sia in campo agro-industriale che in campo medico; anche in questo ambito è ben nota la loro elevata attività farmacologica ad ampio spettro (Zhang et al. 2008, Srinivasa Reddy et al. 2015). Le loro proprietà chimico-fisiche si traducono, quindi, in un'alta stabilità chimica e fotochimica, ed una bassa costante di idrosolubilità, che nel complesso risultano in uno scarso indice di biodegradabilità.

Il loro principale meccanismo d'azione si esplica nell'attività antifungina, per la quale vengono caratterizzati. Il loro effetto consiste nella deplezione dell'ergosterolo, principale sterolo che compone la parete fungina, tramite interazione con l'enzima C14-alfa-demetilasi, una monossigenasi facente parte del complesso del citocromo P450, necessaria per la conversione del lanosterolo in ergosterolo (Song et al., 2007) (Fig. 2).



**Fig. 2. Meccanismo d'azione degli azoli.**

A livello molecolare, i fungicidi azolici inibiscono gli enzimi CYP51 tramite un meccanismo in cui l'atomo di azoto eterociclico (N3 imidazolico o N4 triazolico) si lega all'atomo di ferro del gruppo eme, al centro del sistema porfirinico del CYP450, che costituisce il sito attivo dell'enzima (Georgopapadaku, 1998). Questo legame inibisce l'attivazione del citocromo e, quindi, la funzione enzimatica (Fig.3).



**Fig.3. Interazione molecolare tra azoli (imidazoli e triazoli) e gruppo eme del CY51.**

CYP51 è un enzima evolutivamente conservato ed è l'unico membro della superfamiglia del citocromo CYP450 che mostra ortologhi identici dei domini catalitici tra i diversi regni biologici (Yoshida et al, 2000). È, quindi, importante notare come gli effetti tossici degli azoli siano da ricondurre spesso al loro meccanismo d'azione, in quanto risulta applicabile anche ad organismi differenti dai funghi.

### **1.2. *Insorgenza e distribuzione degli Azoli: una classe emergente di inquinanti***

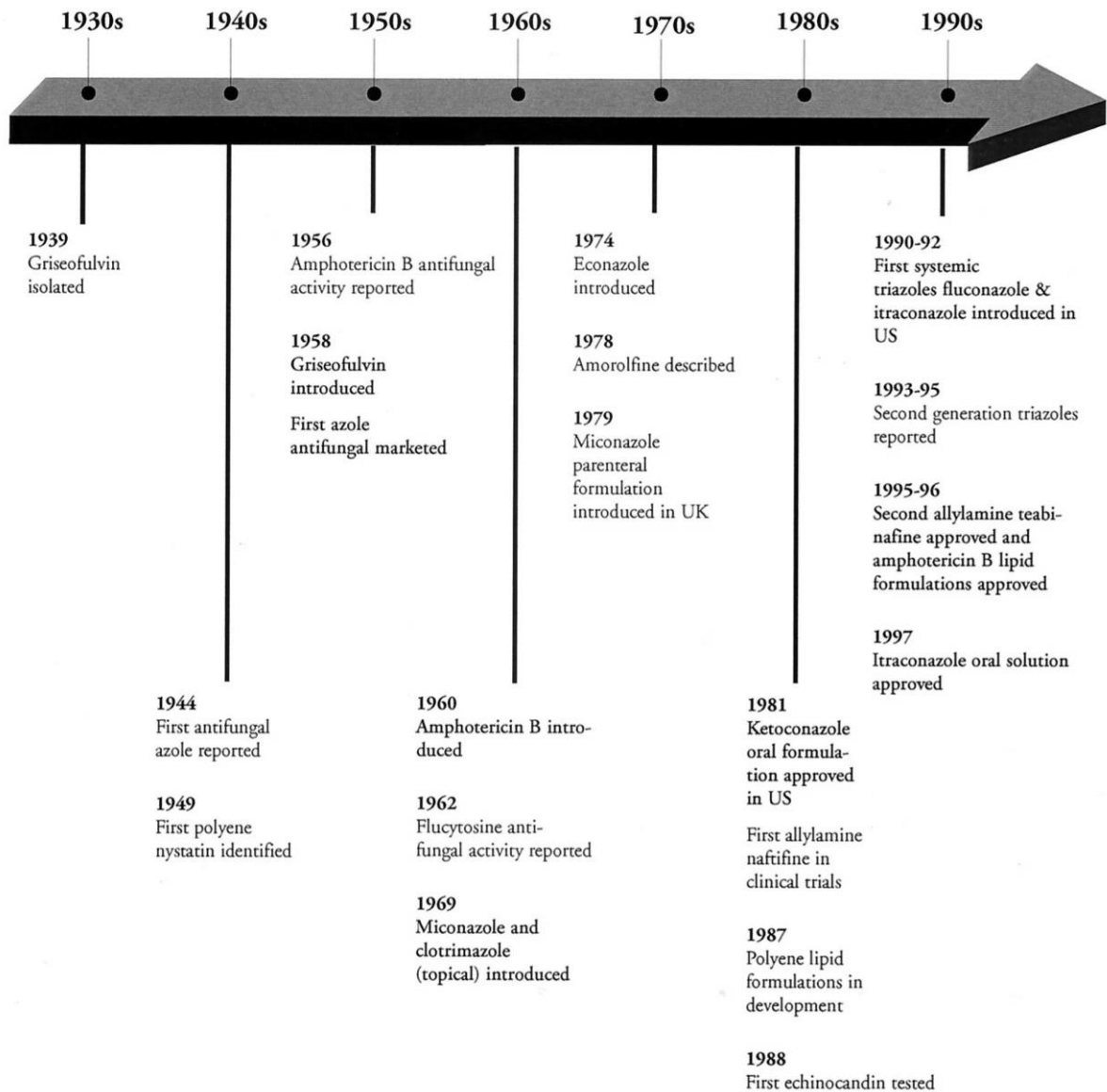
Negli ultimi anni, sia triazoli che imidazoli, sono stati classificati dalle agenzie governative (EFSA, FAO/WHO, etc.) come nuova categoria di inquinanti, dato il loro crescente utilizzo sia in campo agro-industriale come pesticidi ad ampio spettro (Tab.1), sia in ambito farmaceutico (Fig.4) come ingredienti attivi o coadiuvanti nei prodotti della cura della persona (PCP) (Lass-Florl, 2011; Castelli et al., 2014; Chen and Ying, 2015).

<b>Alcuni azoli ad uso agro-industriale</b>	<b>Classe</b>
Epossiconazolo (Epoxi)	TRIAZOLO
Prochloraz (Pcz)	IMIDAZOLO
Propiconazolo (Prop)	TRIAZOLO
Tebuconazolo (Teb)	TRIAZOLO

**Tab. 1. Alcuni dei pesticidi azolici ad uso agro-industriale commercializzati su scala mondiale.**

Importanti residui sono stati trovati frequentemente in matrici come il terreno, ma anche nelle acque e nei prodotti per consumo alimentare (Kahle et al., 2008; Li et al., 2014; Zhang et al., 2015; Zhao et al., 2018).

La classe degli azoli raggiunge il secondo posto in assoluto nel commercio di pesticidi in Cina (WBISS, Consulting co, Ltd, 2016) e per i loro vantaggi, economici e produttivi, sono in rapida espansione in tutto il resto del mondo.



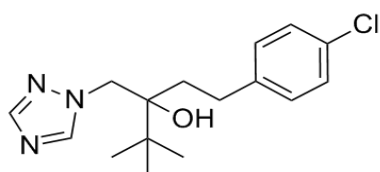
**Fig. 4. Gli eventi chiave nell'insorgenza dei farmaci azolici in ambito clinico (Sheehan et al., 1999).**

### **1.3. *Provvedimenti delle agenzie governative e legislazione***

Nel quadro del progetto "EU-coordinated monitoring programme" (EUCP) del 2017, l'agenzia governativa EFSA (European Food Safety Authority) pone come obiettivi quelli di effettuare un'analisi dettagliata riguardante l'accumulo dei residui di pesticidi nei prodotti alimentari a maggiore consumo, di origine sia vegetale che animale, ed il rischio alimentare correlato all'esposizione ad essi, nonché di aumentare l'efficienza dei sistemi di controllo europei al fine di garantire un alto livello di protezione del consumatore.

La maggior parte dei Paesi ha definito soglie di Livello Massimo di Residuo (LMR) per ogni sostanza, sopra le quali i prodotti alimentari si considerano non adatti al consumo umano. A tal riguardo l'EU stabilisce LMR che vengono applicati in tutti gli Stati membri. Diversi studi pubblicati tra il 2007 e il 2014 indicano che molte sostanze sono spesso presenti in forma di composti pluri-residuo ed in molti casi, a livelli che in alcuni Paesi superano i LMR (Latifah et al. 2011; Jardim et al. 2012).

Nei vertici della classifica EUCP dei pesticidi maggiormente in crescita negli ultimi anni, e tra questi all'interno della classe di azoli più utilizzati, dal monitoraggio dei dati nell'anno 2015 riguardanti gli stati membri dell'EU (inclusi gli stati EEA-European Environment Agency- ed EFTA-European Free Trade Association-), comprese le importazioni provenienti da stati terzi, troviamo in rapida ascesa il fungicida triazolico Tebuconazolo (TEB) (Fig. 5) (EFSA, 2017).



**Fig. 5. Struttura chimica del Tebuconazolo.**

I dati indicano che il TEB risulta tra i residui maggiormente presenti sia tra le fonti animali (tutti i campioni di miele analizzati) che vegetali; inoltre, nel caso dell'uva da tavola il TEB, insieme ad altri dieci pesticidi, è quello che più frequentemente supera l'LMR (in campioni provenienti da Cipro e dalla Turchia).

Da questi report emerge che nel complesso il fungicida TEB viene ritrovato nella lista dei pesticidi riscontrati più frequentemente in violazione degli LMR (sia nei prodotti dell'UE che sui prodotti provenienti da paesi terzi) nei dati rilevati nel 2015, ma non nel 2012.

Inoltre, i risultati della valutazione del rischio acuto, in cui la stima di esposizione a breve termine ha superato l'ARfD (Acute Reference Dose) hanno indicato 29 pesticidi (di cui lo

screening per potenziali rischi a breve termine per i consumatori è stato positivo per almeno un campione dei prodotti alimentari esaminati), tra i quali è presente ancora il fungicida TEB.

Nel complesso questi dati ci danno un'indicazione sul crescente uso/abuso di questo composto.

#### **1.4. Vie di esposizione al TEB e dosi interne**

Le principali vie di esposizione al TEB si realizzano attraverso dieta, inalazione o contaminazione dermica in aree di maggior utilizzo, come le zone rurali. Residui di TEB e/o suoi metaboliti, sono maggiormente ritrovati nei cereali, nei vegetali e nella frutta, in cui l'emivita residua risulta essere di circa sei giorni (Dong et al., 2014; Mohapatra et al., 2014; Zhang et al., 2015). Anche se pochi dati sono disponibili ancora per ottenere informazioni su larga scala, alcuni studi dimostrano che tra i metaboliti secondari rilevabili nei fluidi umani, soprattutto nelle urine, troviamo in maggior concentrazione il TEB-OH, per questi motivi considerato importante marker di rilevamento per l'attività residua del composto madre; le dosi interne del TEB-OH raggiungono nelle urine umane concentrazioni corrispondenti a  $\approx 1.198 \mu\text{M}$  (Mercadante et al., 2014). Evidenze in letteratura rivelano altresì una massima esposizione dermica, riguardante contaminazioni dirette di agricoltori nel sito di lavoro, riconducibili a 40.89 ppm, corrispondenti ad una concentrazione di circa  $133 \mu\text{M}$  (Fustinoni et al., 2014).

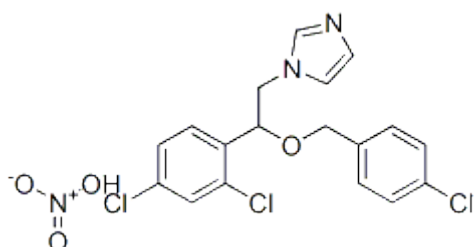
### 1.5. Azoli ad uso farmacologico

Dati in letteratura includono gli azoli nella classe dei “contaminanti di interesse emergente” (contaminants of emerging concern, CEC).

Alcuni composti azolici ad uso farmaceutico	Classe
Econazolo (Eco)	IMIDAZOLO
Fluconazolo (Fluco)	TRIAZOLO
Ketoconazolo (Keto)	IMIDAZOLO
Miconazolo (Mico)	IMIDAZOLO

**Tab. 2.** Alcuni dei farmaci azolici comunemente prescritti e ritrovati come contaminanti.

In particolare, la presenza di alcuni farmaci azolici comunemente prescritti (Tab. 2), è stata riportata in diverse matrici, come le acque reflue (Lindberg et al., 2014; Rossmann et al., 2014; Chen et al., 2014), acque superficiali (Kim et al., 2009; Chitescu et al., 2012; Zgoła - Grzeškowiak e Grzeškowiak, 2013), acque sotterranee (Peng et al., 2014), fanghi (Chen et al., 2012; Östman et al., 2017; Huang et al., 2012), sedimenti (Chen et al., 2014; Huang et al., 2010, 2013), suoli modificati bio-solidi (Chen et al., 2013a, 2013b; Gottschall et al., 2012) e recentemente anche in acque potabili (Assress et al., 2019). Tra questi ritroviamo l'Econazolo (ECO) (fig. 6), imidazolo il cui quoziente di rischio risulta maggiore per gli organismi acquatici (Assress et al., 2019).



**Fig. 6.** Struttura chimica dell'Econazolo.

### **1.6. Biodisponibilità e accenni alla farmacocinetica degli azoli**

La biodisponibilità farmacologica di questi composti è di difficile definizione, data l'esigua disponibilità di dati a riguardo; questo valore varia tra i vari tipi di molecole appartenenti alla stessa famiglia ed è in stretta relazione sia con le proprietà chimico-fisiche della molecola stessa, che con la variabilità inter-specie; in termini farmacocinetici, il circuito di ADME (assorbimento, distribuzione, metabolismo ed eliminazione) di ogni composto varia in base alle caratteristiche del tessuto considerato, stimate tramite il coefficiente di ripartizione tra tessuti e sangue (basato sul rapporto ottanolo/acqua, che definisce la misura del grado di lipofilicità) (Chimuka et al., 2009; Coscolla et al., 2009); dati sperimentali ottenuti su ratti (Joint FAO/WHO Meeting for Pesticide Residues, JMPR, 2011) dimostrano per il TEB tempi di assorbimento veloce, per la quasi totalità di tessuti ed organi, con la concentrazione maggiore ritrovata in reni e milza solo dopo 1 h dalla somministrazione; le sue proprietà lipofile ( $\log P_{ow}$  3.7) (Coscolla et al., 2009), giustificano la ritenzione subitanea, già dopo singola somministrazione, nel tessuto adiposo, e rendono anche plausibile l'ipotesi di un accumulo a lungo termine successivo a somministrazioni plurime, con emivita di eliminazione estesa fino alle 72 h (Jònsdóttir et al., 2016).

### **1.7. Importanza dei residui multipli e delle mixture**

In generale siamo tutti esposti a cocktail di pesticidi attraverso l'ambiente e gli alimenti che consumiamo ogni giorno. Molti studi, infatti, mostrano che i prodotti alimentari contengono spesso diversi tipi di residui, e dunque i pesticidi che finiscono sulle nostre tavole si presentano in forma di combinazioni o cocktail (Fenik et al. 2011). Gli effetti tossici di queste combinazioni sono scarsamente conosciuti, ma è accertato che alcune sostanze interagiscono tra loro in maniera sinergica, ciò significa che il livello di nocività del loro effetto combinato è maggiore di quello della somma della tossicità appartenente alle singole sostanze (Reffstrup et al. 2010). Valutare la tossicità di un cocktail di pesticidi è però molto complesso a causa del gran numero di potenziali combinazioni e interazioni che possono verificarsi. Lo studio di Sutton e colleghi (2011) afferma che negli Stati Uniti, a causa dei residui di pesticidi presenti negli alimenti, l'esposizione cumulativa nella popolazione può risultare potenzialmente alta. Oltre ai rischi ambientali, enfatizzati a causa dell'effetto

“miscela”, è emerso che gli azoli potrebbero agire in sinergia, andando così ad amplificare gli effetti avversi e/o di bioaccumulo anche di altri contaminanti verso organismi non bersaglio, dato che i farmaci antifungini azolici sono in grado di interferire molto facilmente con il metabolismo di altri composti (Chen e Ying, 2015).

Il potenziale di tossicità espresso da queste “miscela” è ad oggi oggetto di studio, grazie all’esortazione promossa dalle agenzie governative nel trovare linee guida a livello internazionale per migliorare la valutazione del rischio e la tutela del consumatore (e.g. EFSA, 2009; EFSA, 2017).

### 1.8. Studi sperimentali: effetti avversi e tossicità

Il CYP51 (C14- $\alpha$ -demetilasi), come già chiarito, è un enzima appartenente alla superfamiglia del citocromo P450, evolutivamente conservato all’interno di specie distanti dal punto di vista filogenetico, dai funghi, alle piante e agli animali (Fig.7).

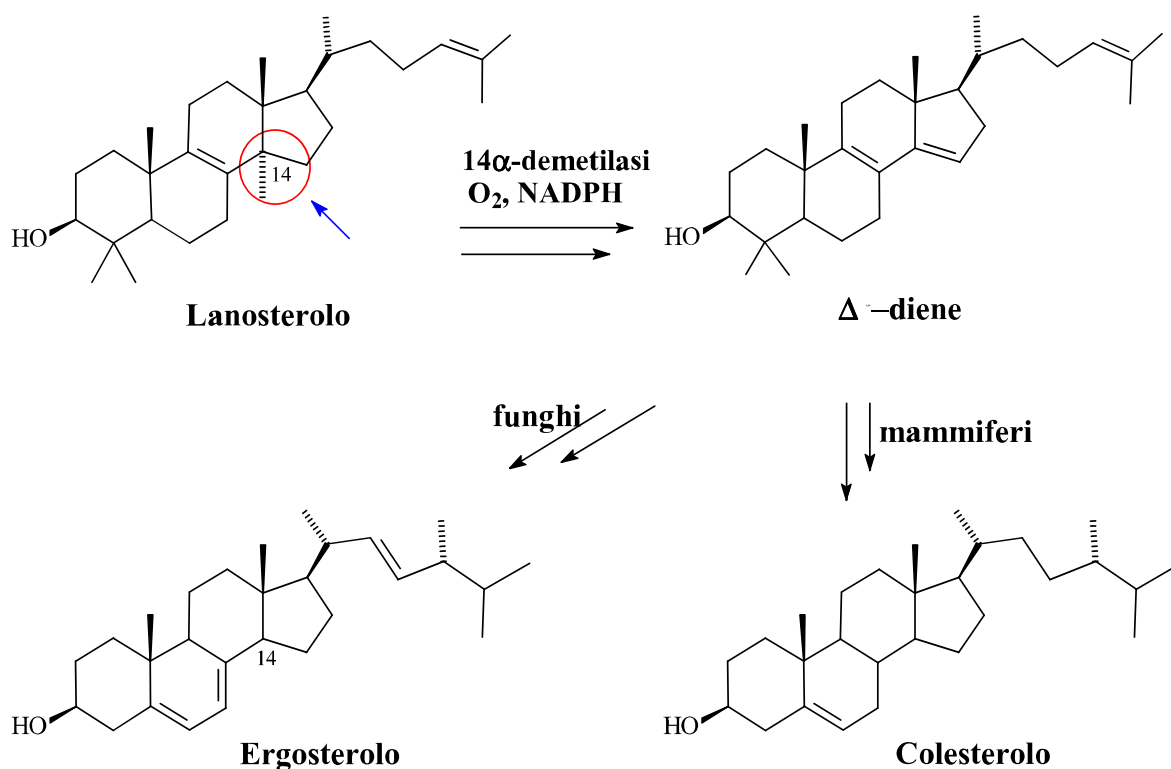
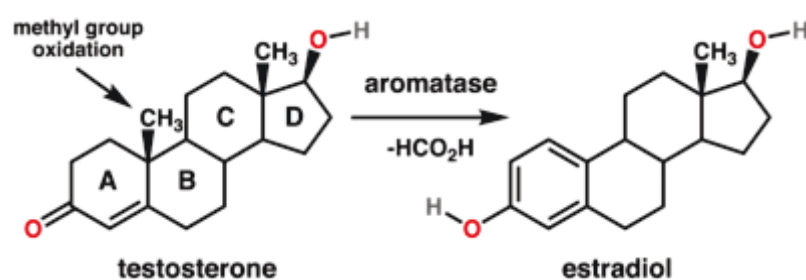


Fig. 7. Via di sintesi dell’ergosterolo (funghi) o del colesterolo (mammiferi) catalizzata dall’enzima C14- $\alpha$ -demetilasi.

Il potenziale quindi accertato, appartenente sia ai triazoli che agli imidazoli, di essere considerati distruttori endocrini va deputato all'agire un'interferenza diretta nel circuito della biosintesi degli steroidi (Juberg et al., 2006; Zhang et al., 2002) ed in particolare alla possibilità d'inibizione di enzimi appartenenti alla famiglia del citocromo P450; tra questi vi è l'aromatasi, enzima deputato alla biosintesi degli estrogeni e che esplica tale funzione prendendo parte alla via catalitica che dal testosterone porta alla formazione di estradiolo (Fig. 8).



**Fig. 8.** Reazione di catalisi dell'estradiolo tramite l'enzima aromatasi.

L'aromatasi è espressa in molti tessuti, come quelli gonadici, endometriali, placentari, adiposi, muscolari, epatici, cerebrali, connettivali e piliferi.

Per questo motivo, la fenomenologia tossica espressa dagli azoli può avere molti risvolti clinici.

#### - **Effetti sulla distruzione endocrina**

Come già descritto, negli effetti principali vi è, come conseguenza maggiormente accertata, la capacità di distruzione endocrina, dimostrata *in vitro* per tutti i composti azolici presentati in Tab.1 (ad uso agro-industriale) e Tab.2 (ad uso farmaceutico) (Kjaerstad et al., 2010); in particolare, studi *in vitro* e *in vivo* hanno riportato forti attività anti-androgenetica ed - estrogenica esibite dal Tebuconazolo e dall'Econazolo (Taxvig et al., 2007, 2008; Kjaerstad et al., 2010; Orton et al., 2011, 2012; Dreisig et al., 2013; Christen et al., 2014; Lv et al., 2017; Atmaca et al., 2018). In particolare, l'esposizione al Tebuconazolo alterava i livelli di testosterone nelle cellule di Leydig (Roelofs et al., 2014) e in *Xenopus laevis* (Poulsen et al., 2015). Questi dati sono in linea con altri studi *in vivo*: in maniera analoga l'Econazolo, il

Miconazolo ed il Prochloraz, risultano potenti inibitori della sintesi del testosterone in feti di ratti (Laier et al., 2006); dati in letteratura mostrano come ratti maschi, esposti a Prochloraz durante la pubertà (Blystone et al., 2007; Vingaard et al., 2005), o a Epoxiconazolo e Tebuconazolo nella vita fetale (Taxvig et al., 2007), mostravano riduzioni della concentrazione testicolare di testosterone. Inoltre, Ketoconazolo, Miconazolo ed Econazolo mostrano effetti avversi anche sull'enzima CYP17, presente a livello sia surrenale che testicolare, in studi su maschi ratti ed umani (Ayub et al., 1987; Weber et al., 1993). Anche per il Fluconazolo la letteratura rivela effetti simili sia *in vitro* che *in vivo* (Hanger et al., 1988); recenti evidenze mostrano come il Fluconazolo, con effetti non inferiori a quelli mostrati dal Ketoconazolo, inibisce in modo dose-dipendente la produzione di cortisolo in cellule adrenocorticali umane *in vitro*, trattate con concentrazioni corrispondenti alle dosi cliniche (Van Der Pas et al., 2012).

- ***Effetti sulla riproduzione e fertilità***

Inoltre, per quanto riguarda la riproduzione dei mammiferi, sebbene ad oggi non siano ancor ben chiariti tutti gli effetti tossici sulla fertilità, è stato dimostrato come alcuni azoli ad uso farmaceutico abbiano effetti negativi sulla fertilità sia in ratti femmine (Cummings et al., 1997; Shirai et al., 2009) che in roditori maschi (Joshi et al., 1994, 2016; Waller et al., 1990). A tal riguardo, sono stati descritti effetti tossici indotti dal Tebuconazolo, tra cui disfunzione delle cellule del trofoblasto placentare (Jacobsen et al., 2012), nonché riduzione del peso dell'epididimo e della conta degli spermatozoi (Zhou et al., 2016). Inoltre, alterazioni delle funzioni testicolari associate a riduzioni della densità e della motilità degli spermatozoi sono state riportate in ratti maschi esposti al Tebuconazolo per un periodo di 30 giorni (Joshi et al., 2016). Tra gli ulteriori effetti degli azoli troviamo ancora demascolinizzazione, riduzione del peso testicolare puberale, in ratti maschi (Goetz et al, 2007), o virilizzazione e distruzione dell'estro in prole di ratti femmine (Rockett et al., 2006).

- ***Capacità di indurre teratogenesi ed anomalie prenatali***

Anomalie craniofacciali, correlate ad interferenza nella via dell'acido retinoico, sono state dimostrate come importante effetto teratogeno indotto dagli azoli (Marotta e Tiboni, 2010; Tiboni et al., 2016); tra i più disparati risvolti riconducibili all'esposizione a farmaci azolici, tra cui il Miconazolo ed il Ketoconazolo, recenti evidenze suggeriscono, inoltre, aumento del rischio di aborto (Rosa et al, 1987), e di insorgenza di varie patologie prenatali, tra cui la

“sindrome del cuore sinistro ipoplastico” (Carter et al., 2008); segmentazione, migrazione delle cellule della cresta neurale e anomalie dell'arco ramificato in embrioni di ratti esposti a Fluconazolo e acido retinoico *in vitro* (Menegola et al., 2004).

- ***Altri meccanismi di tossicità ed ulteriori effetti avversi***

Nei mammiferi va considerato inoltre, sia per la classe degli imidazoli che dei triazoli, in maniera non meno importante, la capacità di produrre altre svariate alterazioni, oltre la tossicità endocrina e riproduttiva, agendo attraverso multipli differenti meccanismi rispetto a quelli sopracitati, ed ancora troppo poco indagati: sono mostrate in letteratura crescenti evidenze riguardo, ad esempio, la capacità di alterazione dei flussi ionici transmembrana (Haegler et al., 2017; Bootman et al., 2002), induzione di stress del reticolo endoplasmatico (Bootman et al., 2002; Soboloff e Berger, 2002; Mathivanan et al., 2016) e di stress ossidativo (Lee et al., 2015), interferenza in circuiti trascrizionali di particolari enzimi (Tully et al., 2006; Walsh et al., 2000; Yu et al., 2013), alterazione del circuito sopravvivenza/morte cellulare (Clapham, 1995; Lee et al., 2015; Zhou et al., 2016; Haegler et al., 2017), o ancora deficit energetici associati ad alterazioni dell'omeostasi mitocondriale (Haegler et al., 2017). Studi recenti rivelano alcuni imidazoli e triazoli, responsabili di epatotossicità e carcinogenesi (Hester et al., 2012; Toppari, 2008), tra cui il Ketoconazolo, responsabili di tossicità epatocellulare, accompagnata a disfunzioni mitocondriali, interferenza nel circuito della catena di trasporto degli elettroni, deficit energetico ed infine induzione di apoptosi nel modello cellulare epatico umano HepG2 (Haegler et al., 2017). In alcuni studi viene mostrato inoltre come il Tebuconazolo abbia capacità di indurre diverse alterazioni metaboliche e funzionali, tra cui blocco del ciclo cellulare ed induzione apoptotica in cellule placentari di ratto (Zhou et al., 2016); studi *in vivo* sull'esposizione perinatale di ratti al Tebuconazolo, hanno rilevato modulazioni e tossicità a livello neuronale ed immunitario. Altre evidenze sugli azoli mostrano fenomeni di alterazione sia nella concentrazione degli ormoni tiroidei che nella trascrizione genica in larve di *Zebrafish* (Yu et al., 2013). Sono stati dimostrati anche effetti sull'espressione genica di più operoni, soprattutto nei tessuti epatico e testicolare di ratti, inclusi geni relativi al metabolismo degli steroidi (Tully et al., 2006). Ulteriori prove mostrano alterazioni post-trascrizionali sull'espressione e l'attività di proteine StAR (steroidogenic acute regulatory protein) in linee cellulari cancerose di Leydig murine esposte ad Econazolo e Miconazolo (Walsh et al., 2000). Tra gli effetti alternativi alla distruzione

endocrina individuiamo ancora molte evidenze su un'alterata mobilizzazione dei depositi dello ione  $\text{Ca}^{2+}$  dal reticolo endoplasmatico; molte alterazioni relative ad un aumento dello ione libero all'interno del citoplasma cellulare sono associate a disfunzioni fisiopatologiche cellulari di diversa natura (Bootman et al., 2002). Flussi ionici transmembrana possono, infatti, convogliare verso disfunzioni enzimatiche, o ancora attivazione del processo apoptotico e difetti proliferativi (Clapham, 1995). In questo panorama, molte evidenze dimostrano come l'Econazolo sia in grado di indurre alterazioni nell'omeostasi del  $\text{Ca}^{2+}$  e disfunzioni nella sintesi proteica, anche in dosi molto più basse rispetto a quelle prescritte (15-50  $\mu\text{M}$ ) ed in diversi tipi cellulari (Soboloff e Berger, 2002; Mathivanan et al., 2016); ulteriori prove sull'intervento azolico nell'alterazione dei flussi ionici e conseguente citotossicità a livello proliferativo, sono da ascrivere anche alla somministrazione di Miconazolo (a dosi inferiori rispetto a quelle utilizzate in clinica: 30-50  $\mu\text{M}$ ) in colture di cellule umane di cancro alla mammella (Roan et al., 2015). In ultimo, troviamo recenti evidenze che mostrano la propensione di composti azolici nel produrre danno cellulare indotto da aumento di specie reattive dell'ossigeno (ROS), causativo di conseguenti alterazioni morfologiche ed induzione apoptotica in maniera dose-dipendente, in mioblasti di ratto trattati con Miconazolo alla concentrazione di 3-10  $\mu\text{M}$  (Lee et al., 2015).

#### - **Effetti tossici di miscele azoliche**

Inoltre, effetti azolici in mixture (nonostante siano ancora molto limitati i dati a disposizione), sono stati dimostrati sia *in vitro* che *in vivo* per quanto riguarda l'attività di distruzione endocrina, anti-androgenica ed estrogenica (Nellemann et al., 2003; Hass et al., 2007; Ohlsson et al., 2010; Christen et al., 2014). Studi su feti di topo sottoposti ad esposizione a Miconazolo e Metronidazolo, hanno mostrato un'elevata interazione teratogena (Tiboni et al., 2008). Ulteriori effetti azolici combinati sono stati dimostrati sulla produzione ormonale ed il metabolismo di linee cellulari placentari (Rieke et al., 2014). Effetti modulatori sono stati dimostrati anche su CAR (recettore costitutivo di androstano) e PXR (recettore X della gravidanza) in epatociti umani esposti a Propiconazolo e Tebuconazolo, dimostrando effetti esacerbati o con diversi bersagli molecolari se somministrati in mixture piuttosto che singolarmente (Knebel et al., 2018).

Per quanto detto, risulta in crescita l'interesse del mondo scientifico e delle autorità governative nel volgere i propri sforzi alla sfida di sempre maggiori chiarimenti riguardo la

tossicità di questi composti, capaci di esacerbare i loro effetti in formato di miscele, quotidianamente presenti nell'ambiente a contatto con l'uomo, e nell'indagare più a fondo i loro meccanismi d'azione.

### **1.9. Cenni sui meccanismi di morte cellulare**

In letteratura sono descritte diverse forme di morte cellulare. Oltre alla necrosi, fenomeno accidentale associato a “*swelling*” mitocondriale e disgregazione cellulare, si aggiunge l'apoptosi. Il processo apoptotico è stato largamente approfondito nelle scorse due decadi, risultando ad oggi ampiamente riconosciuto come il maggior meccanismo di morte cellulare programmata, che richiede l'utilizzo di energia, impiegato sia durante eventi fisiologici di sviluppo e morfogenesi, sia come risposta ad eventi di danno o stress che accorrono alla cellula (Bibel e Barde, 2000). Può essere attivato da stimoli estrinseci ed intrinseci mediati da vie di segnalazione mitocondriale (Adams, 2003; Kroemer et al., 2007), ed è caratterizzato da eventi che includono il “*blebbing*” di membrana, l'attivazione delle caspasi e la frammentazione del DNA, tutti eventi che necessitano l'impiego di energia. Di recente, accanto a queste due modalità di morte cellulare è stata descritta la necroptosi, una forma controllata e programmata di necrosi, caratterizzata dall'assenza di fenomeni legati alla condensazione della cromatina, all'attivazione delle caspasi e alla presenza di vacuoli citoplasmatici.

Negli studi rivolti all'identificazione di possibili composti citotossici è fondamentale analizzare le molecole ed i percorsi responsabili dei processi di morte e sopravvivenza cellulare. In questo ambito si colloca l'autofagia, in quanto sebbene da un lato sia ben noto il suo contributo nel mantenimento dell'omeostasi cellulare è stato anche dimostrato che livelli spinti di autofagia sono responsabili dell'attivazione di processi di morte cellulare (Liu et al., 2016; Das et al., 2018); da qui la denominazione per il processo autofagico di “meccanismo di morte cellulare programmata di tipo II”.

### **1.10. AMPK e metabolismo energetico**

Le cellule adattano costantemente il loro metabolismo per soddisfare le loro esigenze energetiche e rispondere alla disponibilità di nutrienti. Gli eucarioti hanno sviluppato un

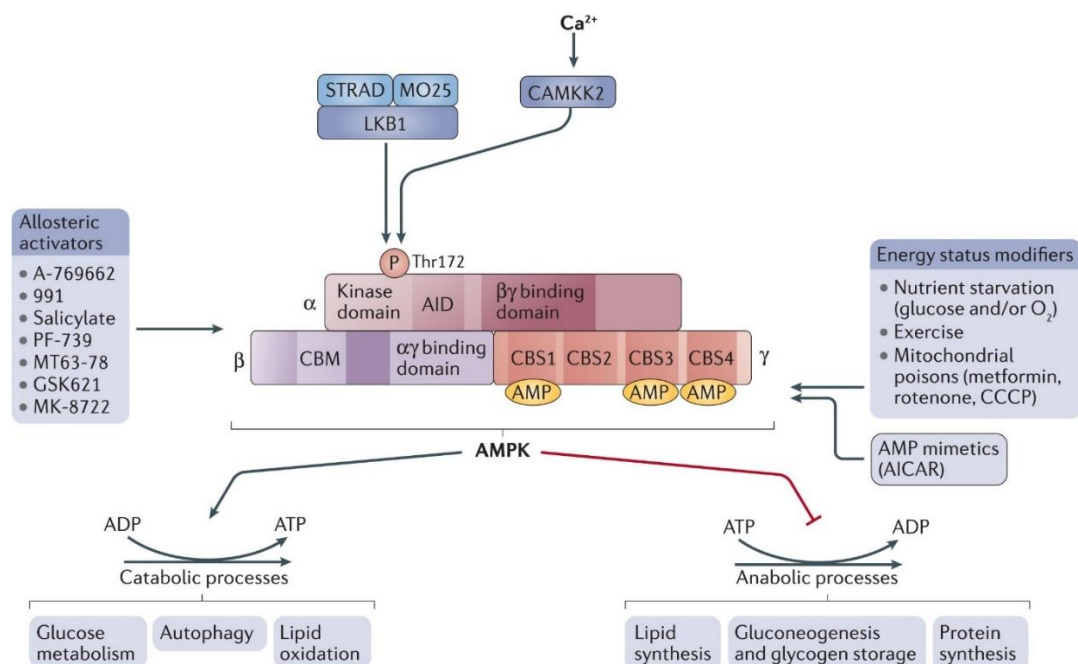
sistema molecolare molto sofisticato per la regolazione della spesa energetica, rappresentato da una serin/treoninchinasi attivata da AMP (AMPK).

Cambiamenti nel rapporto ATP/ADP o ATP/AMP, che si realizzano attraverso l'attivazione di meccanismi post-traduzionali (eventi di fosforilazione) o mediante riprogrammazione trascrizionale delle cellule, stimolano l'attività chinasi di AMPK e la regolazione del metabolismo energetico.

In generale, l'azione di AMPK sul metabolismo cellulare si esplica principalmente attraverso processi che mediano l'inibizione degli eventi anabolici e la concomitante stimolazione di quelli catabolici responsabili della produzione di ATP.

### 1.11. AMPK: struttura, profili di espressione e attività

La struttura di AMPK è descritta come un complesso eterotrimerico che comprende una parte catalitica, la subunità  $\alpha$ , ed una parte regolatrice, costituita da due subunità,  $\beta$  e  $\gamma$ . Ciascuna delle subunità può presentarsi in diverse isoforme ( $\alpha 1$ ,  $\alpha 2$ ,  $\beta 1$ ,  $\beta 2$ ,  $\gamma 1$ ,  $\gamma 2$ ,  $\gamma 3$ ) che consentono numerose combinazioni dei complessi eterotrimerici  $\alpha\beta\gamma$  (Fig. 9).



**Fig. 9. Struttura di AMPK e domini di attivazione (Molecular Cell Biology, Nature, 2018).**

La subunità  $\alpha$  è costituita da 3 domini, uno catalitico N-terminale, con un residuo di treonina 172 (Thr172) la cui fosforilazione rende attiva AMPK, un dominio auto inibitorio (AID) ed una regione C-terminale coinvolta nel legame con le subunità  $\beta$  e  $\gamma$ . All'interno delle cellule le due subunità,  $\alpha_1$  e  $\alpha_2$ , sono differenzialmente compartimentalizzate, infatti la subunità  $\alpha_1$  è distribuita a livello citoplasmatico e regola le vie di trasduzione del segnale, mentre la subunità  $\alpha_2$  è espressa a livello nucleare, e ciò permette di regolare la trascrizione genica. Nello stato di riposo, la chinasi presenta una struttura in cui il dominio catalitico N-terminale viene nascosto; questo stato conformazionale rende impossibile lo svelamento del residuo Thr172, e necessita, per l'attivazione, di cambiamenti conformazionali operati dalle subunità  $\beta$  e  $\gamma$ .

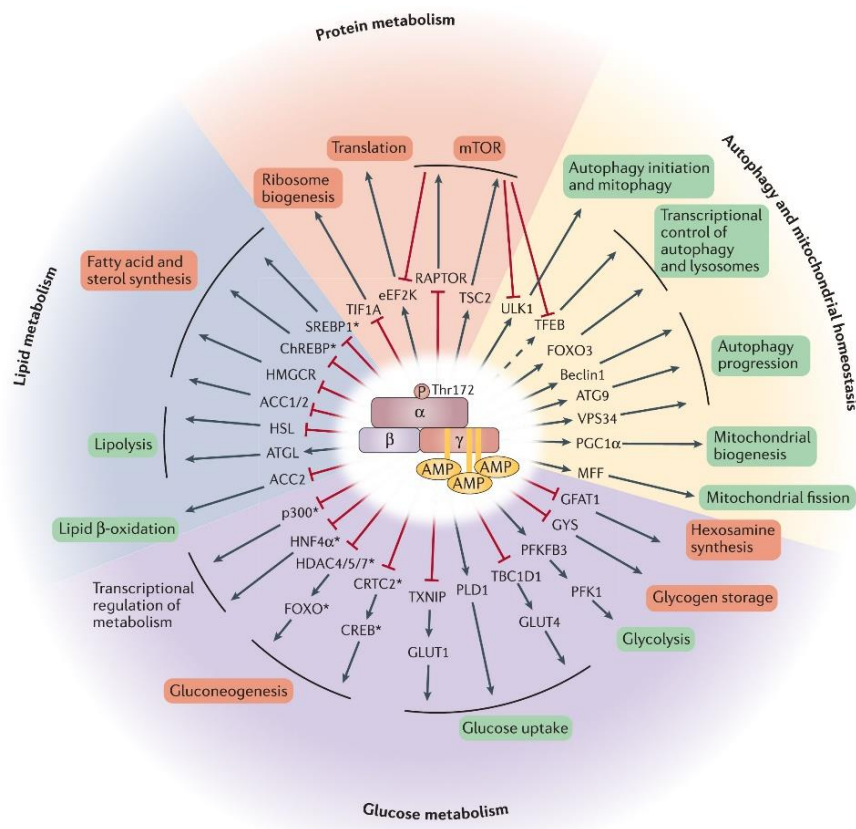
La subunità  $\beta$  contiene una regione legante i carboidrati, la cui associazione con le molecole di glicogeno ha effetti inibitori sull'attività di AMPK, ed una regione legante le subunità  $\alpha$  e  $\gamma$ .

Nella subunità  $\gamma$  sono presenti 4 domini identici ripetuti in tandem, in grado di legare molecole di AMP, ADP e ATP, detti CBS (cistationina  $\beta$  sintasi) o anche domini Bateman (Bateman A.1997). La chinasi responsabile della fosforilazione del residuo Thr172 della subunità  $\alpha$  è la proteina LKB1 (liver kinase B1, conosciuta anche come STK11). L'attività costituzionale di LKB1 consente il mantenimento di livelli di attività basali di AMPK. I cambiamenti conformazionali imposti dal legame dell'AMP o dell'ADP con la subunità  $\gamma$ , aumentano il grado di fosforilazione della Thr172 e sfavoriscono gli eventi di defosforilazione operati dalle fosfatasi. La natura della subunità  $\gamma$  determina il grado di attivazione allosterica, con il complesso  $\gamma_2$  che presenta una maggiore sensibilità all'AMP rispetto al complesso  $\gamma_1$ , che a sua volta è più sensibile al legame con il nucleotide rispetto alla subunità  $\gamma_3$ . L'effetto della fosforilazione sulla Thr172 si traduce in un aumento dell'attività chinasi di circa 1000 volte rispetto ai livelli basali, consentendo un'elevata efficienza nelle risposte alle variazioni dello stato energetico cellulare. Un'ulteriore via di attivazione della proteina AMPK risulta essere indipendente dai cambiamenti nei rapporti ADP/ATP o AMP/ATP, e coinvolge l'interazione con la chinasi  $\text{Ca}^{2+}$ /calmodulina dipendente (CaMKK $\beta$ ).

### 1.12. Ruoli funzionali di AMPK

Nell'ultimo decennio, la scoperta di numerosi nuovi substrati di AMPK ha portato ad una comprensione più completa degli eventi di riprogrammazione del metabolismo cellulare che caratterizzano il passaggio dall'anabolismo al catabolismo (Ducommun et al., 2015; Hoffman et al., 2015; Hardie et al., 2016). Questo switch energetico, che avviene attraverso la fosforilazione di proteine chiave di molteplici pathway, modula la crescita cellulare e processi, quali il metabolismo dei lipidi e del glucosio, l'autofagia (Inoki et al., 2003; Gwinn et al., 2008) ed aspetti riguardanti l'omeostasi mitocondriale, inclusa la mitofagia (Egan et al., 2011).

A fronte di un deficit energetico prodotto da condizioni stressogene, al fine di ristabilire le riserve del pool di ATP, AMPK stimola attivamente il turnover delle macromolecole in favore della produzione di energia; le pathway sollecitate riguardano il metabolismo del glucosio, la mobilizzazione delle riserve lipidiche ed il riciclo di macromolecole tramite il macchinario autofagico (Fig. 10).



**Fig.10.** Schema riassuntivo dei principali processi metabolici regolati da AMPK (Molecular Cell Biology, Nature, 2018).

#### - **Ossidazione degli acidi grassi**

L'ossidazione degli acidi grassi è una via metabolica che permette l'utilizzo di acidi grassi a scopo energetico. In condizioni aerobiche o nello stato di riposo, il rifornimento di energia avviene prevalentemente a carico di questa via metabolica. AMPK sembra svolgere un ruolo importante nell'ossidazione degli acidi grassi, incrementando l'uptake di FFA (free fatty acid) nei mitocondri. AMPK è in grado di incrementare l'uptake di acidi grassi all'interno dei mitocondri inibendo l'enzima acetil-CoA carbossilasi (ACC), tramite la fosforilazione reversibile del suo residuo di serina, determinando una riduzione dei livelli intracellulari di malonil-CoA e, di conseguenza, la mancata inibizione di CPT1 (carnitina-palmitoil-trasferasi 1), che potrà così garantire l'importo di acidi grassi attivati. Alcuni studi suggeriscono che l'AMPK possa ridurre i livelli di malonil-CoA decarbossilasi (O'Neill et al., 2014). Esistono tuttavia delle controversie sul ruolo svolto da AMPK nella regolazione di questa importante via catabolica (Roepstorff et al., 2005). Infatti, nell'uomo non è stata ancora trovata l'associazione tra attivazione di AMPK, fosforilazione di ACC e livelli di malonil-CoA. Questo risultato suggerisce che l'ossidazione lipidica non dovrebbe essere completamente dipendente dalle vie AMPK/ACC. Un altro meccanismo molecolare è rappresentato dallo spostamento del trasportatore di acidi grassi fatty acid (FA) translocase (FAT/CD36), che regola l'ingresso di lipidi all'interno della cellula, sulla membrana plasmatica (Fentz et al., 2015).

#### - **Biogenesi mitocondriale e trasportatori GLUT4**

AMPK è coinvolta nei processi di trascrizione genica attraverso la subunità  $\alpha 2$ , espressa a livello nucleare; è infatti un mediatore chiave nella trascrizione genica del trasportatore GLUT-4 e dei geni coinvolti nella biogenesi mitocondriale. L'espressione genica dei GLUT-4 è dipendente dal grado di fosforilazione indotto da AMPK del repressore trascrizionale istone deacetilasi 5 (HDAC5). In particolare, HDAC5 conduce al rilascio dei fattori enhancer dei miociti 2 (MEF2), una famiglia di fattori di trascrizione che attraverso il controllo genico regolano il differenziamento cellulare e l'attivazione della trascrizione genica di PGC-1 $\alpha$  e GLUT-4. Il controllo trascrizionale legato alla biogenesi mitocondriale è mediato da PGC-1 $\alpha$ , un co-attivatore trascrizionale che promuove l'espressione di numerosi geni mitocondriali, tra i quali quelli responsabili della biogenesi mitocondriale. L'attivazione di AMPK causa una stimolazione di PGC-1 $\alpha$ , attraverso una fosforilazione diretta e una deacetilazione mediata

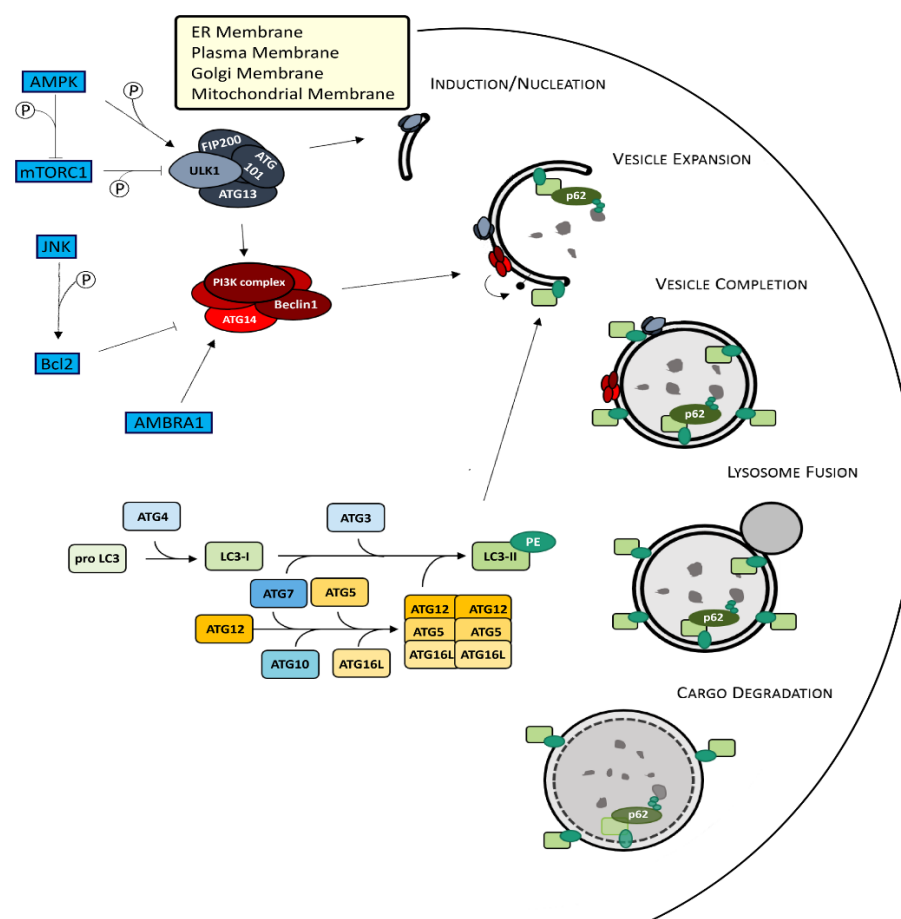
da SIRT1, enzima a valle della via attivata da AMPK. La chinasi AMP dipendente controlla inoltre l'espressione di PGC-1 $\alpha$  e GLUT-4 attraverso la fosforilazione di HDAC5. La regolazione di PGC-1 $\alpha$  via AMPK mette in luce l'importanza del ruolo svolto da quest'ultima nell'attivazione della biogenesi mitocondriale in risposta ad incrementi nel rapporto AMP/ATP nella cellula. La conferma di una stretta correlazione tra l'attività di AMPK e biogenesi mitocondriale deriva da studi sull'invecchiamento (O'Neill et al., 2011; Tanner et al., 2013).

### **1.13. *Cross-talk tra AMPK ed autofagia***

Come già descritto, l'autofagia è un processo catabolico, importante per l'omeostasi cellulare, mediante il quale i componenti cellulari come proteine, macromolecole, organelli e agenti patogeni vengono sequestrati in strutture membranose, note come autofagosomi. L'autofagosoma fonde successivamente con il lisosoma per sottoporre il contenuto a degradazione e riciclo (Bento et al., 2016). Il macchinario autofagico coinvolge diversi complessi multiproteici che controllano ogni passaggio che caratterizza le fasi di induzione, nucleazione, maturazione e degradazione degli autofagosomi. La fase di induzione prevede il coinvolgimento del complesso ULK (Unc-51 like autophagy activating kinase), comprensivo delle forme ULK1/2, la cui regolazione è mediata da mTORC1 (mTOR Complex 1), che in presenza di abbondanza di nutrienti fosforila ed inibisce ULK1. La fase successiva di allungamento e maturazione del fagoforo richiede l'intervento di un sistema ubiquitin-like, responsabile del clivaggio e della coniugazione di fosfatidiletanolamina (PE) alla proteina LC3 (Microtubule-associated protein 1A/1B-light chain 3) che trasloca sulla membrana dell'autofagosoma come LC3-II.

In condizioni di carenza di nutrienti, mTORC1 viene inattivato, così da eliminare la fosforilazione inibitoria su ATG14L (Autophagy-related gene), noto anche come Barkor (Park et al., 2016), ATG13, proteina attivante ULK1 (Puente et al., 2016), ed ULK1, essenziali per l'induzione dell'autofagia (Chan et al., 2007; Russell et al., 2014). ULK1, a sua volta, è in grado di fosforilare diverse proteine coinvolte nell'esecuzione del processo autofagico, inclusi i suoi partner di legame FIP200, ATG101 (Egan et al., 2015) e ATG13 (Joo et al., 2011), e gli effettori a valle ATG9 (Zhou et al., 2017), ATG14L (Park et al., 2016), VPS34 (noto anche come PI3K di tipo 3), Beclin1 e AMBRA1 (Egan et al., 2015) e la proteina di trasporto Sec16A (Joo et al.,

2016) (Wang e Kundu, 2017), responsabili degli stadi iniziali della nucleazione autofagosomale. La maturazione si completa nella fusione con la membrana lisosomiale ad opera della proteina LAMP (lysosomal membrane proteins) (Fig. 11).



**Fig. 11. Meccanismi molecolari coinvolti nel processo di maturazione e degradazione autofagosomale.**

È ampiamente dimostrato in letteratura una regolazione da parte di AMPK dell'autofagia, sia nei lieviti che nelle cellule di mammifero (Meley et al., 2006). In condizioni di stress energetico eventi di fosforilazione AMPK-mediati, a carico del fattore TSC2, regolatore a monte di mTOR e della subunità RAPTOR (Gwinn et al., 2008), partecipano alla down-regolazione dell'attività di mTOR, così da rimuovere la fosforilazione inibitoria su ULK1 e quindi attivare il processo autofagico.

Il link diretto tra AMPK ed il macchinario molecolare autofagico si realizza, quindi, attraverso la fosforilazione di quattro residui specifici presenti su ULK1, quali Ser467, Ser555, Ser637 e

Thr574 (Egan et al., 2011; Kim et al., 2011). È stato dimostrato, in esperimenti con topi knock-out, che la fosforilazione di ULK1 da parte di AMPK risulta essere un evento necessario per l'attivazione della pathway autofagica ed il mantenimento della sopravvivenza cellulare, in condizioni di starvation e stress metabolico. Inoltre, cellule difettive di ULK1 presentano alterazioni a livello mitocondriale, suggerendo anche l'ipotesi che l'asse AMPK/ULK1 sia implicato nel mantenimento dell'omeostasi mitocondriale (Egan et al., 2011).

#### **1.14. Regolazione della dinamica mitocondriale da parte di AMPK**

In linea con il suo ruolo come sensore energetico, AMPK opera per ricondurre la cellula ad un ripristino del pool intracellulare di ATP, ingaggiando effettori molecolari che assicurino anche il mantenimento dell'omeostasi mitocondriale. È noto, infatti, che danni al network mitocondriale inducano l'attivazione della pathway di AMPK.

Per cui, assunto che l'integrità mitocondriale è un mediatore centrale della condizione energetica della cellula, relativamente alla regolazione della dinamica mitocondriale da parte di AMPK, sono inclusi diversi aspetti, che spaziano dal controllo del numero di mitocondri attraverso la stimolazione della biogenesi, alla regolazione del network e della qualità di questi organelli, attraverso la regolazione della morfologia e mitofagia.

Dati in letteratura suggeriscono che la morfologia mitocondriale allungata possa meglio sostenere la produzione di ATP durante condizioni di stress (Tondera et al., 2009), proteggere i mitocondri da mitofagia (Gomes et al., 2011) e distribuire biomateriali, compresi i lipidi (Rambold et al., 2015), durante la mancanza di nutrienti (starvation). Inoltre, in risposta ad altri insulti, tra cui la presenza di inibitori della catena respiratoria mitocondriale, i mitocondri possono andare incontro al processo di frammentazione, che si pensa, da un lato, possa facilitare lo smaltimento dei frammenti mitocondriali caratterizzati da ridotti livelli di potenziale di membrana (Shirihai et al., 2015), dall'altro possa consentire un'efficiente e tempestiva attivazione apoptotica (Chan, 2012).

È risaputo in letteratura che condizioni, quali la depolarizzazione di membrana mitocondriale e l'inibizione della sintesi di ATP, possano, a determinati livelli, innescare il processo di frammentazione mitocondriale, incrementando o decrementando rispettivamente i tassi di fissione e/o fusione mitocondriale (Wai e Langer, 2016). È ben noto ormai che stimoli che

inducono frammentazione mitocondriale, come gli inibitori della catena respiratoria, sono anche potenti attivatori di AMPK: è stato recentemente dimostrato come AMPK sia necessario per la frammentazione mitocondriale indotta da rotenone e antimicina A, inibitori del complesso I e complesso III, rispettivamente, della catena respiratoria. Sorprendentemente, è stato scoperto che l'attivazione di AMPK attraverso piccole molecole attivatrici, anche in assenza di danno mitocondriale, è sufficiente per indurre fissione mitocondriale (Toyama et al., 2016). Nuovi studi di proteomica e bioinformatica hanno identificato, infatti, nuovi siti di fosforilazione di AMPK, che interagiscono direttamente con complessi proteici, quali MFF (mitochondrial fission factor) e DRP1 (dynamin-like protein) presenti sulla membrana mitocondriale esterna, responsabili della modulazione del ciclo di fissione/fusione in maniera AMPK-dipendente (Wang e Youle, 2016).

### **1.15. AMPK, molecola ponte tra autofagia ed omeostasi mitocondriale**

In condizioni di starvation il processo autofagico è attivato, come si è detto, dall'inibizione di mTORC1, con implicazione o meno di AMPK: la mancanza di aminoacidi e di segnali di crescita porta all'inattivazione di mTORC1, senza attivazione di AMPK, mentre la carenza sia di nutrienti che di energia, stimolano l'attivazione della chinasi, che può essere seguita da fusione e/o frammentazione mitocondriale ed eventuale mitofagia. In quest'ultima situazione, i mitocondri possono attuare un tentativo di iperfusione mitocondriale (Tondera et al., 2009), tramite la generazione di una morfologia più allungata, teso ad eludere la frammentazione e la degradazione mediante mitofagia (Gomes et al., 2011; Rambold et al., 2011).

Questo processo è attuabile solo in presenza di mitocondri ancora sufficientemente funzionali e degli appropriati substrati energetici. Tuttavia, la necessità di un'efficiente rimozione dei mitocondri danneggiati può attivare un processo di fissione mitocondriale, finalizzato alla segregazione delle parti disfunzionali del network mitocondriale (Twig et al., 2008; Shirihai et al., 2015). Pertanto, in risposta al danno mitocondriale, l'azione positiva di AMPK, convergente sui livelli di fosforilazione di MFF e ULK1, potrebbe facilitare la segregazione e l'eliminazione dei mitocondri danneggiati tramite mitofagia, mentre una parallela attivazione della biogenesi garantirebbe il ripristino del pool mitocondriale.

Resta da stabilire in che modo l'intensità e/o la durata dello stimolo governino il tipo di risposta mediata da AMPK, orientando i processi cellulari verso il recupero oppure la perdita dell'omeostasi mitocondriale in favore di un destino apoptotico (Herzig e Shaw, 2018).

### ***1.16. Uno sguardo alla pathway lisosomiale***

Da recenti evidenze emerge la capacità di indurre la trascrizione di alcuni geni lisosomiali da parte di AMPK, e di una sua eventuale localizzazione anche a livello di questi organelli; a tal proposito, è emerso come in condizioni di stress energetico AMPK possa interagire con il panorama lisosomiale, legando l'axina (una proteina coinvolta nella pathway di segnalazione WNT e di mTOR a livello lisosomiale), che a sua volta interagisce con la chinasi LKB1, capace di fosforilare AMPK nel residuo Thr172 (Zhang et al., 2013, 2014). Se questo complesso di axina controlli l'attivazione di AMPK in risposta a distinti stress metabolici, così come se specifici substrati di AMPK in diverse posizioni subcellulari siano controllati da un pool di AMPK specifico per i lisosomi, resta da determinare; anche come il pool di AMPK mitocondriale potrebbe interagire con le popolazioni recentemente descritte di AMPK attivato da LKB1 nei lisosomi (Zhang et al., 2017) sarà un'area interessante per futuri studi.

Negli ultimi decenni, l'esposizione a sostanze chimiche nell'ambiente di vita e di lavoro e negli alimenti ha assunto un posto di rilievo fra i fattori di rischio per la salute riproduttiva con particolare riferimento alla fertilità maschile. Infatti, ad oggi, numerose evidenze scientifiche dimostrano come gli xenobiotici ambientali siano in grado di alterare il numero e la funzionalità delle cellule del Sertoli, del Leydig e degli spermatogoni e rappresenterebbero, inoltre, un fattore di rischio per successive patologie del tratto riproduttivo.

Alla luce di queste considerazioni, lo scopo principale di questo lavoro è stato quello di verificare i possibili effetti indotti da due differenti derivati azolici di maggior uso comune in ambito agro-alimentare (Tebuconazolo - TEB) e clinico (Econazolo - ECO) sulle attività metaboliche e funzionali di cellule del Sertoli TM4 e di valutarne il meccanismo molecolare di azione.

La *prima fase* di studio ha previsto l'utilizzo dei composti singoli o in combinazioni ed è stata rivolta all'analisi delle stime del rate di proliferazione e vitalità cellulare e di citotossicità, mediante i metodi del Trypan-blue e test colorimetrico dell'MTT. Successivamente è stata caratterizzata la natura delle interazioni *in vitro* dei composti in miscela, in termini di *sinergia*, *additività* e *antagonismo*, mediante l'utilizzo di modelli non parametrici basati sulla teoria dell'additività di *Loewe* e sul modello dell'indipendenza di azione di *Bliss*. I risultati conseguiti indicano che il trattamento singolo per 24 e 48 h con TEB ed ECO induce nelle cellule del Sertoli una citotossicità concentrazione- e tempo-dipendente associata ad una significativa riduzione del grado di proliferazione cellulare. Inoltre, l'analisi del grado di interazione dei composti in miscele binarie ha evidenziato un effetto sinergico per il mix TEB-ECO (40  $\mu$ M-20  $\mu$ M), come dimostrato dal valore di *Interaction Index* di 0.77. Il decremento della vitalità cellulare, riscontrato in condizioni di esposizione ad ECO e MIX, era anche associato all'aumento del tasso di apoptosi.

Considerando l'intenso cross-talk esistente tra autofagia ed apoptosi, l'obiettivo della *seconda fase* del progetto di tesi è stato quello di comprendere l'eventuale contributo

dell'autofagia agli effetti indotti dagli azoli; a tal proposito, le analisi effettuate in time-course (3-48 h) per i markers autofagici LC3B-II e p62/SQSTM1 hanno rilevato incrementi nei livelli di autofagia. Ulteriori esperimenti di inibizione mediante Bafilomicina A1, hanno, altresì, dimostrato che questo effetto risulta essere una risposta adattativa precoce, che conferisce un vantaggio transitorio in termini di sopravvivenza cellulare. Essendo noto in letteratura il coinvolgimento dell'asse AMPK/ULK1 nella regolazione dell'autofagia, sono stati indagati in western blot i livelli di fosforilazione di entrambe le proteine. A sostegno dell'ipotesi che l'aumento di attività chinastica potesse derivare da una condizione di stress energetico, sono state effettuate analisi in HPLC (3-48 h) del contenuto intracellulare degli adenilati.

Nella *terza ed ultima fase* di studio, abbiamo voluto investigare se la deplezione di energia indotta da azoli fosse associata ad alterazioni della funzionalità mitocondriale e dello stato redox cellulare. I dati ottenuti mediante analisi citofluorimetrica del potenziale di membrana mitocondriale ( $\Delta\Psi_m$ ), nell'intervallo di tempo 3-48 h, hanno evidenziato nei trattati una riduzione significativa della percentuale di cellule con  $\Delta\Psi_m^{\text{high}}$  ed un incremento di quella con  $\Delta\Psi_m^{\text{low}}$ . Questo effetto si accompagnava, in entrambe le popolazioni cellulari, ad un incremento dell'intensità di fluorescenza media (MFI) nel rosso e nel verde, suggerendo la presenza di un incremento nel processo di fissione mitocondriale. A conferma di tale ipotesi, l'analisi in microscopia confocale, effettuata mediante marcatura con anticorpo anti-TOMM20, mostrava per le cellule esposte al MIX, una morfologia mitocondriale frammentata (*donut-like*), rispetto a quella tipicamente tubulare dei controlli. Ulteriori analisi in immunofluorescenza hanno escluso l'attivazione di fenomeni legati alla mitofagia, altresì confermando la presenza di fenomeni legati a clustering lisosomiale. In ultimo, l'ipotesi di una correlazione positiva tra disfunzionalità mitocondriale e stress ossidativo è stata confermata mediante analisi spettrofotometrica dei livelli intracellulari delle specie reattive dell'ossigeno (ROS).

---

### 3.

## *Materiali e Metodi*

---

### **3.1. Chimici**

DMEM (Dulbecco's modified Eagle medium) Ham's F-12 50/50 Mix (con 2 mM L-glutamina e 15 mM HEPES) è stato fornito da Corning Life Sciences (Manassas, VA, USA), fetal bovine serum (FBS) e horse serum (HS) da EuroClone (Pero, MI, Italy). Penicillina-streptomina fornite da Life Technologies (Carlsband, CA, USA). Tebuconazolo (TEB, purezza > 99%) ed Econazolo (ECO, purezza ≥ 98%) provenienti rispettivamente da Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA) e European Pharmacopoeia, Council of Europe (Strasbourg, France). MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide) (purezza 98%) è stato acquistato da Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). Annexin-V-FITC proveniente da Santa Cruz Biotechnology (Dallas, Texas, USA). 2',7'-dichlorofluorescein diacetate (DCFH<sub>2</sub>-DA) fornita da Molecular Probes (Eugene, OR, USA). I reagenti per la chemiluminescenza "Pierce enhanced chemiluminescence" (ECL) sono stati forniti da Thermo Fisher Scientific (Rockford, IL, USA). JC-1 (Molecular Probes, Eugene, OR, USA), Bradford Assay (Bio-Rad, Hercules, CA, USA). Membrana PVDF (Millipore, Milano, Italy). Vectashield Mounting Medium con Dapi (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA). Tutti gli altri chimici sono stati forniti da Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA).

### **3.2. Anticorpi**

Per le analisi in western blot sono stati utilizzati gli anticorpi primari relativi al rilevamento delle proteine LC3B, C-PARP1, pAMPK-Thr 172, AMPK, pULK1-Ser 555, ULK1 (Cell Signaling, Danvers, MA, USA) e per p62 (Santa Cruz Biotechnology, Dallas, Texas, USA); per le analisi di immunofluorescenza sono stati utilizzati gli anticorpi: rabbit anti-TOMM20 (Thermo Fisher Scientific, Rockford, IL, USA), mouse anti-LAMP1 (Immunological Sciences, distribuito da Società Italiana Chimici, Rome, Italy), mouse/rabbit anti-LC3 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). Gli anticorpi secondari anti-rabbit o anti-mouse HRP-coniugati sono stati forniti da Bio-Rad Laboratories (Hercules, CA, USA); per l'immunofluorescenza sono stati utilizzati i

seguenti anticorpi secondari: AlexaFluor 488 anti-rabbit IgG ed AlexaFluor 633 anti-mouse IgG (Molecular Probes, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA).

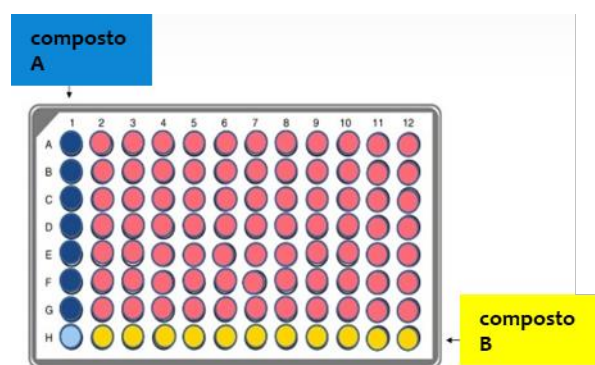
### **3.3. Colture cellulari e trattamenti**

La linea cellulare TM4 (ATCC® CRL1715™) di cellule del Sertoli murine, è stata ottenuta dall'American Type Culture Collection (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). Per la coltura di routine le cellule TM4 venivano piastrate ad una densità di  $1 \times 10^4$  cells/cm<sup>2</sup> e mantenute nel mezzo di coltura, costituito da DMEM/F-12 50/50 Mix supplementato con 5% HS (Horse Serum), 2.5% FBS (Fetal Bovine Serum), 1% di antibiotici (100 IU/ml penicillina, 100 µg/ml streptomycina), fino al raggiungimento dell'80% circa di confluenza. La vitalità cellulare è stata accertata mediante test di esclusione del Trypan-blue e la linea successivamente mantenuta in atmosfera di incubazione ad una temperatura di 37°C ed umidificata al 5% di CO<sub>2</sub>. Per le prove sperimentali con gli azoli, le cellule venivano piastrate ad una densità di  $1 \times 10^4$  cells/cm<sup>2</sup> e mantenute in mezzo di coltura per 24 h prima di sottoporle ai trattamenti. Le cellule venivano, successivamente, esposte a TEB (40 µM), ECO (20 µM) ed alla mixture di entrambi i composti alle medesime concentrazioni (MIX), per un tempo di 3, 6, 12, 24 e 48 h. Per gli esperimenti con bafilomicina A1, 24 h dopo la messa in coltura, le cellule venivano co-trattate con gli azoli e l'inibitore autofagico (25 nM) per 3 e 24 h. Per gli esperimenti di inibizione di AMPK, le cellule venivano sottoposte a pretrattamento di 1 h con dorsomorfina 2HCl (Compound C), alla concentrazione di 5 µM e successiva incubazione di 3 h con i composti azolici.

### **3.4. Determinazione della vitalità cellulare e valutazione delle interazioni**

La vitalità cellulare è stata valutata mediante saggio colorimetrico MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio), tramite misurazione spettrofotometrica della riduzione del sale di tetrazolio (giallo) in formazano (blu-violetto), prodotto dalle cellule metabolicamente attive. Gli effetti dei due composti azolici, singoli ed in mixture, sulla vitalità cellulare sono stati valutati *in vitro* utilizzando la metodologia del "checkerboard assay" in piastre da 96 pozzetti (Fig.12), costruendo una 'scacchiera', costituita da concentrazioni seriali crescenti dei composti utilizzati, sia singolarmente (posizionando un farmaco nella riga H e l'altro nella

colonna 1) che in combinazioni binarie reciproche (costruendo 77 differenti combinazioni, dalla riga A alla G, e dalla colonna 2 alla 12). Successivamente, la valutazione dei diversi livelli di interazione veniva effettuata tramite metodi matematici non-parametrici basati su due modelli ampiamente accreditati per l'interpretazione delle interazioni farmaco-farmaco, la Teoria dell'indipendenza di Bliss (BI) ed il Modello matematico di Chou e Talalay (Chou e Talalay, 1984).



**Fig.12. Metodologia del “checkerboard assay” (in rosa le 77 possibili combinazioni binarie tra il composto A, in blu, ed il composto B, in giallo).**

### **3.4.1. Teoria dell'indipendenza di Bliss**

In questo modello l'effetto delle interazioni tra farmaci ottenute sperimentalmente, è comparato con il modello teorico descritto dalla seguente equazione:

$$I_i = I_A + I_B - I_A \times I_B$$

dove  $I_i$  sta ad indicare la percentuale di inibizione predetta riguardante l'effetto dei due farmaci in combinazione, mentre  $I_A$  ed  $I_B$  sono le percentuali di inibizione sperimentalmente espresse dai singoli farmaci.

L'equazione può essere espressa come la seguente:

$$E_i = E_A \times E_B$$

dove  $E_i$ ,  $E_A$  ed  $E_B$  rappresentano le percentuali di crescita sperimentale relativa all'azione di ogni farmaco agente singolarmente, calcolata come:  $E = 1 - I$ .

La superficie dose-risposta sperimentale (Fig. 13A) viene così sottratta alla teorica (Fig. 13B) per estrapolare la deviazione da un ipotetico piano 'zero' ( $\Delta E = E_{predicted} - E_{measured}$ ). I valori  $\Delta E$  così calcolati sono successivamente graficati sull'asse delle 'z'.

I punti al di sopra dello zero indicano sinergia, quelli sotto lo zero indicano antagonismo (Fig. 13C). Al fine di riassumere le superfici di interazione dose-risposta, le differenti situazioni combinatorie risultanti in sinergia o antagonismo di Bliss sono state indicate con  $\Sigma SYN$  e  $\Sigma ANT$ . Le interazioni <100% vengono considerate come deboli, le interazioni tra 100% e 200% vengono interpretate come moderate, mentre quelle >200% vengono considerate forti (Meletiadis et al., 2005; Celenza et al., 2012).

### 3.4.2. Calcolo del Combination Index

Il Combination Index è stato calcolato come precedentemente descritto da Chou e Talalay (Chou and Talalay, 1984) con alcune modifiche. Il metodo Chou-Talalay per le interazioni tra farmaci è basato sul principio della 'median-effect', secondo cui l'estrapolazione del Combination Index (CI) può essere effettuata tramite la seguente formula:

$$CI = \sum \frac{D_n}{ID_{x,n}}$$

Per un saggio combinatorio a doppia interazione, il CI è la somma ottenuta dal rapporto tra le dosi  $D_1$  e  $D_2$  dei farmaci in combinazione, e la concentrazione dei due composti presi singolarmente,  $ID_{x,1}$  ed  $ID_{x,2}$ , capaci di agire su una frazione  $x$  (*fraction affected, Fa*).

$ID_{x,n}$  può essere calcolata dalla concentrazione inibente il 50% dell'effetto,  $IC_{50}$ , e il coefficiente di Hill,  $m$ , della curva dose-risposta dei due farmaci singoli, tramite l'equazione:

$$ID_{x,n} = IC_{50} \left( \frac{Fa}{1 - Fa} \right)^{1/m_n}$$

Con il metodo del 'median-effect' di Chou e Talalay vengono stimate la  $IC_{50}$  ed il valore di  $m$  tramite regressione lineare della forma linearizzata della curva dose-risposta ottenuta, variando la determinazione con regressione non lineare dell'equazione di Hill, come precedentemente riportato (Greco et al., 1990).

Questo metodo permette una determinazione quantitativa delle interazioni tra farmaci tramite il *CI*:  $CI < 1$  ci suggerisce *sinergia*,  $CI = 1$  indica un effetto *additivo*, mentre  $CI > 1$  rivela *antagonismo*. Graficando ogni valore di *CI* come funzione dei valori di *Fa* abbiamo ottenuto il cosiddetto *Fa-CI* plot (Fig. 13D).

### **3.5. Analisi in citometria a flusso**

Tutti gli esperimenti di citometria a flusso sono stati effettuati tramite FACS Calibur instrument (Becton Dickinson Instruments Inc.). I dati per l'analisi del ciclo cellulare sono stati processati con il programma Modfit LT for Mac V 3.0; i dati per la definizione del  $\Delta\Psi_m$  sono stati acquisiti utilizzando Cell Quest software (BD Instruments Inc.). I canali di diffusione frontale e laterale sono stati circoscritti alla popolazione principale di cellule, uniforme per dimensioni normali e sono state analizzate almeno 10.000 cellule.

#### **3.5.1. Analisi del ciclo cellulare**

Dopo 24 e 48 h di incubazione, le cellule dei campioni di controllo e trattato venivano raccolte, lavate con PBS freddo e successivamente sottoposte a procedura di fissazione tramite inclusione in etanolo al 70%, ad una temperatura di 4°C, per un tempo di 30 min. Le cellule fissate venivano poi lavate, per due volte, in PBS freddo e colorate con una soluzione contenente 50 µg/ml di ioduro di propidio (PI), 0.1% di Nonidet-P40 e RNase A (6 µg/10<sup>6</sup> cellule) per un tempo di incubazione di 30 min, al buio, a 4°C. I dati raccolti al citofluorimetro consistevano sempre di almeno 10000 eventi per campione.

#### **3.5.2. Determinazione dell'apoptosi mediante saggio con Annexin-V-FITC**

Tutti i campioni (1 × 10<sup>6</sup> cells), esposti e non agli azoli, venivano lavati in PBS e risospesi in 1 ml di 'binding buffer' (10 mM HEPES, 140 mM NaCl, 2.5 mM CaCl<sub>2</sub>, pH 7.4), completato con l'aggiunta di 10 µg/ml Annexin-V-FITC e 1 µg/ml di soluzione di PI. Dopo incubazione a temperatura ambiente (TA) per 15 min, le cellule venivano nuovamente lavate e risospese in binding buffer ed immediatamente analizzate al FACS, per il rilevamento del grado di necrosi ed apoptosi.

### **3.5.3. Determinazione del $\Delta\Psi_m$**

Il  $\Delta\Psi_m$  è stato analizzato utilizzando la sonda fluorescente JC-1 (5,5',6,6'-tetrachloro-1,1',3,3'-tetraethylbenzimidazolyl-carbocyanine iodide). Le cellule trattate ed i controlli ( $1 \times 10^6$  cells) venivano incubati in presenza di JC-1 (3  $\mu\text{M}$ ) per 30 min a 37°C in atmosfera umidificata al 5% di  $\text{CO}_2$ , per essere di seguito staccate tramite tripsina-EDTA, lavate in PBS ed analizzate al citofluorimetro. I segnali di fluorescenza emessi dalla parte monomeric di JC-1 (fluorescenza nel verde) e dagli aggregati (fluorescenza nel rosso) erano rilevate tramite i canali FL-1 (525  $\pm$  5 nm band pass filter) e FL-2 (575  $\pm$  5 nm band pass filter), rispettivamente. Come controllo positivo per la caduta del  $\Delta\Psi_m$  i campioni venivano esposti a rotenone ad una concentrazione di 25  $\mu\text{M}$  ed incubati a 37°C in atmosfera umidificata per 90 min, prima di essere incubati con la sonda potenziometrica, come già descritto.

### **3.6. Rilevamento intracellulare delle specie reattive dell'ossigeno (ROS)**

Il livello di produzione intracellulare di ROS è stato rilevato utilizzando 2',7'-dichlorofluorescein diacetate (DCFH<sub>2</sub>-DA) come precedentemente riportato (Iorio et al., 2015). Dopo il trattamento con azoli (3-24 h), i campioni ( $\approx 2 \times 10^4$  cells) sono stati caricati con DCFH<sub>2</sub>-DA, a una concentrazione finale di 0.5  $\mu\text{M}$  e incubati a 37 °C per 30 minuti. Le cellule sono state successivamente analizzate tramite lettura citofluorimetrica delle O.D. (optical density), per rilevare il livello di produzione intracellulare di ROS. Come controllo positivo per l'induzione di un significativo aumento di ROS, abbiamo trattato le SC con 500  $\mu\text{M}$  di *tert*-butyl hydroperoxide (*t*-BHP) per circa 90 min.

### **3.7. Rilevamento della concentrazione intracellulare degli adenilati**

Il dosaggio dei nucleotidi di adenina è stato eseguito mediante cromatografia liquida ad alta prestazione (HPLC). Dopo i diversi trattamenti, i campioni ( $2 \times 10^6$  cells) venivano raccolti e risospesi con acido perclorico 0.55 M. Dopo 30 min in ghiaccio, i campioni venivano centrifugati per 5 min a 20000 *g* e i surnatanti prelevati per la successiva aggiunta equimolare di  $\text{K}_2\text{CO}_3$ . I livelli di nucleotidi di adenina sono stati misurati mediante HPLC in fase inversa a 254 nm (colonna Supelcosil LC-18-T) in condizioni di gradiente. Tampone A: 4 mM di

tetrabutylammonio idrogeno solfato (pH 6.0), 0.1 M  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ; tampone B: tampone A con metanolo al 30% (pH 7.2). I livelli intracellulari di ATP, ADP e AMP sono stati infine determinati utilizzando l'integrazione automatica basata sugli standard nucleotidici appropriati.

### **3.8. *Analisi dell'espressione proteica mediante Western Blot***

Le cellule venivano raccolte, al termine di ogni trattamento, tramite scraping. Le proteine totali venivano successivamente estratte con un buffer di lisi, contenente 50 mM di Tris-HCl a pH 7.8, 1% Triton X-100, 0.1% SDS, 250 mM NaCl, 5 mM EDTA, 100 mM NaF, 2 mM NaPPi, 2 mM  $\text{Na}_3\text{VO}_4$ , 1 mM PMSF. Dopo il saggio di Bradford, gli estratti proteici venivano corsi su un gel al 12% SDS-PAGE e successivamente trasferiti su una membrana PVDF. Dopo bloccaggio dei siti aspecifici a TA per 1 h con 5% non-fat dry-milk in TBST, le membrane venivano lavate brevemente in TBST ed incubate con gli anticorpi primari diretti contro LC3B (1:1000 O/N a 4°C), C-PARP1 (1:1000 O/N a 4°C), p62SQSTM (1:500 O/N a 4°C), pAMPK Thr172 (1:1000 O/N a 4°C), AMPK (1:1000 O/N a 4°C), pULK1 Ser 555 (1:1000 O/N a 4°C), ULK1 (1:1000 O/N a 4°C), diluiti in 5% non-fat milk o 5% BSA in TBST contenente 0.1% di Tween20. Le membrane, dopo lavaggio, venivano nuovamente incubate per 1 h a TA, con gli specifici anticorpi secondari HRP-conjugati (anti-rabbit o anti-mouse) diluiti 1:2000 in TBST al 5% non-fat milk. Successivamente le membrane venivano incubate nel substrato chemiluminescente SuperSignal West Pico, il cui segnale veniva rilevato tramite acquisizione al ChemiDoc XRSplus imaging system (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA). La densitometria delle bande relative all'estratto proteico è stata ottenuta tramite il software dedicato (ImageJ, U. S. National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA) e normalizzata con la  $\beta$ -actina.

### **3.9. *Microscopia confocale a fluorescenza***

Le cellule venivano piastrate ( $1 \times 10^5$ ) su vetrini preparati con fibronectina (10  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) per 24 h e trattati con TEB, ECO e MIX per 3 h a 37 ° C, 5%  $\text{CO}_2$ . Le cellule di controllo e trattate sono state fissate con paraformaldeide al 4% in PBS, per 10 min a TA e permeabilizzate con Triton-X allo 0,1% in PBS, per 5 min a TA. I siti di legame non specifici sono stati bloccati con BSA al

10% in PBS (soluzione bloccante), per 10 min a TA. Dopo il lavaggio con PBS, le cellule sono state incubate, O/N a 4 ° C, con anticorpo anti-TOMM20 rabbit (1:500), con colorazione singola, o le miscele degli anticorpi anti-TOMM20 rabbit/anti-LAMP1 mouse (1:500), anticorpi anti-TOMM20 rabbit/anti-LC3 mouse (1:100), anti-LAMP1 mouse/anti-LC3 rabbit (1:200), per le colorazioni doppie. Tutti gli anticorpi primari sono stati diluiti in soluzione bloccante. Dopo il lavaggio con PBS, gli anticorpi primari venivano rivelati tramite gli anticorpi secondari Alexa Fluor 488 IgG anti-rabbit o dalla miscela Alexa Fluor 488 IgG anti-rabbit/Alexa Fluor 633 IgG anti-mouse (1:2000 in soluzione bloccante), per 30 min a TA al buio. I controlli sono stati eseguiti omettendo l'anticorpo primario. I vetrini venivano chiusi con il mezzo di montaggio Vectashield contenente Dapi ed esaminate al microscopio confocale Leica TCS SP5 (Mannheim, Germany).

### **3.10. *Analisi statistiche***

Se non diversamente indicato, i dati riportati in questo studio sono espressi come la media  $\pm$  l'errore standard (SE) di almeno tre esperimenti indipendenti. Per testare la significatività statistica delle differenze tra medie di gruppo è stato utilizzato il programma Sigma Stat 2.03 (SPSS, Chicago, IL); per determinare le analisi statisticamente significative nel confronto tra più gruppi è stato utilizzato il test ANOVA, seguito dal test di Tukey–Kramer. ANOVA on ranks (test di Kruskal-Wallis) seguito dal test di Tukey–Kramer sono stati eseguiti per le analisi di PARP1. Il software OriginPro. versione 8.5 (OriginLab Corporation, Northampton, MA, USA) è stato utilizzato per valutare la significatività statistica delle interazioni tra TEB ed ECO, considerando il valore di  $P < 0.05$  statisticamente significativo.

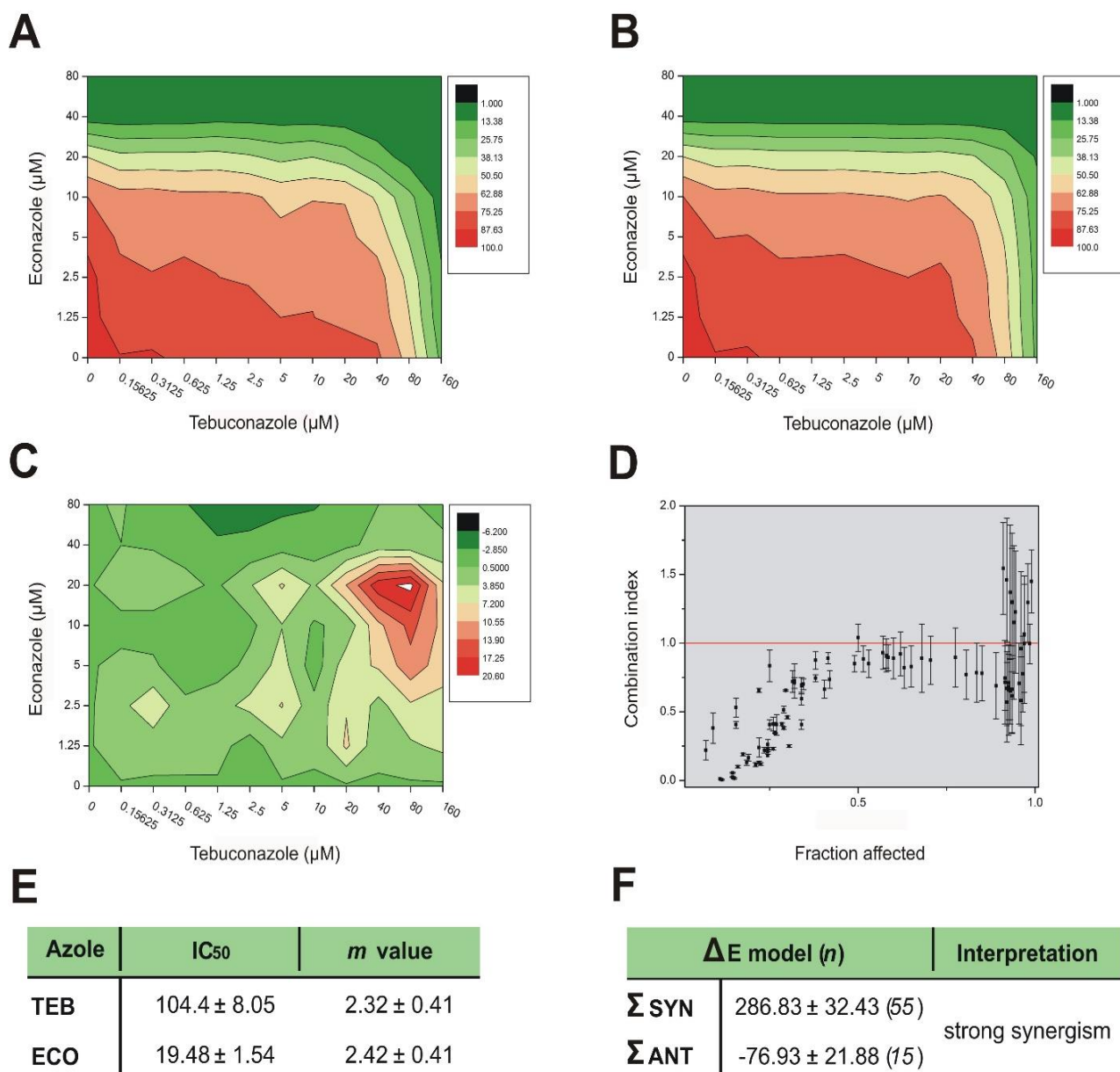
#### 4.1. Effetti citotossici indotti dall'azione sinergica di TEB ed ECO in cellule TM4

Le analisi sulla vitalità cellulare sono state condotte su campioni di cellule esposte per 24 e 48 h a concentrazioni progressivamente crescenti di TEB (0.15625 - 160  $\mu\text{M}$ ) ed ECO (1.25 - 80  $\mu\text{M}$ ), sia per i trattamenti singoli che in combinazione. I dati riportati in figura 13F mostrano effetti sinergici nella riduzione della vitalità cellulare alle 48 h di trattamento. A questi tempi i valori di  $IC_{50}$  (Concentrazione Inibente la crescita del 50%), per i singoli composti, corrispondevano a  $104.40 \pm 8.05$  per il TEB e  $19.48 \pm 1.54$   $\mu\text{M}$  per l'ECO (Fig. 13E). Per definire la natura delle interazioni tra i due azoli, abbiamo inizialmente utilizzato il modello dell'indipendenza di Bliss, detto anche  $\Delta E$  model. Le analisi delle interazioni farmaco-farmaco hanno mostrato un'attività sinergica per 55 combinazioni, corrispondente ad un valore di  $\Sigma\text{SYN}$  di  $286.83 \pm 32.43$  (Fig. 13F). I grafici bi-dimensionali di superficie della crescita cellulare sperimentale, della crescita predetta e della risposta relativa al  $\Delta E$  model ( $E_{\text{predicted}} - E_{\text{measured}}$ ) sono riportati, rispettivamente, in figura 13A, B e C. I dati sperimentali sono stati successivamente utilizzati per il calcolo del *Combination Index* (CI) e della *Fraction affected* (Fa, indicante la percentuale di riduzione della vitalità cellulare) secondo il modello di Chou-Talalay, che fornisce la misura quantitativa ed indipendente della sinergia. A tal riguardo, la selezione delle combinazioni maggiormente efficaci avveniva in base ai seguenti criteri: valore di  $CI < 1.0$  e valore di  $Fa > 0.5$ . Le 31 combinazioni maggiormente rilevanti, tra le 77 possibili, ed il loro relativo valore di 'dose reduction' per ogni singolo composto, sono rappresentate in Tabella 3, mentre tutti i dati raccolti sono riportati nel plot  $Fa-CI$  (Fig. 13D). Tra le combinazioni selezionate solo quella relativa alla concentrazione di TEB 40  $\mu\text{M}$  e di ECO 20  $\mu\text{M}$  è stata ulteriormente investigata, dato il valore di  $CI$  pari a  $0.77 \pm 0.018$ , corrispondente ad un 80% di inibizione della crescita ( $Fa$  pari a  $0.80 \pm 0.09$ ) e di 'dose reduction' efficace di  $5.16 \pm 1.26$  per il TEB e di  $1.87 \pm 0.44$  per l'ECO.

CI	Fa	Combination		dose reduction	
		TEB ( $\mu\text{M}$ )	ECO ( $\mu\text{M}$ )	TEB	ECO
0.99 ± 0.43	0.97 ± 0.04	0.15625	80	3687.19 ± 1671.46	1.25 ± 0.55
0.61 ± 0.27	0.94 ± 0.05	0.15625	40	2987.30 ± 1385.02	2.04 ± 0.91
0.90 ± 0.09	0.58 ± 0.06	0.15625	20	780.40 ± 85.49	1.13 ± 0.12
0.65 ± 0.24	0.93 ± 0.05	0.3125	40	1302.19 ± 504.26	1.79 ± 0.67
0.91 ± 0.12	0.58 ± 0.08	0.3125	20	387.66 ± 53.86	1.12 ± 0.15
0.66 ± 0.23	0.93 ± 0.05	0.625	40	620.69 ± 220.12	1.71 ± 0.58
0.91 ± 0.09	0.58 ± 0.06	0.625	20	193.17 ± 19.15	1.12 ± 0.11
0.74 ± 0.24	0.91 ± 0.05	1.25	40	272.30 ± 89.90	1.51 ± 0.48
0.93 ± 0.12	0.57 ± 0.08	1.25	20	95.46 ± 13.25	1.11 ± 0.15
0.72 ± 0.31	0.91 ± 0.07	2.5	40	156.57 ± 69.24	1.72 ± 0.73
0.89 ± 0.15	0.60 ± 0.10	2.5	20	51.02 ± 9.01	1.18 ± 0.20
0.66 ± 0.33	0.92 ± 0.06	5	40	94.10 ± 48.34	2.05 ± 1.02
0.83 ± 0.15	0.65 ± 0.10	5	20	28.17 ± 5.22	1.30 ± 0.23
0.71 ± 0.27	0.92 ± 0.06	10	40	39.34 ± 15.71	1.73 ± 0.67
0.92 ± 0.16	0.62 ± 0.10	10	20	13.23 ± 2.37	1.22 ± 0.21
0.67 ± 0.31	0.93 ± 0.05	20	40	23.96 ± 11.65	2.09 ± 0.98
0.89 ± 0.25	0.68 ± 0.14	20	20	7.86 ± 2.30	1.44 ± 0.40
0.58 ± 0.32	0.96 ± 0.04	40	40	16.97 ± 9.63	2.91 ± 1.60
<b>0.77 ± 0.18</b>	<b>0.80 ± 0.09</b>	<b>40</b>	<b>20</b>	<b>5.16 ± 1.26</b>	<b>1.87 ± 0.44</b>
0.88 ± 0.10	0.51 ± 0.07	40	10	2.69 ± 0.30	2.00 ± 0.22
0.77 ± 0.27	0.97 ± 0.05	80	40	5.71 ± 2.08	2.00 ± 0.70
0.57 ± 0.29	0.92 ± 0.07	80	20	5.84 ± 3.06	4.07 ± 2.07
0.88 ± 0.18	0.71 ± 0.10	80	10	2.00 ± 0.41	2.93 ± 0.57
0.82 ± 0.15	0.63 ± 0.10	80	5	1.70 ± 0.32	5.01 ± 0.89
0.85 ± 0.10	0.53 ± 0.07	80	2.5	1.39 ± 0.16	8.29 ± 0.94
0.99 ± 0.14	0.99 ± 0.05	160	40	2.49 ± 0.37	1.76 ± 0.25
0.71 ± 0.29	0.96 ± 0.06	160	20	2.93 ± 1.23	4.10 ± 1.66
0.67 ± 0.27	0.92 ± 0.06	160	10	2.40 ± 0.96	6.76 ± 2.61
0.69 ± 0.24	0.89 ± 0.07	160	5	1.93 ± 0.67	10.97 ± 3.66
0.78 ± 0.20	0.85 ± 0.07	160	2.5	1.50 ± 0.39	17.30 ± 4.30
0.79 ± 0.22	0.83 ± 0.08	160	1.25	1.43 ± 0.39	33.12 ± 8.73

**Tab. 3. Combinazioni di TEB ed ECO maggiormente rilevanti.**

Le 31 combinazioni maggiormente rilevanti di TEB ed ECO selezionate in base ai valori del Combination Index (CI) e della Fraction affected (Fa), determinati tramite adattamento dell'equazione del 'median-effect' di Chou e Talalay. In grassetto la combinazione ulteriormente investigata. La variabilità è stimata come SE della media.



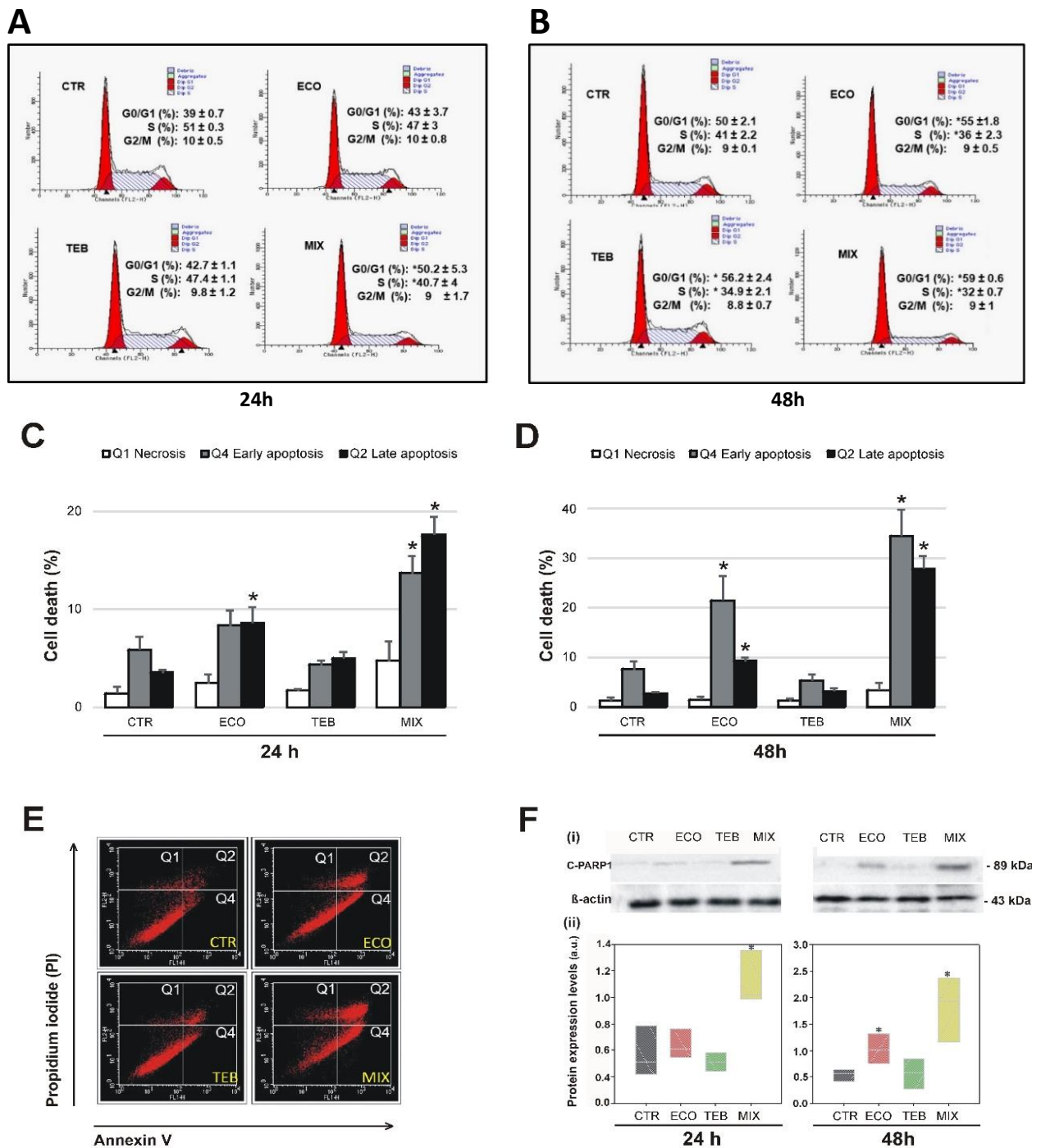
**Fig. 13.** L'associazione TEB/ECO risulta sinergica nell'indurre effetti citotossici nelle cellule TM4.

I grafici dose-risposta di superficie in 2D rappresentano (A) la percentuale sperimentale di crescita e vitalità cellulare, (B) la percentuale di crescita predetta determinata tramite il  $\Delta E$  model ( $E_i = E_A \times E_B$ ) e (C) i valori risultanti dal  $\Delta E$  model ( $\Delta E = E_{predicted} - E_{measured}$ ) (D) Analisi del Combination Index (CI) tra TEB ed ECO in cellule TM4. CI < 0 indica un effetto sinergico. (E) Concentrazione minima inibente il 50% della crescita (IC<sub>50</sub>) e coefficiente di Hill (*m*) determinati per TEB ed ECO. (F) Interazioni *in vitro* tra TEB ed ECO determinate dal  $\Delta E$  model. ΣSYN e ΣANT indicano rispettivamente la sinergia e l'antagonismo di Bliss. *n* = numero delle combinazioni binarie (tra le 77 combinazioni) con valori statisticamente significativi di sinergia o antagonismo. I dati rappresentano la media di tre esperimenti indipendenti ± SE.

#### **4.2. La combinazione TEB/ECO induce l'arresto del ciclo cellulare in fase G0/G1 e l'attivazione di apoptosi in cellule TM4**

Al fine di identificare i meccanismi alla base dell'effetto antiproliferativo indotto dalla combinazione TEB/ECO (MIX), le cellule venivano trattate per 24 e 48 h, e successivamente sottoposte allo studio del ciclo cellulare mediante l'analisi dei profili citofluorimetrici. TEB, ECO e la loro combinazione risultavano influire sulla distribuzione delle fasi del ciclo cellulare in maniera tempo-dipendente (Fig. 14A e B). Nello specifico, il MIX esprimeva una percentuale di incremento significativa per le cellule in fase G0/G1, da un valore di  $39 \pm 0.7$  per il controllo, a  $50.2 \pm 5.2\%$  (Fig. 14A) e da  $50 \pm 2.1$  (controllo) a  $59 \pm 0.6\%$  (Fig. 14B), rispettivamente per le 24 e 48 h di incubazione; questo effetto era parallelamente associato ad un decremento della percentuale di cellule presenti in fase S. Simili alterazioni venivano anche osservate nei campioni trattati con i composti singoli, sebbene espresse ad un livello minore: per la fase G0/G1, il valore dei campioni esposti al TEB risultava essere di  $56.2 \pm 2.4\%$ ; il valore di quelli trattati con ECO era pari a  $55 \pm 1.8\%$ , e questo accadeva solo alle 48 h di esposizione (Fig. 14B). Infine, le analisi della fase sub-G1 alle 48 h mostravano che i trattamenti con ECO e MIX erano associati ad un aumento di morte cellulare rispetto alle cellule non trattate (dati non mostrati). In particolare, le cellule esposte al MIX mostravano un segnale maggiore per la fase sub-G1. Dato che la presenza di un'alta percentuale di cellule contenente DNA in fase sub-G1 viene spesso associata al fenotipo apoptotico, abbiamo investigato un possibile coinvolgimento del processo apoptotico nella citotossicità azoli-indotta. Successivamente al trattamento con TEB, ECO e MIX per 24 e 48 h le cellule venivano sottoposte a doppia marcatura con Annexin V-PI ed analizzate al citofluorimetro. Rispetto ai gruppi di controllo, la percentuale di cellule trattate con il MIX mostrava un aumento significativo sia nella fase precoce (Q4) che in quella tardiva (Q2) dell'apoptosi, al tempo di 24 (Q4 =  $\sim 1$ -fold-increase; Q2 =  $\sim 4$ -fold-increase) e 48 h (Q4 =  $\sim 3.6$ -fold-increase; Q2 =  $\sim 9$ -fold-increase) di incubazione (Fig. 14C e D). In modo simile, per le 48 h di incubazione, anche le cellule trattate con ECO mostravano eventi di esternalizzazione della fosfatidilserina (Q4 =  $\sim 1.8$ -fold-increase rispetto al controllo; Q2 =  $\sim 2.4$ -fold-increase rispetto al controllo), seppur in misura minore rispetto al MIX (Fig. 14D). Non erano, invece, rilevate differenze significative nelle cellule esposte al TEB rispetto al controllo. A conferma di questi dati, nei campioni trattati con ECO e MIX, sono stati analizzati i livelli del frammento 1 della Poli-(ADP-ribosio) polimerasi (89-kDa) (PARP1). PARP1 rappresenta un importante enzima che risulta

essere coinvolto in diverse pathway responsabili della morte cellulare. In caso di apoptosi, PARP1 viene clivato dalla caspasi 3, esprimendo un frammento proteico di 89-kDa, C-PARP1. In linea con i risultati ottenuti, i livelli di espressione di C-PARP1 risultavano significativamente aumentati nelle cellule trattate con MIX ed ECO (Fig. 14F). Complessivamente, questi risultati dimostrano che sia il TEB che l'ECO hanno proprietà citostatiche, mentre solo l'ECO mostra la capacità di indurre citotossicità in termini di morte cellulare. In aggiunta, l'esposizione al TEB induce una sensibilizzazione all'apoptosi indotta dall'ECO.



**Fig. 14. Effetti degli azoli sulla distribuzione delle fasi del ciclo cellulare e sull'apoptosi in cellule TM4.**

Le cellule venivano trattate con TEB (40  $\mu$ M), ECO (20  $\mu$ M), e MIX per 24 (A) e 48 h (B). Il contenuto di DNA e la distribuzione delle fasi del ciclo cellulare sono state analizzate in citometria a flusso tramite marcatura con PI. La percentuale di cellule in ogni fase è mostrata nei profili citofluorimetrici e rappresenta la media  $\pm$  SE di tre esperimenti indipendenti; OneWay ANOVA seguito da Tukey test; \* $P < 0.05$  rispetto al controllo. (C-D) I grafici rappresentano la percentuale di cellule apoptotiche e necrotiche nei gruppi sperimentali esposti per 24 (C) e 48 h (D) a TEB, ECO e MIX. I dati di tre esperimenti indipendenti sono espressi come media  $\pm$  SE; OneWay ANOVA seguito da Tukey test; \* $P < 0.05$  rispetto al controllo. (E) Immagine rappresentativa dell'analisi citofluorimetrica di cellule marcate con annexin-V e PI dopo 48 h di incubazione in assenza (CTR) o in presenza di azoli. Q1 = Necrosi; Q4 = Apoptosi precoce; Q2 = Apoptosi tardiva. (F, i) Immagine rappresentativa di C-PARP1 in western blotting e (F, ii) livelli di espressione di C-PARP1 (89 kDa) ai tempi indicati, analizzati in western blot. La densità delle bande è stata valutata tramite Image-J software e normalizzata con la  $\beta$ -actina. I dati sono espressi come la media di tre esperimenti indipendenti (arbitrary units, a.u.)  $\pm$  SE; ANOVA on ranks (Kruskal-Wallis test) seguito da Tukey test; \* $P < 0.05$  rispetto al controllo.

#### **4.3. La combinazione TEB/ECO promuove un incremento dell'attività autofagica in cellule TM4**

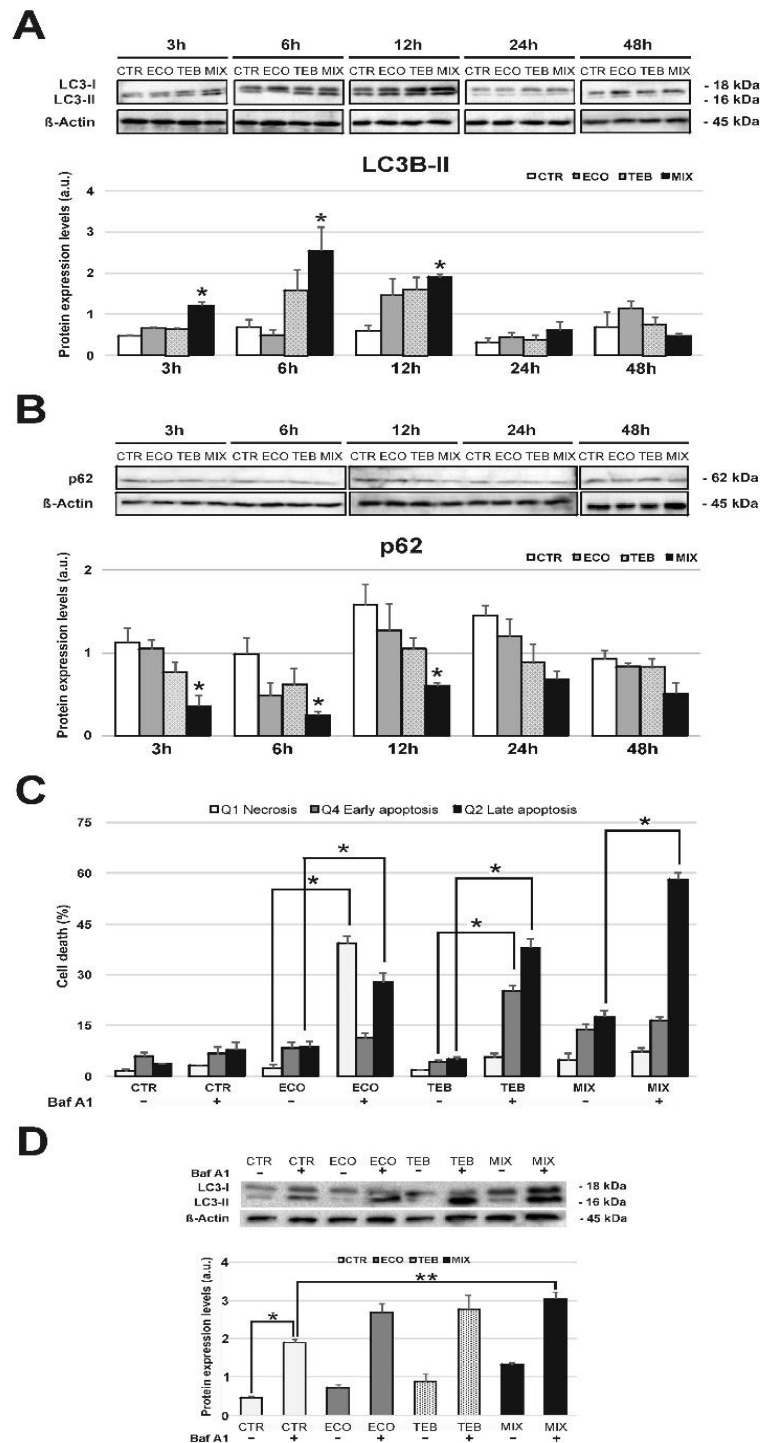
Nelle cellule del Sertoli, in condizioni fisiologiche, l'autofagia contribuisce alla conservazione dell'omeostasi e della funzionalità cellulare (Liu et al., 2016). Al fine di verificare un possibile coinvolgimento dell'autofagia nella risposta allo stress indotto dagli azoli sono stati effettuati esperimenti di time-course (3, 6, 12, 24 e 48 h), valutando in western blotting i livelli di espressione delle proteine LC3 (microtubule-associated protein light chain 3) e p62 (p62/SQSTM1), markers cruciali della pathway autofagica.

Come mostrato in figura 15, l'esposizione singola o combinata delle cellule TM4 agli azoli, induceva un rapido e progressivo incremento dell'autofagia evidenziato dalla modulazione positiva di LC3B-II (membrane-bound LC3) (Fig. 15A) e dalla concomitante riduzione dei livelli di p62 (Fig. 15B). Tuttavia, al di là di questa tendenza generale, solo i gruppi esposti al MIX hanno mostrato variazioni significative rispetto ai campioni di controllo, ed inoltre l'effetto risultava tempo-dipendente (3-12 h). Questi risultati sono stati anche confermati da analisi in immunofluorescenza che hanno evidenziato fenomeni di colocalizzazione tra LC3 (LC3 "punta") e LAMP1 (marker lisosomiale) (Fig. 20C).

#### **4.4. L'autofagia indotta dal trattamento combinato TEB/ECO ha un ruolo essenziale nel mantenere la sopravvivenza delle cellule TM4**

Accanto alla sua importante funzione nel mantenimento dell'omeostasi cellulare, l'autofagia può anche essere un meccanismo atto a garantire i processi di morte cellulare e per tali motivi viene considerata "un'arma a doppio taglio" (*double-edged sword*) (Liu et al., 2016; Das et al., 2018). Al fine di investigare tale aspetto, in relazione agli effetti indotti dal nostro trattamento, sono stati condotti esperimenti in presenza o assenza di bafilomicina A1 (Baf A1), inibitore della V-ATPasi lisosomiale e della fusione autofagosoma-lisosoma (Klionsky et al., 2012). L'esposizione combinata delle cellule agli azoli con Baf A1 (25 nM), per un tempo di 3 h, aumentava i livelli di espressione di LC3B-II (Fig. 15D), confermando così l'inibizione del processo autofagico. Inoltre, la presenza di Baf A1 determinava un'induzione apoptotica nelle cellule esposte al TEB già dopo 24 h di incubazione, ed un incremento significativo di

apoptosi e necrosi nei campioni esposti ad ECO e MIX (Fig. 15C). Globalmente, questi dati suggeriscono un ruolo citoprotettivo per l'autofagia MIX-indotta.



**Fig. 15. Il trattamento combinato TEB/ECO induce un incremento dei livelli di autofagia nelle cellule TM4.**

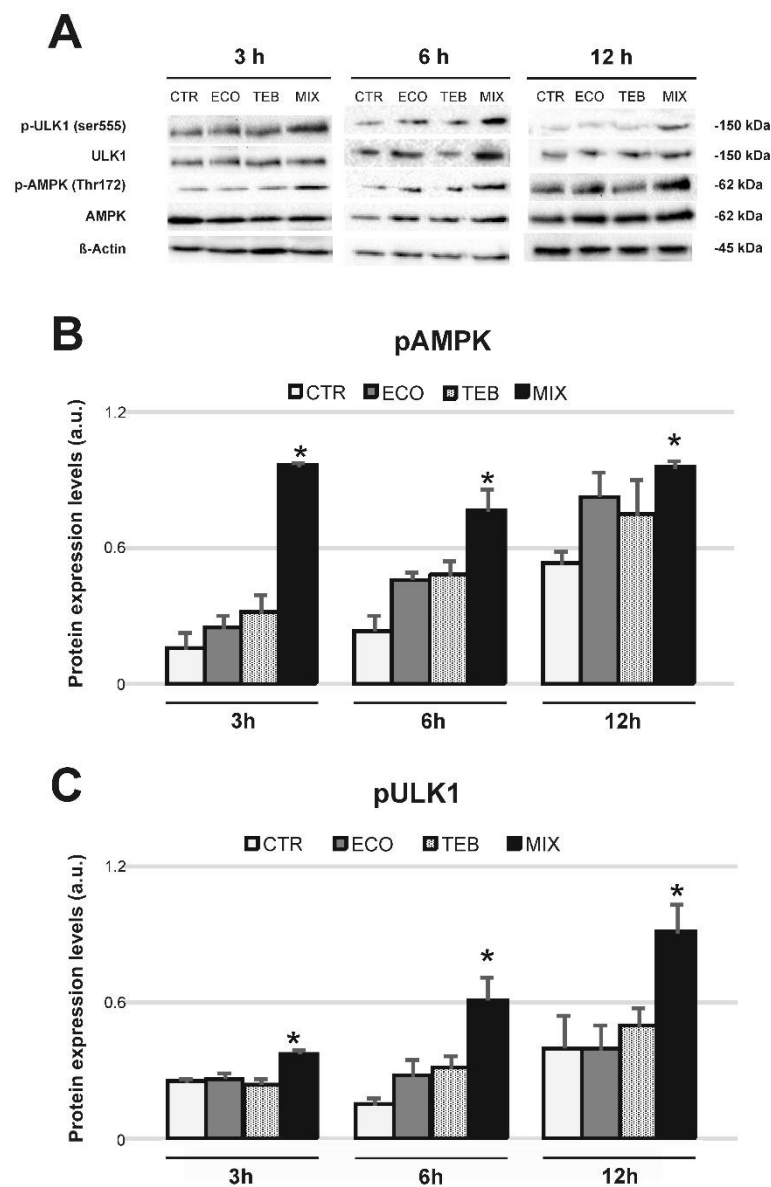
Effetti tempo-dipendenti dei fungicidi azolici sui livelli di espressione di **(A)** LC3B-II e **(B)** p62. Sopra i rispettivi grafici, le immagini rappresentative delle analisi in western blot per LC3B-II e p62. La densitometria delle bande è stata effettuata tramite il software Image-J e normalizzata con la  $\beta$ -actina. I dati sono espressi come la media di tre esperimenti indipendenti (arbitrary units, a.u.)  $\pm$  SE; OneWay ANOVA seguito da Tukey test; \* $P < 0.05$ . **(C)** L'inibizione dell'autofagia tramite bafilomicina A1 (Baf A1) aumenta i livelli di apoptosi e necrosi in cellule TM4 esposte agli azoli per 24 h. \* $P < 0.05$ . **(D)** Immagini rappresentative dei livelli di espressione di LC3B-II rilevate dopo 3 h di incubazione con Baf A1. I dati sono espressi come la media di tre esperimenti indipendenti (arbitrary units, a.u.)  $\pm$  SE; OneWay ANOVA seguito da Tukey test; \* $P < 0.05$  vs gruppi CTR; \*\* $P < 0.05$  vs CTR + Baf A1.

#### **4.5. Coinvolgimento dell'asse AMPK/ULK1 nell'autofagia MIX-indotta**

Dati in letteratura dimostrano come la AMPK svolga un ruolo fondamentale nell'induzione dell'autofagia attraverso l'attivazione di ULK1 (Egan et al., 2011; Kim et al., 2011).

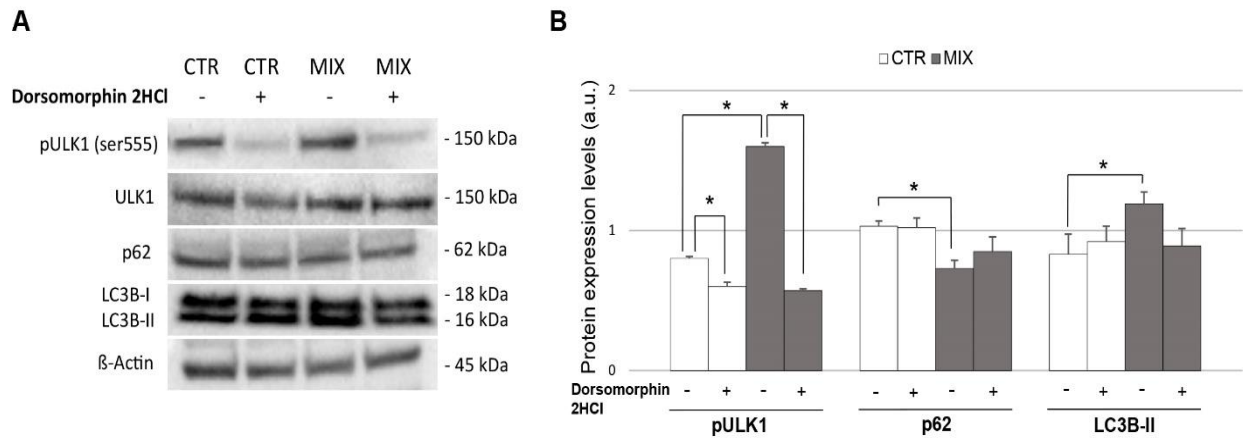
Al fine di valutare le potenziali implicazioni dell'asse AMPK/ULK1 nella modulazione dell'autofagia indotta da MIX, è stato analizzato il grado di attivazione delle due chinasi mediante analisi in western blot. Le stesse valutazioni sono state condotte anche in gruppi sperimentali esposti a TEB ed ECO. Come mostrato nella figura 16B, i livelli di fosforilazione di AMPK (nel residuo Thr172) erano significativamente aumentati nei gruppi esposti a MIX rispetto ai gruppi di controllo (3h = ~ 5-fold-increase; 6 h = ~ 2.1-fold-increase; 12 h = ~ 0.8-fold-increase). Coerentemente con l'attivazione di AMPK, anche i livelli di pULK1 (Ser555) risultavano aumentati. (Fig. 16C; 3h = ~ 0.5-fold-increase; 6 h = ~ 3-fold-increase; 12 h = ~ 1.2-fold-increase). Non sono state osservate differenze significative tra le cellule esposte a TEB ed ECO ed i rispettivi gruppi di controllo.

Il ruolo critico di AMPK nel mediare l'attivazione di ULK1 nell'autofagia MIX-indotta è stato confermato da esperimenti di inibizione con Dorsomorfina 2HCl (Composto C), inibitore di AMPK. Come mostrato in figura 17, l'utilizzo del composto C blocca efficacemente la fosforilazione di ULK1 (Ser 555), evento non accompagnato da aumenti dei livelli di autofagia.



**Fig. 16. Attivazione della via AMPK/ULK1 nell'autofagia MIX-indotta.**

(A) Immagini rappresentative di pAMPK, AMPK, pULK1 e ULK1 ottenute mediante western blotting. (B-C) Livelli di espressione proteica di pAMPK (Thr 172) e pULK1 (Ser 555) in cellule di controllo ed esposte agli azoli nei tempi indicati. I dati derivati da tre esperimenti indipendenti sono espressi come la media (arbitrary units, a.u.)  $\pm$  SE dei livelli di pAMPK e pULK1 (espressi come rapporti pAMPK/AMPK e pULK1/ULK1, dopo normalizzazione con  $\beta$ -actina). OneWay ANOVA seguito da Tukey test; \*P < 0.05.



**Fig. 17. L'attivazione AMPK-dipendente di ULK1 riveste un ruolo critico nell'induzione dell'autofagia MIX-indotta.**

**(A)** Immagini rappresentative di pULK1, ULK1, p62 e LC3B-II ottenute mediante western blotting. **(B)** Livelli di espressione proteica di pULK1 (Ser 555), p62 e LC3B-II in cellule di controllo ed esposte a MIX, incubate per 3 h in presenza o assenza di Dorsomorfina 2HCl (5 $\mu$ M). I dati derivati da tre esperimenti indipendenti esprimono la media (arbitrary units, a.u.)  $\pm$  SE dei livelli di pULK1 (pULK1/ULK1), p62 e LC3B-II, dopo normalizzazione con  $\beta$ -actina. OneWay ANOVA seguita da Tukey test; \*P < 0.05.

#### **4.6. L'attivazione di AMPK è associata a variazioni dello stato energetico cellulare**

Coerentemente con il suo ruolo di sensore energetico, l'attivazione di AMPK indotta da MIX poteva riflettere variazioni dello stato energetico cellulare. Al fine di verificare questa ipotesi, abbiamo esaminato se le variazioni nei livelli di attivazione di AMPK potessero corrispondere a modulazioni dei seguenti parametri: (1) concentrazione intracellulare di ATP, ADP e AMP; (2) rapporto AMP/ATP; (3) pool degli adenilati (ANP, Adenine nucleotides Pool), (ATP)+(ADP)+(AMP); (4) carica energetica (Adenylate Energy Charge, AEC)  $[(ATP) + 0,5 (ADP)] / [(ATP)+(ADP)+(AMP)]$ . Le stesse analisi sono state eseguite anche su campioni sperimentali esposti a ECO e TEB. Come riportato nella Tabella 4, l'esposizione agli azoli, singola o in combinazione, modificava significativamente il metabolismo energetico delle cellule TM4. In particolare, si registravano riduzioni significative sia del contenuto intracellulare di ATP che dei livelli di ANP, a partire dalle 3, 6 e 12 h di trattamento, rispettivamente nei campioni esposti a MIX, ECO e TEB. Tali effetti si mantenevano fino alle 48 h di incubazione. L'esposizione agli azoli causava anche aumenti dei livelli di AMP e del rapporto AMP/ATP sebbene variazioni significative fossero rilevabili esclusivamente nelle cellule trattate con MIX a 3, 6 (come livelli di AMP e rapporto AMP/ATP) e 12 h (come rapporto AMP/ATP). Infine, la progressiva riduzione dei livelli di ANP riscontrata nelle cellule esposte ad ECO e MIX si verificava parallelamente ad una riduzione altrettanto significativa di AEC.

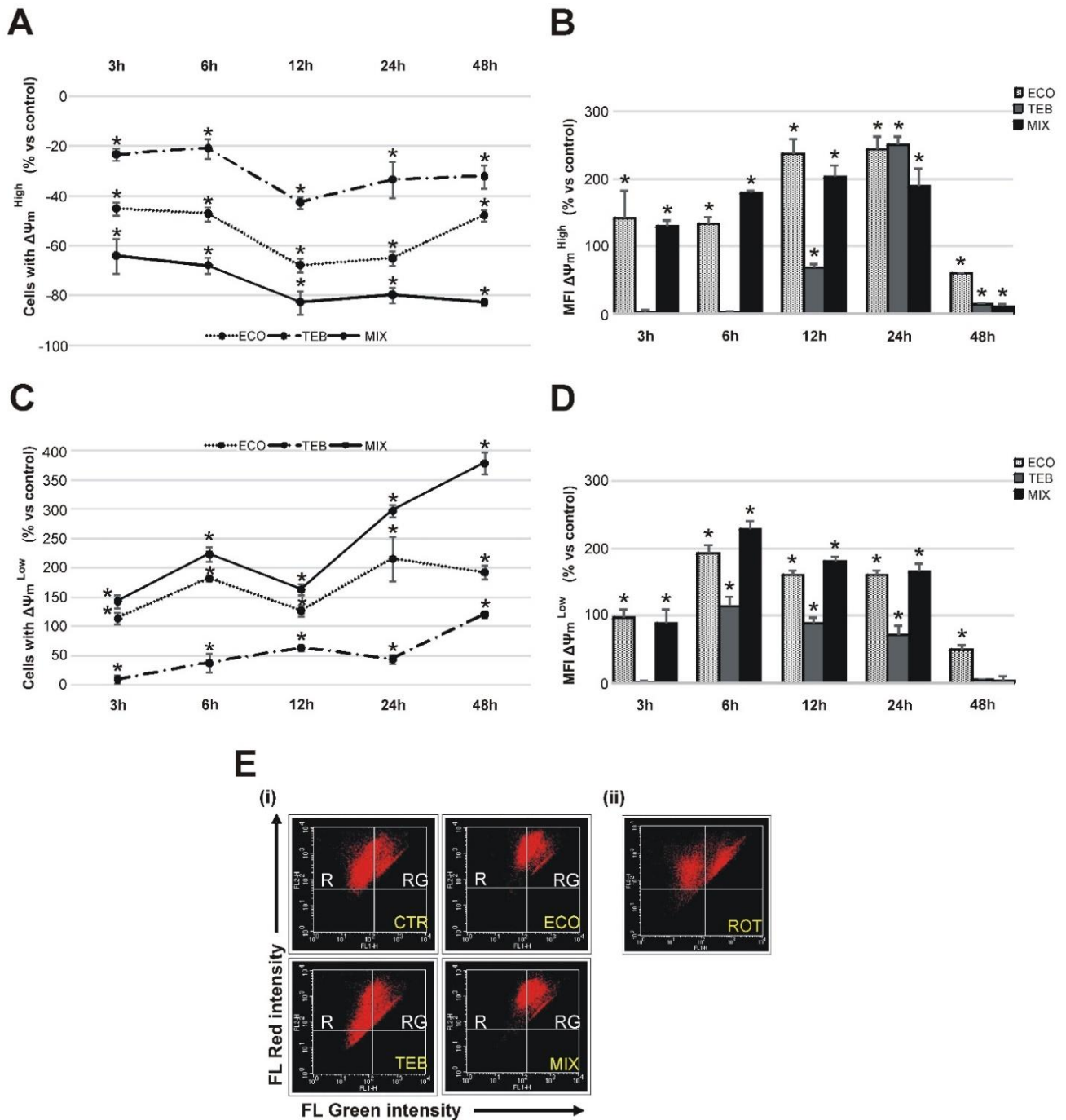
Time	Parameters	ATP	AMP	ADP	ANPs levels	AMP/ATP	AEC
		(nmol/1x10 <sup>6</sup> cells)	(nmol/1x10 <sup>6</sup> cells)	(nmol/1x10 <sup>6</sup> cells)	(nmol/1x10 <sup>6</sup> cells)		$= \frac{0.5 \times [ADP] \times [ATP]}{ATP + ADP + AMP}$
<b>3h</b>	CTR	4.11 ± 0.14	0.12 ± 0.01	0.71 ± 0.02	4.94 ± 0.14	0.03 ± 0.01	0.90 ± 0.01
	ECO	3.43 ± 0.32	0.17 ± 0.02	0.62 ± 0.04	4.1 ± 0.36	0.05 ± 0.01	0.90 ± 0.01
	TEB	3.62 ± 0.26	0.17 ± 0.02	0.66 ± 0.03	4.45 ± 0.29	0.05 ± 0.01	0.89 ± 0.01
	MIX	<b>*2.98 ± 0.08</b>	<b>*0.24 ± 0.02</b>	0.59 ± 0.02	<b>*3.79 ± 0.10</b>	<b>*0.08 ± 0.01</b>	<b>*0.86 ± 0.01</b>
<b>6h</b>	CTR	4.01 ± 0.13	0.32 ± 0.02	0.83 ± 0.02	5.25 ± 0.17	0.08 ± 0.01	0.86 ± 0.01
	ECO	<b>*3.51 ± 0.16</b>	0.38 ± 0.02	0.88 ± 0.08	<b>*4.81 ± 0.10</b>	0.10 ± 0.01	<b>*0.82 ± 0.01</b>
	TEB	3.75 ± 0.06	0.37 ± 0.04	0.82 ± 0.02	4.94 ± 0.09	0.10 ± 0.01	0.84 ± 0.01
	MIX	<b>*3.28 ± 0.05</b>	<b>*0.48 ± 0.03</b>	0.82 ± 0.02	<b>*4.35 ± 0.07</b>	<b>*0.16 ± 0.01</b>	<b>*0.80 ± 0.01</b>
<b>12h</b>	CTR	4.06 ± 0.13	0.19 ± 0.02	0.52 ± 0.02	4.77 ± 0.17	0.05 ± 0.01	0.90 ± 0.01
	ECO	<b>*3.33 ± 0.20</b>	0.24 ± 0.03	0.56 ± 0.02	<b>*4.13 ± 0.19</b>	0.08 ± 0.01	<b>*0.87 ± 0.01</b>
	TEB	<b>*3.17 ± 0.07</b>	0.2 ± 0.02	0.47 ± 0.03	<b>*3.83 ± 0.12</b>	0.06 ± 0.01	0.887 ± 0.01
	MIX	<b>*3.13 ± 0.04</b>	0.28 ± 0.02	0.49 ± 0.02	<b>*3.89 ± 0.05</b>	<b>*0.09 ± 0.01</b>	<b>*0.87 ± 0.01</b>
<b>24h</b>	CTR	3.29 ± 0.01	0.3 ± 0.04	0.68 ± 0.04	4.28 ± 0.07	0.09 ± 0.01	0.85 ± 0.01
	ECO	<b>*2.76 ± 0.11</b>	0.34 ± 0.04	0.69 ± 0.03	<b>*3.79 ± 0.14</b>	0.12 ± 0.01	<b>*0.82 ± 0.01</b>
	TEB	<b>*2.64 ± 0.05</b>	0.31 ± 0.05	0.67 ± 0.03	<b>*3.62 ± 0.08</b>	0.12 ± 0.02	0.82 ± 0.01
	MIX	<b>*2.38 ± 0.07</b>	0.37 ± 0.03	0.71 ± 0.03	<b>*3.46 ± 0.13</b>	0.15 ± 0.01	<b>*0.79 ± 0.01</b>
<b>48h</b>	CTR	3.39 ± 0.14	0.35 ± 0.01	0.62 ± 0.02	4.36 ± 0.13	0.10 ± 0.01	0.85 ± 0.01
	ECO	<b>*2.56 ± 0.17</b>	0.41 ± 0.05	0.63 ± 0.03	<b>*3.60 ± 0.21</b>	0.16 ± 0.01	<b>*0.80 ± 0.01</b>
	TEB	<b>*2.54 ± 0.09</b>	0.33 ± 0.02	0.62 ± 0.02	<b>*3.86 ± 0.09</b>	0.11 ± 0.01	0.83 ± 0.01
	MIX	<b>*2.20 ± 0.14</b>	0.35 ± 0.06	0.64 ± 0.01	<b>*3.18 ± 0.14</b>	0.16 ± 0.03	<b>*0.79 ± 0.01</b>

**Tab.4. Variazioni dello stato energetico indotte dagli azoli in cellule TM4.**

In tabella sono riportate le concentrazioni intracellulari dei nucleotidi, i livelli di ANP, i rapporti AMP/ATP e i valori di AEC nei gruppi di controllo ed esposti agli azoli ai tempi di trattamento indicati. Le concentrazioni intracellulari degli adenilati sono state determinate mediante cromatografia liquida ad alta pressione (HPLC). I dati sono espressi come la media ± SE di tre esperimenti indipendenti; OneWay ANOVA seguita da Tukey test; \*P < 0.05. ANPs = Adenine Nucleotides Pool. AEC = Adenylate Energy Charge.

#### **4.7. Disfunzionalità mitocondriale e stress ossidativo indotto dagli azoli nelle cellule TM4**

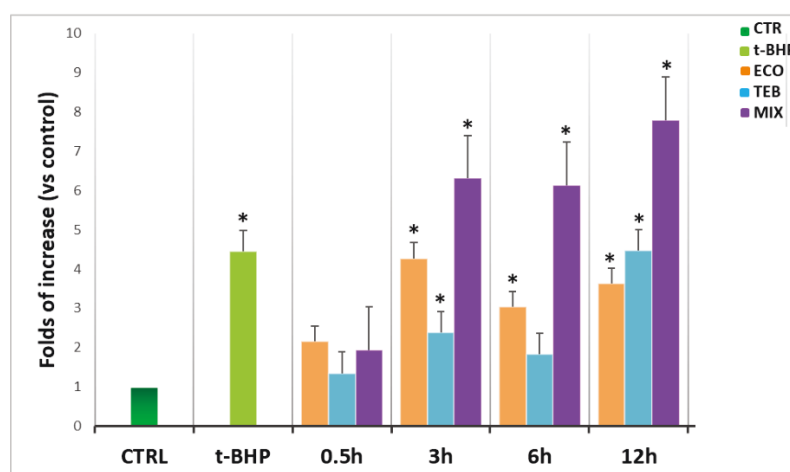
La diminuzione della disponibilità energetica fin qui descritta suggeriva la presenza di alterazioni a carico dei processi ossido-riduttivi e dei flussi ionici transmembrana che si realizzano nei mitocondri. Al fine di verificare tale ipotesi, la funzionalità mitocondriale è stata valutata mediante analisi del potenziale di membrana  $\Delta\Psi_m$ ; analisi preliminari dei profili citofluorimetrici delle cellule non trattate hanno evidenziato la presenza di due popolazioni cellulari distinte, caratterizzate una da  $\Delta\Psi_m$  alto ( $\Delta\Psi_m^{\text{high}}$ , fluorescenza rosso-arancio) e l'altra da  $\Delta\Psi_m$  basso ( $\Delta\Psi_m^{\text{Low}}$ , fluorescenza verde e rosso-arancio). Per il nostro studio, abbiamo eseguito esperimenti in time-course, estesi a partire dalle 3 fino alle 48 h, e sono state esaminate la percentuale di cellule con alto e basso  $\Delta\Psi_m$  e l'intensità media della fluorescenza rosso-arancio (MFI) emessa da ciascuna popolazione. Come riportato nella figura 18A, a tutti i tempi esaminati, la percentuale di cellule con  $\Delta\Psi_m^{\text{high}}$  è significativamente ridotta nei gruppi esposti agli azoli rispetto ai controlli, e l'effetto più forte è stato riscontrato per il trattamento con il MIX a 12 h, con una riduzione di oltre l'80%. TEB ed ECO, inoltre, inducevano i livelli massimi di decremento alle 12 h di trattamento, raggiungendo percentuali superiori al 40 e al 60%, rispettivamente. Questi pattern erano associati con aumenti significativi della percentuale di cellule con  $\Delta\Psi_m^{\text{Low}}$  (Fig. 18C). In questo contesto, TEB, ECO e MIX hanno mostrato la loro attività più intensa alle 48, 24 e 48 h, rispettivamente, raggiungendo ciascuno valori massimi superiori a 120, 190 e 370%. In sintesi, i composti azolici, singoli ed in combinazione, erano in grado di indurre nelle cellule TM4 diversi gradi di depolarizzazione della membrana mitocondriale, con una modalità tempo-dipendente. Tuttavia, le cellule trattate con azoli hanno anche mostrato un aumento progressivo di MFI nelle popolazioni con  $\Delta\Psi_m^{\text{high}}$  e  $\Delta\Psi_m^{\text{Low}}$ , rispetto ai controlli (Fig. 18B e D) suggerendo che i mitocondri intatti, ancora presenti in ogni popolazione, erano progressivamente andati incontro ad iperpolarizzazione. Quest'ultimo effetto era già stato osservato a 3 h per i trattamenti con ECO e MIX, mentre per i campioni esposti al TEB era visibile solo a 12 h. Inoltre, nei gruppi esposti per 48 h ad ECO e MIX questo effetto non era più riscontrabile, conseguenza, questa, dell'induzione di apoptosi. La Figura 18E mostra le variazioni percentuali e di MFI espresse dalle popolazioni cellulari di controllo ed esposte agli azoli, con  $\Delta\Psi_m^{\text{high}}$  e  $\Delta\Psi_m^{\text{Low}}$ . La Figura 18E (ii) rappresenta i campioni trattati con rotenone, usati come controllo positivo per l'abbattimento del  $\Delta\Psi_m$ .



**Fig. 18. Effetto dei fungicidi azolici sul potenziale di membrana mitocondriale ( $\Delta\Psi_m$ ) nelle cellule TM4.**

Il  $\Delta\Psi_m$  è stato misurato mediante marcatura con JC-1 (3  $\mu\text{M}$ ). La percentuale di cellule con  $\Delta\Psi_m^{\text{high}}$  (fluorescenza di JC-1 nel rosso, quadrante R) e  $\Delta\Psi_m^{\text{low}}$  (fluorescenza di JC-1 nel rosso/verde, quadrante RG) è stata analizzata mediante citometria a flusso (eccitazione 488 nm; emissione 525 nm). Effetto tempo-dipendente dei fungicidi azolici sul potenziale di membrana mitocondriale in cellule TM4 con (A) alto e (C) basso  $\Delta\Psi_m$ . MFI emesso dalle popolazioni con (B)  $\Delta\Psi_m^{\text{high}}$  e (D)  $\Delta\Psi_m^{\text{low}}$ . I dati di tre esperimenti indipendenti sono stati espressi come percentuale calcolata rispetto alla popolazione di controllo. OneWay ANOVA seguito dal Tukey test; \*  $P < 0,05$ . (E, i) Immagine rappresentativa di cellule di controllo ed esposte a TEB, ECO e MIX per 3 h. (E, ii) Cellule incubate in presenza di rotenone 25  $\mu\text{M}$ , utilizzato come controllo positivo per l'ablazione del  $\Delta\Psi_m$ . MFI = Intensità media di fluorescenza nel rosso. R = popolazione red. RG = popolazione red/green. ROT = rotenone.

Considerando, inoltre, lo stretto inter-play esistente tra funzionalità mitocondriale e ROS, le analisi successive sono state rivolte all'indagine dello stato redox cellulare nei campioni esposti e non agli azoli (time-course 0.5-12 h). I dati mostrati in figura 19 mostrano la presenza significativa di ROS a tutti i tempi investigati e in tutti i gruppi sperimentali esposti al trattamento con azoli. In particolare, i livelli maggiori di ROS erano registrati nei campioni esposti a MIX (3-6 h = ~ 3-fold-increase; 12 h = ~ 7-fold-increase).



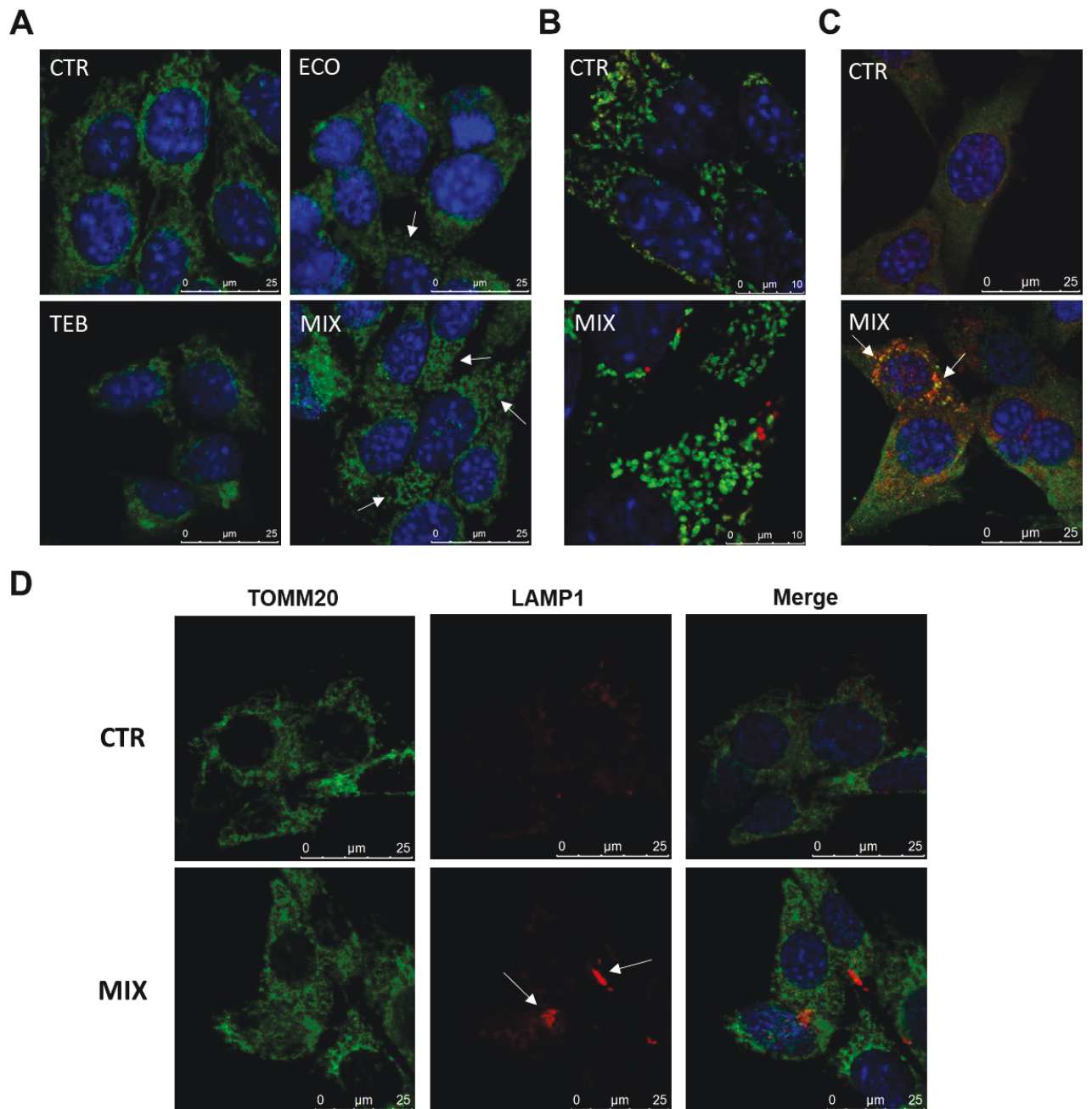
**Fig. 19. Il trattamento con gli azoli induce stress ossidativo nelle cellule TM4.**

Produzione di ROS nelle cellule TM4 trattate con TEB, ECO e MIX, ai tempi di trattamento indicati (t-BHP = Terz-Butyl-idroperoxide, 500  $\mu$ M, è stato utilizzato come controllo positivo per la produzione di ROS). I dati rappresentano la media  $\pm$  SE di tre esperimenti indipendenti. OneWay ANOVA seguito dal Tukey test; \* P < 0,05.

#### **4.8. La combinazione TEB/ECO induce frammentazione mitocondriale e variazioni nelle dinamiche lisosomiali**

I mitocondri esprimono una morfologia complessa e sono in grado di modificarla attraverso eventi di fissione e fusione. È noto che la perdita del  $\Delta\Psi_m$  può innescare frammentazione mitocondriale promuovendo il processo di fissione mitocondriale (Wai e Langer, 2016). Inoltre, è stato dimostrato un ruolo per AMPK nella regolazione dell'omeostasi mitocondriale, per quanto riguarda gli eventi di fissione e mitofagia (Herzig e Shaw, 2018). Nelle nostre condizioni sperimentali, a partire dalle 3 h, la combinazione TEB/ECO era in grado di indurre autofagia ed attivazione dell'asse AMPK/ULK1. La presenza di cellule con diversi pattern di depolarizzazione e iperpolarizzazione mitocondriale suggeriva la possibilità del verificarsi di eventi di frammentazione mitocondriale in seguito ad alterazioni del turnover di fissione (Twig et al., 2008). Al fine di verificare questa ipotesi, campioni di cellule esposte agli azoli per 3 h sono stati sottoposti ad analisi della morfologia mitocondriale eseguite in microscopia confocale. Come mostrato in figura 20 (pannello A), le cellule dei controlli ed esposte al TEB mostravano un'organizzazione del network mitocondriale essenzialmente caratterizzata da morfologia per lo più tubulare, mentre nello schema dei campioni esposti ad ECO e MIX, i mitocondri apparivano più corti e meno tubulati.

In particolare, le cellule trattate con la combinazione TEB/ECO, presentavano il più alto livello di danno, in quanto i mitocondri erano quasi totalmente frammentati e apparivano caratterizzati da numerose strutture “donut-like”. Poiché l'autofagia può portare alla degradazione selettiva dei mitocondri tramite i lisosomi, abbiamo indagato se gli incrementi di autofagia, riscontrati dopo trattamento con azoli, fossero correlati ad eventi di attivazione del processo di mitofagia. Esperimenti di colocalizzazione del marker mitocondriale TOMM20, con quello lisosomiale LAMP1 (Fig. 20D), o autofagosomiale LC3 (Fig. 20B), per la misura della mitofagia, non hanno evidenziato differenze significative tra i gruppi di controllo e quelli esposti agli azoli. Al contrario, le cellule esposte al MIX mostravano la presenza di cluster lisosomiali (Fig. 20, pannello D), suggerendo anche un possibile effetto degli azoli sulla dinamica lisosomiale.



**Fig. 20.** L'esposizione delle cellule TM4 al MIX induce perturbazioni delle dinamiche mitocondriali e lisosomiali.

Immagini acquisite in microscopia confocale dopo (A) marcatura singola (anticorpo anti-TOMM20) e doppia con anticorpi (B) anti-TOMM20 (verde)/anti-LC3 (rosso), (C) anti-LC3 (verde)/anti-LAMP1 (rosso), e (D) anti-TOMM20 (verde)/anti-LAMP1 (rosso), di cellule esposte agli azoli per 3 h di trattamento. Nel pannello A, è visibile un marcato livello di frammentazione mitocondriale ECO- e MIX-indotta. Nel pannello B, la doppia marcatura con il marker mitocondriale TOMM20 e quello lisosomiale LC3 non rileva colocalizzazione. Nel pannello C, le frecce indicano la colocalizzazione dei lisosomi con gli autofagosomi (LC3 "punta"). Nel pannello D, è visibile la presenza di clustering lisosomiale in cellule esposte a MIX (frecce), ma non viene rilevata alcuna colocalizzazione tra i markers mitocondriale (TOMM20) e lisosomiale (LAMP1). I nuclei sono stati marcati con DAPI.

Negli ultimi tempi si è sviluppata un'intensa attività di ricerca per quanto riguarda gli effetti diretti ed indiretti degli xenobiotici ambientali sugli esseri viventi. Uno dei principali target degli inquinanti ambientali è rappresentato dal sistema riproduttivo maschile (Gao et al., 2015; Rim, 2017). Recentemente, diversi studi hanno messo in luce l'importanza di indagare gli effetti combinatori dei tossici ambientali sulle funzioni riproduttive maschili poiché l'uomo è esposto continuamente a complessi cocktail di sostanze chimiche naturali e antropogeniche che possono agire in modo additivo, sinergico o antagonistico (Wong e Cheng, 2011; Moline et al., 2000; Hauser e Sokol, 2008).

Ad oggi, residui di triazoli e imidazoli sono spesso rilevati in diverse matrici ambientali (Kahle et al., 2008; Zhang et al., 2015) e sono state sollevate molte questioni sui loro possibili effetti negativi sulla salute. Sebbene molti di questi composti siano stati segnalati come potenziali interferenti endocrini, gli esatti meccanismi molecolari alla base dei loro effetti tossici sul sistema riproduttivo maschile non sono ancora del tutto chiari.

Il nostro interesse è stato incentrato alla valutazione dei possibili effetti degli azoli sulla vitalità e sulla crescita delle cellule del Sertoli TM4, correlando questi parametri con il metabolismo energetico e lo stato funzionale dei mitocondri.

Il presente studio dimostra l'azione sinergica della mixture di TEB (40  $\mu$ M)/ECO (20  $\mu$ M) nell'indurre arresto del ciclo cellulare ed apoptosi nelle cellule del Sertoli TM4 con effetti che differiscono, in termini di tempi ed intensità, da quelli dei singoli composti. Inoltre, la morte cellulare indotta dal MIX è preceduta da un tentativo di sopravvivenza espletato dal processo autofagico. Data l'esistenza di un'interazione dinamica tra autofagia, morte cellulare e bilancio energetico cellulare (Singh e Cuervo, 2011) è stata anche indagata la loro relazione funzionale. Il seguente studio rivela per i mitocondri un ruolo di bersaglio diretto della citotossicità azolica e dimostra la funzione centrale dell'asse AMPK/ULK1 nella regolazione delle dinamiche autofagiche e mitocondriali in condizioni di deplezione energetica; queste conclusioni si basano sulle seguenti osservazioni: 1) l'esposizione alla mixture TEB/ECO provoca una significativa riduzione del  $\Delta\Psi_m$  ed alterazioni dello stato redox cellulare; 2)

questi eventi sono associati a riduzioni dei livelli intracellulari di ATP e degli ANPs, e ad un significativo aumento del rapporto AMP/ATP; 3) lo squilibrio energetico, attiva l'asse AMPK/ULK1 e questa modulazione è seguita da frammentazione mitocondriale; 4) infine, prolungati stress mitocondriali ed energetici portano all'induzione della morte cellulare programmata (meccanismo riassunto in figura 21).

È noto che i mitocondri rappresentano il bersaglio principale dei tossici ambientali; in particolare, è stato dimostrato che il 35% delle molecole farmacologicamente rilevanti sono responsabili della tossicità mitocondriale (Meyer et al, 2013; 2017; 2018). L'ECO è un farmaco ampiamente utilizzato nelle dermatomicosi, sia localmente che per via orale e parenterale e, sebbene il suo utilizzo sia generalmente sicuro, è stato dimostrato che è in grado di indurre alterazioni dell'omeostasi dello ione  $Ca^{2+}$  e della sintesi proteica in vari tipi di cellule (Soboloff et al., 2002 a, b; Chien et al., 2008; Mathivanan et al., 2016). I nostri dati indicano chiaramente che ECO, TEB e la loro combinazione causano una sostenuta depolarizzazione dei mitocondri. Il MIX mostra il massimo effetto tossico, seguito in ordine di intensità da ECO e TEB. La riduzione dell'attività mitocondriale può essere dovuta alla localizzazione e all'accumulo dei due composti nella membrana mitocondriale. La generazione di interferenze nelle funzioni associate alla membrana comprometterebbe, di conseguenza, i processi di produzione di energia. I coefficienti di ripartizione ottanolo-acqua relativamente alti di TEB ( $\log P_{ow} = 3.7$ ; Jónsdóttir et al., 2016) ed ECO ( $\log P_{ow} = 4.8$ ; Chen e Weber, 2008) e l'alto contenuto lipidico delle membrane mitocondriali favorirebbero una facile permeazione ed accumulo di composti lipofili a livello delle membrane mitocondriali. Data la capacità dei fungicidi azolici di interagire direttamente con diversi enzimi della superfamiglia P450 e tenendo conto dell'esistenza del reticolo endoplasmatico associato ai mitocondri (Mitochondria-associated ER Membranes, MAM), la presenza di citocromo P450 nei mitocondri potrebbe anche generare metaboliti attivi in grado di indurre interferenza con le membrane e, quindi, disfunzioni sia a livello mitocondriale che del reticolo endoplasmatico (Meyer et al., 2013). A sostegno di questa ipotesi, è stato descritto come l'ECO sia in grado di alterare i livelli di  $Ca^{2+}$  presenti nel reticolo endoplasmatico e nelle membrane mitocondriali dei mastociti (Soboloff et al., 2002 b).

Le cellule esposte a MIX, oltre a presentare un ridotto  $\Delta\Psi_m$ , erano caratterizzate da livelli di deficit energetico più marcati rispetto a quelli evidenziati dall'azione dei singoli composti.

L'influenza sui diversi parametri energetici, rilevabile già dopo 3 h di incubazione e fino alle 48 h, includeva il contenuto di ATP e l'AEC. Quest'ultimo parametro è considerato un importante indice dello stato energetico della cellula, in quanto misura dei nucleotidi di adenina che si trovano sotto forma di fosfati ad alta energia (Atkinson, 1968). L'AEC riflette anche l'equilibrio tra i processi di produzione e di consumo di energia e viene solitamente considerato costante per valori compresi tra 0.80 e 0.95. Ciò implica che nella maggior parte delle cellule vitali il valore di ANPs è approssimativamente uguale alla concentrazione intracellulare di ATP. Nelle nostre condizioni sperimentali, il decremento di ATP osservato nelle cellule esposte a MIX era accompagnato da una variazione sostanziale di AEC; tuttavia, questo effetto si verificava nell'intervallo dei valori considerati fisiologici, suggerendo, quindi, che il deficit energetico non influiva sulla capacità cellulare di stabilizzare l'AEC. Secondo la speculazione formulata da Atkinson (1968), una riduzione dell'AEC implica una concomitante diminuzione delle concentrazioni intracellulari degli ANPs. In questo caso, il ripristino dell'AEC, entro limiti piuttosto ristretti, prevede che gli aumentati dei livelli di AMP, scaturiti dallo spostamento dell'equilibrio della reazione catalizzata dall'adenilato chinasi, vengano ridotti dall'azione di conversione dell'adenosina monofosfato in inosina da parte dell'AMP deaminasi. Se da un lato questo evento si traduce in un effetto stabilizzante in grado di tamponare i ridotti livelli di AEC, dall'altro rappresenta un costo aggiuntivo in termini di ulteriore perdita di ATP e riduzione dei livelli di ANPs. In linea con queste asserzioni, la riduzione di AEC causata dalla combinazione TEB/ECO, si stabilizza ad un valore compreso tra 0.8 e 0.85 e si verifica in parallelo alla diminuzione dei livelli di ATP e di ANPs, nonché all'aumento del contenuto di AMP. Lo stress cellulare indotto dal MIX si manifesta anche come incremento del rapporto AMP/ATP, quale ulteriore indicatore dello stato energetico, confermandone il deficit e suggerendo il possibile coinvolgimento dell'asse AMPK/ULK1 nella risposta mediata dagli azoli. Infatti, AMPK è notoriamente considerato un sensore energetico che svolge un ruolo fondamentale nella regolazione del metabolismo cellulare e nel preservare l'omeostasi energetica. I cambiamenti nel rapporto AMP/ATP promuovono l'attivazione di AMPK che agisce reindirizzando il metabolismo verso il catabolismo e riducendo i processi responsabili del consumo di energia. (Hardie, 2018).

Coerentemente con la nostra ipotesi, in risposta alla deplezione energetica indotta da MIX, AMPK risultava fosforilato nel residuo Thr172 già dalle prime ore di trattamento. Tuttavia, tenendo conto del fatto che l'esposizione all'ECO può anche indurre alterazioni dei flussi

ionici del  $\text{Ca}^{2+}$  (Zhang et al., 2006), non possiamo escludere la possibilità che l'aumento dei livelli di pAMPK indotto dagli azoli possa essere attribuito all'attivazione della chinasi  $\text{Ca}^{2+}$ /calmodulina dipendente, CAMKK2, indipendentemente dai livelli del pool di nucleotidi.

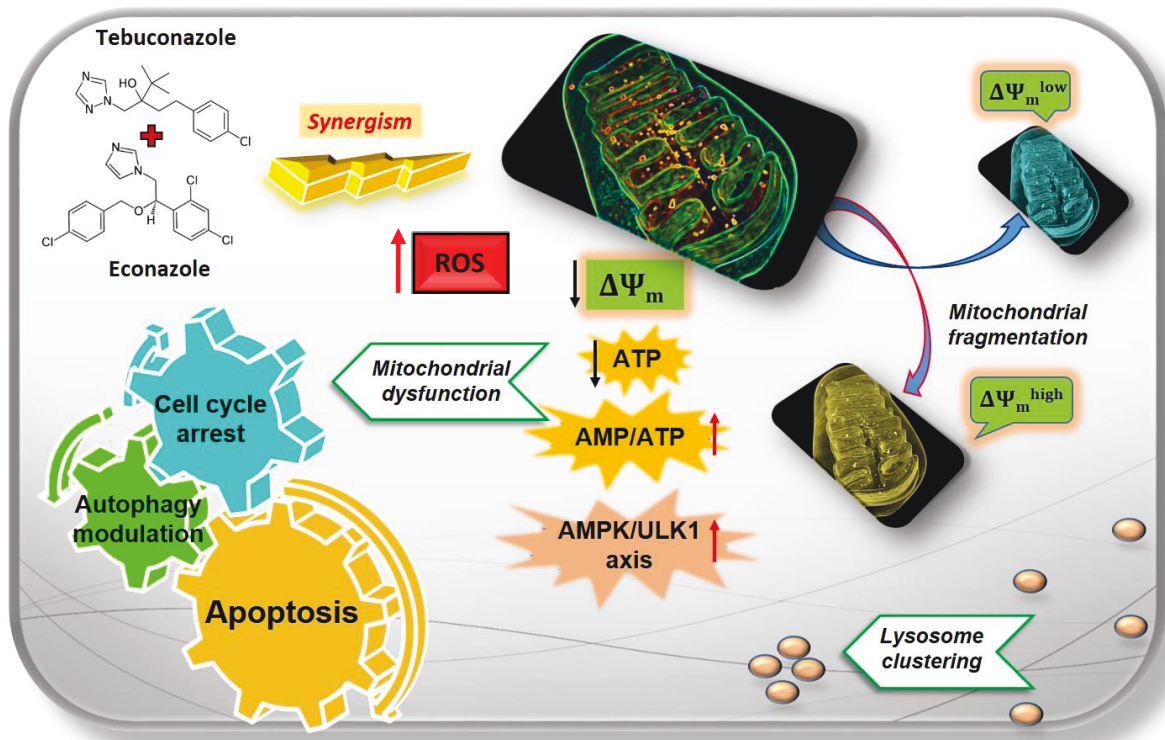
In condizioni di stress energetico, AMPK svolge un ruolo cruciale nella regolazione delle pathway autofagica e mitocondriale attraverso l'attivazione di ULK1 (Egan et al., 2011; Kim et al., 2011; Toyama et al., 2016; Herzig e Shaw, 2018). A questo proposito, sono stati identificati diversi siti di fosforilazione di ULK1 tra cui la Ser555 (Egan D.F. et al., 2011). In accordo con questi risultati, è emerso che l'attivazione di AMPK indotta da MIX si verifica in parallelo all'incremento della forma fosforilata di ULK1 sulla Ser555, e questo evento è seguito da aumenti dei livelli di autofagia. Nelle cellule del Sertoli l'autofagia viene espressa in maniera costitutiva, con un ruolo nella comunicazione intercellulare e nella clearance di SHBG (Sex Hormone-binding Globulin) /ABP (Androgen-binding Protein) (Ma et al., 2015; Liu et al., 2016). Nel meccanismo di risposta allo stress, l'autofagia è definita "*double-edged sword*", poiché può costituire un processo cellulare di rimozione selettiva di componenti citoplasmatici danneggiati, con il fine di mantenere la vitalità o può contribuire al perseguimento della via che induce morte cellulare (Liu et al., 2016; Das et al., 2018). Nel presente studio possiamo definire che l'autofagia MIX-indotta non costituisce un meccanismo di morte, ma assume una funzione citoprotettiva, e quindi adattiva, poiché la sua inibizione farmacologica, mediante bafilomicina A1, conduceva ad aumenti nei livelli di apoptosi. Come precedentemente descritto, l'autofagia indotta da MIX era seguita da attivazione ed induzione di apoptosi; questo risultato è in linea con dati descritti in letteratura riguardanti la possibilità, per le cellule del Sertoli, di attivare l'autofagia e l'apoptosi dopo esposizione a composti tossici o in condizioni di ipossia (Ma et al., 2015; Duan et al., 2016), nonostante siano anche noti fenomeni di resistenza in risposta allo stress (Aslani et al., 2017). Inoltre, i due processi possono escludersi vicendevolmente ed attivarsi in sequenza (Mariño et al., 2014). Alla luce di queste considerazioni, l'aumento dell'autofagia MIX-indotta, registrato fino alle 12 h, rifletterebbe la tendenza cellulare ad adattarsi allo stress al fine di preservare l'omeostasi. Alle 24 h, invece, quando il grado dell'insulto chimico supererebbe una certa soglia di magnitudo, l'autofagia verrebbe disattivata (24 h) in favore di un'attivazione della via apoptotica. Al contrario, i segnali di stress generati dai singoli trattamenti con TEB ed ECO, risultavano essere caratterizzati da un'intensità minore, poichè effetti citostatici (TEB) e citotossici (ECO), venivano osservati solo alle 48 h e non erano

preceduti da alcuna modulazione autofagica significativa. L'azione citotossica sinergica svolta dai due composti in combinazione era anche confermata dalla rapida comparsa (3 h) di frammentazione mitocondriale e modifiche nella dinamica lisosomiale. Il fenomeno di rilocalizzazione e clustering lisosomiale riscontrato potrebbe essere utile al mantenimento dell'omeostasi cellulare, nonché promuovere nuove relazioni vescicolari tra i vari organelli (Ba et al., 2017). Questi risultati confermano lo stretto legame esistente tra distribuzione spaziale dei lisosomi ed up-regolazione dell'autofagia (Pu et al., 2016), mettendo in luce l'importanza del cross-talk tra il sistema mitocondriale e quello lisosomiale. A tal riguardo, è stato recentemente dimostrato come lo stress mitocondriale può condurre ad un aumento della biogenesi lisosomiale in modo AMPK dipendente (Fernández-Mosquera et al. 2017; Diogo et al., 2018). Al fine di mantenere l'omeostasi energetica della cellula, aumenti dell'autofagia e cambiamenti nella dinamica mitocondriale coopererebbero per la rimozione selettiva dei mitocondri danneggiati. Tuttavia, le nostre analisi non hanno mostrato induzione di mitofagia nelle cellule esposte a MIX, confermando l'idea che la frammentazione di per sé non è sufficiente ad innescare la rimozione dei mitocondri danneggiati (Gomes e Scorrano, 2013). L'assenza di mitofagia potrebbe anche essere causata da alcuni deficit in uno o più passaggi del percorso di degradazione operato nei lisosomi, che potrebbe condurre ad un'alterata fusione tra lisosomi ed autofagosomi. A sostegno di questa ipotesi è stato riportato che la compromissione mitocondriale può portare ad un malfunzionamento anche del sistema lisosomiale (Demers-Lamarche et al., 2016). Uno scenario diverso si presentava nelle cellule trattate con i singoli composti TEB ed ECO, poiché non sono stati rilevati cambiamenti nella dinamica dei lisosomi rispetto alle cellule di controllo. Inoltre, il livello di frammentazione mitocondriale era meno pronunciato nei campioni trattati con ECO, mentre tale fenomenologia risultava perlopiù assente nei campioni esposti a TEB.

I nostri risultati forniscono ulteriori informazioni anche sulla relazione tra  $\Delta\Psi_m$  e network mitocondriale. Molti studi, infatti, riportano l'implicazione del  $\Delta\Psi_m$  nel controllo della dinamica mitocondriale e nell'insorgere di mitofagia. (Benard et al., 2007; Gomes e Scorrano, 2013;). Sebbene sia noto che bassi livelli di  $\Delta\Psi_m$  possano indurre mitofagia (Narendra et al., 2008; Sandoval et al., 2008), esistono dati contrastanti sulla relazione tra  $\Delta\Psi_m$  e l'organizzazione del network mitocondriale, in quanto la frammentazione può verificarsi in casi in cui il  $\Delta\Psi_m$  sia assente, oppure sia aumentato o ridotto. Nel nostro studio, i diversi

gradi di depolarizzazione indotti dagli azoli, da soli o in combinazione, risultavano associati ad effetti diversi sulla frammentazione mitocondriale. Questo aspetto potrebbe essere chiarito tenendo in considerazione i risultati correlati al parametro MFI. Infatti, specialmente nei campioni trattati con ECO e MIX, la perdita di  $\Delta\Psi_m$ , definita dalla diminuzione e dall'aumento della percentuale di cellule che possedevano  $\Delta\Psi_m^{\text{high}}$  e  $\Delta\Psi_m^{\text{low}}$ , rispettivamente, è stata anche associata ad un progressivo aumento della MFI suggerendo, quindi, la presenza di mitocondri iperpolarizzati ed il realizzarsi di eventi di fissione. Infatti, come descritto da Twig e colleghi (Twig et al., 2008), la fissione mitocondriale dà origine ad unità figlie con differenti  $\Delta\Psi_m$ : una mostrerà  $\Delta\Psi_m^{\text{high}}$  e l'altra  $\Delta\Psi_m^{\text{low}}$ .

I macchinari mitocondriali svolgono anche un ruolo critico nella regolazione del ciclo cellulare (Horbay e Bilyy, 2016) e nella produzione di ROS; le riduzioni indotte dagli azoli della concentrazione intracellulare di ATP e del  $\Delta\Psi_m$ , associate ad eventi di frammentazione mitocondriale, potrebbero essere correlate con l'arresto delle cellule nella fase G1 e con l'alterazione dello stato redox. Infine, il mantenimento della carica energetica, nei campioni esposti ad ECO e MIX, potrebbe avere un ruolo centrale nella decisione di condurre le cellule verso un destino apoptotico piuttosto che verso la necrosi; a riguardo, infatti, è noto che il macchinario apoptotico sia caratterizzato da un'elevata richiesta energetica (Eguchi et al., 1997).



**Fig. 21. Modello proposto per il meccanismo di interazione sinergica di TEB ed ECO in cellule TM4.** Interazione sinergica di TEB ed ECO nel mediare disfunzione e frammentazione mitocondriale. Questi eventi sono associati a stress energetico ed ossidativo, con il coinvolgimento dell'attivazione dell'asse AMPK/ULK1, arresto del ciclo cellulare ed attivazione sequenziale dell'autofagia, con funzione citoprotettiva, ed apoptosi.

Riassumendo, il nostro studio definisce il mitocondrio come principale target dell'azione dei composti azolici; in particolare, la disfunzione a livello mitocondriale conduce allo sviluppo di una condizione di stress ossidativo, seguita parallelamente da deficit energetico, arresto del ciclo cellulare, modulazione dell'autofagia e, infine, attivazione di apoptosi. Inoltre, questo studio rivela come AMPK assurga a ruolo di mediatore centrale della risposta cellulare allo stress energetico e mitocondriale, coordinando molteplici caratteristiche relative sia all'autofagia che alla biologia mitocondriale, in termini funzionali e morfologici, non escludendo implicazioni in movimenti nelle dinamiche lisosomiali.

Tenendo conto che le cellule del Sertoli sono essenziali sia per il mantenimento della barriera emato-testicolare che per la distribuzione di nutrienti alle cellule germinali, qualsiasi alterazione della loro capacità di controllo su questa complessa interazione metabolica può comportare una compromissione della spermatogenesi, avendo, quindi, risvolti negativi sulla riproduzione maschile. Pur tenendo conto del fatto che i risultati ottenuti *in vitro* non possano essere tradotti in dirette postulazioni *in vivo*, dobbiamo prendere in considerazione che le concentrazioni di TEB ed ECO utilizzate nel nostro studio sono rilevanti per quanto riguarda l'esposizione cutanea e clinica dei due azoli, rispettivamente (Fustinoni et al., 2014; Mathivanan S. et al., 2016). In conclusione, considerando da un lato l'ampio uso a livello mondiale dei composti azolici nel campo dell'agricoltura e dell'industria e dall'altro il ruolo chiave svolto dalle cellule del Sertoli come sistema di sostegno al processo di spermatogenesi, possiamo ipotizzare per questi composti un ruolo causale nell'insorgenza di condizioni di tossicità a livello riproduttivo. Ulteriori studi saranno, dunque, necessari per approfondire gli effetti ed i meccanismi molecolari implicati nella tossicità mediata dai composti azolici sul sistema riproduttivo maschile.

Il presente studio di Tesi è stato oggetto di pubblicazione sulla rivista internazionale *Toxicological Sciences* (Editor: Oxford University Press):

**S. Petricca**, G. Celenza, V. Flati, J. Di Gregorio, A.R. Lizzi, C. Luzi, L. Cristiano, B. Cinque, G. Rossi, C. Festuccia, R. Iorio. Tebuconazole and Econazole act synergistically in mediating mitochondrial stress, energy imbalance, and sequential activation of autophagy and apoptosis in mouse Sertoli TM4 cells: possible role of AMPK/ULK1 axis. *Toxicol. Sci.* 2019 May 1;169(1):209-223.

---

## 7.

## Bibliografia

---

Andersson, A.M., Jorgensen, N., Main, K.M., Toppari, J., Rajpert-De Meyts, E., Leffers, H., et al., 2008. Adverse trends in male reproductive health: we may have reached a crucial 'tipping point', *Int. J. Androl.* 74–80.

APAT, 2004. Gli habitat secondo la nomenclatura EUNIS: manuale di classificazione per la realtà italiana. *Rapporti*, 39/2004.

Aslani, F., Sebastian, T., Keidel, M., Fröhlich, S., Elsässer, H.P., Schuppe, H.C., Klug, J., Mahavadi, P., Fijak, M., Bergmann, M., Meinhardt, A., Bhushan, S., 2017. Resistance to apoptosis and autophagy leads to enhanced survival in Sertoli cells. *Mol Hum Reprod.* 23(6):370-380. doi: 10.1093/molehr/gax022.

Assress HA, Nyoni H, Mamba BB, Msagati TAM. Occurrence and risk assessment of azole antifungal drugs in water and wastewater. *Ecotoxicol Environ Saf.*, 2020 Jan 15;187:109868. doi: 10.1016/j.ecoenv.2019.109868. Epub 2019 Nov 2.

Atkinson, D.E., 1968. The energy charge of the adenylate pool as a regulatory parameter. Interaction with feedback modifiers. *Biochemistry.* 7(11):4030-4.

Atmaca, N., Arikan, S., Essiz, D., Kalender, H., Simsek, O., Bilmen, F.S., Kabakci, R., 2018. Effects of mancozeb, metalaxyl and tebuconazole on steroid production by bovine luteal cells in vitro. *Environ Toxicol Pharmacol.* 59:114-118. doi: 10.1016/j.etap.2018.03.009.

Ba, Q., Raghavan, G., Kiselyov, K., Yang, G., 2018. Whole-Cell Scale Dynamic Organization of Lysosomes Revealed by Spatial Statistical Analysis. *Cell Rep.* 23(12):3591-3606. doi: 10.1016/j.celrep.2018.05.079.

Benard, G., Bellance, N., James, D., Parrone, P., Fernandez, H., Letellier, T., Rossignol, R., 2007. Mitochondrial bioenergetics and structural network organization. *J Cell Sci.* 120(Pt 5):838-48.

Bento, C. F. et al., 2016. Mammalian autophagy: how does it work? *Annu. Rev. Biochem.* 85, 685–713.

Bretveld, R., Brouwers, M., Ebisch, I., Roeleveld, N., 2007. Influence of pesticides on male fertility. *Scand J Work Environ Health.* 33(1):13-28.

Buck, M. D. et al., 2016. Mitochondrial dynamics controls T cell fate through metabolic programming. *Cell* 166, 63–76.

Castelli, M.V., Butassi, E., Monteiro, M.C., Svetaz, L.A., Vicente, F., Zacchino, S.A., 2014. Novel antifungal agents: a patent review (2011 - present). *Expert Opin Ther Pat.* 24(3):323-38. doi: 10.1517/13543776.2014.876993.

Castiglioni, S., et al., 2018. Data on occurrence and fate of emerging contaminants in a urbanised area. *Data Brief* 17, 533–543.

Celenza, G., Segatore, B., Setacci, D., Bellio, P., Brisdelli, F., Piovano, M., Garbarino, J.A., Nicoletti, M., Perilli, M., Amicosante, G., 2012. In vitro antimicrobial activity of pannarin alone and in combination with antibiotics against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clinical isolates. *Phytomedicine.* 19(7):596-602. doi: 10.1016/j.phymed.2012.02.010.

Chan, D. C., 2012. Fusion and fission: interlinked processes critical for mitochondrial health. *Annu. Rev. Genet.* 46, 265–287.

- Chan, E. Y. W., Kir, S. & Tooze, S. A., 2007. siRNA screening of the kinome identifies ULK1 as a multidomain modulator of autophagy. *J. Biol. Chem.* 282, 25464–25474.
- Chen, Y., Zhou, Y., Wang, X., Qian, W., Han, X., 2013. Microcystin-LR induces autophagy and apoptosis in rat Sertoli cells in vitro. *Toxicol.* 76:84-93. doi: 10.1016/j.toxicol.2013.09.005.
- Chen, Z., Weber, S.G., 2008. Determination of binding constants by affinity capillary electrophoresis, electrospray ionization mass spectrometry and phase-distribution methods. *Trends Analyt Chem.* 27(9):738-748.
- Chen, Z.F., et al., 2012. Determination of biocides in different environmental matrices by use of ultra-high-performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *Anal. Bioanal. Chem.* 404 (10), 3175–3188.
- Chen, Z.F., et al., 2014. Triclosan as a surrogate for household biocides: an investigation into biocides in aquatic environments of a highly urbanized region. *Water Res.* 58, 269–279.
- Chen, Z.F., Ying, G.G., 2015. Occurrence, fate and ecological risk of five typical azole fungicides as therapeutic and personal care products in the environment: A review. *Environ Int.* 84:142-53. doi: 10.1016/j.envint.2015.07.022.
- Chien, J.M., Huang, C.C., Cheng, H.H., Lin, K.L., Chen, W.C., Tseng, P.L., Chou, C.T., Tsai, J.Y., Liao, W.C., Wang, B.W., Chang, P.M., Jan, C.R., 2008. Econazole-evoked [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> rise and non-Ca<sup>2+</sup>-triggered cell death in rabbit corneal epithelial cells (SIRC). *J Recept Signal Transduct Res.* 28(6):567-79. doi: 10.1080/10799890802517613.
- Chitescu, C.L., et al., 2012. Accurate mass screening of pharmaceuticals and fungicides in water by U-HPLC–Exactive Orbitrap MS. *Anal. Bioanal. Chem.* 403 (10), 2997–3011.
- Choi, M.S., Park, H.J., Oh, J.H., Lee, E.H., Park, S.M., Yoon, S., 2014. Nonylphenol-induced apoptotic cell death in mouse TM4 Sertoli cells via the generation of reactive oxygen species and activation of the ERK signaling pathway. *J Appl Toxicol.* 34(6):628-36. doi: 10.1002/jat.2886.
- Chou, T.C., Talalay, P., 1984. Quantitative analysis of dose-effect relationships: the combined effects of multiple drugs or enzyme inhibitors. *Adv Enzyme Regul.* 22:27-55.
- Christen, V., Crettaz, P., Fent, K., 2014. Additive and synergistic antiandrogenic activities of mixtures of azol fungicides and vinclozolin. *Toxicol Appl Pharmacol.* 279(3):455-66. doi: 10.1016/j.taap.2014.06.025.
- Das, C.K., Mandal, M., Kögel, D., 2018. Pro-survival autophagy and cancer cell resistance to therapy. *Cancer Metastasis Rev.* doi: 10.1007/s10555-018-9727-z.
- Demers-Lamarche, J., Guillebaud, G., Tlili, M., Todkar, K., Bélanger, N., Grondin, M., Nguyen, A.P., Michel, J., Germain, M., 2016. Loss of Mitochondrial Function Impairs Lysosomes. *J Biol Chem.* 291(19):10263-76. doi: 10.1074/jbc.M115.695825.
- Diogo, C.V., Yambire, K.F., Fernández Mosquera, L., Branco, F.T., Raimundo, N., 2018. Mitochondrial adventures at the organelle society. *Biochem Biophys Res Commun.* 500(1):87-93. doi: 10.1016/j.bbrc.2017.04.124.
- Dreisig, K., Taxvig, C., Birkhøj Kjærstad, M., Nellemann, C., Hass, U., Vinggaard, A.M., 2013. Predictive value of cell assays for developmental toxicity and embryotoxicity of conazole fungicides. *ALTEX.* 30(3):319-30.
- Duan, P., Hu, C., Quan, C., Yu, T., Zhou, W., Yuan, M., Shi, Y., Yang, K., 2016. 4-Nonylphenol induces apoptosis, autophagy and necrosis in Sertoli cells: Involvement of ROS-mediated AMPK/AKT-mTOR and JNK pathways. *Toxicology.* 341-343:28-40. doi: 10.1016/j.tox.2016.01.004.
- EFSA (European Food Safety Authority), 2009. Scientific opinion on risk assessment for a selected group of pesticides from the triazole group to test possible methodologies to assess cumulative effects from exposure through food from these pesticides on human health. *EFSA J.* 7, 1167.

EFSA, 2011. Conclusion on the peer review of the pesticide risk assessment of the active substance prochloraz. EFSA J.

EFSA (European Food Safety Authority), 2017. The 2015 European Union report on pesticide residues in food. EFSA Journal 2017;15(4):4791, 134 pp.doi:10.2903/j.efsa.2017.4791.

Egan, D.F., Shackelford, D.B., Mihaylova, M.M., Gelino, S., Kohnz, R.A., Mair, W., Vasquez, D.S., Joshi, A., Gwinn, D.M., Taylor, R., Asara, J.M., Fitzpatrick, J., Dillin, A., Violette, B., Kundu, M., Hansen, M., Shaw, R.J., 2011. Phosphorylation of ULK1 (hATG1) by AMP-activated protein kinase connects energy sensing to mitophagy. Science. 331(6016):456-61. doi: 10.1126/science.1196371.

Egan, D. F. et al., 2015. Small molecule inhibition of the autophagy kinase ULK1 and identification of ULK1 substrates. Mol. Cell 59, 285–297.

Eguchi, Y., Shimizu, S., Tsujimoto, Y., 1997. Intracellular ATP levels determine cell death fate by apoptosis or necrosis. Cancer Res. 57(10):1835-40.

European Commission, 2007. The Use of Plant Protection Products in the European Union. Eurostat Statistical Books.

European Commission, Directorate-General for Health and Food Safety, 2016. Final Review report for the active substanceswubstance tricyclazole. SANTE/11866/2015.

European Union, 2016. Screening of available evidence on chemical substances for the identification of endocrine disruptors according to different options in the context of an Impact Assessment Specific Contract SANTE/2015/E3/SI2.706218 - Final report. [http://ec.europa.eu/health/sites/health/files/endocrine\\_disruptors/docs/2016\\_impact\\_assessment\\_study\\_en.pdf](http://ec.europa.eu/health/sites/health/files/endocrine_disruptors/docs/2016_impact_assessment_study_en.pdf)

Fa, S., Pogrmic-Majkic, K., Dakic, V., Kaisarevic, S., Hrubik, J., Andric, N., Stojilkovic, S.S., Kovacevic, R., 2013. Acute effects of hexabromocyclododecane on Leydig cell cyclic nucleotide signaling and steroidogenesis in vitro. Toxicol Lett. 218(1):81-90. doi: 10.1016/j.toxlet.2013.01.009.

FAO, 2009. Specifications and evaluations for agricultural pesticides: Alpha-Cypermethrin. [http://www.fao.org/fileadmin/templates/agphome/documents/Pests\\_Pesticides](http://www.fao.org/fileadmin/templates/agphome/documents/Pests_Pesticides).

Fenik, J., Tankiewicz, M., Biziuk, M., Properties and determination of pesticides in fruits and vegetables Trac Trends Anal. Chem., 30 (6) (2011), pp. 814-826

Fernández-Mosquera, L., Diogo, C.V., Yambire, KF., Santos, G.L., Luna Sánchez, M., Bénit, P., Rustin, P., Lopez, L.C., Milosevic, I., Raimundo, N., 2017. Acute and chronic mitochondrial respiratory chain deficiency differentially regulate lysosomal biogenesis. Sci Rep. 7:45076. doi: 10.1038/srep45076.

Fustinoni, S., Mercadante, R., Polledri, E., Rubino, F.M., Mandic-Rajcevic, S., Vianello, G., Colosio, C., Moretto, A., 2014. Biological monitoring of exposure to tebuconazole in winegrowers. J Expo Sci Environ Epidemiol. 24(6):643-9. doi: 10.1038/jes.2014.14.

Gao, Y., Mruk, D.D., Cheng, C.Y., 2015. Sertoli cells are the target of environmental toxicants in the testis – a mechanistic and therapeutic insight. Expert Opin Ther Targets. 19(8): 1073–1090. doi:10.1517/14728222.2015.1039513.

Gomes, L.C., Scorrano, L., 2013. Mitochondrial morphology in mitophagy and macroautophagy. Biochim Biophys Acta. 1833(1):205-12.

Gomes, L. C., Di Benedetto, G. & Scorrano, L., 2011. During autophagy mitochondria elongate, are spared from degradation and sustain cell viability. Nat. Cell Biol. 13, 589–598.

- Greco, W.R., Park, H.S., Rustum, Y.M., 1990. Application of a new approach for the quantitation of drug synergism to the combination of cis-diamminedichloroplatinum and 1-beta-D-arabinofuranosylcytosine. *Cancer Res.* 50(17):5318-27.
- Gwinn, D. M. et al. 2008 AMPK phosphorylation of raptor mediates a metabolic checkpoint. *Mol. Cell* 30, 214–226.
- Hardie, D.G., 2011. AMPK and autophagy get connected. *EMBO J.* 30(4):634-5. doi: 10.1038/emboj.2011.12. Erratum in: *EMBO J.* 2011;30(12):2511.
- Hardie, D.G., 2018. Keeping the home fires burning: AMP-activated protein kinase. *J R Soc Interface.* 15(138). pii: 20170774. doi: 10.1098/rsif.2017.0774.
- Hauser, R., Sokol, R., 2008. Science linking environmental contaminant exposures with fertility and reproductive health impacts in the adult male. *Fertil Steril.* 89:e59–65.
- Heo, J.-M., Ordureau, A., Paulo, J. A., Rinehart, J. & Harper, J. W., 2015. The PINK1-PARKIN mitochondrial ubiquitylation pathway drives a program of OPTN/ NDP52 recruitment and TBK1 activation to promote mitophagy. *Mol. Cell* 60, 7–20.
- Herzig, S., Shaw, R.J., 2018. AMPK: guardian of metabolism and mitochondrial homeostasis. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 19(2):121-135. doi: 10.1038/nrm.2017.95.
- Horbay, R., Bilyy, R., 2016. Mitochondrial dynamics during cell cycling. *Apoptosis.* 21(12):1327-1335.
- Høyer-Hansen, M. et al., 2007. Control of macroautophagy by calcium, calmodulin-dependent kinase kinase-beta, and Bcl-2. *Mol. Cell* 25, 193–205.
- Iorio, R., Castellucci, A., Rossi, G., Cinque, B., Cifone, M.G., Macchiarelli, G., Cecconi, S., 2015. Mancozeb affects mitochondrial activity, redox status and ATP production in mouse granulosa cells. *Toxicol In Vitro.* 30(1 Pt B):438-45. doi: 10.1016/j.tiv.2015.09.018.
- ISPRA, 2011. Definizione delle liste di priorità per i fitofarmaci nella progettazione del monitoraggio delle acque di cui al D.Lgs 152/2006 e s.m.i. Manuali e linee guida, 71/2011. ISBN: 978-88-448-0507-4.
- Jacobsen, P.R., Axelstad, M., Boberg, J., Isling, L.K., Christiansen, S., Mandrup, K.R., Berthelsen, L.O., Vinggaard, A.M., Hass, U., 2012. Persistent developmental toxicity in rat offspring after low dose exposure to a mixture of endocrine disrupting pesticides. *Reprod Toxicol.* 34(2):237-50. doi: 10.1016/j.reprotox.2012.05.099.
- Jónsdóttir, S.Ó., Reffstrup, T.K., Petersen, A., Nielsen, E., 2016. Physiologically Based Toxicokinetic Models of Tebuconazole and Application in Human Risk Assessment. *Chem Res Toxicol.* 29(5):715-34. doi: 10.1021/acs.chemrestox.5b00341.
- Joo, J. H. et al., 2011. Hsp90-Cdc37 chaperone complex regulates Ulk1- and Atg13-mediated mitophagy. *Mol. Cell* 43, 572–585.
- Joo, J. H. et al., 2016. The noncanonical role of ULK/ATG1 in ER-to-Golgi trafficking is essential for cellular homeostasis. *Mol. Cell* 62, 491–506.
- Jørgensen, N., Joensen, U.N., Jensen, T.K., Jensen, M.B., Almstrup, K., Olesen, I.A., Juul, A., Andersson, A.M., Carlsen, E., Petersen, J.H., Toppari, J., Skakkebaek, N.E., 2012. Human semen quality in the new millennium: a prospective cross-sectional population-based study of 4867 men. *BMJ Open.* 2(4). pii: e000990. doi: 10.1136/bmjopen-2012-000990.
- Joshi, S.C., Gulati, N., Sharma, B., Sharma, P., 2016. Effects of Tebuconazole (A fungicide) on Reproduction of Male Rat. *Int J Pharma Res Health Sci.* 4 (6): 1489-1494.

- Juberg, D.R., Mudra, D.R., Hazelton, G.A., Parkinson, A., 2006. The effect of fenbuconazole on cell proliferation and enzyme induction in the liver of female CD1 mice. *Toxicol Appl Pharmacol.* 214(July (2)):178–87.
- Jurewicz, J., Hanke, W., 2011. Exposure to phthalates: reproductive outcome and children health. A review of epidemiological studies. *Int J Occup Med Environ Health.* 24(2):115-41. doi: 10.2478/s13382-011-0022-2.
- Kahle, M., Buerge, I.J., Hauser, A., Müller, M.D., Poiger, T., 2008. Azole fungicides: occurrence and fate in wastewater and surface waters. *Environ Sci Technol.* 42(19):7193-200.
- Kim, J., Kundu, M., Viollet, B., Guan, K.L., 2011. AMPK and mTOR regulate autophagy through direct phosphorylation of Ulk1. *Nat Cell Biol.* 13(2):132-41. doi: 10.1038/ncb2152.
- Kjærstad, M.B., Taxvig, C., Nellemann, C., Vinggaard, A.M., Andersen, H.R., 2010. Endocrine disrupting effects in vitro of conazole antifungals used as pesticides and pharmaceuticals. *Reprod Toxicol.* 30(4):573-82. doi: 10.1016/j.reprotox.2010.07.009.
- Klionsky, D. J., et al., 2012. Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy. *Autophagy* 8, 445–544.
- Lass-Flörl, C., 2011. Triazole antifungal agents in invasive fungal infections: a comparative review. *Drugs.* 71(18):2405-19. doi: 10.2165/11596540-000000000-00000.
- Lazarou, M. et al., 2015. The ubiquitin kinase PINK1 recruits autophagy receptors to induce mitophagy. *Nature* 524, 309–314.
- Li, N., Mruk, D.D., Lee, W.M., Wong, C.K., Cheng, C.Y., 2016. Is toxicant-induced Sertoli cell injury in vitro a useful model to study molecular mechanisms in spermatogenesis? *Semin Cell Dev Biol.* 59:141-156. doi: 10.1016/j.semcdb.2016.01.003.
- Li, Y.B., Dong, F.S., Liu, X.G., Xu, J., Han, Y.T., Zheng, Y.Q., 2014. Chiral fungicide triadimefon and triadimenol: Stereoselective transformation in greenhouse crops and soil, and toxicity to *Daphnia magna*. *J Hazard Mater.* 265:115-123.
- Lindberg, R.H., et al., 2014. Occurrence and behaviour of 105 active pharmaceutical ingredients in sewage waters of a municipal sewer collection system. *Water Res.* 58, 221–229.
- Liu, C., Wang, H., Shang, Y., Liu, W., Song, Z., Zhao, H., Wang, L., Jia, P., Gao, F., Xu, Z., Yang, L., Gao, F., Li, W., 2016. Autophagy is required for ectoplasmic specialization assembly in sertoli cells. *Autophagy.* 12(5):814-32. doi: 10.1080/15548627.2016.1159377.
- Liu, J., Fan, L., Wang, H., Sun, G., 2016. Autophagy, a double-edged sword in anti-angiogenesis therapy. *Med Oncol.* 33(1):10. doi: 10.1007/s12032-015-0721-9.
- Lv, X., Pan, L., Wang, J., Lu, L., Yan, W., Zhu, Y., Xu, Y., Guo, M., Zhuang, S., 2017. Effects of triazole fungicides on androgenic disruption and CYP3A4 enzyme activity. *Environ Pollut.* 222:504-512. doi: 10.1016/j.envpol.2016.11.051.
- Ma, Y., Yang, H.Z., Xu, L.M., Huang, Y.R., Dai, H.L., Kang, X.N., 2015. Testosterone regulates the autophagic clearance of androgen binding protein in rat Sertoli cells. *Sci Rep.* 5:8894. doi: 10.1038/srep08894.
- Mariño, G., Niso-Santano, M., Baehrecke, E.H., Kroemer, G., 2014. Self-consumption: the interplay of autophagy and apoptosis. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 15(2):81-94. doi: 10.1038/nrm3735.
- Mason, J.I., Carr, B.R., Murry, B.A., 1987. Imidazole antimycotics: selective inhibitors of steroid aromatization and progesterone hydroxylation. *Steroids* 50(July (1–3)):179–89.

- Mathivanan, S., de la Torre-Martinez, R., Wolf, C., Mangano, G., Polenzani, L., Milanese, C., Ferrer-Montiel, A., 2016. Effect of econazole and benzydamine on sensory neurons in culture. *J Physiol Pharmacol.* 67(6):851-858.
- Mehrpour, O., Karrari, P., Zamani, N., Tsatsakis, A.M., Abdollahi, M., 2014. Occupational exposure to pesticides and consequences on male semen and fertility: a review. *Toxicol Lett.* 230(2):146-56. doi: 10.1016/j.toxlet.2014.01.029.
- Meletiadiis, J., Verweij, P.E., TeDorsthorst, D.T., Meis, J.F., Mouton, J.W., 2005. Assessing in vitro combinations of antifungal drugs against yeasts and filamentous fungi: comparison of different drug interaction models. *Med Mycol.* 43(2):133-52.
- Meley, D. et al., 2006. AMP-activated protein kinase and the regulation of autophagic proteolysis. *J. Biol. Chem.* 281, 34870–34879.
- Mesnager R., Defarge N., Spiroux de Vendômois J., Séralini G.E., 2014. Major pesticides are more toxic to human cells than their declared active principles. *BioMed Research International*, Article ID 179691, 8 pag. <http://dx.doi.org/10.1155/2014/179691>.
- Meyer, J.N., Hartman, J.H., Mello, D.F., 2018. Mitochondrial Toxicity. *Toxicol Sci.* 162(1):15-23. doi: 10.1093/toxsci/kfy008.
- Meyer, J.N., Leung, M.C., Rooney, J.P., Sandoel, A., Hengartner, M.O., Kisby, G.E., Bess, A.S., 2013. Mitochondria as a target of environmental toxicants. *Toxicol Sci.* 134(1):1-17. doi: 10.1093/toxsci/kft102.
- Meyer, J.N., Leuthner, T.C., Luz, A.L., 2017. Mitochondrial fusion, fission, and mitochondrial toxicity. *Toxicology.* 391:42-53. doi: 10.1016/j.tox.2017.07.019.
- Mnif W., Hadj Hassine A.I., Bouaziz A., Bartegi A., Thomas O., Roig B., 2011. Effect of Endocrine Disruptor Pesticides: A Review. *Int. J. Environ. Res. Public Health*, 8: 2265-2303; doi:10.3390/ijerph8062265.
- Moline, J.M., et al., 2000. Exposure to hazardous substances and male reproductive health: a research framework. *Environ Health Perspect.* 108:803–813.
- Moore, A. S. & Holzbaur, E. L. F., 2016. Dynamic recruitment and activation of ALS-associated TBK1 with its target optineurin are required for efficient mitophagy. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 113, E3349–E3358.
- Mostafalou, S., Abdollahi, M., 2017. Pesticides: an update of human exposure and toxicity. *Arch Toxicol.* 91(2):549-599. doi: 10.1007/s00204-016-1849-x.
- Munoz-Quezada M.T., Lucero B.A., et al. 2013. Neurodevelopmental effects in children associated with exposure to organophosphate pesticides: a systematic review. *Neurotoxicology*, (39) 158-168.
- Narendra, D., Tanaka, A., Suen, D.F., Youle, R.J., 2008. Parkin is recruited selectively to impaired mitochondria and promotes their autophagy. *J Cell Biol.* 183(5):795-803. doi: 10.1083/jcb.200809125.
- Orton, F., Rosivatz, E., Scholze, M., Kortenkamp, A., 2012. Competitive androgen receptor antagonism as a factor determining the predictability of cumulative antiandrogenic effects of widely used pesticides. *Environ Health Perspect.* 120(11):1578-84. doi: 10.1289/ehp.1205391.
- Orton, F., Rosivatz, E., Scholze, M., Kortenkamp, A., 2011. Widely used pesticides with previously unknown endocrine activity revealed as in vitro antiandrogens. *Environ Health Perspect.* 119(6):794-800. doi: 10.1289/ehp.1002895.
- Park, J.-M. et al., 2016. The ULK1 complex mediates MTORC1 signaling to the autophagy initiation machinery via binding and phosphorylating ATG14. *Autophagy* 12, 547–564.

- Peng, X., et al., 2014. Occurrence and ecological potential of pharmaceuticals and personal care products in groundwater and reservoirs in the vicinity of municipal landfills in China. *Sci. Total Environ.* 490, 889–898.
- Poulsen, R., Luong, X., Hansen, M., Styrisshave, B., Hayes, T., 2015. Tebuconazole disrupts steroidogenesis in *Xenopus laevis*. *Aquat Toxicol.* 168:28-37. doi: 10.1016/j.aquatox.2015.09.008.
- Prichard, M.N., Prichard, L.E., Baguley, W.A., Nassiri, M.R., Shipman, C. Jr., 1991. Three-dimensional analysis of the synergistic cytotoxicity of ganciclovir and zidovudine. *Antimicrob Agents Chemother.* 35(6):1060-5.
- Prichard, M.N., Shipman, C. Jr., 1990. A three-dimensional model to analyze drug-drug interactions. *Antiviral Res.* 14(4-5):181-205.
- Pu, J., Guardia, C.M., Keren-Kaplan, T., Bonifacino, J.S., 2016. Mechanisms and functions of lysosome positioning. *J Cell Sci.* 129(23):4329-4339.
- Puente, C., Hendrickson, R. C. & Jiang, X., 2016. Nutrient-regulated phosphorylation of ATG13 inhibits starvation-induced autophagy. *J. Biol. Chem.* 291, 6026–6035.
- Ramalho-Santos, J., Varum, S., Amaral, S., Mota, P.C., Sousa, A.P., Amaral, A., 2009. Mitochondrial functionality in reproduction: from gonads and gametes to embryos and embryonic stem cells. *Hum Reprod Update.* 15(5):553-72. doi: 10.1093/humupd/dmp016.
- Rambold, A. S., Kostecky, B., Elia, N. & Lippincott-Schwartz, J., 2011. Tubular network formation protects mitochondria from autophagosomal degradation during nutrient starvation. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 108, 10190–10195.
- Rambold, A. S., Cohen, S. & Lippincott-Schwartz, J., 2015. Fatty acid trafficking in starved cells: regulation by lipid droplet lipolysis, autophagy, and mitochondrial fusion dynamics. *Dev. Cell* 32, 678–692.
- Reffstrup TK, Larsen JC, Meyer O. Risk assessment of mixtures of pesticides. Current approaches and future strategies. *Regul Toxicol Pharmacol.*, 2010 Mar;56(2):174-92. doi: 10.1016/j.yrtph.2009.09.013. Epub 2009 Sep 24.
- Reis, M.M., Moreira, A.C., Sousa, M., Mathur, P.P., Oliveira, P.F., Alves, M.G., 2015. Sertoli cell as a model in male reproductive toxicology: Advantages and disadvantages. *J Appl Toxicol.* 35(8):870-83. doi: 10.1002/jat.3122.
- Richter, B. et al., 2016. Phosphorylation of OPTN by TBK1 enhances its binding to Ub chains and promotes selective autophagy of damaged mitochondria. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 113, 4039–4044.
- Rim, K.T., 2017. Reproductive Toxic Chemicals at Work and Efforts to Protect Workers' Health: A Literature Review. *Saf Health Work.* 8(2):143-150. doi: 10.1016/j.shaw.2017.04.003.
- Roeleveld, N., Bretveld, R., 2008. The impact of pesticides on male fertility. *Curr Opin Obstet Gynecol.* 20(3):229-33. doi: 10.1097/GCO.0b013e3282fcc334.
- Roelofs, M.J.E., Temming, A.R., Piersma, A.H., van den Berg, M., van Duursen, M.B.M., 2014. Conazole fungicides inhibit Leydig cell testosterone secretion and androgen receptor activation in vitro. *Toxicol Rep.* 1:271-283. doi: 10.1016/j.toxrep.2014.05.006.
- Rolland, M., Le Moal, J., Wagner, V., Royère, D., De Mouzon, J., 2013. Decline in semen concentration and morphology in a sample of 26,609 men close to general population between 1989 and 2005 in France. *Hum Reprod.* 28(2):462-70. doi: 10.1093/humrep/des415.
- Rossmann, J., et al., 2014. Simultaneous determination of most prescribed antibiotics in multiple urban wastewater by SPE-LC–MS/MS. *J. Chromatogr. B* 969, 162–170.

- Russell, R. C. et al., 2013. ULK1 induces autophagy by phosphorylating Beclin-1 and activating VPS34 lipid kinase. *Nat. Cell Biol.* 15, 741–750.
- Russell, R. C., Yuan, H.-X. & Guan, K.-L., 2014. Autophagy regulation by nutrient signaling. *Cell Res.* 24, 42–57.
- Sanderson, J.T., Boerma, J., Lansbergen, G.W., van den, B.M., 2002. Induction and inhibition of aromatase (CYP19) activity by various classes of pesticides in H295R human adrenocortical carcinoma cells. *Toxicol Appl Pharmacol.* 182(July (1)):44–54.
- Sandoval, H., Thiagarajan, P., Dasgupta, S.K., Schumacher, A., Prchal, J.T., Chen, M., Wang, J., 2008. Essential role for Nix in autophagic maturation of erythroid cells. *Nature.* 454(7201):232-5. doi: 10.1038/nature07006.
- Sengupta, P., Banerjee, R., 2014. Environmental toxins: alarming impacts of pesticides on male fertility. *Hum Exp Toxicol.* 33(10):1017-39. doi: 10.1177/0960327113515504.
- Shirihai, O. S., Song, M. & Dorn, G. W., 2015. How mitochondrial dynamism orchestrates mitophagy. *Circ. Res.* 116, 1835–1849.
- Singh, R., Cuervo, A.M., 2011. Autophagy in the cellular energetic balance. *Cell Metab.* 13(5):495-504. doi: 10.1016/j.cmet.2011.04.004.
- Soboloff, J., Berger, S.A., 2002 (b). Sustained ER Ca<sup>2+</sup> depletion suppresses protein synthesis and induces activation-enhanced cell death in mast cells. *J Biol Chem.* 277(16):13812-20.
- Soboloff, J., Zhang, Y., Minden, M., Berger, S.A., 2002 (a). Sensitivity of myeloid leukemia cells to calcium influx blockade: application to bone marrow purging. *Exp Hematol.* 30(10):1219-26.
- Sun, G., Thai, S.F., Tully, D.B., Lambert, G.R., Goetz, A.K., Wolf, D.C., et al., 2005. Propiconazole induced cytochrome P450 gene expression and enzymatic activities in rat and mouse liver. *Toxicol Lett.* 155(February (2)):277–87.
- Taxvig, C., Hass, U., Axelstad, M., Dalgaard, M., Boberg, J., Andeasen, H.R., Vinggaard, A.M., 2007. Endocrine-disrupting activities in vivo of the fungicides tebuconazole and epoxiconazole. *Toxicol Sci.* 100(2):464-73.
- Taxvig, C., Vinggaard, A.M., Hass, U., Axelstad, M., Boberg, J., Hansen, P.R., Frederiksen, H., Nellemann, C., 2008. Do parabens have the ability to interfere with steroidogenesis? *Toxicol Sci.* 106(1):206-13. doi: 10.1093/toxsci/kfn148.
- Toyama, E.Q., Herzig, S., Courchet, J., Lewis, T.L. Jr., Losón, O.C., Hellberg, K., Young, N.P., Chen, H., Polleux, F., Chan, D.C., Shaw, R.J., 2016. Metabolism. AMP-activated protein kinase mediates mitochondrial fission in response to energy stress. *Science.* 351(6270):275-281. doi: 10.1126/science.aab4138.
- Tondera, D. et al., 2009. SLP-2 is required for stress-induced mitochondrial hyperfusion. *EMBO J.* 28, 1589–1600.
- Travison, T.G., Shackelton, R., Araujo, A.B., Hall, S.A., Williams, R.E., Clark, R.V., O'Donnell, A.B., McKinlay, J.B., 2008. The natural history of symptomatic androgen deficiency in men: onset, progression, and spontaneous remission. *J Am Geriatr Soc.* 56(5):831-9. doi: 10.1111/j.1532-5415.2008.01679.x.
- Trosken, E.R., Scholz, K., Lutz, R.W., Volkel, W., Zarn, J.A., Lutz, W.K., 2004. Comparative assessment of the inhibition of recombinant human CYP19 (aromatase) by azoles used in agriculture and as drugs for humans. *Endocr Res.* 30(August (3)):387–94.
- Twig, G., Elorza, A., Molina, A.J., Mohamed, H., Wikstrom, J.D., Walzer, G., Stiles, L., Haigh, S.E., Katz, S., Las, G., Alroy, J., Wu, M., Py, B.F., Yuan, J., Deeney, J.T., Corkey, B.E., Shirihai, O.S., 2008. Fission and selective fusion govern mitochondrial segregation and elimination by autophagy. *EMBO J.* 27(2):433-46. doi: 10.1038/sj.emboj.7601963.

- Vinggaard, A.M., Hnida, C., Breinholt, V., Larsen, J.C., 2000. Screening of selected pesticides for inhibition of CYP19aromatase activity in vitro. *Toxicol In Vitro*. 14(June (3)):227–34.
- WBISS consulting Co, Ltd, 2016. China triazole Fungicides Market Report edition. <https://www.reportlinker.com/p03762688/China-Triazole-Fungicides-Market-Report-Edition.html>
- Wai, T., Langer, T., 2016. Mitochondrial Dynamics and Metabolic Regulation. *Trends Endocrinol Metab*. 27(2):105-117. doi: 10.1016/j.tem.2015.12.001.
- Wang, B. & Kundu, M., 2017. Canonical and noncanonical functions of ULK/Atg1. *Curr. Opin. Cell Biol*. 45, 47–54.
- Wang, C. & Youle, R., 2016. Cell biology: form follows function for mitochondria. *Nature* 530, 288–289.
- Wang, Z., Wilson, W. A., Fujino, M. A. & Roach, P. J., 2001. Antagonistic controls of autophagy and glycogen accumulation by Snf1p, the yeast homolog of AMP-activated protein kinase, and the cyclin-dependent kinase Pho85p. *Mol. Cell. Biol*. 21, 5742–5752.
- Wong, E.W., Cheng, C.Y., 2011. Impacts of environmental toxicants on male reproductive dysfunction. *Trends Pharmacol Sci*. 32(5):290-9. doi: 10.1016/j.tips.2011.01.001.
- Xu, M.L., Hu, J., Guo, B.P., Niu, Y.R., Xiao, C., Xu, Y.X., 2016. Exploration of intrinsic and extrinsic apoptotic pathways in zearalenone-treated rat sertoli cells. *Environ Toxicol*. 31(12):1731-1739. doi: 10.1002/tox.22175.
- Yu, L., Chen, M., Liu, Y., Gui, W., Zhu, G., 2013. Thyroid endocrine disruption in zebrafish larvae following exposure to hexaconazole and tebuconazole. *Aquat Toxicol*. 138-139:35-42. doi: 10.1016/j.aquatox.2013.04.001.
- Zarn, J.A., Brüschweiler, B.J., Schlatter, J.R., 2003 Azole fungicides affect mammalian steroidogenesis by inhibiting sterol 14 alpha-demethylase and aromatase. *Environ Health Perspect*. 111(3):255-61.
- Zgoła-Grzeškowiak, A., Grzeškowiak, T., 2013. Application of dispersive liquid–liquid microextraction followed by HPLC–MS/MS for the trace determination of clotrimazole in environmental water samples. *J. Sep. Sci*. 36 (15), 2514–2521.
- Zhang, W., Ramamoorthy, Y., Kilcarslan, T., Nolte, H., Tyndale, R.F., 2002. Sellers EM. Inhibition of cytochromes P450 by antifungal imidazole derivatives. *Drug Metab Dispos*. 30(3):314-8.
- Zhang, Y., Soboloff, J., Zhu, Z., Berger, S.A., 2006. Inhibition of Ca<sup>2+</sup> influx is required for mitochondrial reactive oxygen species-induced endoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup> depletion and cell death in leukemia cells. *Mol Pharmacol*. 70(4):1424-34.
- Zhang, Y.-L. et al., 2013. AMP as a low-energy charge signal autonomously initiates assembly of AXIN-AMPK-LKB1 complex for AMPK activation. *Cell Metab*. 18, 546–555
- Zhang, C.-S. et al., 2014. The lysosomal v-ATPase-Ragulator complex is a common activator for AMPK and mTORC1, acting as a switch between catabolism and anabolism. *Cell Metab*. 20, 526–540
- Zhang, Z., Jiang, W., Jian, Q., Song, W., Zheng, Z., Wang, D., Liu, X., 2015. Residues and dissipation kinetics of triazole fungicides difenoconazole and propiconazole in wheat and soil in Chinese fields. *Food Chem*. 168:396-403. doi: 10.1016/j.foodchem.2014.07.087.
- Zhang, C.-S. et al., 2017. Fructose-1,6-bisphosphate and aldolase mediate glucose sensing by AMPK. *Nature* 548, 112–116.

Zhao, B., Qiang, L., Joseph, J., Kalyanaraman, B., Viollet, B., He, Y.Y., 2016. Mitochondrial dysfunction activates the AMPK signaling and autophagy to promote cell survival. *Genes Dis.* 3(1):82-87. doi: 10.1016/j.gendis.2015.12.002.

Zhao, W., Zhao, J., Zhao, H., Cao, Y., Liu, W., 2018. Supramolecular solvent-based vortex-mixed microextraction: Determination of chiral triazole fungicide in beer samples. *Chirality.* 30(3):302-309. doi: 10.1002/chir.22798.

Zhou, C. et al., 2017. Regulation of mATG9 trafficking by Src- and ULK1-mediated phosphorylation in basal and starvation-induced autophagy. *Cell Res.* 27, 184–20.

Zhou, J., Zhang, J., Li, F., Liu, J., 2016. Triazole fungicide tebuconazole disrupts human placental trophoblast cell functions. *J Hazard Mater.* 308:294-302. doi: 10.1016/j.jhazmat.2016.01.055.