

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI NAPOLI “FEDERICO II”



**DIPARTIMENTO DI MEDICINA VETERINARIA
E PRODUZIONI ANIMALI**

**DOTTORATO DI RICERCA IN
SCIENZE CLINICHE E
FARMACO-TOSSICOLOGICHE VETERINARIE
XXVIII CICLO**

**CONTAMINAZIONE AMBIENTALE DA INQUINANTI ORGANICI
PERSISTENTI ED ANALISI DI ALCUNI POTENZIALI MECCANISMI
MOLECOLARI DI TOSSICITA' INDOTTI DA PCB NON DIOSSINO-
SIMILI**

CANDIDATA

Dott.ssa Anna Monnolo

Coordinatore

Ch.mo Prof.

Paolo Ciaramella
Ferrante

Docente Guida

Ch.ma Prof.ssa

Maria Carmela

Triennio 2013/2016

INDICE

INTRODUZIONE	2
<i>PARTE PRIMA</i>	
1.1 Proprietà chimico–fisiche ed impiego	
1.1.1 Policlorobifenili	5
1.1.2 Pesticidi Organoclorurati	8
1.2 Destino dei contaminanti clorurati nei comparti ambientali	11
1.3 Cinetica	
1.3.1 Policlorobifenili	14
1.3.2 Pesticidi Organoclorurati	16
1.4 Meccanismo d’azione ed effetti tossici	
1.4.1 Policlorobifenili	18
1.4.2 Pesticidi Organoclorurati	22
<i>PARTE SECONDA – Sperimentale</i>	
2.1 Piano di lavoro	
2.1.1 Analisi dei livelli di OC nel latte di asina e correlazione con il grado di infestazione da strongili intestinali	27
2.1.2 Studio in vitro della modulazione della risposta immunitaria indotta dai PCB-NDL	30
2.1.3 Studio in vitro della modulazione del metabolismo lipidico e della leptino-resistenza indotta dai PCB-NDL	34
2.2 Descrizione dei Materiali e delle Metodologie Applicate	
2.2.1 Analisi dei livelli di OC nel latte di asina e correlazione con il grado di infestazione da strongili intestinali	
2.2.1.1 Campionamento	40
2.2.1.2 Reagenti	41
2.2.1.3 Metodica analitica	41
2.2.1.4 Conta degli strongili intestinali	45
2.2.1.5 Analisi Statistica	45
2.2.2 Studio in vitro della modulazione della risposta immunitaria indotta dai PCB-NDL	45

2.2.2.1 Reagenti	45
2.2.2.2 Colture cellulari	46
2.2.2.3 Schema di trattamento	46
2.2.2.4 Prelievo dei macrofagi peritoneali	47
2.2.2.5 Determinazione della vitalità cellulare	47
2.2.2.6 Determinazione rilascio delle citochine	48
2.2.2.7 Analisi semi-quantitativa Real-time PCR	48
2.2.2.8 Determinazione del rilascio di citochine mediante Kit ELISA	49
2.2.2.9 Analisi Western Blot	50
2.2.2.10 Determinazione dei nitriti nei surnatanti	51
2.2.3 Studio in vitro della modulazione del metabolismo lipidico e della leptino-resistenza indotta dai PCB-NDL	51
2.2.3.1 Reagenti	51
2.2.3.2 Colture cellulari e differenziamento adipocitario	51
2.2.3.3 Determinazione della vitalità cellulare	52
2.2.3.4 Colorazione Oil Red O	53
2.2.3.5 Analisi semi-quantitativa Real-time PCR	53
2.2.3.6 Analisi Western Blot	54
2.2.3.7 Analisi statistica	55

2.3 Risultati e Discussione

2.3.1 Analisi dei livelli di OC nel latte di asina e correlazione con il grado di infestazione da strongili intestinali; valutazione del rischio per il consumatore	56
2.3.2 Studio in vitro della modulazione della risposta immunitaria indotta dai PCB-NDL	67
2.3.2.1 Effetti dei PCB sulla vitalità dei macrofagi J774A.1 stimolati con LPS	67
2.3.2.2 Effetti dei PCB sulla sintesi e il rilascio di citochine proinfiammatorie e di MCP-1 indotti da LPS nelle cellule J774A.1	70
2.3.2.3 Effetti dei PCB sulla sintesi e il rilascio di citochine proinfiammatorie e MCP-1 indotti da LPS nei macrofagi peritoneali primari	74
2.3.2.4 Effetti dei PCB, da soli o in associazione sull'espressione di enzimi e mediatori infiammatori indotti dal LPS nelle cellule J774A.1	75
2.3.2.5 Effetti dei PCB, da soli o in associazione, sull'espressione della COX-2, della iNOS e sulla produzione dei nitriti indotti dal LPS nei macrofagi peritoneali primari	77

2.3.3 Studio in vitro della modulazione del metabolismo lipidico e della leptino-resistenza indotta dai PCB-NDL	83
2.3.3.1 Effetti dei PCB sul contenuto lipidico	83
2.3.3.2 Effetti dei PCB sull'espressione della leptina e del suo recettore funzionale ObRb negli adipociti	84
2.3.3.3 Effetti dei PCB sul signaling della leptina	86
2.3.3.4 Modulazione di AMPK ed attivazione di ACC indotta dai PCB	88
2.3.3.5 Effetti dei PCB sull'espressione delle citochine	89
CONCLUSIONI	93
BIBLIOGRAFIA	96

INTRODUZIONE

Negli ultimi anni è aumentata nettamente la consapevolezza e la percezione delle crescenti e numerose minacce ambientali legate alle attività umane. Tra queste, una riguarda i potenziali danni associati alla mancanza di una corretta gestione delle sostanze chimiche tossiche volontarie e involontarie. Fra queste sostanze hanno destato molto interesse i contaminanti organici persistenti o POPs (Persistent Organic Pollutant), la cui contaminazione si è diffusa in tutto il mondo, producendo gravi conseguenze sull'ecosistema globale. I POPs persistono nell'ambiente perché sono resistenti alla degradazione chimica e bioaccumulabili, e dopo il loro rilascio, si diffondono attraverso l'aria, l'acqua e la catena alimentare, provocando danni all'ambiente e alla salute umana. Le classi di POPs riconosciute a livello internazionale sono dodici. Tra queste annoveriamo: i pesticidi organoclorurati o POC (DDT, pentaclorofenolo, esaclorobenzene, dieldrin, ecc.) e i policlorobifenili (PCB). Tali contaminanti derivano prevalentemente da diverse fonti intenzionali ma anche accidentali.

I PCB sono sostanze chimiche prodotte in seguito a lavorazioni industriali. Sintetizzati all'inizio del secolo scorso e immessi sul mercato fin dal 1930, hanno raggiunto un grande interesse commerciale negli anni '50, e per la notevole inerzia verso altri composti e l'elevata resistenza al calore, sono stati notevolmente adoperati in campo industriale (Pavan *et al.*, 2003; Helmfrid *et al.*, 2015), per le attività antropiche ma anche nel settore agricolo (Safe., 1994; Crinnion., 2011).

Anche i POC sono stati ampiamente utilizzati nel passato perché l'uomo ha sempre cercato di controllare la diffusione di agenti infestanti (in particolare insetti e ectoparassiti) che minacciano la salubrità delle derrate alimentari e la sua stessa salute. A tal proposito non vanno dimenticati i benefici ottenuti con il loro uso quali ad esempio la soppressione dell'epidemia di tifo a Napoli nel 1944 ed il controllo della malaria in Africa, in Medio Oriente e in Asia operato con l'eliminazione della zanzare portatrice del plasmodio della malaria (Krieger *et al.*, 2001; Dhiman *et al.*, 2016). Tuttavia, l'utilizzo di questi pesticidi, che ha sicuramente apportato importanti benefici, ha nel contempo progressivamente lasciato intravedere anche i possibili effetti negativi connessi ad un loro impiego spesso incontrollato stimolando l'adozione di idonee misure correttive. Nonostante le limitazioni di produzione e d'uso e i divieti che negli anni sono stati emanati a livello internazionale,

continua il riscontro di tali inquinanti nei diversi ecosistemi a livelli che, in alcuni casi, rappresentano tuttora un grave rischio per l'uomo e le specie animali esposte (Malarvannan *et al.*, 2014). Infatti, la normativa attuale, pur essendo sempre più restrittiva, non risolve le problematiche derivanti dal riversamento nell'ambiente di ingenti quantità di composti organoclorurati (OC) avvenuto nel passato. Tali sostanze, in virtù della elevata liposolubilità, scarsa biodegradabilità e persistenza, sono andate incontro progressivamente a processi di bioaccumulo che hanno determinato il raggiungimento di elevati livelli di concentrazione negli organismi viventi posti ai vertici delle catene trofiche.

Particolare attenzione si sta ponendo da diversi anni all'esposizione umana agli OC che si verifica principalmente attraverso l'assunzione di alimenti contaminati, soprattutto di origine animale. Tale esposizione, cronica, perché continua e a bassi livelli derivanti dall'assunzione di una dieta potenzialmente contaminata, comporta alterazioni di molteplici funzioni di apparati e sistemi nell'uomo come nelle specie animali (ad esempio immunomodulazione, alterazione della funzione endocrina, ridotta attività riproduttiva, tossicità neuro-comportamentale, epatotossicità e promozione tumorale, ecc). Questi effetti spesso non sono chiaramente manifesti e ciò non consente un adeguato riconoscimento del pericolo e la stima dei livelli di esposizione.

Per quanto concerne in maniera specifica i PCB, la comunità scientifica internazionale ha per decenni dedicato la propria attenzione ai congeneri diossino-simili trascurando i non diossino-simili caratterizzati da una accertata minore tossicità per gli organismi esposti. Solo negli ultimi anni si è verificato un cambio di tendenza in quanto è stato appurato l'alto potenziale di pericolosità dei PCB non diossino-simili che, seppure meno dannosi dei diossino-simili, risultano maggiormente diffusi e a livelli di concentrazione superiori di alcuni ordini di grandezza compensando la minore tossicità con una maggiore presenza ambientale. A dimostrazione di una carente attenzione della comunità scientifica a riguardo, basti pensare che solo alla fine del 2011 sono stati inseriti specifici limiti massimi residuali concernenti questi congeneri nella Regolamentazione Europea (Regolamento della Commissione EU No 1259/2011).

A tutt'oggi come sottolineato recentemente da enti internazionali deputati alla tutela della sicurezza alimentare quali l'EFSA (EFSA Journal, 2012), sono considerati indispensabili e auspicabili gli studi di monitoraggio della presenza ambientale e dell'esposizione degli organismi viventi agli OC (soprattutto attraverso gli alimenti). Allo stesso modo, grande

valenza è attribuita alle ricerche volte a chiarire o mettere in luce nuovi meccanismi d'azione, soprattutto dei congeneri non diossino- simili anche allo scopo di confermare o modificare i limiti di tolleranza recentemente stabiliti.

PARTE PRIMA

1.1 Proprietà chimico-fisiche e impiego

1.1.1 Policlorobifenili

I PCB sono una classe di idrocarburi clorurati non polari con un nucleo bifenilico a cui si lega un numero variabile da 1 a 10 di atomi di cloro (Figura 1). Vengono prodotti a partire dal petrolio e dal catrame, dai quali si estrae il benzene che, con temperature superiori ai 750°C in presenza del piombo come catalizzatore, reagisce formando il bifenile. Questo per reazione con cloro gassoso e in presenza di cloruro ferrico (FeCl_3), come catalizzatore, dà origine a cloroderivati per sostituzione degli atomi di H.

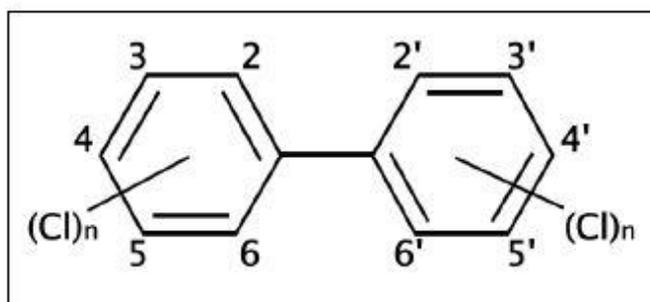


Figura 1. Struttura chimica generale dei bifenili policlorurati. Nei PCB, alcuni o tutti gli atomi di H sono sostituiti con atomi di cloro.

Si possono ottenere così 209 congeneri che differiscono tra loro per il numero e la posizione degli atomi di cloro nella molecola del bifenile. Al fine di rendere più agevole l'identificazione di un singolo congenere dal punto di vista chimico, sono state proposte nel corso degli anni diverse classificazioni; attualmente la più utilizzata è quella di Ballschmiter e Zell (1980) che assegna un numero progressivo da 1 a 209 ai singoli congeneri a seconda del grado di clorurazione.

Sulla base della loro configurazione strutturale, cioè in relazione alla diversa possibilità che hanno gli atomi di cloro di disporsi o meno sullo stesso piano i PCB sono suddivisi rispettivamente in coplanari e non coplanari. Solo 12 dei 209 congeneri vengono inclusi tra i coplanari, i cosiddetti PCB diossino-simili o *dioxin-like* (PCB-

DL); i restanti PCB, non coplanari, sono invece detti non diossino-simili (PCB-NDL). Nell'ambito del sottogruppo di PCB NDL la comunità scientifica internazionale ha identificato sei congeneri "indicatori" cioè maggiormente presenti nelle varie matrici ambientali e alimentari studiate e quindi rappresentativi del grado di contaminazione da PCB. Dei 209 congeneri solo poco più di un centinaio sono stati prodotti e impiegati in miscele commerciali contenenti molteplici combinazioni di isomeri con differente grado di clorurazione, e a cui sono stati attribuiti nomi di fantasia (es. Aroclor, Clophen, Kanechlor).

Dal punto di vista fisico, la maggior parte di essi si presenta in forma di solidi cristallini, insapori, inodori, incolori o tendenti al giallo, mentre le miscele di uso industriale sono liquidi viscosi, la cui viscosità è generalmente proporzionale al numero di atomi di cloro presenti (i congeneri epta- e octa-clorurati possono assumere consistenza resinosa anche a temperatura ambiente). I PCB sono dotati di notevole stabilità chimico-fisica, resistenza alle variazioni di pH ed alla fotodegradazione, non sono ossidabili, tutte caratteristiche che contribuiscono alla loro persistenza ambientale. Presentano una scarsa o nulla solubilità in acqua (inversamente proporzionale al grado di clorurazione) ed elevata solubilità nei lipidi e nei solventi organici quali alcol e acetone (Magnusson *et al.*, 2006). Sono sostanze non infiammabili (se il numero di atomi di cloro è maggiore di 4), evaporano a temperature superiori agli 800° C e si decompongono solo oltre i 1000°C. Sono dotati di un'elevata volatilità e di una bassa tensione di vapore che tende a diminuire con l'incremento degli atomi di cloro e in base alla posizione che essi occupano sul bifenile: per esempio, i composti *orto*-sostituiti presentano una maggiore tensione di vapore con valori che a 25°C vanno da 1.1 Pa per i monoclorurati a 1.4×10^{-6} Pa per i decaclorurati. Per le specifiche proprietà chimico-fisiche, sin dagli inizi del XX secolo, i PCB, sono stati largamente utilizzati in due tipologie d'applicazione, sistemi aperti e sistemi chiusi, come riportato nella tabella (Tabella 1). A seguito della scoperta della pericolosità di questi composti, la loro produzione è stata limitata sempre più fino a giungere al divieto d'uso, che in Italia ha prima coinvolto i soli sistemi chiusi per poi estendersi anche a quelli aperti, bandendo così completamente l'uso dei PCB e regolamentando lo smaltimento delle apparecchiature esistenti contenenti nei propri circuiti di funzionamento i composti (Decreto Legislativo n° 209 del 22 maggio 1999;

Direttiva del Parlamento Europeo 96/59/CE; Direttiva del Parlamento Europeo 85/467/CE).

<u>Sistemi chiusi</u>	
<i>Olio isolante per trasformatori</i>	Edifici, treni, tram, metro, televisori, generatori
<i>Olio isolante per condensatori</i>	Forni elettrici, motori, lampade a mercurio e fluorescenti, apparecchi telegrafici, lavatrici, frigoriferi, condizionatori d'aria, televisori
<i>Altri usi</i>	Cavi elettrici, trivelle
<i>Conduttore di calore</i>	Apparecchi per raffreddamento e riscaldamento
<u>Sistemi aperti</u>	
<i>Olio lubrificante</i>	Apparecchiature operanti ad alta temperatura, alta pressione, e sott'acqua: pompe ad olio e compressori
<i>Elasticizzante</i>	Colle, vernici, grassi sintetici, asfalto, inchiostri per la stampa
<i>Elasticizzante ed isolante</i>	Guaine per conduttori d'elettricità, nastri isolanti, altri usi in campo elettrotecnico
<i>Elasticizzate ed antiinfiammante</i>	Fibre sintetiche, plastiche e gomme
<i>Carta</i>	Carte autocopianti, carte carbone, carte per fotocopie
<i>Altri</i>	Tinture per carte, tessuti, vernici per metalli, additivi per anticrittogamici, coloranti per il vetro e ceramiche antipolvere, antiossidanti per fusibili, olio per miscoscopia, additivi per petrolio, additivi per fertilizzanti

Tabella 1. Principali applicazioni dei PCB

Le molte applicazioni hanno però comportato il rilascio nell'ambiente dei suddetti inquinanti in modo indiretto (ad esempio per inadeguato smaltimento degli apparecchi o materiali che li contenevano) o diretto (combustione incontrollata o incompleta, incenerimento di rifiuti contenenti cloro, perdite o versamenti accidentali delle miscele dai recipienti o da attrezzature industriali). Mi sembra opportuno sottolineare come la combustione può portare anche alla formazione di altri pericolosi inquinanti clororganici quali diossine e furani, la cui emissione può essere limitata dall'adozione di tecnologie di incenerimento operanti in strutture e condizioni idonee (ad es. nei termovalorizzatori a temperature superiori agli 850° C, tempo di esposizione di almeno

2 secondi, ottimizzazione delle turbolenze attraverso le geometrie del forno e flussi di ventilazione secondaria).

1.1.2 Pesticidi Organoclorurati

Rappresentano un eterogeneo gruppo di composti di sintesi arilici, carbociclici o eterociclici (Figura 2) non polari e caratterizzati da elevata solubilità nei solventi organici e nei lipidi, scarsa o nulla idrosolubilità, notevole stabilità chimica e quindi lenta o lentissima degradabilità. In linea generale possono essere suddivisi in cinque gruppi:

- ❖ derivati del difeniletano (DDTs),
- ❖ derivati del cicloesano o stereoisomeri dell'esaclorocicloesano (HCHs),
- ❖ ciclodieni e simili,
- ❖ toxafene e relativi composti,
- ❖ derivati ciclobutapentalenici (mirex e clordecone).

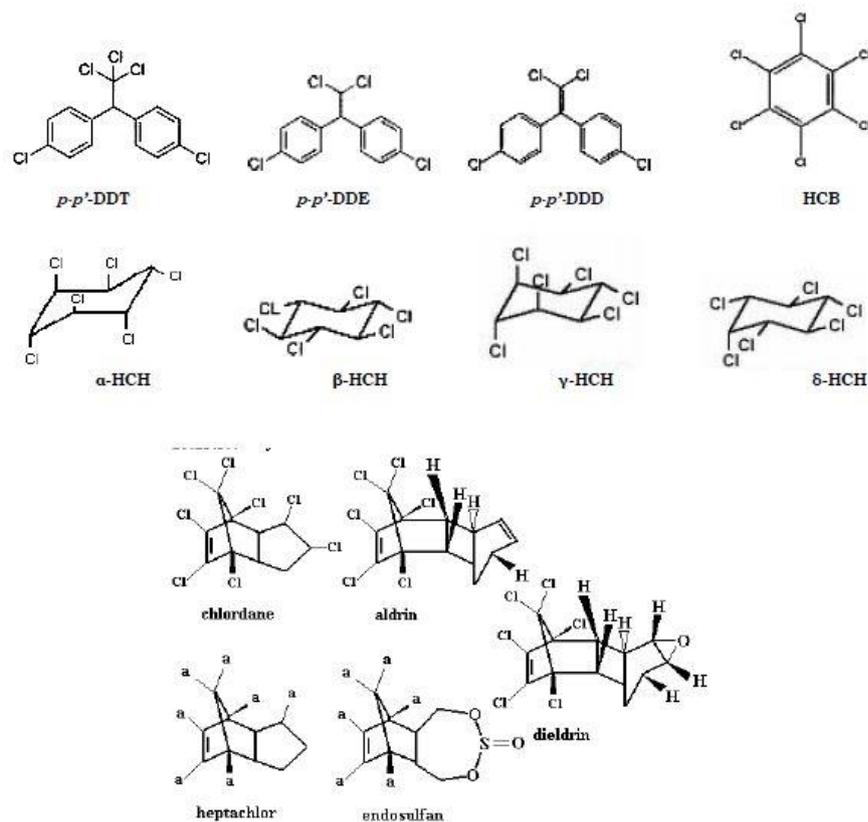


Figura 2. Strutture chimiche dei principali pesticidi organoclorurati

In passato tali composti sono stati largamente utilizzati in ambito agro-zootecnico e medico-sanitario; attualmente l'impiego di questi pesticidi, è vietato in varie parti del mondo, anche se in Paesi sottosviluppati si continuano ad adoperare per la loro particolare efficacia ed i bassi costi di produzione.

Il **DDT** o diclorodifeniltricloroetano, considerato il capostipite degli insetticidi organoclorurati, è stato sintetizzato già alla fine dell'800. Esso origina dalla condensazione della tricloroacetaldeide con il clorobenzene; è altamente solubile nei solventi organici apolari, insolubile in acqua ed è caratterizzato da una bassa pressione di vapore (1.5×10^{-7} mm Hg a 20°C). Il composto tecnico è costituito da una miscela di vari isomeri e derivati (*p,p'*-DDT 77.1%, *o,p'*-DDT 14.9%, *p,p'*-DDD 0.3%, *o,p'*-DDD 0.1%, *p,p'*-DDE 4.0%, *o,p'*-DDE 0.1%) ed altri composti non identificati (3.5%).

Inizialmente impiegato da insetticida come presidio per la protezione da malattie trasmesse all'uomo da insetti vettori, successivamente è stato largamente utilizzato per la protezione dei raccolti in agricoltura e nella lotta agli insetti nocivi in ambito domestico. A seguito della comparsa dei primi fenomeni di resistenza negli insetti e per limitare la presenza di residui negli alimenti, sono state introdotte le prime norme restrittive, ma solo alla fine degli anni '60 ne sono stati evidenziati il notevole impatto ambientale e le gravi ripercussioni sulle specie selvatiche.

Anche l'**esaclorocicloesano (HCH)** tecnico è in effetti una miscela di 8 isomeri, dei quali soltanto gli isomeri α -, β -, γ -, δ - ed ϵ -HCH, caratterizzati dalla tipica conformazione "a sedia", sono stabili e comunemente identificati; nel composto tecnico sono inoltre presenti anche piccole quantità di eptaclorocicloesano ed ottaclorocicloesano. Dalla miscela tecnica in seguito a purificazione si ottiene il lindano, ossia il γ -HCH puro al 99% a cui è attribuita la quasi totale attività insetticida. Il **lindano** è un composto cristallino inodore, molto stabile al calore e caratterizzato da un'elevata tensione di vapore (9.4×10^{-6} mm Hg a 20°C), che lo rende particolarmente adatto ad essere utilizzato sotto forma di vapore.

L'HCH è stato adoperato, per la prima volta, durante la I guerra mondiale come bomba fumogena e le sue proprietà insetticide sono state scoperte solo nel 1942.

I derivati ciclodienici che comprendono l'aldrin, il dieldrin, l'endrin, il clordano, l'endosulfan e l'eptacloro, sono composti altamente clorurati che presentano all'interno dell'anello benzenico il gruppo $-\text{CH}_2$ clorurato a $-\text{CCl}$, ed originano per condensazione dell'esaclorociclopentadiene con idrocarburi ciclici a 5 o 7 atomi di carbonio.

L'**aldrin** è un solido cristallino caratterizzato da pressione di vapore pari a 6×10^{-6} mm Hg a 25°C , ed analogamente al suo derivato dieldrin e all'eptacloro, è stato impiegato prevalentemente contro gli insetti presenti nel suolo (termiti, cavallette e larve), verso i quali è attivo sia per contatto che per ingestione. Pur non essendo fitotossico, esso può conferire odore particolare ad alcuni prodotti coltivati su terreni trattati. L'aldrin viene rapidamente ossidato a **dieldrin** dai batteri presenti nel suolo, dagli insetti, dalle piante e dai vertebrati superiori. Questo secondo composto possiede una pressione di vapore pari a 1.8×10^{-7} mm Hg a 25°C , e in taluni paesi tropicali trova ancora impiego per la lotta a malattie trasmesse da artropodi, come la malaria. L'**endrin** è invece uno stereoisomero del dieldrin, caratterizzato da pressione di vapore pari a 2×10^{-7} mm Hg a 25°C e da elevata tossicità; il principale impiego è stato nella protezione dei raccolti di cotone e grano, ma è stato anche adoperato su terreni incolti contro le cavallette e sugli orti per il controllo dei topi.

Il primo composto ciclodienico ad essere commercializzato è stato il **clordano**, adoperato contro formiche e termiti, mentre l'**endosulfan**, ultimo tra questi pesticidi ad essere stato vietato in Europa, è adoperato nella lotta contro mosche, afidi e cicaline. Pezzo da cancellare se troppo lunga la tesi.

Altro pesticida clorurato largamente impiegato nel passato è l'**esaclorobenzene** (HCB), composto che si presenta in cristalli aghiformi di colore bianco, praticamente insolubile in acqua e caratterizzato da elevata tensione di vapore (1089×10^{-5} mm Hg a 20°C). L'HCB è stato utilizzato come fungicida per il controllo dei depositi di semi di frumento e di grano. Attualmente, a seguito dei provvedimenti di divieto di produzione e di importazione adottati negli Stati Uniti e delle severe misure restrittive adottate dagli altri Paesi, misure rese necessarie a seguito delle evidenze acquisite sulla sua epatotossicità e cancerogenicità, il suo impiego è fortemente diminuito anche se viene ancora impiegato come additivo nella composizione di materiale pirotecnico, come prodotto secondario nella lavorazione della gomma sintetica e nella produzione

di coloranti. Esso si forma anche come prodotto secondario nella produzione industriale di un gran numero di sostanze chimiche clorate quali il pentacloronitrobenzene, il tri- e il tetra- cloroetilene, il tetracloruro di carbonio, i clorofenoli, alcuni pesticidi clorurati come il dacthal ed un numero imprecisato di altri cloroderivati.

Tutti questi composti, una volta dispersi nell'ambiente, risultano abbastanza refrattari alla degradazione, soprattutto se diretti alla litosfera e ciò comporta tempi di emivita decisamente lunghi, ad esempio: 3-10 anni per il DDT, 2 anni per il lindano, 1-4 anni per l'aldrin, 1-7 anni per il dieldrin, ecc. Inoltre, essi vengono facilmente assorbiti dall'apparato radicale delle piante, nelle quali possono essere rinvenuti anche a distanza di anni dall'ultimo trattamento del terreno.

1.2 Destino dei contaminanti clorurati nei comparti ambientali

La comprensione del destino ambientale dei composti di sintesi è fondamentale per la valutazione del rischio ecologico; infatti, per quantificare l'entità dell'esposizione ad un contaminante è indispensabile conoscerne le concentrazioni nei diversi comparti. Le molecole organiche, una volta introdotte nell'ambiente, si muoveranno dal punto d'applicazione verso la loro destinazione finale, ossia verso quel comparto ambientale verso il quale mostrano maggiore affinità. Tale affinità dipende dalle caratteristiche dei comparti ambientali e dalle proprietà fisico-chimiche delle molecole: peso molecolare, densità, punto di fusione e d'ebollizione, solubilità in acqua o in altri solventi organici, tensione di vapore e coefficiente di ripartizione (K_{ow}). Sebbene i livelli ambientali più elevati di POPs siano generalmente riscontrati in prossimità dei punti di rilascio, queste sostanze sono ormai ubiquitarie perché in virtù della loro semivolatilità, vengono trasportati tramite fenomeni di circolazione aerea o acquatica, attraverso gli ecosistemi, contaminando aree anche molto distanti dai luoghi d'emissione (Farrington *et al.*, 1991; Cincinelli *et al.*, 2016). Tale fenomeno è detto

Long Range Transport ed è la causa principale della contaminazione globale (Figura 3).

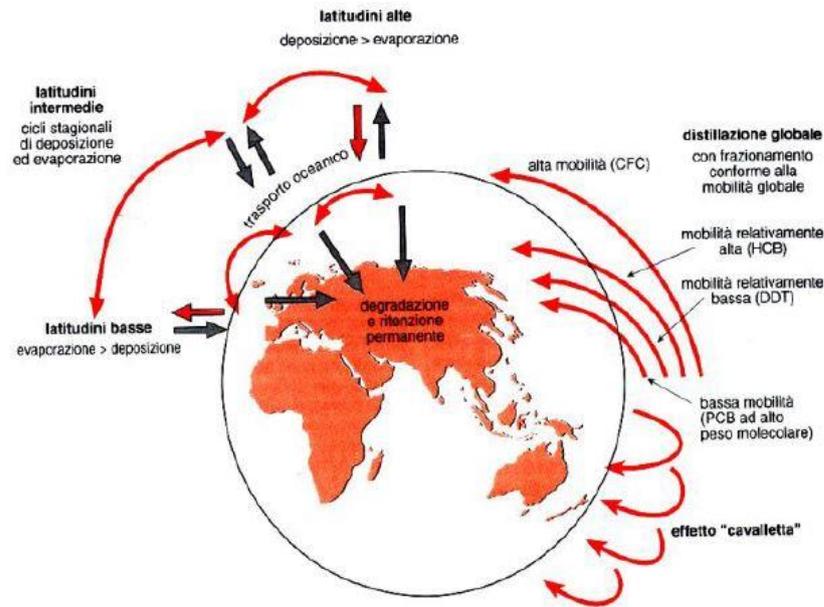


Figura 3. Schema dei principali meccanismi di trasporto e destino globale dei contaminanti organici persistenti (da Wania e MacKay 1996 modificata).

Una volta rilasciato nell'ambiente, il contaminante può entrare in ciascuno dei quattro comparti: nell'atmosfera per evaporazione, nella litosfera per adsorbimento, nell'idrosfera per dissoluzione o nella biosfera per assorbimento cutaneo, inalazione o ingestione.

I contaminanti clorurati tendono a localizzarsi prevalentemente nel suolo e nei sedimenti, che possono costituirne un vero e proprio serbatoio e verso i quali presentano un'alta affinità (Wania *et coll.*, 1996; Wang *et al.*, 2014). Infatti, a tale livello essi si legano col materiale organico, unico costituente apolare e idrofobo ivi presente. Nel caso del DDT e del DDE il terreno ed i sedimenti tendono a contenere oltre il 99,5% del carico immesso negli ecosistemi.

Nel suolo, i contaminanti organoclorurati vanno incontro a processi di degradazione operata principalmente da microrganismi e, in misura minore ed in condizioni particolari, da reazioni chimiche e fotochimiche. Tuttavia, a causa della complessa e stabile struttura delle molecole in oggetto, dell'alto grado di clorurazione e dell'eventuale adsorbimento ai sedimenti, le reazioni degradative sono decisamente

lente. Il *p,p'*-DDT ad esempio è rapidamente dechlorurato, dalle alte temperature e dalla luce, in *p,p'*-DDE e *p,p'*-DDA, e analogamente l'*o,p'*-DDT è convertito in *o,p'*-DDE; il *p,p'*-DDE, però, una volta formatosi non subisce ulteriori degradazioni in anaerobiosi, permanendo nell'ambiente molto più a lungo rispetto al suo precursore. Tale condizione è alla base dell'utilizzo del rapporto DDE/DDT per stabilire il momento presunto dell'immissione del pesticida nell'ambiente: un rapporto inferiore ad uno, infatti, sarebbe indicativo di un utilizzo recente del pesticida (Bordajandi *et al.*, 2003). Analoghi processi di dechlorurazione possono inizialmente avvenire anche a carico degli isomeri dell'HCH mentre per i ciclodieni sono più comuni le reazioni di ossidazione con formazione di derivati epossido, dotati spesso di maggiore tossicità rispetto ai composti parentali (come ad esempio avviene con la trasformazione dell'aldrin in dieldrin) (Lichtenstein e Schultz., 1960; Buser *et al.*, 2009).

Ad alte temperature gli OC tendono a volatilizzare verso l'atmosfera mentre a basse temperature tendono ad accumulare sulle superfici ambientali. Di conseguenza, gli OC tendono a volatilizzare dalle regioni temperate e tropicali e a condensare nelle regioni più fredde, come i poli o le grandi catene montuose, attraverso una serie di cicli di condensazione e deposizione (Wania e Mackay., 1993; Cincinelli *et al.*, 2016).

La distribuzione spaziale dei POPs in genere a lungo termine riflette quindi le differenze di temperatura presenti nelle diverse regioni del globo: le condizioni ambientali presenti nelle regioni più fredde favoriscono l'assorbimento dei POPs sul particolato atmosferico, la loro condensazione sul suolo, sull'acqua, sul ghiaccio e il loro assorbimento da parte della vegetazione. Inoltre, a basse temperature i fattori ambientali che potrebbero avere qualche effetto sulla degradazione dei POPs sono meno efficaci, favorendo quindi il loro accumulo.

Questo processo di alternata volatilizzazione e condensazione anche chiamato "effetto cavalletta", può condurre i contaminanti a migliaia di chilometri di distanza in pochi giorni.

Le maggiori concentrazioni atmosferiche di composti organoclorurati si riscontrano comunque nei pressi dei centri urbani e delle aree industriali, con livelli più elevati nell'emisfero settentrionale del globo, rispecchiando la situazione di minore sviluppo agricolo e industriale dell'emisfero meridionale. Gli OC tendono, riversati negli ecosistemi, ad andare incontro a fenomeni di bioaccumulo che si verificano per

bioconcentrazione o biomagnificazione. La bioconcentrazione è un fenomeno di arricchimento di una sostanza che negli animali avviene attraverso le stesse superfici che consentono gli scambi di gas respiratori (branchie, pelle, polmoni). Mentre la biomagnificazione è un arricchimento che si verifica per via alimentare (Bacci e Gaggi., 1998; Loflen, 2013). (Figura 4). In base a quest'ultimo fenomeno i composti, e in particolare i congeneri dei PCB maggiormente clorurati, tendono a raggiungere concentrazioni più elevate man mano che si sale lungo la catena trofica. Pertanto, i livelli di contaminazione maggiori si rinvencono negli organismi che si collocano all'apice della piramide alimentare.

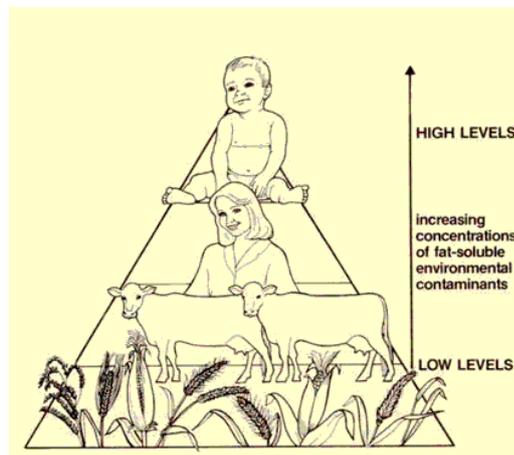


Figura 4. Esempio di biomagnificazione nella catena alimentare

L'età dell'animale, il gradino della catena trofica di appartenenza, la durata e le modalità di esposizione oltre alle specifiche capacità metaboliche sono i principali fattori che influenzano il processo di bioaccumulo negli organismi viventi.

Gli OC depositandosi sotto forma di particolato nel suolo e sulla vegetazione vengono ingeriti da erbivori intenti al pascolo che rappresenta il fattore primario di esposizione per questi animali. Il risultato è l'accumulo di queste sostanze nei grassi delle loro carni e nei grassi del latte prodotto.

1.3 Cinetica

1.3.1 Policlorobifenili

Grazie alla loro liposolubilità e ai coefficienti di ripartizione aria-acqua e ottanolo-acqua (K_{ow}), i policlorobifenili sono efficacemente assorbiti in seguito ad introduzione attraverso la cute, l'apparato gastroenterico e quello respiratorio. Una volta assorbiti, analogamente ai pesticidi, si legano alle proteine plasmatiche per essere distribuiti fino al raggiungimento dell'equilibrio dinamico tra concentrazioni plasmatiche e tissutali. In seguito ad esposizione prolungata, tali concentrazioni tendono ad aumentare sino alla saturazione e al raggiungimento di una sorta di equilibrio tra velocità di assunzione e di escrezione. La velocità di raggiungimento di questo livello d'equilibrio è strettamente correlata alle proprietà chimico-fisiche di ciascun composto ed alle capacità metaboliche dell'organismo considerato ed è tanto maggiore quanto minore è la velocità di eliminazione della sostanza in esame (Vighi e Bacci., 1998; Van Ede *et al.*, 2013).

I PCB tendono a distribuirsi ed accumularsi nei tessuti ricchi di lipidi con concentrazioni progressivamente decrescenti in: tessuto adiposo (dal 30% al 70% della quota assorbita), cute e sottocute, fegato, muscolo e sangue (Safe, 1980).

I principali processi metabolici di biotrasformazione avvengono a livello del fegato e sono rappresentati in maniera predominante da fenomeni di idrossilazione (la cosiddetta "ring hydroxylation"), operati dalla cicloossigenasi a funzione mista della famiglia del citocromo P450 con formazione di derivati intermedi che talvolta risultano essere responsabili di alcuni degli effetti tossici (Inui *et al.*, 2014). La velocità di trasformazione metabolica risulta essere dipendente dal grado di clorurazione della molecola e dalle posizioni cloro-sostituite. Infatti, una maggiore presenza di posizioni libere nell'anello benzenico rende il composto più agevolmente aggredibile da parte degli enzimi, mentre le molecole più ricche in cloro risultano meno sensibili alla degradazione. Tale caratteristica si riflette anche nel pattern di composti che si riscontrano lungo una catena trofica: i congeneri meno clorurati subiscono un progressivo declino fino a ridursi in modo significativo verso i gradini più alti della catena alimentare. Al contrario, i composti più clorurati, essendo più refrattari agli attacchi metabolici, diventano predominanti nelle specie che ne occupano i vertici

(Boon *et al.*, 1992; Yoo *et al.*, 2015). Di conseguenza, i composti maggiormente clorurati presentano dei valori di clearance ematica senza dubbio più bassi rispetto ai composti con meno cloro-sostituzioni. L'entità dei processi metabolici, peraltro, è influenzata anche dalle posizioni che gli atomi di cloro occupano sugli anelli benzenici delle molecole. Gli attacchi ossidativi, infatti, non si verificano direttamente sulle posizioni C-Cl, ma tendono ad indirizzarsi sulle posizioni adiacenti non sostituite orto-meta o meta-para dell'anello benzenico.

Oltre a ciò, le posizioni para non sostituite sembrano favorire particolarmente l'idrossilazione catalizzata dal sistema del citocromo P450 (Walker, 2001). Tali processi portano alla formazione, mediante epossidi intermedi, di metaboliti idrossilati più facilmente eliminabili con le urine.

L'eliminazione dei metaboliti avviene essenzialmente con le urine, ma anche la via di escrezione fecale e quella mammaria rivestono una certa importanza (Inoue *et al.*, 2006). Nell'ambito dell'escrezione fecale, preponderante è il ruolo dell'eliminazione biliare, fortemente influenzata sia dalla lipofilia del composto (maggiore lipofilia corrisponde ad una più lenta escrezione), più precisamente, dal suo K_{ow} , sia dalle capacità del sistema stesso. Infatti, si è notato, ad esempio, come in un soggetto particolarmente giovane si riscontrino oltre ad una meno efficiente metabolizzazione, per lo sviluppo ancora incompleto dei sistemi enzimatici, anche una minore escrezione fecale per uno sviluppo solo parziale del sistema d'eliminazione biliare; ciò contribuirebbe a spiegare perché molti tossici risultino più dannosi per i giovani rispetto agli adulti (Wimmerova *et al.*, 2010 o Zuberova *et al.*, 2015). Per motivi sempre legati alle capacità enzimatiche e di eliminazione, anche i soggetti anziani possono risentire maggiormente degli effetti di tali contaminanti, e anche la specie ed il sesso possono influenzare i fenomeni di bioaccumulo. Ad esempio, rispetto ai maschi, l'eliminazione attraverso il latte nelle femmine può contribuire a diminuire i livelli dei contaminanti nell'organismo, e le quote escrete possono variare in base alla percentuale lipidica del latte e alla durata della lattazione.

1.3.2 Pesticidi Organoclorurati

Per la loro elevata liposolubilità i pesticidi possono essere assorbiti per inalazione, per contatto cutaneo ma principalmente per via orale, con differenze correlate al composto e alla formulazione. Ad esempio il DDT, sia in polvere che in soluzione, risulta scarsamente assorbito per via cutanea, contrariamente ai ciclodieni ed al lindano. In seguito ad introduzione, questi xenobiotici vengono trasportati nei fluidi organici legati a macromolecole, in particolare alle albumine e alle lipoproteine, raggiungendo tutti i compartimenti e distribuendosi nei vari tessuti fino allo stabilirsi di un equilibrio dinamico tra siero e organi. Vengono sequestrati principalmente dal tessuto adiposo dal quale si sganciano molto lentamente e, in misura minore, anche da altri tessuti ricchi di lipidi neutri quali fegato, rene e tessuto nervoso. Il motivo di tale distribuzione preferenziale sta, oltre che nella spiccata liposolubilità dei composti clorurati, anche nella loro struttura chimica e nella tendenza a legarsi a particolari siti presenti in questi tessuti (Yu *et al.*, 2011). Alterazioni nello stato di nutrizione possono comportare una maggiore suscettibilità dell'animale al tossico a causa anche di una minore disponibilità dei depositi di grasso a cui tali composti possano legarsi, e conseguente accumulo degli stessi a livello di tessuti sensibili quali ad esempio quello nervoso. Inoltre, condizioni di stress, di digiuno prolungato o di attività fisica forzata, tramite la liberazione delle catecolamine, efficienti nel provocare un incremento dei fenomeni lipolitici, possono provocare mobilitazione delle quote sequestrate dai tessuti adiposi, con potenziale induzione di fenomeni di tossicità anche acuta. Sono, inoltre, riscontrabili differenze nelle capacità d'accumulo dei vari composti, legate sia a diversa suscettibilità alla metabolizzazione degli stessi, sia a variabilità del corredo enzimatico del soggetto coinvolto. Ad esempio il dieldrin si deposita maggiormente rispetto al suo isomero endrin, più facilmente biotrasformabile proprio per le specifiche caratteristiche strutturali (Bedford *et al.*, 1975) e riscontrabile nei tessuti solo in seguito a intossicazione acuta. La velocità di metabolizzazione dei pesticidi, è influenzata anche dalla specie dell'animale e dal sesso. Esempi in tal senso sono riportati da Kunisue e coll. (2005) che rilevano come la specie canina (principalmente le femmine) sembrasse accumulare in maniera minore rispetto ai felini, pesticidi come il DDT o il clordano, probabilmente grazie ad un corredo enzimatico più specifico nella loro metabolizzazione. La complessa struttura chimica rende, comunque, i

pesticidi clorurati difficilmente degradabili, giustificandone anche la lunga emivita (Tabella 2). La principale sede di biotrasformazione, come per gli altri xenobiotici, è il fegato, anche se può avvenire in minor misura anche in altri tessuti. La fase iniziale è attuata da enzimi microsomiali spesso tramite deidroclorurazione e idrossilazione, con formazione di derivati non sempre meno tossici dei composti parentali; successivamente tali metaboliti possono subire coniugazione con glicina o alanina con l'effetto di un aumento della idrosolubilità.

<i>Composto</i>	<i>Animale</i>	<i>Tessuto</i>	<i>Emivita (gg)</i>
Dieldrin	bovino-femmina	grasso	85
	bovino-maschio	grasso	245
	suino	grasso	28
	vacca	grasso latte	30
DDT	vacca	grasso latte	14-20
DDE	vacca	grasso latte	52

Tabella 2. Emivita di alcuni pesticidi organoclorurati nel tessuto adiposo e nel latte

In linea generale, negli animali a sangue caldo il *p,p'*-DDT viene dechlorurato a *p,p'*-DDD dalla flora gastrointestinale, con formazione intermedia di *p,p'*-DDE; il *p,p'*-DDD può essere successivamente metabolizzato a *p,p'*-DDA e coniugato prima dell'eliminazione (Ecobichon e Sascenbrecker, 1968), mentre il *p,p'*-DDE tende ad accumularsi in maniera molto più tenace rispetto al suo precursore e può seguire vie metaboliche differenti. Ciò comporta una maggiore persistenza del DDE nell'organismo, con un aumento della concentrazione dello stesso, espresso in percentuale rispetto ai DDTs, anche a distanza di tempo dall'esposizione al DDT, ed una sua maggiore presenza negli animali al vertice delle catene alimentari. Proprio in virtù di tale comportamento si ritiene che un basso rapporto DDE/DDT nei tessuti sia indice di una recente esposizione al pesticida (Bordajandi *et al.*, 2003).

Gli isomeri dell'HCH sono trasformati in composti fenolici subendo reazioni di deidroclorurazione, idrossilazione e successiva glucuronazione, ma la velocità di metabolizzazione dell'isomero β risulta inferiore rispetto a quella degli isomeri α e γ , permettendone un maggior accumulo con fenomeni di biomagnificazione (Abbott *et al.*, 1968). Anche nel caso dei ciclodieni la bioinattivazione risulta lenta e poco

efficace, considerando, ad esempio, come l'ossidazione di aldrin ed eptacloro rispettivamente a dieldrin e eptacloro-eossido non alteri significativamente la tossicità o la liposolubilità delle molecole (Keane and Zavon., 1969; Matthews and Matsumura., 1969). Infine l'HCB viene metabolizzato a livello epatico a pentaclorofenolo, pentaclorobenzene e tetraclorobenzene (Mehendale et al., 1975).

La fase escretiva vede coinvolte possibili vie, quale quella biliare (e in minor misura quella fecale) per i composti inalterati o quella urinaria per i loro metaboliti. Parte del processo escretivo può anche attuarsi attraverso le ghiandole sebacee cutanee, con la comparsa di fenomeni di cloracne simili a quelli riscontrabili nell'uomo. La persistenza nell'organismo e la lenta eliminazione di questi xenobiotici può comportare la presenza prolungata di residui nelle derrate di origine animale, e tra queste un certo rilievo va dato al latte. Infatti, la via mammaria costituisce un'altra modalità d'escrezione dei composti clorurati, considerando la notevole vascolarizzazione del tessuto e il contenuto lipidico del latte, che può quindi contenere livelli anche rilevanti di questi composti lipofili. Come la metabolizzazione, anche l'escrezione risente di una certa variabilità correlata ai composti presi in esame e alle caratteristiche di specie dell'animale coinvolto (Kunisue et al., 2005).

1.4 Meccanismo d'azione ed effetti tossici

1.4.1 Policlorobifenili

La tossicità dei singoli PCB varia molto da composto a composto. Gli effetti tossici dipendono dal grado di clorazione e dalle posizioni occupate dagli atomi di cloro. I congeneri a più alto grado di clorurazione, anche per la loro più lunga permanenza nell'organismo e la refrattarietà alle azioni degradative, rivestono un ruolo di maggiore pericolosità. La tossicità acuta dei PCB riveste carattere di eccezionalità ed è correlata ad una esposizione massiva ai tossici che si realizza o in caso di incidenti ambientali o, nell'uomo, per motivi occupazionali. L'esposizione frazionata nel tempo a basse concentrazioni dei tossici, responsabile del loro bioaccumulo, comporta l'induzione di effetti di tossicità cronica (Annamalai e Namasivayam., 2015). Numerosi studi sono stati effettuati e tuttora in corso, sugli effetti e sui meccanismi tramite cui operano i

policlorobifenili. I PCB-DL agiscono con un meccanismo ben definito che si basa sul legame specifico al recettore citoplasmatico Ah con formazione di un complesso che, penetrando nel nucleo, interagisce con sequenze di DNA dette DRE (dioxine responsive elements), e a questa azione sono dovuti parte dei loro effetti tossici. Per i PCB-NDL il meccanismo d'azione non è ancora ben chiarito e queste lacune trovano spiegazione nel fatto che, come accennato, nell'introduzione, il mondo scientifico ha sempre trascurato tali composti considerandoli poco tossici (attivi a concentrazioni di ppb) rispetto ai PCB-DL e alle diossine. I PCB rientrano nel novero degli induttori enzimatici, che stimolano l'aumentata sintesi di enzimi microsomiali epatici (Dragney et al., 1995), come le ossigenasi a funzione mista della famiglia del citocromo P450, con conseguente alterazione del metabolismo di svariati ormoni. Tra questi ultimi ormoni sessuali (estrogeni ed androgeni) e tiroidei.

A carico del sistema tiroideo, l'interferenza è esercitata soprattutto da taluni metaboliti idrossilati dei PCB. Tali composti, infatti, sono chimicamente affini all'ormone T4, e competono con questo per il legame con la sua proteina plasmatica di trasporto, la transtiretina (TTR) (Porterfield, 2000). Oltre a spiazzare l'ormone da questo legame, l'idrossi-derivato, una volta legatosi alla TTR, provoca anche il distacco della proteina trasportatrice dal complesso RBP-retinolo (vitamina A e sua proteina di trasporto, RBP).

I PCB vengono definiti “*endocrine disruptors*” (ED) termine utilizzato in riferimento a sostanze attive sul sistema endocrino (Colburn et al., 1992). Secondo tale definizione, questi composti chimici possono mimare l'attività biologica di un ormone legandosi ad uno specifico recettore cellulare (effetto agonista) e di conseguenza innescare una risposta nell'organismo simile a quella fisiologica. Allo stesso possono legarsi al recettore senza attivarlo (effetto antagonista) e di conseguenza prevenire o diminuire l'attività dell'ormone endogeno corrispondente. I PCB come altri ED sono in grado di modificare la biodisponibilità ormonale interferendo con la secrezione e il trasporto di questi oppure distruggendo i pathway enzimatici coinvolti nella loro sintesi e metabolismo (Whitehead e Rice., 2006). Lo squilibrio dell'attività ormonale causa gravi alterazioni della sfera riproduttiva (Toft, 2014). In particolare, sono state riscontrate diverse patologie e disfunzioni, tra cui endometriosi, atrofia, degenerazione e necrosi dei testicoli, riduzione del numero e della vitalità degli spermatozoi, spesso

correlate all'azione ormono-simile (sia estrogeno-simile che anti-estrogenica); a tali effetti consegue una ridotta fertilità o sterilità (Hombach-Klonisch *et al.*, 2005). Uno studio epidemiologico condotto sull'uomo, ha evidenziato la capacità di alcuni PCB di indurre alterazioni della motilità e della morfologia degli spermatozoi, con differenze nell'attività dei singoli congeneri (Hauser *et al.*, 2003). Tale effetto, comune ad esempio ai PCB 138, 118 e 153, come anche al *p,p'*-DDE, sembra correlato alla capacità di questi xenobiotici di attraversare la barriera emato-testicolare, interferendo poi in maniera diretta sulle fasi mitotiche e meiotiche della spermatogenesi oltre che sui processi di maturazione epididimale. A questi meccanismi si aggiunge l'induzione operata dai PCB del rilascio di GnRH o di ormone luteinizzante da parte dell'ipofisi. Le miscele commerciali di PCB, e alcuni congeneri in particolare, sono dotati di attività estrogenica *in vivo* e *in vitro* grazie alla capacità di legarsi al recettore ER (estrogen receptor) (Korach *et al.*, 1988). Alcuni isomeri sono invece in grado di esercitare attività anti-estrogenica, come evidenziato da Wojtowicz e coll. (2001), i quali hanno studiato gli effetti del PCB 153 su cellule follicolari di suino. Tale ricerca ha mostrato l'interferenza del contaminante sulla secrezione da parte delle cellule ovariche di estradiolo, progesterone e testosterone in funzione sia della durata dell'esposizione che dello sviluppo follicolare.

I PCB sono anche in grado di legarsi al recettore AR (androgen receptor), con effetto anti-androgeno e conseguente blocco trascrizionale (Waller *et al.*, 1996). Studi *in vitro* hanno dimostrato come i bifenilipoliclorurati possano esercitare azione competitiva ed anti-androgena in presenza di diidro-testosterone, ma si comportino da agonisti in assenza dello stesso (Portigal *et al.*, 2002). Conseguenza diretta è che organi sensibili agli androgeni, come la prostata ed in generale gli organi sessuali maschili, in caso di esposizione in utero, quando sono presenti bassi livelli di ormoni maschili, possono andare incontro ad alterazioni dello sviluppo. La stessa cosa può accadere durante lo sviluppo puberale, quando gli ormoni sessuali maschili circolanti danno inizio alla crescita ed al completo sviluppo prostatico.

Altro target dell'azione dei PCB è il sistema immunitario. Tra i vari effetti tossici i PCB sono, in grado di determinare immunosoppressione sia in specie da laboratorio che in specie selvatiche, comportando una maggiore suscettibilità a infezioni di varia natura. Nell'ambito di tali effetti possiamo menzionare: atrofia degli organi linfoidei,

sia primari che secondari (con riduzione ponderale della milza, riduzione numerica dei centri germinativi di milza e linfonodi) (Chang et al., 1982), alterazioni dell'immunità cellulo-mediata (ridotta attività delle cellule natural-killer e ridotta risposta proliferativa dei linfociti T) (Murphy *et al.*, 2008) e umorale (ridotta risposta anticorpale) (Selgrade, 2007), ridotta attività dei granulociti neutrofili (Ganey et al., 1993). Uno studio tossicologico condotto recentemente in vitro sui PCB-NDL (Ferrante *et al.*, 2011), dati recenti prodotti in vitro dimostrano che i PCB 101, 153 e 180 sono in grado di sopprimere la risposta macrofagica e di stimolare in queste cellule il processo apoptotico. In aggiunta, Levin *et al.*, (2005) hanno dimostrato come l'esposizione di leucociti ai PCB-NDL 138, 153 e 180, provenienti da soggetti sani, si risolva in una ridotta fagocitosi mediata sia dalla ridotta attività monocitica che neutrofilica, effetti che diventano ancora più evidenti con l'esposizione alle combinazioni di PCB-NDL.

In aggiunta agli effetti sullo sviluppo e sulla riproduzione, ci sono anche quelli riguardanti l'induzione dei disordini metabolici. Diversi ED possono esercitare un effetto obesogenico alterando i meccanismi fisiologici di controllo dell'aumento di peso (McAllister *et al.*, 2009). L'esposizione ai PCB-DL è stata anche associata ad altre patologie metaboliche obesità-correlate, come la sindrome metabolica e il diabete mellito di tipo 2 (Fontcuberta *et al.*, 2008).

I PCB inoltre inducono effetti sulle funzioni neuro-comportamentali determinando deficit motorio, iporiflessia, ritardo nell'apprendimento, stati d'ansia e depressione (Boersma e Lanting, 2000), evidenziati in bambini esposti durante lo sviluppo pre-natale o post-natale attraverso il consumo di latte materno contaminato (Schantz *et al.*, 2003).

Contrastanti sono invece i pareri sulle proprietà cancerogene dei PCB. Secondo studi riportati dall'EPA (Environment Protection Agency degli Stati Uniti) l'esposizione a PCB potrebbe essere correlata ad un'aumentata incidenza di tumori al fegato, alla vescica, alle vie biliari ed ematologici, ma altri studi non hanno permesso di ottenere una così netta connessione tra tali eventi (Brown and Lawton, 1993). La "International Agency for Research on Cancer" IARC ha pertanto classificato i PCB nel gruppo 2A (probabili cancerogeni per l'uomo) sulla base di limitate evidenze negli esseri umani e sufficienti riscontri negli animali (IARC, 1987 a).

1.4.2 Pesticidi organoclorurati

I POC come i PCB sono implicati soprattutto in episodi di tossicità cronica anche se soprattutto in passato sono stati responsabili di episodi di tossicità acuta. I sintomi dell'intossicazione acuta sono a carico del sistema nervoso sul quale essi agiscono in maniera variabile in relazione alle differenze strutturali dei vari gruppi. Il bersaglio principale ad esempio del DDT è la membrana assonica. Questo composto interferisce con la cinetica dei canali del sodio, ritardandone la chiusura ed inibendo l'efflusso di potassio. Inoltre inibisce le Na^+ , K^+ -ATPasi e la Ca^{2+} -ATPasi, fondamentali nel processo di ripolarizzazione, e il trasporto da parte della calmodulina di ioni calcio, essenziali per la liberazione dei neurotrasmettitori (Matsumura, 1985). Tutto ciò va ad alterare la sensibilità del neurone e quindi tra i sintomi che si manifestano in seguito ad intossicazione acuta ritroviamo tremori, ipereccitazione, convulsioni tonico-cloniche intermittenti di tipo epilettiforme con barcollamenti, opistono e masticazione ma anche salivazione, nausea, vomito, diarrea, midriasi, minzione frequente, aritmie cardiache ed intensa secrezione bronchiale. Durante o dopo gli attacchi epilettici può manifestarsi ipertermia dovuta all'impossibilità di dissipare completamente il calore generato dall'intensa attività muscolare e metabolica. La morte subentra per arresto respiratorio. Nell'ambito del gruppo del DDT e suoi metaboliti, il *p,p'*-DDT ha una bassa tossicità acuta per i mammiferi e nella maggior parte delle specie aviarie, anche se appare molto più pericoloso dei composti derivati e del suo isomero *o,p'*-. Quest'ultimo induce lieve o moderata sintomatologia nervosa anche quando raggiunge a livello cerebrale concentrazioni 5-9 volte superiori a quelle necessarie al *p,p'*-DDT per produrre lo stesso effetto (Dale et al., 1966).

La tossicità acuta da HCB è relativamente bassa se indotta da un'unica esposizione ma aumenta nel caso di somministrazioni ripetute a dosaggi anche bassi. In quest'ultimo caso la sintomatologia compare dopo qualche settimana dall'esposizione e consiste essenzialmente in perdita di peso, ipereccitabilità, aumento di peso e cambiamenti morfologici del fegato, induzione degli enzimi microsomiali e citoplasmatici, porfiria, fotosensibilità con lesioni cutanee, modificazioni della risposta immunitaria. Talvolta

compaiono anche convulsioni, come ad esempio in ratti neonati allattati da madri che avevano assunto il pesticida (De Matteis *et al.*, 1961).

Discorso differente agli altri pesticidi va fatto per i ciclodieni, responsabili di svariati casi di intossicazione acuta con esiti fatali e caratterizzati da una rapida insorgenza di fenomeni convulsivi prima di qualsiasi altro sintomo. I ciclodieni inibiscono competitivamente il legame dell'acido γ -aminobutirrico (GABA) al proprio recettore causando stimolazione del neurone. Inoltre essi essendo rapidamente assorbiti per via cutanea, rappresentano un rischio anche per coloro che li maneggiano. Come già accennato, l'aldrin viene rapidamente trasformato in dieldrin, quest'ultimo imputabile degli effetti tossici. L'endrin risulta essere il ciclodiene dotato di maggiore tossicità ma risulta poco persistente nei tessuti. L'intossicazione acuta da lindano comporta l'insorgenza di violente convulsioni epilettiformi, che generalmente portano il soggetto a morte entro 24ore. Il lindano e il dieldrin esercitano un'azione diretta sui tratti dopaminergici della substantia nigra, contribuendo nell'uomo allo sviluppo del morbo di Parkinson (Saeedi Saravi e Dehpour., 2016).

In seguito ad esposizione cronica ai POC invece, possono riscontrarsi perdita di peso, edema, immunotossicità, riduzione del successo riproduttivo, induzione enzimatica, epatotossicità, mutagenicità e promozione tumorale (Ali *et al.*, 2014).

I POC influenzano il sistema immunitario con effetti soprattutto a carico della risposta anticorpale. In uno studio condotto su ratti a cui sono stati somministrati DDT e lindano, per via orale, è stato riportato che tali pesticidi, oltre al deficit anticorpale inducono immunosoppressione in seguito ad una possibile produzione di radicali liberi (Koner *et al.*, 1998). Numerosi studi *in vitro* ed *in vivo* condotti su animali da laboratorio dimostrano il dieldrin riduce la risposta immunitaria sia umorale sia cellulo-mediata, con soppressione della funzione macrofagica (Krystyniak *et al.*, 1986). Anche per l'HCB è stata confermata l'immunotossicità, con riscontro in particolare di ipertrofia di milza e linfonodi, incremento dei livelli di IgM e lesioni infiammatorie a carico di cute e polmoni imputabili a reazioni autoimmuni indotte dal pesticida (Michielsen *et al.*, 1999).

Da tempo i composti organoclorurati, sono riconosciuti come interferenti endocrini (U.S. EPA, 1994). Tale condizione può indurre vari effetti, ma di sicuro quelli più di frequente riscontrati sono a carico del sistema riproduttivo. Il *p,p'*-DDT e *p,p'*-DDE

hanno un'attività tipo anti-androgenica mentre, l'*o,p'*-DDT, il clordano, il dieldrin e il toxafene, estrogeno-simile.

Studi *in vivo* mostrano come il *p,p'*-DDE, legandosi ai recettori per gli androgeni, causi riduzione della distanza anogenitale e, nei maschi, ritenzione dei capezzoli e riduzione del volume della prostata (Kelce *et al.*, 1995). Il legame di tipo competitivo dell'*o,p'*-DDT al recettore per gli estrogeni causa effetti a carico dell'utero come ipertrofia ed edema (Kupfer e Bulger., 1976), ma l'attività ormonale del contaminante pare sia comunque nettamente inferiore rispetto a quella fisiologica dell'estradiolo (Nelson, 1973). Anche il lindano ed il β -HCH sono in grado di esercitare nel topo lieve azione estrogenica (Van Velsen *et al.*, 1986); possono essere inoltre entrambi responsabili di alterazioni a carico dei testicoli con atrofia dei tubuli seminiferi (Huang e Huang., 1987) e degenerazione delle cellule di Leydig (Chowdhury *et al.*, 1987) con possibile calo della produzione di steroidi da parte di tali cellule. Il lindano pare essere anche in grado, di inibire la comunicazione intercellulare e le contrazioni del miometrio in topine gravide tramite perossidazione lipidica (Criswell e Loch-Carus., 1999). A carico del clordano sono stati rilevati danni ai testicoli ed alterazioni della spermatogenesi (Balash *et al.*, 1987).

Anche il fegato risente fortemente dell'azione dei POC, con alterazioni morfologiche dell'organo e delle sue capacità metaboliche. In animali da laboratorio in seguito ad esposizione al DDT, le prime alterazioni epatiche si sono verificate nelle cellule della regione centrolobulare, con proliferazione del reticolo endoplasmatico liscio degli epatociti e ipertrofia delle cellule, accompagnata da fenomeni di marginazione e dalla comparsa di piccole gocce lipidiche all'interno del reticolo denominate "liposfere" (Ortega *et al.*, 1956).

Il DDT, come molti altri organoclorurati, provoca, inoltre, un aumento della sintesi di fosfolipidi e proteine, tra cui taluni isoenzimi del citocromo P450 e NADPH-citocromo P450 reductasi (Sonne *et al.*, 2008 b), e sono state rilevate variazioni anche nei livelli serici della fosfatasi alcalina e della alanina-aminotransferasi di cani esposti ai POC rispetto ad animali di controllo (Backer *et al.*, 2001). Anche l'HCB (Iverson, 1976), i ciclodieni (Hutson e Hoadley., 1974), l'ossi-clordano a basse dosi (Bondy *et al.*, 2003) sono responsabili d'induzione enzimatica. Il DDT, l'HCH, il clordano e il dieldrin in particolare si comportano come induttori di tipo fenobarbitalico (Thorpe e

Walker, 1973) mentre sembra che l'HCB appartenga ad una differente classe di induttori che possiedono caratteristiche assimilabili in parte a quelle del fenobarbitale e in parte a quelle del metilcolantrene (Stonard, 1975). L'effetto induttivo di quest'ultimo composto porta ad una aumentata metabolizzazione non solo dello stesso ma anche di altri pesticidi (Mendoza *et al.*, 1976). L'attività dei composti clorurati sul sistema enzimatico epatico può quindi avere ripercussioni sul metabolismo anche di altri xenobiotici, come pure di farmaci e ormoni endogeni, con l'alterazione dei delicati sistemi da essi regolati.

Le alterazioni epatiche possono risultare comunque reversibili qualora l'assunzione dello xenobiotico venga interrotta sufficientemente presto (Wright *et al.*, 1972), anche se la normalizzazione risulta avvenire con una certa lentezza, specie se l'induttore permane a lungo nel tessuto. Se invece l'esposizione ai pesticidi è prolungata e a concentrazioni elevate, il danno risulta irreversibile, anche in virtù di una durata vitale degli animali a volte non sufficientemente lunga da permettere una totale eliminazione del composto e un ritorno alla normale fisiologia dell'organo.

Riguardo le capacità mutageniche, esistono pareri discordanti, ma i test di mutagenicità risultano negativi (Wildemauwe *et al.*, 1983). Nello specifico, il DDT, a seguito di test microbiologici, è stato classificato come non mutageno (Shirasu *et al.*, 1976), mentre test *in vivo* hanno dato risultati negativi o dubbi (Coulston., 1985). Altri test hanno indicato come non mutageno anche l'HCH (Wildemauwe *et al.*, 1983), così come il dieldrin, l'aldrin e l'HCB (Usha Rani *et al.*, 1980).

Infine va esaminata la cancerogenicità di questi contaminanti, anche se i pareri in proposito sono talvolta contrastanti e l'azione non sembra diretta. Tali composti, infatti, agirebbero come promotori tumorali e l'effetto sarebbe dovuto all'induzione di stress ossidativo a carico delle membrane cellulari e soprattutto all'induzione enzimatica, che, comportando squilibri ormonali, agevolerebbe l'azione di altre sostanze tumorigene. Il DDT, l'HCH, ed i ciclodieni possono infatti a livello epatico agevolare l'azione cancerogena di agenti quali la dietilnitrosamina o le aflatoxine (Rojanapo *et al.*, 1987).

Per quanto riguarda l'uomo, è stato dimostrato come l'esposizione cronica a tali composti clorurati, possa contribuire alla genesi di cancro in organi come il surrene, l'utero o la tiroide per l'alterazione del metabolismo di ormoni quali estrogeni o

tiroxina (Laden *et al.*, 2001). Tuttavia, i risultati non sempre concordi delle sperimentazioni, non permettono ad oggi di definire con certezza le proprietà tumorigene dei pesticidi clorurati, inducendo la IARC (International Agency for Research on Cancer) a classificarne la maggior parte dei POC come possibili cancerogeni per l'uomo (categoria 2B) (IARC, 1987 b-1991-2001).

PARTE SECONDA SPERIMENTALE

2.1 Piano di lavoro

2.1.1 Analisi dei livelli di OC nel latte di asina e correlazione con il grado di infestazione da strongili intestinali

Nonostante l'emanazione di leggi sempre più restrittive riguardo la produzione, l'uso e lo smaltimento di molti inquinanti organoalogenati, la derivante contaminazione ambientale è diventata una condizione di difficile risoluzione avendo per alcuni xenobiotici, quali i POC e i PCB, ormai acquisito rilevanza su scala globale. Per tale motivo negli ultimi anni, pur osservando un trend di riduzione generale dei livelli residuali di OC, l'attività di ricerca, tesa a monitorarne la diffusione e persistenza negli ecosistemi ambientali, promossa a livello internazionale, non ha subito inflessioni. Anzi, c'è stata una crescente spinta verso le attività sperimentali tese a chiarire i meccanismi di tossicità dei composti con particolare riferimento ai congeneri di PCB-NDL.

Come già sottolineato nella precedente sezione, l'esposizione degli organismi viventi e in particolare dell'uomo agli OC, avviene principalmente per via alimentare, attraverso il consumo di prodotti di origine animale. Infatti, se l'esposizione accidentale od occupazionale riveste carattere di eccezionalità e riguarda solo una fetta limitata di popolazione, in media, l'esposizione umana giornaliera deriva per il 90% dall'assunzione di alimenti contaminati (per il 90% di origine animale) ed in particolare modo dal consumo di prodotti ittici e lattiero-caseari (Malish *et al.*, 2014). Gli erbivori possono introdurre ed immagazzinare, nei tessuti ricchi di grassi, residui di POPs attraverso il consumo di mangime o pascolo contaminato (Kumari, 1995), mentre una delle principali vie di escrezione è rappresentata dal latte in cui i tossici si legano alla componente grassa. Tale matrice può quindi rappresentare un importante indicatore biologico dei livelli di esposizione per gli animali che vivono per un prolungato periodo di tempo in un ambiente inquinato (Vrecl, 2003) e una fonte alimentare dell'esposizione umana.

Molte ricerche sono state condotte a livello internazionale per rilevare la presenza di PCB nelle specie di erbivori ruminanti, mentre solo uno studio, molto recente, è stato condotto in Italia sul latte di asina destinato al consumo alimentare (Di Bella *et al.*, 2014). Tale specie, impiegata in passato principalmente per la sua peculiare resistenza fisica, in tempi recenti ha incontrato un interesse crescente per la produzione di latte che risulta essere il più simile

al latte materno (Vincenzetti *et al.*, 2014). Il latte d'asina oltre alla quota di acqua, presenta proteine, lattosio, grassi, vitamine e sali minerali. Tra le proteine, le principali sono le caseine, le siero proteine, di cui l'alfa-lattoalbumina; il lisozima e la lattoferrina che hanno un'azione antibatterica inducendo una riduzione significativa delle infezioni gastro-intestinali; e le immunoglobuline (Tabella 3).

Tabella 3. COMPOSIZIONE DEL LATTE DI DIVERSI MAMMIFERI (valori riferiti a 100 ml di prodotto)				
Latte	Proteine (g)	Lattosio (g)	Grasso (g)	Acqua (ml)
Asina	1,5	6,2	1,5	90
Donna	0,9	7,2	3,5	88
Cavalla	2,2	5,9	1,5	90
Mucca	3,6	4,9	3,5	87
Capra	4	4,5	4,3	86
Pecora	6	4,5	7,5	81
Bufala	4,8	4,7	7,5	82
Scrofa	6	5,4	6	82
Gatta	9	5	5	80
Cane	10	3	10	75
Ratto	8	2,6	10,3	79
Coniglio	13,5	1,8	12	70
Focena	12	1,3	46	40
Balena	10	0,8	35	54

Per quanto riguarda il contenuto in lattosio, esso rappresenta il maggiore costituente solubile del latte, presente in percentuale analoga al latte di donna. L'alto contenuto di lattosio è responsabile della buona palatabilità del latte di asina e del buon assorbimento di calcio a livello intestinale, un elemento fondamentale, durante la crescita del bambino, per la mineralizzazione delle ossa (Playford *et al.*, 2000). A differenza della componente proteica, la percentuale lipidica del latte di asina è minore rispetto a quello del latte materno. I lipidi sono rappresentati essenzialmente da triacilgliceroli ed acidi grassi liberi (Chiofalo *et al.*,

2011), fosfolipidi, glicolipidi e steroidi (Dugo *et al.*, 2005). Senza dubbio il punto forza di questo alimento è proprio il suo profilo biochimico che lo rende, data l'elevata similarità al latte materno, un suo ottimo sostituto. Il latte d'asina in virtù dell'elevata digeribilità, del suo contenuto in vitamine, sali minerali e zuccheri è considerato un alimento funzionale, divenuto, ormai da anni, parte integrante della dieta per alcune categorie di consumatori quali bambini con intolleranze alimentari al lattosio o alle proteine del latte vaccino o di altri ruminanti e pazienti in età geriatrica (Polidori *et al.*, 2009). Recentemente, sono state attribuite al latte d'asina spiccate proprietà nutraceutiche grazie alle sue componenti bioattive. Queste sono i lipidi capaci di influenzare positivamente, in maniera diretta o indiretta l'ambiente intestinale (Amati *et al.*, 2010) rivestendo un ruolo nella prevenzione e nella cura di alcune patologie e contribuendo, nei bambini, al costituirsi di un normale e completo sistema immunitario. (Tafaro *et al.*, 2007). Tali lipidi, inoltre, sarebbero in grado di contribuire positivamente al fisiologico sviluppo dei processi di osteogenesi, di intervenire in processi di senescenza anticipata, rallentandoli, e nelle terapie di pazienti con malattie cardiovascolari ed aterosclerosi. Non è da sottovalutare il possibile inserimento di questo latte anche nelle diete a basso contenuto di colesterolo (D'Alessandro *et al.*, 2010). Il latte d'asina, oltre che essere una fonte naturale di microrganismi autoctoni con proprietà probiotiche, può costituire una eccellente base per la crescita di molti altri ceppi microbici in possesso di tali peculiarità, in quantità tali da potersi considerare a pieno titolo "alimento probiotico". Pertanto il latte d'asina fermentato può esser considerato una base eccellente per le preparazioni di molti prodotti funzionali con proprietà probiotiche (Chiavari *et al.*, 2005). L'impiego alimentare diffuso del latte di asina è recente e questo spiega la quasi totale assenza di studi di monitoraggio della presenza di contaminanti ambientali in tale matrice. Tuttavia, tali studi acquistano una importanza rilevante se si considera che, come sopra riportato, questo latte è prevalentemente destinato a sottocategorie di consumatori particolarmente sensibili ai potenziali effetti dannosi indotti dai contaminanti ambientali (bambini e soggetti in età geriatrica). La qualità e la quantità della produzione latte asinina è, al pari di quella ovina e caprina, negativamente influenzata da diversi fattori, tra i quali particolare importanza assumono oltre a fattori chimici quali i contaminanti ambientali, le parassitosi e soprattutto le infestioni da strongili gastrointestinali (SGI). Si tratta delle parassitosi più diffuse negli allevamenti al pascolo, causate da diverse specie elmintiche, ciascuna localizzata in un settore specifico dell'apparato gastroenterico dei propri ospiti. I

generi più diffusi nelle specie di erbivori domestici allevati in Italia sono *Teladorsagia*, *Haemonchus*, *Trichostrongylus*, *Oesophagostomum*, *Chabertia* e *Bunostomum*, alcuni dei quali agenti di zoonosi. Il parassitismo da SGI è ritenuto uno dei fattori sanitari limitanti più rilevanti nel sistema di produzione degli erbivori domestici che, in tutto il territorio nazionale, è basato tuttora anche sull'uso del pascolo, principale fonte di esposizione a questi parassiti (Sykes, 1994; Walzer, 1999) come ai contaminanti ambientali persistenti. Solitamente, gli asini condividono le stesse specie elmintiche di ovini e caprini, sebbene localmente i valori di prevalenza ed abbondanza possono essere differenti tra queste specie ospiti in relazione al tipo ed alle dimensioni del pascolo. Mentre gli aspetti legati alla morfologia, biologia, epidemiologia, sintomatologia, profilassi e terapia degli SGI dei piccoli ruminanti sono generalmente ben conosciuti (Morgan e Van Dijk., 2012), lo sono molto meno quelli legati alla loro diagnosi e soprattutto alla loro fisiopatologia (Andersen *et al.*, 2013). In una prima parte del lavoro sperimentale oggetto di questa tesi è stato valutato il grado di contaminazione da OC di campioni di latte di asina raccolti in diverse aree della regione Campania (Salerno e Caserta), Calabria (Cosenza) e Basilicata (Potenza). Considerando l'azione di alterazione della funzione immunitaria operata dagli OC, successivamente, i livelli rilevati sono stati confrontati con i dati riguardanti il grado di infestazione da parassiti intestinali (strongili) degli animali impiegati nel campionamento per evidenziare potenziali correlazioni tra le due variabili analitiche.

2.1.2 Studio in vitro della modulazione della risposta immunitaria indotta dai PCB-NDL

Numerosi studi, condotti negli ultimi quarant'anni, riportano in modo inequivocabile che i PCB sono dei potenti perturbatori del sistema immunitario (Chalubinskim *et al.*, 2006). Varie indagini sperimentali, condotte previa esposizione a tali inquinanti, hanno dimostrato che i PCB sono associati all'alterazione non solo della risposta immunitaria innata ma anche della risposta immunitaria adattiva, entrambe indotte dalla modificazione del signaling di molecole coinvolte nell'attivazione delle cellule immunitarie. Questi effetti inducono un'aumentata incidenza delle infezioni, insufficiente risposta anticorpale alle vaccinazioni (Heilmann *et al.*, 2006, 2010), alterazioni negli organi del sistema immunitario ed alterazioni della funzione linfocitaria (Belles-Isles *et al.*, 2002). Tutti i ricercatori

concordano nel definire il periodo perinatale il momento di maggiore sensibilità immunotossica, sia per l'uomo che per gli animali. In generale, i neonati risultano essere fra i soggetti a rischio, quelli più suscettibili agli effetti dei PCB che vengono introdotti sia durante la gestazione che l'allattamento. L'esposizione a tali sostanze, è stata associata ad una maggiore incidenza di otiti infettive ed infezioni respiratorie, influenza e varicella (Weisglas-Kuperus *et al.*, 2004) nei bambini Inuit in età prescolare (Dallaire *et al.*, 2006), nei bambini nati da lavoratori impiegati negli impianti condensatori e nei bambini esposti pre-parto per ingestione materna di olio di riso contaminato da PCB durante i disastri ambientali di Yushi e Yu-Cheng (Guo *et al.*, 2004). Ulteriori studi hanno dimostrato che i PCB-DL sono in grado di ridurre il numero delle cellule che mediano la risposta immunitaria precoce, compresi monociti, cellule polimorfonucleate e cellule natural killer (NK) (Van Den Heuvel *et al.*, 2002). Questo effetto può influenzare la capacità del sistema immunitario di riconoscere sostanze antigeniche e limitare la trasduzione di segnali indotti da citochine e chemochine. A Taiwan, in soggetti accidentalmente intossicati da PCB sono state osservate alterazioni immunitarie oltre un anno dopo l'episodio acuto con alterazioni rappresentate da riduzione delle concentrazioni sieriche di IgM e di IgA, decremento dei linfociti T, in particolare dei CD4, con CD8. È stata rilevata, inoltre, una riduzione dell'ipersensibilità ritardata ed un aumento della risposta linfocitaria alla maggior parte dei mitogeni. Un gruppo di bambini delle isole Faroe ha manifestato una riduzione della produzione di anticorpi in risposta al vaccino contro difterite e tetano. Questi bambini sono stati esposti ai PCB attraverso il consumo di grasso di pesce di balena, una fonte consistente di POP (Heilmann *et al.*, 2010). Allo stesso modo anche Svensson e collaboratori (1994) ha indagato gli effetti sul sistema immunitario del consumo di grasso di pesce contaminato. Dalle analisi è emersa una riduzione debole delle cellule NK negativamente correlata ai livelli plasmatici dei congeneri di PCB 118 e 126.

Nonostante molti studi abbiano dimostrato che i PCB (principalmente i DL) contribuiscono significativamente alla disfunzione del sistema immunitario, poche informazioni sono attualmente disponibili sui meccanismi dettagliati di questa alterazione indotta dai PCB-NDL. In letteratura sono riportati pochi studi in cui è evidenziata un'attività immunomodulatrice dei PCB-NDL utilizzando modelli sperimentali in vitro. Ferrante e collaboratori (2011) hanno dimostrato che tali PCB (IUPAC n. 101, 153, 180) hanno un effetto immunosoppressivo nelle cellule macrofagiche J774A.1 poiché ne inducono

l'apoptosi attraverso l'attivazione della via intrinseca. Protagonista assoluto di questo pathway è la famiglia proteica Bcl-2 (B-cell Lymphoma 2) che comprende sia segnali pro-apoptotici, come Bax e Bak che attivano le caspasi, che anti-apoptotici come Bcl-2. I risultati evidenziano che i PCB-NDL determinano un aumento dell'espressione di Bax e dell'attività della caspasi 3 e di contro riducono l'espressione del fattore anti-apoptotico Bcl-2. Il meccanismo induttore dell'immunotossicità dei PCB-NDL risulta essere indipendente da quello riferito per i PCB-DL che vede coinvolto l'attivazione dell'AhR.

Partendo da tali presupposti, nella terza parte di questa tesi, è stato analizzato l'effetto dei PCB-NDL (PCB101, 153, 180) da soli o in differenti combinazioni sulla risposta immunitaria macrofagica al lipopolisaccaride (LPS). I macrofagi notoriamente possono essere attivati da citochine o componenti della parete batterica e rivestono un ruolo fondamentale nell'immunità sia innata che cellulo-mediata. Per quanto concerne il loro ruolo nell'immunità aspecifica, i macrofagi fagocitano e digeriscono enzimaticamente i microrganismi rilasciando mediatori proinfiammatori, tra cui prostaglandine e monossido d'azoto (NO). Nell'immunità specifica, invece, tali cellule agiscono presentando l'antigene e rilasciando citochine, come l'interleuchina (IL-6), il Tumor Necrosis Factor (TNF- α) e chemochine come il Monocyte chemoattractant protein (MCP-1) regolando in questo modo l'attivazione dei linfociti T helper (Billack, 2006).

L'IL-6 è una citochina pleiotropica multifunzionale ben nota per il suo effetto anti-infiammatorio e/o proinfiammatorio nella risposta immunitaria che possiede anche diverse attività biologiche implicate nella regolazione dell'emopoiesi, dell'infiammazione e dell'oncogenesi (Kimura e Kishimoto, 2010). E' secreta da diversi tipi di cellule come i linfociti T e i macrofagi per stimolare la risposta immunitaria ad esempio durante un'infezione, in seguito ad un trauma o altri danni tissutali che portino ad infiammazione. Il suo ruolo nella risposta agli agenti patogeni è stato confermato in esperimenti nei quali cavie prive di IL-6 mostravano una minore capacità di resistere ad infezioni da *S. Pneumoniae* (Van der Pool *et al.*, 1997). L'IL-6 agisce in seguito alla formazione di un complesso recettore, IL-6R e la glicoproteina (gp) 130, che attiva il recettore stesso. L'attivazione del recettore determina la fosforilazione di una serie di chinasi che a loro volta attivano fattori di trascrizione citoplasmatici, STAT1 e STAT3 (Stahl *et al.*, 1994) responsabili degli effetti a valle della citochina. Il ruolo dell'IL-6 come citochina antinfiammatoria è dato dal suo effetto inibitorio sul TNF- α e su altre citochine.

Il TNF- α è una citochina pro-infiammatoria, secreta principalmente dai macrofagi attivati. È il principale mediatore della risposta infiammatoria acuta nei confronti dei batteri Gram-negativi (e quindi del LPS) e di altri microrganismi patogeni. Hong *et al.* (2004), hanno studiato per la prima volta in macrofagi murini (RAW 264) e in macrofagi peritoneali gli effetti di svariati ED (erbicidi, insetticidi) sulla produzione di TNF- α indotta dal LPS. Tali studiosi hanno dimostrato che i suindicati composti chimici possono sia indurre che sopprimere la produzione della citochina, suggerendo un loro potenziale ruolo nel decorso anomalo di diverse malattie infettive. Le principali funzioni del TNF- α consistono nel reclutamento dei neutrofili e dei macrofagi nei focolai d'infezione, nell'attivazione delle loro funzioni microbicide e nella stimolazione della produzione di IL-6, IL-1 e chemochine. Tra le chemochine la MCP-1 (o CCL2) è un'importante chemioattrattore di cellule mononucleate, prodotta da diversi tipi di cellule tra cui macrofagi, monociti e cellule epiteliali in risposta ad agenti ossidanti, citochine, fattori di crescita ed endotossine batteriche (Yadav *et al.*, 2010). Nonostante MCP-1 sia sintetizzata costitutivamente, le maggiori concentrazioni si osservano durante la risposta infiammatoria causata da lesioni tessutali o in seguito ad infezioni.

Una volta attivati, i macrofagi utilizzano un ampio repertorio di segnali chimici per comunicare gli uni con gli altri. Per esempio, se stimolati dal LPS aumentano la concentrazione di NO tramite l'azione della NO sintetasi inducibile (iNOS), sistema enzimatico espresso nei macrofagi attivati. Il NO viene coinvolto nelle prime fasi della risposta immunitaria innata nei confronti delle infezioni batteriche. Tuttavia, esso può avere anche effetti dannosi sull'ospite generando stress ossidativo. Durante il processo di difesa dell'ospite, similmente a quanto accade durante un processo infiammatorio, endotossine e citochine inducono anche rapide alterazioni nell'espressione di geni precoci, portando alla sintesi *de novo* di ciclossigenasi (COX)-2 (Di Rosa *et al.*, 1996) oltre all'iNOS (Meli *et al.*, 2000). L'induzione contemporanea di iNOS e COX-2 è stata evidenziata in numerose tipologie cellulari inclusi i macrofagi murini (Swierkosz *et al.*, 1995), con molte similitudini nelle vie di trasduzione del segnale.

Nella presente ricerca è stata valutata la capacità dei PCB-NDL 101, 153, 180, da soli o in associazione, di alterare la risposta immunitaria indotta dal LPS in macrofagi di ratto della linea continua J774A.1 e in macrofagi murini primari. In particolare, sono stati analizzati gli effetti di tali contaminanti sull'espressione delle citochine pro-infiammatorie IL-6, TNF-

α e sulla chemochina MCP-1. Successivamente, è stato esaminato l'effetto dei PCB-NDL sull'espressione della COX-2 e del iNOS indotta dal contemporaneo trattamento con il lipopolisaccaride.

La scelta della co-esposizione delle cellule ai contaminanti e al LPS origina dall'obiettivo principale che ha guidato questi studi in vitro e cioè, come per la valutazione del loro ruolo nella patogenesi dell'obesità, dall'opportunità di mimare in parte, mediante l'adozione di condizioni sperimentali controllate, l'esposizione naturale degli organismi viventi. Tale esposizione avviene, soprattutto per via alimentare, a miscele di PCB e frequentemente è contestuale ad infezioni batteriche.

2.1.3 Studio in vitro della modulazione del metabolismo lipidico e della leptino-resistenza indotta dai PCB-NDL

In una terza fase della ricerca, è stato esaminato, con uno studio condotto in vitro, il possibile coinvolgimento dei PCB nelle disfunzioni del metabolismo lipidico correlate all'obesità.

Nel corso degli ultimi decenni il tasso di obesità è notevolmente aumentato soprattutto nei Paesi industrializzati, tanto da diventare uno dei più gravi problemi di salute pubblica dell'ultimo secolo (Smith e Smith., 2016). Una combinazione tra fattori genetici e il moderno stile di vita (eccessiva assunzione di cibo, spesso ipercalorico, scarsa attività fisica, privazione del sonno) inducono, probabilmente, un rapido e significativo aumento dei tassi di obesità. Tale fenomeno sta destando preoccupazione anche nel settore medico-veterinario, interessando in maniera predominante gli animali da compagnia (Sandoe *et al.*, 2014). L'obesità è frequentemente associata a diversi disordini metabolici quali il diabete di tipo 2, l'aterosclerosi, le dislipidemie e l'ipertensione. A livello cellulare, lo sviluppo della massa grassa consiste sostanzialmente nell'alterazione del volume di lipidi che si accumulano negli adipociti, nel reclutamento dei preadipociti, nella loro successiva induzione alla differenziazione in adipociti maturi ricchi di lipidi e nell'apoptosi degli adipociti stessi (Arner *et al.*, 2010). L'aumentata incidenza di malattie metaboliche è stata correlata, negli ultimi decenni, anche alle modifiche sostanziali dello stato di salute ambientale minato dall'inquinamento chimico derivante dalle esacerbate attività industriali e agricole succedutesi nel corso degli ultimi 70 anni (Casals-Casas e Desvergne., 2011). Questa contaminazione globale ha spinto ad ipotizzare che alcune delle numerose sostanze inquinanti ambientali del tipo “*endocrine disruptors*”, possano interferire con vari aspetti

del metabolismo e costituire un fattore di rischio aggiuntivo nel determinismo dell'obesità e delle patologie correlate (Heindel *et al.*, 2015). Questa ipotesi è supportata da ricerche *in vitro* ed *in vivo*, nonché da studi epidemiologici, che hanno dimostrato che una varietà di inquinanti ambientali altamente liposolubili possono influenzare l'adipogenesi comportandosi da pro-obesogeni (Chamorro-Garcia e Blumberg., 2014). Tra questi inquinanti i PCB hanno suscitato molto interesse in quanto elevate concentrazioni sieriche di tali contaminanti sono state correlate positivamente con le manifestazioni della sindrome metabolica, intolleranza al glucosio e malattie cardiovascolari (Airaksinen *et al.*, 2011; Ha *et al.*, 2007; Uemura *et al.*, 2009). Questa correlazione è stata sostenuta da dati sperimentali ottenuti con studi *in vivo* e *in vitro* che attestano che i PCB-DL alterano l'omeostasi del glucosio nei topi magri e obesi (Baker *et al.*, 2013), inducono la differenziazione degli adipociti e promuovono l'obesità nei ratti (Arsenescu *et al.*, 2008). Ulteriori studi hanno dimostrato che alcuni PCB (PCB 153 e PCB 77) sono in grado di pregiudicare le funzioni degli adipociti con un conseguente accumulo di lipidi (Mullerova *et al.*, 2007). Questo risultato è coerente con l'idea che i PCB possano essere coinvolti nello sviluppo dell'obesità e nell'interferenza delle funzioni endocrine di questo tessuto (Tang-Peronard *et al.*, 2011). Tali effetti possono essere facilmente esplicitati dai PCB in virtù delle loro specifiche proprietà chimico-fisiche, che gli consentono di accumularsi nei tessuti ricchi di lipidi con tre principali implicazioni:

- 1) il tessuto adiposo agisce come *reservoir* per una grande varietà di xenobiotici caratterizzati da una spiccata lipofilia di natura chimica, quali, in particolare, i POP;
- 2) tale tessuto costituisce una fonte a lento-rilascio di POP che possono indurre effetti di tossicità cronica sulle strutture bersaglio;
- 3) il tessuto adiposo può essere anche un target dell'azione dei POP che interferirebbero con le funzioni del tessuto stesso, incrementando i processi infiammatori locali e/o modulando la differenziazione dei precursori cellulari degli adipociti (La Merrill *et al.*, 2012).

La quantità di inquinanti organici persistenti nel tessuto adiposo può variare di diversi ordini di grandezza (Smeds e Saukko., 2001 Ronn *et al.*, 2011) in base all'esposizione alimentare e alla capacità di accumulare tali sostanze specie-dipendente. Diversi studi hanno dimostrato che ad una perdita di grasso a seguito di una dieta o chirurgia bariatrica, si verifica un aumento della concentrazione di POP nel sangue (Kim *et al.*, 2011). Il ruolo del tessuto

adiposo nel controllo dei livelli ematici dei POP è stato ulteriormente supportato da diversi studi. Lim e collaboratori (2010), hanno dimostrato che esiste una correlazione inversa tra i cambiamenti del peso ed i livelli sierici di tali inquinanti. Quindi il dimagrimento comporterebbe una riduzione della concentrazione dei POP nel tessuto adiposo (Jandacek *et al.*, 2005), viceversa un aumento della massa grassa indurrebbe una riduzione del loro tasso di eliminazione (Michalek e Tripathi., 1999) (Ronn *et al.*, 2011).

Il tessuto adiposo oltre a svolgere un ruolo chiave nel metabolismo lipidico, ha anche un'azione endocrina, secernendo un gran numero di proteine, collettivamente definite adipochine, che influenzano il metabolismo sistemico e locale e il pathway infiammatorio. Tra queste la leptina (dal greco leptos, magro), un piccolo ormone codificato dal gene Ob, che è ampiamente coinvolto nella regolazione del metabolismo lipidico e del dispendio energetico (Banks, 2004) (Figura 5).

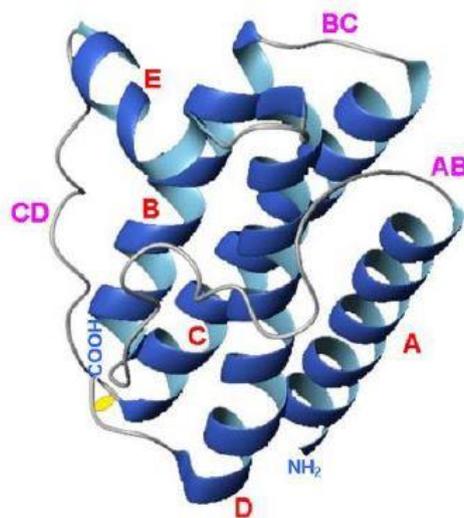


Figura 5. Struttura tridimensionale della leptina

Gli adipociti sono i principali produttori di leptina, secreta in maniera proporzionale alla massa di tessuto adiposo e allo stato nutrizionale (Zhang *et al.*, 2002), con implicazioni importanti per il processo di regolazione dell'appetito. Quando l'individuo si trova in uno stato di digiuno, vengono sfruttati i depositi di grasso come riserva di energia e quindi la secrezione di leptina da parte degli adipociti diminuisce. In tal modo giunge all'ipotalamo il segnale che le riserve adipose stanno terminando e quindi occorre aumentare l'assunzione

di cibo e ridurre la spesa energetica. Al contrario, quando le riserve lipidiche aumentano in seguito ad un pasto, gli adipociti accelerano la sintesi di leptina per segnalare all'ipotalamo che occorre ridurre l'assunzione di cibo. La leptina diminuisce il senso della fame (effetto anoressizzante) ed aumenta la spesa energetica, favorendo la riduzione del peso corporeo e della massa grassa (Crujeiras *et al.*, 2015). Problemi nella sintesi e secrezione della leptina causano un mancato controllo dell'appetito e possono condurre all'obesità in quanto l'individuo agisce come se l'organismo fosse in uno stato permanente di digiuno. Infatti, molti casi di obesità sono associati ad un aumento dei livelli circolanti di questo ormone mentre restrizione calorica e perdita di peso si associano ad una riduzione dei suoi livelli sierici (Kershaw e Flier., 2004). La leptina svolge la sua funzione legandosi alla sua isoforma recettoriale ObRb presente anche a livello del tessuto adiposo. L'mRNA del recettore ObRb è espresso principalmente nelle regioni del cervello che controllano l'assunzione di cibo, ossia i neuroni del nucleo arcuato dell'ipotalamo. Esso è prodotto in diverse forme varianti (Figura 6).

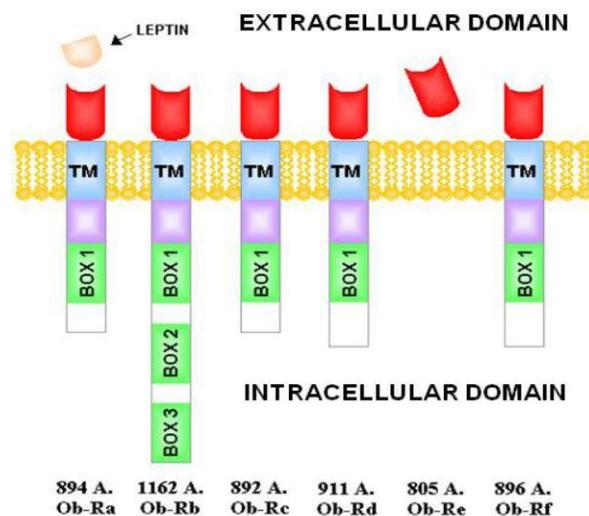


Figura 6. Strutture ed isoforme del recettore della leptina.

L'isoforma lunga ObRb, espressa a livelli elevati nell'ipotalamo, è considerata, l'unica variante funzionalmente attiva in quanto presenta dei motivi intracellulari assenti in tutte le altre isoforme, necessari per l'attivazione della via di trasduzione del segnale della chinasi associata alla famiglia Janus (JAK) e dei trasduttori del segnale e attivatori della trascrizione

(STAT), responsabile dell'attività biologica dell'ormone. Quando la leptina interagisce con ObRb, essa causa un cambiamento conformazionale del recettore che espone il dominio di legame per la tirosinchinasi JAK-2 che media le fosforilazioni successive. JAK-2 attivato si autofosforila e fosforila il recettore creando dei siti a cui si legano le proteine STAT in particolare STAT 3, un trasduttore del segnale ed attivatore della trascrizione. STAT 3 viene anch'esso fosforilato da JAK-2, dimerizza e va a legarsi a sequenze specifiche di DNA, promuovendo l'espressione di alcuni geni. Ad inibire la trasmissione del segnale via JAK/STAT, indotta dall'interazione tra la leptina e il recettore, è deputato SOCS3 (Suppressor of Cytokine Signaling Proteins) che lega JAK-2 e inibisce la fosforilazione del recettore (Ramadhinara *et al.*, 2008). Oltre a SOCS-3, anche la fosfatasi dei residui tirosinici delle proteine (PTP1B) è un regolatore negativo del signaling della leptina, nonché di quello dell'insulina. Tale fosfatasi defosforila JAK-2, riducendo la sensibilità all'ormone (Bence *et al.*, 2006).

Gli effetti della leptina sul tessuto adiposo sono orchestrati dall'adenosina monofosfato chinasi (AMPK), una chinasi che regola il metabolismo e il bilancio energetico. L'AMPK attivato permette alla leptina di metabolizzare gli acidi grassi in quanto contemporaneamente all'attivazione dell'AMPK, la leptina sopprime l'attività di acetil-CoA carbossilasi (ACC), un enzima coinvolto nella biosintesi endogena di acidi grassi. Quest'ultimo effetto determina il trasporto degli acidi grassi nei mitocondri e quindi la loro β -ossidazione.

Partendo da queste premesse, è stato valutato nella presente ricerca l'effetto dei PCB-NDL 101, 153 e 180 da soli o in associazione sulla funzionalità degli adipociti maturi impiegando concentrazioni finali di trattamento stabilite nel range dei livelli residuali evidenziati in diversi studi di monitoraggio. Queste condizioni sperimentali hanno lo scopo di mimare le condizioni naturali di esposizione degli organismi superiori. Diverse ragioni spiegano il nostro interesse nei confronti dei tre congeneri impiegati. Innanzitutto la maggior parte degli studi funzionali condotti su cellule adipose hanno riguardato esclusivamente i DL-PCB e il PCB 153. A tutt'oggi mancano studi *in vitro* concernenti gli effetti sul metabolismo lipidico di altri PCB-NDL quali il PCB 101 e il PCB 180, che insieme al PCB 153 costituiscono tre dei sei congeneri indicatori più frequentemente rilevati nelle matrici ambientali e alimentari (principalmente alimenti di origine animale) (Ferrante *et al.*, 2010; Törnkvist *et al.*, 2011). Inoltre, di particolare interesse risulta il dato epidemiologico che indica come questi

congeneri sono anche quelli più frequentemente riscontrati, e alle più alte concentrazioni, nel siero e nel tessuto adiposo umano (Malarvannan *et al.*, 2013). Alterando la differenziazione, il metabolismo e le funzioni del tessuto adiposo questi inquinanti potrebbero influenzare non solo il ruolo fisiologico di tale tessuto, ma anche lo sviluppo di malattie associate all'obesità (Casals-Casas e Desvergne., 2011).

Le cellule utilizzate nella ricerca, le 3T3-L1, sono fibroblasti murini indotti alla differenziazione in adipociti maturi. In particolare è stato esaminato l'effetto dei PCB sull'accumulo lipidico e sull'espressione del PPAR γ (peroxisome proliferator-activated receptor), un importante marker del differenziamento adipocitario. Successivamente è stato analizzato l'effetto dei PCB sull'espressione della leptina, sulla isoforma recettoriale ObRb e sulla via di segnalamento dell'ormone attraverso l'analisi di STAT3, SOCS-3 e PTP1B. Inoltre è stato valutato l'effetto dei contaminanti sulla modulazione del pathway di segnalamento a valle del recettore AMPK/ACC.

2.2 DESCRIZIONE DEI MATERIALI E DELLE METODOLOGIE APPLICATE

2.2.1 Analisi dei livelli di OC nel latte di asina e correlazione con il grado di infestazione da strongili intestinali

2.2.1.1 Campionamento

È stato effettuato nel periodo compreso tra gennaio e luglio 2013. Sono state raccolte 56 unità campionarie di cui 42 in allevamenti dislocati sul territorio della provincia di Salerno (Pontecagnano, Giffoni Valle Piana e Oliveto Citra), 6 della provincia di Caserta (S.Maria Capua Vetere) e diverse unità campionarie sono state prelevate anche da allevamenti della Basilicata (Potenza) e Calabria (Cosenza) (Figura 7)



Figura 7. La figura evidenzia le aree di campionamento (cerchiate in nero).

E' stato campionato latte destinato al consumo alimentare umano prodotto da animali soggetti ad una alimentazione mista con mangime concentrato e pascolo. L'età media delle asine era in media superiore a sette anni. Tutti gli animali erano in buono stato di salute prima e durante la gravidanza e quindi l'allattamento.

Il latte prelevato è stato posto in contenitori di polietilene; immediatamente refrigerato su ghiaccio per consentire l'invio dei campioni in idonee condizioni. Giunti al laboratorio di Tossicologia, sono stati suddivisi in aliquote di 10 ml ciascuna e conservati a -20°C fino al momento dell'analisi chimica. Per ciascun campione si è proceduto alla registrazione dei dati riguardanti l'animale produttore (provenienza, età, fase della lattazione, parti, alimentazione, ecc). Le fasi di campionamento e di

stoccaggio si sono svolte in modo da ridurre al minimo le possibilità di una contaminazione e qualsiasi alterazione che potesse pregiudicare il risultato delle analisi.

2.2.1.2 Reagenti

Tutti i solventi: esano, acetonitrile, etanolo, metanolo, isottano, toluene, etilacetato per pesticidi, della ROMIL e la C18 isolate, 40-60 mesh, precedentemente attivata, sono stati acquistati dalla Delchimica Scientific Glassware. Il Sodio solfato anidro è stato acquistato dalla Sigma Aldrich (St. Louis, Missouri). Le cartucce extrelut-3, Cartucce extrelut-1 ed il Florisil PR, 60-100 mesh sono stati acquistati dalla VWR International. Gli standard di PCB sono stati acquistati dalla LabService (Bologna).

2.2.1.3 Metodica analitica

Per la procedura analitica concernente la ricerca di pesticidi organoclorurati e bifenili policlorurati nel latte di asina ci si è basati sulla metodica descritta da Di Muccio *et al.* (1997), alla quale sono state apportate opportune modifiche. Le varie fasi prevedono una iniziale estrazione della porzione lipidica dalle matrici organiche in esame, una successiva purificazione della stessa, e il frazionamento dell'estratto per permetterne una migliore lettura tramite gas-cromatografo munito di rilevatore a cattura di elettroni (GC/ECD).

I fase) Estrazione liquido/liquido

Dopo scongelamento del campione, posto in frigorifero la sera prima dell'analisi, l'aliquota (10 ml) è stata posta in un provettone da centrifuga, in vetro da 60 ml con tappo a vite, a cui sono stati addizionati, dopo sonicazione in bagnetto ad ultrasuoni termostato per 15 minuti, 20ml di esano, 5ml di acetonitrile ed 1ml di etanolo. L'estrazione dei grassi è stata ottenuta mediante agitazione manuale del campione per 2 min. e successiva centrifugazione per 4 min. a 2000 r.p.m per ottenere la separazione delle fasi. Il surnatante ottenuto è stato prelevato e posto in una colonna in vetro (200x20 mm di diametro interno con un restringimento di 55x5mm i.d) contenente 20 gr di sodio solfato anidro e raccolto in un pallone da vuoto precedentemente pesato.

L'estrazione è stata ripetuta altre 2 volte con 20ml di esano per ottimizzare il processo di estrazione. L'eluato ottenuto è stato portato a secco in rotavapor, (t° del bagnetto 35°/40°C) fino ad un volume di 1-2 ml e poi manualmente, per permettere il calcolo gravimetrico del grasso estratto eseguito per differenza.

II fase) Ripartizione acetonitrile/esano

Il grasso estratto è stato ripreso con esano e trasferito in una cartuccia Extrelut-3 (contenente polvere di diatomea a diversa granulometria). Successivamente, l'esano è stato rimosso dalla cartuccia mediante flusso d'azoto. Al di sotto della cartuccia Extrelut-3 è stata posizionata una seconda cartuccia di tipo Extrelut-1 modificata con l'aggiunta di C₁₈. Il sistema combinato di cartucce è stato eluito con acetonitrile e l'eluato raccolto in un pallone da vuoto. Successivamente, previa aggiunta di 4 ml di metanolo, l'eluato è stato portato a secco fino alla quantità di circa 1 ml in rotavapor (con bagnetto a 40°C) e poi manualmente.

III fase) Cromatografia di adsorbimento su colonna con florisil attivato

Una colonna cromatografica in vetro (30 cm x 10 mm i.d. con un rubinetto in PTFE ed estremità inferiore maschio) è stata impaccata con 2,5 g di florisil attivato in stufa a 130° per 14 h, al di sopra del quale è stato posto uno strato di 1 cm di sodio solfato anidro, e condizionata con 15 ml di esano. L'estratto precedentemente ottenuto è stato sciolto in 1 ml di esano e trasferito nella colonna cromatografica. Si è proceduto, quindi, alla raccolta delle due frazioni del campione. L'eluizione è avvenuta secondo il seguente schema:

1^a F: 30 ml di esano

2^a F: 25 ml di esano-toluene, 80:20 v/v

Ciascuna frazione è stata raccolta in un pallone da vuoto ed è stata portata completamente a secco in rotavapor (T° del bagnetto 40°C per la 1^a F e 50°C per 2^a F) con flusso leggero di azoto. Alla prima frazione è stato aggiunto isottano come "keeper". Ogni frazione è stata ripresa con un volume fisso di cicloesano contenente lo standard interno (PCB 209) alla concentrazione di 30 ppb. Successivamente, 1 µl di ciascuna frazione è stato iniettato nel gascromatografo Carlo Erba 5160 Serie Mega

munito di detector a cattura di elettroni ^{63}Ni (ECD). L'iniezione del campione è stata eseguita mediante tecnica cold on-column.

Le condizioni operative dell'apparecchio sono state le seguenti:

- gas carrier: elio (pressione in testa alla colonna di 55 kPa);
- gas di make up: azoto (flusso 40 ml/min.);
- temperatura del detector: 310°C.;
- temperatura programmata: isoterma iniziale a 60°C per 10 min; fino a 170°C incremento di 15°C/min; fino a 215°C incremento di 10°C/min; fino a 260°C incremento di 20°C/min; isoterma di 5 min.

Per ciascuna unità campionaria sono stati misurati i livelli di concentrazione di cinque OCP (HCB, *p,p'*-DDT e i suoi metaboliti quali *p,p'*-DDE, *o,p'*-DDE, *p,p'*-DDD, *o,p'*-DDD e *o,p'*-DDT) e diciannove isomeri di PCB non dioxin-like, (n. 28, 52, 74, 66, 101, 99, 146, 153, 138, 128, 187, 183, 177, 180, 170, 201, 194, 196) oltre ai non-ortho PCB-DL n. 77, 126 e 169 e ai mono-ortho PCB-DL n. 105, 118, 156, 157 e 167. Tra i suddetti PCB presi in esame, i congeneri non diossino-simili PCB 28, 52, 101, 138, 153, 180 sono stati identificati dalla comunità scientifica internazionale come i sei congeneri "indicatori" (regolamento UE 1259/2011) in quanto la somma di questi PCB risulta essere predominante rispetto agli altri congeneri nelle varie matrici ambientali e alimentari studiate quindi consentendo di effettuare una stima molto attendibile dei livelli complessivi dei PCB non diossino simili.

Per l'identificazione degli analiti ci si è basati sui relativi tempi di ritenzione, ottenuti tramite l'analisi di soluzioni standard dei singoli composti e verificati giornalmente mediante l'esame di una soluzione standard costituita da un mix delle varie sostanze a concentrazioni note. Le singole soluzioni standard di base, ottenute dall'Ehrenstorfer Company (Asburgo, Germania), avevano una concentrazione di 10 ng/μl in cicloesano (o isotano in alcuni casi); a partire da tali soluzioni sono state poi preparate miscele a 5 differenti concentrazioni (1, 5, 10, 50 e 100 ppb) impiegate per costruire idonee curve di calibrazione. La quantificazione delle concentrazioni degli analiti è infatti avvenuta tramite paragone delle aree dei singoli picchi relativi ai composti presenti nel campione con quelle dei picchi presenti nei cromatogrammi di riferimento dei mix

standard. Per ottimizzare tale comparazione, e per annullare l'influenza di errori umani nel prelievo delle aliquote da iniettare, è stato utilizzato il metodo dello standard interno. Quest'ultimo consiste nell'aggiungere ai campioni da analizzare una quantità fissa e nota di un composto che abbia comportamento simile a quello degli analiti, ma che sia facilmente distinguibile da essi nel tracciato cromatografico e che non sia normalmente presente nelle matrici considerate. In questo caso la scelta è ricaduta sul PCB 209, addizionato ai campioni nella quantità di 30 ng, e presente in concentrazione costante anche nei diversi mix standard.

Le operazioni di integrazione delle aree dei picchi cromatografici, come anche quelle relative al successivo calcolo delle concentrazioni, sono state effettuate impiegando uno specifico software (Chrom-card, Thermo Finnigan).

Per verificare l'efficienza della metodica estrattiva, campioni presumibilmente non contaminati (bianchi) quali latti per la prima infanzia, sono stati impiegati per effettuare prove di recupero aggiungendo rispettivamente 5, 10 o 50 ng di ciascun analita (escluso il PCB 209) a 3 diverse aliquote. I campioni sono stati poi estratti in triplicato secondo la metodica sopra descritta. Il recupero medio percentuale per i singoli POC e PCB ricercati oscillava tra il 87 ed il 105%. Inoltre, sono state effettuate analisi con specifiche matrici certificate (latte in polvere BCR-188 e BCR-450 per l'analisi, rispettivamente, dei POC e dei PCB, fornita dall'Institute for Reference Materials and Measurements). Le deviazioni standard rispetto ai valori certificati erano inferiori al 10%.

Il limite di rilevazione (LOD) per i pesticidi organoclorurati e i bifenili policlorurati era compreso tra 0.08-0.60 ng/g. Quando le quantità rilevate erano inferiori a tali limiti sono state indicate come non determinabili (n.d.).

I risultati sono stati poi espressi come concentrazioni su base lipidica o fat weight (ng/g f.w.), ottenuta dividendo i valori rilevati per il quantitativo di grasso estratto dal relativo campione di origine, e sul tal quale o wet weight (ng/g w.w.), rapportando i precedenti dati alla percentuale lipidica del campione. L'espressione della concentrazione sul tal quale consente la comparazione dei dati con i limiti massimi residuali (LMR) stabiliti a livello europeo per i composti di interesse nella matrice studiata; la scelta di esprimere le concentrazioni anche su base lipidica è derivata dalla

necessità di normalizzare le stesse al fine di poter meglio paragonare i livelli di inquinanti lipofili presenti in matrici con differenti quantitativi di grasso corporeo. Abbiamo usato la sigla $\Sigma 6\text{PCB}$ e $\Sigma 7\text{PCB}$ per indicare, rispettivamente, la somma delle concentrazioni dei picchi risolti relative ai soli 6 congeneri di “PCB indicatori” e questi in associazione con il PCB 118; con $\Sigma 20\text{PCB}$ la somma di tutti i congeneri analizzati cioè i sei PCB marcatori e gli altri ricercati. La sigla ΣDDT si riferisce alla somma delle concentrazioni di *p,p'*-DDT, *p,p'*-DDE e *p,p'*-DDD.

2.2.1.4 Conta degli strongili intestinali

La conta degli strongili intestinali sottoposte a campionamento è stata effettuata con la metodica modificata da McMaster (Cringoli *et al.*, 2004) con sensibilità di 10 UPG. Il risultato è stato espresso come numero di uova per grammo di feci

2.2.1.5 Analisi statistica

L'analisi statistica è stata condotta rispetto alle concentrazioni degli OC espresse sia su ww che su lw. I dati sono stati preliminarmente analizzati attraverso le statistiche descrittive quali media e deviazione standard. La significatività statistica è stata misurata in termini del valore di probabilità (*p*-value): è stata rigettata l'ipotesi nulla quando il *p*-value era inferiore a 0.05. L'analisi di regressione è stata invece impiegata per analizzare la relazione tra la concentrazione dei PCB/POC e il numero di strongili intestinali degli animali dai quali è stato prelevato il latte campionato.

2.2.2 Studio in vitro della modulazione della risposta immunitaria indotta dai PCB-NDL

2.2.2.1 Reagenti

Il 2,2',4,5,5'-pentaclorobifenile (PCB 101), il 2,2',4,4',5,5'-esaclorobifenile (PCB153) e il 2,2',3,4,4',5,5'-eptaclorobifenile (PCB180) (con una purezza del 99%) sono stati acquistati dalla Sigma Aldrich (St. Louis, Missouri). Il DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium) senza rosso fenolo, il siero fetale bovino (FBS) e i suoi

supplementi sono stati acquistati da Lonza (Walkerville, Maryland, USA). Il lipopolisaccaride di *Escherichia coli* (LPS, sierotipo 0111: B4) è stato fornito dalla Fluka (Milano, Italia). L'anticorpo anti-ciclossigenasi-2 (COX-2) è stato acquistato dalla Cayman Chemical (Ann Arbor, Michigan, USA). L'anticorpo anti monossido d'azoto (NO) sintasi inducibile (iNOS) è stato fornito dalla BD Biosciences Transduction Laboratories (Lexington, Kentucky, USA). Laddove non sia diversamente specificato, tutti i reagenti e composti sono stati ottenuti dalla Sigma Chemicals Company (Sigma, Milano, Italia).

2.2.2.2 Colture Cellulari

Per questo studio sono stati utilizzati macrofagi murini della linea cellulare continua J774A.1. Le cellule J774A.1 (BALB/c) sono state acquistate dalla European Collection of Animal Cell Cultures (Salisbury, Wiltshire, UK), tenute in coltura in piastre (P100) dalla superficie di 75 cm² ed incubate a 37°C in atmosfera umidificata con una pressione parziale di CO₂ pari al 5%. Il mezzo di coltura completo era costituito da DMEM supplementato con FBS al 10%, penicillina (100 U/ml), streptomina (100 µg/ml), L-glutamina (2 mM) e HEPES (25 mM).

2.2.2.3 Schema di trattamento

Le cellule J774.A1 sono state staccate meccanicamente e piastrate. Dopo 4 ore di adesione, le stesse cellule sono state poste in "starvation" per 2 ore con il mezzo al 5% di FBS, DMEM senza rosso fenolo.

Le cellule poi, sono state stimolate con LPS (10 ng/ml) ed incubate con i PCB. I PCB sono stati sciolti in dimetilsolfossido (DMSO) puro ottenendo una soluzione madre alla concentrazione di 10mM. La concentrazione finale di DMSO in tutti i trattati e nei controlli era dello 0.1% (v/v). Questa percentuale di DMSO permetteva la solubilizzazione ottimale dei PCB nelle soluzioni acquose. I PCB sono stati utilizzati da soli alla concentrazione di 300nM e in associazione secondo le seguenti concentrazioni: 150nM PCB_x +150nM PCB_y per la combinazione di 2 PCB e 100nM PCB 101, 100nM PCB 153 e 100nM PCB 180 quando utilizzati insieme (per ottenere

una concentrazione finale costante 300nM). Sono state scelte le concentrazioni nanomolari di PCB perché non modificavano in maniera significativa la vitalità cellulare. Infatti è stato precedentemente dimostrato che, a concentrazioni più elevate, tali composti chimici causavano morte cellulare (Ferrante *et al.*, 2011). Inoltre queste concentrazioni sono state comprese nell'intervallo di concentrazioni riscontrate nel siero umano in alimenti di origine animale campionati in aree geografiche caratterizzate da un evidente impatto antropico (Ferrante *et al.*, 2010).

2.2.2.4 Prelievo macrofagi peritoneali

Per questo studio sono stati utilizzati anche macrofagi residenti prelevati da due differenti animali donatori, ratti maschi Wistar (200g) (Charles River) tramite lavaggio peritoneale con una soluzione salina sterile contenente penicillina (100U/ml) e streptomicina (100µg/ml). Dopo centrifugazione a 2400 rpm per 10 minuti, i macrofagi peritoneali sono stati sospesi in un mezzo composto da DMEM privo di rosso fenolo, con glutammina 2mM, HEPES 25 mM, penicillina (100U/ml), streptomicina (100µg/ml), FBS al 10% e sodio piruvato al 1.2%, posti in piastre P60 (3x10⁶) ed incubati per 3 ore a 37°C in atmosfera umidificata con una pressione parziale di CO₂ pari al 5%. In seguito, le cellule non adese alla piastra sono state rimosse mediante lavaggio mentre quelle adese sono state poste in “starvation” nel mezzo al 5% di FBS, DMEM senza rosso fenolo. Dopo 2 ore, le cellule sono state stimolate con LPS (1µg/ml) ed incubate con i PCB in associazione a due a due o tutti e tre insieme, secondo lo schema di trattamento precedentemente riportato.

2.2.2.5 Determinazione della vitalità cellulare

La vitalità dei macrofagi è stata valutata attraverso il saggio di citotossicità con il 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio bromuro (MTT), un test che permette di riconoscere i mitocondri funzionali nelle cellule vitali. Questo sale solubile di tetrazolio, di colore giallo, viene convertito nella forma insolubile (sale di formazano) di colore amaranto dalle deidrogenasi mitocondriali delle cellule vitali, per cui la misura spettrofotometrica dell'assorbanza del campione è funzione della quota di colorante convertito dalle cellule vive (Mosmann, 1983). La quota di cellule vitali nei

campioni trattati con i PCB è stata paragonata a quella delle cellule di controllo trattate con il veicolo. Dopo aver staccato meccanicamente le cellule, queste sono state poste in piastre da 96 pozzetti in numero di 3×10^4 /150 μ l/pozzetto in mezzo completo (DMEM al 10% di FBS). Dopo 4 ore di adesione, le cellule sono state incubate in DMEM al 5% di FBS per 2 ore e solo successivamente trattate con PCB a concentrazioni crescenti (100nM-10 μ M) da soli o in presenza di LPS (10ng/mL). Dopo 24h di incubazione a 37°C sono stati aggiunti 25 μ l di MTT alla concentrazione di 5mg/ml in ogni pozzetto; trascorse 3h le cellule sono state lisate con 100 μ l di un tampone lisante costituito da sodio dodecil solfato (20% w/v) a pH 4.5 e dimetilformamide (50% v/v), per permettere la solubilizzazione dei cristalli scuri. Dopo un'incubazione di 20 ore a 37°C, la densità ottica dei campioni (OD₆₂₀) trattati con diverse diluizioni seriali di PCB da soli o in associazione con LPS è stata confrontata con quella dei pozzetti di controllo in modo da stimare la vitalità cellulare che è stata calcolata come % di cellule morte = $100 - (\text{OD trattate} / \text{OD controllo}) \times 100$.

2.2.2.6 Determinazione del rilascio delle citochine

Il rilascio delle citochine da parte delle cellule macrofagiche è stato valutato sia nelle cellule J774A.1 (a 4 ore e a 24 ore) che nei macrofagi peritoneali primari (solo a 24 ore). A 4h è stato analizzato il rilascio delle citochine pro-infiammatorie negli estratti di cellule mediante real-time PCR; a 24 ore invece è stato determinato e misurato il loro rilascio nei surnatanti cellulari mediante Kit ELISA.

2.2.2.7 Analisi semi-quantitativa Real-time PCR

Dopo 4 ore di incubazione con i PCB, da soli o in associazione, in presenza di LPS, l'RNA totale è stato estratto dalle cellule J774A.1 con un metodo modificato di Chomczynski e Sacchi (1987), usando il Trizol Reagent (Invitrogen Biotecnologie), seguendo il protocollo di fabbricazione. Il cDNA è stato sintetizzato usando un kit di retrotrascrizione (MaximaFirst Strand cDNA Synthesized Kit, Fermentas, Ontario, Canada) a partire da 2 μ g di RNA totale. Le PCR sono state eseguite con l'apparecchiatura Bio-Rad CFX96 Connect Real-time PCR System ed il software (Bio-Rad Laboratories). Le sequenze dei primer utilizzati sono riportati in Tabella 4.

Target gene	Forward primer (5'→3')	Reverse primer (3'→5')	Accession number
IL-6	5'-ACAAGTGGGAGGCTTAATTACACAT-3'	3'-TTGCCATTGCACAACCTCTTTTC-5'	NM_031168.1
TNF- α	5'-CATCTTCTCAAAACTCGAGTGACAA-3'	3'-TGGGAGTAGATAAGGTACAGCCC-5'	NM_013693.3
MCP-1	5'-CCCACTCACCTGCTGCTACT-3'	3'-TCTGGACCCATTCTTCTTG-5'	NM_011333.3
GAPDH	5'-AACTTTGGCATTGTGGAAGG-3'	3'-GGATGCAGGGATGATGTTCT-5'	NM_008084.2

Tabella 4. Sequenze primer per Real-time PCR

La reazione di amplificazione prevedeva i seguenti passaggi:

10 minuti a 95°C seguiti da 40 cicli di denaturazione a due fasi a 95°C per 15 secondi e annealing a 60 °C per 60 secondi. Ogni campione conteneva 1-100ng cDNA in una Master Mix 2X Power SYBRGreen PCR (Applied Biosystem) e 200 nmol/l di ciascun primer (Eurofins MWG Operon, Huntsville, AL) con un volume finale di 25 μ L.

L'espressione relativa di ciascun mRNA studiato è stata normalizzata utilizzando la gliceraldeide 3-fosfato deidrogenasi (GAPDH) come gene housekeeping e i dati sono stati analizzati in accordo con il metodo del $2^{-\Delta\Delta CT}$.

2.2.2.8 Determinazione del rilascio di citochine mediante Kit ELISA

Dopo 24 ore d'incubazione con LPS in presenza o in assenza dei PCB, è stato valutato il rilascio di IL-6, TNF- α e MCP-1 nei surnatanti dei macrofagi peritoneali e delle cellule J774A.1. I livelli delle citochine sono stati valutati utilizzando kit ELISA secondo le istruzioni fornite dalla casa produttrice (Thermo Scientific, Rockford, Illinois). La concentrazione delle citochine di ciascun campione è stata determinata mediante estrapolazione dalla curva standard di ciascuna citochina ed è stata espressa in ng o pg/mL.

2.2.2.9 Analisi Western Blot

Espressione della COX-2, della iNOS e dei nitriti: per valutare l'espressione della COX-2 e della iNOS da parte dei macrofagi peritoneali e delle J774A.1 dopo 24 ore di incubazione con i PCB, le cellule sono state lavate due volte con PBS freddo e lisate su ghiaccio utilizzando un tampone lisante [Tris-HCl 20mM pH7.5, NaF 10mM, NaCl 150mM, Nonidet P-40 1%, fenilmetilsulfonilfluoruro 1mM, Na₃VO₄ 1mM, leupeptina 10µg/ml]. Dopo un'ora, gli omogenati sono stati centrifugati a 20.000g per 15 minuti a 4°C.

Per l'analisi Western blot, la fase preliminare di determinazione della concentrazione proteica è stata condotta con il Bio-Rad protein assay usando come concentrazione di riferimento nota quella dell'albumina sierica bovina (BSA).

I lisati cellulari sono stati diluiti utilizzando la soluzione di Laemmli, bolliti per 5 minuti a 95°C e sottoposti ad elettroforesi su gel di acrilamide al 10% in presenza di sodio dodecil solfato (SDS). Le proteine separate sono state poi trasferite dal gel su una membrana di nitrocellulosa (PROTAN®) mediante un apparato di trasferimento semi-dry (Bio-Rad) con amperaggio costante di 240 mA per 45 minuti a temperatura ambiente. Il legame aspecifico è stato poi bloccato trattando la membrana con una soluzione di PBS 1X al 5% di latte scremato per 40 min a temperatura ambiente. La membrana è stata quindi incubata con l'anticorpo primario diluito in una soluzione di PBS 1X al 5% di latte scremato e allo 0,1% di Tween 20, overnight. Sono stati utilizzati gli anticorpi COX-2 (1:500) e iNOS (1:1000). La membrana, poi, è stata incubata con l'appropriato anticorpo secondario legato alla perossidasi di rafano (HRP) per 1 ora a temperatura ambiente. Le bande proteiche sono state visualizzate con il dispositivo Image Quant-800 utilizzando metodiche di chemiluminescenza (ECL-Kit, Amersham). Western blot per β-actina o GAPDH è stato eseguito per assicurarsi di un uguale caricamento dei campioni. Le bande proteiche sono state sottoposte ad analisi densitometrica con il dispositivo GS-700 (Bio-Rad Laboratories, Milano, Italia).

2.2.2.10 Determinazione dei nitriti nei surnatanti

Per la valutazione dell'accumulo dei nitriti, dopo 24 ore di incubazione con i PCB, questi sono stati misurati nel surnatante delle J774A.1 e nei macrofagi peritoneali mediante la reazione di Griess. 100 μ L di surnatante cellulare è stato aggiunto a 100 μ L di reattivo di Griess [0.1% (w/v) naftiletilendiammina-HCl e 1% (w/v) sulfanilamide in 5% (v/v) acido fosforico (vol.1:1)]. L'OD550 nM è stata misurata usando un lettore di micropiastre Titertek. La concentrazione dei nitriti di ciascun campione è stata determinata mediante regressione lineare da una curva standard nitrito di sodio preparata utilizzando il terreno di coltura ed espressa in unità micromolare.

2.2.3 Studio in vitro della modulazione del metabolismo lipidico e della leptino-resistenza indotta dai PCB-NDL

2.2.3.1 Reagenti

L'insulina (INS), desametasone (DEX) isobutil-metilxantina (IBMX), Oil Red O, isopropanolo sono stati acquistati da Sigma Chemicals Company (Sigma, Milano, Italia).

2.2.3.2 Colture cellulari e differenziamento adipocitario

Le cellule 3T3-L1, fibroblasti murini, acquistati dall'European Collection of Animal Cell Cultures (Salisbury, Wiltshire, U.K.), sono state poste in fiasche da 75 cm² con mezzo di coltura DMEM supplementato con FBS al 10%, penicillina (100 U/ml) e streptomicina (100 μ g/ml). Le cellule sono stata incubate a 37 °C in atmosfera umidificata con una pressione parziale di CO₂ pari al 5%. La procedura standard (SP) di differenziamento adipogenico è mostrata nella Figura 8. Le cellule 3T3-L1 sono state coltivate alla confluenza. Alla confluenza (ID 0), le cellule sono state incubate con il mezzo inducente l'adipogenesi (MD I) (DMEM supplementato con 10 μ g/mL INS, IBMX 0,5 μ M, 10 μ M DEX e 10% FBS) per due giorni (ID 2). Il mezzo è stato poi cambiato con DMEM al 10% FBS implementato con 10 μ g/mL di INS (MD II)

per due giorni (ID 4), seguito da DMEM con 10% FBS (MD III) per altri 3 giorni (ID 7). (Madsen *et al.*, 2003). Per definire gli effetti di PCB NDL in adipociti maturi, le cellule sono state trattate con PBC 101, 153 180 da soli (1 μ M) o in combinazione (1 μ M) per due giorni (ID 9).

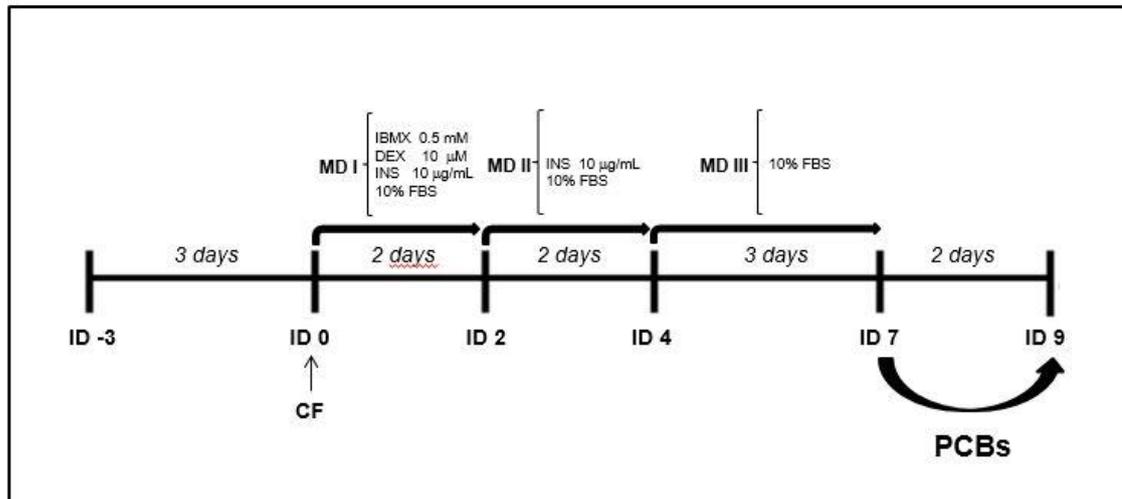


Figura 8. Protocollo per il differenziamento cellulare e trattamento. Viene mostrata la procedura standard di differenziamento adipogenico. Le cellule 3T3-L1 sono state coltivate a confluenza (CF) per tre giorni. Due giorni dopo la confluenza (ID0), le cellule sono state incubate in un mezzo inducente l'adipogenesi (MD I) [DMEM contenente 10 mM desametasone (DEX), 0.5 mM isobutylmethylxanthine (IBMX), 10 mg / insulina ml (INS), e il 10% FBS] per 2 giorni (ID2), poi nel mezzo di mantenimento (MD II) (DMEM contenente 10 μ g / ml INS e il 10% FBS) per 2 giorni (ID4), seguito da MD III (DMEM, 10% FBS) per altri 3 giorni (ID7). Per definire gli effetti di PCB in adipociti maturi, le cellule sono state trattate con PCB da ID-7 a ID9

2.2.3.3 Determinazione della vitalità cellulare

L'attività citotossica dei PCB 101, 153 e 180 sulle cellule 3T3-L1 è stata valutata attraverso il saggio di citotossicità con l'MTT. I preadipociti (8×10^3 / pozzetto) sono stati piastrati su piastre da 96 pozzetti in un volume finale di 100 microlitri e sono stati sottoposti allo stesso differenziamento adipogenico sopra riportato. All' ID7 gli adipociti maturi sono stati esposti ai PCB (10-100 nM and 1-10 μ M). Dopo due giorni d'incubazione, stati aggiunti 25 μ l di MTT alla concentrazione di 5mg/ml in ogni pozzetto; trascorse 3 ore le cellule sono state lisate con 100 μ l di una soluzione lisante (sodio dodecil solfato (20% w/v) a pH 4.5 e dimetilformamide (50% v/v), per permettere la solubilizzazione dei cristalli scuri. Dopo un'incubazione di 20 ore a 37°C, la densità ottica dei campioni (OD620) trattati con diverse diluizioni seriali di

PCB da soli o in associazione è stata confrontata con quella dei pozzetti di controllo in modo da stimare la vitalità cellulare che è stata calcolata come
 $\% \text{ di cellule morte} = 100 - (\text{OD trattate} / \text{OD controllo}) \times 100.$

2.2.3.4 Colorazione Oil Red O

L'accumulo dei lipidi negli adipociti è stato quantificato mediante colorazione Oil Red O (ORO) utilizzando il metodo Laughton leggermente modificato da Ramirez-Zacarias *et al.* (1992). I preadipociti sono stati piastrati in multiwell da 6 pozzetti (5×10^4 cells/well). In seguito al differenziamento adipogenico e l'esposizione ai PCB per 48 ore, monostrati di cellule sono stati lavati due volte con PBS e fissati in formaldeide al 10% (vol / vol) per 60 min a temperatura ambiente. Dopo due lavaggi con acqua distillata le cellule fissate sono state colorate con 1 ml per ogni pozzetto di una soluzione Oil Red O per 2 ore. Tale soluzione è stata preparata sciogliendo 0,5 g di ORO in 100 ml di isopropanolo assoluto e lasciata riposare per una notte e poi filtrata utilizzando carta da filtro Whatman n. 1. Il filtrato è stato poi diluito con acqua distillata (6:4 vol/vol), lasciato una notte a 4 ° C, e filtrato altre due volte. La soluzione colorante è stata scartata dalle cellule lavate tre volte con acqua distillata. L'assorbanza è stata misurata a 510 nm.

2.2.3.5 Analisi semi-quantitativa Real-time PCR

L'RNA totale dagli adipociti maturi trattati con PCB da soli o in associazione, è stato estratto con un metodo modificato di Chomczynski e Sacchi (1987), usando Trizol Reagent (Invitrogen Biotecnologie), seguendo il protocollo di fabbricazione. Il cDNA è stato sintetizzato usando un kit di retrotrascrizione (Maxima First Strand cDNA Synthesized Kit, Fermentas, Ontario, Canada) a partire da 2µg di RNA totale. Le PCR sono state eseguite con l'apparecchiatura Bio-Rad CFX96 Connect Real-time PCR System ed il software (Bio-Rad Laboratories) come precedentemente descritto da (Ferrante *et al.*, 2011). Le sequenze dei primer utilizzati sono riportati in Tabella 5.

Target gene	Forward primer (5'→3')	Reverse primer (3'→5')	Accession number
Ob	5'-TCTCCGAGACCTCCTCCATCT-3'	3'-TTCCAGGACGCCATCCAG-5'	NM_008493.3
ObRb	5'CCAGCACAATCCAATCACTAGT-3'	3'CGAATAGATGGATTATCGGGAA-5'	NM_146146.2
IL-6	5'ACAAGTGGGAGGCTTAATTACAAT-3'	3'-TTGCCATTGCACAACCTCTTTTC-5'	NM_031168.1
TNF- α	5'-CATCTTCTCAAAACTCGAGTGACAA-3'	3'-TGGGAGTAGATAAGGTACAGCCC-5'	NM_013693.3
Rn18S	5'-CGCGGTCTATTTTGTGGT-3'	3'-AGTCGGCATCGTTTATGTC-5'	NR_003278.3

Tabella 5. Sequenze primer Real Time PCR

La reazione di amplificazione prevedeva i seguenti passaggi:

10 minuti a 95°C seguiti da 40 cicli di denaturazione a due fasi a 95°C per 15 secondi e annealing a 60 °C per 60 secondi. Ogni campione conteneva 1-100ng cDNA in una Master Mix 2X Power SYBRGreen PCR (Applied Biosystem) e 200 nmol/l di ciascun primer (Eurofins MWG Operon, Huntsville, AL) con un volume finale di 25 μ L.

L'espressione relativa di ciascun mRNA studiato è stata normalizzata utilizzando la gliceraldeide 3-fosfato deidrogenasi (GAPDH) come gene housekeeping e i dati sono stati analizzati in accordo con il metodo del 2- $\Delta\Delta$ CT.

2.2.3.6 Analisi Western blot

Dopo 48h di incubazione con i PCB, gli adipociti maturi sono stati lavati due volte con PBS freddo, raccolti e risospesi in Tris-HCl (20 mM pH 7.5), fluoruro di sodio NaF (10 mM), cloruro di sodio NaCl (150 mM), Nonidet P-40 (1%), fenil metil sulfonil fluoruro PMSF 1 mM, sodio vanadato Na₃VO₄ 1 mM, leupetina e Trypsin inhibitor (10 μ g/ ml). Dopo 1h di incubazione, sono stati ottenuti i lisati cellulari per centrifugazione a 20.000 g per 15 minuti a 4°C. Le concentrazioni proteiche sono state determinate con il Bio-Rad protein assay usando come concentrazione nota di riferimento quella dell'albumina sierica bovina (BSA). Trenta microgrammi di proteine di lisato cellulare sono stati diluiti nella soluzione di Laemmli, bolliti per 5 minuti a 95°C e sottoposti ad elettroforesi su un gel di acrilamide al 15% in presenza di sodio dodecil solfato (SDS). Le proteine separate sono state poi trasferite dal gel su una membrana di nitrocellulosa (Protran®) mediante un dispositivo di trasferimento

semi-dry (Bio-Rad) ad amperaggio costante di 240 mA per 45 minuti a temperatura ambiente. La membrana è stata poi trattata con una soluzione di PBS 1X al 5% di latte scremato per 40 min a temperatura ambiente. Le analisi western blot sono state effettuate con specifici anticorpi, diluiti in una soluzione di PBS 1X al 5% di latte scremato e allo 0,1% di Tween 20, per: PPAR γ (1:1000), anti-PTP1B, anti-SOCS3 (1:1000; Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, CA), anti-phosphoAMPK α e anti-AMPK α (1:1000; Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA), anti-phospho-STAT3 e anti-STAT3 (1:1000; Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA), anti-phosphoACC e anti-ACC (1:1000; Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA). Le membrane sono state incubate con β -actina, per assicurarsi di un uguale caricamento dei campioni. Le bande proteiche sono state sottoposte ad analisi densitometrica con il dispositivo GS-700 (Bio-Rad Laboratories, Milano, Italia).

2.2.3.7 Analisi statistica

I dati di questa serie di esperimenti e degli esperimenti riguardanti lo studio della immunomodulazione indotta dai PCB sono stati elaborati statisticamente e presentati come media \pm SEM di almeno tre diversi esperimenti ciascuno con almeno tre osservazioni indipendenti. L'analisi statistica è stata eseguita usando il test ANOVA a una via seguito dal test di Student-Newman-Keuls o di Bonferroni per confronti multipli usando il GraphPad software. La significatività statistica è stata misurata in termini del valore di probabilità (p-value): è stata rigettata l'ipotesi nulla quando il p-value era inferiore a 0.05.

2.3 RISULTATI E DISCUSSIONE

2.3.1 Analisi dei livelli di OC nel latte di asina e correlazione con il grado di infestazione da strongili intestinali

I risultati relativi all'analisi delle concentrazioni residuali degli OC nel latte di asina mostravano la predominanza dei PCB (prevalentemente dei PCB-NDL) seguiti dai DDT e infine dall'HCB. Le concentrazioni medie dei PCB-NDL risultavano essere molto differenti tra le province esaminate pur rimanendo nello stesso ordine di grandezza (ppb) (Tabella 6, Figura 9).

Tabella 6. Medie (ng g^{-1}) \pm DS e range dei bifenilipoliclorurati espresse su lw e su ww.

		Salerno	Caserta	Potenza	Cosenza
$\Sigma 6\text{PCB}$	<i>LW</i>	114.71 \pm 157.34 (1.26-708.8)	75.84 \pm 61.46 (12.6-167.4)	261.6 \pm 88.46 (159-364.8)	271.85 \pm 173.14 (88.8-477.2)
	<i>WW</i>	0.16 \pm 0.19 (ND-0.71)	0.09 \pm 0.05 (0.03-0.17)	0.2 \pm 0.11 (0.11-0.36)	0.37 \pm 0.39 (0.17-0.95)
$\Sigma 12\text{PCB}$	<i>LW</i>	24.93 \pm 38.79 (ND-163.2)	17.29 \pm 17.04 (3.35-47.7)	67.95 \pm 19.23 (51-85.2)	81.3 \pm 57.16 (22.2-152.4)
	<i>WW</i>	0.03 \pm 0.04 (ND-0.16)	0.02 \pm 0.01 (0.01-0.05)	0.05 \pm 0.02 (0.03-0.08)	0.11 \pm 0.13 (0.04-0.3)
$\Sigma \text{PCB-NDL}$	<i>LW</i>	139.64 \pm 194.77 (1.26-872)	93.13 \pm 78.04 (16.05-215.1)	329.55 \pm 105.91 (210-448.8)	353.15 \pm 230.2 (111-629.6)
	<i>WW</i>	0.2 \pm 0.23 (ND-0.88)	0.11 \pm 0.06 (0.03-0.22)	0.25 \pm 0.14 (0.14-0.45)	0.48 \pm 0.52 (0.22-1.26)
$\Sigma \text{PCB-DL}$	<i>LW</i>	26.05 \pm 57.12 (ND-211.2)	3.4 \pm 5.9 (ND-14.4)	20.6 \pm 15.27 (ND-36.8)	42.45 \pm 31.43 (12.6-76.8)
	<i>WW</i>	0.03 \pm 0.06 (ND-0.21)	0 \pm 0.01 (ND-0.01)	0.01 \pm 0.02 (ND-0.04)	0.05 \pm 0.05 (0.01-0.12)

Nota: $\Sigma 6\text{PCB}$ corrisponde alla somma dei sei congeneri indicatori; $\Sigma 12\text{PCB}$ corrisponde alla somma dei rimanenti congeneri di PCB NDL; ΣNDLPCB è la somma di tutti i PCBNDL; ΣDLPCB è la somma degli otto congeneri di PCB diossino simili misurati.

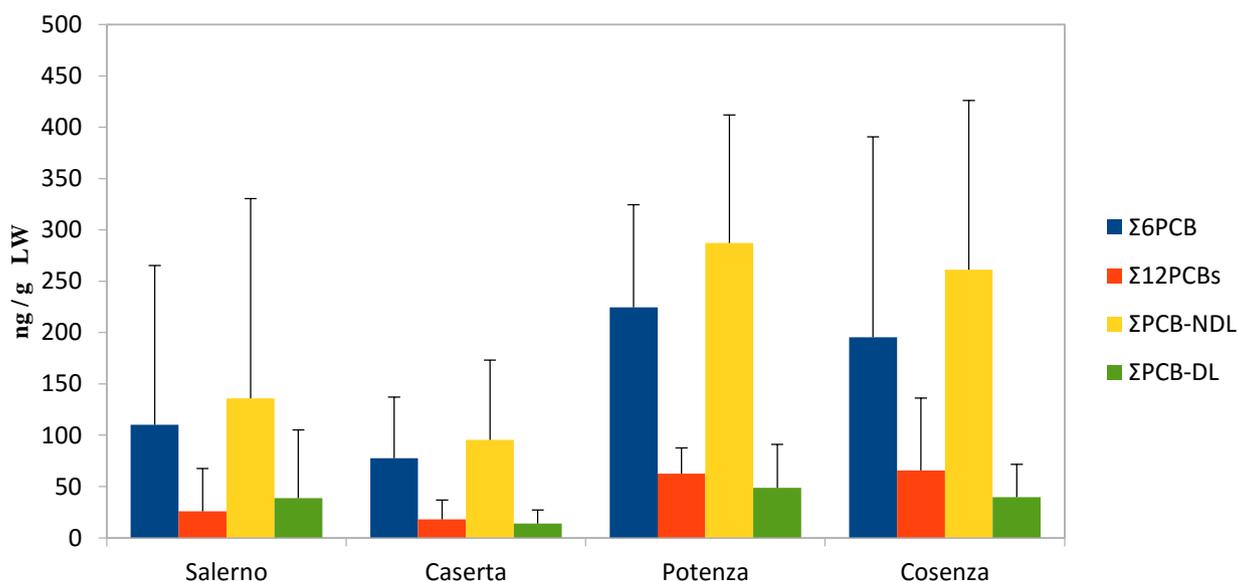


Figura 9. Livelli di PCB per gruppi di composti espressi su base lipidica e differenziati per provincia.

I livelli più alti della $\Sigma 6\text{PCB}$ erano quelli del campione proveniente da Cosenza ($271.85 \text{ ng g}^{-1} \text{ lw}$ in media) e a seguire Potenza ($261.6 \text{ ng g}^{-1} \text{ LW}$), Salerno ($114.71 \text{ ng g}^{-1} \text{ LW}$) e Caserta ($75.84 \text{ ng g}^{-1} \text{ lw}$). Per quanto concerne il pattern di distribuzione dei PCB indicatori, sono state evidenziate notevoli analogie tra province poste in una stessa area geografica. In particolare, nei campioni di Potenza e Cosenza si osservava la prevalenza del PCB 153 (rispettivamente il 28% e 24% circa in media della $\Sigma 6\text{PCB}$) seguito in ordine decrescente dai congeneri di PCB penta-tetra-esa-tetra-epta-clorurati IUPAC nos. 101, 28, 138, 52, 180. Invece, per le province campane di Caserta e Salerno, il congenere rilevato alle concentrazioni più alte era il PCB 28 (rispettivamente il 27% e 32% circa in media della $\Sigma 6\text{PCB}$) seguito dal PCB 153, 101, 52, 138, 180. I congeneri NDL non indicatori costituivano solo una parte limitata della $\Sigma 18\text{PCB}$ con percentuali che in media si aggiravano intorno al 20% (dal 19% per la provincia di Caserta al 23% per la provincia di Cosenza). Va sottolineato comunque, a conferma della scarsa rilevanza di questi analiti nella valutazione generale dei livelli di contaminazione da PCB che, in molte unità campionarie, diversi di tali congeneri risultavano non determinabili.

Le concentrazioni degli otto PCB-DL misurati risultavano sempre molto inferiori ai $\Sigma 6\text{PCB}$ e nell'ordine di alcune decine di ppb (Tabella 6, Figura 9).

La Tabella 7 e la Figura 10 riportano i risultati dell'analisi descrittiva dei POC. I livelli risultavano in genere bassi ma con la presenza costante in tutte le unità campionarie di Caserta, Potenza e Cosenza del p,p'-DDE (da una concentrazione in media di 10.56 ng g⁻¹ lw per Salerno a 34.25 ng g⁻¹ lw per Cosenza) e nei lattini di Potenza e Cosenza dell'HCB (da un valore di 2.52 ng g⁻¹ lw per Cosenza a 7.77 ng g⁻¹ lw in media per Salerno). Il p,p'-DDT era presente solo nelle unità campionarie di Salerno e Potenza (rispettivamente nel 23% e nel 20% delle unità campionarie).

Tabella 7. Medie (ng g⁻¹) ± DS e range dei pesticidi organoclorurati ricercati espresse su lw e su ww.

		Salerno	Caserta	Potenza	Cosenza
ΣDDT	<i>LW</i>	45.22±87.9 (ND-343.2)	18.76±11.33 (3.4-33.9)	54.95±49.72 (6.0-113.4)	39.45±8.21 (12.6-32.40)
	<i>WW</i>	0.07±0.124 (ND-0.479)	0.030±0.021 (0.005-0.068)	0.035±0.032 (0.006-0.068)	0.032±0.023 (0.13-0.065)
p,p'-DDT	<i>LW</i>	26.82±75.766 (ND-343.2)	ND	5.55±11.1 (ND-22.2)	ND
	<i>WW</i>	0.042±0,111 (ND-0,408)	ND	0,03±0,01 (0.001-0.01)	ND
p,p'-DDE	<i>LW</i>	10.56±10.16 (ND-49.8)	18.36±10.97 (3.4-33.9)	29.5±22.61 (4.2-59.2)	34.25±10.63 (23.4-45.6)
	<i>WW</i>	0.02±0.02 (ND-0.07)	0.03±0.02 (0.01-0.07)	0.02±0.02 (0.001-0.06)	0.04±0.01 (0.02-0.05)
HCB	<i>LW</i>	7.77±9.78 (ND-48.80)	3.91±4.22 (ND-11.1)	7.4±10.17 (1.2-22.4)	2.52±1.32 (0.9-3.6)
	<i>WW</i>	0.01±0.01 (ND-0.06)	0.01±0.005 (ND-0.011)	0.01±0,01 (ND-0.02)	0.003±0.001 (0,001-0,004)

Nota: ΣDDTs corrisponde alla somma del p,p'-DDT, p,p'-DDE, p,p'-DDD, o,p'-DDT o,p'-DDE e o,p'-DDD.

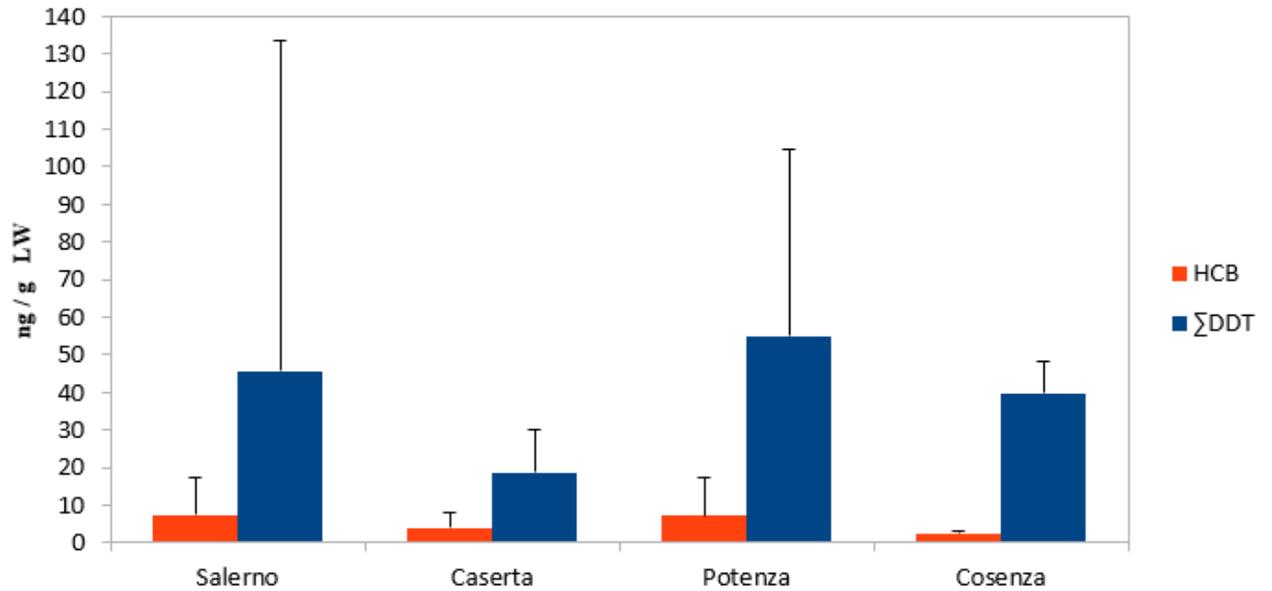


Figura 10. Livelli di POC per gruppi di composti espressi su base lipidica e differenziati per provincia.

La regressione degli strongili intestinali sui livelli medi di concentrazione della $\Sigma 18\text{PCB}$ sul wet weight e il grado di infestazione, controllando per l'età degli animali utilizzati nello studio e per la provincia di provenienza, evidenziava che all'aumentare della concentrazione dei PCB si riscontravano valori maggiori degli strongili ($p < 0.001$) (Tabella 8). Analogamente, quando si utilizzavano i valori di concentrazione espressi sul lipid weight, si osservava una correlazione positiva. Tuttavia, tale relazione era indotta dai valori di concentrazione riferiti a pochi campioni. La stessa analisi effettuata con le concentrazioni di ΣDDT evidenziava una relazione crescente che però era principalmente indotta dai valori di cinque campioni su 55.

Tabella 8. Regressione della Concentrazioni dei $\Sigma 18$ PCB (su WW e su LW) e numero degli strongili intestinali.

	WW	LW
$\Sigma 20$ PCB	2116.1 0.000***	1.35 0.021**
<u>Eta'</u>	-12.25 (0.523)	16.67 (0.477)
Provincia 2	-3.38 (0.99)	-46.78 (0.873)
Provincia 3	-224.18 (0.384)	-329.16 (0.206)
Provincia 4	293.18 (0.260)	297.82 (0.255)
Costante	224.99 (0.406)	129.71 (0.641)
Osservazioni	55	55

Nota Per il valore di $\Sigma 18$ PCB, la tabella riporta i risultati della regressione per i valori di concentrazione espressi su WW e su LW e il numero degli strongili intestinali degli animali dai quali proveniva il latte analizzato. In parentesi sono riportati i p-values; la significatività statistica è indicata come segue: **p<0.01, ***p<0.001.

~~~~~

La comparazione tra i livelli relativi alle quattro province esaminate mostrano differenze apprezzabili. Ad esempio, per quanto concerne la  $\Sigma 6$ PCB, i livelli riportati per le province di Potenza e Cosenza sono significativamente maggiori rispetto a quelle sia di Caserta che di Salerno (p<0.001). Tali differenze potrebbero essere spiegate con i diversi gradi di contaminazione ambientale dell'area di provenienza. Tuttavia, tale ipotesi non trova facile conferma per la mancanza di dati in letteratura riferiti, in generale al sud Italia.

Non è possibile effettuare un confronto delle concentrazioni residuali relative alle altre province, non campane, in quanto mancano, per quanto di mia conoscenza, dati in letteratura relativi alla Calabria e alla Basilicata. L'unico, recentissimo, lavoro pubblicato sul latte di asina analizza i livelli di OC in latti provenienti da aziende

dislocate sul territorio di tre regioni italiane tra cui anche la Calabria (Di Bella *et al.*, 2014). I livelli della  $\sum 6\text{PCB}$  riscontrati dagli autori sono tutti inferiori a quelli riportati nella presente tesi anche se dello stesso ordine di grandezza (ad es 178.14 ng g<sup>-1</sup> lw, quale indicatore del valore massimo per le aziende calabresi, 13.87 ng g<sup>-1</sup> lw per le unità campionarie prelevate in Sicilia).

La concentrazione media della  $\sum 6\text{PCB}$  (271.85 ng g<sup>-1</sup> lw e 261.6 ng g<sup>-1</sup> lw, rispettivamente per le province di Cosenza e Potenza) è in accordo con quanto riportato da Turrio-Baldassarri *et al.* (2009) nel latte bovino proveniente da aziende vicine all'impianto industriale di Brescia che ha prodotto PCBs fino al 1984. Questi valori sono invece molto più alti di quanto evidenziato da Ingelido *et al.* (2009) nel latte di vacche e pecore raccolto in aziende vicine a impianti di incenerimento situati nel centro Italia (valori da 1.4 a 8.2 ng g<sup>-1</sup> lw in rapporto alla specifica area esaminata), da Storelli *et al.* (2012) nel latte di pecore da un'area industrializzata della Sardegna (4.92 ng g<sup>-1</sup> lw), e da Bertocchi *et al.* (2015) nel latte di bovina proveniente da aziende nella città di Brescia (14.4 ng g<sup>-1</sup> lw).

Più in particolare, le concentrazioni di NDL-PCBs e DL-PCBs rilevate nelle unità campionarie provenienti dalle province campane risultano decisamente inferiori a quelle evidenziate recentemente in campioni di origine diversa (muscolo di pesce, molluschi eduli lamellibranchi) (Ferrante *et al.*, 2015; Ferrante *et al.*, 2010) ma anche nella stessa matrice proveniente da altre specie erbivore da lattazione provenienti dalla stessa area sottoposta a monitoraggio (Esposito *et al.*, 2009, 2010). Diversamente da quanto sopra riportato, i dati provenienti dai piani di monitoraggio relativi alle aziende bovine e ovine situate sul territorio Campano, rivelano in genere più alti livelli di contaminazione per la provincia di Caserta contrapposti, in genere, a bassi livelli per le altre province. Alti livelli di PCDDs nel latte di pecore e capre dalla provincia di Caserta sono stati anche riportati nel report tecnico di Di Fusco (2006).

E' interessante constatare che il pattern dei congeneri è abbastanza simile a quello riportato in tutti i lavori riportati con la sola differenza nella presenza a più alti livelli o predominante (nel caso di Caserta e Salerno) del PCB 28.

Le differenze osservate tra i dati riportati nella presente tesi e quelli riferiti ad altre specie da lattazione potrebbero essere imputabili, oltre che a una diversa esposizione degli animali allevati in ambienti diversamente contaminati, anche ad una maggiore

capacità metabolica o comunque ad una diversa cinetica depletiva dei congeneri nella specie esaminata. A tale proposito, non deve essere dimenticata la diversa, bassa, composizione in grassi del latte di asina che potrebbe comportare il legame e quindi l'escrezione, di una minore concentrazione degli OC. Purtroppo, a tutt'oggi, per quanto di mia conoscenza, non esistono in letteratura studi a riguardo eseguiti nell'asina. La diversa alimentazione cui sono stati sottoposti gli animali in allevamento fino al momento del prelievo di latte offre un'altra possibile spiegazione dei diversi livelli di PCB diversificata per area di provenienza: prevalentemente a base di concentrati quella delle asine di Caserta (dove le asine sono allevate presso il Centro di Incremento Ippico e prevalentemente a scopo di ricerca), mista per le asine di Salerno e caratterizzata da vegetali al pascolo (potenzialmente più contaminati) per quelle di Potenza e Cosenza. In generale, i bassi livelli evidenziati di pesticidi dimostrano che l'impiego dei composti non è stato massivo e fondamentalmente imputabile ad un utilizzo passato dei POC. Tuttavia, il riscontro del p,p'DDT in alcuni campioni delle province di Salerno e Potenza lascia presumere un impiego recente in tali aree del composto parentale. Il rapporto DDE/DDT, che viene utilizzato per stabilire il momento presunto dell'immissione del pesticida nell'ambiente, (Bordajandi *et al.*, 2003) indica che a Salerno, dove tale rapporto è inferiore ad uno (0,39), probabilmente c'è stato un utilizzo recente del pesticida; a Potenza, dove il rapporto è molto superiore ad uno (5.3) l'utilizzo è stato prevalentemente passato. Per le rimanenti province il rapporto non è stato calcolato per l'assenza della molecola parentale. Il risultato è chiaramente rapportabile all'utilizzo dei pesticidi nei terreni agricoli adiacenti le aree di pascolo.

La regressione degli strongili intestinali sui livelli medi di concentrazione evidenzia che all'aumentare della concentrazione dei PCB si osservano valori maggiori degli strongili. Tale relazione, positiva, si riscontra sia quando si considerano le misure di concentrazione calcolate sul ww che su lw, sia per i PCB che per i  $\Sigma$ DDTs. Tuttavia, mentre nel caso dei valori di concentrazione della  $\Sigma$ 18PCB espressi su ww la relazione, che risulta altamente statisticamente significativa ( $p < 0.001$ ), è indotta da un ampio numero di osservazioni, negli altri casi è determinata da un esiguo numero di osservazioni. La conseguenza diretta di quanto riportato è che gli OC e in particolare i PCB, possono influenzare la risposta immunitaria dell'organismo nei confronti di

agenti infestanti. Infatti, l'immunodepressione conseguente ad una esposizione cronica ai PCB causerebbe un aumento del grado di infestazione parassitaria da strongili intestinali. Sono pochi in letteratura i lavori condotti con lo scopo di ricercare una eventuale correlazione tra contaminanti ambientali persistenti e parassiti. Sagerup *et al* (2009) provarono a verificare se l'infezione parassitaria evidenziata in gabbiani adulti delle isole di Svalbard fosse correlabile alla contaminazione da metalli pesanti e/o POPs. Tuttavia, gli autori evidenziarono una correlazione positiva solo con i livelli di selenio e mercurio indicandola come fortuita interessando questa solo un numero limitato di animali sottoposti ad osservazione. Henríquez-Hernández e suoi collaboratori (2015), hanno evidenziato addirittura una correlazione inversa tra i livelli serici di PCB e parassiti intestinali in uomini africani emigranti in Spagna. Analogamente, anche Carreras-Aubets *et al* (2012) hanno rilevato una riduzione dei livelli di diversi ecto e endoparassiti nel *Mullus barbatus* con l'aumentare dei livelli di PCB. In questo lavoro di tesi per la prima volta, per quanto di mia conoscenza, viene riportata una correlazione positiva tra esposizione a OC-parassiti intestinali esaminando una specie zootecnica di crescente interesse in medicina veterinaria. La regressione, la cui validità è attestata da una elevata significatività statistica, indica chiaramente che i contaminanti analizzati e in particolar modo i PCB-NDL possono indurre uno stato di immunodepressione che rende l'animale più esposto ad una infestazione di grado maggiore indotta da parassiti intestinali, quali gli strongili, con le conseguenti implicazioni sotto il profilo sanitario e della resa produttiva. Del resto, che i PCB potessero alterare le difese immunitarie era stato già evidenziato da Sagerup *et al* (2009) i quali, esaminando nei gabbiani del nord Atlantico i livelli di alcuni OC, evidenziarono che l'azione combinata di tali inquinanti modula negativamente la funzione immunitaria stimolata con diversi agenti virali e tossina tetanica.

## Valutazione del rischio

Per quanto concerne la valutazione del rischio per il consumatore correlato ad una esposizione ai PCB, la Comunità Europea ha recentemente stabilito dei LMR per vari prodotti di origine animale relativi alla somma dei sei congeneri di PCB definiti "congeneri indicatori" (Commission Regulation EU No 1259/2011 del 2 Dicembre 2011). La somma delle concentrazioni riferite a tali PCB indicatori (PCB 28, 52, 101, 138, 153 e 180) comprende circa la metà della quantità totale di PCB-NDL presenti nei prodotti alimentari e nei mangimi. Questa somma è considerata, quindi, dalla Comunità Europea, come un marcatore adeguato per valutare la diffusione ambientale e l'esposizione umana ai PCB-NDL.

Il LMR riferito al latte crudo e ai prodotti derivati compreso il burro è stato, stabilito dal suddetto Regolamento, in 40ng/g grasso per i prodotti con una percentuale lipidica non inferiore al 2% mentre, in genere, per i prodotti caratterizzati da una percentuale di grasso inferiore al 2%, il LMR, che deve essere espresso sul tal quale (ww che indica come già riportato il riferimento al peso fresco), è uguale al prodotto del precedente limite per 0.02. Questo limite derivato, nel caso delle matrici latte e degli altri prodotti caseari, corrisponde a 0.8ng/g ww.

Dall'esame dei dati ottenuti si evince che la percentuale di grasso calcolata nei campioni è sempre inferiore al 2% e quindi deve essere adottato il limite di 0.8ng/g ww per effettuare un'analisi del rischio. La presenza dei composti bifenilipoliclorurati si rileva a livelli quantificabili per tutte le province esaminate. Tuttavia, la  $\Sigma$ 6PCB relativa alle unità campionarie prelevate nelle province di Salerno, Caserta e Potenza è sempre inferiore al LMR, mentre solo un campione proveniente da Cosenza superava il limite di sicurezza (0.95ng/g ww).

Per quanto concerne i PCB-DL, la valutazione della tossicità dei congeneri si basa sulla definizione dei Fattori di Tossicità Equivalente (WHO - World Health Organization - TEF) (Van den Berg 1998). In breve, la concentrazione di ciascun PCB-DL in un campione è moltiplicato per il corrispondente WHO TEF e successivamente sommato per ottenere la concentrazione totale dei composti diossino-simili espressi in WHO TEQ (World Health Organization - Quantità Tossica Equivalente). Anche in questo caso, come per la somma dei congeneri indicatori, per le motivazioni sopra riportate, il LMR di 3 pg/g di grasso è stato moltiplicato per 0,02 e confrontato con la

TEQ ottenuta con le concentrazioni espressa su ww. La somma dei congeneri di PCB DL misurati nel presente lavoro espressa come WHO TEQ è risultata sempre inferiore al LMR stabilito dal Regolamento Europeo 1259/2011.

Per quanto concerne i pesticidi, il Ministero della Salute (2004) ha fissato dei LMR per il latte crudo di specie diverse da quella bovina. Riguardo la ΣDDTs, il limite fissato per le matrici che hanno un contenuto in grassi inferiore o uguale al 5% è di 0.05 mg kg<sup>-1</sup> ww, mentre per l'HCB è di 0.01 mg kg<sup>-1</sup>. Nessuna unità campionaria supera i livelli stabiliti dalla normativa Italiana. Le concentrazioni qui riportate sono, in assoluto, basse e da correlare al particolarmente ridotto contenuto lipidico del campione che quindi dovrebbe costituire relativa garanzia di una ridotta presenza di contaminanti liposolubili. Allo stesso tempo non sono altresì noti dati sul consumo di latte di asina che, come è noto, negli ultimi anni è particolarmente consigliato per l'alimentazione soprattutto di soggetti neonati e bambini con intolleranze o allergie a componenti del latte vaccino e per soggetti in età geriatrica. Per tale motivo, non avendo a disposizione informazioni dettagliate sui consumi che, peraltro, interessano maggiormente fasce di consumatori particolarmente sensibili, risulta al momento difficile potere effettuare una più approfondita valutazione del rischio per l'uomo. Tuttavia, a conferma dell'apparente salubrità del latte di asina, altri autori (Fantuz *et al.*, 2015) ne hanno misurato i livelli di elementi in tracce e metalli pesanti e hanno constatato i bassi livelli residuali di tali contaminanti confermando che tale alimento non dovrebbe costituire una fonte di rischio per il consumatore.

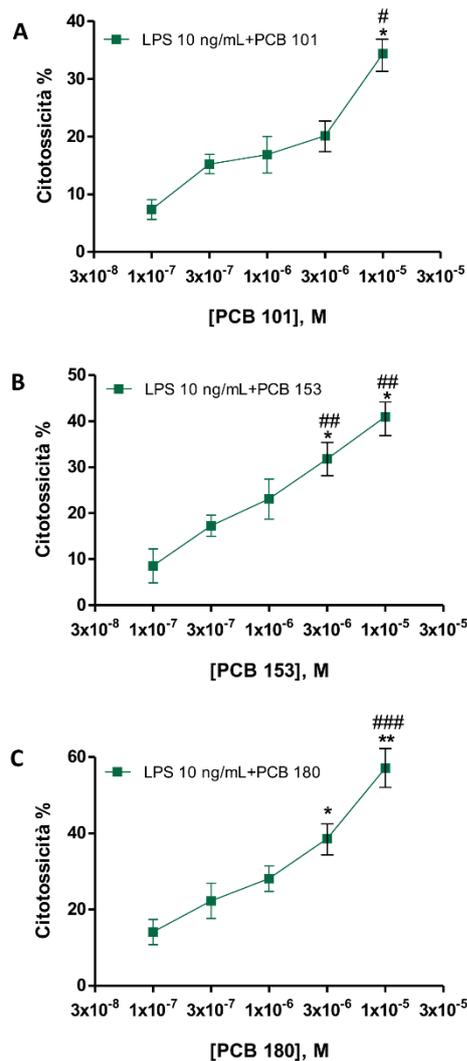
In conclusione il campionamento limitato ad alcune province del sud Italia impedisce di trarre conclusioni definitive sulla contaminazione da OC della matrice latte di asina. Del resto l'allevamento di asine da latte ha trovato particolare sviluppo solo in poche province italiane tra cui quelle considerate in questo studio. I dati, confermano la presenza di uno stato di fondo di inquinamento da contaminanti organici persistenti nelle aree della regione Campania esaminate e soprattutto della Calabria e Basilicata, pur risultando (per le concentrazioni relativamente basse) in generale scarsamente pericolose per la sicurezza del consumatore perchè quasi sempre sotto i limiti residuali stabiliti dalla normativa Europea. I livelli evidenziati in Campania non sono in linea con quanto già osservato negli ultimi anni nella stessa regione relativamente ai

medesimi composti, in altre matrici alimentari (prodotti della pesca) o nel latte proveniente da altre specie erbivore.

## **2.3.2 Studio in vitro della modulazione della risposta immunitaria indotta dai PCB-NDL**

### ***2.3.2.1 Effetti dei PCB sulla vitalità dei macrofagi J774A.1 stimolati con LPS***

Gli esperimenti condotti sulla linea cellulare J774A.1 hanno confermato l'alterazione della responsività dei macrofagi e analizzato in maniera più dettagliata il meccanismo sotteso all'effetto immunotossico dei PCB. Per valutare l'effetto citotossico dei PCB sulle cellule macrofagiche J774A.1, queste ultime sono state incubate per 24 ore con concentrazioni crescenti dei PCB-NDL 101, 153 e 180 in presenza di LPS (10 ng/mL) e sottoposte al saggio di vitalità, MTT (Figura 11).



**Figura 11.** Effetti citotossici dei PCB 101(A), 153(B) e 180 (C) in associazione con LPS (10 ng/mL) sulle cellule macrofagiche J774A.1. Le cellule sono state trattate per 24 ore con PCB-NDL a concentrazioni crescenti (100 nM-10 $\mu$ M) in presenza di LPS (10 ng/mL). La citotossicità è stata poi valutata come descritto nella sezione Materiali e Metodi. Ciascun valore percentuale è la media  $\pm$  SEM di tre esperimenti indipendenti. \*P<0.05, \*\*P<0.01 e \*\*\*P<0.001 vs cellule di controllo; #P<0.05, ##P<0.01 e ###P<0.001 vs cellule incubate con l'LPS.

Tutti i PCB.NDL analizzati inducevano citotossicità in modo concentrazione-dipendente. Comparando i valori di densità ottica delle cellule esposte ai PCB con le cellule di controllo appariva evidente che gli inquinanti riducevano la vitalità cellulare in modo significativo alle concentrazioni più elevate (10  $\mu$ M, P <0.05). Fra i PCB analizzati, il PCB 180 risultava essere il più citotossico, in quanto alla concentrazione di 10  $\mu$ M riduceva la vitalità cellulare del 45% con un valore di IC<sub>50</sub> di 1,41x10<sup>-5</sup> M

quando utilizzato da solo in assenza di LPS, come riportato in Tabella 9. Gli altri due congeneri analizzati, il PCB 101 e il PCB 153, avevano rispettivamente un valore di IC<sub>50</sub> di  $1,91 \times 10^{-3}$  M e  $2,19 \times 10^{-3}$  M (Tabella 9) e determinavano una riduzione della vitalità cellulare del 27 e 22% alla concentrazione più elevata utilizzata. Quando le cellule sono state esposte contemporaneamente agli inquinanti analizzati e al LPS per 24 ore, si registrava un incremento dell'effetto citotossico con valori di IC<sub>50</sub> di  $4,57 \times 10^{-4}$  M,  $4,79 \times 10^{-5}$  M e  $1,15 \times 10^{-5}$  M rispettivamente per i PCB 101, 153 e 180.

| Trattamento cellulare                   | IC <sub>50</sub> [M]  |
|-----------------------------------------|-----------------------|
| PCB 101 (100 nM-10 µM)                  | $1.91 \times 10^{-3}$ |
| PCB 153 (100 nM-10 µM)                  | $2.19 \times 10^{-3}$ |
| PCB 180 (100 nM-10 µM)                  | $1.41 \times 10^{-5}$ |
| PCB 101 (100 nM-10 µM)+<br>LPS 10 ng/mL | $4.57 \times 10^{-4}$ |
| PCB 153 (100 nM-10 µM)+<br>LPS 10 ng/mL | $4.79 \times 10^{-5}$ |
| PCB 180 (100 nM-10 µM)+<br>LPS 10 ng/mL | $1.15 \times 10^{-5}$ |

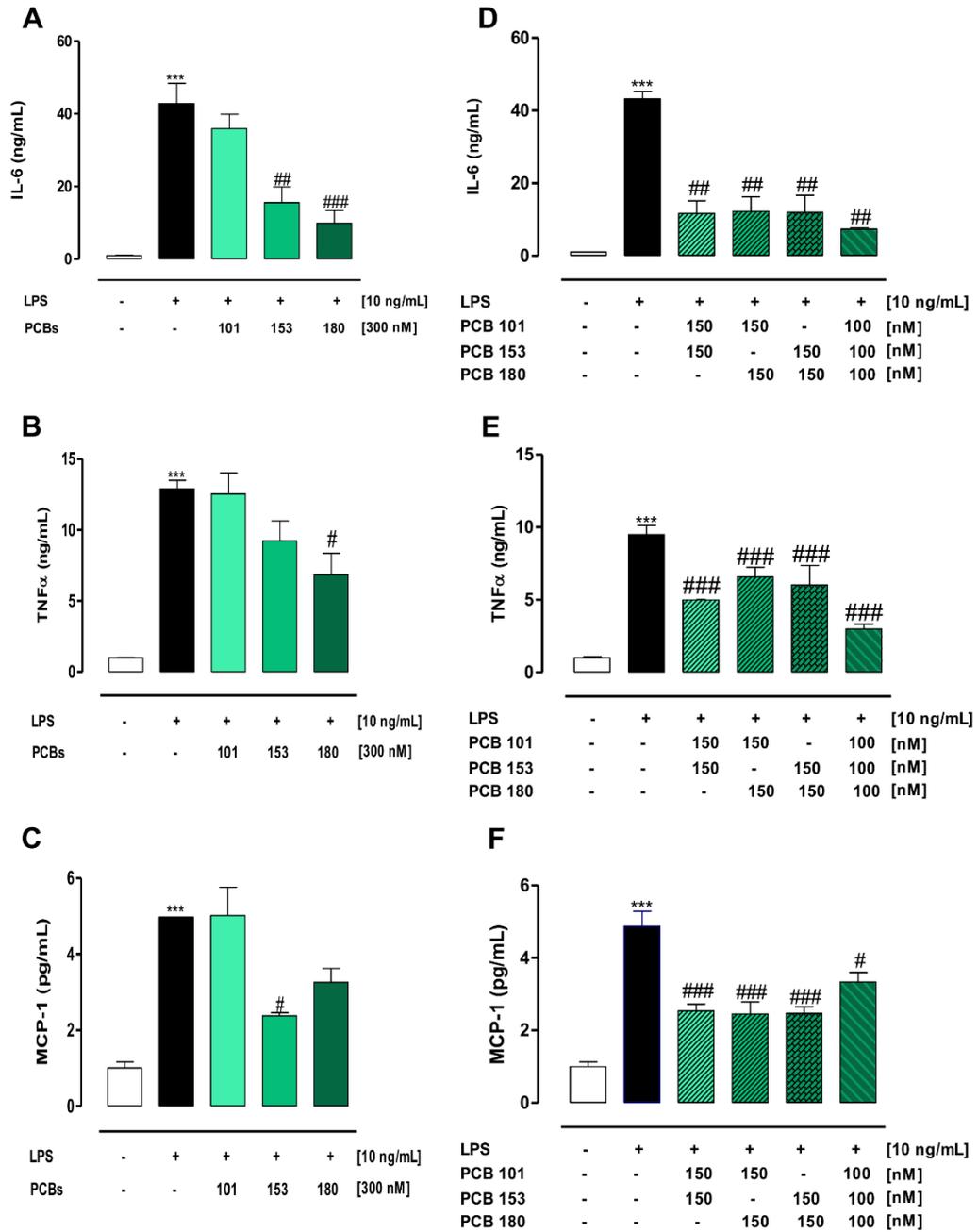
**Tabella 9.** Effetto dei PCB 101, 153 and 180, da soli (100 nM-10 µM) e in associazione con LPS (10 ng/mL), sull'inibizione della vitalità dei macrofagi murini J774A.1. La vitalità delle cellule di controllo calcolata era del 100% e i risultati sono stati espressi come la concentrazione di PCB-NDL in grado di indurre il 50% di mortalità nei macrofagi non trattati o trattati con LPS (IC<sub>50</sub>). I risultati sono espressi come media  $\pm$ S.E.M. a partire da almeno tre esperimenti indipendenti.

Sulla base dei dati di vitalità cellulare è stata scelta la concentrazione finale dei PCB di 300 nM, in quanto che tale concentrazione dei congeneri singoli o in associazione non modificava la vitalità (dati non mostrati).

### ***2.3.2.2 Effetti dei PCB sulla sintesi e il rilascio di citochine proinfiammatorie e di MCP-1 indotti da LPS nelle cellule J774A.1***

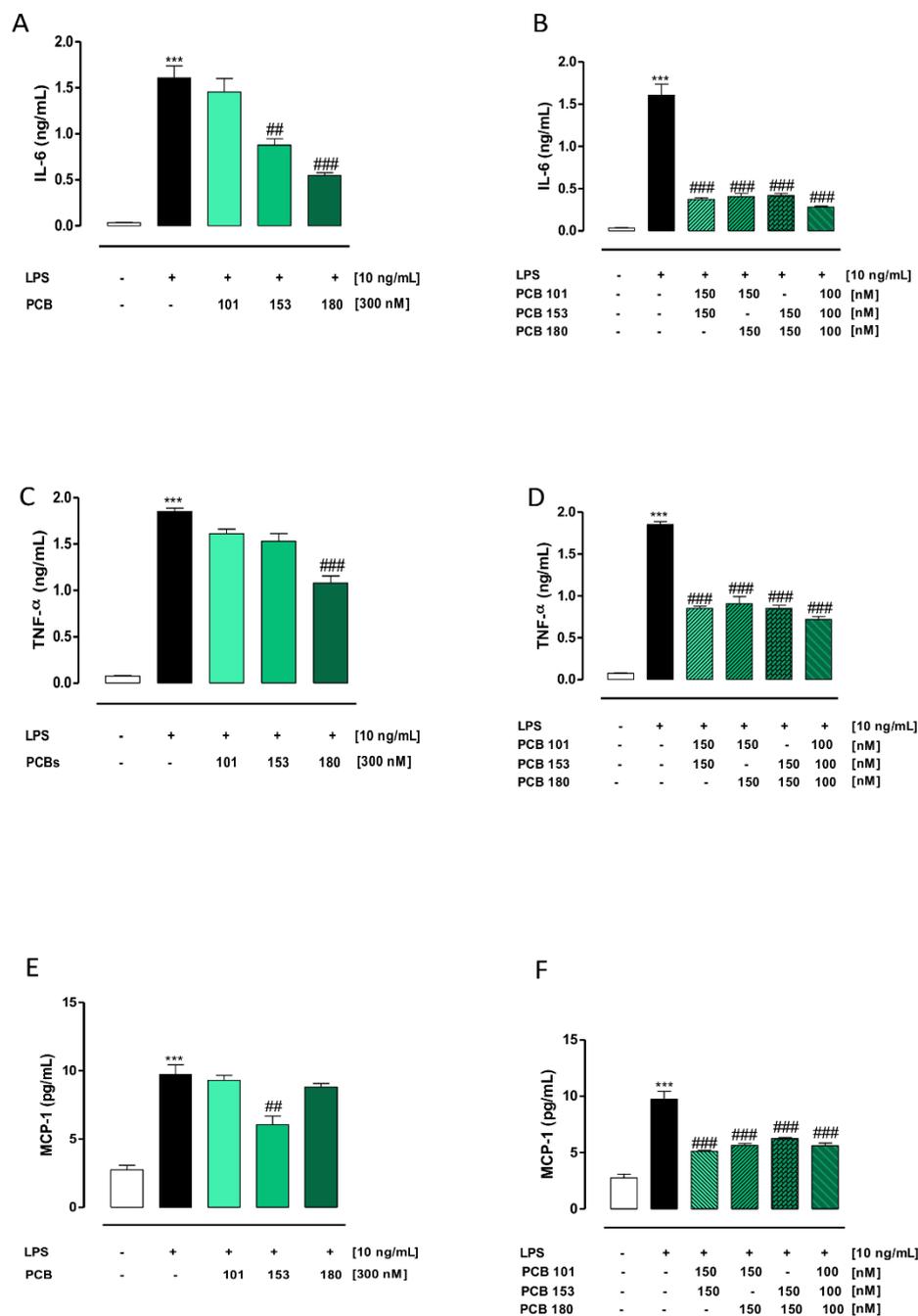
L'espressione delle citochine dopo stimolazione con LPS dipende strettamente dal tempo di esposizione e dalla concentrazione dell'endotossina batterica. Citochine, come IL-6 e TNF- $\alpha$ , insieme ad MCP-1 sono coinvolte nel reclutamento cellulare e giocano un ruolo chiave nell'orchestrare la risposta immunitaria innata.

È stata valutata la trascrizione genica di tali citochine negli estratti di cellule J774A.1 dopo stimolazione per 4 ore con LPS, sia in assenza di PCB che in loro presenza (da soli o in associazione). Come mostrato in Figura 12 l'esposizione al LPS induceva un aumento significativo dei livelli di mRNA dell'IL-6, del TNF- $\alpha$  e di MCP-1. Di contro tutti i PCB-NDL analizzati dopo 4 ore di stimolazione delle cellule inibivano l'effetto del LPS sull'espressione di tali citochine. In particolare, il PCB 101 risultava essere il congenere meno immunotossico, mentre i PCB 153 e 180 riducevano in modo significativo la trascrizione della IL-6 indotta dal LPS (rispettivamente  $P < 0.01$  e  $P < 0.001$ ). Inoltre, il PCB 153 riduceva in maniera significativa la trascrizione, LPS-indotta, di MCP-1 ( $P < 0.05$ ) e il PCB 180 sopprimeva quella del TNF- $\alpha$ . Quando, infine, le cellule macrofagiche venivano esposte agli inquinanti diversamente associati, a due a due o tutti e tre insieme alla concentrazione finale di 300 nM, si evidenziava un effetto sinergico sull'inibizione della trascrizione delle suddette citochine.



**Figura 12.** Effetto dei PCB 101, 153 e 180, da soli o in associazione sul rilascio di IL-6 (A e B), TNF- $\alpha$  (C e D) e MCP-1 (E e F) indotto dal LPS. Le cellule macrofagiche sono state esposte ai PCB (300nM) e al LPS (10ng/mL) per 4h. Quindi, è stato estratto l'mRNA dai lisati cellulari ed è stata determinata la concentrazione di citochine mediante real-time PCR come descritto nella sezione Materiali e Metodi. I dati sono la media  $\pm$  SEM di tre esperimenti indipendenti. Come specificato nella sezione Materiali e Metodi, quando i PCB sono utilizzati in associazione, la concentrazione finale dei composti è sempre di 300nM. \*\* $P < 0,01$  e \*\*\* $P < 0,001$  vs cellule controllo; # $P < 0,05$ , ## $P < 0,01$  e ### $P < 0,001$  vs cellule incubate con LPS.

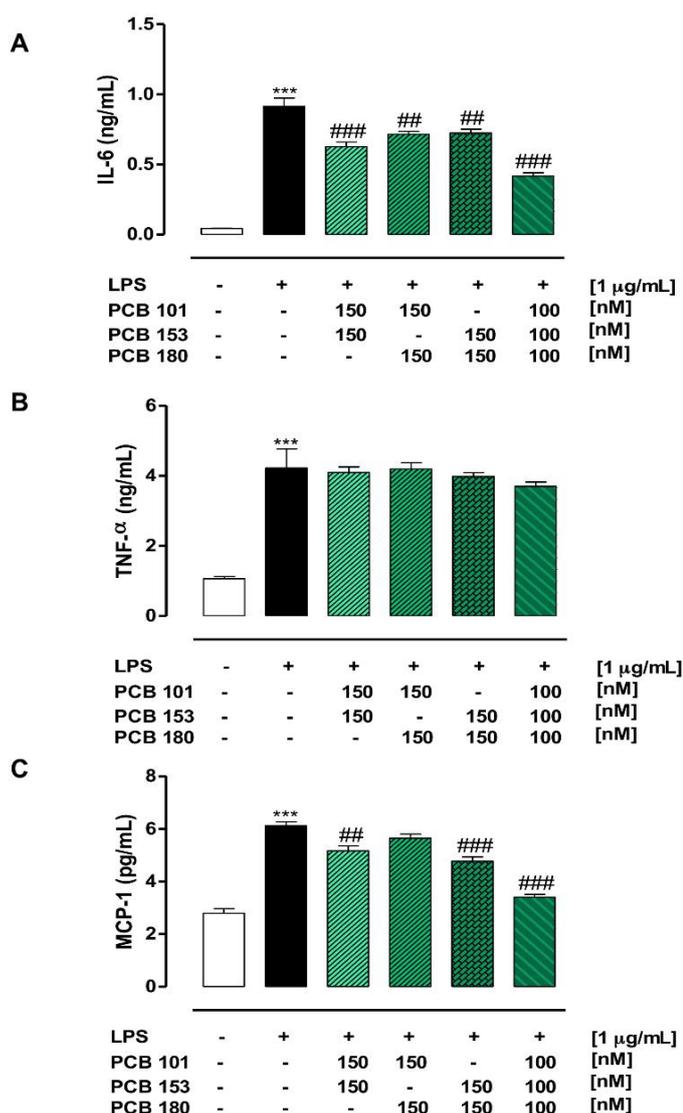
A conferma dei dati ottenuti dagli esperimenti eseguiti a 4 ore, l'espressione delle suindicate citochine è stata valutata anche nei surnatanti delle cellule J774A.1 esposte al LPS e ai PCB da soli e in associazione per 24 ore. Come mostrato nella Figura 13 gli effetti dell'endotossina batterica erano fortemente contrastati dai PCB da soli ma principalmente in associazione determinando una riduzione significativa del rilascio di questi importanti mediatori infiammatori ed immunitari.



**Figura 13.** Effetto dei PCB 101, 153 e 180, da soli o in associazione sul rilascio di IL-6 (A e B), TNF- $\alpha$  (C e D) e MCP-1 (E e F) indotto dal LPS. Le cellule macrofagiche sono state esposte ai PCB (300nM) e al LPS (10ng/mL) per 24h. Quindi, sono stati prelevati i surnatanti ed è stata determinata la concentrazione di citochine come descritto nella sezione Materiali e Metodi. I dati sono la media  $\pm$  SEM di tre esperimenti indipendenti. Quando i PCB sono utilizzati in associazione, la concentrazione finale dei composti è sempre di 300nM. \*\*\*P<0,001 vs cellule controllo; ##P<0,01 e ###P<0,001 vs cellule incubate con LPS.

### 2.3.2.3 Effetti dei PCB sulla sintesi e il rilascio di citochine proinfiammatorie e MCP-1 indotti da LPS nei macrofagi peritoneali primari

A supporto dei dati ottenuti sulla linea cellulare continua J774A.1, nei nostri esperimenti sono stati utilizzati anche macrofagi peritoneali primari. In particolare, sui surnatanti dei macrofagi peritoneali esposti per 24 ore al LPS e ai PCB in associazione è stata valutata l'espressione delle citochine e chemochine, il cui rilascio è stato indotto dal LPS. Anche in questi esperimenti i dati ottenuti dimostravano che l'associazione di PCB a due a due e tutti insieme induceva una riduzione significativa del rilascio di IL-6 (Figura 14 A) e MCP-1 (Figura 14 C), mentre solo la combinazione di tutti i PCB era capace di ridurre lievemente il rilascio di TNF- $\alpha$  (Figura 14 B).

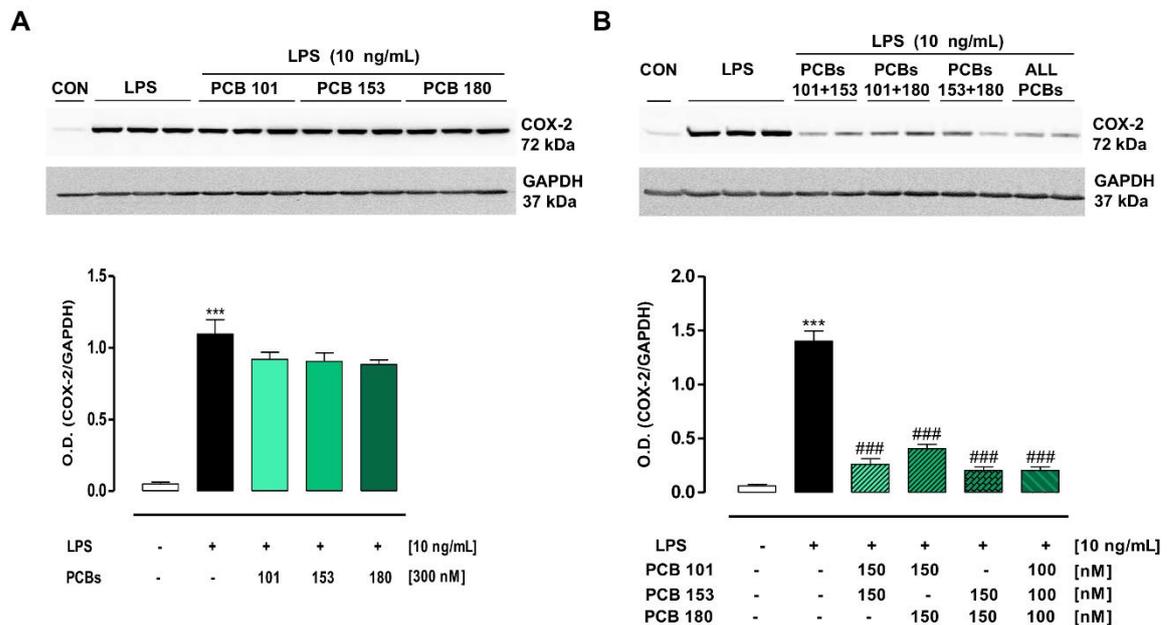


**Figura 14.** Analisi dei livelli di IL-6 (A), TNF- $\alpha$  (B) e MCP-1 (C) rilevati nei lisati e nei surnatanti di macrofagi peritoneali trattati con PCB 300nM, differientemente associati, in presenza di LPS (1 $\mu$ g/mL) dopo 24 dal trattamento. I livelli di citochine (ng o pg/mL) sono la media  $\pm$  SEM di tre esperimenti indipendenti. Quando i PCB sono utilizzati in associazione, la concentrazione finale dei composti era sempre di 300nM. \*\*\*P<0,001 vs cellule controllo; ##P<0,01 e ###P<0,001 vs cellule incubate con l'LPS.

#### ***2.3.2.4 Effetti dei PCB, da soli o in associazione sull'espressione di enzimi e mediatori infiammatori indotti dal LPS nelle cellule J774A.1***

Al fine di valutare l'effetto dei PCB-NDL analizzati sull'espressione della COX-2 indotta dal LPS, sono stati determinati i livelli di tale enzima nei lisati cellulari di J774A.1 esposti ai suddetti inquinanti (300 nM) da soli (Figura 15 A) o in associazione (Figura 15 B), in presenza del LPS.

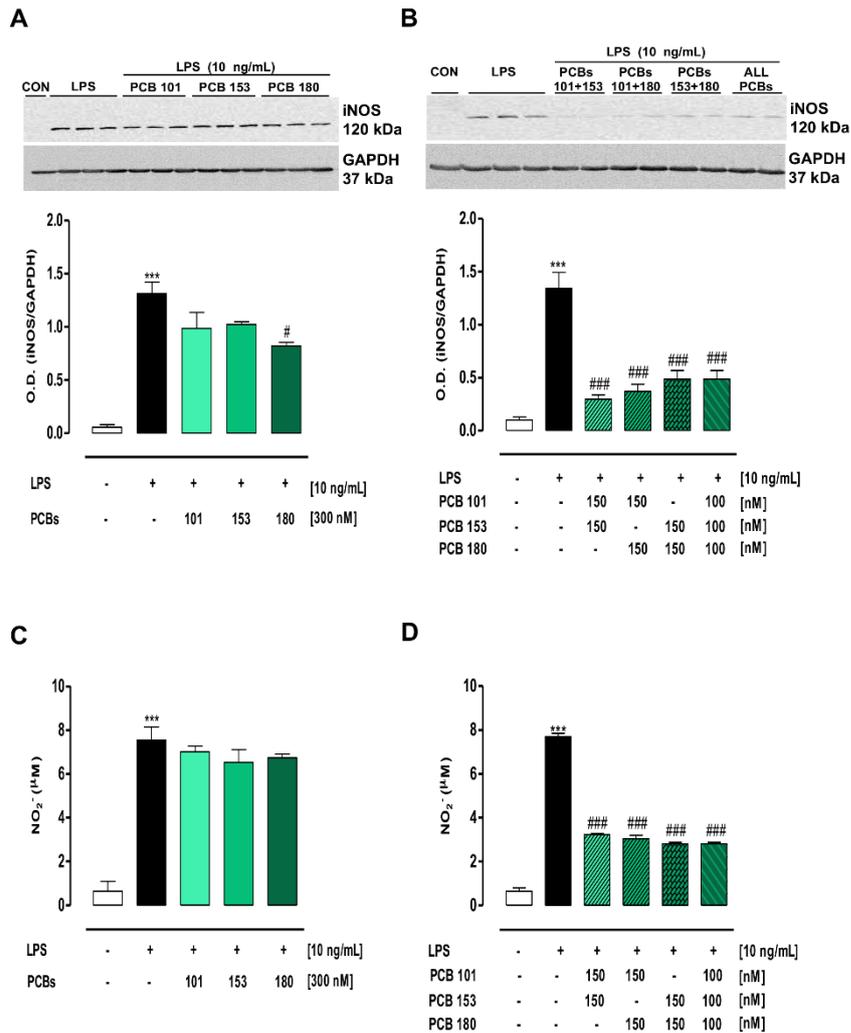
Dopo 24 ore di stimolazione delle cellule con il LPS si osservava un marcato incremento dell'espressione della COX-2 (P<0.001, vs cellule di controllo). Quando sono stati aggiunti i PCB da soli l'espressione di tale enzima indotta dal LPS non subiva modificazioni significative, mentre, con l'esposizione delle cellule agli inquinanti in associazione, sia a due a due che tutti e tre insieme, si registrava una riduzione significativa dell'espressione della proteina indotta dall'endotossina batterica (P<0.001 vs cellule incubate con LPS, (Figura. 15 B), confermando l'effetto sinergico di tali composti.



**Figura 15.** Analisi Western Blot dell'espressione della COX-2 nelle cellule macrofagiche J774A.1 stimolate con LPS e PCB per 24h da soli (A) o in associazione (B). Analisi densitometrica delle bande proteiche di COX-2 eseguita su 3 esperimenti separati. L'immunoblot della proteina GAPDH è stato eseguito per garantire un uguale caricamento dei campioni. Quando i PCB sono utilizzati in associazione, la concentrazione finale dei composti era sempre di 300nM. \*\*\*P<0,001 vs cellule controllo; e ###P<0,001 vs cellule incubate con LPS.

Per quanto concerne l'iNOS, l'esposizione delle cellule J774A.1 al LPS per 24 ore determinava un aumento significativo dei suoi livelli. L'aggiunta dei PCB singolarmente non provocava effetti tranne che nel caso del PCB 180 che determinava una riduzione significativa di tale enzima ( $P<0.05$ , Figura 16 A). L'associazione di tutti i PCB invece, riduceva marcatamente l'espressione della iNOS indotta dal LPS (Figura 16 B).

In accordo con l'induzione della iNOS, LPS aumentava significativamente la produzione di nitriti marcatamente ridotta da tutte le associazioni di PCB, dimostrando l'effetto sinergico ( $P<0.001$ , Figura 16 D).

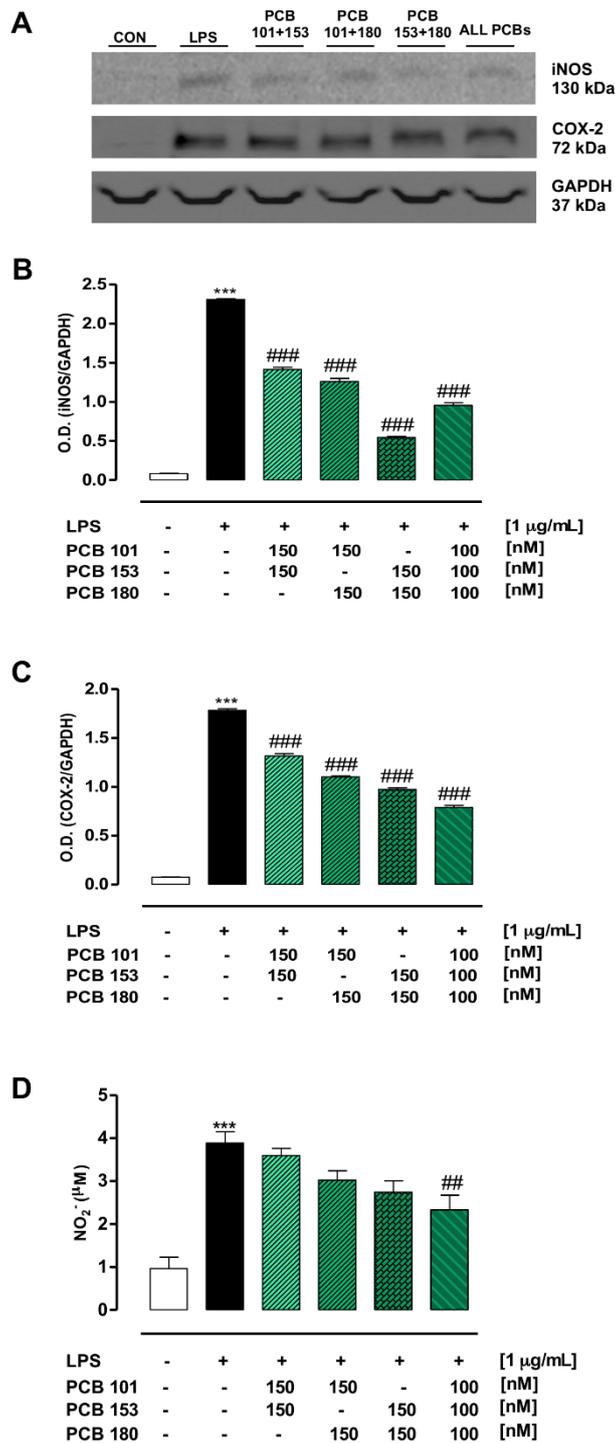


**Figura 16.** Analisi Western Blot dell'espressione della iNOS nelle cellule J774A.1 stimulate con LPS e PCB da soli (A) o in associazione (B). Analisi densitometrica delle bande proteiche di iNOS eseguita su 3 esperimenti separati. L'immunoblot della proteina GAPDH è stato eseguito per garantire un uguale caricamento dei campioni. Livello di nitriti ( $\text{NO}_2^-$ ) (C-D). I valori dei nitriti ( $\mu\text{M}$ ) sono la media  $\pm$  SEM di tre esperimenti indipendenti. Quando i PCB sono utilizzati in combinazione, la concentrazione finale dei composti era sempre di 300 nM. \*\*\* $P < 0,001$  vs cellule controllo; # $P < 0,05$  e ### $P < 0,001$  vs cellule incubate con LPS.

### 2.3.2.5 Effetti dei PCB, da soli o in associazione, sull'espressione della COX-2, della iNOS e sulla produzione dei nitriti indotti dal LPS nei macrofagi peritoneali primari

Per confermare i dati ottenuti dalle cellule di linea J774A.1, sono stati valutati i livelli degli stessi enzimi visti in precedenza, nella coltura primaria di macrofagi. L'incubazione con i PCB in associazione evidenziava una significativa riduzione

dell'espressione della iNOS indotta dal LPS ( $P < 0.001$ ; Figura 17 A e B). Inoltre, anche l'espressione della COX-2 era marcatamente ridotta nei macrofagi esposti ai PCB (Figura 17 A e C), indicando una riduzione della risposta infiammatoria. In accordo con questi dati, la produzione di nitriti mostrava un trend di riduzione quando i macrofagi sono stati incubati con i PCB associati due a due, che diventava significativa quando è stata utilizzata l'associazione dei 3 PCB mostrando ancora una volta una sinergia nell'effetto tossico ( $P < 0.01$ ; Figura 17 D).



**Figura 17.** Analisi Western Blot dell'espressione della iNOS e della COX-2 nei macrofagi primari stimolati con LPS (A). Analisi densitometrica delle bande proteiche di iNOS (B) e COX-2 (C) eseguita su 3 esperimenti separati. L'immunoblot della proteina GAPDH è stato eseguito per garantire un uguale caricamento dei campioni. Livello di nitriti ( $\text{NO}_2^-$ ) (D). I valori dei nitriti ( $\mu\text{M}$ ) sono la media  $\pm$  SEM di tre esperimenti indipendenti. Quando i PCB sono utilizzati in combinazione, la concentrazione finale dei composti era sempre di 300 nM. \*\*\* $P < 0,001$  vs cellule controllo; ### $P < 0,01$  e #### $P < 0,001$  vs cellule incubate con LPS.



I PCB possono esacerbare le infezioni a causa della loro capacità di compromettere la funzionalità delle cellule del sistema immunitario interferendo anche con il sistema endocrino (Igarashi *et al.*, 2006). Le malattie infettive sono spesso causate da invasione microbica e per superare tale aggressione, il nostro organismo mette in atto una sofisticata risposta immunitaria. L'alterazione di questa risposta, generalmente ben orchestrata, può risultare nell'insorgenza di gravi malattie infettive. Numerosi studi epidemiologici dimostrano una correlazione positiva tra l'esposizione ai PCB a lungo termine e un indebolimento delle difese immunitarie, una maggiore incidenza di infezioni otorinolaringoiatriche e/o respiratorie (Dallaire *et al.*, 2006) e insufficiente risposta anticorpale alle vaccinazioni (Heilmann *et al.*, 2010). In questo studio è stata analizzata la capacità dei PCB-NDL 101, 153 e 180, di alterare la risposta immunitaria innata nei macrofagi attivati dal LPS il principale componente della membrana esterna dei batteri gram-negativi (Fujihara *et al.*, 2003). In particolare, lo studio è stato rivolto allo studio all'analisi dell'effetto sinergico immunotossico dei PCB, mimando le condizioni ambientali per cui gli organismi si trovano allo stesso tempo esposti alle differenti combinazioni di PCB e ai batteri o a loro frammenti (come il LPS). È interessante notare che concentrazioni di PCB che risultano inattive quando usate da sole causano immunosoppressione quando usate in associazione. Dai dati presentati si può evidenziare infatti, che quando i PCB sono associati a due a due o tutti e tre insieme si ottiene un effetto tossico e sinergico che induce un aumento significativo dell'inibizione della risposta immunitaria innata ad una concentrazione alla quale, usate singolarmente, le sostanze risultano inattive.

I PCB scelti rientrano nel gruppo dei PCB indicatori, riconosciuti congeneri predominanti nelle matrici biotiche e abiotiche (Storelli e Perrone, 2010). Inoltre, la somma dei 6 PCB-NDL è, nella media, circa 5 volte superiore alla somma dei 12 PCB-DL (EFSA 2010) che risultano una minore componente del carico totale corporeo nell'uomo (Cave *et al.*, 2010). Risultati precedentemente pubblicati hanno dimostrato che questi 3 congeneri di PCB-NDL non solo sono in grado di indurre apoptosi nei macrofagi in maniera concentrazione-dipendente (Ferrante *et al.*, 2011), ma sono

anche citotossici a concentrazioni alle quali risultano inattivi singolarmente, dimostrando un effetto tossico sinergico nell'induzione della morte cellulare.

Sono stati utilizzati tali inquinanti a concentrazioni nanomolari allo scopo di identificare in maniera specifica l'effetto immunosoppressivo indipendentemente dalla morte cellulare. La concentrazione finale di 300 nM, ottenuta dall'associazione dei 3 PCB-NDL e usata per trattare i macrofagi, corrisponde a circa 108ppb (ng/mL). Questa concentrazione, così come la concentrazione scelta per i PCB singoli e per le associazioni 2 a 2, è vicina a quella presente nel siero (De Felip *et al.*, 2008) e nel tessuto adiposo (Malarvannan *et al.*, 2013) di soggetti esposti, e/o presente negli alimenti di origine animale, rispecchiando l'esposizione di uomini e animali ai PCB-NDL. L'importante ruolo giocato dalle cellule macrofagiche nei meccanismi di difesa dell'organismo ospite nei confronti di attacchi esterni è ben noto. I macrofagi, una volta attivati, producono citochine pro-infiammatorie, enzimi e chemochine (Rodriguez-Vita e Lawrence., 2010), che complessivamente intensificano ed orientano la difesa immunitaria dell'ospite.

Nel presente studio è stato dimostrato che i PCB-NDL mostrano forti effetti sinergici riducendo il rilascio di IL-6, TNF- $\alpha$  e MCP-1 da parte dei macrofagi dopo stimolazione con LPS a 4 ore e a 24 ore. Nello specifico, il PCB penta-clorurato (il 101) risulta meno efficace di quelli esa/epta-clorurati (come il PCB 153 e 180) nel sopprimere in maniera significativa il rilascio di IL-6 indotto dal LPS. Inoltre, il PCB 153 riduce i livelli di MCP-1 ed il PCB180 sopprime il rilascio di TNF- $\alpha$ . Questi ultimi risultati sono perfettamente coerenti con quelli di Hong *et al.* (2004), che dimostrano la capacità degli altri interferenti endocrini (EDC) di ridurre o contrastare l'espressione del TNF- $\alpha$  in una diversa linea cellulare macrofagica, le RAW 264. Durante il processo infiammatorio e durante la risposta immunitaria, come nel processo di difesa dell'ospite, endotossine e chemochine inducono una rapida alterazione nelle cellule ed un'espressione immediata dei geni precoci, portando alla sintesi della forma inducibile di enzimi infiammatori come la COX-2 (Ferrante *et al.*, 2008; Emami *et al.*, 2010) e la iNOS (Meli *et al.*, 2000). I nostri dati dimostrano chiaramente che le cellule macrofagiche esposte all'associazione dei PCB-NDL sono meno capaci o del tutto incapaci di orchestrare una risposta immunitaria efficace contro il LPS, poiché

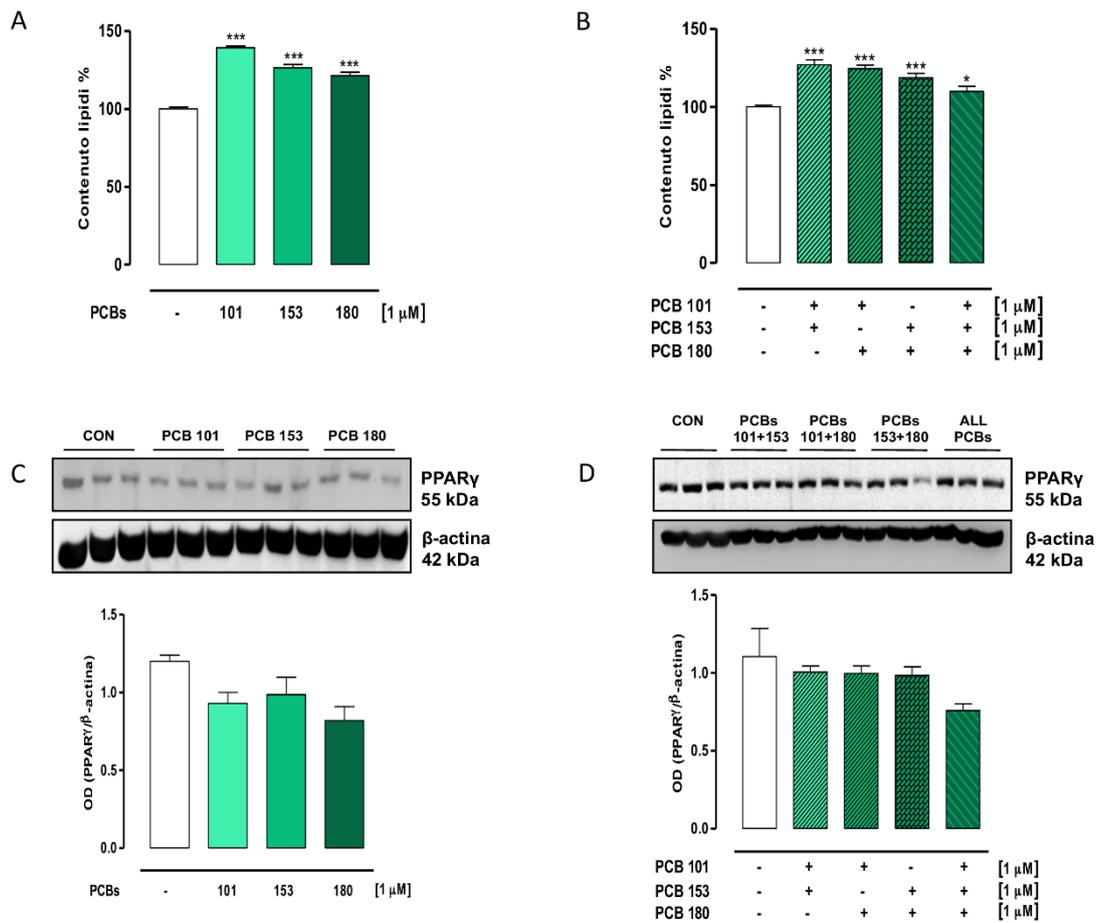
l'espressione della COX-2 e della iNOS indotta dal LPS viene soppressa dall'incubazione simultanea di queste cellule con associazioni di PCB. Come risaputo, i macrofagi hanno un'ampia gamma di segnali chimici per comunicare con altre tipologie di cellule immunocompetenti, ad esempio le cellule macrofagiche stimulate dal LPS producono un eccesso di NO tramite l'azione della iNOS (Zhou *et al.*, 2014). Nelle nostre condizioni sperimentali, i PCB-NDL, specialmente in associazione tra loro, inibiscono la produzione di nitriti indotta dal LPS. I risultati sono coerenti con quelli trovati da Hong *et al.*, (2004) e con quelli ottenuti da Yoshitake *et al.*, (2008), che mettono in luce la capacità di numerosi EDC di sopprimere la produzione di NO in vitro nei macrofagi stimolati con LPS, suggerendo una plausibile interferenza con il signaling del NO e con il sistema di difesa dell'ospite contro patogeni esterni. Complessivamente, i dati ottenuti dimostrano che le associazioni dei PCB-NDL riducono la capacità dei macrofagi di rispondere in modo appropriato agli stimoli nocivi, come il LPS. Di conseguenza, le associazioni dei PCB possono causare, così come molti altri inquinanti immunotossici, una risposta non-fisiologica alle infezioni batteriche aumentandone la suscettibilità, tali dati sono in accordo con studi epidemiologici nei quali si osserva una correlazione diretta tra l'esposizione ai PCB e la crescente incidenza di patologie infettive soprattutto dell'apparato respiratorio ed endocrino (Heilmann, 2006)

### **2.3.3 Studio in vitro della modulazione del metabolismo lipidico e della leptino-resistenza indotta dai PCB-NDL**

#### ***2.3.3.1 Effetti dei PCB sul contenuto lipidico***

Studi preliminari sono stati condotti per valutare l'effetto dei PCB 101, 153 e 180 sulla vitalità di cellule adipocitarie differenziate 3T3-L1. Tutti i PCB testati alle diverse concentrazioni (nM a  $\mu$ M), da soli o in combinazione, non modificavano la vitalità cellulare (dati non mostrati).

Successivamente sono stati esaminati gli effetti dei PCB, alla concentrazione di 1  $\mu$ M, su adipociti differenziati 3T3L1, valutando sia la capacità delle cellule di inglobare grasso, utilizzando la tecnica istologica di colorazione Oil Red O' (Ramirez-Zacarias *et al.*, 1992), sia l'espressione del PPAR- $\gamma$ , un regolatore dell'adipogenesi che gioca un ruolo chiave durante il differenziamento da una cellula precursore ad adipocita completamente maturo (Rosen *et al.*, 2006). Dai nostri esperimenti risultava che i PCB sia da soli che in associazione causavano un aumento significativo del contenuto lipidico (Figura 18 A -B) mentre l'espressione del PPAR- $\gamma$  non subiva modificazioni significative (Figura 18 C-D).

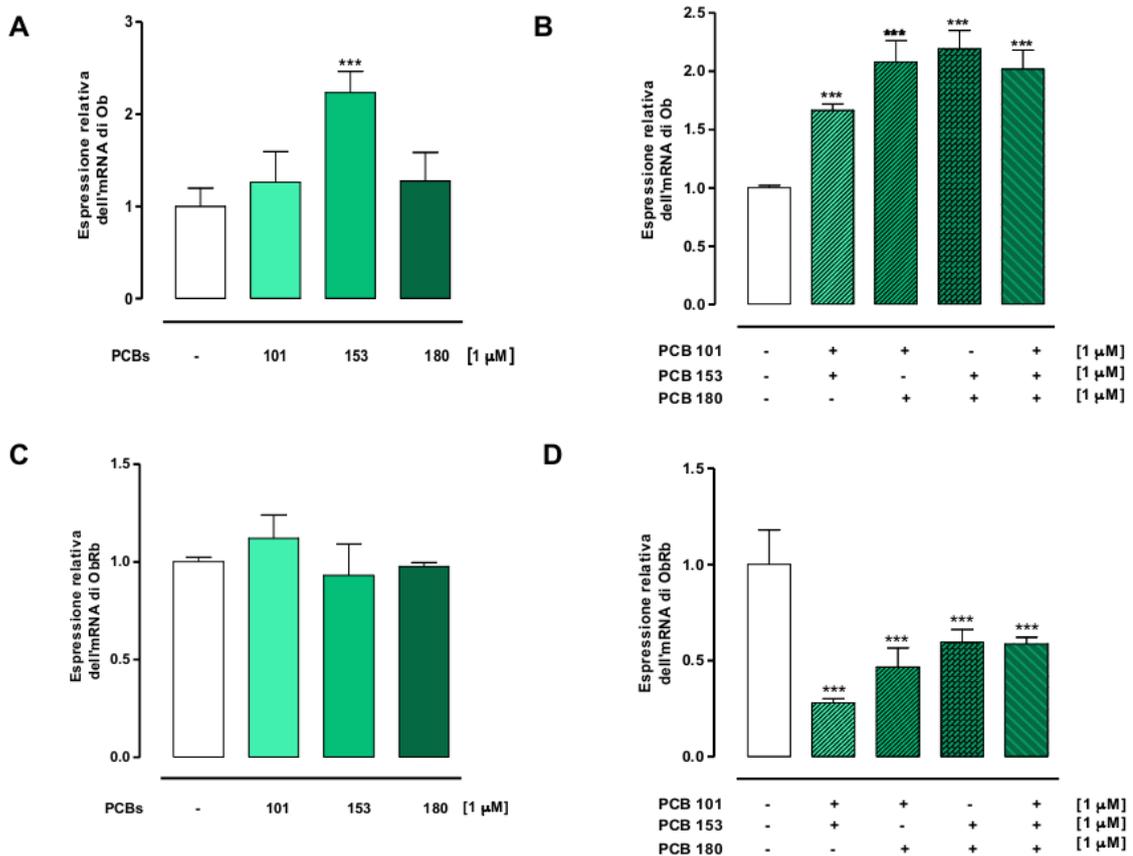


**Figura 18.** Effetti dei PCB da soli o in associazione sul contenuto lipidico e sull'espressione del PPAR $\gamma$  in adipociti maturi 3T3-L1. Le cellule, indotte al differenziamento per 7 giorni, sono trattate con PCBs da soli (A) o in associazione (B) per due giorni (1 $\mu$ M). Le cellule di controllo contengono DMSO (0,1%) come veicolo. Dopo trattamento con i PCB, le cellule sono colorate con Oil Red O. La densità ottica (OD<sub>510</sub>) delle cellule trattate con i PCB sono comparate con le OD delle cellule di controllo. I risultati sono espressi come media  $\pm$  SEM di tre esperimenti indipendenti. L'espressione e l'analisi densitometrica del PPAR $\gamma$  nelle cellule trattate con 1 $\mu$ M di PCB sono mostrati. L'immunoblot di  $\beta$ -Actina è stato usato come controllo per il corretto caricamento dei campioni. Quando i PCB sono stati usati in associazione, la concentrazione finale era sempre di 1  $\mu$ M.

### 2.3.3.2 Effetti dei PCB sull'espressione della leptina e del suo recettore funzionale ObRb negli adipociti

Successivamente è stato studiato se i PCB non coplanari in esame avessero effetti sulla funzione degli adipociti maturi. In particolare è stata valutata la trascrizione di un importante ormone secreto dagli adipociti: la leptina. Come mostrato in Figura 19 A il PCB 153, ma non il 101 e il 180, determinava un aumento significativo della trascrizione genica della leptina. È interessante notare che l'associazione dei PCB maggiormente, il 101 e 180 o tutti e tre insieme, determinava un aumento significativo

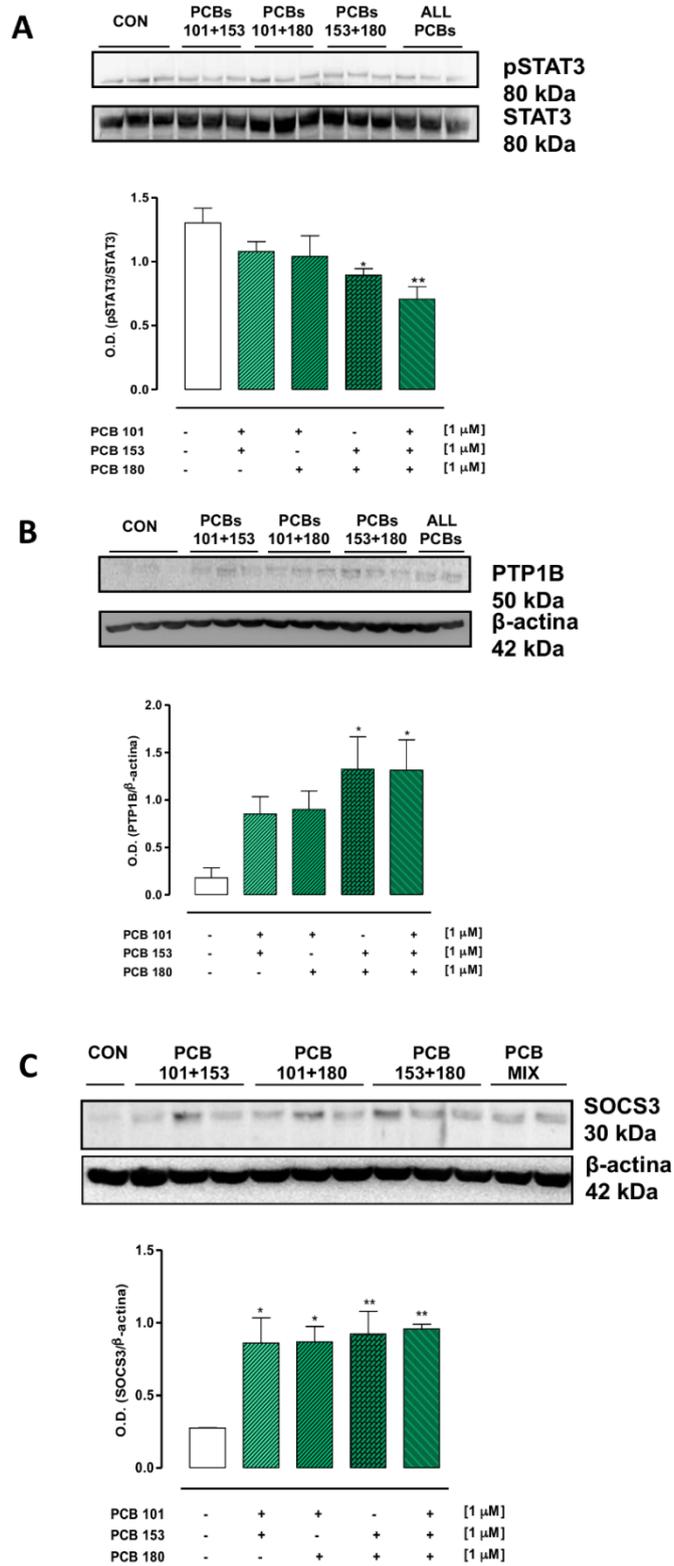
dell'espressione dell'ormone adipocitario (Figura 19 B). Inoltre i PCB anche se da soli non modificavano l'espressione del recettore ObRb (Figura 19 C) associati a due a due o tutti e tre insieme diminuivano significativamente l'espressione di quest'ultimo. (Figura 19 D).



**Figura 19.** Effetti dei PCB sull'espressione dell'mRNA della leptina (Ob) e del suo recettore (ObRb) in adipociti differenziati. Gli adipociti differenziati 3T3-L1 sono esposti ai PCB da soli o in associazione, per 48h. Le cellule di controllo contengono DMSO (0,1%) come veicolo. Le cellule sono lisate per estrarre l'mRNA come descritto nei Materiali e Metodi. I livelli di mRNA sono analizzati mediante real.time PCR. I valori sono rappresentativi di tre esperimenti indipendenti. Quando i PCB sono usati in associazione la concentrazione finale dei contaminanti è sempre di 1  $\mu$ M. \*\*\*P<0.001 vs cellule di controllo.

### ***2.3.3.3 Effetti dei PCB sul signaling della leptina***

Per valutare l'induzione della leptino-resistenza da parte dei PCB, è stata studiata la trasduzione del segnale di ObRb focalizzando l'attenzione sulla fosforilazione di STAT3, un attivatore a valle della trascrizione di geni bersaglio della leptina e sull'espressione di SOCS3 e PTP1B due importanti proteine che mediano la leptino-resistenza. L'associazione dei PCB 153 e 180 o tutti e tre insieme induceva una significativa riduzione nell'attivazione di STAT3, evidenziata da una riduzione della proteina fosforilata (Figura 20 A). A supporto di tale dato, i PCB causavano un aumento dell'espressione di PTP1B (Figura 20 B) e SOCS3 (Figura 20 C).

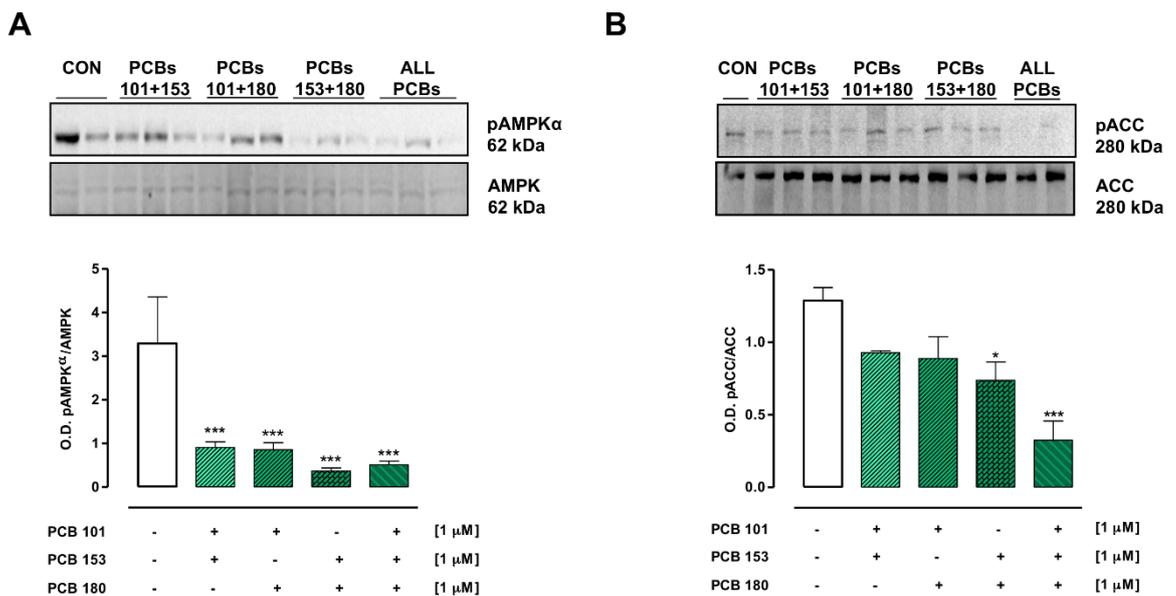


**Figura 20.** Effetto dei PCB sul signaling della leptina. I livelli di pSTAT3 (A) PTP1B (B) e SOCS3 (C) nelle cellule trattate per 2 giorni con PCB sono mostrati. Le cellule di controllo contengono DMSO (0,1%) come veicolo. Analisi densitometrica delle bande proteiche di pSTAT3/STAT3 (A). L' immunoblot è rappresentativo di tre esperimenti indipendenti. L'immunoblot della β-actina è stata usata per dimostrare l'uguale caricamento

dei campioni. Quando i PCB sono usati in associazione, la concentrazione finale è sempre di 1  $\mu\text{M}$ . \* $P < 0.05$  e  $P < 0.01$  vs cellule di controllo.

### 2.3.3.4 Modulazione di AMPK ed attivazione di ACC indotta dai PCB

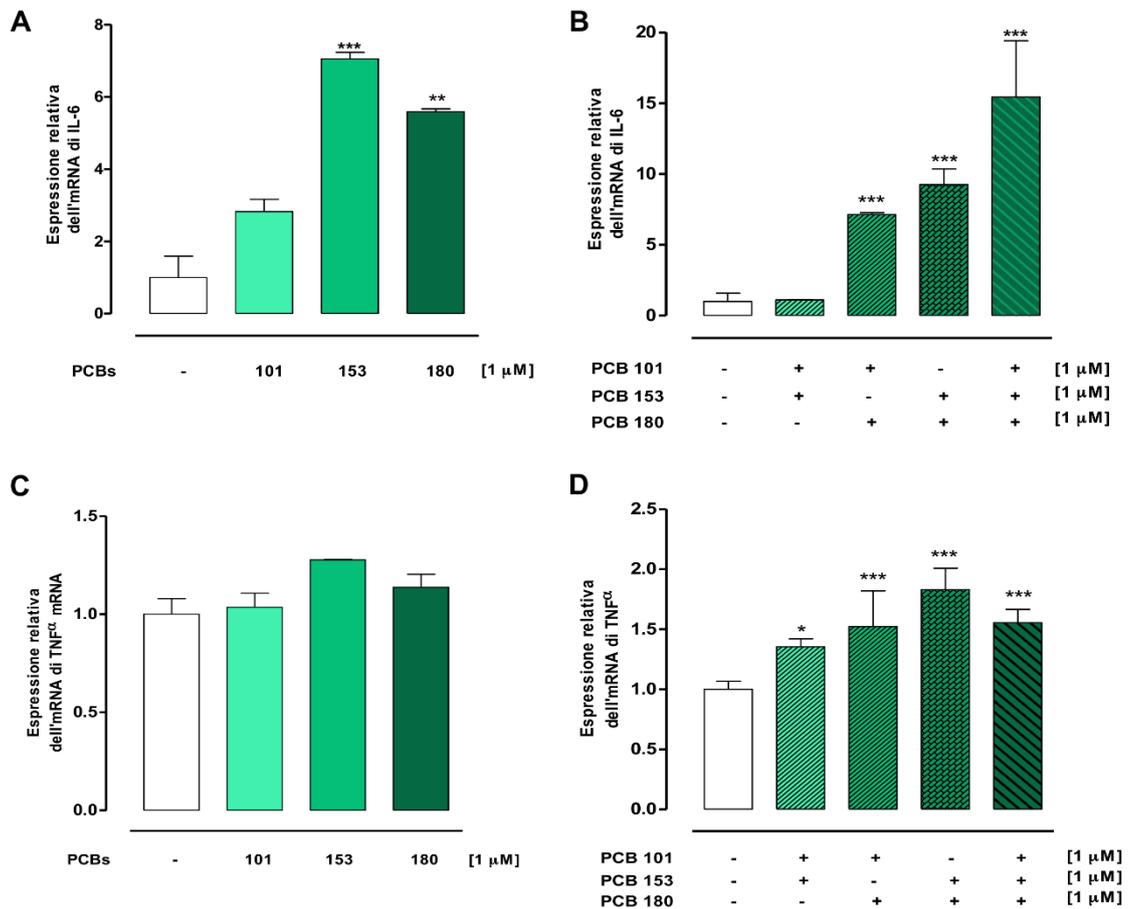
Poiché l'effetto della leptina sul tessuto adiposo è orchestrato dall'attivazione del pathway AMPK/ACC, è stato valutato lo stato di fosforilazione di entrambi gli enzimi. L'esposizione degli adipociti ai PCB determinava una marcata riduzione dell'attivazione di AMPK (Figura 21 A) associato con una diminuzione della pACC, in particolare quando si associavano i PCB 153 e 180 o tutti i PCB (Figura 21 B), suggerendo una riduzione nel catabolismo dei lipidi.



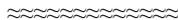
**Figura 21.** Effetto dei PCB sul pathway AMPK-ACC. Variazioni nell'espressione di pAMPK $\alpha$  e pACC in adipociti maturi trattati per 48h con PCB singoli e in associazione (1  $\mu\text{M}$ ) sono mostrati. Analisi densitometrica delle bande proteiche di pAMPK $\alpha$ /AMPK (A) e pACC/ACC (B) eseguita su 3 esperimenti separati. I dati sono valutati come media  $\pm$ SEM di tre esperimenti indipendenti. Quando i PCB sono usati in associazione la concentrazione finale dei contaminanti è sempre di 1  $\mu\text{M}$ . \* $P < 0.05$  e \*\*\* $P < 0.001$  vs cellule di controllo.

### 2.3.3.5 Effetti dei PCB sull'espressione delle citochine

Come è ben noto, l'IL-6 e il TNF- $\alpha$ , sono due citochine pro-infiammatorie, prodotte dal tessuto adiposo, che svolgono un ruolo chiave nell'insorgenza di disordini metabolici associati al diabete di tipo 2 o sindrome metabolica. L'esposizione ai PCB inducevano un aumento dei livelli di IL-6 sia da soli che in associazione (Figura 22 A-B), viceversa i livelli di mRNA di TNF- $\alpha$  aumentavano significativamente solo con le diverse associazioni di PCB (Figura 22 D).



**Figura 22.** Effetti dei PCB sull'espressione del mRNA di IL-6 e TNF- $\alpha$  in adipociti maturi 3T3L1 esposti ai PCB 1  $\mu$ M da soli o in associazione per 48h sono mostrati. Le cellule di controllo contengono DMSO (0,1%) come veicolo. Le cellule sono lisate per estrarre l'mRNA come descritto nei Materiali e Metodi. I livelli di mRNA sono analizzati mediante real.time PCR. I valori sono rappresentativi di tre esperimenti indipendenti. Quando i PCB sono usati in associazione la concentrazione finale dei contaminanti è sempre di 1  $\mu$ M. \*P<0.05, \*\*P<0.01 e \*\*\*P<0.001 vs cellule di controllo.



È ormai riconosciuto che l'elevata lipofilia dei PCB e dei composti tossici correlati possa favorire il loro accumulo nel tessuto adiposo. Pertanto il tessuto adiposo costituisce il principale serbatoio dei contaminanti organici persistenti, ed è stato utilizzato come matrice tissutale ideale per la valutazione dei livelli di esposizione ai PCB. La maggior parte degli studi sperimentali sono stati rivolti ai PCB coplanari e confermano la loro capacità di alterare l'omeostasi del glucosio sia nei topi magri che obesi (Baker *et al.*, 2013), di indurre la differenziazione degli adipociti in vitro e di promuovere l'obesità in vivo (Arsenescu *et al.*, 2008). In generale i PCB-DL sono una componente minore del contenuto di PCB presenti negli esseri umani. Al contrario i PCB-NDL, prevalenti nell'ambiente, sono stati notevolmente trascurati e i loro effetti tossici sulle funzioni del tessuto adiposo sono tutt'ora poco esplorati (Crinnion, 2011). Il presente studio è il primo che dimostra come l'esposizione ai PCB-NDL determina alterazioni nel pathway della leptina indicando un effetto negativo di questi contaminanti sulla funzione e sull'attività degli adipociti. La leptina è un ormone adipocitario sintetizzato e rilasciato in proporzione al contenuto di massa grassa (Zhang *et al.*, 2002), che svolge un ruolo fondamentale nell'omeostasi del tessuto adiposo. Infatti, la leptina, attraverso il legame alla sua isoforma recettoriale funzionale attiva negli adipociti una cascata di segnali che impediscono l'accumulo di lipidi ed aumentano l'ossidazione degli acidi grassi (Steinberg *et al.*, 2002). L'alterazione di questa via metabolica, caratterizzata da un aumento dei livelli di leptina circolante e una diminuita funzionalità del suo recettore e del suo signalling, viene definito leptino-resistenza ed è spesso associato al fenotipo obeso (Zhou e Rui., 2013).

In questo studio è stato evidenziato come l'esposizione delle cellule 3T3-L1 ai PCB-NDL (101,153 e 180), da soli o in associazione a due a due o tutti insieme, determina un aumento del contenuto dei lipidi e della trascrizione del gene della leptina. A questo aumento si oppone una riduzione dell'espressione dell'isoforma recettoriale ObRb.

Tale riduzione associata all'elevata produzione della leptina supporta l'insorgenza di una insensibilità all'ormone correlabile alla leptino-resistenza del tessuto adiposo tipica dell'alterazione metabolica periferica caratteristica dell'obesità (Crujeiras *et al.*, 2015).

Nel protocollo sperimentale adottato, l'aumento nella sintesi della leptina e la riduzione nella trascrizione del suo recettore è anche associato alla riduzione degli enzimi fosforilati AMPK e ACC, e quindi all'aumento del contenuto di lipidi negli adipociti. AMPK è una chinasi che gioca un ruolo fondamentale nel metabolismo lipidico (Unger, 2004) e nel monitoraggio dello stato energetico della cellula attraverso il rilevamento del rapporto [ATP]/[AMP]. Quando il rapporto [ATP]/[AMP] si abbassa a causa della ridotta disponibilità di nutrienti, AMPK è attivato. Questa attivazione rappresenta un segnale per chiudere percorsi anabolizzanti e promuovere processi catabolici come la fosforilazione di enzimi chiave del metabolismo intermedio. In parallelo con l'attivazione di AMPK, la leptina sopprime l'attività di ACC, un enzima chiave nella biosintesi endogena di acidi grassi. L'inibizione di ACC riduce la sintesi di lipidi attraverso il blocco della produzione di malonil-CoA, un inibitore allosterico della carnitina palmitoil trasferasi (CTP) 1, un enzima limitante la velocità di ossidazione degli acidi grassi. Quest'ultimo effetto porta al trasporto degli acidi grassi nei mitocondri e quindi alla loro  $\beta$ -ossidazione. È ipotizzabile sostenere che l'induzione della leptino-resistenza da parte dei PCB potrebbe essere correlata all'aumentato accumulo di grasso attraverso la modulazione della via AMPK /ACC negli adipociti.

Per confermare la leptino-resistenza da PCB è stata valutata l'efficacia del signalling della leptina attraverso la determinazione di STAT3 fosforilato e l'espressione della fosfatasi PTP1B e della SOCS-3, due importanti mediatori della leptino-resistenza. (Cheng *et al.*, 2002; Lubis *et al.*, 2008). Questi regolano negativamente il signalling della leptina, defosforilando JAK-2, e quindi riducendo la fosforilazione di STAT3. Coerentemente, nei nostri esperimenti è stato dimostrato un aumento dell'espressione di PTP1B e di SOCS-3 e una riduzione dell'attivazione di STAT3 nelle cellule trattate con i diversi PCB.

Vari studi hanno riportato che l'attivazione di AMPK può anche inibire la sintesi di citochine pro-infiammatorie come il TNF- $\alpha$  e l'IL-6 nel tessuto adiposo (Linh *et al.*, 2008). Qui, la capacità di PCB di ridurre l'attivazione di AMPK è coerente con l'aumento osservato nella sintesi delle due citochine suindicate. Come è noto, queste, prodotte dal tessuto adiposo, svolgono un ruolo nell'insorgenza della disfunzione metabolica correlata al diabete di tipo 2, e alla sindrome metabolica (Wieser *et al.*, 2013; Capurso e Capurso, 2012).

Nella presente tesi è stato osservato l'effetto sinergico di PCB-NDL analizzati sia sui disturbi metabolici (cioè trascrizione del gene della leptina, del recettore e trasduzione del segnale) sia sull'espressione delle citochine infiammatorie (cioè IL-6 e TNF $\alpha$ ). Gli effetti differenziati indotti dai congeneri di PCB potrebbero essere spiegati con una specifica reattività dei congeneri, ma anche sulla base della diversa distribuzione di PCB attraverso i compartimenti adipocitari.

In conclusione, i risultati suggeriscono che l'alterazione del metabolismo lipidico è causata da un'esposizione delle cellule differenziate 3T3-L1 ai PCB attraverso la riduzione della reattività del recettore della leptina e dei suoi pathway relativi. Questo studio dimostra il potenziale effetto obesogenico dei PCB-NDL, che possono anche contribuire all'insorgenza dei disturbi metabolici su base infiammatoria.

## CONCLUSIONI

I risultati di questo lavoro di tesi mostrano come, in vitro, i PCB-NDL da soli e in combinazione abbiano un ruolo importante sia di modulazione della risposta immunitaria che di alterazione del metabolismo lipidico. Quest'ultima è causata dalla riduzione della responsività del recettore per la leptina e del pathway di segnalamento ad esso correlato. I PCB, inoltre, attraverso la sotto-regolazione dell'attivazione di AMPK, inducono nel tessuto adiposo un aumento della sintesi di citochine proinfiammatorie quali il TNF- $\alpha$  e l'IL-6 che, secrete nel torrente circolatorio, giocano un ruolo importante nell'insorgenza di disfunzioni metaboliche quali il diabete di tipo 2 o la sindrome metabolica. Lo studio mostra, quindi, il potenziale effetto pro-obesogeno dei PCB-NDL che sembrano acquisire un ruolo importante nella eziopatogenesi di patologie multifattoriali, quali appunto l'obesità e le turbe metaboliche e su base infiammatoria ad esso correlate. Tali patologie risultano ampiamente diffuse nell'era moderna costituendo una vera emergenza sanitaria soprattutto in medicina umana ma anche in campo medico-veterinario.

Gli stessi congeneri di PCB riducono la capacità dei macrofagi di rispondere in maniera idonea agli stimoli nocivi (come ad esempio l'LPS in corso di infezione da batteri gram-negativi). I PCB-NDL, possono quindi, soprattutto se in associazione, indurre una risposta non fisiologica alle infezioni su base batterica. Questa evidenza conferma quanto osservato negli ultimi decenni in studi epidemiologici che correlano i livelli tissutali di PCB con l'aumentata incidenza di patologie di origine batterica. L'effetto sinergico evidenziato con il trattamento combinato delle cellule ai tre PCB-NDL studiati ha importante rilevanza perché riproduce, in parte, le condizioni dell'esposizione naturale degli organismi viventi superiori a miscele di tali contaminanti presenti nei prodotti commerciali. Per una maggiore coerenza dei risultati ottenuti in condizioni sperimentali controllate, le concentrazioni testate in vitro sono state selezionate riproducendo quelle evidenziate, nel corso di studi epidemiologici, nei tessuti animali e/o campioni umani.

I risultati concernenti la modulazione della risposta immunitaria sono in perfetto accordo con quanto scaturito dall'analisi di regressione eseguita sui livelli residuali di PCB-NDL nel latte e il grado di infestazione da strongili intestinali rilevato nelle asine

sottoposte a campionamento. L'aumento delle concentrazioni degli inquinanti risulta indurre, in maniera significativa, un aumento della contaminazione da parassiti a conferma dell'azione immunodepressiva indotta dai PCB-NDL.

I risultati sembrano di particolare interesse in quanto ottenuti esaminando congeneri che, come riportato nella parte introduttiva di questa tesi, sono stati poco studiati negli scorsi anni e trascurati rispetto ai più tossici e noti PCB diossino-simili. Tra l'altro i PCB selezionati sono tre dei sei congeneri definiti dalla Comunità Europea quali "indicatori" della contaminazione da PCB-NDL, quindi, più diffusi nell'ambiente e più frequentemente riscontrati, alle più alte concentrazioni, nei tessuti e nei fluidi degli organismi viventi.

Il presente studio fornisce, inoltre, dati sulla contaminazione da composti organoclorurati di una matrice alimentare poco indagata quale il latte di asina. Tale alimento presenta concentrazioni residuali di OC quasi sempre inferiori ai LMR stabiliti dalla Comunità Europea per il latte e i prodotti lattiero-caseari a basso contenuto di grassi. Tuttavia, la mancanza di dati relativi ai consumi che appaiono progressivamente crescenti negli ultimi anni e il prevalente interessamento di fasce di consumatori particolarmente sensibili (bambini e anziani) implica la necessità di prestare una opportuna attenzione nell'analisi del rischio relativa ad un alimento che sembrerebbe più sicuro (in uno stesso ambito territoriale) rispetto al latte prodotto da altre specie erbivore.

I risultati presentati mostrano, in conclusione, come i PCB-NDL, attraverso l'alterazione della fisiologica risposta macrofagica e del metabolismo lipidico siano capaci di agire su diverse strutture e sistemi inducendo importanti alterazioni biochimiche a loro volta causa diretta e/o indiretta di anomalie funzionali anche complesse. Gli effetti osservati nei due studi in vitro, combinati con i risultati dell'analisi di regressione, forniscono un contributo alla definizione e al chiarimento dei meccanismi d'azione alla base della tossicità esercitata dai PCB-NDL che, almeno per quanto concerne la immunomodulazione, a tutt'oggi vede ancora riportati in letteratura pareri contrastanti.

Sebbene l'impiego e la presenza dei composti organoclorurati studiati sia stato ormai vietato del tutto già da diversi anni, il riscontro attuale della loro presenza

nell'ambiente in diverse matrici biotiche/abiotiche e la identificazione di nuovi meccanismi d'azione tramite i quali questi contaminanti possono indurre tossicità, impongono di non abbassare la soglia di guardia. A tale proposito, gli studi di monitoraggio e quelli sui meccanismi di tossicità costituiscono nel loro insieme un valido contributo per individuare tempestivamente fonti allarmanti di contaminazione e partecipare al processo di conferma o modificazione dei livelli di tolleranza e dei livelli obiettivo stabiliti dalla comunità scientifica internazionale.

## BIBLIOGRAFIA

- Airaksinen R., Rantakokko P., Eriksson J.G., Blomstedt P., Kajantie E., Kiviranta H., 2011. Association between type 2 diabetes and exposure to persistent organic pollutants. *Diabetes Care* 34, 1972-9.
- Ali U., Syed J.H., Malik R.N., Katsoyiannis A., Li J., Zhang G., Jones K.C., 2014. Organochlorine pesticides (OCPs) in South Asian region: a review. *Sci Total Environ.* 1, 476-477:705-17.
- Amati L., Marzulli G., Martulli M., Tafaro A., Jirillo F., Pugliese V., Martemucci G., D'Alessandro A.G., Jirillo E. 2010. Donkey and goat milk intake and modulation of the human aged immune response. *Curr Pharm Des.* 16, 864–869.
- Andersen U.V., Howe D.K., Olsen S.N., Nielsen M.K., 2014. Recent advances in diagnosing pathogenic equine gastrointestinal helminths: The challenge of prepatent detection. *Veterinary Parasitology* 192, 1–9.
- Annamalai J., Namasivayam V., 2015. Endocrine disrupting chemicals in the atmosphere: Their effects on humans and wildlife. *Environ Int.* 76, 78-97. Review.
- Arner P., Spalding K.L., 2010. Fat cell turnover in humans. *Biochem Biophys Res Commun* 396:101–104.
- Arsenescu V., Arsenescu R.I., King V., Swanson H., Cassis L.A., 2008. Polychlorinated biphenyl-77 induces adipocyte differentiation and proinflammatory adipokines and promotes obesity and atherosclerosis. *Environ. Health Perspect.* 116, 761–768.
- Arsenescu V., Arsenescu R.I., King V., Swanson H., Cassis L.A., 2008. Polychlorinated biphenyl-77 induces adipocyte differentiation and proinflammatory adipokines and promotes obesity and atherosclerosis. *Environ. Health Perspect.* 116, 761–768.
- Backer L.C., Grindem C.B., Corbett W.T., Cullins L., Hunter J.L., 2001. Pet dogs as sentinels for environmental contamination. *Sci. Total Environ.* 274, 161-9.
- Baker N.A., Karounos M., English V., Fang J., Wei Y., Stromberg A., Sunkara M., Morris A.J., Swanson H.I., Cassis L.A., 2013. Coplanar polychlorinated biphenyls impair glucose homeostasis in lean C57BL/6 mice and mitigate beneficial effects of weight loss on glucose homeostasis in obese mice. *Environ. Health Perspect.* 121, 105-10.
- Baker N.A., Karounos M., English V., Fang, J., Wei, Y., Stromberg, A., Sunkara, M., Morris, A.J., Swanson, H.I., Cassis, L.A., 2013. Coplanar polychlorinated biphenyls impair glucose homeostasis in lean C57BL/6 mice and mitigate beneficial effects of weight loss on glucose homeostasis in obese mice. *Environ. Health Perspect.* 121, 105–110.
- Balash K.J., Al-Omar M.A., Abdul Latif B.M. 1987. Effect of chlordane on testicular tissues of Swiss mice. *Bull Environ Contam Toxicol.* 39: 434-42.
- Ballschmiter K., Zell M., 1980. Baseline studies of the global pollution. I. Occurrence of organohalogenes in pristine European and antarctic aquatic environments. *Int J Environ Anal Chem.* 8, 15-35.

- Banks A.S., Davis S.M., Bates S.H., Myers MG J.r., 2000. Activation of downstream signals by the long form of the leptin receptor. *J Biol Chem.* 275, 14563-72.
- Bence K.K., Delibegovic M., Xue B., Gorgun C.Z., Hotamisligil G.S., Neel B.G., Kahn B.B., 2006. Neuronal PTP1B regulates body weight, adiposity and leptin action. *Nat. Med.* 12, 917–924.
- Bertocchi L., Ghidini S., Fedrizzi G., Lorenzi V., 2015. Case-study and risk management of dioxins and PCBs bovine milk contaminations in a high industrialized area in Northern Italy. *Environ Sci Pollut Res. Inter.* 22, 9775-9785.
- Billack B., 2009. Macrophage activation: role of toll-like receptors, nitric oxide, and nuclear factor kappa B. *Am J Pharm Educ.* 70, 102.
- Boersma E.R., Lanting C.I., 2000. Environmental exposure to polychlorinated biphenyls (PCBs) and dioxins. Consequences for longterm neurological and cognitive development of the child lactation. *Adv. Exp. Med. Biol.* 478, 271-87.
- Bondy G., Armstrong C., Coady L., Doucet J., Robertson P., Feeley M., Barker M., 2003. Toxicity of the chlordane metabolite oxychlordane in female rats: clinical and histopathological changes. *Food Chem. Toxicol.* 41, 291-301.
- Bordajandi L.R., Gómez. G., Fernández M.A., Abad E., Rivera J., González M.J., 2003. Study on PCBs, PCDD/Fs, organochlorine pesticides, heavy metals and arsenic content in freshwater fish species from the River Turia (Spain). *Chemosphere* 53, 163–171.
- Brown J.F., Lawton Jr. R.W., 1993. Environmental Protection Agency - PCBs in fish tissue. In *Proceedings: U.S. EPA's National Technical Workshop.* EPA 823-R-93-003.
- Capurso, C., Capurso, A., 2012. From excess adiposity to insulin resistance: the role of free fatty acids. *Vascul. Pharmacol.* 57, 91–97.
- Carreras-Aubets M., et al., 2012. Parasite communities in the red mullet, *Mullus barbatus* L., respond to small-scale variation in the levels of polychlorinated biphenyls in the Western Mediterranean. *Mar. Pollut. Bull.* 64, 1853–1860.
- Casals-Casas C., Desvergne B., 2011. Endocrine disruptors: from endocrine to metabolic disruption. *Annu Rev Physiol.* 73,135-62.
- Cave, M., Appana, S., Patel, M., Falkner, K.C., McClain, C.J., Brock, G., 2010. Polychlorinated biphenyls, lead, and mercury are associated with liver disease in American adults: NHANES 2003-2004. *Environ. Health Perspect.* 118, 1735–1742.
- Chalubinski M., Kowalski M.L., 2006. Endocrine disruptors--potential modulators of the immune system and allergic response. *Allergy* 61, 1326-35.
- Chamorro-García R., Blumberg B., 2014. Transgenerational effects of obesogens and the obesity epidemic. *Curr Opin Pharmacol.* 19, 153-8.
- Chang K.J., Hsieh K.H., Tang S.Y., Tung T.C., Lee T.P., 1982. Immunologic evaluation of patients with polychlorinated biphenyl poisoning: evaluation of delayed-type skin hypersensitive response and its relation to clinical studies. *J Toxicol Environ Health.* 9, 217-23.

- Cheng A., Uetani N., Simoncic P.D., Chaubey V.P., Lee-Loy A., McGlade C.J., Kennedy B.P., Tremblay M.L., 2002. Attenuation of leptin action and regulation of obesity by protein tyrosine phosphatase 1B. *Dev. Cell.* 2, 497–503.
- Chiavari C., Coloretti F., Nanni M., Sorrentino E., Grazia L. 2005. Use of donkey's milk for a fermented beverage with lactobacilli. *Lait.* 85, 481-490.
- Chiofalo B., Dugo P., Bonaccorsi I.L., Mondello L. 2011. Comparison of major lipid components in human and donkey milk: new perspectives for a hypoallergenic diet in humans. *Immunopharmacol Immunotoxicol.* 33, 633-44.
- Chomczynski, P., Sacchi N. 1987. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenolchloroform extraction. *Anal. Biochem.* 162, 156–159.
- Chowdhury A.R., Venkatakrisna-Bhatt H., Gautam A.K., 1987. Testicular changes of rats under lindane treatment. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 38, 154-6.
- Cincinelli A., Martellini T., Pozo K., Kukučka P., Audy O., Corsolini S., 2016. *Trematomus bernacchii* as an indicator of POP temporal trend in the Antarctic seawaters. *Environ Pollut.* S0269-7491, 30271-2
- Colburn T., Clement C., 1992. *Advances in Modern Environmental Toxicology*, vol. 21. Princeton Scientific Publishing, Princeton, NJ.
- Corrigan F.M., Wienburg C.L., Shore R.F., Daniel S.E., Mann D., 2000. Organochlorine insecticides in substantia nigra in Parkinson's disease. *J. Toxicol. Environ. Health A* 59, 229-34.
- Coulston F., 1985. Reconsideration of the dilemma of DDT for the establishment of an acceptable daily intake. *Regul. Toxicol. Pharmacol.* 5, 332-83.
- Cringoli G., Rinaldi L., Veneziano V., Capelli G., Scala A., 2004. The influence of flotation solution, sample dilution and the choice of McMaster slide area (volume) on the reliability of the McMaster technique in estimating the faecal egg counts of gastrointestinal strongyles and *Dicrocoelium dendriticum* in sheep. *Vet. Parasitol.* 123, 121-31.
- Crinnion W.J., 2011. Polychlorinated Biphenyls: Persistent Pollutants with Immunological, Neurological, and Endocrinological Consequences. *Environmental Medicine* 16, 5-13.
- Criswell K.A., Loch-Carusio R., 1999. Lindane-induced inhibition of spontaneous contractions of pregnant rat uterus. *Reprod. Toxicol.* 13, 481-90.
- Crujeiras A.B., Carreira M.C., Cabilia B., Andrade S., Amil M., Casanueva F.F., 2015. Leptin resistance in obesity: An epigenetic landscape. *Life Sci* 140, 57-63.
- D'Alessandro A.G., Martemucci G., Jirillo E., De Leo V., 2010. Major stage. Implications for potential dietary interventions in human diseases. *Immunopharmacol Immunotoxicol.* 33, 259-65.
- Dale W.E., Copeland M.F., Pearce G.W. and Miles J.W., 1966. Concentration of o,p'-DDT in rat brain at various intervals after dosing. *Arch. Int. Pharmacodyn. Ther.* 162, 40-43.

Dallaire F., Dewailly E., Vezina C., Muckle G., Weber J. P., Bruneau S., Ayotte P., 2006. Effect of prenatal exposure to polychlorinated biphenyls on incidence of acute respiratory infections in preschool Inuit children. *Environ. Health. Perspect.* 114, 1301–1305.

De Felip E., Abballe A., Casalino F., Di Domenico A., Domenici P., Iacovella N., Ingelido A.M., Pretolani E., Spagnesi M., 2008. Serum levels of PCDDs, PCDFs and PCBs in non-occupationally exposed population groups living near two incineration plants in Tuscany, Italy. *Chemosphere.* 72, 25–33.

De Matteis F., Prior B.E., Rimington C., 1961. Nervous and biochemical disturbances following hexachlorobenzene intoxication. *Nature (London).* 191, 363-6.

Decreto Ministeriale del 27 agosto 2004 del Ministero della Salute 2004. Prodotti fitosanitari: limiti massimi di residui delle sostanze attive nei prodotti destinati all'alimentazione. G.U. n° 292, 14/12/2004.

Dhiman S., Yadav K., Rabha B., Goswami D., Hazarika S., Tyagi V., 2016. Evaluation of Insecticides Susceptibility and Malaria Vector Potential of *Anopheles annularis* s.l. and *Anopheles vagus* in Assam, India. *Plos one* 11, 1-13.

Di Bella G., Potortì A.G., Lo Turco V., Licata P., Rastrelli L., Dugo G., 2014. Donkey's milk safety: POCs and PCBs levels and infant daily intake. *Food Control* 46, 210-216

Di Fusco N., 2006. La contaminazione da diossine in provincia di Caserta. *SILVAE* 4, 225-238.

Di Muccio A., Pelosi P., Barbini DA., Generali T., Ausili A., Vergori F. 1997. Selective extraction of pyrethroid pesticide residues from milk by solid-matrix dispersion. *J Chromatogr A.* 765, 51-60.

Di Rosa M., Ialenti A., Ianaro A., Sautebin L., 1996. Interaction between nitric oxide and cyclooxygenase pathways. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 54, 229-238

Dragney K.H., Nims R.W., Fox S.D., Lindahl R., Lubet R.A. 1995. Relative potencies of induction of hepatic drug-metabolizing enzyme genes by individual PCB congeners. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 132, 334-42.

Dugo P., Kumm T., Lo Presti M., Chiofalo B., Salimei E., Fazio A., Cotroneo A., Mondello L. 2005. Determination of triacylglycerols in donkey milk by using high performance liquid chromatography coupled with atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry. *J Sep Sci.* 28, 1023–1030.

EFSA 2010. Scientific Report OF Efsa, Results of the monitoring of non dioxin-like PCBs in food and feed. European Food Safety Authority (EFSA), Parma, Italy.

EFSA 2012. Scientific Report OF Efsa, Update of the monitoring of levels of dioxin and PCBs in food and feed. *The EFSA Journal*, 10, 1–82.

Emami S.A., Taghizadeh Rabe S. Z., Iranshahi M., Ahi A., Mahmoudi M. 2010. Sesquiterpene lactone fraction from *Artemisia khorassanica* inhibits inducible nitric oxide synthase and cyclooxygenase-2 expression through the inactivation of NF-kappaB. *Immunopharmacol. Immunotoxicol.* 32, 688–695.

Esposito M., Cavallo S., Serpe F.P., D'Ambrosio R., Gallo P., Colarusso G., et al., 2009. Levels congener profiles of polychlorinated dibenzo-p-dioxins, polychlorinated dibenzofurans and dioxin-like polychlorinated biphenyls in cow's milk collected in Campania, Italy. *Chemosphere* 77, 1212-1216.

Esposito M., Serpe F.P., Cavallo S., Pellicanò R., Gallo P., Colarusso G., et al., 2010. A survey of dioxins (PCDDs and PCDFs) and dioxin-like PCBs in sheep and goat milk from Campania, Italy. *Food Additives and Contaminants Part B. Surveillance*. 3, 58-63.

EU Commission Regulation No 1259/2011, (2 December 2011). Amending Regulation (EC) No 1881/2006 as regards maximum levels for dioxins, dioxin-like PCBs and non dioxin-like PCBs in foodstuffs. G.U. EU-L 320, 03/12/2011.

Fantuz F., Ferraro S., Todini L., Piloni R., Mariani P., Malissiova E., Salimei E., 2015. Minor and potentially toxic trace elements in milk and blood serum of dairy donkeys. *J Dairy Sci*. 98, 5125-32.

Ferrante M. C., Clausi M. T., Meli R., Fusco G., Naccari C., Lucisano A., 2010. Polychlorinated biphenyls and organochlorine pesticides in European eel (*Anguilla anguilla*) from the Garigliano River (Campania region, Italy). *Chemosphere*. 78, 709–716.

Ferrante M.C., Mattace Raso G., Bilancione M., Esposito E., Iacono A., Meli, R., 2008. Differential modification of inflammatory enzymes in J774A.1 macrophages by ochratoxin A alone or in combination with lipopolysaccharide. *Toxicol. Lett.* 181, 40–46.

Ferrante M.C., Mattace Raso G., Esposito E., Bianco G., Iacono A., Clausi M. T., Amero P., Santoro A., Simeoli, R., Autore, G., 2011. Effects of non-dioxin-like polychlorinated biphenyl congeners (PCB 101, PCB 153 and PCB 180) alone or mixed on J774A.1 macrophage cell line: modification of apoptotic pathway. *Toxicol. Lett.* 202, 61–68.

Ferrante M.C., Clausi M.T., Naccari C., Fusco G., Mattace Raso G., Santoro A., Meli R., 2014. Does *Clam Ensis Siliqua* provide useful information about contamination by Polychlorinated biphenyls and organochlorine pesticides beyond that of mussel *Mytilus Galloprovincialis*? *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, 92, 636-641

Fujihara M., Muroi M., Tanamoto K., Suzuki T., Azuma H., Ikeda H., 2003. Molecular mechanisms of macrophage activation and deactivation by lipopolysaccharide: roles of the receptor complex. *Pharmacol. Ther.* 100, 171–194.

Ganey P.E., Sirois J.E., Denison M., Robinson J.P., Roth R.A., 1993. Neutrophil function after exposure to polychlorinated biphenyls in vitro. *Environ Health Perspect.* 101, 430-4.

Guo Y.L., Lambert G.H., Hsu C-C., Hsu M.M.L., 2004. Yucheng: health effects of prenatal exposure to polychlorinated biphenyls and dibenzofurans. *Int Arch Occup Environ Health* 77, 153–158.

Ha M.H., Lee D.H., Jacobs D.R., 2007. Association between serum concentrations of persistent organic pollutants and self-reported cardiovascular disease prevalence: results from the National Health and Nutrition Examination Survey, 1999-2002. *Environ. Health Perspect.* 115, 1204-9.

Hauser R., Chen Z., Pothier L., Ryan L., Altshul L., 2003. The relationship between human semen parameters and environmental exposure to polychlorinated biphenyls and p,p'-DDE. *Environ. Health Perspect.* 111, 1505-11.

Heilmann, C., Budtz-Jørgensen E., Nielsen F., Heinzow B., Weihe P., Grandjean P., 2010. Serumconcentration of antibodies against vaccine toxoids in children exposed perinatally to immunotoxicants. *Environ. Health. Perspect.* 118, 1434–1438.

Heindel J.J., Newbold R., Schug T.T., 2015. Endocrine disruptors and obesity. *Nat Rev Endocrinol.* 11, 653-61.

Helmfrid I., Salihovic S., Van Bavel B., Wingren G., Berglund M., 2015. Exposure and body burden of polychlorinated biphenyls (PCB) and metals in a historically contaminated community. *Environment International* 76, 41–48.

Henriquez-Hernandez L.A., et al., 2011. Background levels of polychlorinated biphenyls in the population of the Canary Islands (Spain). *Environ. Res.* 111, 10–16.

Hombach-Klonisch S., Pocar P., Kietz S., Klonisch T., 2005. Molecular actions of polyhalogenated arylhydrocarbons (PAHs) in female reproduction. *Curr. Med. Chem.* 12, 599-616.

Hong C.C., Shimomura-Shimizu M., Muroi M., Tanamoto K., 2004. Effect of endocrine disrupting chemicals on lipopolysaccharide-induced tumor necrosis factor-alpha and nitric oxide production by mouse macrophages. *Biol. Pharm. Bull.* 27, 1136–1139.

Hoshi H., Minamoto N., Iwata H., Shiraki K., Tatsukawa R., Tanabe S., Fujita S., Hirai K., Kinjo T., 1998. Organochlorine pesticides and polychlorinated biphenyl congeners in wild terrestrial mammals and birds from Chubu region, Japan: interspecies comparison of the residue levels and compositions. *Chemosphere.* 36, 3211-21.

Huang Q., Huang X., 1987. The effect of benzene hexachloride on mouse sperm. *Zhejiang Yike Daxue Xuebao.* 16, 9-12.

Hutson D.H. e Hoadley E.C.,1974. The oxidation of a cyclic alcohol (12-hydroxyendrin) to a ketone (12-keto-endrin) by microsomal mono-oxygenation. *Chemosphere.* 3: 205-10.

IARC (International Agency for Research on Cancer). (1987 b). IARC Monogr. Eval. Carcinog. Risk Hum. Vol. 20 (suppl.7).

IARC (International Agency for Research on Cancer). (1991). IARC Monogr. Eval. Carcinog. Risk Hum. Vol. 53.

IARC (International Agency for Research on Cancer). (2001). IARC Monogr. Eval. Carcinog. Risk Hum. Vol. 79.

IARC (International Agency for Research on Cancer). 1987a. IARC Monogr. Eval. Carcinog. Risk Hum. Vol. 18 (suppl.7).

Igarashi A., Ohtsu S., Muroi M., Tanamoto K. 2006. Effects of possible endocrine disrupting chemicals on bacterial component- induced activation of NF-kappaB. *Biol. Pharm. Bull.* 29, 2120–2122.

Ingelido A.M., Abballe A., Di Domenico A., Fochi I., Iacovella N., Saragosa A., Spagnesi M., Valentini S., De Felip E., 2009. Levels and Profiles of Polychlorinated Dibenzo-p-Dioxins,

Polychlorinated Dibenzofurans, and Polychlorinated Biphenyls in Feedstuffs and Milk From Farms in the Vicinity of Incineration Plants in Tuscany, Italy. *Arch Environ Contam Toxicol.* 57, 397–404.

Iverson F., 1976. Induction of paraoxon dealkylation by hexachlorobenzene (HCB) and mirex. *J. Agric. Food Chem.* 24, 1238-46.

Jandacek R.J., Anderson N., Liu M., Zheng S., Yang Q., Tso P., 2005. Effects of yo-yo diet, caloric restriction, and olestra on tissue distribution of hexachlorobenzene. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 288, G292–G299.

Kelce W.D., Stone C.R., Laws S.C., Gray L.E., Kemppainen J.A., Wilson E.M., 1995. The persistent DDT metabolite p,p'-DDE is a potent androgen receptor antagonist. *Nature* 375, 581-5.

Kershaw E.E., Flier J.S., 2004. Adipose tissue as an endocrine organ. *J Clin Endocrinol Metab.* 89, 2548-56.

Kim M.J., Marchand P., Henegar C., Antignac J.P., Alili R., Poitou C., et al., 2011. Fate and complex pathogenic effects of dioxins and polychlorinated biphenyls in obese subjects before and after drastic weight loss. *Environ Health Perspect* 119, 377–383.

Kimura A., Kishimoto T., 2010. IL-6: Regulator of Treg/Th17 balance. *Eur. J. Immunol.* 40, 1830–1835.

Koner B.C., Banerjee B.D, Ray A., 1998. Organochlorine pesticide-induced oxidative stress and immune suppression in rats. *Indian J. Exp. Biol.* 36, 395-8.

Korach K.S., Sarver P., Chae K., McLachlan J.A., McKinney J.D., 1988. Estrogen receptor-binding activity of polychlorinated hydroxybiphenyls: conformationally restricted structural probes. *Mol. Pharmacol.* 33, 120–126.

Krystyniak K., Bernier J., Hugo P., Fournier M., 1986. Suppression of MHV3 virus-activated macrophages by dieldrin. *Biochem. Pharmacol.* 35, 2577-86.

Kunisue T., Nakanishi S., Watanabe M., Abe T., Nakatsu S., Kawauchi S., Sano A., Horii A., Kano Y., Tanabe S. 2005. Contamination status and accumulation features of persistent organochlorines in pet dogs and cats from Japan. *Environ. Pollut.* 136, 465-76.

Kupfer D., Bulger W.H., 1976. Studies on the mechanism of estrogenic actions of o,p-DDT: interactions with the estrogen receptor. *Pestic. Biochem. Physiol.* 6, 461-70.

La Merrill M., Emond C., Kim M.J., Antignac J.P., Le Bizec B., Clément K., Birnbaum L.S., Barouki R., 2013. Toxicological function of adipose tissue: focus on persistent organic pollutants. *Environ Health Perspect.* 121, 162-9.

Laden F., Hankinson S.E., Wolff M.S., Colditz G.A., Willett W.C., Speizer F.E., Hunter D.J., 2001. Plasma organochlorine levels and the risk of breast cancer: an extended follow-up in the Nurses' Health Study. *Int. J. Cancer.* 91, 568-74.

Levin M., Morsey B., Mori C., Nambiar P.R., De Guise S., 2005a. Non-coplanar PCB-mediated modulation of human leukocyte phagocytosis: a new mechanism for immunotoxicity. *J Toxicol Environ Health A.* 68, 1977-93.

- Lihn A.S., Pedersen S.B., Lund S., Richelsen B., 2008. The anti-diabetic AMPK activator AICAR reduces IL-6 and IL-8 in human adipose tissue and skeletal muscle cells. *Mol. Cell. Endocrinol.* 292, 36–41.
- Lim J.S., Son H.K., Park S.K., Jacobs D.R. Jr, Lee D.H., 2010. Inverse associations between long-term weight change and serum concentrations of persistent organic pollutants. *Int J Obes* 35, 744–747.
- Loflen C.L., 2013 Examination of spotted sand bass (*Paralabrax maculatofasciatus*) pollutant bioaccumulation in San Diego Bay, San Diego, California. *Peer J.* 1, e213.
- Lubis A.R., Widia F., Soegondo S., Setiawati A., 2008. The role of SOCS-3 protein in leptin resistance and obesity. *Acta Med Indones.* 40, 89-95.
- Madsen L., Petersen R.K., Sørensen M.B., Jørgensen C., Hallenborg P., Pridal L., Fleckner J., Amri E.Z., Krieg P., Furstenberger G., Berge R.K., Kristiansen K., 2003. Adipocyte differentiation of 3T3-L1 preadipocytes is dependent on lipoxygenase activity during the initial stages of the differentiation process. *Biochem. J.* 375, 539–549.
- Magnusson K., Ekelund R., Grabic R., Bergqvist P.A., 2006. Bioaccumulation of PCB congeners in marine benthic infauna. *Mar Environ Res.* 61, 379-95.
- Malarvannan G., Dirinck E., Dirtu A.C., Pereira-Fernandes A., Neels H., Jorens P.G., Gaal L.V., Blust R., Covaci A., 2013. Distribution of persistent organic pollutants in two different fat compartments from obese individuals. *Environ. Int.* 55, 33–42.
- Malisch R., Kotz A., 2014. Dioxins and PCBs in feed and food--review from European perspective.
- Matsumura F., Ghiasuddin S.M., 1983. Evidence for similarities between cyclodiene type insecticides and picrotoxin in their action mechanisms. *J. Environ Sci. Health, Part B.* B 18, 1-4.
- Matthews H.B., Matsumura F., 1969. Metabolic fate of dieldrin in the rat. *J. Agric. Food Chem.* 17, 845-52.
- McAllister E.J., Dhurandhar N.V., Keith S.W., Aronne L.J., Barger J., Baskin M., Benca R.M., Biggio J., Boggiano M.M., Eisenmann J.C., Elobeid M., Fontaine K.R., Gluckman P., Hanlon E.C., Katzmarzyk P., Pietrobelli A., Redden D.T., Ruden D.M., Wang C., Waterland R.A., Wright S.M., Allison D.B., 2009. Ten putative contributors to the obesity epidemic. *Crit Rev Food Sci Nutr* 49, 868-913.
- Mehendale H.M., Fields M., Matthews H.B., 1975. Metabolism and effects of hexachlorobenzene on hepatic microsomal enzymes in the rat. *J. Agric. Food Chem.* 23, 261-5.
- Meli R., Ferrante M.C., Mattace Raso G., Cavaliere M., Di Carlo R., Lucisano A., 2000. Effect of fumonisin B1 on inducible nitric oxide synthase and cyclooxygenase-2 in LPSstimulated J774A.1 cells. *Life Sci.* 67, 2845–2853.
- Mendoza C.E., Shields J.B., Laver G.W., 1976. Body burden of hexachlorobenzene and its effects on some esterases in tissues of young male rats. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 38, 499-506.
- Michielsen C.C., Bloksma N., Klatter F.A., Rozing J., Vos J.G., van Dijk J.E., 1999. The role of thymus-dependent T cells in hexachlorobenzene-induced inflammatory skin and lung lesions. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 161, 180-91.

Morgan E.R., Van Dijk J., 2012. Climate and the epidemiology of gastrointestinal nematode infections of sheep in Europe. *Vet Parasitol.* 189, 8-14.

Mosmann T., 1983. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods.* 16, 55-63.

Mullerova D., Kopecky J., 2007. White adipose tissue: storage and effector site for environmental pollutants. *Physiol. Res.* 56, 375–381.

Murphy K., Travers P., Walport M., 2008. *Immunobiology.* 7th ed. New York:Garland Science.

Nelson J.A., 1973. Effects of DDT analogs and polychlorinated biphenyls (PCB) mixtures on 3H-estradiol binding to rat uterine receptor. *Fed. Proc. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* 32, 236.

Ortega P., Hayes W.J.Jr., Durham W.F., Mattson A., 1956. DDT in the Diet of the Rat. *Public Health Monogr. No 43, Public Health Serv. Public No. 484. U.s. Govt. Printing Office; Washington, D.C.*

Pessah, N., Kaufmann, D., Yagen, B., Hen, N., Wlodarczyk, B., Finnell, R.H., Bialer, M., 2010. Comparative pharmacodynamic and pharmacokinetic analysis of two anticonvulsant halo derivatives of 2,2,3,3-tetramethylcyclopropanecarboxamide, an amide of a cyclic analog of valproic acid. *Epilepsia* 51, 1944-1953.

Playford R.J., MacDonald C.E., Johnson W.S. 2000. Colostrum and milk-derived peptide growth factors for the treatment of gastrointestinal disorders. *AM J Clin Nutr.* 72, 5-14.

Polidori P., Beghelli D., Mariani P., Vincenzetti S. 2009. Donkey milk production: state of the art. *Ital J Anim Sci.* 677-683.

Porterfield S.P., 2000. Thyroidal dysfunction and environmental chemicals--potential impact on brain development. *Environ. Health Perspect.* 108(Suppl. 3): 433-8.

Portugal C.L., Cowell S.P., Fedoruk M.N., Butler C.M., Rennie P.S., Nelson C.C., 2002. Polychlorinated biphenyls interfere with androgen-induced transcriptional activation and hormone binding. *Toxicol. Applied Pharmacol.* 179, 185-94.

Ramadhinara A., Widia F., Soegondo S., Setiawati A., 2008. The Role of SOCS-3 in Leptin Resistance and Obesity. *Acta Med Indones-Indones J Intern Med* 40, 89-95. Review.

Ramirez-Zacarias J.L., Castro-Munozledo F., Kuri-Harcuch W., 1992. Quantitation of adipose conversion and triglycerides by staining intracytoplasmic lipids with Oil Red O. *Histochemistry* 97, 493–497.

Rodriguez-Vita J., Lawrence T., 2010. The resolution of inflammation and cancer. *Cytokine Growth Factor Rev.* 21, 61–65.

Rojanapo W., Tepsuwan A., Kupradinum P., Chutimataewin S., 1987. Modulation of hepatocarcinogenicity of aflatoxin B1 by the chlorinated insecticide, DDT. In: Nigam S.K., McBrien D.C.H. and Slater T.F. (eds.) *Eicosanoids, Lipid Peroxidation and Cancer.* Springer-Verlag,

Berlin. pp. 327-38.

Rönn M., Lind L., Van Bavel B., Salihovic S., Michaëlsson K., Lind P.M., 2011. Circulating levels of persistent organic pollutants associate in divergent ways to fat mass measured by DXA in humans. *Chemosphere*. 85, 335-43.

Saeedi Saravi S.S., Dehpour A.R., 2016. Potential role of organochlorine pesticides in the pathogenesis of neurodevelopmental, neurodegenerative, and neurobehavioral disorders: A review. *Life Sci*. 145, 255-64.

Safe S., 1980. Metabolism, uptake, storage and bioaccumulation. In: Kimbrough R.D. (ed.) *Halogenated biphenyls, terphenyls, naphthalenes, dibenzodioxins and related products*. Elsevier, New York. pp. 81-107.

Sagerup K., et al., 2009. Persistent organic pollutants, heavy metals and parasites in the glaucous gull (*Larus hyperboreus*) on Spitsbergen. *Environ. Pollut.* 157, 2282–2290.

Sandoe P., Palmer C., Corr S., Astrup A., Bjørnvad C.R., 2014. Canine and feline obesity: a One Health perspective. *Veterinary Record* 610-616.

Schantz S.L., Widholm J.J., Rice D.C., 2003. Effects of PCB exposure on neuropsychological function in children. *Environ. Health Perspect.* 111, 357-94.

Selgrade M.K., 2007. Immunotoxicity: the risk is real. *Toxicol Sci.* 100, 328-32.

Shirasu Y., Moriya M., Kato K., Lienard F., Tezuka H., Teramoto S., Kada T., 1976. Mutagenicity screening of pesticides in the microbial system. *Mutat. Res.* 40, 19-30.

Smith K.B., Smith M.S., 2016. Obesity Statistics. *Prim Care.* 43, 121-35.

Sonne C., Dietz R., Born E.W., Leifsson P.S., Andersen S., 2008a. Is there a link between hypospadias and organochlorine exposure in East Greenland sledge dogs (*Canis familiaris*)? *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 69, 391-5.

Stahl N., Boulton T.G., Farruggella T., Ip NY, Davis S., Witthuhn B.A., Quelle F.W., Silvennoinen O., Barbieri G., Pellegrini S., et al. 1994. Association and activation of Jak-Tyk kinases by CNTF-LIF-OSM-IL-6 beta receptor components. *Science* 263, 92–95.

Steinberg G.R., Bonen A., Dyck D.J., 2002. Fatty acid oxidation and triacylglycerol hydrolysis are enhanced after chronic leptin treatment in rats. *Am. J. Physiol.* 282, 593–600.

Stonard M.D., 1975. Mixed type hepatic microsomal enzyme induction by hexachlorobenzene. *Biochem. Pharmacol.* 24, 1959-63.

Storelli C., Scarano C., Spanu E.P.L., De Santis V.P., Busco A., Storelli G.O., 2012. Marcotrigiano Levels and congener profiles of polychlorinated dibenzo-p-dioxins (PCDDs), polychlorinated dibenzofurans (PCDFs) and polychlorinated biphenyls (PCBs) in sheep milk from an industrialised area of Sardinia, Italy *M.M. Food and Chemical Toxicology* 50, 1413–1417.

Storelli M.M., Perrone V.G., 2010. Detection and quantitative analysis of organochlorine compounds (PCBs and DDTs) in deep sea fish liver from Mediterranean Sea. *Environ. Sci. Pollut. Res. Int.* 17, 968–976.

Svensson B.G.; Hallberg T.; Nilsson A.; Schutz A.; Hagmar L., 1994. Parameters of immunological competence in subjects with high consumption of fish contaminated with persistent organochlorine compounds. *Int. Arch. Occup. Environ. Health* 65, 351–358.

Swierkosz T.A., Mitchell J.A., Warner T.D., Botting R.M., Vane J.R., 1995. Coinduction of nitric oxide synthase and cyclo-oxygenase: interactions between nitric oxide and prostanoids. *Br J Pharmacol* 114, 1335-1342.

Tafaro A., Magrone T., Jirillo F., Martemucci G., D'Alessandro A.G., Amati L., Jirillo E. 2007. Immunological properties of donkey's milk: its potential use in the prevention of atherosclerosis. *Curr Pharm Des.* 13, 3711–3717.

Tang-Péronard J.L., Heitmann B.L., Andersen H.R., Steuerwald U., Grandjean P., Weihe P., Jensen T.K., 2014. Association between prenatal polychlorinated biphenyl exposure and obesity development at ages 5 and 7 y: a prospective cohort study of 656 children from the Faroe Islands. *Am J Clin Nutr.* Jan 99, 5-13.

Thorpe E., Walker A.I.T., 1973. The toxicology of dieldrin (HEOD). II. Comparative long-term oral toxicity studies in mice with dieldrin, DDT, phenobarbitone,  $\beta$ -BHC and  $\gamma$ -BHC. *Food Cosmet. Toxicol.* 11, 433-42.

Toft G., 2014. Persistent organochlorine pollutants and human reproductive health. *Dan Med J.* 61, B4967. Review.

Törnkvist A., Glynn A., Aune M., Darnerud P.O., Ankarberg E.H., 2011. PCDD/F, PCB, PBDE, HBCD and chlorinated pesticides in a Swedish market basket from 2005 levels and dietary intake estimations. *Chemosphere* 83, 193-9.

Turrio-Baldassarri L., Alivernini S., Carasi S., Casella M.L., Fuselli S., Iacovella N., Iamiceli A.L., La Rocca C., Scarcella C., Battistelli C.L., 2009. PCB, PCDD and PCDF contamination of food of animal origin as the effect of soil pollution and the cause of human exposure in Brescia. *Chemosphere* 76, 278–285.

U.S. EPA (Environmental Protection Agency). 1994. Health assessment document for 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) and related compounds. U.S. Environmental Protection Agency (EPA/600/BP-92/001a-c).

Uemura H., Arisawa K., Hiyoshi M., Kitayama A., Takami H., Sawachika F., Dakeshita S., Nii K., Satoh H., Sumiyoshi Y., Morinaga K., Kodama K., Suzuki T., Nagai M., Suzuki T., 2009. Prevalence of metabolic syndrome associated with body burden levels of dioxin and related compounds among Japan's general population. *Environ. Health Perspect.* 117, 568-73.

Unger R.H., 2004. The hyperleptinemia of obesity-regulator of caloric surpluses. *Cell* 117, 145–146.

Usha Rani M.V., Reddi O.S., Reddy P.P., 1980. Mutagenicity studies involving aldrin, endosulfan, dimethoate, phosphamidon, carbaryl and Ceresan. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 25, 277-82.

Van den Berg M., Birnbaum L.S., Bosveld A.T., Brunstrom B., Cook P., Feeley M., et al. 1998. Toxic equivalency factors (TEFs) for PCBs, PCDDs, PCDFs for humans and wildlife. *Environmental Health Perspectives*, 106, 775 e792.

- Van Den Heuvel R.L., Koppen G., Staessen J.A., Hond E.D., Verheyen G., Nawrot T.S., Roels H.A., Vlietinck R., Schoeters G.E., 2002. Immunologic biomarkers in relation to exposure markers of PCBs and dioxins in Flemish adolescents (Belgium). *Environ Health Perspect.* 110, 595-600.
- Van Der Poll T., Keogh C.V., Guirao X., Buurman W.A., Kopf M., Lowry S.F., 1997. Interleukin-6 Gene-Deficient Mice Show Impaired Defense against Pneumococcal Pneumonia, in *The Journal of Infectious Diseases.* 176. 439–444.
- Van Ede K.I., Aylward L.L., Andersson P.L., Van Den Berg M., Van Duursen M.B., 2013. Tissue distribution of dioxin-like compounds: potential impacts on systemic relative potency estimates. *Toxicol Lett.* 220, 294-302.
- Van Velsen F.L., Danse L.H.J.C., Van Leeuwen F.X.R., Dormans J.A.M.A., Van Logten M.J., 1986. The subchronic oral toxicity of beta-isomer of hexachlorocyclohexane in rats. *Fund. Appl. Toxicol.* 6, 697-712.
- Vincenzetti S., Foghini L., Pucciarelli S., Polzonetti V., Cammertoni N., Beghelli D, Polidori P. 2014. Hypoallergenic properties of donkey's milk: a preliminary study. *Vet Ital.* 50, 99-107.
- Walker C.H., 2001. *Organic pollutants: an ecotoxicological perspective.* Taylor and Francis Press.
- Waller C., Juma B., Gray L.E., Kelce W., 1996. Three dimensional quantitative structure activity relationships for androgen receptor ligands. *Toxicol. Applied Pharmacol.* 137, 219-27.
- Wang X., Xue Y., Gong P., Yao T., 2014. Organochlorine pesticides and polychlorinated biphenyls in Tibetan forest soil: profile distribution and processes. *Environ Sci Pollut Res* 21, 1897–1904.
- Weisglas-Kuperus N., Vreugdenhil H. J., Mulder P. G., 2004. Immunological effects of environmental exposure to polychlorinated biphenyls and dioxins in Dutch school children. *Toxicol. Lett.* 149, 281–285.
- Whitehead S.A., Rice S., 2006. Endocrine-disrupting chemicals as modulators of sex steroid synthesis. *Best Practice & Research. Clinical Endocrinology & Metabolism* 20, 45–61.
- WHO Consultation, 1998. *Assessment of the health risk of dioxins: re-evaluation of the Tolerable Daily Intake (TDI)* May 25-29, Geneva, Switzerland.
- Wieser V., Moschen A.R., Tilg H., 2013. Inflammation, cytokines and insulin resistance: a clinical perspective. *Arch. Immunol. Ther. Exp. (Warsz)* 61, 119–125.
- Wildemauwe C., Lontie J.F., Schoofs L., Larebeke N., 1983. The mutagenicity in procaryocytes of insecticides, acaricides and nematicides. *Residue Rev.* 89, 129-78.
- Wimmerova S., Lancz K., Tihanyi J., Šovcikova E., Kocan A., Drobna B., Palkovicova L., Fabišikova A., Jureckova D., Conka K., Trnovec T., 2010. Half-lives of serum PCB congener concentrations in environmentally exposed early adolescents. *Chemosphere*

Wojtowicz A., Ropstad E., Gregoraszcuzk E., 2001. Estrous cycle dependent changes in steroid secretion by pig ovarian cells in vitro to polychlorinated biphenyl (PCB153). *Endocr. Regul.* 35, 223-8.

Wright A.S., Potter D., Wooder M.F., Donninger C., Greenland R., 1972. The effects of dieldrin on the subcellular structure and function of mammalian liver cells. *Food Cosmet. Toxicol.* 10: 311-22.

Yadav A., Saini V., Arora S., 2010. MCP-1: chemoattractant with a role beyond immunity: a review. *Clin. Chim. Acta* 411, 1570–1579.

Yoo J., Hirano M1, Mizukawa H., Nomiya K., Agusa T., Kim E.Y., Tanabe S., Iwata H. 2015. In Vitro and in Silico Analyses for Predicting Hepatic Cytochrome P450-Dependent Metabolic Potencies of Polychlorinated Biphenyls in the Baikal Seal. *Environ Sci Technol.* 49, 14588-96.

Yoshitake J., Kato K., Yoshioka D., Sueishi Y., Sawa T., Akaike T., Yoshimura T., 2008. Suppression of NO production and 8-nitroguanosine formation by phenol-containing endocrine-disrupting chemicals in LPS-stimulated macrophages: involvement of estrogen receptor-dependent or-independent pathways. *Nitric Oxide.* 18, 223–228.

Yu G.W., Laseter J., Mylander C., 2011. Persistent organic pollutants in serum and several different fat compartments in humans. *J. Environ. Public Health.* 2011, 417980.

Zhang Y., Matheny M., Zolotukhin S., Tumer N., Scarpace P.J., 2002. Regulation of adiponectin and leptin gene expression in white and brown adipose tissues: influence of beta3-adrenergic agonists, retinoic acid, leptin and fasting. *Biochim Biophys Acta.* 1584, 115-22.

Zhang Y., Guo K.Y., Diaz P.A., Heo M., Leibel R.L., 2002. Determinants of leptin gene expression in fat depots of lean mice. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 282, 226-34.

Zhou D., Huang C., Lin Z., Zhan S., Kong L., Fang C., Li J., 2014. Macrophage polarization and function with emphasis on the evolving roles of coordinated regulation of cellular signaling pathways. *Cell. Signal.* 26, 192–197.

Zhou Y., Rui L., 2013. Leptin signaling and leptin resistance. *Front. Med.* 7, 207–222.

Zubero M.B., Aurrekoetxe J.J., Murcia M., Ibarluzea J.M., Goni F., Jimenez C., Ballester F., 2015. Time Trends in Serum Organochlorine Pesticides and Polychlorinated Biphenyls in the General Population of Biscay, Spain. *Arch Environ Contam Toxicol.* 68, 476–488.

