



**Dipartimento di Scienze Agrarie e Forestali
(DAFNE)**

Corso di Dottorato di Ricerca in

Scienze e Tecnologie per la Gestione Forestale e Ambientale – XXVIII Ciclo.

**“Caratterizzazione del rischio da esposizione a β -esaclorocicloesano
(β -HCH) mediante modelli cellulari animali”**

s. s. d. AGR/18

Tesi di dottorato di:

Dott.ssa Cristina Rossi

Tutore

Dott. Andrea Amici

Coordinatore del corso

Prof. Bartolomeo Schirone

Data della discussione

28 GIUGNO 2016

*“Ogni persona che passa nella nostra vita è unica.
Sempre lascia un po’ di se e si porta un po’ di noi.
Ci sarà chi si è portato via molto,
ma non ci sarà mai chi non avrà lasciato”*

J. L. Borges

INDICE

Riassunto

Abstract

CAPITOLO 1

Introduzione	pag. 10
1.1 Interferenti endocrini	pag. 11
1.2 Inquinanti Organici Persistenti (POPs)	pag. 18
1.3 Pesticidi e loro impatto tossicologico	pag.19
1.3.1 Pesticidi organofosforici	pag. 22
1.3.2 Carbammati e ditiocarbammati	pag. 23
1.3.3 Pesticidi organoclorurati	pag.24
1.4 Esaclorocicloesano ed i suoi isomeri: proprietà chimico-fisiche	pag. 25
1.5 Produzione ed utilizzo in campo agronomico	pag. 27
1.6 Livelli ambientali di HCH in Italia e nel mondo	pag. 29
1.7 Effetti dei pesticidi organoclorurati: studi in vivo ed in vitro	pag.30
1.8 Esposizione ad organoclorurati e stress ossidativo: le specie reattive all'ossigeno (ROS)	pag. 41

CAPITOLO 2

QUADRO DI RIFERIMENTO E SCOPO DELLA TESI

2.1 Il caso della Valle del Sacco	pag. 47
2.2 Scopo della tesi	pag. 53

CAPITOLO 3

MATERIALI E METODI

3.1 Schema sperimentale	pag. 55
--------------------------------------	----------------

3.2	<i>Colture cellulari</i>	<i>pag.56</i>
3.2.1	<i>PBMC di bovino</i>	<i>pag. 56</i>
3.2.2	<i>Cellule linfocitarie Jurkat</i>	<i>pag. 56</i>
3.3	<i>Test in vitro</i>	
3.3.1	<i>Conta cellulare mediante il metodo di esclusione del Trypan Blue (TBE)</i>	<i>pag. 57</i>
3.3.2	<i>Determinazione di vitalità/citotossicità: saggio XTT</i>	<i>pag. 57</i>
3.3.3	<i>Determinazione dell'attività proliferativa: saggio dell'incorporazione della Bromodeossiuridina (BrdU)</i>	<i>pag. 58</i>
3.3.4	<i>Test di citotossicità LDH</i>	<i>pag. 58</i>
3.3.5	<i>Quantificazione delle Specie Reattive all'Ossigeno (ROS) mediante il test della Diclorofluoresceina Diacetate (DCF-DA</i>	<i>pag. 59</i>
3.3.6	<i>Quantificazione dell'attività dei principali enzimi di detossificazione quali: Superossido Dismutasi (SOD), Catalasi (CAT), Glutathione Perossidasi (GPx), Glutathione-S-Trasferasi (GST) e quantificazione del Glutathione ridotto (GSH)</i>	<i>pag.60</i>
3.3.7	<i>Quantificazione degli mRNA dei principali enzimi di detossificazione quali: Superossido Dismutasi (SOD), Catalasi (CAT), Glutathione Perossidasi (GPx), Glutathione-S-Trasferasi (GST)</i>	<i>pag. 61</i>
3.3.8	<i>Elaborazione statistica dei dati</i>	<i>pag. 62</i>

CAPITOLO 4

RISULTATI

4.1	<i>PBMC di bovino</i>	<i>pag.63</i>
4.2	<i>Cellule linfocitarie umane Jurkat</i>	<i>pag.73</i>
4.3	<i>Riepilogo risultati</i>	<i>pag. 80</i>

CAPITOLO 5

DISCUSSIONE

CONCLUSIONI E PROSPETTIVE

Bibliografia

Pubblicazioni e contributi

Ringraziamenti

Riassunto

Nella classe di composti denominati “Interferenti Endocrini” (IE) ritroviamo il Lindano, l’isomero γ - dell’esaclorocicloesano (γ -HCH), e gli altri isomeri dell’HCH (α -HCH; β -HCH; δ -HCH; ϵ -HCH). L’HCH è un insetticida ampiamente usato sino alla fine degli anni ’80, ormai vietato in Europa e negli USA, ma che continua ad essere oggetto di preoccupazione, in quanto alcune sue tracce persistono nell’ambiente e negli alimenti. Tra gli isomeri, il β -HCH risulta essere il più stabile ed il meno degradabile, sia nell’ambiente che nei tessuti umani ed animali nei quali può accumularsi in seguito ad esposizione. La contaminazione da β -HCH che ha coinvolto una vasta area della Valle del Fiume Sacco (province di Roma e Frosinone, Lazio, Italia), ha causato ingenti danni nei sistemi agro-zootecnici locali, riportando all’attenzione dell’opinione pubblica nazionale e regionale, problematiche circa l’inquinamento agro-ambientale e la sicurezza alimentare. Residui di β -HCH, sono stati ritrovati nel periodo 2005-2006, in campioni di latte e di siero ematico provenienti da allevamenti di bovini da latte collocati lungo il Fiume Sacco. Lo scopo di questo lavoro è stato quello di monitorare gli effetti del β -HCH su modelli cellulari animali e umani, con l’obiettivo di stimare il rischio d’esposizione sia per gli animali da reddito che per gli operatori del settore agricolo-zootecnico dell’area. Sulla base dei dati pubblicati in merito allo stato di contaminazione della Valle del Fiume Sacco, e sulla base degli studi effettuati in precedenza, sono stati scelti due modelli cellulari per studiare gli effetti *in vitro* del β -HCH sul sistema immunitario animale e umano. I modelli cellulari utilizzati sono stati: le cellule mononucleate del sangue periferico (PBMC) di bovino, una popolazione eterogenea di cellule costituita da linfociti T, linfociti B e monociti, e le cellule linfocitarie umane Jurkat, popolazione immortalizzata e omogenea, costituita solamente da linfociti T.

I test *in vitro* utilizzati in questo studio sono stati: il Trypan Blue Exclusion (TBE) test, per monitorare il numero di cellule vive; il test XTT, per monitorare l’attività metabolica cellulare; il test di proliferazione cellulare basato sull’incorporazione della Bromodeossiridina (BrdU) (solo su PBMC bovine); il test del rilascio della lattato deidrogenasi (LDH); il test della Diclorofluoresceina Diacetato (DCF-DA) per la quantificazione dei ROS intracellulari; i test colorimetrici per monitorare l’attività dei principali enzimi di detossificazione quali la Superossido Dismutasi (SOD), la Catalasi

(CAT) la Glutathione Perossidasi (Gpx) e la Glutathione-S-Transferasi (GST) e la real-time-PCR (rt-PCR) per monitorare l'espressione genica degli enzimi di detossificazione.

Il *range* di concentrazioni di β -HCH testato (β -HCH 0,1-1-10-100-1000 μ M), è stato scelto sulla base sia degli studi già effettuati in precedenza, sia delle concentrazioni ritrovate *in vivo* nei bovini della Valle del fiume Sacco. Il piano sperimentale ha previsto due tempi di incubazione, 2 giorni (esposizione acuta) e 7 giorni (esposizione sub-cronica). I risultati ottenuti hanno dimostrato che, il β -HCH è in grado di indurre un aumento dell'attività metabolica (test XTT) nelle PBMC bovine e nelle Jurkat esposte a β -HCH 1 μ M, dopo 2 giorni di incubazione. Invece, dopo 7 giorni di incubazione, e alle concentrazioni più alte (β -HCH 10-100-1000 μ M), è stata osservata una diminuzione dell'attività metabolica cellulare. I risultati ottenuti hanno mostrato che, il β -HCH induce un aumento dello stress ossidativo cellulare, sia nelle PBMC bovine che nelle cellule linfocitarie umane Jurkat, ad entrambi i tempi di incubazione. In particolare, nelle PBMC è stato osservato un aumento dello stress ossidativo anche alle concentrazioni di β -HCH paragonabili a quelle ritrovate *in vivo* nei bovini allevati nella Valle del Sacco (β -HCH 0,1-1 μ M). Inoltre, in entrambi i tipi cellulari, è stato osservato un cambiamento dell'attività dei principali enzimi di detossificazione (SOD, CAT, Gpx, GST) rispetto al controllo, anche se la risposta enzimatica varia in base al tipo cellulare. Al contrario, non è stata osservata l'attivazione di meccanismi più complessi come l'attivazione della trascrizione genica dei principali enzimi di detossificazione (SOD; GST; CAT; Gpx), tranne che nelle PBMC bovine esposte alle concentrazioni più alte (β -HCH 100 e 1000 μ M), dopo 7 giorni d'esposizione. Dai risultati ottenuti dal test LDH, non sono state osservate differenze significative nel rilascio nel mezzo extracellulare di LDH, in entrambi i tipi cellulari. Infine, il test della BrdU, effettuato solo sulle PBMC bovine, ha evidenziato una diminuzione dell'attività proliferativa nelle cellule stimulate sia con il Pokeweed (PWM), che con la Conavalina A (Con A), esposte alla più alta concentrazione di β -HCH (1000 μ M), ad entrambi i tempi di incubazione. Al contrario, le PBMC esposte a β -HCH nel *range* di concentrazione 0,1-100 μ M hanno mostrato una variabilità della risposta cellulare sulla base del mitogeno utilizzato. In particolare, nelle PBMC di bovino stimulate con il mitogeno PWM, è stata osservata una diminuzione dose-dipendente dell'attività proliferativa cellulare, soltanto dopo 2 giorni di incubazione. Al contrario, nelle PBMC stimulate con la Con A, dopo 2

giorni di incubazione, è stato osservato un aumento dell'attività proliferativa solo nelle cellule trattate con β -HCH 100 μ M.

Sulla base di questi risultati possiamo affermare che, il β -HCH induce, sia nelle cellule del sistema immunitario bovino, che nelle cellule linfocitarie umane, *in vitro*, un aumento dello stress ossidativo cellulare, anche alle dosi paragonabili a quelle ritrovate *in vivo* nel caso della Valle del Sacco. Inoltre il β -HCH è in grado di indurre una risposta cellulare, sia a livello di attività metabolica, ma soprattutto a livello di attività dei principali enzimi di detossificazione, al fine di riportare la cellula in uno stato di omeostasi ossidativa.

Gli obiettivi futuri sono quelli di monitorare la presenza/assenza di markers della perossidazione lipidica come la malondialdeide (MDA), ed il meccanismo alla base dell'interazione tra il β -HCH e le cellule del sistema immunitario. Infine, sarebbe interessante confermare l'ipotesi di attivazione del *pathways* di morte cellulare per apoptosi.

Abstract

The β -hexachlorocyclohexane (β -HCH) is a very stable and accumulable isomer of Lindane, a well-known organochlorine pesticide. The HCHs are banned in all developed countries but to date, high concern still exists for the environment, animal and human health due to contaminated sites.

Nowadays, the indirect environmental contamination by OCPs is mainly due to the illegal and/or wrong accumulation of wastes in industrial areas. In 2006, a rural area in Italy devoted to dairy cow farming (the Sacco River Valley, Lazio Region), was found to be contaminated by HCHs: in particular, the β -HCH was found in soil, forages and cow milk as well as in sapwood and bark of poplars growing near the Sacco River. In addition, the β -HCH was found in blood serum of the cows farmed in that area.

The aim of this work was monitoring the effects of the β -HCH on human and animal cell models, to estimating the risk of exposure for both farm animals and operators of the agro-livestock sector.

Two type of immune cells were selected for this study: the bovine Peripheral Blood Mononuclear Cells (PBMCs) and a specific type of immune cells (human T lymphocytes), called Jurkat. The range of β -HCH (from 0.1 to 1000 μ M) was chosen on the basis of previous studies and on the basis of β -HCH levels found *in vivo* on bovine reared in the Sacco River Valley. All the trials were performed incubating PBMCs and Jurkat for 2 and 7 days.

In this study, *in vitro* tests used to monitoring effects of β -HCH were the following: cell viability test (XTT test); Trypan Blue Exclusion (TBE) assay, for monitoring the number of living cells; Lactate Dehydrogenase (LDH) release assay; Bromodeoxyuridine (BrdU) incorporation assay, for monitoring the proliferation cells activity; Dichlorodihydrofluorescein Diacetate (DCFH-DA) assay, for monitoring the intracellular reactive oxygen species concentration; real-time PCR (rt-PCR) for monitoring the mRNA expression of Superoxide Dismutase (SOD), Catalase (CAT), Glutathione Peroxidase (Gpx) and Glutathione-S-Transferase (GST)).

The metabolic activity of bovine PBMCs and Jurkat cells increased at 2 days of exposure only in cells exposed to β -HCH 1 μ M; instead, after 7 days of exposure, and at higher concentrations of β -HCH (10-100-1000 μ M), a decrease of metabolic activity was observed. Results obtained by the DCFH-DA assay showed an increase of Reactive Oxygen Species on bovine PBMCs and Jurkat exposed to β -HCH, both after 2 days of

exposure and after 7 days of exposure, also at concentration levels (β -HCH 0.1-1 μ M) comparable to those found *in vivo* in blood serum of cows reared in the Sacco River Valley. Besides, it was observed an increase of activity of detoxification enzymes (SOD, CAT, Gpx, and GST), both on bovine PBMCs and Jurkat cells. The increase of expression of mRNA of SOD, CAT, Gpx and GST was observed only on bovine PBMCs exposed to β -HCH 100 and 1000 μ M, after 7 days of exposure.

The LDH assay results suggest that, β -HCH does not clearly affect the integrity of the cell membrane in the range of exposure levels tested.

The BrdU incorporation assays showed rather different results according to the different mitogens and times of exposure; only the highest concentration of β -HCH (1000 μ M) induce a decrease of proliferation activity of PBMCs stimulated by PWM and Con A at both incubation time. Instead, PBMCs stimulated with PWM, exhibited a gradual reduction of proliferative activity from 0.1 μ M to 100 μ M β -HCH, only after 2 days of exposure. A rather different picture has been observed stimulating PBMCs with the mitogen ConA. After 2 days of exposure, no effects have been observed in PBMCs exposed to β -HCH 0.1-100 μ M. Instead, after 7 days of incubation, it was seen a decrease of the proliferative capacity of PBMCs exposed to 100 μ M β -HCH.

On the basis of these results, we can affirm that, the β -HCH induces, both in cells of the bovine immune system, that in human lymphocyte cells, *in vitro*, an increase of cellular oxidative stress, even at doses comparable found *in vivo* in blood serum of cows reared in the Sacco River Valley. Furthermore, the β -HCH is able to induce a cellular metabolic activity response, and an activation of main detoxifying enzymes, to bring the cell in a state of oxidative homeostasis.

Future objectives are to monitor the presence / absence of markers of lipid peroxidation such as malondialdehyde (MDA), and the mechanism of interaction between the β -HCH, and the immune system cells. Finally, it would be interesting to confirm the hypothesis of activation of cell death *pathways* for apoptosis.

CAPITOLO 1

Introduzione

La produzione agricola è oggi afflitta da numerose problematiche relative alla contaminazione da composti chimici presenti nell'ambiente, alla sostenibilità dei processi produttivi ed ora anche ai cambiamenti climatici. La presenza di contaminanti negli agrosistemi e di riflesso nelle filiere alimentari ha un'origine industriale e/o di tipo urbano. In merito alla diffusione degli inquinanti nell'ambiente, l'attività industriale ha avuto ed ha tuttora un ruolo molto rilevante a seguito di rilasci accidentali, di emissioni da processo non completamente controllate in aria e nelle acque e di smaltimento dei rifiuti. Questi eventi rappresentano una causa di preoccupazione per la qualità agroalimentare e la salubrità delle produzioni alimentari. I processi di sviluppo demografico e di urbanizzazione giocano indubbiamente un ruolo importante rispetto alla qualità dell'ambiente rurale.

Un ambiente sano è essenziale per sostenere e garantire il benessere animale, la qualità e la sicurezza dei prodotti alimentari è un punto cruciale per la salute dei consumatori. Una buona qualità ambientale si riflette anche su una buona qualità di vita e di alimentazione delle specie che vivono in quell'ambiente.

A partire dalla scoperta del dicloro difenil tricloroetano (DDT) nel 1939 (*Mellanby, 1992*), numerosi pesticidi (organoclorurati, organofosfati, carbammati) sono stati scoperti e largamente utilizzati in tutto il mondo, in particolare tra gli anni '40 e gli anni '70 con la *Green Revolution* sono state selezionate geneticamente nuove varietà vegetali, utilizzati nuovi fertilizzanti, fitofarmaci e pesticidi con un conseguente aumento della produzione agricola e della produzione di cibo.

Dall'altra parte però, l'immissione di pesticidi, erbicidi e fungicidi a tassi non compatibili con i naturali processi degradativi, ha portato ad un accumulo di queste sostanze nel suolo, nelle acque e nelle piante che si è scoperto poi essere dannoso sia per l'ambiente che per i consumatori finali. Gli inquinanti ambientali più pericolosi sono quelli che subiscono i processi di bioaccumulo e biomagnificazione. Il bioaccumulo è processo attraverso cui sostanze tossiche persistenti si accumulano

attraverso respirazione, ingestione e contatto, all'interno di un organismo in concentrazioni superiori a quelle riscontrate nell'ambiente circostante, la biomagnificazione invece è il processo attraverso il quale la concentrazione di sostanze tossiche e nocive aumenta man mano che si sale al livello trofico successivo, ovvero procedendo dal basso verso l'alto della piramide alimentare all'interno della rete trofica.

I principali contaminanti ambientali li possiamo distinguere in:

- Contaminanti microbiologici: tra cui batteri, funghi, virus o parassiti, questa categoria provoca, nella maggior parte dei casi, sintomi acuti e possono essere pericolosi perché possono diffondersi da un individuo all'altro e quindi avere anche carattere infettivo.
- Contaminanti chimici: tra cui sostanze chimiche presenti nell'ambiente, metalli pesanti e altri residui accidentalmente introdotti nella catena alimentare durante la coltivazione, la lavorazione, il trasporto o l'imballaggio. Queste sostanze nella maggior parte dei casi non provocano sintomi acuti tranne in casi di esposizioni a dose molto elevate, e non hanno carattere infettivo. Inoltre queste sostanze spesso si accumulano nel nostro organismo in maniera silente e manifestano i loro effetti solo dopo tempi di esposizione lunghi, si parla quindi nella maggior parte dei casi di tossicità cronica.

1.1. Interferenti Endocrini

Alcuni inquinanti ambientali sono in grado di alterare l'equilibrio del sistema endocrino negli animali e nell'uomo con conseguenze talvolta irreversibili sullo sviluppo e la funzionalità di diversi apparati; in particolare il sistema riproduttivo è stato identificato come un bersaglio particolarmente suscettibile. Per indicare queste sostanze si usa il termine inglese di *Endocrine-Disrupting Chemicals* (EDC) (Toppari et al., 1995) oppure si può utilizzare il termine italiano Interferenti Endocrini (IE); un interferente endocrino è stato definito dalla U.S. Environmental Protection Agency (EPA) come: “un agente che interferisce con la sintesi, la secrezione, il trasporto, il legame o l'eliminazione

degli ormoni nel corpo che sono responsabili del mantenimento dell'omeostasi, della riproduzione dello sviluppo e/o del comportamento” (*Kavlock et al., 1996*). Il sistema endocrino è formato dall'insieme di tutte le ghiandole a secrezione interna presenti all'interno dell'organismo umano. Queste ghiandole costituiscono un sistema unitario che garantisce l'omeostasi ormonale e hanno la funzione di regolare i vari organi del corpo per andare incontro alle esigenze di crescita dell'organismo e della sua riproduzione e rispondere alle fluttuazioni dell'ambiente interno, inclusi vari tipi di stress.

Le principali ghiandole che compongono il sistema endocrino sono il pancreas endocrino, le ghiandole paratiroidi, l'ipofisi, la tiroide, le ghiandole surrenali e le gonadi (testicoli ed ovaie). Inoltre nel nostro organismo sono presenti cellule con funzione endocrina localizzate all'interno di organi che hanno la capacità di secernere ormoni pur non essendo la loro funzione primaria quella endocrina, e sono: cervello (ipotalamo e ghiandola pineale), cuore, reni, tessuto adiposo, stomaco, intestino, fegato, utero, ghiandola mammaria e prostata (Fig. 1).

Gli ormoni, i principali messaggeri del sistema endocrino, sono segnali chimici utilizzati nella comunicazione tra cellule, sono secreti da cellule specializzate o ghiandole, e trasportati dal flusso sanguigno in altre parti del corpo dove interagiscono con recettori specifici espressi solo in alcune cellule chiamate cellule bersaglio, l'interazione ormone-recettore induce nella cellula bersaglio una determinata risposta biologica. La funzionalità del sistema endocrino è quella di garantire all'organismo umano l'approvvigionamento di tutti gli ormoni di cui ha bisogno per lo svolgimento di tutti i processi fisiologici, nelle giuste concentrazioni, di solito molto basse, e nei tempi giusti. In particolare il sistema endocrino è molto importante in età riproduttiva, in quanto regola il funzionamento degli organi riproduttivi maschili e femminili ma anche nelle fasi di accrescimento come l'adolescenza e la pubertà e nelle fasi di sviluppo dell'organismo come la gravidanza ed i primi anni di vita in quanto fondamentale nel regolare lo sviluppo della maggior parte di tutti gli organi tra cui anche quelli destinati alla riproduzione.

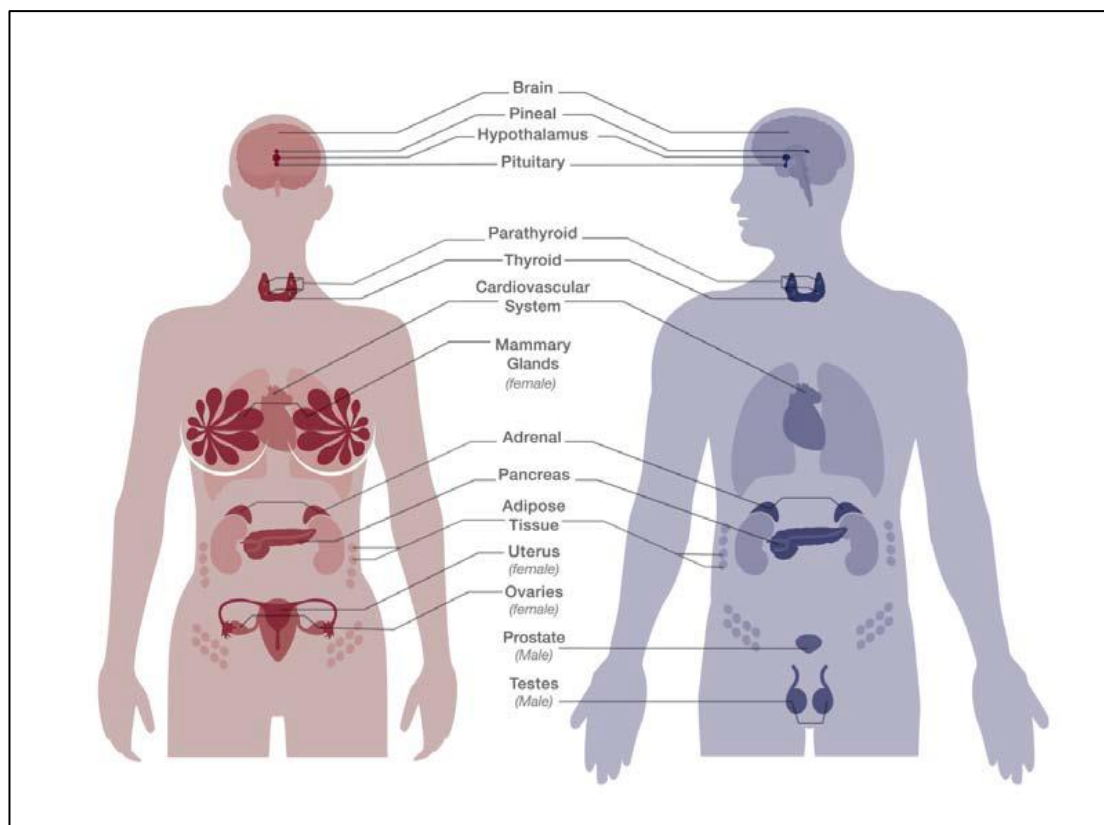


Figura 1: rappresentazione dei principali organi del sistema endocrino umano (Gore et al., 2014)

Gli IE possono interferire con il sistema endocrino in quanto sono in grado di interagire con i principali recettori per gli ormoni (Tabb e Blumberg, 2006). In particolare gli IE possono legare numerosi recettori ormonali come il recettore per gli androgeni (AR) quello per gli estrogeni (ER) ed il recettore arilico (AhR). Attraverso l'interazione con i recettori ormonali, gli IE possono mimare gli effetti degli ormoni (azione agonista) producendo una risposta eccessiva o scarsa rispetto agli ormoni oppure bloccare i recettori ormonali senza attivarli inibendo l'effetto dei naturali ormoni (azione antagonista) (Fig. 2). Infine gli IE possono interferire con la sintesi, il metabolismo, il trasporto e l'eliminazione dei naturali ormoni, per esempio studi *in vivo* mostrano che la produzione degli ormoni tiroidei quali triiodotironina (T3), tiroxina (T4) e l'ormone tireostimolante (TSH) può essere inibita da alcuni pesticidi organoclorurati e organofosforici riconosciuti come interferenti endocrini (Akhtar et al., 1996).

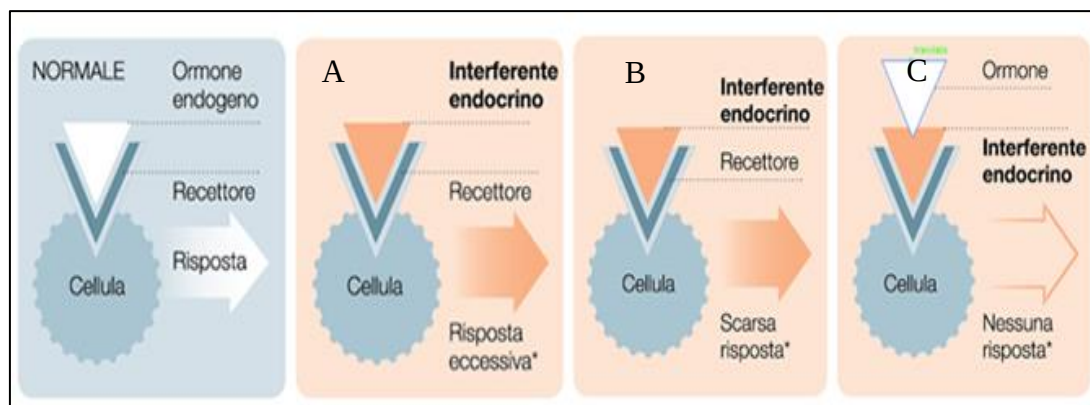


Figura 2: interazione degli interferenti endocrini e i recettori ormonali, azione agonista (A, B) e azione antagonista (C).

Negli anni 1960-1970 è stata messa in evidenza nei modelli sperimentali *in vivo* e *in vitro* “l’estrogenicità” di numerosi inquinanti ambientali quali l’*o,p'*-DDT, il kepone, il metossicloro, i derivati fenolici e i bifenili policlorurati (PCB). Negli ultimi anni, in seguito all’introduzione di nuovi metodi di *screening*, si sono aggiunti all’elenco altri pesticidi e composti di origine industriale quali il toxafene, la dieldrina, l’endosulfan, alcuni derivati alchilfenolici, il benzilbutilftalato e il bisfenolo-A (Soto *et al.*, 1995; Thomas, 1998), inoltre, crescente attenzione stanno ricevendo i composti tireostatici. A destare preoccupazione non sono solo i dati sperimentali, alterazioni quali anomalie morfologiche del tratto genitale esterno, riduzione della fertilità e alterazioni del comportamento sono state infatti osservate in animali selvatici (pesci, uccelli, mammiferi) e sono state associate alla presenza di alcuni inquinanti a lunga persistenza quali gli organoclorurati (Tyler *et al.*, 1998; Vos *et al.*, 2000). Gli studi di tossicologia sperimentale *in vivo* e *in vitro* hanno evidenziato, per alcuni di questi composti, meccanismi d’azione diversi, ma sempre riconducibili ad un’attività regolatoria sull’omeostasi degli ormoni sessuali. Le molecole che possiedono un’attività anti-androgenica sono di particolare interesse per la patogenesi di effetti indotti da esposizioni avvenute in periodi critici per lo sviluppo morfologico e funzionale del sistema riproduttivo. L’azione di queste molecole può essere mediata dal legame con i recettori ormonali; altri meccanismi possono invece coinvolgere la sintesi o l’attività degli ormoni sessuali o alterare la funzionalità delle ghiandole endocrine o degli organi e tessuti bersaglio.

L'ipotesi che effetti sullo sviluppo e sulla funzionalità del sistema riproduttivo (evidenziabili anche a lungo termine) possano verificarsi nell'uomo per esposizioni a IE è attualmente oggetto d'attenzione nella comunità scientifica. Sembrano sostenere quest'ipotesi le osservazioni sull'aumentata incidenza in alcuni Paesi del Nord-Europa, di patologie malformative, funzionali e tumorali del tratto riproduttivo maschile (*Skakkebaek e Keiding, 1994; Adami et al., 1994*) e, più recentemente, le osservazioni sul ritardo di sviluppo in bambini esposti ai PCB. (*Brouwer et al., 1995; Jacobson e Jacobson, 1996*). Tra gli inquinanti ambientali gli IE occupano pertanto un posto prioritario. Gli effetti sul sistema riproduttivo possono essere indotti da un'esposizione prenatale e/o neonatale e manifestarsi solo dopo un lungo periodo di latenza, al raggiungimento della maturità sessuale quindi anche bassi livelli di esposizione possono rappresentare un pericolo. La normativa dell'Unione Europea, per la classificazione e l'etichettatura delle sostanze e dei preparati pericolosi per la salute dell'uomo e/o per l'ambiente, è stata estesa nel 1993 agli effetti sulla fertilità e sullo sviluppo (Direttiva 93/21/CEE della Commissione del 27 aprile 1993, 18° adeguamento della Direttiva di base 67/548). Per le sostanze introdotte sul mercato successivamente alla normativa, l'informazione tossicologica fornita dai produttori è, nella gran parte dei casi, sufficiente per definire un eventuale rischio per la riproduzione e lo sviluppo, poiché nel corso degli anni i protocolli sperimentali proposti dalle agenzie sono stati modificati con l'introduzione di indicatori di tossicità più sensibili e specifici. A livello dell'OECD (Organisation de Coopération et de Développement Economiques, <http://www.oecd.org/ehs>, ultima consultazione 5/4/2001) è in corso un programma di aggiornamento delle linee guida tossicologiche per una migliore caratterizzazione degli effetti endocrini e anche su altri sistemi (es. sistema nervoso). Questa condizione non sempre si realizza per le sostanze introdotte sul mercato negli anni precedenti la normativa; ad esempio alcuni parametri tradizionalmente utilizzati negli studi ad una o più generazioni, quali l'indice di fertilità, sono risultati poco sensibili per la valutazione degli effetti riproduttivi nei roditori, rispetto ai parametri seminologici o istologici (*Nagao et al., 2000*). Alla luce delle considerazioni esposte precedentemente assumono quindi particolare interesse le sostanze a lunga persistenza nell'ambiente e nei tessuti biologici, introdotte sul territorio

italiano già da diversi anni, e che non sono state fino ad oggi adeguatamente valutate per un probabile rischio riproduttivo.

I composti in grado di interferire con il sistema endocrino sono quindi numerosi e con caratteristiche diverse, ciò non ne facilita la classificazione, in linea di massima è possibile però raggrupparli in cinque categorie principali:

a) Farmaci o estrogeni sintetici (come ad esempio il 17- β estradiolo o l'estrogeno sintetico dietilstilbestrolo).

b) Fitoestrogeni:

- isoflavonoidi;
- cumestani;
- lignani;
- stilbeni.

c) Pesticidi: utilizzati per il controllo di organismi nocivi, soprattutto in campo agricolo.

- organofosforici;
- carbammati;
- ditiocarbammati;
- piretroidi sintetici;
- organoclorurati;
- fenossiacetici;
- erbicidi del gruppo dell'ammonio quaternario.

d) Plastificanti (in particolare, gli ftalati) e prodotti derivanti dalla combustione del policloruro di vinile (PVC) ma anche della carta e delle sostanze putrescibili come le diossine.

e) Sostanze di origine industriale:

- fenoli: Bisfenolo A (BPA) utilizzato nella sintesi di alcune materie plastiche e di alcuni additivi, utilizzato anche per la produzione di imballaggi per il cibo (*Gore et al., 2014*)
- ritardanti di fiamma;
- acido perfluorooctanico e suoi sali;
- alcuni metalli pesanti (piombo, cadmio e mercurio).

Sono stati dimostrati effetti estrogeno-simili (sia *in vivo* che *in vitro*) anche per alcune sostanze naturali (incluse alcune micotossine), potenzialmente presenti in diverse componenti della dieta (Jobling *et al.*, 1995).

Un altro modo di classificare queste sostanze prende spunto dalla loro origine (Diamanti-Kandarakis *et al.*, 2009):

Si distinguono pertanto composti di origine:

1. naturale (fitoestrogeni ed estrogeni)
2. antropica o sintetica cioè sintetizzati dall'uomo e successivamente immessi in natura, ulteriormente suddivisibili in:
 - a. estrogeni sintetici, a loro volta distinti in:
 - farmaceutici come il dietilsilbestrolo (DES) che è un estrogeno di sintesi che veniva utilizzato negli anni 50 nella terapia delle minacce di aborto della donna
 - industriali tra cui: pesticidi, conservanti, solventi e plasticizzanti. I pesticidi utilizzati per il controllo di organismi nocivi, soprattutto in campo agricolo, sono tossici anche per altri organismi, incluso l'uomo. Il DDT, per esempio, può interferire con la tiroide, con il sistema neuroendocrino, con i recettori per gli estrogeni e per gli androgeni, con il sistema cardiovascolare e metabolico e con il sistema riproduttivo (Gore *et al.*, 2014)
 - b. anti-estrogeni sintetici, a loro volta suddivisi in:
 - farmaceutici (tamoxifen);
 - industriali (diossine).

Le caratteristiche principali degli IE sono:

- lipofilità questo permette loro di diffondere attraverso la membrana cellulare e/o di legare recettori per gli ormoni steroidei. Essendo liposolubili inoltre, sono in grado di depositarsi nel tessuto adiposo e il loro bioaccumulo ha una notevole importanza dal punto di vista tossicologico anche se bisogna considerare che tale fenomeno non è riconducibile solo all'inquinamento ambientale ma può verificarsi anche attraverso la via alimentare (Juberg, 2000)

- bioaccumulo: processo attraverso cui sostanze tossiche persistenti si accumulano attraverso respirazione, ingestione e contatto, all'interno di un organismo in concentrazioni superiori a quelle riscontrate nell'ambiente circostante.
- biomagnificazione: processo di accumulo di sostanze tossiche e nocive con un aumento di concentrazione all'interno degli organismi dal basso verso l'alto della piramide alimentare. Quindi consiste nell'amplificazione di un contaminante andando verso i livelli più alti di una catena trofica.
- alta stabilità e permanenza ambientale: resistenza alla degradazione chimica e biologica con conseguente predisposizione all'accumulo.

1.2. Inquinanti Organici Persistenti (POPs)

Tra gli interferenti endocrini ritroviamo delle sostanze denominate Inquinanti Organici Persistenti, noti con l'acronimo POPs (Persistent Organic Pollutants). I POPs sono sostanze prevalentemente di origine antropica che presentano un lungo tempo di emivita; questo porta ad un incremento costante del carico agro-ambientale in quanto i naturali processi degradativi non sono sufficienti a smaltire le quantità immesse nell'ambiente (*Breivik et al 1999; Misra et al., 2007*). I POPs includono composti di sintesi quali pesticidi e poli-cloro-bifenili (PCB) ed altre sostanze come diossine e furani, generate come sottoprodotti di processi per lo più antropici (*Gavilescu, 2005*)

L'ampia rassegna di studi scientifici ha ormai dimostrato che i POPs sono da considerare tra gli inquinanti più pericolosi immessi nell'ambiente da parte dell'uomo (*Tanabe et al., 1994; Word Bank, 2001; Thomas et al., 2005*).

La resistenza alla degradazione chimica e biologica implica un'ulteriore pericolosità intrinseca dovuta al fatto che questi composti, anche là dove ne vengano controllate le emissioni, accumulandosi, raggiungeranno livelli di concentrazione di cui è difficile valutare le conseguenze e le possibilità di bonifica. Inoltre, sempre a causa della loro persistenza, i POPs sono soggetti al trasporto attraverso aria, acqua e terreno, anche a lunga distanza, e quindi all'accumulo in luoghi remoti e lontani dai luoghi di emissione. La maggior parte di questi composti sono semi-volatili e come tali possono essere trasportati attraverso gli ecosistemi a distanze notevoli, questa

rappresenta la maggiore via di esposizione (*Simonich e Hites, 1995; Harrad e Mao, 2004*). Anche l'acqua è considerata un importante veicolo per questi inquinanti, possono essere trasportati verso i sistemi fluviali per erosione o dilavamento e quindi raggiungere il mare e i sistemi oceanici. Nei sistemi acquatici questi contaminanti sono sottoposti a processi di scambio con i sedimenti oppure possono essere rilasciati verso l'atmosfera. La direzione del flusso tra acqua e atmosfera dipende dalla temperatura: nelle zone temperate il flusso netto è verso l'atmosfera, mentre nelle regioni polari è dall'atmosfera all'acqua (*Barrie et al., 1992; Miur et al., 1992*). Infine la loro scarsa idrosolubilità favorisce il loro assorbimento, in particolare alla frazione organica del terreno. Il suolo e i sedimenti, dove è accumulata la maggior parte dei POPs dispersi nell'ambiente negli anni passati, ora fungono da sorgente di emissione verso l'atmosfera.

La Convenzione di Stoccolma sui POPs è stata firmata da oltre 90 nazioni il 23 maggio 2001 ed è entrata in vigore nel maggio del 2004 con l'adesione di 150 paesi tra cui gli Stati Membri della Unione Europea. La Convenzione, fondata sul principio di precauzione, ha come obiettivo la protezione della salute umana e dell'ambiente dai danni causati dai POPs e definisce una lista di 12 sostanze o classi di sostanze prioritarie (aldrin, clordano, DDT, dieldrin, endrin, eptacloro, mirex, toxafene, policlorobifenili, diossine e furani) alle quali ne sono state successivamente aggiunte delle altre (pentabromofenolo, clordecone, esabromodifenile ed esaclorocicloesano).

1.3. Pesticidi e loro impatto tossicologico

A livello mondiale, l'Organizzazione delle Nazioni Unite (ONU), più specificatamente l'organizzazione delle Nazioni Unite per l'Alimentazione e l'Agricoltura (FAO), definisce come pesticida qualsiasi sostanza, singola o miscelata con altre, destinata a distruggere o tenere sotto controllo qualsiasi organismo nocivo, impedirne o prevenirne i danni, inclusi i vettori di malattie umane e animali, le specie indesiderate di piante o animali che causano danni o comunque interferiscono durante la produzione, la lavorazione, la conservazione, il trasporto e la commercializzazione di cibo, di derrate alimentari, di legname e suoi derivati, di

alimenti zootecnici, nonché le sostanze che possono essere destinate agli animali per il controllo di insetti, acari o altri organismi nocivi somministrate o applicate ad essi. Sono incluse le sostanze utilizzate come regolatori di crescita delle piante, defoglianti, disseccanti, diradanti o anticascola dei frutti. Inoltre quelle applicate alle coltivazioni prima o dopo il raccolto per proteggerlo dal deterioramento durante la conservazione e il trasporto.

L'agenzia statunitense EPA ha definito il pesticida come qualsiasi sostanza, singola o miscelata con altre, destinata a: prevenire o impedire, distruggere, repellere o attenuare qualsiasi organismo nocivo o i suoi danni, comprendendo anche le sostanze impiegate come regolatori di crescita delle piante, i defoglianti e i disseccanti.

L'applicazione di un pesticida sul bersaglio può avere diverse destinazioni: dirette (aria, piante, terreno, acqua) e indirette (fauna terrestre, fauna acquatica, uomo) (Vicari, 1995).

L'aria è soltanto un mezzo di trasporto di cui il pesticida ha bisogno per raggiungere il suo bersaglio. I tempi di contatto con questo mezzo sono solitamente brevi, ma il passaggio nell'atmosfera rappresenta sempre un aspetto negativo nella distribuzione dei pesticidi in quanto entrano in gioco i fattori di stabilità all'aria e alla luce dei composti utilizzati, di temperatura (volatilizzazione) e di movimenti dell'aria (deriva). La volatilizzazione è la trasformazione del pesticida nella forma di vapore, per sublimazione ed evaporazione. Questo fenomeno, che dipende dalla natura chimica del composto e dalla temperatura dell'ambiente, genera dispersione del prodotto.

Le piante costituiscono il bersaglio primario dei trattamenti; solitamente l'assorbimento del diserbante può essere consistente. Infatti, nelle applicazioni su vegetazione ben sviluppata, può essere assorbita fino al 50% della dose di prodotto impiegata. Al contrario, nelle applicazioni al suolo, ciò dipende dalla natura del terreno e dal suo potere di assorbimento. Nelle piante infestanti intervengono processi di metabolizzazione che degradano l'erbicida a prodotti elementari non tossici. Per quanto riguarda le piante coltivate si può avere una situazione differente, il pesticida, non metabolizzato, può rimanere come residuo e passare con la raccolta nei prodotti destinati all'alimentazione umana (Vercesi, 1995).

Sul terreno, oggetto diretto o indiretto del trattamento, confluisce la parte più consistente del pesticida applicato. Qui i pesticidi seguono strade differenti a

seconda delle varie interazioni che si instaurano tra pesticida, terreno, piante e fattori climatici.

Una volta giunto nel terreno, il pesticida può essere metabolizzato o trasportato, il che ne determina la persistenza. Tutti i pesticidi, in tempi più o meno lunghi, vengono metabolizzati e tramite processi degradativi le molecole vengono ridotte a composti semplici quali acqua, anidride carbonica e sali organici.

I meccanismi di degradazione possono essere di tipo biologico (microrganismi presenti nel terreno), fotochimico (ossidazioni dovute dalle radiazioni solari) e chimico (reazioni d'idrolisi in terreno, acqua e piante). Il parametro per esprimere la velocità di degradazione è il tempo di dimezzamento (chiamato anche emivita o periodo di semitrasformazione) che indica il tempo necessario per ridurre del 50% la quantità di erbicida immessa in un dato ambiente. I fattori che influenzano tale parametro sono, ad esempio, le proprietà chimico-fisiche della sostanza (polarità, ionizzazione, formula commerciale) quantità di microrganismi presenti nel terreno, grado di umidità e temperatura del terreno (*Vercesi, 1995*).

Anche l'acqua, come il terreno, può essere oggetto diretto o indiretto del trattamento. Nel primo caso non sono normalmente da temere effetti negativi sull'ambiente in senso lato in quanto, nei casi specifici, i diserbanti vengono impiegati a ragion veduta. Come oggetto indiretto, invece, i riflessi sono quasi sempre negativi in quanto si originano al di fuori di eventi controllabili e si configurano come fenomeni di contaminazione sia di corpi idrici superficiali che di quelli profondi. Anche in questo caso il tasso di contaminazione dipende dalla stabilità dei composti in acqua, dalla sensibilità alla luce e dalla costante di dissociazione ai diversi pH.

I pesticidi, sono sostanze utilizzate, come già detto, nella lotta antiparassitaria, aiutano a garantire la produzione agricola impedendo che le coltivazioni agricole vengano attaccate da vari agenti infestanti. Alcune delle principali categorie di pesticidi, classificate in base agli organismi nocivi a cui sono destinate, sono gli erbicidi o diserbanti utilizzati contro piante infestanti le colture agricole; gli insetticidi, gli acaricidi, topicidi, e fungicidi, quasi sempre sintetizzati artificialmente, oppure elaborati a partire da sostanze naturali di natura organica come la nicotina e il piretro. Gli erbicidi possono essere selettivi o meno a seconda che uccidano indistintamente tutte le specie vegetali su cui vengono sparsi o soltanto

alcune varietà specifiche. Tra gli erbicidi più diffusi quelli di natura organica sono a base di composti quali solfati di rame, clorati e arsenicati di sodio. Alcuni erbicidi devono essere applicati sulla parte aerea della pianta, altri invece, agiscono dal terreno penetrando in tessuti vegetali attraverso la radice. La maggior parte dei diserbanti di recente sintesi viene irrorata durante lo sviluppo delle piante e interferisce con la loro crescita senza danneggiare le colture agricole.

I diserbanti ‘totali’ o non selettivi come il paraquat e il glufosinate sono utilizzabili solo prima che spuntino le piantine seminate. Inoltre alcuni nuovi diserbanti richiedono l’aggiunta di prodotti chimici che potenzino le difese naturali della pianta contro i principi attivi che determinano l’eliminazione delle erbe infestanti. Gli insetticidi costituiscono la porzione minore del mercato mondiale dei pesticidi (circa il 28% del totale). Caratteristica comune di questa categoria è l’alta solubilità nei lipidi, espressa come coefficiente di ripartizione n-ottanolo/acqua. Inoltre sono molto persistenti nell’ambiente per svariati fattori quali temperatura, intensità luminosa, pH e percentuale di umidità.

Tra i pesticidi più conosciuti ci sono:

- Organofosforici: che hanno un’azione neurotossica
- Carbammati: azione neurotossica, ma sono meno tossici e meno persistenti
- Organoclorurati: azione neurotossica e azione endocrina, il più noto è il DDT e il Lindano (γ -esaclorocicloesano) ed i suoi isomeri

L’azione biologica dei pesticidi si esplicita non solo sulle specie bersaglio ma anche sugli organismi superiori, attraverso la loro diffusione nell’aria, nell’acqua e la contaminazione della catena alimentare e quindi dei cibi destinati al consumatore finale.

1.3.1. Pesticidi organofosforici

I pesticidi organo fosforici sono gli insetticidi più utilizzati in agricoltura, sono identificati come neurotossici in quanto sono inibitori dell’enzima acetilcolinesterasi (Ach). L’Ach è un enzima deputato alla scissione dell’acetilcolina in acetato e colina nello spazio intersinaptico, questa reazione permette l’inattivazione del

neurotrasmettitore acetilcolina e quindi regola e controlla la trasmissione dell'impulso nervoso contrastando l'iperattivazione. L'acetilcolina è il principale neurotrasmettitore utilizzato dai neuroni efferenti del sistema nervoso centrale, compresi i motoneuroni, i neuroni pre-gangliari del sistema nervoso autonomo simpatico e i neuroni pre- e post-gangliari del sistema nervoso autonomo parasimpatico. I neuroni colinergici controllano attività corticali e ippocampali connesse con l'apprendimento e la memoria, e attività più profonde dipendenti da vie localizzate nel ponte e nel talamo, comprendenti l'induzione del sonno REM.

L'azione dei pesticidi organofosforici quindi, porta all'inibizione dell'enzima Ach e ad un accumulo dell'acetilcolina nello spazio intersinaptico con conseguenti iperstimolazione dei recettori colinergici. Questo negli insetti porta ad iperattività tale da non permettergli il movimento, fino a giungere alla morte. Studi epidemiologici su soggetti esposti ad alte concentrazioni di organofosforici hanno mostrato che la tossicità acuta porta a paralisi di tipo spastico, il soggetto non riesce più a controllare la muscolatura volontaria, si verifica broncocostrizione, ipersalivazione, ipertensione, paralisi diaframmatica. Esposizione cronica a questi pesticidi invece può portare a possibili effetti sullo sviluppo del cervello, legame con sindrome dell'iperattività e *deficit* dell'attenzione, difficoltà nell'apprendimento e nella memoria nei bambini esposti (*Ahlbom et al., 1995*). I gas nervini per esempio sono inibitori irreversibili dell'acetilcolinesterasi ed hanno una sintomatologia identica a quella dei pesticidi organo fosforici ma con evoluzione molto rapida e prognosi infausta.

1.3.2. Carbammati e ditiocarbammati

I carbammati e i ditiocarbammati sono utilizzati come insetticidi, erbicidi e fungicidi. I carbammati sono esteri alchilici dell'acido carbammico in cui un ulteriore gruppo alchilico sostituisce un

atomo di idrogeno del gruppo -NH₂. I più diffusi sono il carbofuran, il carbaryl e 1'aldicarb. Essi interferiscono con il metabolismo degli insetti bersaglio inibendo l'acetilcolinesterasi. I pesticidi carbammici sono preferiti agli organoclorurati in quanto non essendo molto stabili possono essere idrolizzati in composti più semplici aventi una minore tossicità inoltre sono degli inibitori reversibili dell'Ach (*Lifshitz et al., 1997*).

1.3.3. Pesticidi organoclorurati

Con il termine di pesticidi organoclorurati si intendono correttamente quelle sostanze il cui meccanismo d'azione (prevalentemente a danno del sistema nervoso) sia riferibile a strutture molecolari organiche fortemente clorate.

Gli insetticidi clorurati comprendono: i derivati del cloroetano, tra cui il DDT è il più conosciuto; i ciclodieni, che comprendono l'Aldrin, il Dieldrin, l'Eptaclor, l'Endrin; altri idrocarburi tra cui gli isomeri dell'esaclorocicloesani incluso il Lindano.

A causa dell'uso massiccio in agricoltura e della stabilità chimica e della scarsa biodegradazione questi composti sono diventati ubiquitari, soprattutto in ambiente marino (*Aguilar e Borrell, 2005*), ma anche in altri comparti acquatici, nei suoli e in tutte le parti dell'ecosistema (*Oehme et al., 1996*). La bassa solubilità in acqua e l'elevata liposolubilità, che aumenta con l'aumentare del numero degli atomi di cloro, rende questi composti bioaccumulabili nei tessuti grassi (*Perugini et al., 2004*). Tra i cloroderivati il più noto degli insetticidi è il DDT (diclorodifeniltricloroetano); la sua azione, prolungata nel tempo anche per mesi dopo l'applicazione, si esplica per contatto, ma anche per ingestione. Il DDT, messo in commercio durante la Seconda Guerra Mondiale, fu utilizzato soprattutto per debellare la malaria; negli anni '70 venne messo al bando perché nocivo anche per l'uomo se ingerito accidentalmente con gli alimenti. I prodotti di degradazione del DDT, il DDE

(diclorodifenildicloroetilene) e il DDD (diclorodifeniledicloroetano), possono presentare persistenza e tossicità elevate.

Una volta assorbito, il DDT si concentra nel tessuto adiposo, l'accumulo nei grassi si traduce in un meccanismo protettivo, perché viene così a diminuire la quantità di sostanza presente nella sede della sua azione tossica, il cervello. Il DDT attraversa la placenta e le sue concentrazioni nel sangue del cordone ombelicale sono dello stesso ordine di grandezza di quelle che si raggiungono nel sangue della madre esposta. Per la lentezza della sua degradazione nell'ambiente e per l'accumulo nel tessuto adiposo degli animali, viene ad essere l'esempio classico del processo della biomagnificazione. Infatti una serie di organismi di una catena alimentare ne accumulano nel loro tessuto adiposo quantità sempre crescenti a ogni successivo livello trofico.

Un altro esempio di derivati clorurati è rappresentato dall'esaclorocicloesano (conosciuto anche come Benzene esacloruro o HCH). È una miscela di otto isomeri e l'isomero γ è noto con il termine commerciale di Lindano. Il Lindano è il più tossico e, in pratica, tutta l'attività insetticida dell'HCH è dovuta ad esso.

1.4. Esaclorocicloesano ed i suoi isomeri: proprietà chimico fisiche

Dal punto di vista chimico, gli HCH sono composti organoclorurati aventi una struttura ciclica a sei termini; sono noti otto isomeri (indicati con le lettere greche α , β , γ , δ , ϵ , η , θ) che differiscono tra loro per la disposizione assiale ed equatoriale degli atomi di cloro nell'anello. L' α -HCH, esiste in due diverse forme enantiomeriche; l'isomero γ (Lindano) presenta una maggiore attività pesticida; il β -HCH ha una elevata stabilità dovuta alla presenza di tutti gli atomi di cloro in posizione equatoriale.

Generalmente, gli isomeri dell'HCH (Fig: 3) sono stabili alla luce, alle alte temperature e agli acidi mentre si degradano in ambiente alcalino. Studi presenti in

letteratura dimostrano come la degradazione del γ -HCH si verifichi per valori di pH superiori a 8 (Buser *et al.*, 1995). Se comparati con altri composti organoclorurati, come il DDT, gli HCH sono più solubili in acqua e più volatili. Questo spiega perché tali sostanze possano essere rilevate in tutti i comparti ambientali (acqua, sedimenti, aria e animali). Come detto, il γ -HCH, conosciuto anche come Lindano, è quello con la più alta attività pesticida, anche se il mix tecnico (HCH tecnico) è stato ampiamente usato come pesticida commerciale a basso costo. Il mix commerciale tipicamente contiene 60-70% di α -, 5-12% di β , 10-12% di γ -, 6-10% di δ -, e 3-4% di ϵ ed è stato sintetizzato per la prima volta da Faraday nel 1825 (Chessels *et al.*, 1988). Il γ -HCH ha trovato impiego nel trattamento delle sementi, dei suoli e degli alberi da frutta; è stato inoltre impiegato come prodotto antiparassitario su animali domestici e in alcuni preparati farmaceutici sotto forma di lozioni, creme e shampoo per la cura e la prevenzione nell'uomo della pediculosi e della scabbia.

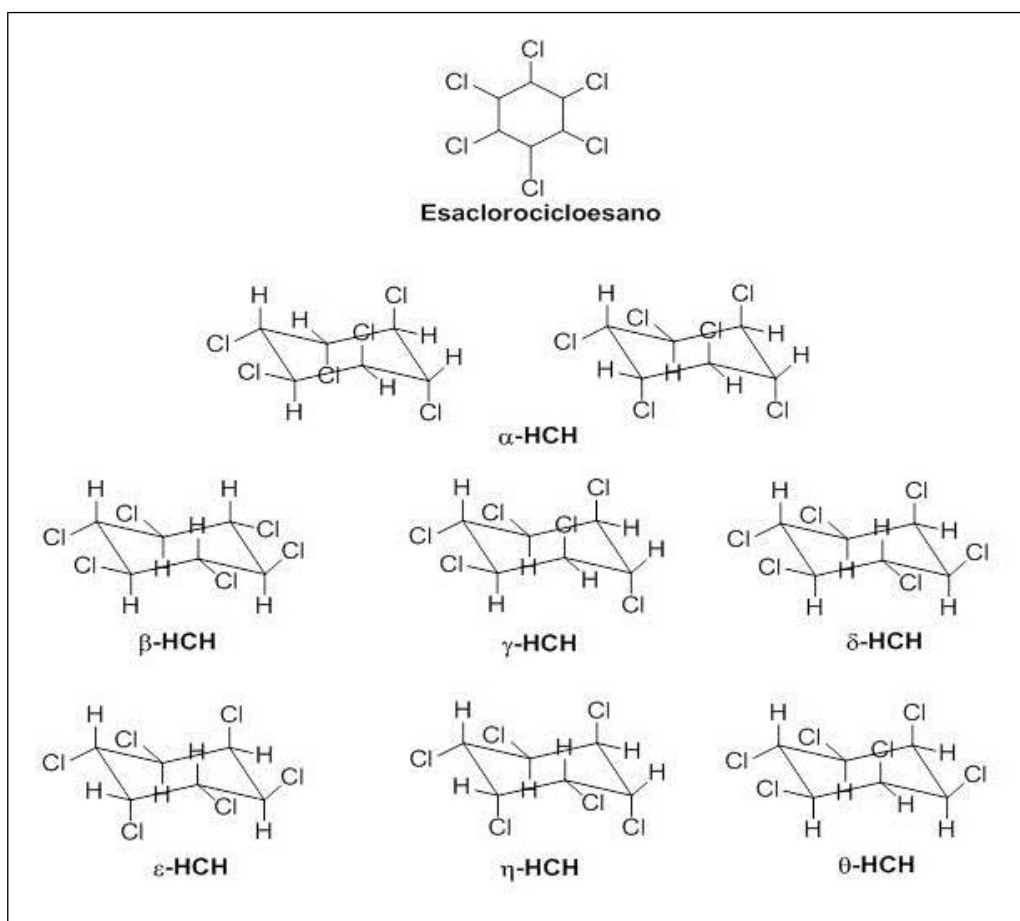


Figura 3: Struttura chimica degli otto isomeri dell'esaclorocicloesano (HCH).

Le proprietà chimico fisiche degli isomeri sono molto diverse tra loro, il β -HCH possiede una pressione di vapore più bassa dell' α -, del γ -, e del δ -HCH e un punto di fusione e un fattore di bioconcentrazione (BCF) nel grasso umano più elevati dell' α -HCH, proprietà determinate principalmente dalle posizioni assiali ed equatoriali degli atomi di cloro in ciascun isomero (Tab. 1). Il β -HCH possiede tutti gli atomi di cloro in posizione equatoriale e questa caratteristica gli conferisce un'elevata stabilità metabolica e fisica che a loro volta ne aumentano la persistenza ambientale e biologica. Al contrario la presenza di atomi di cloro in posizione assiale rende gli isomeri più facilmente disponibili alla degradazione enzimatica da parte di microrganismi, come osservato per il γ - e l' α -HCH (Vonk *et al.*, 1979).

Tabella 1: Alcune proprietà chimico-fisiche dell' α , β , γ e δ -HCH.

Proprietà	α	β	γ	δ
Punto di ebollizione (°C)	159-160	309-310	112-113	138-139
Pressione di vapore (Pa)	$(1,6 \pm 0,9) \times 10^{-2}$	$(4,2 \pm 0,3) \times 10^{-5}$	$(5,3 \pm 1,4) \times 10^{-3}$	$2,1 \times 10^{-3}$
Log K_{ow}	$3,9 \pm 0,2$	$3,9 \pm 0,1$	$3,7 \pm 0,5$	$4,1 \pm 0,02$
BCF nei tessuti adiposi umani	20 ± 8	527 ± 140	19 ± 9	8,5
BCF nei tessuti adiposi di animali acquatici	$2,6 \pm 0,5$	$2,9 \pm 0,3$	$2,5 \pm 0,4$	---

Log K_{ow} : coefficiente di ripartizione n-ottanolo/acqua

BCF: fattore di bioconcentrazione

1.5. Produzione ed utilizzo in campo agronomico

Gli HCH sono stati sintetizzati per la prima volta nel 1825, ma i primi usi come pesticidi sono noti solo nel 1942 (Smith *et al.*, 1991). Sono stati ampiamente utilizzati nei paesi industrializzati in particolare per la concia delle sementi e per uso veterinario (Garmouna e Poissant, 2004), la formulazione meno costosa, l'HCH tecnico, è stata ampiamente venduta ed utilizzata nei paesi in via di sviluppo,

soprattutto in Asia, per la difesa delle colture e per il controllo del vettore malaria (*Iwata et al., 1993; John et al., 2001*). La produzione mondiale di HCH tecnico tra 1945 e il 1992 è stata stimata a 1.400.000 tonnellate (*Barrie et al. 1992*). Nel 1976, gli Stati Uniti vietarono l'utilizzo e l'impiego dell'HCH tecnico a scopi agricoli (*ATSDR, 2003*). In molti paesi europei l'impiego dell'HCH tecnico e del Lindano fu notevolmente limitato e/o vietato tra gli anni 1977 e 1992. Per il periodo 1970-1996, *Breivika et al. (1999)*, hanno stimato un impiego di HCH tecnico e Lindano, su scala europea pari a 382.000 ed 81.000 tonnellate rispettivamente.

In Italia, in particolare, la produzione totale e l'utilizzo di Lindano è stata consistente. In campo agricolo il suo utilizzo è stato fondamentalmente di tipo preventivo, mirato alla lotta degli insetti terricoli. Prodotti antiparassitari agricoli a base di tale composto sono stati utilizzati, in tutte le regioni, in quantità sempre crescenti dagli anni '50 fino al 1979. Nel decennio 1969-1979, sono stati raggiunti i valori massimi di consumo (circa 20 mila quintali/anno) (*Traina et al., 2001*). Il Decreto del Ministero della Sanità del 1975 ha introdotto delle limitazioni all'utilizzo del Lindano in campo agricolo, consentendone l'uso per il trattamento del terreno prima della semina, per la disinfestazione dei cereali nei magazzini e sulle sementi e per le coltivazioni della barbabietola. Pertanto, la diminuzione del consumo di prodotti contenenti γ -HCH è iniziata negli anni '80 ma è stata evidente solo dal 1987. In Italia, è stato calcolato, per il periodo 1970-1996, un consumo totale di Lindano pari a 135.000 tonnellate. Nella maggior parte degli altri Paesi europei, le restrizioni d'uso e le revoche sono state introdotte in anni successivi rispetto all'Italia. Tra i Paesi Nordici l'uso del Lindano è stato sospeso nel 1987 in Finlandia e tra il 1989 e il 1995 in Svezia, Olanda, Norvegia e Danimarca mentre in Unione Sovietica il divieto è arrivato solo nel 1990 (*Walker et al., 1999*).

A livello mondiale è stato stimato un consumo annuale di HCH tecnico pari a 40.000 tonnellate nel 1980 e di 29.000 tonnellate nel 1990 (*Li et al., 1999*). Il consumo massimo è stato raggiunto nel periodo 1970-1980 e ha visto un decremento successivamente con l'introduzione delle revoche in Cina, in India e Unione Sovietica (*Breivik et al., 1999*). In Cina la produzione è stata vietata nel 1983, ma gli stock residui sono stati utilizzati fino al 1985; nel Nord-America, l'utilizzo dell'HCH tecnico è stato proibito in Canada e negli Stati Uniti nel 1970 mentre in Messico è continuato fino al 1993 (*Kalajzic et al., 1998*). Dal novembre 2006, l'uso del Lindano

è stato proibito in 52 Paesi e sottoposto a norme restrittive in altri 33 Paesi. Nel 2009, una ulteriore restrizione internazionale nell'uso del γ -HCH in agricoltura è stata incrementata con la Convenzione di Stoccolma sugli inquinanti organici persistenti. La convenzione, firmata dalla maggior parte degli stati mondiali, manca ancora della ratificazione da parte di Irlanda, Stati Uniti, Russia e paesi minori dell'Africa e dell'Asia. Una specifica eccezione permette ancora l'uso del Lindano per più di 5 anni in trattamenti di seconda opzione per pidocchi del capo e scabbia.

1.6. Livelli ambientali di HCH in Italia e nel mondo

La determinazione del trasporto dei vari isomeri e il loro destino ambientale viene fatta mediante l'analisi di matrici ambientali quali piante, suolo, acqua ed aria e in tessuti di diverse specie animali. In particolare si ritiene utile determinare la concentrazione di β -HCH nelle matrici ambientale e biologiche in quanto è l'isomero più persistente e meno volatile (*Bayarri et al., 2001*), e permette di scoprire una contaminazione di HCH tecnico. Invece per matrici ambientali come aria ed acqua, si ritiene più utile monitorare la presenza degli isomeri α - e γ -, perché sono i più volatili, con la predisposizione ad accumularsi nelle regioni polari (*Li et al., 1997*). Le concentrazioni di Lindano più alte sono state rilevate nell'emisfero nord e nei Paesi che hanno largamente utilizzato questa sostanza. Stessa situazione si osserva per le acque di superficie, le più alte concentrazioni sono state riscontrate in golfo dell'Alaska e del Nord -Pacifico. La misura più attendibile dei livelli di contaminazione è determinata attraverso i livelli riscontrati nei sedimenti dei laghi. In Italia sono stati riscontrati livelli più alti nei sedimenti del Lago di Garda soprattutto nel periodo di utilizzo degli HCH (1949-1989) (*Barrie et al., 1992*), livelli più bassi sono stati riscontrati nel lago artificiale di Simbirizzi in Sardegna (*Bossi et al., 1992*) e ancora più bassi nel lago Trasimeno, in provincia di Perugia (*Kalajzic et al., 1998*). Il biomonitoraggio dei fiumi e dei mari viene effettuato attraverso l'analisi delle specie animali che li popolano. Un esempio è il tessuto muscolare delle trote prelevate da un tratto del Po, in particolare in corrispondenza con il fiume Lambro,

dove sono stati riscontrati alti livelli di contaminazione degli isomeri α - e γ -HCH (Poletti et al., 2000).

Dallo studio effettuato da Pribylova et al. (2012), nel quale sono stati monitorati i livelli ambientali di organoclorurati in matrici di aria e suolo provenienti da zone rurali ed industriali in Europa dell'est e in Europa Centrale, sono stati osservati alti livelli di PCBs, HCHs, DDT e HCB sia nei siti rurali che nei siti industriali presi in esame. La fonte di contaminazione è costituita principalmente dai siti di stoccaggio dei pesticidi, dai complessi industriali, dalle zone militari e dalle discariche sia legali che illegali.

In particolare, livelli di HCHs, pur essendo prodotti banditi da 20 anni, risultano essere presenti ancora nei siti di utilizzo e di stoccaggio che costituiscono la maggiore fonte di contaminazione del suolo. A livello atmosferico invece la concentrazione atmosferica di HCHs non è uniforme, i livelli più alti sono stati stimati in siti industriali in Romania (2320 ng/campione), seguita da Macedonia, Serbia e dalla Federazione Russia che sono nell'ordine di centinaia di ng/campione. Mentre le concentrazioni più alte ritrovate nei siti rurali sono state riscontrate in Kazakistan, Kirghizistan, Romania, Moldavia ed Ucraina. Mentre i livelli più bassi sono stati ritrovati in Bosnia-Erzegovina, Slovenia e Croazia (Pribylova et al., 2012). Dai risultati ottenuti da Sarkar et al. (2008), è possibile affermare che i pesticidi organoclorurati, quali DDT e HCHs, impiegati sia per uso agricolo che per uso sanitario hanno contribuito all'inquinamento dei sedimenti fluviali della costa tropicale indiana, con conseguente accumulo anche negli organismi acquatici e nella catena alimentare. In particolare è stato osservato che i livelli di inquinanti risultavano maggiori nei fiumi che attraversavano le zone industriali. Lo stesso scenario è stato osservato in Pakistan da Syed et al. (2012), in cui sono stati ritrovati alti livelli di pesticidi organoclorurati (DDT, HCHs e PCB) nei sedimenti fluviali che costituiscono la maggiore fonte di contaminazione anche per il suolo.

1.7. Effetti dei pesticidi organoclorurati: studi in vitro ed in vivo

Nella prima fase del Dottorato è stata svolta un'ampia ricerca bibliografica in modo da stabilire i tempi di esposizione, le concentrazioni da testare ed i tipi cellulari già

utilizzati nella ricerca scientifica sugli effetti dell'esaclorocicloesano ed altri composti organoclorurati. Inoltre, la raccolta bibliografica, ha permesso di stabilire quali test *in vitro* effettuare, in accordo con il principio delle 3R che si basa sulla scelta da parte del ricercatore di una forma di sperimentazione animale più attenta al grado di sofferenza che tale pratica causa nei soggetti sperimentali. Il principio delle 3R è stato proposto nel 1959 dagli scienziati britannici William Russell e Rex Burch, membri della *Universities Federation of Animal Welfare* (UFAW), associazione tuttora molto attiva nel campo del benessere, e fa riferimento a tre concetti fondamentali: Rimpiazzare (*Replacement*), Ridurre (*Reduction*) e Rifinire (*Refinement*). In una prima fase il ricercatore deve quindi cercare, con il maggiore sforzo possibile, di rimpiazzare, o sostituire, il modello animale con un modello alternativo, nella maggior parte dei casi con un modello *in vitro*. La seconda fase è quella di cercare di ridurre il più possibile il numero di soggetti utilizzati in un determinato protocollo sperimentale, mantenendo comunque una quantità di dati significativi di sufficiente precisione. Infine, con l'ultima R, si intende l'operazione di rifinire, o migliorare, le condizioni sperimentali alle quali sono sottoposti gli animali. Dal punto di vista giuridico, il principio delle 3R è alla base della legislazione europea dedicata alla protezione degli animali utilizzati in sperimentazione. La direttiva 2010/63/UE del Parlamento europeo e del Consiglio, del 22 settembre 2010, sulla protezione degli animali utilizzati a fini scientifici, ha ampliato e approfondito le regole base per la protezione degli animali sperimentali già contenute nella direttiva precedente, la 1986/609/CEE.

La maggior parte degli studi effettuati sui composti organoclorurati, sono stati condotti sul sistema endocrino, sugli organi riproduttivi e sulle cellule dell'apparato riproduttivo come gli spermatozoi, ma negli ultimi anni sono stati effettuati anche studi per monitorare gli effetti degli organoclorurati sul sistema immunitario (*Corsini et al., 2013*).

Studi *in vitro* hanno dimostrato che la somministrazione di miscele di organoclorurati che comprendono gli isomeri β -, α - e γ -HCH stimolano la proliferazione delle linee cellulari cancerose del seno, *Payne et al. (2001)* hanno dimostrato che cellule cancerose del seno MCF-7, esposte a pesticidi organoclorurati quali o,p'-DDT, p-p'-DDT, p,p'-DDE e β -HCH, mostrano, dopo 7 giorni di esposizione, un aumento della capacità proliferativa. Inoltre è stato stabilito, per ogni composto, il livello di

soglia che è rispettivamente per il o,p'-DDT 0,35 μM , per il p-p'-DDT 0,037 μM , per il p,p'-DDE 0,34 μM e per il β -HCH 0,075 μM . Successivamente sono stati testati anche due mix di sostanze, il primo composto da una miscela 1:1:1:1 ed il secondo con una miscela 1:10:5:4 (o,p'-DDT, p,p'-DDE, β -HCH, p-p'-DDT) che hanno mostrato un livello di soglia rispettivamente di 0,018 μM e 0,50 μM .

Zou e Matsumura (2003) hanno osservato che l'esposizione a lungo termine, 13 mesi, al β -HCH 100 nM e 1 μM , promuove l'invasività delle cellule cancerose del seno MCF-7 ed inoltre induce cambiamenti biochimici cellulari come i livelli di espressione di proteine chinasi quali MAP chinasi deputate alla trasduzione del segnale ritenuti importanti markers per la trasformazione maligna delle cellule cancerose.

Ulteriori studi dimostrano che le cellule cancerose del seno MCF-7, CAMA-1 e T47D che esprimono il recettore per gli estrogeni esposte a β -HCH 0,001-100 μM o ad un mix di organoclorurati in cui erano presenti anche α -, β -, γ -HCH, mostrano un aumento dell'attività proliferativa con un picco massimo, nel caso del β -HCH, alla concentrazione di 100 μM , mentre invece le cellule cancerose del seno MDA-MB-231, MDA-MB468 e HS578T che non esprimono il recettore per gli estrogeni non mostrano un aumento dell'attività proliferativa a tutte le concentrazioni testate (Steinmetz *et al.*, 1996) o addirittura un effetto opposto, una diminuzione dell'attività proliferativa (Aubé *et al.*, 2011). Confermando così la tesi secondo la quale esiste un'interazione tra composti organoclorurati e recettori per gli estrogeni *in vitro*.

Altri studi dimostrano che l'esposizione ad organoclorurati, in particolare un mix costituito da diversi tipi di PCBs, p,p'-DDE, p,p'-DDT, α -, β -, γ -HCH ed esaclorobenzene, alle concentrazioni 0, 10,5, 14,7 e 21 $\mu\text{g/ml}$, porta ad una diminuzione della motilità e della vitalità degli spermatozoi di cinghiale dopo 2 e 4 ore di incubazione (Campagna *et al.*, 2009).

È stato inoltre osservato che il Lindano agisce come neurotossico *in vitro* infatti Heusinkveld *et al.* (2010) hanno osservato che cellule dopaminergiche di ratto (PC12) esposte a Lindano ad un *range* di concentrazioni che va da 0 a 100 μM , per 2, 4 e 6 ore non mostrano nessun cambiamento sulla vitalità cellulare anche se dopo 1 ora di incubazione, alle concentrazioni 10 e 100 μM è stato osservato, un aumento significativo delle Specie Reattive all'Ossigeno (ROS) a livello intracellulare e un incremento del rilascio di $[\text{Ca}^{2+}]$ extracellulare (concentrazione soglia compresa tra

10 e 100 μM). Studi successivi hanno dimostrato che esponendo le cellule PC12 ad un mix composto da Lindano 100 μM e Dieldrina 100 μM per 24 ore si osserva anche una diminuzione della vitalità cellulare (*Heusinkveld e Westerink, 2012*).

Recentemente sono stati effettuati anche studi *in vitro* su cellule del sistema immunitario in particolare sono stati utilizzati maggiormente il DDT ed i suoi derivati. *Pèrez-Maldonado et al. (2005)* hanno dimostrato che cellule mononucleate del sangue periferico (PBMC) umane esposte a p,p'-DDT, p,p'-DDE e p,p'-DDD (0-80 $\mu\text{g/ml}$) per 24 ore mostrano un aumento dello stress ossidativo cellulare misurato attraverso l'aumento dei ROS intracellulari, in particolare il picco di produzione dei ROS si osserva dopo 6 ore di trattamento con tutti e 3 i composti e solo alle concentrazioni di 60 e 80 $\mu\text{g/ml}$ per DDT, DDE e DDD. È stato inoltre osservato che l'aumento dei ROS induce anche l'attivazione del meccanismo di apoptosi.

Ennauncer et al. (2008) hanno dimostrato che il DDE alle concentrazione 80 mM induce un danno genotossico dopo 72 ore di incubazione in linfociti umani *in vitro* mentre nello stesso studio non è stato osservato nessun danno genotossico sulle stesse cellule esposte a Esaclorobenzene nel range di concentrazione 0,005-0,1 mM.

Test *in vitro* effettuati su monociti umani, isolati da sangue intero di donatori volontari, esposti a DDT alle concentrazioni di 10 50 e 100 $\mu\text{g/ml}$ per 24 ore, mostrano una serie di alterazioni morfologiche come la perdita della funzionalità delle proteine del citoscheletro, cromatina condensata e, attraverso l'analisi citofluorimetrica, è stato osservato che tutte le cellule esposte a DDT a tutte le concentrazioni testate vanno incontro ad apoptosi (*Dutta et al., 2008*).

È stato inoltre osservato che linfociti T umani prelevati da pazienti affetti da Lupus eritematoso (SLE), esposti a β -HCH 100 mM e DDT 50 μM per 72 ore, presentano una minore produzione di interleuchina 2 (IL-2) e interferone- γ (INF- γ), inoltre il β -HCH 100 mM induce un aumento della percentuale di CD4^+ nei linfociti T isolati dai pazienti nei SLE mentre in quelli isolati da pazienti sani si osserva un aumento dei linofciti T CD8^+ (*Dar et al., 2012*).

PBMC umane esposte a p,p'-DDE alle concentrazioni 10 e 80 $\mu\text{g/ml}$ per 0, 3, 6, 12 e 24 ore mostrano una diminuzione (-35 %) della vitalità cellulare in particolare dopo 24 ore di incubazione e alla concentrazione più alta testata (80 $\mu\text{g/ml}$) ed è stato inoltre osservato un incremento della produzione delle citochine infiammatorie quali interleuchina 1 β (IL-1 β) dopo 3 e 6 ore di incubazione ad entrambe le concentrazioni

testate, un aumento della produzione di Interleuchina-6 (IL-6) dopo 6, 12 e 24 ore di incubazione con 10 e 80 µg/ml di p,p'-DDE, e un aumento del Tumor Necrosis Factor α (TNF- α) solo dopo 12 ore di incubazione con p,p'-DDE alle concentrazioni 10 e 80 µg/ml (Càrdenas-Gonzàles *et al.*, 2013).

Ahmed *et al.* (2008) hanno osservato che PBMC umane esposte a un mix di endosulfano (α/β endosulfano rispettivamente 70:30) in un *range* di concentrazioni 0-100 µM per 6-12-24 ore mostrano un aumento di morte per apoptosi dopo 24 ore di incubazione alle concentrazioni più alte (20, 50 e 100 µM), e una diminuzione del Glutatione ridotto (GSH) in maniera dose-dipendente dopo 24 ore di incubazione.

Ahmed *et al.* (2011) su uno studio effettuato su PBMC umane esposte a Endosulfano, malatione, phosphamidon hanno osservato che Endosulfano e malatione inducono aumento di MDA e danno ossidativo al DNA alle concentrazioni 20-50-100 µM; phopshamidon induce aumento di MDA e danni ossidativi al DNA alle concentrazioni 5-10-20 µM confermando così un aumento dello stress ossidativo cellulare.

Yañez *et al.* (2004) hanno effettuato uno studio *in vitro* su PBMC umane isolate da soggetti sani esposte a 40, 80 µg/ml di p,p'-DDT, p,p'-DDE e p,p'-DDD per 24, 48 e 72 ore, dai risultati ottenuti si può osservare che PBMC trattate con p,p'-DDT e p,p'-DDD a tutte le concentrazioni testate ed a tutti i tempi di incubazione mostrano un danno al DNA invece per il p,p'-DDE è risultato un danno al DNA solo nelle cellule esposte alla concentrazione più alta ed ai tempi di incubazione di 24 e 48 ore.

Gli studi *in vivo* confermano la capacità degli organoclorurati di interagire con il sistema endocrino, infatti, si osservano livelli significativamente più alti di α -, β -, γ -, δ -HCH e anche di DDT e dei suoi metaboliti (p,p'-DDE, P,P'-DDD e o,p'-DDT) in soggetti che presentano infertilità rispetto a soggetti fertili, ed è stata osservata anche una correlazione tra livelli alti dei pesticidi e qualità di liquido seminale (analisi della motilità e conta degli spermatozoi) (McGlynn *et al.*, 2008).

Inoltre pazienti che presentano la micro-delezione del cromosoma Y, responsabile dell'infertilità, risultano avere alte concentrazioni tissutali di β -HCH ed α -HCH, e nello stesso studio, è stata osservata una concentrazione seminale significativamente maggiore di β -HCH nei pazienti affetti da azoospermia e oligospermia rispetto a soggetti sani (Khan *et al.*, 2010). In precedenza in uno studio di Pant *et al.* (2007) era

stata ipotizzata una correlazione tra esposizione fetale a p,p'DDE e sviluppo di tumori del testicolo sia seminomi che non seminomi.

Livelli significativamente più alti rispetto al controllo di lindano e dei suoi isomeri sono stati trovati nel siero di pazienti affetti da endometriosi (*Weiderpass et al., 2000; Louis et al., 2012*), cancro alla prostata (*Xu et al., 2010*), cancro al pancreas (*Porta et al., 2009*) e in pazienti affetti da linfoma non-Hodgkin (*Spinelli et al., 2007*).

Viel et al., (2011) hanno osservato un livello maggiore di β -HCH nei pazienti affetti da linfoma non-Hodgkin rispetto ai pazienti sani (98,61 ng/g di grasso rispetto a 48,08 ng/g di grasso nei soggetti sani).

Pazienti esposti a diversi inquinanti (Malatione, lindano, propoxur), hanno mostrato un aumento dei livelli di molecole reattive all'acido Tiobarbiturico (TBARS), markers del processo di perossidazione lipidica causata da aumento dei ROS, in tutti i campioni di siero, mentre negli eritrociti è stato osservato un aumento dell'attività enzimatica di tutti gli enzimi di detossicazione (Superossido Dismutasi, SOD; Catalasi, CAT; Glutazione Perossidasi, GPx, Glutazione Reduttasi, GRed; - Glutazione-S-Trasferasi, GST) e una diminuzione dei livelli di GSH (*Banerjee et al., 1999*).

Infine *Richardson et al. (2009)*, hanno osservato elevati livelli di β -HCH in pazienti affetti da Parkinson rispetto a soggetti sani (76% rispetto al 40%).

Di seguito sono riportati in tabella una serie di studi effettuati *in vitro* (Tab. 2) e *in vivo* (Tab. 3).

Tabella 2: test *in vitro* per studiare gli effetti degli organoclorurati

TEST IN VITRO							
Tipo cellulare	Tipo di inquinante	Concentrazione	Tempo di esposizione	Effetti e concentrazioni attive	Solubizzante*	Test in vitro effettuati	Ref.
Cellule umane embrionali renali	α -, β -, γ -, δ -HCH	1-30 μ M	-	Sono stati testati i singoli isomeri su 3 combinazioni diverse di recettori GABA _A . Su ogni combinazione di recettore è stato trovato un EC ₅₀ diverso.	DMSO (Cf=0,1%)	1. Patch clamp	Nagata et al., 1996
Cellule cancerose del seno (CAMA-1; MCF-7; T47D; MDAMB231; Fibroblasti del rene, non cancerose (CV-1)	α -, β -, γ HCH	0,02-0,40 μ M	24h	Sono stati testate le singole molecole chimiche ma anche un mix in cui non sono solo presenti gli organo clorurati ma anche altre sostanze	DMSO (Cf= 0,1%)	1. Proliferation assay (CyQuant kit) 2. RT-PCR semiquantitativa 3. FACS 4. gene reporter luciferina	Aubé et al., 2011
Cellule cancerose del seno (MCF-7)	β -HCH	0,1 μ M; 1 μ M	7-13 Mesi	Dopo 13 mesi le MCF-7 trattate con β -HCH 0,1 μ M e 1 μ M risultano avere un aumento del livello di invasività;	Etanolo (Cf=0,1%)	1. Anchorage-independent growth assay 2. Cell invasion assay 3. Zymographic electroforesis assay 4. Western blot	Zou e Matsumura, 2003
Linfociti umani	HCB DDE	10-80 mM	48h	Concentrazioni attive: DDE: 80 mM HCB: nessun risultato	DMSO (Cf=1%)	1. Test dei micronuclei	Ennaceur et al., 2008
Cellule pituitarie di ratto (MtT/E-2)	α -HCH	10 mM 100 μ M	7 giorni	α -HCH mostra il 15% d'inibizione alle concentrazioni testate	Etanolo	1. Ligand competition binding assay 2. Test di vitalità MTT	Maruyama et al., 1999
Preadipociti	PCB 77 PCB 153	PCB 77 e PCB	48h	PCB 153 e DDE significante	DMSO	1. Test di proliferazione	Chapados et

umani	DDE	153; 3,4 e 34 μ M DDE: 5-50-500 μ M		aumento della proliferazione	(Cf=0,3%)	cellulare (BrdU assay)	al., 2012
PBMC umane (pazienti affetti da Lupus erythematosus (SLE) e pazienti sani di controllo)	β -HCH	100 mM	72h	1. 100 mM HCH: aumento della percentuale di CD4+ nei pazienti SLE; aumento dei CD8+ nei pazienti sani ma non nei pazienti SLE 2. 100 mM HCH: decremento significativo della secrezione dell'IL-2 sia nei pazienti di controllo che in quelli malati; riduzione dei livelli di IL-10 nei pazienti di controllo	DMSO (Cf<=0,01%)	1. FACS 2. Elisa per quantificazione citochine	Dar et al., 2012
Cellule cancerose del seno umane: MCF-7; T47D, HS578T; MDA-MB231; MDA-MB468	β -HCH	0,001-100 μ M	8 giorni	MCF-7 e T47D: massimo effetto alla concentrazione 100 μ M.	Etanolo (Cf=0,01%)	1. Test di vitalità MTT 2. Hoechst dye-binding assay 3. ER-binding assay 4. Ps2 m RNA levels	Steinmetz et al., 1996
Cellule spermatiche di cinghiale	Mix di molecole: γ -HCH (0,2%)- α -HCH (0,2%) e β -HCH (0,4%)	0-10-15-25 μ g/ml	0-2-4-6-12 h	Riduzione della motilità a tutti i tempi di incubazione, vitalità ridotta a 2 ore di incubazione	DMSO (Cf= 0,1%)	1. Analisi della vitalità, motilità e progressione	Campagna et al., 2009
Cellule cancerose del seno umane: MCF-7	β -HCH	0,01-10 M	7gg	Il livello di soglia è di 0,075 μ M mentre la concentrazione che produce effetto è 2,45 μ M;	Etanolo (Cf< 1%)	1. Test di proliferazione	Payne et al., 2001
Cellule dopaminergiche di ratto: PC12	γ -HCH	10-100 μ M	24h	La concentrazione attiva che influisce negativamente sulla vitalità cellulare è di 100 μ M	DMSO	1. Test di citotossicità del Neutral red	Heusinkveld e Westerink, 2012
PBMC umane	Endosulfano, malatione, phosphamidon	0-100 μ M (endosulfano e malatione) 0-20 μ M (phopsphamidon)	6-12-24 h	Endosulfano e malatione inducono aumento di MDA e danno ossidativo al DNA alle concentrazioni 20-50-100 μ M; phopshamidon induce aumento di	Etanolo (Cf = 0,1%)	1. Lipid peroxidation (MDA) 2. Oxidative DNA damage	Ahmed et al., 2011

				MDA e danni ossidativi al DNA alle concentrazioni 5-10-20 μ M			
Cellule del Sertoli (ratto)	p,p-DDE	10-30-50 μ M	24 h	I trattamenti al di sopra dei 30 μ M inducono morte per apoptosi attraverso la via di FasL, 50 e 70 μ M inducono una diminuzione della vitalità	DMSO (Cf=0,3%)	1. Test di vitalità MTT 2. FACS (Apoptosi) 3. RT-PCR	Shi et al., 2009
Cellule del Sertoli (ratto)	p,p-DDE	10-30-50-70 μ M	24 h	Riduzione vitalità ed aumento LDH leakage nei trattati con 30-50-70 μ M, aumento SOD nei trattati con 50 μ M.	DMSO (Cf=0,3 %)	1. Test di vitalità MTT 2. Test di citotossicità LDH 3. FACS (ROS e apoptosi) 4. Attività enzimatica SOD 5. Western Blot	Song et al., 2008
Macrofagi (ratto)	2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD), Endrin, Lindano	0-200 ng/ml per tutti i composti	30 minuti	Aumento di ROS nei trattati con 100 ng/ml per tutti i composti testati	--	1. Chemiluminescence (ROS)	Bagchi e Stohs, 1993
PBMC umane	DDT p,p-DDE p-p-DDD	0-80 μ g/ml	6-24 h	Aumento della produzione dei ROS all'aumentare della concentrazione dei diversi trattamenti	Acetone (Cf= 0,5%)	1. FACS (ROS) 2. Test Apoptosi	Pèrez-Maldonado et al., 2005

Tabella 3: test *in vivo* per studiare gli effetti degli organoclorurati

TEST IN VIVO						
Tipo cellulare o soggetti studiati	N° donatori	Tipo di inquinante	Matrice	Test effettuato	Effetti	Bibliografia
Testicular Germ Cell Tumors (TGCTs)	739 casi: 313 con seminoma, 425 senza seminoma	β -HCH	Ricerca nel siero	1. Denaturazione del campione con acido formico seguito da estrazione in fase solida. Analisi con gas-cromatografia e spettrofotometria di massa	Livelli più alti di β-HCH nei pazienti rispetto al controllo	McGlynn et al., 2008
Pazienti esposti a diversi inquinanti (Malatione, lindano, propoxur)	25-30 pazienti	Avvelenamento da malatione, lindano e propoxur	Ricerca su siero, eritrociti e linfociti	1. Livelli di TBARS nel siero 2. Quantificazione GSH (linfociti) 3. SOD attività enzimatica (eritrociti) 4. CAT attività enzimatica (eritrociti) 5. GPx attività enzimatica (eritrociti) 6. GRed attività enzimatica (eritrociti) 7. GST attività enzimatica (eritrociti)	- Aumento dei livelli di TBARS in tutti i campioni di siero - Aumento dell'attività enzimatica di tutti gli enzimi di detossificazione (SOD, CAT, GPx, GRed, GST) - Diminuzione dei livelli di GSH	Banerjee et al., 1999
Pazienti affetti da epatocarcinoma	1306 casi: 341 positivi 691 negativi	α -, β -, γ -, δ -HCH	Ricerca nel siero	1. Quantificazione attraverso gas-cromatografia		Zhao et al., 2011
Pazienti affetti da cancro alla prostata ed al seno	4753 pazienti tra il 1999 ed il 2004	β -HCH	Ricerca nel siero	1. Quantificazione attraverso gas-cromatografia	Livelli più alti di β-HCH nei pazienti rispetto al controllo	Xu et al., 2010
Pazienti affetti da Parkinson e Alzheimer	50 casi	β -HCH	Ricerca nel siero	1. Quantificazione attraverso gas-cromatografia e spettrofotometria di massa	Livelli più alti di β-HCH nei pazienti rispetto al controllo	Richardson et al., 2009

Pazienti affetti da cancro al pancreas	144 casi	β -HCH	Ricerca nel siero	1. Quantificazione attraverso gas-cromatografia	Livelli più alti di β-HCH nei pazienti rispetto al controllo	For the PANKRAS II Study Group et al., 2009
Pazienti affetti da linfoma non-Hodgkin	882 casi: 422: pretrattati 460: controllo	β -HCH	Ricerca nel siero	1. Quantificazione attraverso gas-cromatografia	Livelli più alti di β-HCH nei pazienti rispetto al controllo	Spinelli et al., 2007
Donne affette da Endometriosi	495 donne	β -, γ -HCH	Ricerca nel siero e nel grasso addominale	1. Quantificazione attraverso gas-cromatografia e spettrofotometria di massa	Livelli più alti di β-, γ-HCH nei pazienti rispetto al controllo	Louis et al., 2012
Pazienti esposti a diversi inquinanti per 6 mesi	146 pazienti dal 1992 al 1998	α -, β -, γ -HCH	Ricerca nel sangue;	1. Determinazione della sub-popolazione linfocitaria; 2. Determinazione della presenza nel plasma della neopterin; 3. Enzyme immunoassay 4. Determinazione delle citochine plasmatiche	Non si osservano effetti significativi su test effettuati, si osserva solo un debole effetto dose-risposta tra PCB e sub-popolazione linfocitaria e tra HCHs e HCB e produzione di citochine e anticorpi	Daniel et al., 2001
Pazienti a cui è stato diagnosticato non-hodgkin lymphoma tra il 2003 ed il 2005	53 casi	β -, γ -HCH	Ricerca nel siero	1. Gas-cromatografia	Livelli più alti di β-, γ-HCH nei pazienti rispetto al controllo	Viel et al., 2011
Pazienti di sesso maschile affetti da infertilità	100 casi	α -, β -, γ -, δ -, ϵ -HCH	1. Ricerca nel liquido seminale 2. ricerca della microdelezione del cromosoma Y	1. Estrazione con n-hexane e acido formico, quantificazione con gas cromatografia	Livelli più alti di α-, β-, γ-, δ-, ϵ-HCH nei pazienti rispetto al controllo	Khan et al., 2010
Pazienti di sesso maschile affetti da infertilità	50 casi	α -, β -, γ -HCH	Ricerca nel liquido seminale	1. Estrazione con n-hexane e acido formico, quantificazione con gas cromatografia	Livelli più alti di α-, β-, γ-HCH nei pazienti rispetto al controllo	Pant et al., 2007
Pazienti con avvelenamento da lindano	20 pazienti 20 controlli	γ -HCH	Ricerca nel sangue	1. HPLC per la determinazione dei livelli di lindano 2. Immunoassay per anticorpi (IgM, IgA, IgG) e citochine infiammatorie (IL-2, IL-4,	- Aumento delle citochine IL-2, IL-4 e TNF-α - Decremento dell' INF-γ - Nessun cambiamento nei livelli di immunoglobuline	Seth et al., 2005

				TNF- α , e IFN- γ		
Pazienti di sesso femminile affetti da cancro all'endometrio	359 casi (54-74 anni): 154 controlli positivi 205 controlli negativi	α -, β -, γ -HCH	Ricerca nel siero	1. Estrazione con n-hexane, quantificazione con gas cromatografia	Livelli più alti di α-,β-,γ-HCH nei pazienti rispetto al controllo	Weiderpass et al., 2000

1.8. Esposizione ad organoclorurati e stress ossidativo: le Specie Reattive all'Ossigeno (ROS)

Dagli studi raccolti (Tab. 2, Tab. 3) risulta che la maggior parte degli inquinanti ambientali, in particolare i pesticidi, inducono negli organismi esposti un stato di stress ossidativo con conseguente attivazione di *pathways* cellulari per ristabilire l'omeostasi cellulare (Bagchi e Stohs, 1993; Song et al., 2008; Ahmed et al., 2011; Pèrez-Maldonado et al., 2005).

Per stato redox cellulare s'intende il rapporto di concentrazione intracellulare tra i composti di natura pro-ossidanti e quelli anti-ossidanti. Tra i composti pro-ossidanti sono annoverate tutte le specie reattive dell'ossigeno (ROS), degli anti-ossidanti fanno parte invece tutte quelle molecole che hanno la funzione di tamponare la concentrazione e l'effetto dei primi. Nell'ambiente intracellulare la presenza dei ROS è fisiologica e costante, essi infatti sono prodotti dal metabolismo aerobico mitocondriale, dall'attività degli enzimi con la funzione di ossidasi (xantina ossidasi, NADPH ossidasi, ammine ossidasi, mieloperossidasi, lipoossigenasi, cicloossigenasi) e dal reticolo endoplasmatico attraverso l'attività del Citocromo P450 (Cyt P450). La produzione endogena di ROS non è l'unica fonte di specie ossidanti, altrettanto costantemente infatti le cellule sono bersagliate dall'esterno da radiazioni ionizzanti, ultrasuoni, fumo, pesticidi ed inquinanti e composti ossidanti di diversa natura chimica, che contribuiscono ad incrementare il *pool* interno. I ROS possiamo distinguerli in specie radicaliche e non radicaliche, le prime possiedono un elettrone spaiato nell'orbitale più esterno mentre le seconde non hanno elettroni spaiati ma sono altamente reattive ad essere riconvertite in specie radicaliche. Le specie radicaliche includono l'anione superossido ($O_2^{\cdot-}$), i radicali idrossilici ($\cdot OH$), l'idroperossido ($HO_2^{\cdot}$), le specie non radicaliche sono invece il perossido d'idrogeno (H_2O_2) e l'ossigeno singoletto ($^1O_2$) (Fig. 4).

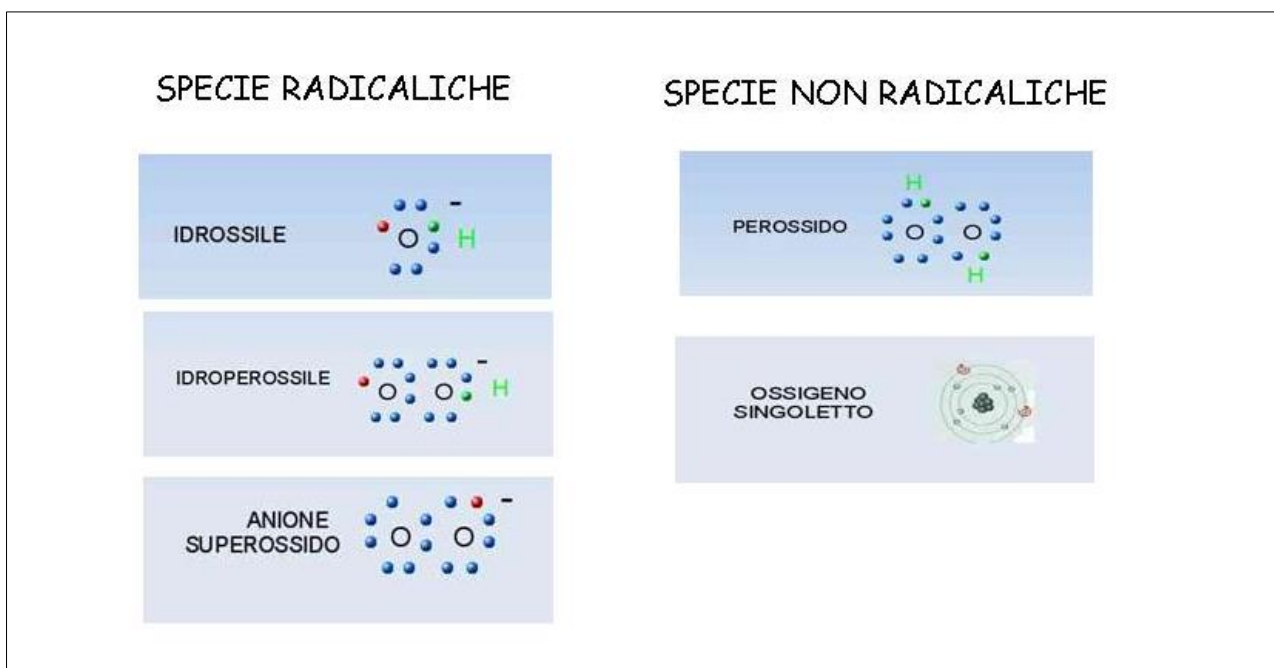


Figura 4: differenze tra Specie Reattive all'Ossigeno (ROS) radicaliche e non radicaliche

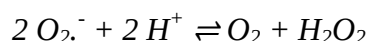
Dal punto di vista chimico, un “radicale libero” è una particella che possiede uno o più elettroni non accoppiati sul suo strato esterno. La presenza di un elettrone spaiato conferisce alla molecola una grande instabilità. Ogni radicale libero in pratica ha perduto un elettrone a causa di processi metabolici o di altri fattori come inquinamento, raggi UVA, stress prolungato, fumo ecc. . Da quel momento in poi i radicali liberi hanno come caratteristica l'elevata reattività, che si manifesta anche a concentrazioni bassissime (pM) e una limitata emivita, che varia da 10-12 secondi a poche ore e raramente giorni.

I ROS possono risultare molto dannosi, infatti i loro principali bersagli sono le macromolecole biologiche, come i lipidi, le proteine e il DNA, determinando alterazioni delle membrane, inattivazione di enzimi e recettori, modificazione di proteine del citoscheletro e danni al genoma (Halliwell e Gutteridge, 1999; Valko et al, 2004).

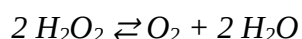
La pericolosità dei ROS è bilanciata dalla cellula attraverso il vasto speiegamento e l'attività di enzimi antiossidanti e *scavengers* deputati alla rimozione di tali composti. Del primo gruppo fanno parte gli enzimi specifici per il tipo di ROS presente nella cellula come Catalasi (CAT), Superoossido Dismutasi (SOD) e Glutathione Perossidasi selenio- e glutathione (GSH)-dipendente (GPx), che rispettivamente si occupano dell'eliminazione dell'anione superossido $O_2^{\cdot-}$, del perossido d'idrogeno (H_2O_2) e di tutti gli idroperossidi con particolare riferimento ai lipoperossidi di membrana. Al secondo gruppo appartengono vitamine e composti antiossidanti ad attività generalizzata come α -tocoferolo (Vitamina E), β -carotene, acido ascorbico (Vitamina C), glutathione (GSH), selenio, deputati alla protezione dell'intero

citoplasma e della membrana cellulare. In generale nella cellula le Specie reattive all'ossigeno vengono mantenute in equilibrio costante e funzionano anche come molecole di segnalazione per l'attivazione di diversi *pathways* cellulari, ma quando la loro concentrazione supera quella delle molecole anti ossidanti si crea all'interno della cellula un stato chiamato stress ossidativo cellulare (Halliwell, 1999) che è alla base della patogenesi di numerose malattie neurodegenerative come il Parkinson, la sclerosi laterale amiotrofica, la malattia di Huntington; inoltre, una stretta correlazione, c'è anche tra stress ossidativo e altre patologie come aterosclerosi, cancro e diabete (Gutteridge, 1993; Kehrer, 1993; Storz, 2005). La continua ricerca di un equilibrio dello *status* ossidativo nella cellula ci fa capire l'importanza delle molecole antiossidanti, in particolare di seguito si farà riferimento alle molecole endogene antiossidanti in quanto poi oggetto degli studi di dottorato.

Tra gli antiossidanti endogeni una prima linea di difesa dell'organismo è costituita dagli enzimi come SOD e CAT che hanno la funzione di convertire i ROS in composti meno dannosi per la cellula (Hayes et al., 1999; Arnér et al., 2000; Matés et al., 1999; Chaudière et al., 1999; Talalay et al., 2000), in particolare la SOD catalizza la reazione



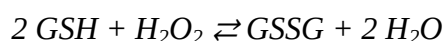
portando alla formazione di perossido di idrogeno che viene poi convertito dalla CAT



portando alla formazione di una molecola di ossigeno e 2 molecole di acqua. Questi due enzimi costituiscono una prima linea di difesa dell'organismo, ma spesso non riescono a svolgere la loro azione protettiva, è necessaria quindi una seconda linea di difesa per impedire ulteriori danni intracellulari. Questa seconda linea di difesa è rappresentata da enzimi come la GPx e la GST (Armstrong et al., 1997; Brigelius-Flohè et al., 1999; Kuhn e Borchert, 2002).

I metaboliti derivanti da queste reazioni, vengono poi escreti dalla cellula tramite specifici meccanismi tra cui quello della coniugazione con il glutatione, che viene legato alle molecole da eliminare formando il complesso glutatione-xenobiotico e trasportato nel mezzo extracellulare (Akerboom e Sies, 1989).

Il glutathione risulta quindi essere la molecola chiave per il mantenimento dell'omeostasi dello status ossidativo (Meister e Anderson, 1983; Sies, 1999). Il tripeptide γ -glutamylcisteinglicina o glutathione (GSH) contenente cisteina, esiste sia in forma ridotta (GSH) che in forma ossidata (GSSG), meglio indicata come glutathione bisolfuro, e prende parte alle reazioni redox grazie all'ossidazione reversibile dei suoi gruppi tiolici attivi (Kalyanaraman et al., 1996; Briviba et al., 1999). Il GSH è normalmente distribuito nel nucleo, nel reticolo endoplasmatico e nei mitocondri, può agire sia direttamente da *scavenger* mediante il legame con xenobiotici, reazione catalizzata dalla GST oppure agire come substrato per gli enzimi GPx e Glutathione reduttasi (GRed). La glutathione perossidasi è un enzima appartenente alla classe delle ossidoreduttasi, che catalizza la seguente reazione:



A partire da due molecole di GSH più una molecola di perossido di idrogeno produce una molecole di GSSG e due molecole di acqua. La GST invece ha la funzione protettiva contro sostanze potenzialmente tossiche prodotte nella cellula in seguito all'esposizione a contaminanti ambientali o al consumo di cibi cotti alla brace o contaminati con micotossine, o di acqua inquinata (Hayes et al., 2005). L'azione della GPx e della GST porta ad una diminuzione del GSH intracellulare con un conseguente aumento del GSSG, l'aumento del GSSG risulta essere tossico per la cellula in quanto questa sostanza porta alla formazione di ponti disolfuro nelle proteine compromettendone la funzionalità. Quindi è opportuno mantenere il rapporto GSH/GSSG intracellulare sempre in equilibrio e per fare questo la cellula adotta due meccanismi, o il GSSG viene rilasciato nell'ambiente extracellulare oppure viene riconvertito in GSH dalla glutathione reduttasi (GRed) (Fig. 5). Il GSH intracellulare può essere rigenerato sia ad opera della GRed sia per sintesi *ex-novo*. La sintesi *ex-novo* del GSH avviene attraverso due reazioni sequenziali, entrambe ATP-dipendenti, la prima reazione è catalizzata dall'enzima γ -glutamylcisteina sintetasi (γ GCS) e la seconda dall'enzima glutathione sintetasi. La sintesi del GSH viene regolata mediante *feedback* negativo dalla disponibilità di cisteina e dalla concentrazione di GSH (Lu, 2000) (Fig. 6).

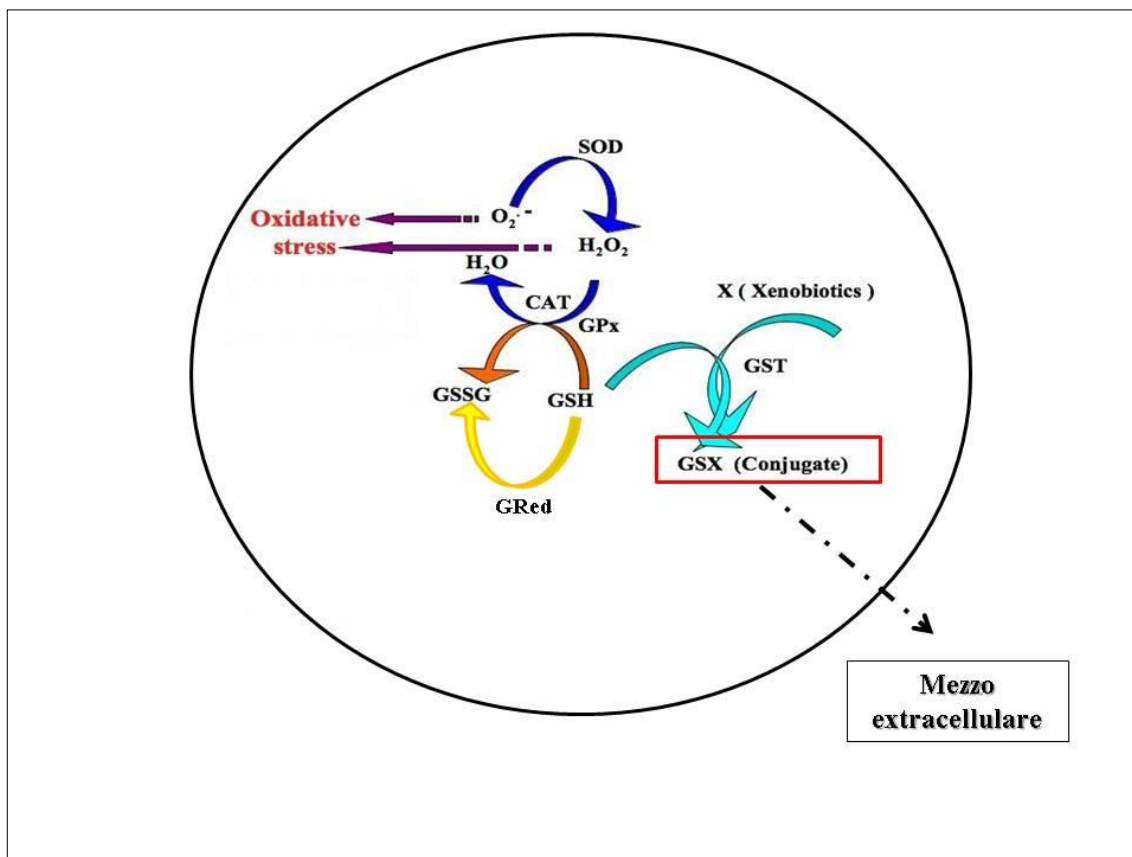


Figura 5: principali meccanismi intracellulari attivati dalla cellula per contrastare lo stress ossidativo. Gli enzimi che costituiscono la prima linea di difesa sono la Catalasi (CAT) e la Superossido Dismutasi (SOD), mentre la seconda di linea di difesa è costituita dagli enzimi che utilizzano come substrato il Glutatione ridotto (GSH), come la Gutatione-S-trasferasi (GST), la Glutatione Perossidasi (Gpx).

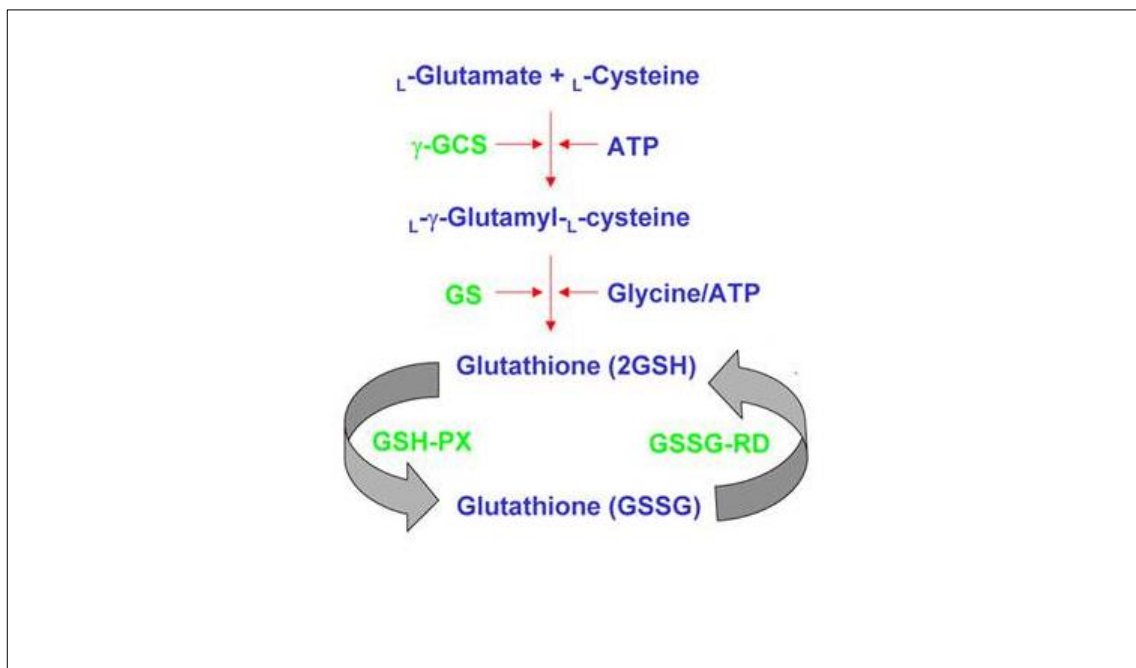


Figura 6: meccanismi di rigenerazione o di sintesi ex-novo del Glutathione ridotto (GSH). Il GSH può essere rigenerato grazie all'azione della Glutathione Reduttasi che riduce il Glutathione Ridotto (GSSG) oppure attraverso la sintesi ex-novo attraverso due reazioni sequenziali, entrambe ATP-dipendenti, la prima reazione è catalizzata dall'enzima γ -glutamylcisteina sintetasi (γ GCS) e la seconda dall'enzima glutathione sintetasi.

Nel marzo 2005, nel corso di un'indagine prevista dal Piano Nazionale Residui, è stata evidenziata una contaminazione da β -HCH in un campione di latte prodotto in un'azienda presente lungo il fiume Sacco, nel comune di Gavignano. I livelli di β -HCH risultavano essere 20 volte superiori al limite stabilito dalla legge (0,003 mg/kg), precisamente 0,062 mg/kg. A seguito di tale evenienza l'ASL di Roma G ha provveduto ad effettuare tutti i controlli del caso sull'azienda individuata. Nel corso di tali analisi è stata evidenziata la positività del foraggio utilizzato da tale azienda nell'alimentazione del bestiame, questo ha lasciato supporre che la contaminazione del latte fosse legata ad un problema di inquinamento ambientale. Immediatamente sono stati disposti controlli in aziende zootecniche limitrofe che hanno confermato la fondatezza dell'ipotesi prospettata. L'esito degli accertamenti svolti, fino al 30 marzo, hanno evidenziato una situazione complessivamente grave nei Comuni di Segni e Gavignano, con diverse aziende zootecniche coinvolte nella contaminazione. Successivamente sono state prese misure per la gestione dell'emergenza delle autorità locali tra cui l'Assessorato alla Sanità, il ministero della Salute, l'Istituto Superiore di Sanità, l'Istituto Zooprofilattico, l'ARPA Lazio le ASL di Roma G e di Frosinone e la Direzione Regionale Agricoltura e Ambiente. Le misure prese sono state le seguenti: nei confronti delle aziende zootecniche risultate positive, nel rispetto del principio di precauzione, blocco della commercializzazione del latte e prescrizioni per una movimentazione controllata degli animali; spese per lo smaltimento del latte nelle aziende sotto sequestro poste a carico del Servizio sanitario regionale; indagini estese anche ai Comuni confinanti della provincia di Frosinone, Paliano ed Anagni, negli allevamenti insistenti lungo le sponde del fiume Sacco, al fine di delimitare geograficamente il problema.

La negatività di tutte le altre analisi effettuate nel Comune di Colleferro avrebbe avvalorato l'ipotesi che la sorgente di contaminazione del fiume dovesse essere individuata in un sito posto a valle dell'abitato di questo Comune.

Tale sito riguarderebbe una vasta area di circa 650 ettari dove un'industria chimica, la Bombrini Parodi Delfino (BPD), nata all'inizio del '900, produceva sostanze chimiche quali insetticidi organoclorurati, esteri fosforici, chetoni, ecc. L'area industriale ha visto anche la produzione di esplosivi, carri e carrozze ferroviarie, motori di lancio, con una occupazione fino a 8000 addetti.

In detta area sarebbero stati interrati sia i residui della lavorazione sia le scorte invendute a seguito dell'intervenuto divieto di commercializzazione e di impiego del Lindano. Tali quantitativi sarebbero stati stimati in circa 50.000 m³. Questa sostanza ha contribuito ad

inquinare il Fiume Sacco, che dopo un percorso di circa 80 km getta le proprie acque nel Liri-Garigliano.

Già nel 1990 erano state individuate tre discariche incontrollate di rifiuti industriali (ARPA 1 e ARPA 2 e Cava di Pozzolana del Comune di Colleferro), testimonianza che nel corso degli anni era stata effettuata un'intensa attività illegale di smaltimento sul suolo e di incenerimento di rifiuti. Una perizia tecnica sulle sostanze presenti nelle acque e nel terreno delle tre discariche, aveva rilevato la presenza di inquinanti organoclorurati quali il Lindano e metalli pesanti. Dopo tale ritrovamento, nel 1992 inizia il processo a carico dell'azienda BPD, con l'accusa di "stoccaggio e smaltimento di rifiuti speciali". Il procedimento si conclude con la condanna da parte del tribunale di Velletri all'obbligo della bonifica della zona. L'azienda suddetta non avrebbe mai provveduto alla messa in sicurezza, né alla bonifica dei siti accertati come contaminati senza nessun intervento di verifica da parte delle autorità locali, favorendo l'ulteriore cronicizzazione del problema.

Al fine di garantire la sicurezza alimentare e la riqualificazione della Valle del Sacco viene avviato un piano definito "Piano che affronta l'emergenza" che prevede la rimozione totale dei foraggi, dei capi e delle produzioni zootecniche che in base ai controlli effettuati si sono dimostrati a rischio di contaminazione e il divieto di utilizzo delle aree agricole a rischio esondazione del fiume Sacco. Sono state 55 le aziende agro-zootecniche direttamente interessate, nelle quali è stato disposto l'abbattimento di circa 6000 capi, di cui 4000 ovini e 2000 bovini, e la distruzione di latte per oltre 700 quintali al giorno. Nel frattempo sono stati stanziati fondi, da parte della Regione Lazio e del Governo, come indennizzo alle aziende coinvolte per l'abbattimento dei capi, per il latte distrutto, per l'acquisto di foraggi e per riavviare le attività. E' stato, inoltre, attivato un extra-piano finalizzato ad un programma di monitoraggio con campionamenti periodici del latte prodotto dai nuovi capi di bestiame. Inoltre l'Assessorato Regionale all'Agricoltura ha programmato una serie d'interventi per la messa in sicurezza della zona, la bonifica dell'area e l'avvio di un progetto di compatibilità per arrivare alla certificazione dei prodotti di qualità della Valle del Sacco".

Dal luglio 2005 a settembre 2005 sono stati effettuati una serie di analisi su campioni di latte e sangue provenienti da 5 aziende presenti nell'area contaminata in cui sono stati eliminati tutti i foraggi contaminati dall'alimentazione del bestiame. Sono stati effettuati campionamenti ogni 3 settimane e dai risultati ottenuti è stato osservato che i livelli di contaminazione da β -HCH erano più alti nelle aziende a ridosso del Fiume Sacco. Inoltre si osservavano livelli più alti nelle prime fasi di lattazione rispetto alle fasi più tardive, dovuto soprattutto alla movimentazione del grasso di riserva. Infine sono stati ritrovati livelli sierici

di β -HCH nei bovini in esame, in particolare i livelli ematici di β -HCH erano presenti anche prima della contaminazione del latte, questo faceva ipotizzare la presenza di β -HCH nel siero ematico come un marker precoce di contaminazione (Ronchi e Danieli, 2008). Successivamente nel 2010 l'Istituto Nazionale per l'Assicurazione contro gli infortuni sul lavoro (INAIL) ha finanziato il progetto intitolato "Studio della diffusione di inquinanti organici persistenti in ambiente rurale e stima dei rischi da esposizione per gli operatori del settore agricolo-zootecnico mediante modelli cellulari" (Decisione Presidenziale n. 165/2010, Progetto ID7/2010, Università degli Studi della Tuscia di Viterbo). Il progetto ha previsto la determinazione dello stato di contaminazione della zona attraverso l'analisi di numerose matrici come latte mangimi, suolo, soprassuolo, acqua, uova, ortaggi, conserve ed essenze arboree peri-fluviali (alberi di salice collocati in prossimità ed a distanza dell'alveo del Fiume Sacco). Inoltre ha previsto anche la stima dei rischi da esposizione a organoclorurati attraverso colture cellulari *in vitro* che sarà trattato in maniera particolareggiata in quanto oggetto della presente tesi di dottorato.

Le analisi effettuate per caratterizzare lo stato di contaminazione ambientale sono state condotte in 2 fasi, la prima nel 2012 e la seconda nel 2014, dalle quali è emerso che:

- sul suolo, sul quale sono stati fatti campionamenti a 3 diverse profondità (0-15; 15-30; 30-45 cm), i risultati evidenziano che in tutti i casi, lo strato superficiale (0-15 cm) ha presentato i livelli più elevati per tutti gli isomeri dell'HCH. Il limite dell'HCH nei suoli riportato nel Testo Unico Ambientale (Decreto Legislativo 152/2001) è pari a 0,01 mg/kg, il 31% dei campioni analizzati supera tale limite per l' α -HCH; il 27% per il β -HCH e per il γ -HCH. Al contrario le concentrazioni dell'isomero δ -HCH riscontrate, rientrano nei limiti di legge per tutti i campioni analizzati. Nel corso del campionamento dei suoli, per ogni azienda partecipante al progetto di ricerca, sono stati raccolti anche campioni di soprassuolo rappresentati da essenze erbacee in consorzio polifita (prevalentemente siti non lavorati e non utilizzati per la produzione di foraggi o granelle di cereali) o monospecie (siti lavorati). Le analisi condotte sui campioni acquisiti nel corso del primo ciclo hanno mostrato valori al di sotto del Limite di Determinazione (LOD).
- Ulteriori matrici analizzate sono state l'*unifeed* (una miscela di alimenti, quali foraggi, concentrati e sottoprodotti destinati al nutrimento dei bovini), l'acqua destinata all'abbeveraggio degli animali ed il latte prodotto. I campioni di

unifeed hanno mostrato dei valori, per la maggior parte, al di sotto del Limite di Determinazione (LOD=0,0002 mg/kg). Soltanto in tre aziende i campioni sono risultati positivi. Dalle analisi effettuate sull'acqua, in alcun caso è stato osservato un livello superiore a quello imposto dalle norme in materia ambientale (D. Lgs n. 152/06) per le acque sotterranee, come non è risultato superato il limite pari a 0,1 µg/l per antiparassitario (o 0,5 µg/l per la somma) imposto dal D. Lgs 31/2001 per le acque ad uso umano.

- Per la matrice latte, soltanto 3 campioni appartenenti alle aziende hanno presentato valori oltre il limite di quantificazione, in particolare, le aziende che avevano mostrato anche i livelli elevati di contaminazione da α -HCH nell'*unifeed*, hanno presentato valori al di sopra del limite comunitario pari a 0,003 mg/l (Reg. EC 396/2005).
- per quanto riguarda gli altri alimenti destinati all'alimentazione umana, sono state effettuate campionature di miele, prodotti dell'orto e carne bovina nell'area di studio e non è risultato nessun caso di positività per la contaminazione da isomeri dell'HCH o HCH totale .

Le stesse analisi sono state effettuate nella fase II (2014).

Analizzando i due cicli di campionamenti si è potuto concludere che, sebbene ci sia un generale trend di riduzione riscontrato nel corso dello studio, il suolo agrario risulta essere a tutt'ora la matrice agro-ambientale maggiormente a rischio in quanto, specie negli strati più superficiali, rappresenta fonte importante di tali inquinanti che possono migrare lungo la catena trofica ma anche via atmosfera sotto forma di particolato ovvero in fase vapore. Inoltre i livelli di HCH riscontrati nell'*unifeed*, in alcune aziende sono stati ritrovati anche nel latte prodotto dalle stesse aziende. Al contrario non sembra che la migrazione degli HCH in altri prodotti d'origine animale quali carne, frattaglie, miele e uova di gallina possa rappresentare una fonte di rischio particolarmente rilevante sulla base delle risultanze ottenute.

In occasione dei campionamenti di suolo e soprassuolo in alcune aziende coinvolte nel Progetto, sono state effettuate anche campionature radiali su essenze arboree peri-fluviali (alberi di salice collocati in prossimità ed a distanza dell'alveo del Fiume Sacco).

Il fitorimedia ed, in particolare il sistema di pioppicoltura a taglio breve (SRC), è una delle tecniche di bonifica utilizzate per il risanamento della Valle del Fiume Sacco, in quanto gli isomeri dell'HCH possono essere accumulati nei tessuti delle piante, come il legno e la corteccia, attraverso l'assorbimento radicale o l'aerosolizzazione dal suolo.

Al fine di verificare l'effettivo assorbimento degli HCH da parte dei pioppi, sono stati effettuati dei carotaggi di alcune piante collocate nell'area oggetto di studio. I campioni risultanti sono stati analizzati tal quali, in via preliminare, con la spettroscopia micro-FTIR e successivamente anche con la tecnica della gas cromatografia.

In letteratura l'utilizzo di tale tecnica per l'individuazione di inquinanti nelle piante risulta essere noto solo nel caso specifico della contaminazione da metalli pesanti. Un recente studio ha, infatti, riportato l'utilizzazione di tale tecnica nella valutazione del livello di contaminazione da metalli pesanti di suoli alluvionati utilizzando la riflettanza del suolo nel medio infrarosso (*Kooistra et al., 2001*). Attraverso questi studi è stato possibile dimostrare, attraverso la tecnica della spettroscopia micro-FTIR e della gas cromatografia, che gli HCHs si accumulano nelle specie legnose ripariali come il pioppo, in maniera differenziale nei diversi anelli di accrescimento, infatti, grazie alla tecnica micro-FTIR, è possibile individuare le fasi di maggiore e/o minore accumulo, che ha permesso di capire che negli anni con maggiori eventi di esondazioni del Fiume Sacco si è riscontrato un maggiore accumulo di inquinanti nei pioppi lungo il letto del fiume. Sulla base di questi risultati e sulla base delle caratteristiche fisiche e chimiche degli HCH come la costante di ripartizione ottanolo/acqua (K_{ow}) inferiore a 5 e un valore favorevole del fattore di concentrazione del flusso di traspirazione (TSCF) dal fusto per il pioppo che è tra 1,58 (γ -HCH) e 1,17 (δ -HCH), è stato possibile confermare il fatto che questi inquinanti si accumulano nelle piante principalmente attraverso il meccanismo di assorbimento suolo-radice. Inoltre, valori particolarmente bassi della costante di Henry per questi contaminanti (tra $3,5 \times 10^{-8}$ e $4,5 \times 10^{-7}$) impedirebbero il loro passaggio dal sistema xilematico del fusto alle foglie e di conseguenza dalle foglie all'aria. Tuttavia, sono state analizzate anche le cortecce dei pioppi ed è stata riscontrato l'accumulo nella corteccia dell'isomero β -HCH che suggerisce la possibilità che tali contaminanti possano diffondersi anche attraverso il sistema aria-suolo. I pesticidi, infatti, possono essere assorbiti, oltre che dall'apparato radicale, anche da quello fogliare, per poi penetrare

all'interno del fusto. Alcuni autori hanno riscontrato discreti quantitativi di policlorobifenili nella corteccia di querce che crescono anche a 14 km di distanza da aree contaminate da tali inquinanti (*Liu e Schnoor, 2008*).

Infine, i risultati dell'accumulo nel legno di pioppo pongono quesiti da risolvere sulla destinazione finale di biomassa di pioppo risultante da impianti di fitodepurazione o fitorimediale come quelli installati nell'area oggetto dello studio.

In conclusione la presenza anche solo sporadica in alcune matrici agro-ambientali, suggerisce che debbano essere valutati opportunamente i rischi da esposizione cronica per gli animali da reddito e soprattutto gli operatori del settore agro-zootecnico presenti nell'area contaminata, le caratteristiche di lipofilità, bioaccumulo e biomagnificazione degli HCH fanno sì che queste sostanze si accumulino nei tessuti grassi sia degli animali da reddito che del consumatore finale, che non sono in grado di metabolizzarli e quindi possono andare incontro a tossicità cronica.

2.2 Scopo della tesi

Sulla base dei dati già pubblicati e anche sulla base delle evidenze della presenza degli inquinanti organoclorurati nel siero di animali esposti attraverso l'alimentazione (*Ronchi e Danieli, 2008*), lo scopo di questo lavoro è quello di andare a monitorare gli effetti di una particolare molecola, il β -HCH, su modelli cellulari animali e umani, con l'obiettivo di stimare il rischio d'esposizione sia per gli animali da reddito che per gli operatori del settore zootecnico e per il consumatore finale.

Il ritrovamento di queste sostanze nel siero di animali esposti attraverso l'alimentazione fa ipotizzare un contatto tra le cellule del sistema immunitario, essendo cellule circolanti del sangue, e gli inquinanti in questione (HCH). In particolare, è stato scelto di monitorare gli effetti del β -HCH, che rappresenta l'isomero più persistente del Lindano, su cellule del sistema immunitario in quanto in primo luogo costituiscono la prima difesa dell'organismo contro patogeni, e a contatto con essi producono una risposta per proteggere l'organismo. Inoltre è stato osservato che il buon funzionamento del sistema immunitario costituisce una protezione verso il cancro, infatti oltre a mantenere l'omeostasi delle difese immunitarie il sistema immunitario riconosce non solo i patogeni ma anche le cellule anormali e/o

cancerose, si ha quindi una vera e propria “immunosorveglianza” svolta in particolare dalle cellule dell’immunità specifica in quanto in grado di adattarsi e rispondere a nuovi segnali di pericolo (Wojtowicz *et al.*, 2016).

Infine, la carenza di lavori scientifici sugli effetti degli inquinanti ambientali ed in particolare degli interferenti endocrini sul sistema immunitario, ci ha spinto ad effettuare delle indagini scientifiche su questo fronte, con l’obiettivo di individuare, attraverso dei test preliminari, gli effetti sulla vitalità e sulla funzionalità delle cellule del sistema immunitario.

I modelli cellulari presi in esame sono stati: le cellule polimorfonucleate del sangue periferico (PBMC) di animali d’allevamento, nel nostro caso i bovini, che costituiscono la fonte principali degli alimenti di origine animale utilizzati nell’alimentazione umana e le Jurkat, cellule del sistema immunitario umano, in particolare linfociti T, per osservare come il sistema immunitario umano risponde agli inquinanti ambientali.

Infine sulla base dei risultati preliminari sono stati poi effettuati test per monitorare lo *status* ossidativo cellulare e la risposta ad un eventuale stress ossidativo indotto dalla molecola testata.

CAPITOLO 3

MATERIALI E METODI

3.1. Schema sperimentale

Lo schema sperimentale finalizzato allo studio *in vitro* degli effetti da esposizione al β -HCH, è stata impostata sulla base di uno schema a più fasi.

Durante la prima fase di lavoro sono stati effettuati test *in vitro* per determinare il tipo e la concentrazione del solvente da utilizzare per la solubilizzazione del β -HCH in quanto altamente lipofilico. In base all'ampia valutazione dei lavori scientifici presenti in letteratura (Nagata *et al.*, 1996; Steinmetz *et al.*, 1996; Payne *et al.*, 2001; Zou e Matsumura, 2003; Ennaceur *et al.*, 2008; Aubé *et al.*, 2011; Briz *et al.*, 2011; Dar *et al.*, 2012), ed in base alle prove preliminari effettuate in laboratorio, è stato stabilito di utilizzare il Dimetilsulfossido (DMSO) alla concentrazione dello 0,2% sia perché non ha mostrato effetti negativi sulla vitalità e sulla funzionalità delle PBMC di bovino e delle cellule linfocitarie umane Jurkat e sia perché in grado di solubilizzare in modo migliore il β -HCH rispetto ad altri solventi testati (etanolo e dimetilformammide). Inoltre, nella scelta del *range* di concentrazioni di β -HCH da testare (β -HCH 0,1-1-10-100-1000 μ M), è stato tenuto conto sia degli studi già effettuati in precedenza (Steinmetz *et al.*, 1996; Payne *et al.*, 2001; Zou e Matsumura, 2003; Ennaceur *et al.*, 2008; Aubé *et al.*, 2011; Dar *et al.*, 2012) sia delle concentrazioni ritrovate *in vivo* nello studio di Ronchi e Danieli (2008). Infine la scelta di 2 tempi di incubazione è giustificata dal fatto che ritenevamo interessante osservare gli effetti da esposizione acuta (2 giorni) e sub-cronica (7 giorni). Successivamente sono stati effettuati test *in vitro* su PBMC di bovino che permettono di tener conto anche dell'effetto dovuto alla variabilità inter-individuale, potendo utilizzare più animali donatori contemporaneamente. In seguito il β -HCH è stato testato anche su una linea cellulare umana, le cellule linfocitarie Jurkat, linfoblasti T (linee immortali) utilizzati, nella ricerca medica, per determinare i meccanismi alla base della diversa suscettibilità a forme di cancro causate da fumo e radiazioni e di osservare la risposta ad

inquinanti ambientali (Luongo *et al.*, 2006; Severino *et al.* 2006; McDermott *et al.*, 2008; Graillot *et al.*, 2012).

3.2.Colture Cellulari

3.2.1. PBMC di bovino

Le PBMC di bovino sono state separate da sangue intero ottenuto da 4 animali donatori (manze di 15-17 mesi) tutti in buono stato di salute e a distanza di oltre 4 mesi dal previsto parto. La separazione è avvenuta attraverso un protocollo che prevede la stratificazione su Ficoll (Lacetera *et al.*, 2002):

- il sangue è stato stratificato su Ficoll e centrifugato a 717 x g, a 18°C, per 45 minuti;
- sono stati raccolti i leucociti stratificati ed è stato effettuato un lavaggio in PBS seguito da una centrifugazione a 613 x g per 15 min a 4°;
- dopo aver eliminato il surnatante si procede con l'emolisi aggiungendo 1 ml di H₂O ultra pura (ASTM Type I) per 30 secondi e si porta a volume fino a 20 ml con PBS sterile;
- si effettua una centrifugazione a 613 x g per 15 min a 4°C;
- dopo aver eliminato il surnatante, il pellet di cellule viene risospeso in terreno e le cellule vengono contate mediante il metodo di esclusione del Trypan Blue (TBE); prima della semina in piastre da 24 o 96 pozzetti, in base al test da effettuare, le cellule vengono opportunamente diluite in RPMI 1640 con il 10% di Fetal Bovine Serum (FBS), 2 mM glutamina, 100 UI/ml penicillina e con 100 µg/ml streptomicina.

3.2.2. Cellule linfocitarie umane Jurkat

Le cellule umane linfocitarie Jurkat (SIGMA Aldrich, Italia) sono state fatte crescere in sospensione in fiasche da 75 cm² su un terreno completo composto da RPMI 1640 con il 10% di FBS, 2 mM glutamina, 100 UI/ml penicillina e 100 µg/ml streptomicina e mantenute in coltura in atmosfera umidificata a 37° C in presenza di CO₂ al 5%. Per il mantenimento il terreno è stato sostituito ogni tre giorni, effettuando un lavaggio in

PBS. Per l'allestimento dei saggi le cellule Jurkat sono state seminate in piastre multiwell da 96 o 24 pozzetti in base al test da effettuare.

Entrambi i sistemi cellulari modello sono stati trattati per 2 e 7 giorni con β -HCH alle seguenti concentrazioni: 0,1-1-10-100-1000 μ M e successivamente sottoposte ai test *in vitro*.

3.3. Test in vitro

3.3.1. Conta cellulare mediante il metodo di esclusione del Trypan Blue (TBE assay)

La conta cellulare è stata effettuata tramite il metodo di esclusione del Trypan blue (TB) un colorante in grado di entrare selettivamente solo nelle cellule morte, il motivo per cui questo colorante non entra nelle cellule vive è da ricercarsi nell'estrema selettività della membrana cellulare, le cellule vitali, infatti, avendo la membrana intatta, non permettono la penetrazione del TB nel citoplasma. Le cellule sono state seminate in piastre da 24 pozzetti (1×10^6 cell/ml PBMC; 5×10^4 cell/ml Jurkat) ed incubate per 2 e 7 giorni in presenza dei diversi trattamenti. La conta è stata effettuata utilizzando un contatore cellulare automatizzato (Countess® Automated Cell Counter, Invitrogen). Il numero delle cellule è stato poi normalizzato in percentuale ponendo il controllo come il 100% e i trattati in percentuale rispetto al controllo.

3.3.2. Determinazione di vitalità/tossicità: saggio XTT

Il test XTT è un test citotossicologico che consente di valutare, *in vitro*, la capacità di certe sostanze di interferire sulla vitalità cellulare. Il test, di tipo colorimetrico, si basa sulla riduzione del 2,3-bis(2-methoxy-4-nitro-5-Sulfophenyl)-5-[(phenylamino)carbonyl]-2Htetrazolium hydroxide (XTT) in formazano, un composto solubile in acqua di colore arancione direttamente quantificabile allo spettrofotometro. La riduzione del XTT avviene all'interno della cellula ed è operata da enzimi, pertanto richiede cellule metabolicamente attive (cellule morte infatti non sono in grado di effettuare tale riduzione), il quantitativo di formazano prodotto riflette

la attività metabolica cellulare (Gerlier e Thomasset, 1986). Per il test XTT è stato utilizzato il kit Cell Proliferation Kit II (Roche Diagnostics, Switzerland).

Le cellule sono state seminate in piastre da 96 pozzetti (1×10^6 cell/ml PBMC; 5×10^4 cell/ml Jurkat) ed incubate per 2 e 7 giorni in presenza dei diversi trattamenti.

Alla fine dell'incubazione sono stati aggiunti 50 μ l/ pozzetto di XTT (0,3 mg/ml) e incubati per 24h. In seguito l'assorbanza è stata misurata a 450 e 650 nm (lunghezza d'onda di riferimento) con un lettore di piastre Sunrise plate Reader (TECAN, Switzerland) (Scudiero et al., 1988)

3.3.3. Determinazione dell'attività proliferativa: saggio dell'incorporazione della bromo-desossiuridina (BrdU)

E' un saggio colorimetrico quantitativo che misura l'incorporazione della bromodesossiuridina (BrdU), un analogo della timina, durante la fase S del ciclo cellulare. Anticorpi anti-BrdU vengono utilizzati per rilevare le cellule che hanno incorporato la BrdU.

Le PBMC sono state seminate in piastre da 96 pozzetti (1×10^6 cellule/ml) in presenza dei diversi trattamenti per 2 e 7 giorni. Le PBMC sono state stimulate con due diversi mitogeni: Concanavalina A (ConA; 1,25 μ g/ml) o Pokeweed (PWM; 0,02 μ g/ml) per stimolare le differenti sotto popolazioni cellulari facenti parte della nostra coltura cellulare. A fine incubazione la funzionalità cellulare è stata misurata mediante il kit Cell Proliferation Biotrack ELISA System, version 2 (GE Healthcare) secondo il protocollo fornito dal kit.

L'assorbanza, a 450 nm, è stata misurata attraverso un lettore di piastre Sunrise plate Reader (TECAN, Switzerland).

3.3.4. Test di citotossicità LDH

La lattato deidrogenasi (LDH), è un enzima citosolico presente nella maggior parte delle cellule eucariotiche, il rilascio di questo enzima nel mezzo di coltura è conseguente ad un danno alla membrana plasmatica che, *in extremis*, porta alla lisi della cellula. L'incremento dell'attività dell'LDH nel mezzo di coltura è proporzionale al numero di cellule che subiscono la lisi. A tale fine, sarà utilizzato il Cytotoxicity

Detection Kit PLUS (LDH) (Roche Diagnostic, GmbH, Germany) che permette la misurazione, con metodo colorimetrico, dell'attività dell'LDH attraverso due reazioni che portano alla formazione del formazano a partire dal sale di tetrazolio quando l'LDH è presente nel mezzo di coltura. In particolare nella prima reazione enzimatica l'enzima LDH riduce il NAD^+ a $\text{NADH} + \text{H}^+$ attraverso l'ossidazione del lattato a piruvato; nella seconda reazione l'enzima diaforasi catalizza l'ossidazione del NADH in NAD. L'idrogeno liberato nel corso di questa reazione viene trasferito al sale di tetrazolio e si ottiene il formazano che presenta una colorazione rossa, rilevabile attraverso una lettura in assorbanza a 490 nm. Il test è stato condotto direttamente in micropiastre, le cellule sono state seminate in piastre da 96 pozzetti (1×10^6 cell/ml PBMC; 5×10^4 cell/ml Jurkat) ed incubate per 2 o 7 giorni in presenza dei diversi trattamenti (β -HCH 0,1-1000 μM). I risultati del test sono stati determinati mediante un lettore di micropiastre Sunrise plate Reader (TECAN, Switzerland).

3.3.5. Quantificazione delle Specie Reattive all'Ossigeno (ROS) mediante il test della Diclorofluoresceina Diacetato (DCFH-DA)

La valutazione dell'eventuale insorgenza di stress ossidativo cellulare è stata effettuata misurando i livelli cellulari di Specie Reattive all'Ossigeno (ROS) utilizzando la 2'-7'-diclorofluoresceina diacetato. Questo composto diffonde attraverso le membrane all'interno della cellula dove viene deacetilata da esterasi intracellulari che la riducono in diclorofluoresceina (DCFH), un composto più idrofilo e non fluorescente. In presenza di ROS la DCFH viene rapidamente ossidata nel composto fluorescente DCF (Fig. 8).

La DCF-DA (Sigma Aldrich) è stata solubilizzata in DMSO e successivamente diluita in PBS alla concentrazione finale di 20 μM (Degli Esposti, 2002; Fernández-Blanco et al., 2014). Le cellule sono state seminate in piastre da 96 pozzetti (1×10^6 cell/ml PBMC; 5×10^4 cell/ml Jurkat) ed incubate per 2 o 7 giorni in presenza dei diversi trattamenti (β -HCH 0,1-1000 μM oltre ad un controllo positivo con H_2O_2 0,1 μM). A fine incubazione con i trattamenti è stata aggiunta la DCF-DA (20 μM) ed incubata per 40 minuti a 37/39°C, successivamente la quantità di ROS intracellulari è stata misurata in fluorescenza ($\lambda_{\text{ex}}/\lambda_{\text{em}}$: 485/535) tramite un lettore di piastre Multimode Detector DTX 880 (Beckman Coulter).

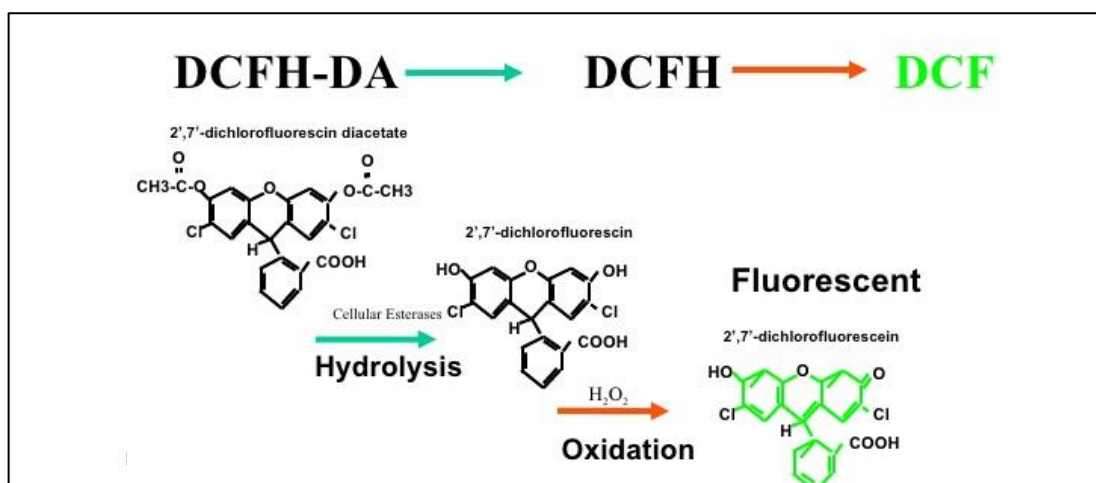


Figura 8: meccanismo di funzionamento della diclorofluoresceina diacetato (DCF-DA) utilizzato per rilevare le specie reattive all'ossigeno (ROS) intracellulari.

3.3.6. *Quantificazione dell'attività dei principali enzimi di detossificazione quali Superossido Dismutasi (SOD), Catalasi (CAT), Glutathione Perossidasi (GPx), Glutathione-S-trasferasi (GST) e quantificazione del Glutathione ridotto (GSH)*

L'attività degli enzimi di detossificazione Superossido dismutasi (SOD), Catalasi (CAT), Glutathione perossidasi (GPx), Glutathione-S-trasferasi (GST) e la quantificazione del Glutathione ridotto (GSH) è stata misurata attraverso test colorimetrici. Le cellule sono state seminate in piastre da 24 pozzetti (2×10^6 cell/ml per le PBMC; 2×10^5 cells/ml per le Jurkat) ed esposte ai trattamenti con β -HCH (0,1-1000 μ M) per 2 e 7 giorni. Alla fine dell'incubazione le cellule sono state centrifugate a 2000 x g per 10 minuti e successivamente, dopo aver scartato il surnatante, le cellule sono state risospese in 0.2 ml di Assay Buffer e sonicate a 100 watt per 2 minuti.

È stata quindi effettuata una centrifugazione a 10.000 x g per 15 min' a 4°C. I surnatanti sono stati analizzati subito oppure conservati a -80°C. I test sono stati effettuati in accordo con le indicazioni fornite dai rispettivi kit: Superoxide Dismutase (SOD) Activity Assay Kit, Glutathione Peroxidase (GPx1) Activity Assay Kit, GST Colorimetric Activity Assay Kit e ApoGSH Glutathione colorimetric detection kit (BioVision Incorporated Milpitas, CA, USA). L'assorbanza è stata misurata per la SOD a 450 nm, per il GPx1 e il GST a 340 nm e per il GSH a 405 nm mediante un lettore di micropiastre Sunrise plate Reader (TECAN, Switzerland).

3.3.7. Quantificazione dell'espressione degli mRNA dei principali enzimi di detossificazione quali Superossido dismutasi (SOD), Catalasi (CAT), Glutazione perossidasi (GPx), Glutazione-S-trasferasi (GST) mediante la tecnica della Real Time PCR (rt-PCR).

La quantificazione relativa dell'espressione genica della SOD, della CAT del GPx e del GST è stata condotta mediante rt-PCR utilizzando come sonda per la quantificazione il SYBR-GREEN. Nelle PBMC bovine è stato utilizzato come gene di controllo (housekeeping gene) il gene Rps9 codificante per una proteina ribosomiale, che risulta essere tra i più stabili nell'espressione genica (*Janovick-Guretzky et al., 2007*), invece, per le cellule Jurkat, è stato utilizzato l'housekeeping gene della β -actina, proteina che costituisce il citoscheletro delle cellule. Le cellule (2×10^6 cellule totali sia per le PBMC che per le Jurkat) dopo essere state esposte ai trattamenti sono state centrifugate (1500 rpm, 10 minuti) ed i pellets sono stati processati subito oppure conservati a -80°C .

L'mRNA totale è stato estratto mediante QIAzol (QIAGEN) secondo protocollo (QIAzol® Handbook) e successivamente quantificato mediante il kit Quant-iT RNA assay (Invitrogen). La retro- trascrizione in cDNA è stata effettuata mediante il kit QuantiTect Reverse Transcription (QIAGEN). È stata poi effettuata la rt-PCR utilizzando il SensiMix Capillary kit (BIOLINE) e lo strumento LightCycler 2.0 (Roche). I primers utilizzati sono riportati nella Tabella 4.

Tabella 4: Sequenze dei *primers* utilizzati per la rt-PCR.

PBMC Bovino			
<i>Gene</i>	<i>Primer sense</i>	<i>Primer antisense</i>	<i>Cod. gene</i>
Rps9	5'-GGCGGCTCGTCCGTATC-3'	5'-AATCTTCAGGCCCAGGATGTAATC-3'	XN_864261**
CAT	5'-GAACTGTCCCTACCGT-3'	5'-TCGTTGGCACTGTTGA-3'	<i>Mathy-Hartert et al., 2008</i>
Gpx	5'-CTTCCCCTGCAACCAGTTTG-3'	5'-GGCAATTCAGGATCTCCTCGTT-3'	NM_174076**
GST	5'-AATGGACGTGGCAGAATGGAGT-3'	5'-GGGCACAGTGGTAAATGCATGA-3'	NM_177515**
SOD Cu/Zn	5'-GAAGAGAGGCATGTTGGAGA-3'	5'-CCAATTACACCACGAGCCAA-3'	NM_174615**
Cellule umane Jurkat			
β-Actina	5'-CCTGGCACCCAGCACAAAT-3'	5'-GGGCCGGACTCGTCATAC-3'	NM_001101**
CAT	5'-TTTCCCAGGAAGATCCTGAC-3'	5'-ACCTTGGTGAGATCGAATGG-3'	NM_001752**
Gpx	5'-CAGTCGGTGTATGCCTTCTCG-3'	5'-GAGGGACGCCACATTCTCG-3'	41406081c1***
GST	5-CCTGTACCAGTCCAATACCATCCT-3	5-CCTGCTGGTCCTTCCCATAG-3	NM_000852**
SOD Cu/Zn	5'-AGGCCCTTAACATCATCT-3'	5'-CTACAGGTACTTTAAAGCAACTCT-3'	NM_000454**

Database: **RT primer; ***PrimerBank

3.3.8 Elaborazione statistica dei risultati.

La significatività statistica tra il valore medio dei dati, in ciascun esperimento, è stata valutata utilizzando il software SATISTICA 7 tramite ANOVA seguita da confronto multiplo con il test post-hoc Fisher LSD e un livello di significatività $P < 0,05$.

CAPITOLO 4

RISULTATI

4.1.PBMC di bovino

I risultati ottenuti dai test *in vitro* effettuati su PBMC bovine esposte per 2 e 7 giorni al β -HCH 1000 μ M hanno mostrato una diminuzione dell'attività metabolica risultante dal test XTT, una riduzione del numero di cellule vive rispetto al controllo (test TBE) (Fig. 9) ed una diminuzione del potenziale proliferativo cellulare risultante dal test d'incorporazione della BrdU, sia per le cellule stimulate con il mitogeno ConA che con il PWM (Tab. 4). Al contrario, per le concentrazioni più basse di β -HCH (0,1-1, 10, 100 μ M), il quadro risulta essere più complesso. I risultati del test del TBE non hanno mostrato differenze significative tra controlli e trattati (β -HCH 0,1-100 μ M) sia a 2 che a 7 giorni di incubazione (Fig. 9-A). L'attività metabolica (Test XTT) delle PBMC, dopo 2 giorni di incubazione, non ha subito cambiamenti significativi, tranne che nelle PBMC trattate con β -HCH 1 μ M, in cui è stato osservato un aumento dell'attività metabolica sia dal test XTT (Fig. 9-B), che dal rapporto XTT/TBE (attività metabolica per singola cellula) (Fig. 9-C). Al tempo di incubazione di 7 giorni, invece, l'attività metabolica diminuisce in modo dose-dipendente (Fig. 9-B,C). Lo stesso risultato è stato osservato dal test della BrdU sulle PBMC stimulate con il mitogeno ConA, che hanno mostrato una diminuzione dose-dipendente a 7 giorni di incubazione con β -HCH, mentre, le cellule stimulate con il mitogeno PWM, mostrano una diminuzione dell'attività proliferativa dose-dipendente solo al tempo di incubazione di 2 giorni (Tab. 4).

La differente risposta delle PBMC di bovino esposte ai diversi mitogeni ci porta a formulare l'ipotesi che, essendo le PBMC una popolazione cellulare eterogenea ed avendo i mitogeni proprietà stimolatorie diverse verso le differenti popolazioni cellulari, i risultati contrastanti potrebbero dipendere proprio dalla diversa risposta delle PBMC in base al mitogeno (Neri *et al.*, 1973; Mellstedt, 1975). Infine dai

risultati del test LDH non sono state osservate differenze significative tra controlli e trattati anche sulle PBMC trattate con il β -HCH 1000 μ M (Tab. 5).

A partire da questi risultati preliminari, è stato ipotizzato un aumento dello stress ossidativo nelle cellule esposte a β -HCH, supportata sia da alcuni studi che dimostrano che un incremento di anione superossido (O_2^-) può portare una riduzione dell'attività mitocondriale (*Shimamura et al., 2000; Wang et al., 2011*), sia da altri studi in cui è stato osservato che cellule esposte ad altri pesticidi, incluso il Lindano, mostrano un incremento delle specie reattive all'ossigeno (ROS) (*Lowy et al., 1977; Bagchi and Stohs, 1993; Ahmed et al., 2011*).

Gli studi successivi, quindi, hanno avuto l'obiettivo di andare a misurare i ROS intracellulari e l'espressione genica dei principali enzimi di detossificazione che la cellula ha a disposizione per fronteggiare l'aumento dello stress ossidativo intracellulare.

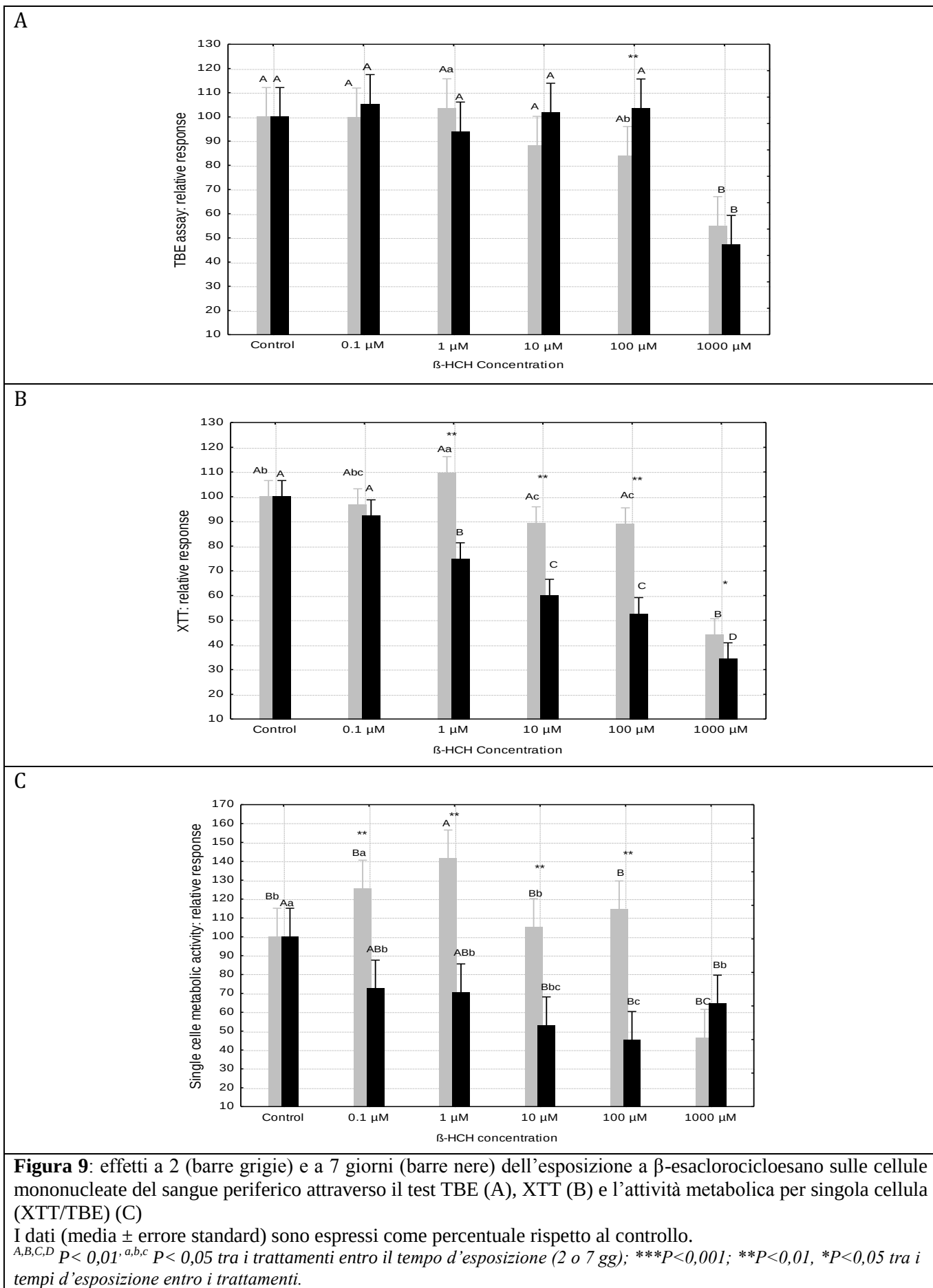


Tabella 4: effetti a 2 e 7 giorni dell'esposizione a β -esaclorocicloesano sulle cellule mononucleate del sangue periferico di bovino attraverso il test BrdU

Mitogeno PWM	Concentrazioni β -HCH					
	Controllo	0,1 μ M	1 μ M	10 μ M	100 μ M	1000 μ M
2 gg	100 $\pm$ 8,7 ^A	82,4 $\pm$ 4,1 ^{aB}	72,5 $\pm$ 4,2 ^B	68,1 $\pm$ 4,1 ^{BbC}	57,0 $\pm$ 2,6 ^{Cc}	12,6 $\pm$ 2,6 ^D
7 gg	100 $\pm$ 3,2 ^A	106,7 $\pm$ 2,9 ^{Aa}	108,9 $\pm$ 2,5 ^{Aa}	106,9 $\pm$ 2,1 ^{Aa}	95,0 $\pm$ 10,1 ^{Ab}	5,7 $\pm$ 0,5 ^B
Effetto tempo		**	**	**	**	

Mitogeno Con A	Concentrazioni β -HCH					
	Controllo	0,1 μ M	1 μ M	10 μ M	100 μ M	1000 μ M
2 gg	100 $\pm$ 7,5 ^B	109,1 $\pm$ 3,5 ^B	105,9 $\pm$ 3,5 ^B	111,1 $\pm$ 4,9 ^{ABb}	127,9 $\pm$ 7,1 ^{Aa}	64,4 $\pm$ 8,8 ^C
7 gg	100 $\pm$ 4,5 ^a	104,1 $\pm$ 2,8 ^{Aa}	95,5 $\pm$ 2,6 ^{ab}	94,5 $\pm$ 1,9 ^{ab}	85,7 $\pm$ 3,5 ^{Bb}	86,7 $\pm$ 9,1 ^b
Effetto tempo				*	**	**

β -HCH: β -esaclorocicloesano; **ConA:** concanavalina A; **PWM:** pokeweed.

I dati (media $\pm$ errore standard) sono espressi come percentuale rispetto al controllo.

^{A,B,C,D} $P < 0,01$; ^{a,b,c} $P < 0,05$ tra i trattamenti entro il tempo d'esposizione (2 o 7 gg); *** $P < 0,001$; ** $P < 0,01$,

* $P < 0,05$ tra i tempi d'esposizione entro i trattamenti.

Tabella 5: effetti a 2 e 7 giorni dell'esposizione a β -esaclorocicloesano sulle cellule mononucleate del sangue periferico di bovino attraverso il test LDH.

LDH	Concentrazioni β -HCH						
	Controllo	0,1 μ M	1 μ M	10 μ M	100 μ M	1000 μ M	High Control ¹
Tempo							
2 gg	100 $\pm$ 1,6 ^C	104,1 $\pm$ 2,4 ^{BC}	100,2 $\pm$ 1,6 ^{BC}	105,8 $\pm$ 1,2 ^{BC}	105,4 $\pm$ 1,7 ^{BC}	103,2 $\pm$ 0,8 ^{BC}	113,1 $\pm$ 2,3 ^A
7 gg	100 $\pm$ 1,9 ^{BC}	97,7 $\pm$ 0,9 ^{BC}	95,1 $\pm$ 1,7 ^C	102,1 $\pm$ 1,6 ^B	101,6 $\pm$ 0,9 ^B	100 $\pm$ 1,9 ^{BC}	127,1 $\pm$ 3,2 ^A
Effetto Tempo		**	*				**

β -HCH: β -esaclorocicloesano;

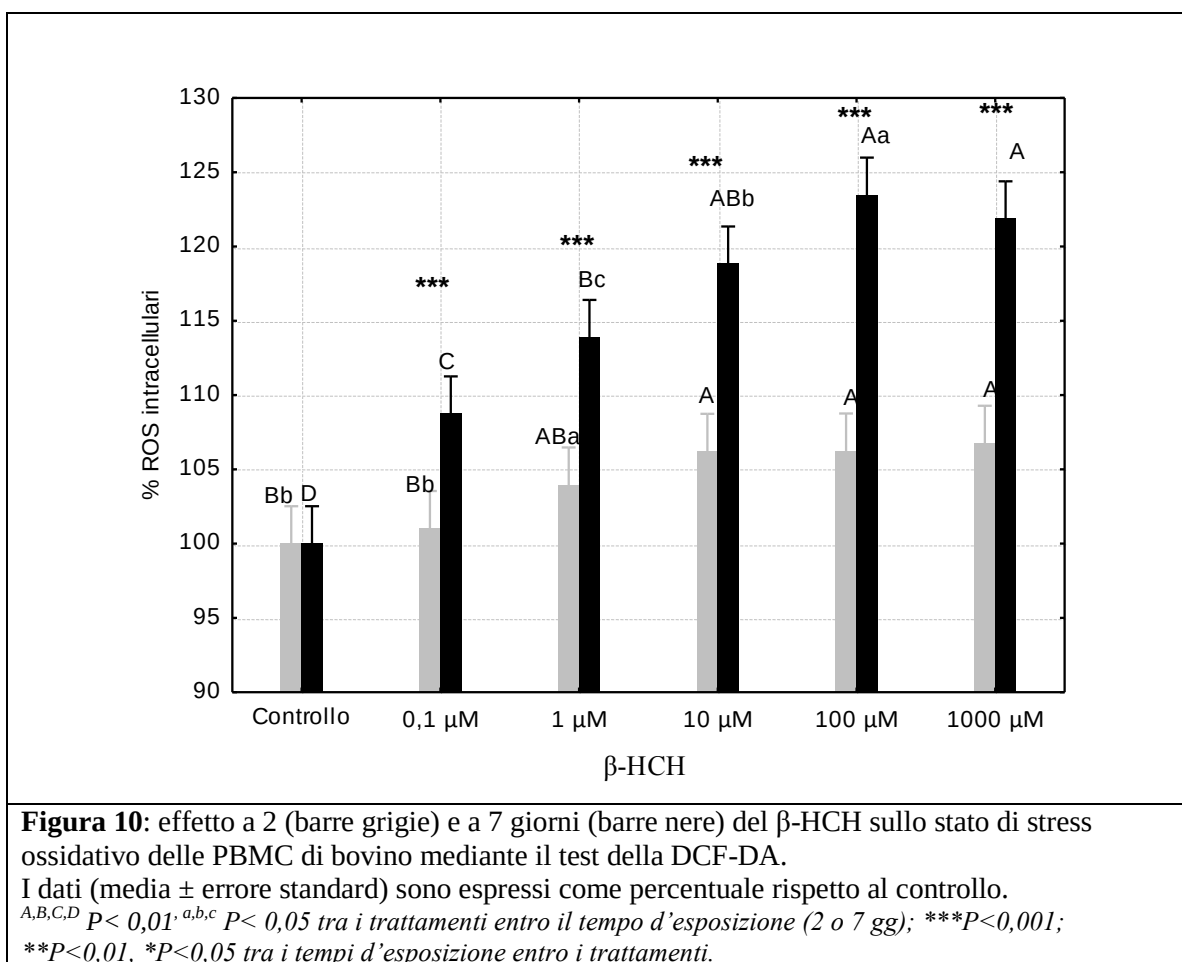
I dati (media $\pm$ errore standard) sono espressi come percentuale rispetto al controllo.

¹Determina il massimo rilascio di LDH nella linea cellulare in uso.

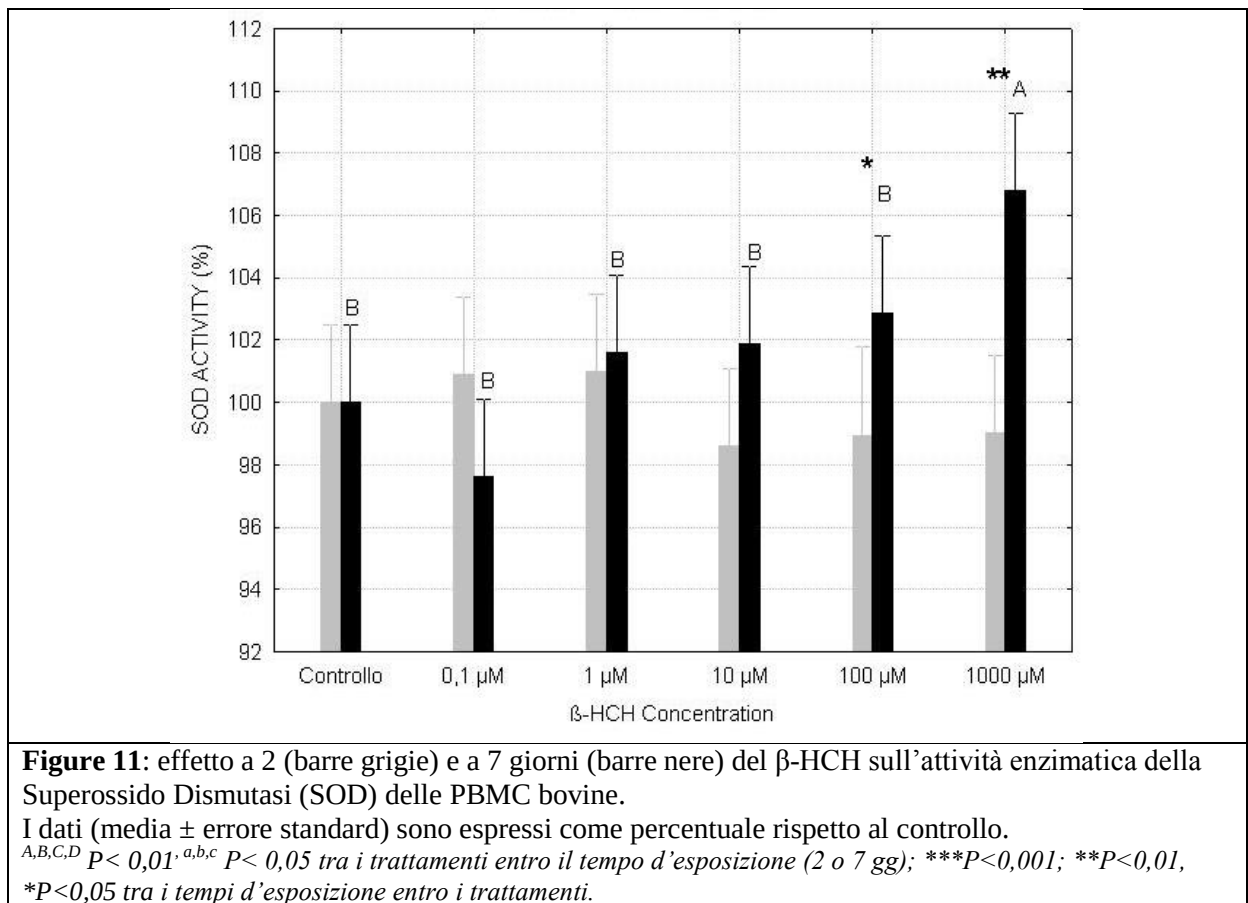
^{A,B,C,D} $P < 0,01$; ^{a,b,c} $P < 0,05$ tra i trattamenti entro il tempo d'esposizione (2 o 7 gg); *** $P < 0,001$; ** $P < 0,01$,

* $P < 0,05$ tra i tempi d'esposizione entro i trattamenti.

Dai risultati ottenuti dal test della DCF-DA è stato osservato che, le PBMC esposte al β -HCH, sia a 2 che a 7 giorni, hanno mostrato un aumento dose-dipendente dei ROS intracellulari rispetto al controllo. In particolare dopo 2 giorni d'incubazione è stato osservato un aumento dei ROS nelle PBMC esposte al β -HCH a partire dalla concentrazione di 1 μ M ($P < 0,05$), mentre dopo 7 giorni d' incubazione anche le cellule esposte al livello più basso tra quelli testati (0,1 μ M) hanno mostrato un aumento significativo ($P < 0,01$) dei ROS intracellulari (Fig. 10).

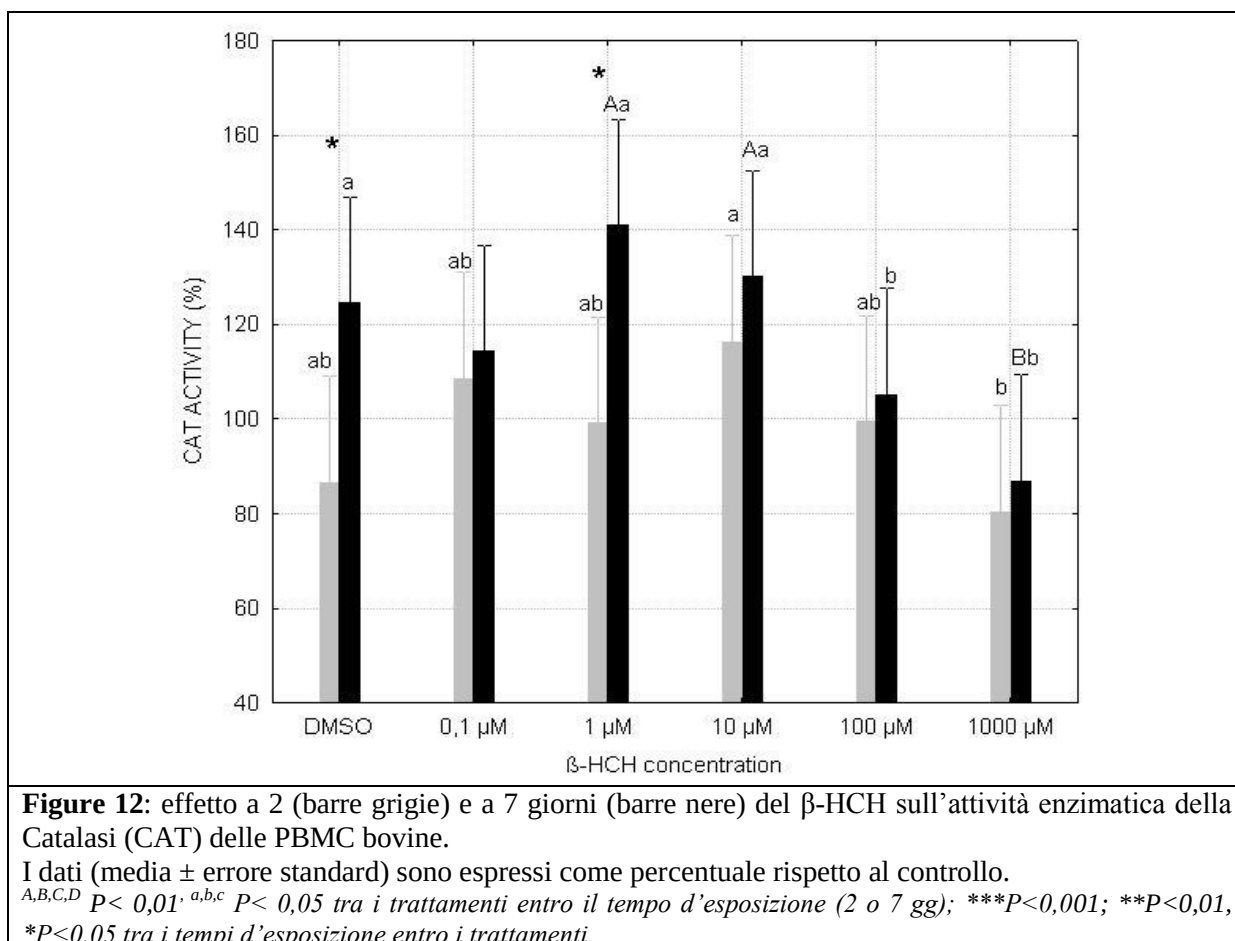


A partire da questi risultati è stata monitorata l'attività enzimatica dei principali enzimi di detossificazione quali la SOD, la CAT, la GST e la GPx. Dai risultati ottenuti si può osservare che l'attività enzimatica della SOD dopo 2 giorni di incubazione non ha mostrato cambiamenti rispetto al controllo, mentre, dopo 7 giorni di incubazione, è stato osservato solo un significativo aumento ($P < 0.01$) dell'attività enzimatica nelle PBMC esposte al β -HCH 1000 μ M. Inoltre, tra i due tempi di esposizione, è stata osservata una differenza significativa alle concentrazioni 100 e 1000 μ M, in particolare ad entrambe le concentrazioni dopo 7 giorni di incubazione l'attività della SOD risulta essere maggiore rispetto al tempo più breve di incubazione (Fig. 11).

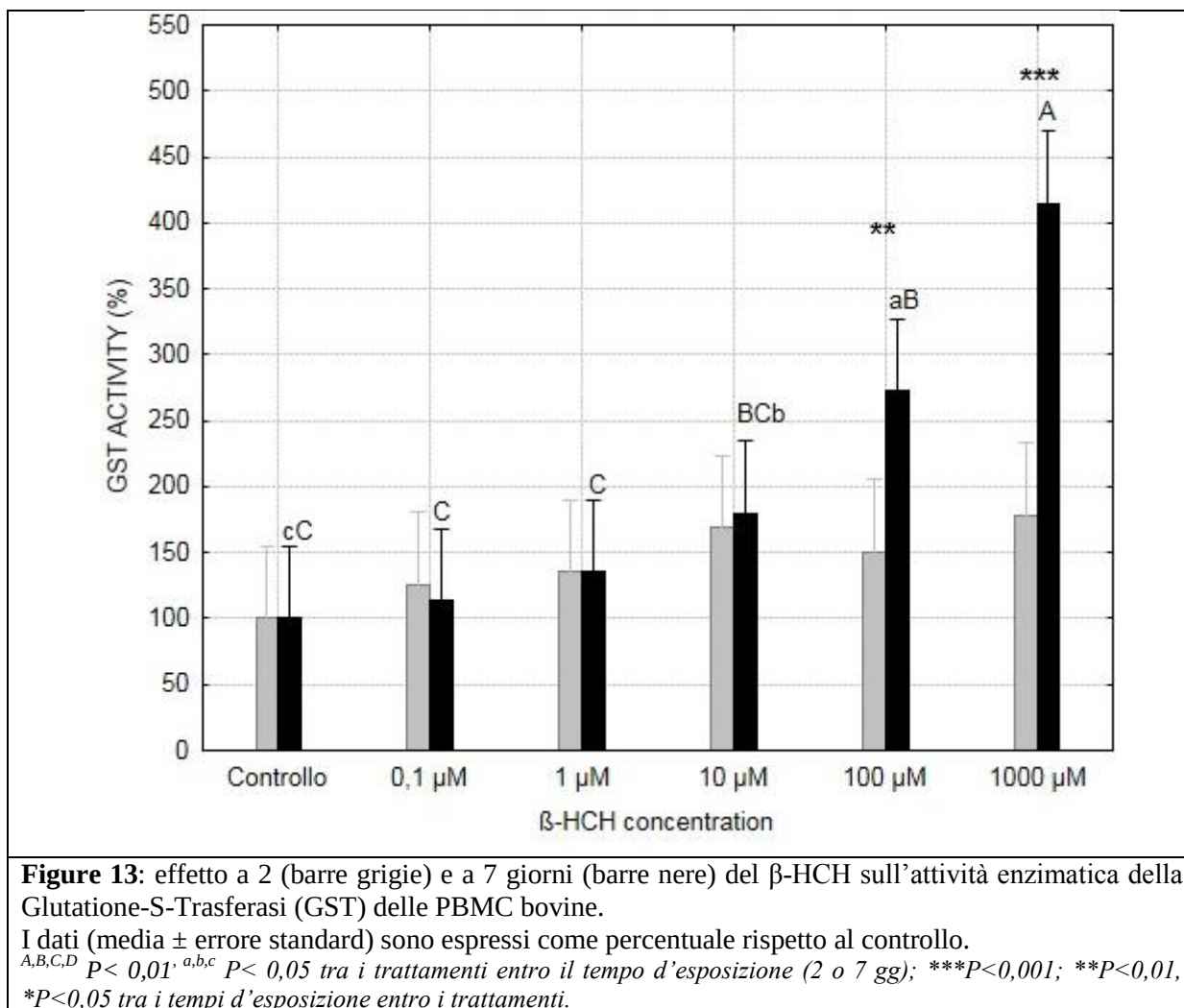


L'attività enzimatica della CAT, dopo 2 giorni di incubazione, risulta essere maggiore nelle PBMC esposte a β -HCH 10 μ M rispetto a 1000 μ M ($P < 0,05$), ma non rispetto al controllo. Al contrario, dopo 7 giorni di esposizione, la situazione risulta essere più complessa. Le cellule

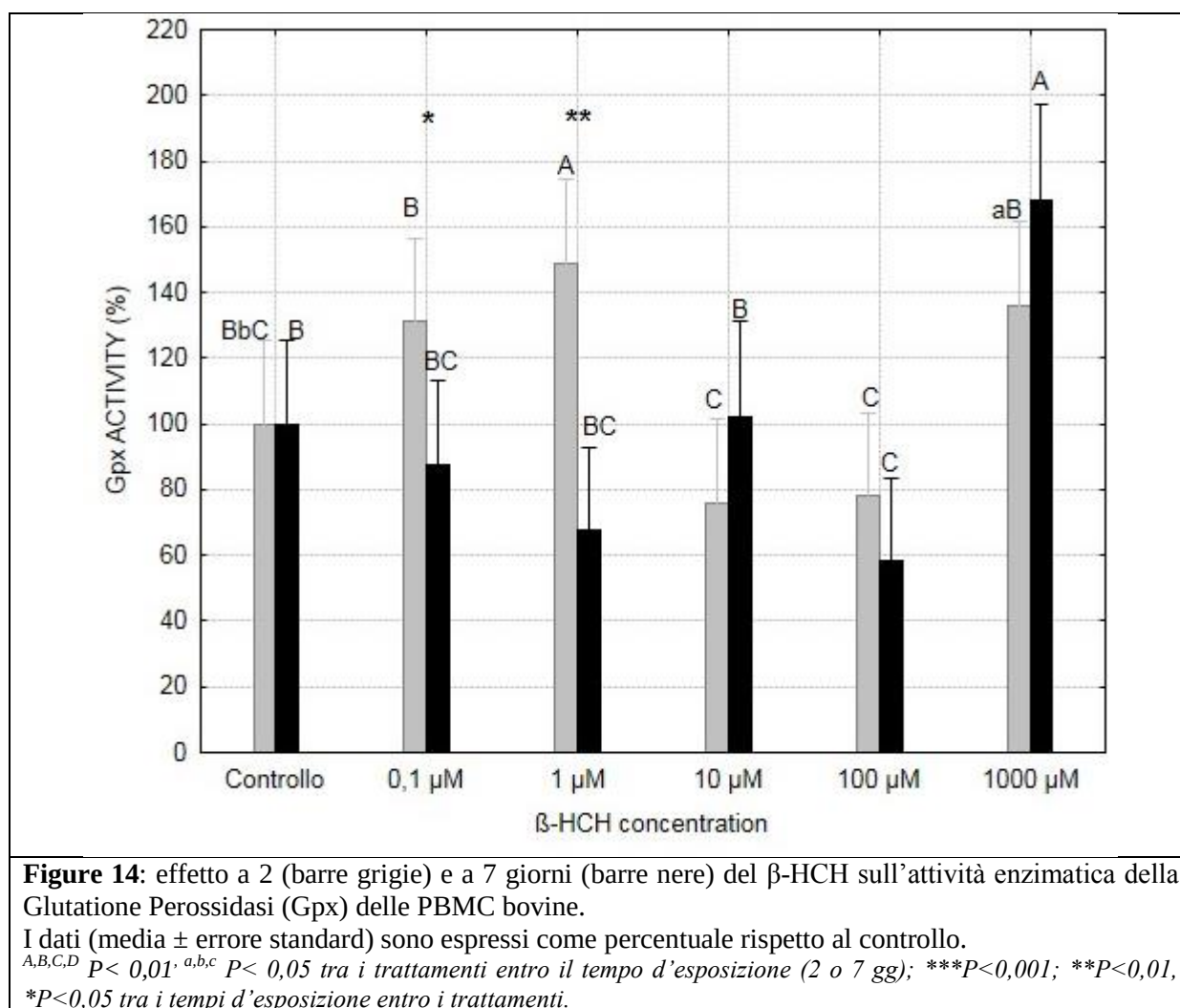
esposte a β -HCH 100 e 1000 μ M hanno mostrato un'attività enzimatica minore per la CAT rispetto al controllo, mentre nelle cellule esposte a β -HCH 1 μ M è stato osservato un lieve aumento, anche se non significativo, dell'attività della CAT. Tra i due tempi di incubazione, alla concentrazione 1 μ M, è stata osservata un'attività significativamente maggiore ($P < 0,05$) della CAT al tempo di incubazione di 7 giorni rispetto a 2 giorni (Fig. 12)



L'attività enzimatica della GST nelle PBMC esposte a β -HCH non risulta essere modulata dopo 2 giorni di incubazione, mentre, dopo 7 giorni di incubazione, è stato osservato un aumento dell'attività enzimatica nelle cellule esposte a β -HCH 100 e 1000 μ M. Inoltre, tra i tempi di incubazione, è stato osservato un significativo aumento dell'attività enzimatica a 7 giorni rispetto a 2 giorni, nelle cellule esposte al β -HCH 100 e 1000 μ M, confermando lo stesso andamento osservato per la SOD (Fig. 13).



Le analisi effettuate per monitorare l'attività enzimatica della Gpx hanno mostrato, dopo 2 giorni di incubazione, un aumento dell'attività enzimatica nelle PBMC esposte a β-HCH 0,1 e 1 µM, mentre, alle concentrazioni 10 e 1000 µM, è stata osservata una diminuzione dell'attività della Gpx. Dopo 7 giorni di incubazione, le cellule esposte a β-HCH 1000 µM, hanno mostrato un aumento dell'attività enzimatica, mentre nelle PBMC esposte a β-HCH 100 µM è stata osservata una diminuzione dell'attività enzimatica. L'attività enzimatica, alle concentrazioni 0,1 e 1 µM, risulta essere significativamente ($P < 0,05$) maggiore a 2 giorni d'esposizione rispetto a 7 giorni (Fig. 14).



A partire da questi risultati è stata monitorata l'espressione genica dei principali enzimi deputati alla detossificazione, in particolare, dai risultati ottenuti mediante rt-PCR (Tab. 6), non sono state rilevate differenze significative tra controlli e trattati, dopo 2 giorni di incubazione, mentre a 7 giorni d'incubazione è stato rilevato un aumento significativo ($P < 0,01$) dell'mRNA per SOD, GPx e CAT nelle cellule trattate con β-HCH 1000 µM e per la CAT, GST e GPx anche nelle cellule trattate con β-HCH a 100 µM ($P < 0,05$) (Tab. 6). Questi risultati consentono di affermare che l'esposizione al β-HCH induce, nelle PBMC di bovino, un aumento dei ROS intracellulari, sia a 2 che a 7 giorni di esposizione. Gli effetti sulla trascrizione genica, invece, si osservano solo a tempi lunghi di esposizione (7 gg) ed alle concentrazioni più alte (100-1000 µM), anche per gli enzimi come la SOD e la CAT che rappresentano la prima linea di difesa cellulare per lo stress ossidativo (Giovannini et al., 2006).

Tabella 6: Risultati della rt-PCR sulle PBMC bovine

mRNA SOD	β -HCH					
	0 μ M (Controllo)	0,1 μ M	1 μ M	10 μ M	100 μ M	1000 μ M
2 gg	100 $\pm$ 1,01	99,11 $\pm$ 1,76	100,94 $\pm$ 2,87	99,87 $\pm$ 2,38	102,61 $\pm$ 1,21	103,09 $\pm$ 1,16
7 gg	100 $\pm$ 3,03 ^B	98,29 $\pm$ 2,00 ^{Bb}	99,71 $\pm$ 1,36 ^B	101,00 $\pm$ 2,53 ^B	105,35 $\pm$ 1,25 ^{Ba}	112,93 $\pm$ 1,65 ^A
Effetto Tempo						**
mRNA CAT						
2 gg	100 $\pm$ 2,07	97,65 $\pm$ 2,73	98,62 $\pm$ 2,91	99,01 $\pm$ 3,21	102,04 $\pm$ 1,35	101,06 $\pm$ 0,68
7 gg	100 $\pm$ 3,06 ^{Bb}	98,19 $\pm$ 2,04 ^{Bb}	100,44 $\pm$ 1,98 ^{Bb}	102,15 $\pm$ 2,57 ^B	107,25 $\pm$ 0,65 ^{ABa}	109,38 $\pm$ 2,42 ^A
Effetto Tempo						*
mRNA GPX						
2 gg	100 $\pm$ 1,98	98,59 $\pm$ 2,74 ^b	109,42 $\pm$ 9,92 ^a	100,55 $\pm$ 2,26	104,61 $\pm$ 1,56	104,18 $\pm$ 1,30
7 gg	100 $\pm$ 4,25 ^{Bc}	98,00 $\pm$ 2,81 ^{Bc}	100,50 $\pm$ 2,94 ^{Bc}	103,62 $\pm$ 2,99 ^B	111,34 $\pm$ 1,35 ^{ABb}	119,54 $\pm$ 2,22 ^{Aa}
Effetto Tempo						**
mRNA GST						
2 gg	100 $\pm$ 3,16	100,27 $\pm$ 1,56	101,57 $\pm$ 4,17	104,38 $\pm$ 2,13	106,02 $\pm$ 2,73	105,04 $\pm$ 1,07
7 gg	100 $\pm$ 3,75 ^b	100,81 $\pm$ 2,76 ^b	100,30 $\pm$ 1,91 ^b	102,25 $\pm$ 1,55 ^{ab}	108,98 $\pm$ 3,44 ^a	99,84 $\pm$ 2,19 ^b
Effetto Tempo						

β -HCH: β -esaclorocicloesano;

I dati (media $\pm$ errore standard) sono espressi come percentuale rispetto al controllo.

^{A,B,C,D} $P < 0,01$; ^{a,b,c} $P < 0,05$ tra i trattamenti entro il tempo d'esposizione (2 o 7 gg); *** $P < 0,001$; ** $P < 0,01$,

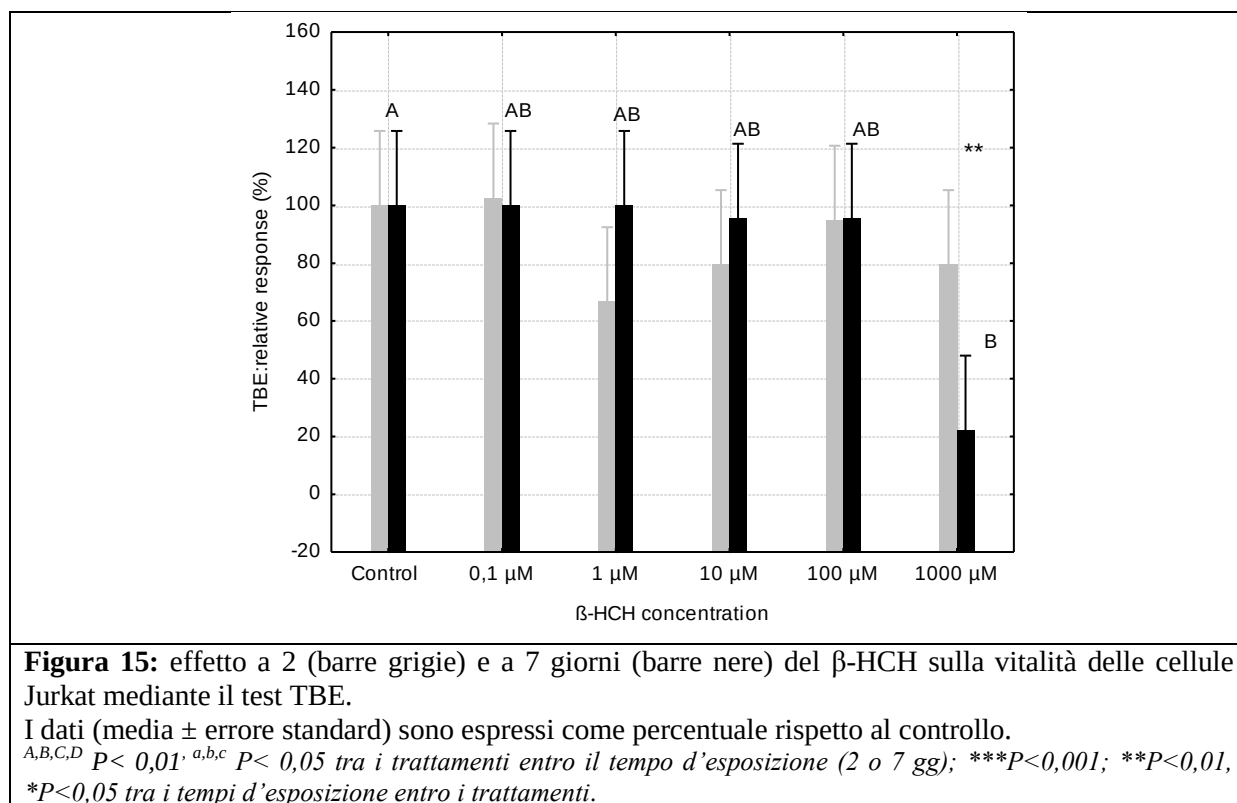
* $P < 0,05$ tra i tempi d'esposizione entro i trattamenti.

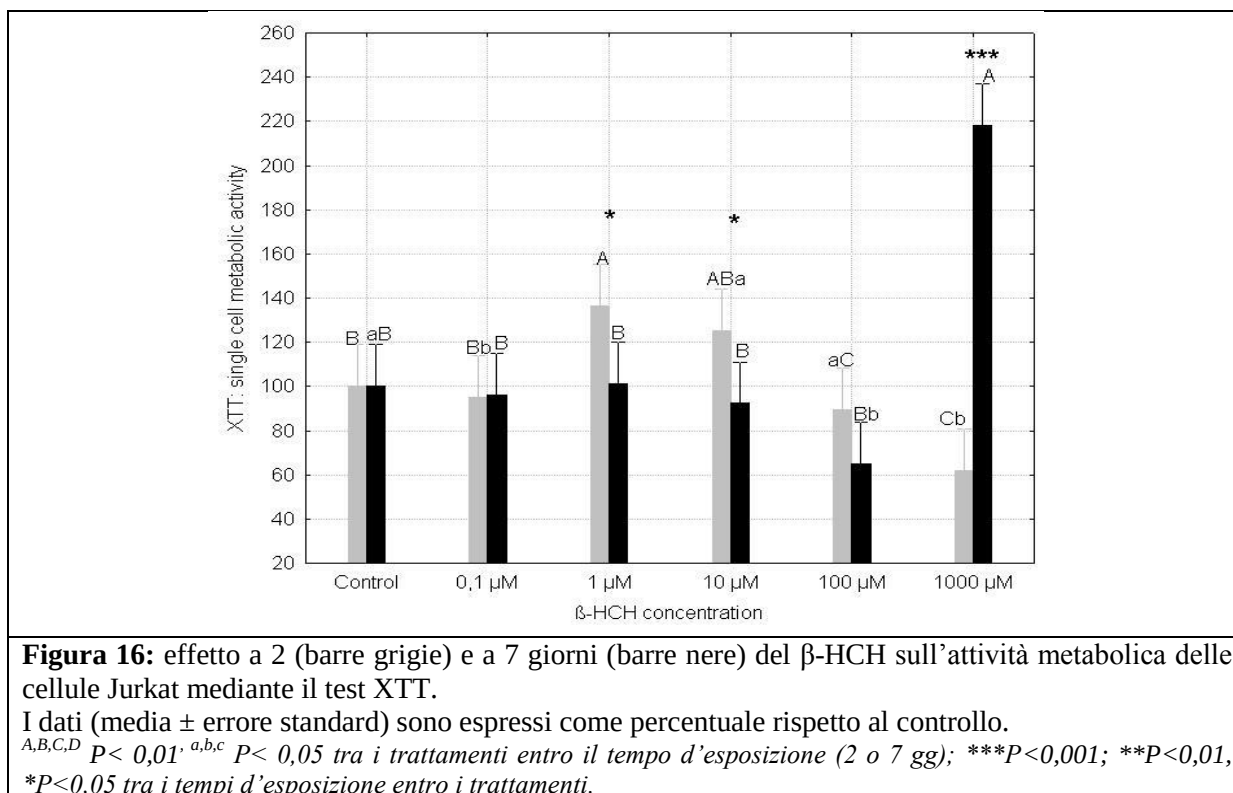
4.2. Cellule linfocitarie umane Jurkat

I risultati, ottenuti dai test *in vitro* effettuati sulle cellule linfocitarie umane Jurkat, hanno mostrato un incremento ($P < 0,01$) della mortalità cellulare (TBE test) solo nelle cellule esposte al β -HCH 1000 μM dopo 7 giorni di incubazione (Fig. 15)

I risultati ottenuti dal test XTT hanno mostrato, dopo 2 giorni di incubazione, un aumento significativo ($P < 0,01$) dell'attività metabolica nelle cellule esposte al β -HCH 1 μM , ed una significativa diminuzione ($P < 0,01$) dell'attività metabolica nelle cellule esposte al β -HCH alla concentrazione di 100 e 1000 μM . Dopo 7 giorni di incubazione, invece, è stata osservata una diminuzione dell'attività metabolica cellulare nelle Jurkat esposte a β -HCH 100 μM ed un significativo aumento dell'attività metabolica nelle Jurkat esposte alla concentrazione più alta (Fig. 16).

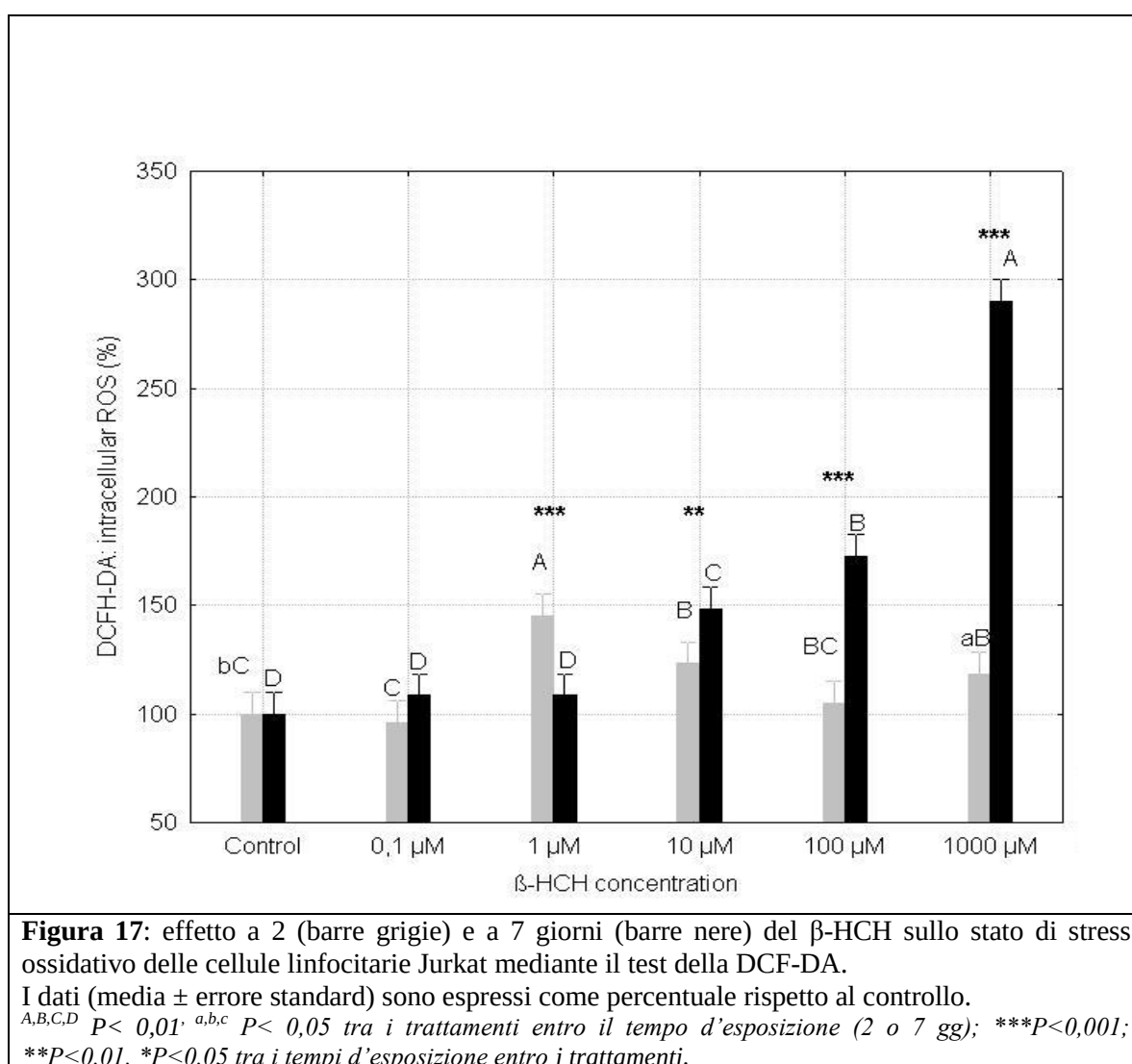
Infine, dai risultati ottenuti dal test LDH, non è stato osservato nessun cambiamento nel rilascio di LDH sia a 2 giorni che a 7 giorni di esposizione.





Sulla base dei risultati preliminari precedentemente descritti e anche sulla base dei risultati ottenuti sulle PBMC bovine, anche sulle Jurkat sono stati effettuati il test della DCF-DA per quantificare i livelli di specie reattive all'ossigeno e successivamente è stata monitorata sia l'attività enzimatica che l'espressione genica dei principali enzimi di detossificazione (SOD, CAT, GST, GPx). Infine è stato quantificato il tripeptide γ -glutamylcisteinglicina o glutathione (GSH), che rappresenta il regolatore, non enzimatico, più importante dell'omeostasi redox intracellulare ed è presente, ubiquitariamente, in tutti i tipi di cellule. Il GSH riveste un ruolo centrale nelle linee di difesa contro i ROS (Sies, 1999) e si utilizza come marker dello *status* ossidativo cellulare.

Dal test della DCF-DA è stato osservato un aumento dei ROS intracellulari nelle cellule Jurkat esposte a β -HCH 1 e 10 μ M dopo 2 giorni di esposizione, mentre, al tempo di esposizione di 7 giorni, è stato osservato un aumento dose-dipendente dello stress ossidativo nelle cellule esposte a β -HCH 10, 100 e 1000 μ M rispetto al controllo ($P < 0,01$). Inoltre, differenze significative, sono state osservate, tra i due tempi di incubazione alle concentrazioni 1, 10, 100 e 1000 μ M. In particolare, alla concentrazione 1 μ M di β -HCH, è stato osservato un quantitativo di ROS maggiore al tempo di incubazione di 2 giorni rispetto al tempo di esposizione di 7 giorni, al contrario, alle altre concentrazioni, i ROS risultano essere più alti a 7 giorni di esposizione. (Fig. 17).



I risultati dei test effettuati per monitorare l'attività enzimatica della SOD hanno mostrato, a 2 giorni di incubazione, un aumento dose-dipendente dell'attività dell'enzima a partire dalla concentrazione più bassa (0,1 μ M) fino alla concentrazione di β -HCH 100 μ M, mentre a 1000 μ M, l'attività enzimatica è risultata essere più bassa rispetto al 100 μ M ma comunque significativamente ($P < 0,001$) più alta rispetto al controllo. A 7 giorni di incubazione, invece, è stato osservato che alle concentrazioni più basse (β -HCH 0,1-1 μ M) l'attività enzimatica della SOD è significativamente ($P < 0,001$) più alta rispetto al controllo ma al crescere della concentrazione del β -HCH l'attività enzimatica decresce fino ad arrivare alla concentrazione 1000 μ M in cui è stata osservata un'attività enzimatica minore rispetto al controllo (Fig. 18).

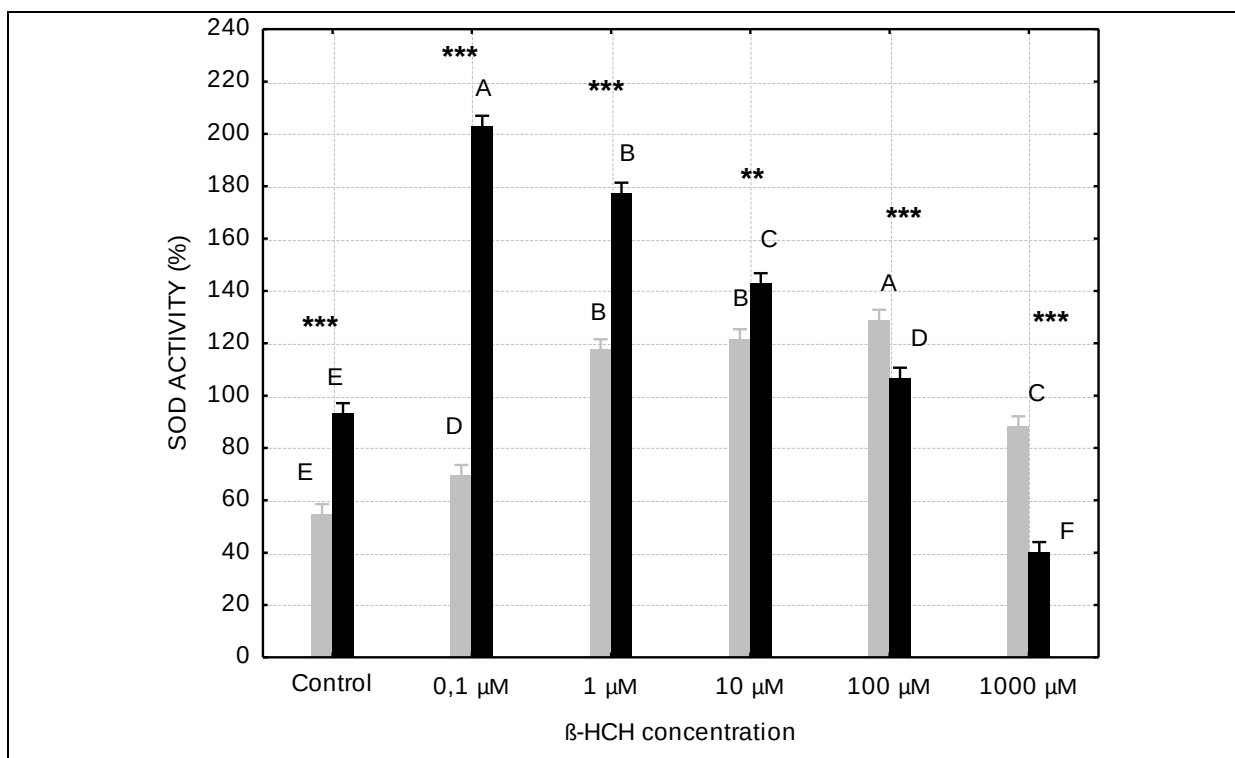
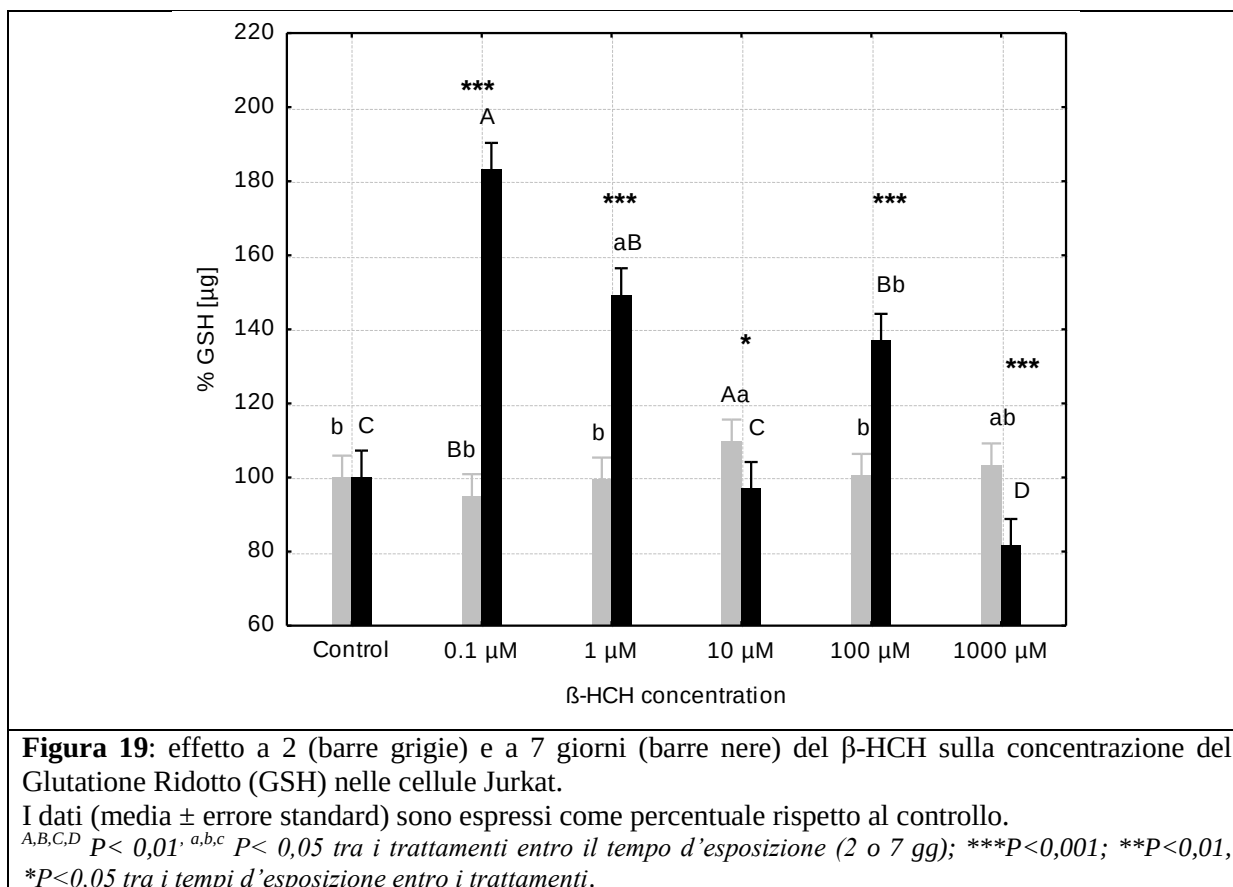


Figura 18: effetto a 2 (barre grigie) e a 7 giorni (barre nere) del β -HCH sull'attività enzimatica della Superossido Dismutasi (SOD) delle cellule linfocitarie Jurkat.

I dati (media $\pm$ errore standard) sono espressi come percentuale rispetto al controllo.

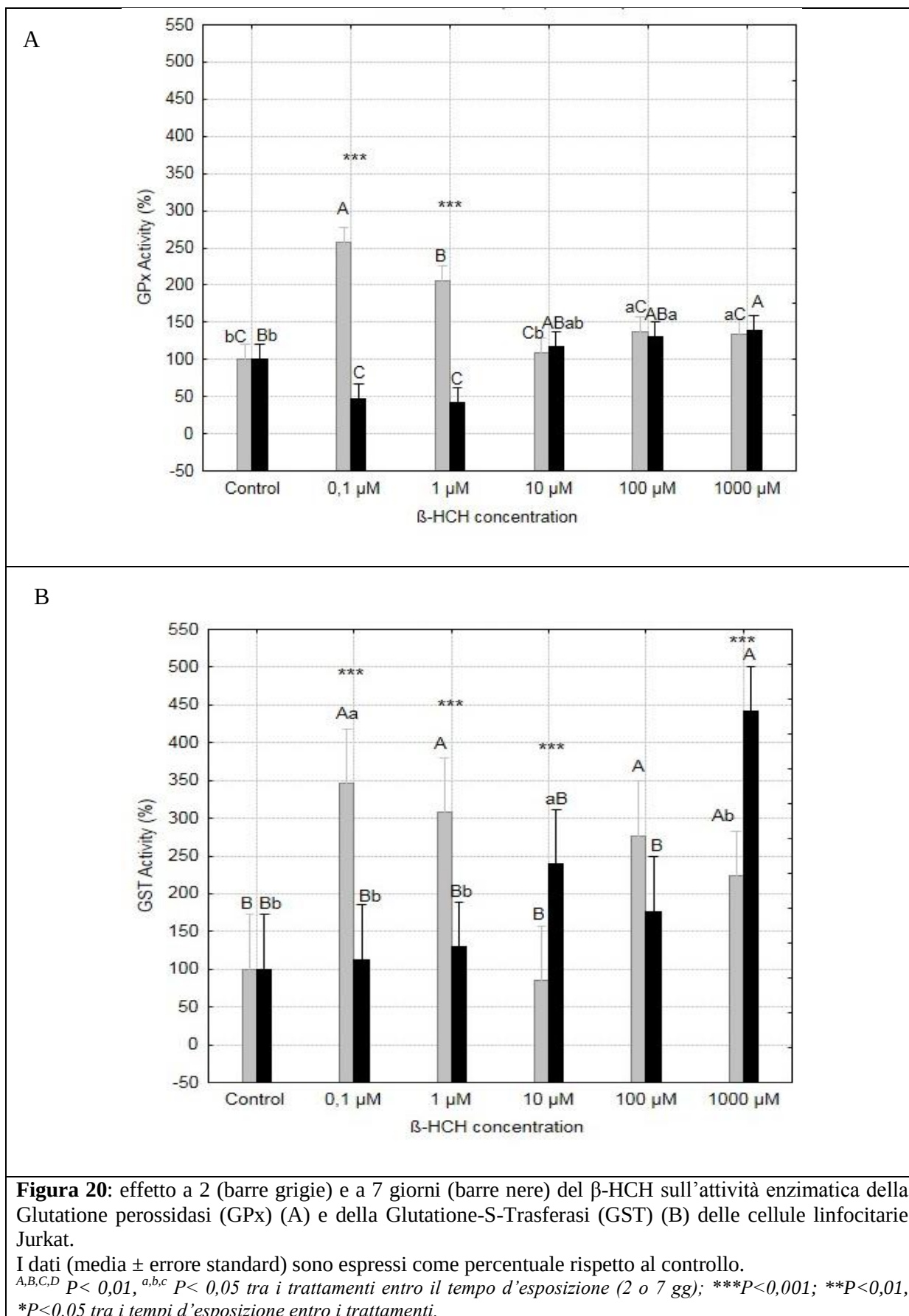
A,B,C,D $P < 0,01$; a,b,c $P < 0,05$ tra i trattamenti entro il tempo d'esposizione (2 o 7 gg); *** $P < 0,001$; ** $P < 0,01$, * $P < 0,05$ tra i tempi d'esposizione entro i trattamenti.

I risultati ottenuti dalla quantificazione del GSH hanno mostrato un lieve ma significativo ($P < 0,05$) aumento del GSH, a 2 giorni di incubazione alla concentrazione 10 μ M, mentre, a 7 giorni di incubazione, è stato osservato un significativo ($P < 0,01$) aumento della concentrazione di GSH nelle cellule trattate con β -HCH 0,1- 1-100 μ M, mentre a 1000 μ M è stata osservata una diminuzione dei livelli di GSH rispetto al controllo (Fig. 19).



Nelle Jurkat esposte al β -HCH è stato osservato, dopo 2 giorni di incubazione, un aumento significativo ($P < 0,01$) dell'attività enzimatica della GPx, alle concentrazioni di 0,1 e 1 μ M ed anche alle concentrazioni 100 e 1000 μ M, anche se con una significatività più bassa ($P < 0,05$). Mentre, a 7 giorni di incubazione, è stata osservata una diminuzione dell'attività della GPx a 0,1 e 1 μ M ed invece un lieve aumento dell'attività enzimatica nelle Jurkat trattate con 100 e 1000 μ M (Fig. 20-A).

I risultati del test della GST hanno mostrato un aumento dell'attività enzimatica nelle Jurkat esposte a 0,1-1-100 e 1000 μ M, mentre dopo 7 giorni di incubazione è stato osservato un aumento dell'attività enzimatica solo alle concentrazioni di β -HCH pari a 10 e 1000 μ M (Fig. 20-B).



Successivamente è stata monitorata l'espressione genica dei principali enzimi deputati alla detossificazione mediante rt-PCR, ma non sono state osservate differenze significative tra controlli e trattati né a 2 né a 7 giorni di incubazione (Tab. 7).

Tabella 7: Risultati della rt-PCR sulle cellule linfocitarie umane Jurkat

β-HCH						
mRNA SOD	Controllo	0,1 μM	1 μM	10 μM	100 μM	1000 μM
2 gg	100 ± 0,57	99,37 ± 1,87	100,40 ± 1,13	100,05 ± 0,75	100,06 ± 0,95	101,05 ± 1,32
7 gg	99,79 ± 1,15	100,82 ± 1,35	100,64 ± 0,09	103,00 ± 3,11	103,33 ± 3,67	98,14 ± 0,30
Effetto Tempo						
mRNA CAT						
2 gg	100 ± 0,42	97,76 ± 1,15	99,74 ± 1,21	100,08 ± 1,40	99,62 ± 0,57	99,07 ± 1,84
7 gg	100,12 ± 0,46	100,33 ± 1,16	102,00 ± 0,79	102,54 ± 2,49	104,51 ± 3,79	100,24 ± 0,64
Effetto Tempo						
mRNA GPX						
2 gg	100 ± 0,35	99,00 ± 2,06	100,26 ± 1,08	100,64 ± 1,12	99,92 ± 0,22	102,23 ± 1,99
7 gg	100,11 ± 1,27	99,49 ± 1,10	101,21 ± 0,65	102,69 ± 3,24	104,58 ± 4,09	102,14 ± 0,64
Effetto Tempo						
mRNA GST						
2 gg	100 ± 0,17	98,90 ± 1,56	99,32 ± 1,38	101,50 ± 0,29	100,93 ± 0,84	100,54 ± 1,67
7 gg	100,09 ± 0,59	100,08 ± 0,93	102,47 ± 0,62	102,39 ± 3,09	105,18 ± 4,24	100,19 ± 0,28
Effetto Tempo						

β-HCH: β-esaclorocicloesano;

I dati (media ± errore standard) sono espressi come percentuale rispetto al controllo.

^{A,B,C,D} $P < 0,01$; ^{a,b,c} $P < 0,05$ tra i trattamenti entro il tempo d'esposizione (2 o 7 gg); *** $P < 0,001$; ** $P < 0,01$,

* $P < 0,05$ tra i tempi d'esposizione entro i trattamenti

4.3.RIEPILOGO RISULTATI

Di seguito sono riportati degli schemi riassuntivi che mettono in relazione i risultati ottenuti sulle PBMC bovine e sulle cellule linfocitarie Jurkat, per ogni test effettuato su entrambe le linee cellulari.

Schema 1: riepilogo dei risultati del test TBE su PBMC bovine e cellule linfocitarie umane Jurkat

Test TBE						
<i>Tipo cellulare</i>	<i>β-HCH (μM)</i>					
2 giorni	Control	0,1	1	10	100	1000
<i>PBMC bovino</i>	---	---	---	---	---	↓
<i>JURKAT</i>	---	---	---	---	---	---
7 giorni						
<i>PBMCs</i>	---	---	---	---	↓	↓
<i>JURKAT</i>	---	---	---	---	---	↓

↑ aumento; ↓ diminuzione; --- nessun cambiamento

Schema 2: riepilogo dei risultati del test XTT/TBE su PBMC bovine e cellule linfocitarie umane Jurkat

Test XTT						
<i>Tipo cellulare</i>	<i>β-HCH (μM)</i>					
2 giorni	Control	0,1	1	10	100	1000
PBMC bovino	---	---	↑	↓	↓	↓
JURKAT	---	---	↑	---	---	↓
7 giorni						
PBMC bovino	---	---	↓	↓	↓	↓
JURKAT	---	---	---	↓	↓	↓

↑ aumento; ↓ diminuzione; --- nessun cambiamento

Schema 3: riepilogo dei risultati del test DCF-DA (ROS) su PBMC bovine e cellule linfocitarie umane Jurkat

Test DCF-DA (ROS)						
<i>Tipo cellulare</i>	<i>β-HCH (μM)</i>					
2 giorni	Control	0,1	1	10	100	1000
PBMC bovino	---	---	↑	↑	↑	↑
JURKAT	---	---	↑	↑	---	---
7 giorni						
PBMC bovino	---	↑	↑	↑	↑	↑
JURKAT	---	---	---	↑	↑	↑

↑ aumento; ↓ diminuzione; --- nessun cambiamento

Schema 4: riepilogo dei risultati dei test enzimatici per monitorare l'attività dei principali enzimi di detossificazione su PBMC bovine e cellule linfocitarie umane Jurkat

Attività enzimatica						
SOD						
<i>Tipo cellulare</i>	<i>β-HCH (μM)</i>					
2 giorni	<i>Control</i>	<i>0,1</i>	<i>1</i>	<i>10</i>	<i>100</i>	<i>1000</i>
<i>PBMC bovino</i>	---	---	---	---	---	---
<i>JURKAT</i>	---	↑	↑	↑	↑	↑
7 giorni						
<i>PBMC bovino</i>	---	---	---	---	---	↑
<i>JURKAT</i>	---	↑	↑	↑	↑	↓
GPx						
<i>Tipo cellulare</i>	<i>β-HCH (μM)</i>					
2 giorni	<i>Control</i>	<i>0,1</i>	<i>1</i>	<i>10</i>	<i>100</i>	<i>1000</i>
<i>PBMC bovino</i>	---	↑	↑	---	---	↑
<i>JURKAT</i>	---	↑	↑	---	---	---
7 giorni						
<i>PBMC bovino</i>	---	---	---	---	---	↑
<i>JURKAT</i>	---	↓	↓	---	---	---
GST						
<i>Tipo cellulare</i>	<i>β-HCH (μM)</i>					
2 giorni	<i>Control</i>	<i>0,1</i>	<i>1</i>	<i>10</i>	<i>100</i>	<i>1000</i>
<i>PBMC bovino</i>	---	---	---	---	---	---
<i>JURKAT</i>	---	↑	↑	---	↑	---
7 giorni						
<i>PBMC bovino</i>	---	---	---	↑	↑	↑
<i>JURKAT</i>	---	---	---	↑	---	↑

↑ aumento; ↓ diminuzione; --- nessun cambiamento

Schema 5: riepilogo dei risultati dei test enzimatici per monitorare l'attività dei principali enzimi di detossificazione su PBMC bovine e cellule linfocitarie umane Jurkat

<i>Espressione genica</i>						
mRNA SOD						
<i>Tipo cellulare</i>	<i>β-HCH (μM)</i>					
2 giorni	Controllo	0,1	1	10	100	1000
PBMC bovino	---	---	---	---	---	---
JURKAT	---	---	---	---	---	---
7 giorni						
PBMC bovino	---	---	---	---	---	↑
JURKAT	---	---	---	---	---	---
mRNA GPx						
<i>Tipo cellulare</i>	<i>β-HCH (μM)</i>					
2 giorni	Controllo	0,1	1	10	100	1000
PBMC bovino	---	---	---	---	---	---
JURKAT	---	---	---	---	---	---
7 giorni						
PBMC bovino	---	---	---	---	↑	↑
JURKAT	---	---	---	---	---	---
mRNA GST						
<i>Tipo cellulare</i>	<i>β-HCH (μM)</i>					
2 giorni	Controllo	0,1	1	10	100	1000
PBMC bovino	---	---	---	---	---	---
JURKAT	---	---	---	---	---	---
7 giorni						
PBMC bovino	---	---	---	---	↑	---
JURKAT	---	---	---	---	---	---
mRNA CAT						
<i>Tipo cellulare</i>	<i>β-HCH (μM)</i>					
2 giorni	Controllo	0,1	1	10	100	1000
PBMC bovino	---	---	---	---	---	---
JURKAT	---	---	---	---	---	---
7 giorni						
PBMC bovino	---	---	---	---	↑	↑
JURKAT	---	---	---	---	---	---

↑ aumento; ↓ diminuzione; --- nessun cambiamento

DISCUSSIONE

Dai risultati ottenuti, sia sulle PBMC di bovino che sulle cellule linfocitarie umane Jurkat, è stato osservato un aumento dell'attività metabolica mitocondriale, dopo 2 giorni di incubazione, alle concentrazioni più basse testate di β -HCH (1 μ M nelle PBMC, fig. 9C; 1 e 10 μ M nelle Jurkat, fig. 16). Al contrario, alle stesse concentrazioni, non è stato rilevato nessun effetto sul numero di cellule vive (TBE test) in entrambi i tipi cellulari (Fig. 9-A; Fig. 15). Soltanto dopo 7 giorni di incubazione, e alle concentrazioni più alte di β -HCH, è stato possibile osservare una diminuzione dell'attività mitocondriale, sia nelle PBMC di bovino che nelle cellule Jurkat. Altri studi hanno riportato risultati simili; attraverso il test MTT, analogo al test XTT, è stato osservato un aumento dell'attività metabolica cellulare in cellule HepG2 (cellule cancerose del fegato) esposte a Malatione, alle concentrazioni più basse testate (6 mM) e dopo 48 ore di incubazione, mentre alle concentrazioni più alte (12, 18, 24 mM), è stata osservata una diminuzione dell'attività mitocondriale (Moore et al., 2010). Lo stesso andamento è stato osservato in cellule CHO-K1 (*Chinese Hamster Ovary cells*) esposte a carbammati e altri pesticidi (José Ruiz et al., 2006). L'apparente effetto stimolatorio, osservato alle basse concentrazioni, ed a tempi brevi di incubazione, è riconosciuto come un fenomeno biologico denominato “*low dose stimulation and high dose inhibition*”, descritto come meccanismo di protezione o di risposta adattativa cellulare all'esposizione a pesticidi (José Ruiz et al., 2006).

Inoltre è importante sottolineare che, le concentrazioni 0,1 e 1 μ M di β -HCH, rientrano nel range dei livelli ematici di β -HCH ritrovati *in vivo* nello studio di Ronchi e Danieli (2008) in bovini allevati nella Valle del Sacco.

La vitalità cellulare, *in vitro*, è spesso monitorata attraverso diversi saggi colorimetrici, il test XTT è uno dei test spesso utilizzato per indicare il numero di cellule vive (Alcouffe et al., 1999; Li et al., 2009; Lu et al., 2012). In realtà, dai risultati ottenuti in questo studio, è stato osservato che, tra il numero di cellule vive risultanti dal test TBE, ed il numero di cellule vitali osservate attraverso il test XTT, non c'è concordanza, questo è stato confermato anche in uno studio condotto nel periodo del dottorato, nel quale è stato testato il bicromato di potassio, un contaminante inorganico, sulle PBMC di bovino (Danieli et al., 2014).

La diminuzione dell'attività mitocondriale potrebbe essere causata da diversi fattori, tra questi ci sono la deplezione di nutrienti nel mezzo di coltura (Figenschau et al., 1997), oppure l'incremento intracellulare delle specie reattive all'ossigeno.

Shimamura et al. (2000) e *Wang et al. (2011)* hanno dimostrato che l'anione superossido potrebbe interferire con l'attività mitocondriale; inoltre è stato osservato che diversi pesticidi, incluso il Lindano, inducono un aumento intracellulare dei ROS (*Lowy et al., 1977; Bagchi and Stohs, 1993; Ahmed et al., 2011*). La presenza del controllo, in ogni esperimento da noi effettuato, esclude l'idea della deplezione di nutrienti, è stata quindi formulata l'ipotesi secondo la quale, nelle cellule esposte a β -HCH, si instauri una condizione di stress ossidativo.

Infatti, sulla base dei risultati ottenuti, il β -HCH induce, sia nelle PBMC di bovino che nelle cellule linfocitarie Jurkat, un aumento dei ROS intracellulari. In particolare, nelle PBMC bovine, è stato osservato un aumento dose dipendente dei ROS dopo 2 giorni di incubazione, a partire dalla concentrazione 1 μ M, mentre, dopo 7 giorni di incubazione, i ROS aumentano a partire dalla concentrazione più bassa testata (0,1 μ M) (fig. 10; fig. 17).

Nelle Jurkat invece, dopo 2 giorni di incubazione, è stato osservato un aumento dei ROS solo nelle cellule esposte a β -HCH 1 μ M, mentre, dopo 7 giorni di incubazione, l'aumento dose-dipendente dei ROS intracellulari, è stato osservato a partire dalla concentrazione 10 μ M.

Sulla base delle evidenze sperimentali, l'aumento dei ROS induce, sia nelle PBMC bovine che nelle Jurkat, un'attivazione dei principali enzimi di detossificazione; in particolare, la risposta varia in base al tipo cellulare.

Nelle PBMC bovine la SOD e la GST vengono attivate dopo 7 giorni di incubazione e alle concentrazioni più alte testate (100 e 1000 μ M). La GPx, invece, risulta essere più attiva, dopo 2 giorni, nelle PBMC esposte alle concentrazioni di β -HCH 0,1 e 1 μ M, mentre dopo 7 giorni solo alle concentrazioni più alte di β -HCH (100 e 1000 μ M) (fig. 11-13-14).

Al contrario, non sono stati osservati cambiamenti significativi nell'attività della CAT tranne nelle PBMC esposte a β -HCH 100 μ M, dopo 2 giorni di incubazione (fig. 12). Questo potrebbe essere spiegato dal fatto che, la GPx e la CAT competono per l' H_2O_2 , utilizzata come substrato nel processo di detossificazione (*Valko et al., 2006*) L'ipotesi è che le PBMC hanno attivato la via di detossificazione legata alla coniugazione con il GSH rispetto all'utilizzo della CAT.

Tale ipotesi sembrerebbe essere confermata da una maggiore attività della GST, altro enzima che utilizza come substrato il GSH nel tentativo di mantenere l'omeostasi dello *status ossidativo*. La GST catalizza la reazione di legame tra xenobiotici e GSH, portando alla formazione degli addotti del GSH che vengono eliminati attraverso l'escrezione nel mezzo extracellulare (*Giovannini et al., 2006*).

Nelle cellule Jurkat, invece, è stato osservato un aumento dell'attività della SOD alle concentrazioni di β -HCH 0,1-1-10 100 μ M sia a 2 che a 7 giorni di incubazione, ma con un trend opposto: a 2 giorni d'esposizione, l'attività della SOD aumenta in maniera dose-dipendente, con un picco massimo alla concentrazione 100 μ M; a 7 giorni invece, il picco massimo di attività enzimatica è stato osservato alle concentrazioni più basse di β -HCH (0,1-1 μ M) (fig. 18).

La GST e la GPx risultano essere più attive al tempo di incubazione di 2 giorni, alle concentrazioni più basse di β -HCH (0,1-1 μ M) (fig. 20-A, 20-B), mentre, dall'analisi della quantificazione del GSH, è stato osservato un aumento delle concentrazioni intracellulari solo a 7 giorni di incubazione e alle concentrazioni 0,1-1-1000 μ M (fig. 19).

Sulla base di questi risultati è possibile affermare che, i principali enzimi di detossificazione, si attivano in entrambi i tipi cellulari, ma con un andamento diverso. Le due linee cellulari utilizzate, pur essendo entrambe costituite da cellule del sistema immunitario, presentano alcune differenze. Le PBMC rappresentano una popolazione cellulare eterogenea (monociti, linfociti T e linfociti B) e quindi, i risultati ottenuti potrebbero rappresentare la somma delle risposte dei diversi tipi cellulari, le Jurkat invece, sono una popolazione omogenea, costituita solamente da linfociti T. Inoltre le Jurkat sono una linea cellulare stabilizzata, molto più resistente rispetto alle PBMC che costituiscono una linea cellulare primaria.

Successivamente, l'analisi della quantificazione degli mRNA per gli enzimi di detossificazione, ha mostrato, nelle PBMC bovine, un aumento della trascrizione dei geni per la SOD, la CAT, la Gpx e la GST solo dopo 7 giorni di esposizione e alle concentrazioni più alte testate di β -HCH (100 e 1000 μ M). Al contrario, nelle cellule Jurkat, non è stata osservata nessuna modifica dell'espressione genica (tab. 6-7).

L'attivazione della trascrizione genica è un meccanismo molto complesso e strettamente regolato, sia a livello dei fattori di trascrizione, che a livello di modificazioni post-traduzionali. La regolazione dell'espressione dei geni codificanti per gli enzimi di detossificazione, quali la Gpx e la GST, è stata messa in relazione con sequenze geniche, localizzate nel sito del promotore di questi geni, chiamate *Antioxidant Responsive Elements* (ARE). Tra i fattori di trascrizione coinvolti nell'attivazione delle sequenze ARE, ci sono Nrf1 e Nrf2 (Nuclear Related Factors 1 e 2), che a loro volta possono essere regolati da cofattori di inibizione o attivazione. Tra i cofattori di inibizione un esempio è la proteina *Kelch-like ECH-associated protein 1* (Keap1), legata all'actina e localizzata nello spazio perinucleare. Keap1 è in grado di sequestrare la proteina Nrf2 presente nel citoplasma rendendola incapace di legare ed attivare le sequenze ARE (Giovannini et al., 2006).

Questo è soltanto uno dei *pathways* coinvolti nella regolazione dell'espressione genica degli enzimi di detossificazione, che necessita di studi più approfonditi per chiarirne i meccanismi. A proposito invece dei meccanismi post-traduzionali, *Brown et al. (2004)* hanno dimostrato che, l'incremento della concentrazione intracellulare dell'anione superossido, induce una rapida attivazione del pool citoplasmatico di SOD inattivata (apo-SOD), tramite l'interazione con speciali proteine chiamate *Copper Chaperone for SOD (CCS)*. Inoltre, *Cao et al. (2003)*, hanno dimostrato che, l'aumento dei livelli intracellulari di H_2O_2 , induce l'attivazione di specifiche proteine Tirosin-kinasi, c-Abl e Arg, che hanno la funzione di fosforilare specifici siti di attivazione sia della GPx che della CAT. Questa modificazione post-traduzionale induce un aumento dell'attività enzimatica. L'interazione tra la GPx e c-Abl e Arg è stimolata dall'aumento dei livelli di H_2O_2 , ma se la concentrazione di H_2O_2 è superiore a 0,5 mM, la formazione del complesso GPx-c-Abl-Arg è inibita, con un conseguente accumulo intracellulare di ROS (*Cao et al., 2003*).

L'accumulo di ROS intracellulari induce nella cellula l'attivazione o del *pathway* apoptotico, di morte cellulare programmata oppure del *pathway* di morte cellulare per necrosi.

È stato dimostrato inoltre che, il rilascio di LDH aumenta nelle cellule che vanno incontro a morte cellulare per necrosi, ma non nelle cellule che vanno incontro a morte cellulare per apoptosi (*Vairetti et al., 2005; Chan et al., 2013*).

Dai risultati ottenuti dal test LDH, sia nelle PBMC bovine, che nelle cellule umane linfocitarie Jurkat, non si osserva un aumento significativo del rilascio di LDH nel mezzo extracellulare (tab. 5), questo risultato avvalorava l'ipotesi che in entrambi i tipi cellulari non si instaura il meccanismo di morte per necrosi. L'ipotesi è supportata anche dai risultati ottenuti dal test del TBE, che non evidenziano danni alla membrana plasmatica di entrambi i tipi cellulari, rafforzando la nostra ipotesi di instaurazione del *pathways* di morte cellulare per apoptosi (*Desagher and Martinou, 2000*).

Inoltre *Pérez-Maldonado et al. (2004)* hanno osservato che, PBMC umane, esposte *in vitro* a DDT e ai suoi metaboliti (100 e 1000 μ M), vanno incontro a morte cellulare per apoptosi.

Sulle PBMC bovine esposte a β -HCH è stata monitorata anche l'attività proliferativa, le cellule sono state stimulate con due diversi mitogeni, il PWM e la Con A. I risultati ottenuti sono contrastanti, soprattutto in base al mitogeno utilizzato, infatti, il PWM stimola i linfociti T e B, mentre la Con A stimola la proliferazione solo i linfociti T (*Neri et al., 1973; Mellstedt, 1975*).

In particolare è interessante sottolineare che, le cellule stimulate con PWM, mostrano una diminuzione dell'attività proliferativa dopo 2 giorni di esposizione a β -HCH, già alle

concentrazioni più basse (0,1-1 μM) (tab. 4), comparabili con le concentrazioni ritrovate *in vivo* (Ronchi e Danieli, 2008). L'ipotesi è che il β -HCH possa influenzare la funzionalità del sistema immunitario bovino con una conseguente situazione di immunosoppressione, e una maggiore possibilità di contrarre infezioni da parte degli animali da allevamento esposti a questi inquinanti. Al contrario, al tempo di incubazione di 7 giorni, non si osservano differenze significative nell'attività proliferativa nelle PBMC stimulate con entrambi i mitogeni. Questo risultato è stato già osservato nello stesso modello cellulare (PBMC bovine) esposte *in vitro* a Fumonisin B1, micotossina prodotta da funghi filamentosi del genere *Fusarium*, in cui si osservava una diminuzione dell'attività proliferativa cellulare dopo 2 giorni di incubazione, ma non dopo 7 giorni di esposizione (Danieli et al., 2010). Inoltre Yàñez et al (2004) hanno dimostrato che PBMC umane esposte a DDE mostrano un aumento della frammentazione del DNA dopo 24 e 48 ore di incubazione, al contrario, dopo 72 ore di incubazione, non è stata osservata nessun danno al DNA, ipotizzando un meccanismo di riparazione del danno da parte delle cellule.

Infine, rimane ancora sconosciuto il meccanismo mediante il quale il β -HCH inneschi una risposta da parte delle cellule del sistema immunitario. A questo proposito, alcuni studi hanno mostrato la capacità del Lindano di interagire con i recettori GABA_A del sistema nervoso, inducendo un danno neurotossico (Islam e Lynch, 2011), ed è interessante sottolineare che Tian et al., (1999) e Alan et al., (2006) hanno dimostrato che le cellule T umane e murine esprimono i recettori GABA_A e che la presenza di questi recettori può modulare la risposta immunitaria attraverso l'attivazione o l'inibizione dell'attività proliferativa.

CONCLUSIONI E PROSPETTIVE

In conclusione è possibile affermare che il β -HCH induce, sia nelle cellule del sistema immunitario bovino che nelle cellule linfocitarie umane, *in vitro*, un aumento delle stress ossidativo cellulare, anche alle dosi paragonabili a quelle ritrovate *in vivo* nel caso della Valle del Sacco. Inoltre il β -HCH è in grado di indurre una risposta cellulare, sia a livello di attività metabolica, ma soprattutto a livello di attività dei principali enzimi di detossificazione, al fine di riportare la cellula in uno stato di omeostasi ossidativa.

Nelle condizioni sperimentali adottate non si osserva l'attivazione di meccanismi più complessi come, l'attivazione della trascrizione genica dei principali enzimi di detossificazione, tranne che nelle PBMC bovine alle concentrazioni più alte e dopo 7 giorni d'esposizione.

Gli obiettivi futuri sono quelli di valutare gli effetti del β -HCH a tempi più lunghi d'esposizione, al fine di valutare più in dettaglio gli effetti da esposizione cronica. Inoltre, sarebbe interessante monitorare la presenza/assenza di markers della perossidazione lipidica come la malondialdeide (MDA), ed il meccanismo alla base dell'interazione tra il β -HCH e le cellule del sistema immunitario. A tale scopo sarebbero utili esperimenti volti a definire se, la segnalazione che induce la risposta intracellulare, avviene mediante interazione ligando-recettore in membrana, oppure se la molecola entra passivamente ed interagisce con recettori nucleari o citoplasmatici, come avviene per altri interferenti endocrini. Infine, sarebbe interessante confermare l'ipotesi di attivazione del *pathways* di morte cellulare per apoptosi, attraverso test specifici come il TUNEL assay ed il Comet assay che sono utilizzati per valutare lo stato di frammentazione del DNA, oppure monitorare lo stato di attivazione delle caspasi che sono le molecole effettrici dell'apoptosi.

Bibliografia

- Adami, H.O., Bergstrom, R., Mohnner, M., Zatonski, W., Storm, H., Ekblom, A., Tretili, S., Teppo, L., Ziegler, H., Rahu, M., Gurevicius, R., Stengrevics, A., 1994. Testicular cancer in nine Northern European countries. *International Journal of Cancer*; 59:33-38.
- Agency for Toxic Substances and Disease Registry (ATSDR), 2003. Toxicological profile For alpha-, Beta-, gamma-, and delta-hexachlorocyclohexane. Agency for Toxic Substances and Disease Registry. US department of Health and Human Services. Georgia. USA, 306.
- Aguilar, A., Borrell, A., 2005. DDT and PCB reduction in the western Mediterranean from 1987 to 2002, as shown by levels in striped dolphins (*Stenella coeruleoalba*) *Marine Environmental Research*; 59:391–404.
- Ahlbom, J., Fredriksson, A., Eriksson, P., 1995. Exposure to an organophosphate (DFP) during a defined period in neonatal life induces permanent changes in brain muscarinic receptors and behavior in adult mice, *Brain Res*; 677:13–9.
- Ahmed, T., Pathak, R., Mustafa, M.D., Kar, R., Tripathi, A.K., Ahmed, R.S., Banerjee B.D., 2011. Ameliorating effect of N-acetylcysteine and curcumin on pesticide-induced oxidative DNA damage in human peripheral blood mononuclear cells. *Environ. Monit. Assess.*; 179:293-299.
- Ahmed, T., Tripathi, A.K., Ahmed, R.S., Das, S., Suke, S. G., Pathak, R., Chakraborti, A., Banerjee B.D., 2008. Endosulfan-Induced Apoptosis and Glutathione Depletion in Human Peripheral Blood Mononuclear Cells: Attenuation by N-Acetylcysteine. *Biochem. Molecular Toxicology*; 22:5
- Akerboom, T.P.M., Sies, H., 1989. Transport of glutathione, glutathione disulfide, and glutathione conjugates across the hepatocyte plasma membrane. *Methods Enzymol*; 134:523-34.
- Akhtar, N., Kayani, S.A., Ahmad, M.M., Shahab, M., 1996. Insecticide-induced changes in secretory activity of the thyroid gland in rats. *J. Appl. Toxicol.*; 16:397-400.
- Alam, S., Laughton, D.L., Walding, A., Wolstenholme, A., 2006. Human peripheral blood mononuclear cells express GABA_A receptors subunits. *Molecular Immunology*; 43:1432-1442.
- Alcouffe, J., Caspar-Bauguil, S., Garcia, V., Salvayre, R., Thomsen, M., Benoist, H., 1999. Oxidized low density lipoproteins induce apoptosis in PHA-activated peripheral blood mononuclear cells and in the Jurkat T cell line. *Journal of Lipid Research*; 40:1200-1210, 2013.
- Armstrong, R.N., 1997. Structure, catalytic mechanism and evolution of the glutathione transferase. *Chem Res Toxicol.*; 10:2-18.
- Arnér, E.S., Holmgren, A., 2000. Physiological functions of thioredoxin and thioredoxin reductase. *Eur J Biochem*; 267:6102-9.
- Aubé, M., Larochelle, C., Ayotte, P., 2011. Differential effects of a complex organochlorine mixture on the proliferation of breast cancer cell lines. *Environmental Research*, 111:337–347.
- Bagchi, M., Stohs, S.J., 1993. In vitro induction of reactive oxygen species by 2,3,7,8- tetrachlorodibenzo-p-dioxin, endrin, and lindane in rat peritoneal macrophages, and hepatic mitochondria and microsomes. *Free Radical Bio. Med.*; 14:11-18.
- Banerjee, B.D., Seth, V., Bhattachaiya, A., Pasha, S.T., Chakraborty, A.K., 1999. Biochemical effects of some 26. pesticides on lipid peroxidation and free radical scavengers. *Toxicol Lett*; 107: 33-47.
- Barrie L. A., Gregor D., Hargrave B., Lake R., Muir D., Shearer R., Tracey B., Bidleman T.F., 1992. Arctic contaminants: sources, occurrence and pathways. *Sci. Tot. Environ.*; 122: 1-74. 4. .

- Bayarri, S., Turrio Baldassarri, L., Iacovella, N., Ferrara, F., Di Domenico, A., 2001. PCDDs, PCDFs, PCBs, and DDE in edible marine species from the Adriatic sea. *Chemosphere*; 43:601-611.
- Bossi, R., Larsen, B., Premazzi, G., 1992. Polychlorinated biphenyl congeners and other chlorinated hydrocarbons in bottom sediment cores of lake Garda (Italy). *Sci. Tot. Environ. Poll.*; 121:77-93.
- Breivik, K.; Pacyna, J. M.; Münch, J., 1999. Use of alpha-, beta- gamma- esachlorocyclohexane in Europe. *Sci. Tot. Environ.*; 239:151-163.
- Brigelius-Flohè R., 1999. Tissue-specific functions of individual glutathione peroxidases. *Free Rad Biol Med*; 27:951-965.
- Briviba, K., Klotz, L.O., Sies, H., 1999. Defenses against peroxynitrite. *Methods Enzymol*; 301:301-311.
- Briz, V., Molina-Molina, J.-M., Sánchez-Redondo, S., Fernández, M.F., Grimalt, J.O., Olea, N., Rodríguez-Farré, E., Suñol, C., 2011. Differential Estrogenic Effects of the Persistent Organochlorine Pesticides Dieldrin, Endosulfan, and Lindane in Primary Neuronal Cultures. *Toxicol. Sci.*; 120:413–427.
- Brouwer, A., Ahlborg, U.G., Van Den Berg, M., Birnbaum, L.S., Boersma, E.R., Bosveld, B., Denison, M.S., Gray, L.E., Hagmar, L., 1995. Functional aspects of developmental toxicity of polyhalogenated aromatic hydrocarbons in experimental animals and human infants. *European Journal of Pharmacology*; 293:1-40.
- Brown, N. M., Torres, A.S., Doan, P.E., O'Halloran, T.V., 2004. Oxygen and the copper chaperone CCS regulate posttranslational activation of Cu,Zn superoxide dismutase. *PNAS* 101; 15:5518-55123
- Buser, H., Muller, M.D., 1995. Isomer and enantioselective degradation of hexachlorocyclohexane isomers in sewage sludge under anaerobic conditions. *Environ. Sci. Technol.*; 29:664-672.
- Campagna, C., Guillemette, C., Ayotte, P., Bailey, J.L., 2009. Effects of an Environmentally Relevant Organochlorine Mixture and a Metabolized Extract of This Mixture on Porcine Sperm Parameters In Vitro. *J. Androl.*; 30:317–324.
- Cao, C., Leng, Y., Huang, W., Liu, X., Kufe, D., 2004. Glutathione Peroxidase 1 Is Regulated by the c-Abl and Arg Tyrosine Kinases. *JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY* 278; 41:39609 –39614.
- Càrdenas-Gonzàles, M., Gaspar-Ramírez, O., Pérez-Vázquez, F.J., Alegria-Torres, J.A., Gonzàles-Amaro, R., Pérez-Maldonado, I.N., 2013. P,p'-DDE, a DDT metabolite, induce proinflammatory molecules in human peripheral blood mononuclear cells "in vitro". *Experimental and Toxicology Pathology*; 65:661-665
- Chan, F.K., Moriwaki, K., De Rosa, M.J., 2013. Detection of necrosis by release of lactate dehydrogenase activity. *Methods Mol. Biol.*; 979:65-70.
- Chaudière J, Ferrari-Iliou R., 1999. Intracellular Antioxidants: from chemical to biochemical mechanisms. *Food Chem Toxicol*; 37:949-962.
- Chessels, M.J.; Haweker, D.W.; Connell, D.W.; Papajcsik, I.A., 1988. Factor influencing the distribution of lindane and isomers in soil of an agricultural environment. *Chemosphere*; 17:1741-1749
- Corsini, E., Sokooti, M., Galli, C.L., Moretto, A., Colosio, C., 2013. Pesticides induced immunotoxicity in humans: A comprehensive review of the existing evidence. *Toxicology*; 307:123-125
- Daniel, V., Huber, W., Bauer, K., Suesal, C., Conradt, C., Opelz, G., 2001. Associations of blood levels of PCB, HCHS, and HCB with numbers of lymphocyte subpopulations, in vitro lymphocyte response, plasma cytokine levels, and immunoglobulin autoantibodies. *Environ Health Perspect*; 109:173–178.
- Danieli, P.P., Catalani, E., Lacetera, N., Ronchi, B., 2010. Comparative assessment of Fumonisin B1 and hydrogen peroxide in vitro exposure on bovine lymphocytes proliferative response. Page 237 in *Proc. EAAP 61st Annual Meeting*, Heraklion, Greece.

- Danieli, PP, Ronchi, B., Rossi, C., 2014. Assessing the in vitro viability of bovine peripheral blood mononuclear cells (PBMCs): a comparison between the MTT (or XTT) and Trypan Blue Exclusion (TBE) test. *ACTA NATURALIS SCIENTIA*; 1:58-61.
- Dar, S.A., Das, S., Ramachandran, V.G., Bhattacharya, S.N., Mustafa, M.D., Banerjee, B.D., Verma, P., 2012. Alterations in T-lymphocyte sub-set profiles and cytokine secretion by PBMC of systemic lupus erythematosus patients upon in vitro exposure to organochlorine pesticides. *J. Immunotoxicol.*; 9:85-95.
- Degli Esposti, M., McLennan, H., 1998. Mitochondria and cells produce reactive oxygen species in virtual anaerobiosis: relevance to ceramide-induced apoptosis. *FEBS Lett.*; 430:338.
- Desagher, S., Martinou, J.-C., 2000. Mitochondria as the central control point of apoptosis. *Trends Cell Biol.*; 10:369-377.
- Diamanti-Kandarakis, E., Bourguignon, J.P., Giudice, L.C., Hauser, R., 2009. Endocrine-disrupting chemicals: an endocrine society scientific statement. *Endocr. Rev.*; 30 (4):293–342.
- Dutta, R., Mondal, A. M., Arora, V., Nag, T. C., Das N., 2008. Immunomodulatory effect of DDT (bis[4-chlorophenyl]-1,1,1-trichloroethane) on complement system and macrophages. *Toxicology*; 252: 78-85
- Ennaceur, S., Ridha, D., Marcos, R., 2008. Genotoxicity of the organochlorine pesticides 1,1-dichloro-2,2-bis(pchlorophenyl) ethylene (DDE) and hexachlorobenzene (HCB) in cultured human lymphocytes. *Chemosphere*; 71:1335-1339.
- Fernández-Blanco C., Font G., Ruiz MJ., 2014. Oxidative stress of alternariol in Caco-2 cells. *Toxicol Lett.*; 229(3):458-64.
- Figenschau, Y., Yousef, M.I., Sveinbjörnsson, B., Bertheussen, K., 1997. A sensitive serum- free colorimetric assay for the detection of cytotoxic effects of pesticides. *J. Environ. Sci. Heal.*; B 32:177-194.
- Finkel T., 2012. From sulfenylation to sulphydrylation: what a thiolate needs to tolerance. *Sci Signal.*; 5:10.
- For the PANKRAS II Study Group, Porta, M., Pumarega, J., López, T., Jarrod, M., Marco, E., Grimalt, J.O., 2009. Influence of tumor stage, symptoms, and time of blood draw on serum concentrations of organochlorine compounds in exocrine pancreatic cancer. *Cancer Causes & Control*; 20:1893–1906.
- Garmouna, M., Poissant, L., 2004. Occurrence, temperature and seasonal trends in α - and γ -HCH in air (Québec, Canada). *Atm. Environ.*; 38:386-382.
- Gerlier, D., Thomasset, N., 1986. Use of MTT colorimetric assay to measure cell activation. *J. Immunol. Methods*; 94:57-63.
- Giovannini, C., Filesi, C., D'Archivio, M., Scazzocchio, B., Santangelo, C., Masella, R., 2006. Polifenoli e difese antiossidanti endogene: effetti sul glutatione e sugli enzimi ad esso correlati. *ANN IST SUPER SANITÀ*; 42, 3: 336-347
- Gore, A. C., Crew, D., Doan, L. L., La Merrill, M., Patisaul, H., Zota A. 2014. Introduction to endocrine disrupting chemicals (EDCs). A guide for public interest organizations and policy- markers.
- Graillot, V., Tomasetig, F., Cravedi, J.-P., Audebert, M., 2012. Evidence of the in vitro genotoxicity of methyl-pyrazole pesticides in human cells. *Mutat. Res.*; 748:8–16.
- Gravilescu, M., 2005. Fate of pesticides in the environment and its bioremediation. *Eng. Life Sci.*; 5(6):497-526
- Gutteridge, J.M.C., 1993. Free radicals in diseases processes: a compilation of cause and consequence. *Free Rad Res Comm*; 19:141-58.
- Halliwell, B., Gutteridge, J.M.C., 1999. *Free Radicals in Biology and Medicine*. 3. ed. Oxford: Clarendon Press; 1999 (Chapter 4).

- Halliwell, B., 1999. Antioxidant defense mechanisms: from the beginning to the end. *Free Rad Res*; 31:261-72.
- Harrad, S., Mao, H., 2004. Atmospheric PCBs and organochlorine pesticides in Birmingham, UK: concentration, sources, temporal and seasonal trends. *Atm. Envi.*; 38:1437-1445
- Hayes, J.D., Flanagan, J.U., Jowsey, I.R., 2005. Glutathione Transferases. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*; 45:51-88.
- Hayes, J.D., McLellan, L.I., 1999. Glutathione and glutathione-dependent enzymes represent a co-ordinately regulated defense against oxidative stress. *Free Rad Biol Med*; 31:273-300.
- Heusinkveld, H.J., Thomas, G.O., Lamot, I., Van den Berg, M., Kroese, A.B.A., Westerink, R.H.S., 2010. Dual actions of lindane (γ -hexachlorocyclohexane) on calcium homeostasis and exocytosis in rat PC12 cells. *Toxicology and Applied Pharmacology*; 248:12–19.
- Heusinkveld, H.J., Westerink, R.H.S., 2012. Organochlorine Insecticides Lindane and Dieldrin and Their Binary Mixture Disturb Calcium Homeostasis in Dopaminergic PC12 Cells. *Environ. Sci. Technol.*; 46:1842–1848.
- Islam, R., Lynch, J.W., 2011. Mechanism of action of the insecticides, Lindane and fipronil, on glycine receptor chloride channels. *British Journal of pharmacology*; 165:2707-2720
- Iwata, H., Tanbe, S., Sakal, N., Taysukawa, R., 1993. Distribution of Organochlorines in the Ocean air and Surface Seawater and the role, of ocean on their global transport an fate. *Environ. Sci. Technol.*; 27:1080-1098.
- Jacobson, J.L., Jacobson, S.W., 1996. Intellectual impairment in children exposed to polychlorinated biphenyls in utero. *New England Journal of Medicine*; 335:783-789.
- Janovick-Guretzky, N.A., Dann, H.M., Carlson, D.B., Murphy, M.R., Loor, J.J., Drackley, J.K., 2007. Housekeeping gene expression in bovine liver is affected by physiological state, feed intake, and dietary treatment. *J Dairy Sci.*; 90(5):2246-2252.
- Jobling S., Sumpter J.P., 1993. Detergent components in sawage effluent are weakly estrogenic to fish: an in vivo study using rainbow trout (*Onchoruncus mykiss*) hepatocytes. *Acqua Toxicol*; 27:361-72
- John. P.J., Bakore, N., Bhatnagar, P., 2001. Assessment of organochlorine pesticide residue level in dairy milk and buffalo milk from Jaipur City, Rajasthan, India. *Environ. Int.*; 26:231-236.
- José Ruiz, M., Festila, L.E., Fernández, M., 2006. Comparison of basal cytotoxicity of seven carbamates in CHO-K1 cells. *Toxicol. Environ. Chem.*; 88:345-354.
- Juberg, D.R, 2000 An evaluation of endocrine modulators: implications for human health. *Ecotoxicol Environ Saf.*; 45(2):93-105.
- Kalajzic, T.; Bianchi, M.; Muntai, H.; Kettrup, A., 1998. Polychlorinated biphenyls (PCBs) and organochlorine pesticides (OCPs) in the sediments of an Italian drinking water reservoir. *Chemosphere*; 36:1615-1625.
- Kalyanaraman, B., Karoui, H., Singh, R.J., Felix, C.C., 1996. Detection of thiyl radical adducts formed during hydroxyl radical- and peroxynitrite-mediated oxidation of thiols- a high resolution ESR spin-trapping study at Q-band. *Anal Biochem*; 241:75-81.
- Kavlock, R.J., Daston, G.P., DeRosa, C., Fenner-Crisp, P., Gray, L.E., Kaattari, S., Lucier, G., Luster, M., Mac, M.J., Maczka, C., Miller, R., Moore, J., Rolland, R., Scott, G., Sheehan, D.M., Sinks, T., Tilson, H.A.. 1996. Research needs for the risk assessment of health and environmental effects of endocrine disruptors: a report of the U.S. EPA-sponsored workshop. *Envin. Health Perspect.*; 104 (4):715-740
- Kehrer, J., 1993. Free radicals as mediators of tissue injury and disease. *Crit Rev Toxicol*; 23:21-48.

- Khan, F.H., Ganesan, P., Kumar, S., 2010. Y Chromosome microdeletion and altered sperm quality in human males with high concentration of seminal hexachlorocyclohexane (HCH). *Chemosphere*; 80:972–977.
- Kooistra, L., Wehrens, R., Leuven, R.S.E.W., Buydens, L.M.C., 2001. Possibilities of visible–near-infrared spectroscopy for the assessment of soil contamination in river floodplains. *Anal. Chim. Acta.*; 446:97-105
- Kuhn, H, Borchert, A., 2002 . Regulation of enzymatic lipid peroxidation: the interplay of peroxidizing and peroxide reducing enzymes. *Free Rad Biol Med*; 33:154-72.
- Lacetera, N., Franci, O., Scalia, D., Bernabucci, U., Ronchi, B., Nardone, A., 2002. Effects on functions of ovine blood mononuclear cells for each of several fatty acids at concentrations found in plasma of healthy and ketotic ewes. *Am. J. Vet. Res.*; 63:958-962.
- Li, Q., Kobayashi, M., Kawada, T., 2009. Chlorpyrifos induces apoptosis in human T cells. *2009 Toxicology*; 255:53–57.
- Li, Y. F., 1999. Spatial Distribution of Hexachlorocyclohexanes in Agricultural Soils in Zhejiang Province, China, and Correlations with Elevation and Temperature. *Sci.Tot. Environ.*; 232:121-158.
- Lifshitz, M., Shahak, E., Bolotin, A., Sofer, S., 1997. Carbamate poisoning in early childhood and in adults. *Clin Toxicol*; 35:25-27.
- Liu, J., Schnoor, J.L., 2008. Uptake and translocation of lesser-chlorinated polychlorinated biphenyls (PCBs) in whole hybrid poplar plants after hydroponic exposure. *Chemosphere*; 73:1608-1616.
- Louis, G.M.B., Chen, Z., Peterson, C.M., Hediger, M.L., Croughan, M.S., Sundaram, R., Stanford, J.B., Varner, M.W., Fujimoto, V.Y., Giudice, L.C., Trumble, A., Parsons, P.J., Kannan, K., 2012. Persistent Lipophilic Environmental Chemicals and Endometriosis: The ENDO Study. *Environ. Health Persp.*; 120:811–816.
- Lowy, R., Albrecht, R., Pelissier, M.A., Manchon, P., 1977. Determination of the no effect levels of two pesticides, Lindane and Zineb, on the microsomal enzyme activities of rat liver. *Toxicol. Appl. Pharm.*; 42:329-338.
- Lu, S.C., 2000. Regulation of glutathione synthesis. *Curr Top Cell Regul*; 36:95-116.
- Lu, H., Fernández-Franzòn, M., Font G., Ruiz, M.J., 2012. Toxicity evaluation of individual and mixed enniatins using an in vitro method with CHO-K1 cells,” *Toxicol. In Vitro*; 27:672-680.
- Luongo, D., Severino, L., Bergamo, P., De Luna, R., Lucisano, A., Rossi, M., 2006. Interactive effects of fumonisin B1 and α -zearalenol on proliferation and cytokine expression in Jurkat T cells. *Toxicology in Vitro*; 20:1403–1410.
- Matés, J., Pérez-Gomez, C., Nùnez De Castro, I., 1999. Antioxidant enzymes and human diseases. *Clin Biochem*; 32:595-603.
- Mathy-Hartert, M., Hogge, L., Sanchez, C., Deby-Dupont, G., Crielaard, J.M., Henrotin, Y., 2008. Interleukin-1beta and interleukin-6 disturb the antioxidant enzyme system in bovine chondrocytes: a possible explanation for oxidative stress generation. *Osteoarthritis Cartilage*; 16(7):756-763
- McDermott, C., Allshire, A., Pelt, F. van, Heffron, J.J.A., 2008. In Vitro Exposure of Jurkat T-Cells to Industrially Important Organic Solvents in Binary Combination: Interaction Analysis. *Toxicol. Sci.*; 101:263–274.
- McGlynn, K.A., Quraishi, S.M., Graubard, B.I., Weber, J.-P., Rubertone, M.V., Erickson, R.L., 2008. Persistent Organochlorine Pesticides and Risk of Testicular Germ Cell Tumors. *JNCI J Natl Cancer Inst.*; 100:663–671.
- Meister, A., Anderson, M.E., 1983. Glutathione. *Ann Rev Biochem*; 52:711-60.

- Mellanby, K., 1992. The DDT story. British Crop Protection Council: Hampshire, UK.
- Mellstedt, H., 1975. In vitro activation of human T and B lymphocytes by pokeweed mitogen. *Clin. Exp. Immunol.*; 19:75-82.
- Misra, K., Satinder Brar, K., Verma, M., Tyagi, R. D., Tryvedi, R. K., Sharma, S., 2007. Lindane – A contaminant of global concern.. *J. Ind. Poll. Contr.*; 23(1):169-187.
- Moore, P.D., Yedjou, C.G., Tchounwou, P.B., 2010. Malathion-induced oxidative stress, cytotoxicity and genotoxicity in human liver carcinoma (HepG2) cells. *Environ. Toxicol.*; 25:221-226.
- Muir, D.C.G., Wagemann, R., Hargrave B.T., Thomas D.J., Peakall D.B., Norstrom R.J., 1992. Arctic Ecosystem contamination. *Sci. Tot. Environ.*; 122: 75-134.
- Nagao, T., Saito, Y., Usumi, K., Nakagomi, M., Yoshimura, S., Ono, H., 2000. Disruption of the reproductive system and reproductive performance by administration of nonylphenol to newborn rats. *Human and Experimental Toxicology*; 19:284-296.
- Nagata, K., Huang, C.S., Hamilton, B.J., Carter, D.B., Narahashi, T., 1996. Differential effects of hexachlorocyclohexane isomers on the GABA receptor subunits expressed in human embryonic kidney cell line. *Brain Res.*; 28:738(1):131-137.
- Neri, A., Zorini, C.O., Brugiattelli, M., Podagrosi, D., 1973. Attivazione linfocitaria in vitro da concanavalina a. *Res. Clin. Lab.*; 3:566-580.
- Oehme, M., Haugen, J.E., Schlabach, M., 1996. Seasonal changes and relations between levels of organochlorines in Arctic ambient air: first result of an all-year-round monitoring program at Ny-Alesund, Svalbard, Norway. *Environ. Sci. Technol.*; 30:2294-2304.
- Pant, N., Kumar, R., Mathur, N., Srivastava, S.P., Saxena, D.K., Gujrati, V.R., 2007. Chlorinated pesticide concentration in semen of fertile and infertile men and correlation with sperm quality. *Environmental Toxicology and Pharmacology*; 23:135–139.
- Payne, J., Scholze, M., Kortenkamp, A., 2001. Mixtures of four organochlorines enhance human breast cancer cell proliferation. *Environ. Health Perspect.*; 109:391–397.
- Pérez-Maldonado, I.N., Diaz-Barriga, F., de la Fuente, H., Gonzàles-Amaro R., Calderòn, J., Yànez, L., 2004. DDT induces apoptosis in human mononuclear cells in vitro and is associated with increased apoptosis in exposed children. *Environ. Res.*; 94:38-46.
- Perugini, M., Cavaliere, M., Giammarino, A., Mazzone, P., Olivieri, V., Amorena, M., 2004. Levels of polychlorinated biphenyls and organochlorine pesticides in some edible marine organisms from the Central Adriatic Sea *Chemosphere*; 57:391–400
- Poletti, A.; Proietti, G.; Murgia, S.M.; Selvaggi, R.; Poletti, L.; Ludovisi, A., 2000. Interference from sulfur in chlorinated pesticides gas chromatographic analysis in lake sediments. *Annali di Chimica*; 90:503-507
- Porta, M., Pumarega, J., López, T., Jariod, M., Marco, E., Grimalt, J.O., 2009. Influence of tumor stage, symptoms, and time of blood draw on serum concentrations of organochlorine compounds in exocrine pancreatic cancer. *Cancer Causes & Control*; 20:1893–1906.
- Prybilova, P., Kares, R., Borukova, J., Cupr, P., Prokes, R., Kohoutek, J., Holoubek, I., Klanova, J., 2012. Levels of persistent organic pollutants and polycyclic aromatic hydrocarbons in ambient air of Central and Eastern Europe. *Atmospheric Pollution Research*; 3:494–505
- Richardson, J.R., Shalat, S.L., Buckley, B., Winnik, B., O'Suilleabhain, P., Diaz-Arrastia, R., Reisch, J., German, D.C., 2009. Elevated Serum Pesticide Levels and Risk of Parkinson Disease. *Arch Neurol.*; 66:870–875.

- Ronchi, B., Danieli, P.P., 2008. Contamination by persistent chemical pesticides in livestock production systems. In: B. Faye and Y. Sinyavskiy (eds.) *Impact of pollution on animal products*. Springer, Amsterdam, The Netherlands, pp 147-162
- Sarkar, S. K., Bhattacharya, B. D., Chatterjee, M., Alam, A., Satpathy, K. K., Jonathan, M.P., 2008. Occurrence, distribution and possible sources of organochlorine pesticides residues in tropical coastal environment of India: An overview. *Environmental International*; 34:1062-1071.
- Scudiero, D.A., Shoemaker, R.H., Paull, K.D., Monks, A., Tierney, S., Nofziger, T.H., Currens, M.J., Seniff, D., Boyd, M.R., 1988. Evaluation of a soluble tetrazolium/formazan assay for cell growth and drug sensitivity in culture using human and other tumor cell lines. *Cancer Res.*; 48:4827-4833.
- Seth, V., Ahmad, R.S., Suke, S.G., Pasha, S.T., Bhattacharya, A., Banerjee, B.D., 2005. Lindane-induced immunological alterations in human poisoning cases. *Clin Biochem.*; 38(7):678-680.
- Severino, L., Luongo, D., Bergamo, P., Lucisano, A., Rossi, M., 2006. Mycotoxins nivalenol and deoxynivalenol differentially modulate cytokine mRNA expression in Jurkat T cells. *Cytokine*; 36:75–82.
- Shimamura, T., Takamori, A., Ukeda, H., Nagata, S., Sawamura, M., 2000. Relationship between the reduction of tetrazolium salt XTT and DNA strand breakage with aminosugars. *J. Agr. Food Chem.*; 48:1204-1209.
- Sies, H., 1999. Glutathione and its role in cellular functions. *Free Rad Biol Med*; 27:916-21.
- Simonich, S.L., Hites, R.A., 1995. Global distribution of persistent organochlorine compounds. *Science*. 29; 269(5232):1851-1854.
- Skakkebaek, N.E., Keiding, N., 1994. Changes in semen and the testis. *British Medical Journal*; 309:1316-1317
- Smith, A.G., 1991. Chlorinated Hydrocarbon Insecticides. *Hand. Pesti. Toxicol.*; 2:731-915.
- Soto, A. M., Sonnenschein, C., Chung, K.L., Fernandez, M.F., Olea, N., Serrano, F.O., 1995. The E-SCREEN assay as a tool to identify estrogens: an update on estrogenic environmental pollutants. *Environmental Health Perspectives*; 103 (S7):113-122.
- Spinelli, J.J., Ng, C.H., Weber, J.-P., Connors, J.M., Gascoyne, R.D., Lai, A.S., Brooks-Wilson, A.R., Le, N.D., Berry, B.R., Gallagher, R.P., 2007. Organochlorines and risk of non-Hodgkin lymphoma. *International Journal of Cancer*; 121:2767–2775.
- Steinmetz, R., Young, P.C.M., Caperell-Grant, A., Gize, E.A., Madhukar, B.V., Ben-Jonathan, N., Bigsby, R.M., 1996. Novel Estrogenic Action of the Pesticide Residue β -Hexachlorocyclohexane in Human Breast Cancer Cells. *Cancer Res.*; 56:5403–5409.
- Storz, P., 2005. Reactive oxygen species in tumor progression. *Front Biosci.*; 10:1881-96
- Syed, A.M., Malik, R.N., Almadar, A., Faheem, H., 2012. Status of organochlorine Contaminants in the different Environmental Compartments of Pakistan: A review on occurrence and levels. *Bull Environ. Toxicol*; 88:303-310.
- Tabb, M.M., Blumberg, B., 2006. New modes of action for endocrine-disrupting chemicals. *Mol. Endocrinol.*, 20:475-482
- Talalay, P., 2000. Chemoprotection against cancer by induction of phase II enzymes. *Biofactors*; 12:5-11.
- Tanabe, S., Iwata, H., Tatsukawa, R., 1994. Global contamination by persistent organochlorines and their ecotoxicological impact on marine mammals. *Sci. Tot. Environ.*; 154:163-177.
- Thomas, G. O., Wilkinson, M., Hodson, S., Jones, K. C., 2005. Organohalogen chemicals in human blood from the United Kingdom. *Environ. Poll.*; 141(I):30-41.

- Thomas, J. A., 1998. Drugs and chemicals that affect the endocrine system. *International Journal of Toxicology*; 17:129-138.
- Tian, J., Chau, C., Hales, T. G., Kaufman, D.L., 1999. GABA_A receptors mediate inhibition of T cell responses. *Journal of neuroimmunology*; 96: 21-28
- Toppari, J., Larsen, J.C, Christiansen, P., Giwercman, A., Grandjean, P., Guillette L. J., Jégou, B., Jensen, T. K., Jouannet, P., Keiding, N., Leffers, H., McLachlan, J.A., Meyer, O., Müller, J., Rajpert-De Meyts, E., Scheike, T., Sharpe, R., Sumpter, J., Skakkebaek, N. E., 1995. Male reproductive health and environmental chemicals with estrogenic effects. (Miljøprojekt nr.290,1995). Ministry of Environment and Energy, Denmark, Danish Environmental Protection Agency; 1995.
- Traina, M. E.; Urbani, E.; Rescìa, M.; Mantovani, A., 2001. L'insetticida lindano: identificazione dei rischi possibili per la riproduzione umana. *Rapporti Istisan*, 3-6.
- Tyler, C.R., Jobling, S., Sumpter, J.P., 1998. Endocrine disruption in wildlife: a critical review of the evidence. *Critical Reviews in Toxicology*; 28:319-361.
- Vairetti, M., Ferrigno, A., Bertone, R., Richelmi, P., Bertè, F., Freitas, I., 2005. Apoptosis vs. necrosis: glutathione-mediated cell death during rewarming of rat hepatocytes. *Biochim. Biophys. Acta*; 1740:367-374.
- Valko, M., Izakovic, M., Mazur, M., Rhodes, C.J., Telser, J., 2004. Role of oxygen radicals in DNA damage and cancer incidence. *Mol Cell Biochem*; 266:37-56.
- Valko, M., Rhodes, C.J., Moncola, J., Izakovic, M., Mazura, M., 2006. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chemico-Biological Interactions*; 160:1–40
- Vercesi, B., 1995. *Diserbanti e loro impiego*, Edagricole, Bologna, pp. 728.
- Vicari A., 1995. La dispersione degli erbicidi nell'ambiente, in 'Informatore Fitopatologico', Luglio- Agosto XLV, 45:8-12.
- Viel, J.-F., Floret, N., Deconinck, E., Focant, J.-F., De Pauw, E., Cahn, J.-Y., 2011. Increased risk of non-Hodgkin lymphoma and serum organochlorine concentrations among neighbors of a municipal solid waste incinerator. *Environ Int.*; 37:449–453.
- Vonk, J.W.; Quirijns, J.K., 1979. Anaerobic formation of a hexachlorocyclohexane from γ -hexachlorocyclohexane in soil and by *Escherichia coli*. *Pest. Biochem. Physiol.*; 12:68-74.
- Vos, J.G., Dybing, E., Greim, H.A., Ladefoged, O., Lambre, C., Tarazona, J.V., Brandt, I., Vethaak, A.D. 2000. Health effects of endocrine-disrupting chemicals on wildlife, with special reference to the European situation. *Critical Reviews in Toxicology*; 30:71-133.
- Walker, K.; Vallero, D. A.; Lewis, R. G., 1999. Factors influencing the distribution of lindane and other hexachlorocyclohexanes in the environment. *Environ. Sci. Technol.*; 33:4373-4378.
- Wang, S., Yu, H., Wickliffe, J.K., 2011. Limitation of the MTT and XTT assays for measuring cell viability due to superoxide formation induced by nano-scale TiO₂. *Toxicol. In Vitro*; 25:2147-2151.
- Weiderpass, E., Adami, H.-O., Baron, J.A., Wicklund-Glynn, A., Aune, M., Atuma, S., Persson, I., 2000. Organochlorines and Endometrial Cancer Risk. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prevention*; 9:487–493.
- Wojtowicz, M. E., Dunn, B. K., Umar, A., 2016. Immunologic Approaches to Cancer Prevention – Current Status, Challenges and Future Perspectives, *Semin Oncol*; 43(1):161-72.
- Word Bank, 2001. *Persistent Organic Pollutants and the Stockholm Convention: a resource guide*. Washington DC, USA. 185

- Xu, X., Dailey, A.B., Talbott, E.O., Ilacqua, V.A., Kearney, G., Asal, N.R., 2010. Associations of Serum Concentrations of Organochlorine Pesticides with Breast Cancer and Prostate Cancer in U.S. Adults. *Environmental Health Perspectives*; 118:60–66.
- Yáñez, L., Borja-Aburto, V. H., Rojas, E., de la Fuente, H., Gonzàles-Amaro, R., Gòmez, H., Jongitud, A. A., diaz-Barriga, F., 2004. DDT induces DNA damage in blood cells. Studies in vitro and in women chronically exposed to this insecticide. *Environmental Research*; 94:18-24.
- Zhao, B., Shen, H., Liu, F., Liu, S., Niu, J., Guo, F., Sun, X., 2011. Exposure to organochlorine pesticides is independent risk factor of hepatocellular carcinoma: A case–control study. *Journal of Exposure Science and Environmental Epidemiology*; 21:601–608.
- Zou, E., Matsumura, F., 2003. Long-term exposure to β -hexachlorocyclohexane (β -HCH) promotes transformation and invasiveness of MCF-7 human breast cancer cells. *Biochemical Pharmacology*; 66:831–840.

PUBBLICAZIONI E CONTRIBUTI

Rossi C., Basiricò L, Danieli PP, Ronchi B (2015). The β -hexachlorocyclohexane (β -HCH) affects the oxidative status of bovine peripheral blood mononuclear cell in vitro. In: Italian Journal of animal science volume 14, supplement 1, 2015 ASPA 21st Congress Milano, June 9-12, 2015, vol. Volume 14 Supplement 1, p. 61-61

Rossi C., Danieli PP, Ronchi B (2014). In vitro effects of the organochlorine pesticide β -hexachlorocyclohexane on bovine peripheral blood mononuclear cells. ITALIAN JOURNAL OF ANIMAL SCIENCE, vol. 13; p. 620-626, ISSN: 1828-051X, doi: 10.4081/ijas.2014.336

Danieli PP, Ronchi B, Rossi C. (2014). Assessing the in vitro cell viability: a comparison between the MTT (or XTT) and Trypan Blue Exclusion (TBE) test. In: Scieconf 2014 The 2nd year of international virtual Scientific Conference. Zijna, 9-13 June 2014EDIS - Publishing Institution of the University of, p. 394-396

Danieli PP, Ronchi B, Rossi C. (2014). Assessing the in vitro viability of bovine peripheral blood mononuclear cells (PBMCs): a comparison between the MTT (or XTT) and Trypan Blue Exclusion (TBE) test. ACTA NATURALIS SCIENTIA, vol. 1; p. 58-61, ISSN: 1339-5

Articoli in fase di sottomissione:

Titolo della sottomissione: "Effects of the organochlorinated pesticide β -hexachlorocyclohexane on Jurkat cells"; autori: Pier Paolo Danieli, Cristina Rossi, Bruno Ronchi) sottomissione prevista Settembre 2016 c.a., rivista (internazionale con IF): Journal of Animal Science.

Ringraziamenti

Desidero innanzitutto ringraziare il Dott. Pier Paolo Danieli, per i suoi preziosi insegnamenti, e per aver lavorato al mio fianco ogni giorno per portare a termine questo progetto di ricerca. Inoltre, ringrazio il Prof. Bruno Ronchi, il Prof. Lacetera, il Dott. Andrea Amici, la Dott.ssa Loredana Basiricò e la Dott.ssa Patrizia Morera che sono stati sempre disponibili a dirimere i miei dubbi e per la fiducia dimostratami in molte occasioni.

Intendo poi ringraziare l'Azienda Agricola Ascenzi Francesco e Silvio SNC e l'Azienda Agricola Montejugo di Viterbo per la disponibilità e la precisione che hanno mostrato nei miei confronti e per i campioni da loro donati che hanno contribuito alla realizzazione di questo progetto di tesi.

Inoltre, vorrei esprimere la mia sincera gratitudine alla Dott.ssa Maria Stella Ranieri, la Sig. Giorgina Kuzminsky, il Sig. Piero Bondi, il Sig. Corrado Bruti, il Dott. Alfredo Fabi, la Sig. Gabriella Porcai e a tutte le Sig.re della segreteria per la disponibilità e la gentilezza che hanno mostrato nei miei confronti, per avermi sempre aiutata e sostenuta durante il mio lavoro e per avermi fatto sentire come a casa.

Ringrazio il Dott. Fabio Mastrogiovanni, per il suo prezioso aiuto in laboratorio soprattutto nell'ultimo periodo di Dottorato, quando i ritmi erano molto serrati.

In ultimo vorrei ringraziare la Dott.ssa Elisabetta Catalani, la Dott.ssa Federica Gabbianelli, il Dott. Daniele Dipasquale e il Dott. Rocco Caracciolo che sono stati preziosi compagni di avventura e sono diventati dei veri e propri amici, oltre che colleghi, e che mi hanno sostenuta e sopportata ogni giorno.

Infine, ho desiderio di ringraziare con affetto la mia famiglia per il sostegno ed il grande aiuto che mi ha sempre dato, grazie a mamma Pina, a papà Roberto, alla sorellona Barbara e al piccolo Lorenzo che con i suoi sorrisi mi ha spesso aiutata ad andare avanti. Grazie ad Adele e Riccardo che mi hanno sempre trattata come una figlia.

Grazie alle mie amiche Irene, Tiziana e Georgia sempre pronte ad aiutarmi e a sostenermi.

In ultimo, ma non per importanza, grazie al mio compagno di vita, Manuel che ha vissuto con me i successi e gli insuccessi della vita, che mi stimola sempre a reagire e mi dà la forza di andare avanti.

Grazie a tutti coloro che hanno creduto in me.