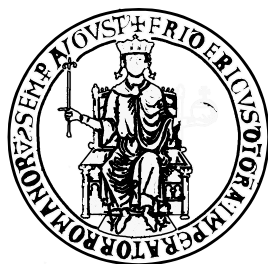


**UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI NAPOLI**  
**“FEDERICO II”**



**DIPARTIMENTO DI FARMACIA**

**DOTTORATO DI RICERCA IN**  
**SCIENZA DEL FARMACO**  
**XXV CICLO**

**STUDIO DEI MECCANISMI D'AZIONE DEI BIFENILI**  
**POLICLORURATI NON DIOSSINO-SIMILI SUL**  
**SISTEMA IMMUNITARIO ED ENDOCRINO**

**DOTTORANDA**

**Dott.ssa PAOLA AMERO**

**COORDINATORE**

**Ch.ma Prof.ssa**

**MARIA VALERIA D'AURIA**

**TUTOR**

**Ch.ma Prof.ssa**

**ROSARIA MELI**

**ANNO ACCADEMICO 2010/2013**

# INDICE

<b>1. INTRODUZIONE</b>	<b>4</b>
<b>2. CARATTERISTICHE CHIMICHE DEI PCB</b>	<b>10</b>
2.1 <i>Congeneri non diossino-simili</i>	12
<b>3. MECCANISMO D'AZIONE</b>	<b>14</b>
<b>4. TOSSICITA'</b>	<b>17</b>
4.1 <i>Immunotossicità</i>	17
4.2 <i>Effetti dei PCB sul sistema endocrino</i>	20
4.3 <i>PCB e Obesità</i>	24
4.4 <i>Cancerogenicità</i>	28
4.5 <i>Neurotossicità e tossicità cardiovascolare</i>	33
<b>5. PCB E APOPTOSI</b>	<b>36</b>
5.1 <i>Effetti apoptotici dei PCB</i>	36
5.2 <i>Apoptosi</i>	37
5.3 <i>Apoptosi e Necrosi</i>	37
5.4 <i>La via estrinseca</i>	40
5.5 <i>La via intrinseca o mitocondriale</i>	40
<b>6. TESSUTO ADIPOSO</b>	<b>43</b>
6.1 <i>Struttura e funzione dell'adipocita</i>	43
6.2 <i>Tessuto adiposo bianco e bruno</i>	45
6.3 <i>Sistema <math>\beta</math>-adrenergico, lipolisi e lipogenesi</i>	46
6.4 <i>L'adipocita: Adipogenesi da fibroblasto a cellula endocrina specializzata</i>	48
6.5 <i>Recettori attivati dalla proliferazione dei perossisomi (PPAR) e differenziamento</i>	50
6.6 <i>Adipochine</i>	53
6.6.1 <i>Leptina e suo recettore ObRb</i>	53
6.6.2 <i>Leptino-resistenza</i>	55
6.6.3 <i>Adiponectina e suoi recettori AdipoR1 e AdipoR2</i>	58
6.7 <i>Citochine</i>	60
6.7.1 <i>Interleuchina-6 (IL-6)</i>	60
6.7.2 <i>Fattore di necrosi tumorale <math>\alpha</math> (TNF<math>\alpha</math>)</i>	61
6.7.3 <i>Interleuchina-10 (IL-10)</i>	63
<b>7. SCOPO DELLA TESI</b>	<b>65</b>
<b>8. MATERIALI E METODI</b>	<b>67</b>
8.1 <i>Esperimenti condotti sui macrofagi murini J774.A1</i>	67
8.1.1 <i>Materiali e reagenti</i>	67
8.1.2 <i>Colture cellulari: Macrofagi murini J774.A1</i>	68
8.1.3 <i>Determinazione della vitalità cellulare: Macrofagi murini J774.A1</i>	69
8.1.4 <i>Determinazione della frammentazione del DNA mediante elettroforesi</i>	70

8.1.5	<i>Colorazione dei nuclei apoptotici mediante DAPI</i>	71
8.1.6	<i>Studio del processo apoptotico</i>	71
8.1.7	<i>Analisi Western blot</i>	72
8.1.8	<i>Analisi statistica</i>	74
8.2	<i>Esperimenti condotti sugli adipociti maturi 3T3L1</i>	75
8.2.1	<i>Fibroblasti murini 3T3L1 e differenziamento adipogenico</i>	75
8.2.2	<i>Detrminazione della vitalità cellulare</i>	75
8.2.3	<i>Red Oil O' Staining</i>	76
8.2.4	<i>Analisi Western blot</i>	77
8.2.5	<i>Analisi Reverse Transcription-PCR</i>	78
8.2.6	<i>Analisi statistica</i>	80
<b>9.</b>	<b>RISULTATI</b>	<b>81</b>
9.1	<i>Esperimenti condotti sui macrofagi J774.A1</i>	81
9.1.1	<i>Effetti dei PCB sulla vitalità cellulare</i>	82
9.1.2	<i>Induzione dell'apoptosi nelle cellule J774.A1</i>	85
9.1.3	<i>Colorazione dei nuclei ipodiploidi con PI</i>	85
9.1.4	<i>Modulazione dell'espressione della caspasi-3, di Bax e di Bcl-2</i>	86
9.2	<i>Esperimenti condotti sugli adipociti maturi 3T3L1</i>	90
9.2.1	<i>Protocollo di differenziamento P0</i>	90
9.2.2	<i>Protocollo di trattamento P4</i>	91
9.2.3	<i>Effetti dei PCB sulla vitalità cellulare</i>	91
9.2.4	<i>Effetti dei PCB sull'accumulo lipidico</i>	93
9.2.5	<i>Modulazione dell'espressione del PPAR<math>\gamma</math></i>	95
9.2.6	<i>Effetti dei PCB sulla funzione degli adipociti maturi</i>	97
9.2.7	<i>Leptina e suo recettore ObRb</i>	97
9.2.8	<i>Leptino-resistenza</i>	100
9.2.9	<i>Adiponectina e suoi recettori AdipoR1 e AdipoR2</i>	103
9.2.10	<i>Effetti dei PCB sulla trascrizione delle citochine IL-6, TNF<math>\alpha</math> e IL-10</i>	107
<b>10.</b>	<b>DISCUSSIONE</b>	<b>112</b>
<b>11.</b>	<b>BIBLIOGRAFIA</b>	<b>123</b>

## 1. INTRODUZIONE

Nell'ultimo secolo, l'aumento delle attività antropiche, quali l'agricoltura intensiva, la produzione di energie, l'industrializzazione improvvida, associate alla necessità di soddisfare l'attuale concezione di benessere di una società sempre più esigente, ha portato ad un sempre più crescente rilascio di sostanze xenobiotiche nell'ambiente, con conseguente forte contaminazione dell'ecosistema globale.

È noto che le diossine non vengano prodotte intenzionalmente, non avendo alcun utilizzo pratico, ma siano sottoprodotti indesiderati di una serie di processi chimici e/o di combustione. Invece, i policlorobifenili, il cui acronimo è PCB, sono una classe di idrocarburi aromatici alogenati utilizzati in svariati settori industriali. Essi hanno una struttura simile a quella del decaclorobifenile, la cui ossidazione parziale può dare origine a diossine clorate, come la 2,3,7,8-tetraclorodibenzo-p-diossina (TCDD). A differenza delle diossine, quindi, i PCB sono sostanze chimiche prodotte deliberatamente tramite processi industriali. Si tratta, infatti, di molecole sintetizzate all'inizio del secolo scorso e prodotte commercialmente fin dal 1930. Essi raggiunsero un grande interesse commerciale negli anni '50, inoltre, a causa della loro notevole inerzia verso altri composti e l'elevata resistenza al calore, sono stati notevolmente sfruttati in campo industriale (Pavan *et al.*, 2003), ma anche in agricoltura (Safe *et al.*, 1985; Safe, 1994) come additivi in pesticidi, vernici,

ritardanti di fiamma, plastificanti e adesivi (World Health Organization, WHO, 1998).

Nei primi anni '70, sono state adottate norme legislative atte a vietarne la produzione, determinando una lenta diminuzione dei livelli di fondo di tali inquinanti (Noren e Meironyte, 2000). Tuttavia tali composti continuano a giungere nell'aria-ambiente come rifiuti dei materiali in cui sono stati impiegati e, con diverse modalità, danno origine a processi di accumulo in specifici comparti/matrici ambientali (suoli e sedimenti) e di bioaccumulo in prodotti (latte e vegetali a foglia larga) ed organismi (fauna ittica ed erbivori). In particolare, l'elevata lipofilia e stabilità chimica rendono i PCB difficili da degradare e favoriscono i fenomeni di bioaccumulo e biomagnificazione negli organismi viventi, causando numerosi effetti avversi sulla salute umana. La maggior fonte di contaminazione umana da PCB è rappresentata dall'assunzione di tali inquinanti attraverso gli alimenti anche se, in alcuni casi, non sono da sottovalutare l'inalazione e l'esposizione cutanea.

Sebbene sia noto che i PCB non inducano frequentemente nei mammiferi una tossicità di tipo acuta, la maggior parte di essi è responsabile di una tossicità cronica, con alterazione di numerose funzioni fisiologiche, inadeguato riconoscimento del pericolo, non corretta stima dei livelli residuali e della tossicità da accumulo.

Studi riportano che l'esposizione a lungo termine a tali composti sia da correlare a gravi danni a carico del sistema nervoso (Shantz *et al.*, 2001), con

effetti anche di tipo comportamentale, del sistema endocrino, riproduttivo (Lyche *et al.*, 2004) ed immunitario (Mori *et al.*, 2008, Selgrade, 2007) nei mammiferi.

Nell'ambito dei PCB non diossino-simili sono stati individuati sette “*PCB target*”, ovvero i congeneri considerati dalla Comunità Scientifica Internazionale come indicatori del grado di contaminazione da PCB e diossine. Per tali congeneri sono, a tutto oggi, richiesti approfonditi studi per valutare i meccanismi di tossicità, i livelli ambientali, al fine di consentire la conferma o la ridefinizione dei Limiti Massimi Residuali (LMR) ammessi recentemente dalla Comunità Europea (Reg. UE 1259/2011) nei prodotti alimentari di origine animale.

I PCB 101, PCB 153 e PCB 180, utilizzati nel nostro studio, fanno parte del gruppo dei policlorobifenili non diossino-simili (PCB NDL). La scelta è ricaduta sui PCB 153 e 180 per essere quelli più abbondanti nel tessuto adiposo (Duarte-Davidson *et al.*, 1994) ed il PCB 153, in particolare, è il congenere che si presenta alla più alta concentrazione nel latte materno (De Saeger *et al.*, 2005; Furst, 2006; Kostyaniak, 1999), mentre il PCB 101 è stato scelto per essere il congenere meno studiato.

La valutazione, *in vitro*, degli effetti proapoptotici dei PCB 101, 153 e 180 è stato l'oggetto di studio durante il primo anno di dottorato. Per tale scopo, si è utilizzato una linea cellulare continua di macrofagi murini J774.A1, e, combinando tecniche biochimiche e morfologiche, abbiamo ottenuto dati

sperimentali che sostengono l'ipotesi che i PCB causano la morte delle cellule macrofagiche per apoptosi. Nelle condizioni sperimentali da noi scelte, il processo apoptotico indotto dai PCB è stato studiato tramite il classico saggio dell'MTT, la fluorescenza con il DAPI, la frammentazione del DNA con l'elettroforesi su gel di agarosio e la valutazione dei nuclei ipodiploidi con il propidio ioduro (PI). Inoltre, è stata valutata la modulazione dell'espressione di proteine coinvolte nel fenomeno apoptotico, quali la caspasi-3, Bcl-xl (antiapoptotica) e Bax (proapoptotica).

Durante gli ultimi due anni di dottorato, noto che tra macrofagi e adipociti esista un “*crosstalk*”, siamo andati a valutare gli effetti di tali congeneri su una linea cellulare continua di fibroblasti murini 3T3L1 capaci, *in vitro* e sotto opportuni stimoli, di differenziarsi ad adipociti, acquisendo tutte le caratteristiche morfologiche e funzionali tipiche dell'adipocita maturo.

Inoltre, i PCB, lipofili, si accumulano nei tessuti adiposi degli organismi viventi (Longnecker *et al.*, 1997) ed interagiscono con i componenti cellulari (Wolff *et al.*, 1997; Haddad *et al.*, 2000). Dati statistici riportano che nel corso degli ultimi decenni il tasso di obesità è notevolmente aumentato, tale da diventare uno dei più gravi problemi di salute pubblica del XXI secolo (Formiguera *et al.*, 2004), favorendo l'insorgenza di malattie metaboliche quali l'aterosclerosi, l'iperglicemia, le dislipidemie e l'ipertensione. A livello cellulare, lo sviluppo della massa grassa consiste sostanzialmente nell'alterazione del volume dei lipidi accumulati nelle cellule adipose, nel

reclutamento dei preadipociti, nella loro successiva induzione a differenziare in adipociti ricchi di lipidi e nell'apoptosi degli adipociti stessi (Prins *et al.*, 1997; Arner *et al.*, 2010). Studi recenti sono concordi nel ritenere che i PCB possano essere coinvolti nello sviluppo dell'obesità e nell'interferenza delle funzioni endocrine e metaboliche di questo tessuto (Grün *et al.*, 2007; Tang-Péronard *et al.*, 2011). Lo sviluppo e le funzioni del tessuto adiposo sono in parte controllati dalla replicazione dei preadipociti, che può essere modulata dai contaminanti. Infatti, è stato evidenziato che l'esposizione ad alcuni PCB diossino-simili e non- possa modulare la capacità proliferativa dei preadipociti (Chapados *et al.*, 2012).

Nelle condizioni sperimentali scelte, l'adipogenesi è stata determinata tramite saggio di proliferazione cellulare, tecnica istologica di colorazione con il Red Oil O' (Ramirez-Zacarias *et al.*, 1992) e valutazione della modulazione dell'espressione della principale proteina, coinvolta nel differenziamento adipocitario e nel mantenimento dello stato differenziato della cellula, il PPAR- $\gamma$  (Peroxisome Proliferator Activated Receptor- $\gamma$ ). Inoltre, il tessuto adiposo svolge un ruolo cardine non solo nello *storage* e nella mobilizzazione di sostanze ad elevata energia metabolica ma ricopre un ruolo fondamentale anche nella regolazione dell'omeostasi energetica dell'intero organismo attraverso la secrezione di specifici ormoni. Per tale motivo, abbiamo valutato se i PCB in esame, da soli o in associazione, per evidenziarne l'eventuale



effetto sinergico, modulassero la trascrizione di importanti adipochine e citochine secrete dagli adipociti maturi.

## 2. CARATTERISTICHE CHIMICHE DEI PCB

I bifenilipoliclorurati, insieme alle diossine (policloro-dibenzo-p-diossine, PCDD) ed ai furani (policloro dibenzofurani, PCDF) (Tab.1), sono riconosciuti a livello internazionale come composti appartenenti al gruppo dei *Persistent Organic Pollutants* (POP).

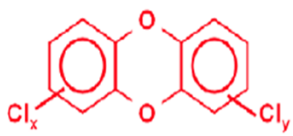

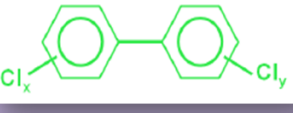
NOME	STRUTTURA	NUMERO DI CONGENERI
POLICLORODIBENZO- DIOSSINE (PCDD)		75
POLICLOROFURANI (PCDF)		135
POLICLOROBIFENILI (PCB)		209

Tabella 1: Struttura e numero di congeneri delle diossine, dei furani e dei PCB

I PCB sono una classe di composti aromatici biciclici costituiti da molecole di bifenile variamente clorate. Essi vengono ricavati a partire dal petrolio e dal catrame, dai quali si estrae il benzene, che viene poi trasformato in bifenile. Il bifenile viene successivamente clorurato a policlorobifenile.

La loro struttura chimica fa sì che i PCB siano una numerosissima famiglia, la cui formula bruta è  $C_{12}H_{10-x}Cl_x$ , (Fig. 1), distinti in relazione al diverso numero di atomi di cloro (da 1 a 10) e alla disposizione degli stessi (2'3'4'5'6'2''3''4''5''6'').

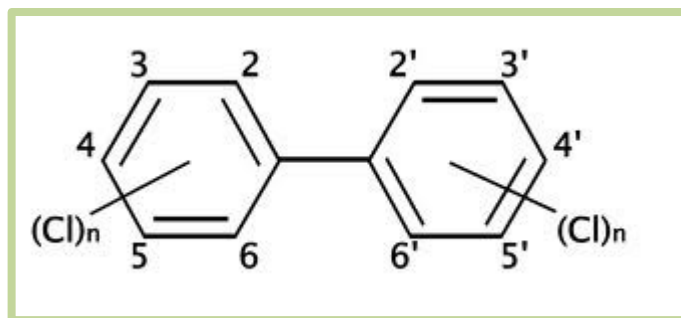


Figura 1: Formula generale di struttura dei PCB

Per la loro classificazione si può ricorrere alla nomenclatura IUPAC (International Union of Pure and Applied Chemistry) oppure assegnare ad ogni congenere un numero tra 1 e 209. In generale con il termine PCB ci si riferisce ad una miscela di più congeneri, anche se spesso viene considerato come una singola entità chimica.

Le caratteristiche chimico-fisiche e la tossicità sono notevolmente influenzate dalla struttura, con conseguenze dirette sulla persistenza e bioaccumulo dei singoli congeneri. Generalmente, tutti i congeneri mostrano una solubilità in acqua bassa (inversamente proporzionale al grado di clorurazione), una discreta solubilità in solventi organici e un'elevata lipofilia (Pizzin *et al.*, 2006).

I policlorobifenili sono, inoltre, suddivisi in due gruppi in base alla diversa possibilità che hanno gli atomi di cloro di disporsi su un unico anello del bifenile o su entrambi.

Solo 19 dei 209 congeneri dei PCB presentano caratteristiche chimico-fisiche e tossicologiche paragonabili alle diossine e ai furani: questi vengono definiti PCB diossino-simili e indicati con la sigla PCB DL. Gli elementi più

importanti nel determinare lo stesso meccanismo di azione della 2,3,7,8-TCDD risultano essere le dimensioni molecolari e la conformazione di tipo planare. Proprio questa somiglianza strutturale fa sì che i PCB DL agiscano, a livello cellulare, in maniera simile alla 2,3,7,8-TCDD, interazione che non è possibile per i congeneri indicati come PCB non diossino-simili (NDL). Infatti, gli effetti dei PCB DL, sulla salute umana e sugli organismi, sono analoghi a quelli evidenziati per le diossine (Ahlborg *et al.*, 1994).

Sia i congeneri diossino-simili che non diossino-simili sono molto stabili alle variazioni di pH, alla fotodegradazione e all'ossidazione. I PCB, inoltre, sono sostanze non infiammabili (se il numero di atomi di cloro è maggiore di 4) e poco volatili, evaporano a temperature superiori agli 800° C e si decompongono solo oltre i 1000°C. Infine, caratteristiche quali la bassa costante dielettrica, la densità maggiore dell'acqua, l'elevata lipofilia li rendono difficilmente biodegradabili.

## 2.1 CONGENERI NON DIOSSINO-SIMILI

Oggetto del nostro studio sono tre congeneri non diossino-simili: il PCB 101 (2,2',4,5,5'-pentaclorobifenile), PCB 153 (2,2',4,4',5,5'-esaclorobifenile) e PCB 180 (2,2',3,4,4',5,5'-eptaclorobifenile) (Fig. 2), il cui numero di atomi di cloro aumenta progressivamente dal PCB 101 al 180 con conseguente incremento della lipofilia, della tendenza a persistere nell'ambiente e ad accumularsi nel tessuto adiposo. Essi sono identificati dal Consiglio

Internazionale per l'Esplorazione Marina (ICES) come marcatori del grado di contaminazione ambientale dovuto ai PCB. Tali congeneri, inoltre, hanno destato sempre maggiore interesse in quanto rilevati frequentemente, a livelli residuali elevati, in matrici alimentari destinate al consumo umano o in reperti biologici provenienti da soggetti esposti.

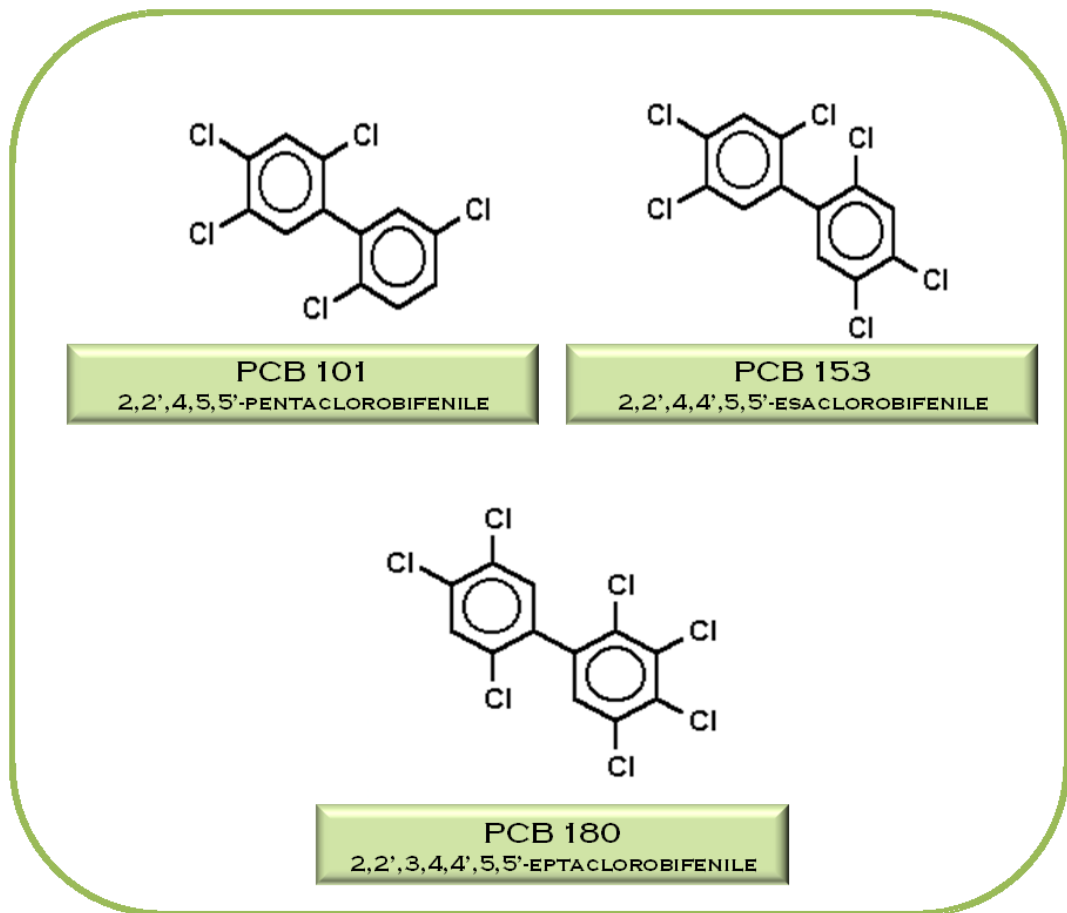


Figura 2: Formule di struttura dei PCB 101, 153 e 180

### 3. MECCANISMO D'AZIONE

La maggior parte degli effetti indotti dai PCB diossini-simili sono dovuti, come per la TCDD, all'attivazione del recettore degli idrocarburi arilici (AhR), sebbene anche l'interazione con il Recettore Costitutivo per l'Androstano (CAR) e con il recettore X presente in gravidanza (Ludewig *et al.*, 2007) svolga un ruolo determinante per la loro tossicità.

L'AhR é un recettore citosolico che, nella forma inattiva, lega una heat shock protein (Hsp 90). In seguito al legame della TCDD al recettore Ah, si verifica il distacco sia della proteina inibitoria Hsp90 che di un particolare polipeptide simil-chaperone detto p23. Successivamente il complesso, costituito dalla TCDD e dal recettore Ah, migra nel nucleo dove, attivato il fattore di trascrizione, del tipo elica-loop-elica (HLH), ARNT (Ah Receptor Nuclear Translocator), induce la trascrizione di geni specifici mediante interazione con i Geni di Risposta alla Diossina (Dioxin Responsive Elements, DRE). Tali geni risultano implicati nei meccanismi di differenziamento e divisione cellulare, nel metabolismo di alcuni ormoni, come quelli tiroidei, e nella regolazione dell'espressione di alcuni fattori di crescita (Fig. 3). I cosiddetti elementi di risposta alla diossina (DRE) sono adiacenti al gene CYP1A1 che codifica per la trascrizione del citocromo microsomiale P-450 1A1, un complesso enzimatico inducibile deputato alla biotrasformazione ed all'eliminazione delle sostanze ambientali tossiche dall'organismo (Hahn, 2002). Il tipo di geni trascritto dipende dal tipo di

miscela di diossine, dall'affinità di quest'ultime per il recettore Ah (che presenta tre diverse isoforme), dalla concentrazione dell'inquinante, dal tipo di esposizione e dalla variabilità biologica interindividuale. Gli effetti tossici dei PCB DL sono simili a quelli evidenziati per le diossine.

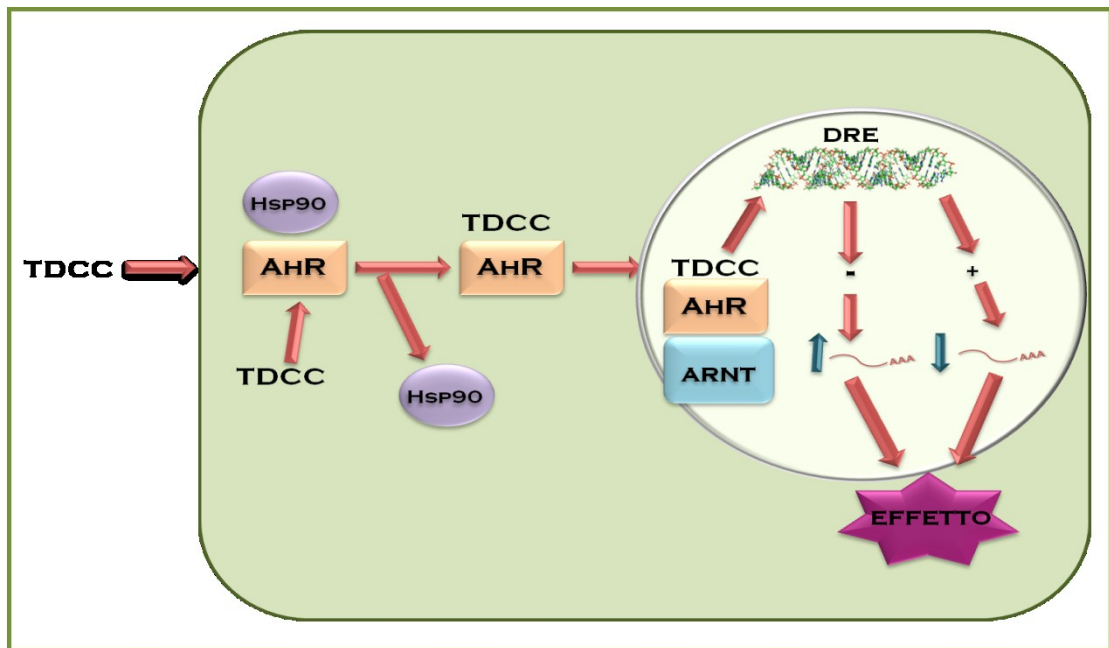


Figura 3: Meccanismo d'azione delle diossine

La maggior parte dei PCB NDL evoca, d'altro canto, altri tipi di risposte non collegate all'interazione con il recettore Ah, tra le quali si annoverano la diminuzione dei livelli di dopamina, l'alterazione dei livelli degli ormoni tiroidei ed il legame al recettore degli estrogeni (Safe, 1990). Alcuni PCB hanno mostrato attività estrogenica o androgenica *in vitro* (Andersson *et al.*, 1999; Arcaro *et al.*, 1999). In particolare, alcune caratteristiche strutturali aiutano a prevedere quale PCB sia in grado di legarsi al recettore degli estrogeni e possono, quindi, mediare la risposta estrogenica. È stato dimostrato, infatti, che la sostituzione, in posizione orto, con un atomo di

cloro, limita la libertà torsionale intorno al legame tra i due anelli fenilici, e l'idrossilazione nella posizione para aumentano l'affinità dei PCB per il recettore degli estrogeni (Fielden *et al.*, 1997). Sebbene si siano ottenuti differenti risultati circa gli effetti dei PCB sullo sviluppo delle gonadi, a seconda degli animali e dei congeneri considerati, in generale, si può asserire che i PCB e i loro metaboliti interferiscono con la determinazione e differenziazione sessuale (Zhou *et al.*, 2004). I congeneri non diossinossimili hanno un profilo di tossicità ben diverso da quello della diossina. In particolare, in studi *in vivo* su ratti, hanno dimostrato che il PCB 153 attiva il fattore nucleare  $\kappa$ B (Nuclear Factor- $\kappa$ B, NF- $\kappa$ B) anche dopo una singola somministrazione (Lu *et al.*, 2003) e che la delezione della subunità p50 di questo fattore inibisce lo sviluppo di tumori. È stato dimostrato, inoltre, che i PCB 101 e 153 hanno la capacità di mimare l'azione di diversi ormoni, quali, ad esempio, l'estradiolo ( $E_2$ ), determinando la comparsa di infertilità, tumori ed altri disordini ormonali (Negri *et al.*, 2003). La competizione dei PCB con l'estradiolo per i recettori degli estrogeni  $ER\alpha$  ed  $ER\beta$ , in particolare, è coinvolta nel processo di cancerogenesi mammaria (Bonfeld-Jorgensen *et al.*, 2001). I PCB, analizzati in associazione, peraltro, mostrano un effetto sinergico ai fini dell'attività estrogenica (Arnold *et al.*, 1996).



## 4. TOSSICITÀ

### 4.1 IMMUNOTOSSICITÀ

Poche classi di xenobiotici ambientali sono state così studiate per gli effetti immunotossici come i composti idrocarburici alogenati. Essi comprendono oltre ai bifenili policlorurati (PCB), anche i bifenili polibromurati (PBB), i dibenzofurani policlorurati (PCDF), nonché le diossine, che hanno come bersaglio principale della loro tossicità gli organi del sistema immunitario. Sul piano immunotossicologico varie indagini sperimentali, condotte a seguito dell'esposizione a tali inquinanti, hanno dimostrato fenomeni di immunodepressione, con quadri di ipoplasia timica, splenica ed involuzione di tutti i tessuti associati ai linfonodi, pancitopenia, cachessia e promozione oncogena. Nel contesto sperimentale, studi comparati hanno evidenziato che gli animali esposti ai PCB e alle diossine manifestano reazioni immunotossiche molto simili tra loro. Quanto a sensibilità ai composti tossici si riscontrano differenze in rapporto all'età ed al sesso, verosimilmente per effetto del polimorfismo genetico del recettore Ah (Tryphonas, 1994). Studi sulla resistenza dell'organismo a seguito dell'esposizione protratta a composti alogenati ciclici indicano un indebolimento delle difese organiche, come dimostrato dalla maggiore suscettibilità delle anatre all'epatite virale, del topo alla *Salmonella typhimurium* ed alla *Trichinella spiralis*. Anche nell'uomo a seguito dell'esposizione a tali inquinanti sono stati segnalati quadri di indebolimento della risposta immunitaria, ai quali non è stato possibile finora

associare alterazioni specifiche delle funzioni di difesa (Descotes *et al.*, 1986). A Taiwan, in soggetti accidentalmente intossicati da bifenili alogenati si sono osservate alterazioni immunitarie ad oltre un anno dall'episodio acuto, alterazioni rappresentate da riduzione delle concentrazioni sieriche di IgM e di IgA, decremento dei linfociti T, in particolare dei CD4, con CD8 e linfociti B nella norma. È stata rilevata, inoltre, una riduzione dell'ipersensibilità ritardata ed un aumento della risposta linfocitaria alla maggior parte dei mitogeni. I bambini le cui madri sono state fortuitamente esposte agli idrocarburi ciclici alogenati durante la gravidanza e l'allattamento, hanno dimostrato nell'80% dei casi di soffrire nei primi anni di vita di otiti infettive all'orecchio medio e nel 60% dei casi di infezioni polmonari, in conseguenza delle deficienze immunitarie indotte da tali contaminanti ambientali (Dewailly *et al.*, 2000). Gli effetti immunotossici indotti dalle diossine e dai PCB diossino-simili a seguito di ricerche condotte sperimentalmente su cavie, ratti, topi, polli, hanno evidenziato effetti depressivi dell'immunocompetenza con precoci riscontri di ipoplasia timica, mirata alle cellule epiteliali della corticale per effetto dei recettori Ah, maggior suscettibilità alle infezioni, riduzione dell'attività fagocitaria e di quella delle cellule NK.

Il meccanismo dell'immunotossicità da diossine e PCB diossino-simili a livello timico sembrerebbe legato all'incremento della fosforilazione ossidativa della tiroxina dei linfociti B, mentre verrebbe ridotta l'attività

citotossica dei linfociti T, in associazione al forte incremento di fenomeni apoptotici dei timociti.

Sempre nell'uomo a seguito dell'intossicazione protratta da diossina e PCB diossino-simili, alcuni ricercatori hanno osservato attivazione della proliferazione linfocitaria indotta da mitogeni, nonché quadri di linfocitosi nei bambini di Seveso esposti ai composti tossici, rispetto ad altri soggetti di controllo. Se alcuni ricercatori, in operai esposti, hanno evidenziato una riduzione percentuale dei linfociti T CD4, altri ne hanno rilevato un leggero incremento. In prove comparative tra soggetti esposti ed altri non intossicati, non si sono osservate differenze nell'ambito dei due gruppi per quanto attiene le sottopopolazioni linfocitarie ed anche il numero delle cellule NK non ha mostrato variazioni. Anche la valutazione delle immunoglobuline sieriche e del complemento non ha rivelato differenze significative nei valori rilevati. (Kerkvliet, 1995). Tutti i ricercatori concordano nel definire il periodo perinatale il momento di maggiore sensibilità immunotossica, sia a livello umano che animale. I dati bibliografici finora esistenti in materia di immunotossicità indotta dai PCB diossino-simili e dalla diossina nell'uomo non sono molto convincenti, in ragione delle grandi differenze, della mancanza di omogeneità di risultati conseguiti e del carattere sovente marginale delle variazioni osservate. (Kerkvliet, 1995).

## 4.2 EFFETTI DEI PCB SUL SISTEMA ENDOCRINO

I distruttori endocrini (EDC) sono composti esogeni potenzialmente capaci di alterare la regolazione ormonale e il sistema endocrino, di conseguenza, incidono sulla salute e la riproduzione degli animali e dell'uomo (U.S. Environ. Prot. Agency, 2000). Gli EDC possono interferire con la produzione, il rilascio, il metabolismo e l'eliminazione o mimare la funzione degli ormoni naturali (Tabb *et al.*, 2006). In aggiunta agli effetti sullo sviluppo e sulla riproduzione, c'è anche uno riguardante i disordini metabolici che possono essere legati agli EDC.

Il tasso di obesità globale è aumentato drasticamente negli ultimi tre decenni negli adulti, bambini e adolescenti, in particolare nei paesi industrializzati. L'obesità è frequentemente associata con i disordini metabolici (includendo il diabete di tipo 2, la sindrome metabolica, le complicazioni cardiovascolari e polmonari e la malattia epatica) così come altri problemi di salute, come problemi psicologico/sociali, difetti riproduttivi e alcune forme di cancro. Una combinazione tra fattori genetici, stile di vita e fattori ambientali inducono, probabilmente, un rapido e significativo aumento dei tassi di obesità. Sebbene i fattori genetici possano spiegare una parte della predisposizione all'obesità, essi da soli sono incapaci di motivare l'improvvisa comparsa e progressione dell'attuale epidemia di obesità in tutto il mondo.

Il moderno stile di vita, che include un'eccessiva assunzione di cibo, scarsa attività fisica, privazione del sonno e le temperature delle abitazioni più

confortevoli sembrano essere i principali fattori che contribuiscono all'obesità. Tuttavia, l'aumentata incidenza di malattie metaboliche è correlata anche con le modifiche sostanziali dell'ambiente a causa dell'inquinamento chimico derivante dalle procedure industriali e agricole succedutesi nel corso degli ultimi 40 anni. Questo cambiamento nell'ambiente ha portato all'ipotesi che alcune delle numerose sostanze inquinanti ambientali del tipo EDC, interferiscano con vari aspetti del metabolismo e costituiscano un aggiuntivo fattore di rischio per l'obesità (McAllister, 2009; Baillie-Hamilton, 2002). Questa ipotesi è supportata da ricerca *in vitro* ed *in vivo*, nonché da studi epidemiologici che hanno dimostrato che una varietà di inquinanti ambientali EDC possano influenzare l'adipogenesi e l'obesità (Baillie-Hamilton, 2002; Grün, 2009). Tali EDC, infatti, sono stati definiti come *obesogenesi ambientali* (Grün *et al.*, 2006)

Tuttavia, poiché gli effetti collaterali degli EDC possono anche portare ad altre malattie metaboliche come la sindrome metabolica e il diabete di tipo 2, questa sottoclasse di EDC è stata definita anche come *interferenti metabolici* (Ben-Jonathan *et al.*, 2009). E' noto che gli EDC abbiamo un meccanismo comune per le disfunzioni endocrine e metaboliche. Infatti, gli ormoni funzionano principalmente attraverso l'interazione con i recettori affini, che possono essere classificati in due grandi gruppi: i recettori legati alla membrana, che reagiscono soprattutto agli ormoni peptidici come l'insulina e i recettori nucleari (NR), che vengono attivati dall'interazione con piccoli

ormoni lipofili quali gli ormoni sessuali. Gli EDC possiedono molteplici meccanismi d'azione, tuttavia, poiché sono piccoli composti lipofili, una via privilegiata è attraverso l'interazione diretta con un NR, che perturba presumibilmente o modula l'espressione genica a valle. Ad esempio, molti EDC sono associati a disregolazione della riproduzione e dello sviluppo. A tale proposito si ritiene che ciò sia dovuto all'interferenza di tali composti con la funzione del recettore degli estrogeni (ER) e/o recettore degli androgeni (AR), interrompendo la normale attività dei ligandi degli estrogeni ed androgeni.

Inoltre i pesticidi organoclorurati, comprendenti i PCB, le diossine e i furani, sono in grado di alterare il normale sviluppo embrionale e le funzioni riproduttive in età adulta. Ma soprattutto possono influenzare le normali attività mediate dagli estrogeni o androgeni, mimando o antagonizzando le loro funzioni fisiologiche. L'effetto dei pesticidi organoclorurati, sulla differenziale modulazione di geni regolati dagli estrogeni, è tessuto- e composto-specifica e dipende dal bilancio energetico che induce variazioni della dimensione del tessuto adiposo bianco (WAT) (Villa *et al.*, 2004).

L'espressione dei recettori per estrogeni ed androgeni nel WAT è più chiaramente dipendente dalla posizione dei depositi adiposi piuttosto che dal sesso, in particolare i depositi viscerali rappresentano il sito con maggiore densità per tali recettori (Rodriguez-Cuenca *et al.*, 2005). I POP possono legare questi recettori, interferire con gli ormoni e di conseguenza influenzare

il metabolismo energetico cellulare e la deposizione dei grassi. Ridotti effetti degli estrogeni nel WAT (Kamei *et al.*, 2005) hanno confermato che i topi ovariectomizzati erano concordanti con il fenotipo obeso. Inoltre, sono stati associati con i livelli più bassi di recettori nucleari e co-fattori coinvolti nella spesa energetica, quali il recettore legato agli estrogeni 1, PPAR (alfa e delta), e PGC-1 e nella lipogenesi (PPAR- $\gamma$  e SREBP-1c). È interessante notare che la sovra-regolazione della biogenesi mitocondriale e la  $\beta$ -ossidazione dei grassi polinsaturi n-3 della dieta nel WAT è associata con la prevenzione dell'insulino-resistenza (Flachs *et al.*, 2005). La potenza dei pesticidi organoclorurati androgeno-interferenti è discusso in connessione con DDT, DDE, dieldrina, metossicloro e lindan. Attualmente, DDE è il più diffuso metabolita del DDT nel WAT, che è stato dimostrato essere un antagonista del recettore AR (Kelce *et al.*, 1995), analogamente a PCB 118, 138 e 153 (Schrader e Cooke, 2003). Pitteloud *et al.* (2005) hanno dimostrato nell'uomo una correlazione positiva tra la sensibilità all'insulina e livelli sierici di testosterone, che sono stati ulteriormente correlati con le funzioni mitocondriali nei muscoli. Secondo Petersen *et al.* (2003), la disfunzione mitocondriale contribuisce all'insulino-resistenza nei muscoli scheletrici degli anziani. D'altra parte, Imbeault *et al.* (2002) hanno suggerito che la perdita di peso induce un aumento dei livelli plasmatici di inquinanti organoclorurati, ciò può ridurre il metabolismo ossidativo nei muscoli scheletrici degli uomini, ma non nelle donne. Un altro sito della possibile influenza dei POP potrebbe

riguardare la biosintesi degli estrogeni nel WAT, che dipende da una fonte di precursori circolanti di androgeni come il testosterone e la sua catalisi mediante l'aromatasi citocromo P450. Infatti, un difetto dell'aromatasi nel cervello è stato descritto dopo trattamento con i PCB (Hany *et al.*, 1999).

Inoltre un disturbo del fenotipo della biosintesi degli estrogeni locali, dimostrata usando topi knock-out per l'aromatasi, è caratterizzato da una sindrome metabolica con insulino-resistenza, obesità del tronco e steatosi epatica (Simpson *et al.*, 2005).

La capacità degli EDC, di interagire con i recettori nucleari, è supportato e spiega la vasta gamma di perturbazioni metaboliche riportate in studi sperimentali e epidemiologici. Si rafforza così anche il concetto di associare la disregolazione endocrina con quella metabolica.

### **4.3 OBESITÀ E PCB**

L'obesità è uno dei più importanti problemi di salute pubblica nei paesi industrializzati. Il tasso di obesità è notevolmente aumentato negli ultimi anni, in particolare i soggetti più colpiti sembrano essere i bambini e gli adolescenti (U.S. Environ. Prot. Agency, 2000; Tabb *et al.*, 2006). Cambiamenti nelle abitudini alimentari che rendono facilmente disponibili alimenti ad alto contenuto energetico, da un lato, e lo stile di vita sedentario, dall'altro, sono responsabili di tale andamento (Colborn *et al.*, 1993). Tuttavia, la dieta e l'esercizio fisico, da soli, non sono molto efficaci e quindi anche dopo una



notevole perdita di peso molti pazienti riacquistano il peso perso (Chen *et al.*, 2009). Questo accade principalmente, ma non esclusivamente, come conseguenza dell'attivazione di meccanismi contro-regolatori, che tendono a ripristinare il peso corporeo al punto precedente (Hatch *et al.*, 2010). L'obesità è spesso associata ad altre malattie metaboliche quali l'aterosclerosi, l'iperglicemia, le dislipidemie e l'ipertensione. Inoltre essa si caratterizza per l'aumento del tessuto adiposo, ad esempio l'incrementato del peso da 70 a 150 kg comporta il quadruplicarsi della massa grassa mentre rimangono relativamente inalterate quella scheletrica e muscolare (Prins *et al.*, 1997). In particolare, anche in una persona magra, il tessuto adiposo bianco (WAT) rappresenta circa il 15-25% del peso corporeo e questa percentuale può aumentare di più del 50% in casi di pazienti con obesità patologica. Poiché circa il 70% della massa di WAT è formato da lipidi, questo tessuto rappresenta un importante serbatoio per molti contaminanti lipofili (Covaci *et al.*, 2002). La maggior parte di loro appartiene al gruppo dei Persistent Organic Pollutants (POP) la cui concentrazione aumenta ad ogni passaggio della catena trofica. Così cibi, specialmente i grassi contenuti nei pesci, i prodotti a base di carne e latte, sono la principale fonte di esposizione umana ai POP. La quantità di inquinanti organici persistenti nel WAT può variare di diversi ordini di grandezza (Smeds e Saukko, 2001), in base all'esposizione alimentare e alla capacità di accumulare tali sostanze. Diversi studi indipendenti hanno dimostrato che ad una perdita di grasso, a seguito di una

dieta o chirurgia bariatrica, si verifica un aumento della concentrazione di POP nel sangue (Hue *et al.*, 2006; Kim *et al.*, 2011). Il ruolo del WAT nel controllo dei livelli ematici dei POP è stato ulteriormente supportato da studi. Lim *et al.* (2010), in particolare, hanno dimostrato che esiste una correlazione inversa tra i cambiamenti del peso e livelli sierici dei POP. Quindi il dimagrimento comporta una riduzione della concentrazione dei POP nel WAT (Jandacek *et al.*, 2005), viceversa un aumento della massa grassa comporta una riduzione del tasso di eliminazione dei POP (Michalek e Tripathi, 1999).

In uno studio recente, è stato valutato se l'esposizione ai composti organoclorurati (OC) fosse capace di modulare la capacità proliferativa delle cellule progenitrici degli adipociti. A tale proposito i preadipociti umani sono stati trattati con un PCB coplanare (PCB 77) e con uno non coplanare (PCB 153), e pesticidi organoclorurati DDE a diverse concentrazioni. I risultati ottenuti, da questo lavoro, hanno suggerito, per la prima volta, che, a breve termine, l'esposizione ad inquinanti ambientali fosse in grado di promuovere la proliferazione dei preadipociti umani sottocutanei dal 28-72% (Chapados *et al.*, 2012). Precedenti studi *in vitro*, inoltre, hanno riportato effetti positivi all'esposizione agli OC sulla proliferazione valutata su diversi tipi di cellule (Radice *et al.*, 2008; Chang *et al.*, 2008; Endo *et al.*, 2003).

La letteratura è molto limitata nel fornire motivi per cui solo alcune linee cellulari danno risposte dose-dipendente all'esposizione ai composti

organoclorurati sulla proliferazione. Questo potrebbe essere dovuto in parte ad una risposta on-off ad alcuni PCB, che presentano un ampio spettro di effetti biologici e tossici, a seconda del numero e della posizione degli atomi di cloro nell'anello aromatico (Safe, 1994). Un meccanismo ipotizza che gli effetti proliferativi del PCB non diossino-simile 153 possano essere mediati dall'attivazione del pathway della proteina MAPK (proteina chinasi mitogeno-attivata) ed ERK 1/2 (chinasi regolata dai segnali extracellulari 1/2). In molte cellule, attivazione della MAPK/ERK promuove la divisione cellulare (Wang *et al.*, 2009; Xavier *et al.*, 2009). Per esempio, l'attivazione della cascata di ERK 1/2 ha dimostrato promuovere la crescita delle cellule del seno umano (Radice *et al.*, 2008). Il PCB 77 presenta uno o nessun sostituito di cloro nelle posizioni orto e quindi assume una configurazione planare. Questa conformazione gli consente di legare ed attivare il recettore degli idrocarburi arilici (Schechter *et al.*, 2006), che è ritenuto indurre l'arresto del ciclo cellulare in linee cellulari di epatoma murino esposte a TCDD, il più potente attivatore del recettore Ah (Puga *et al.*, 2002; Elferink *et al.*, 2001). In questo studio, è stato dimostrato che l'esposizione al PCB 77 non ha effetto sulla capacità proliferativa dei preadipociti umani. Nonostante il PCB 77 abbia una minore affinità per il recettore Ah, rispetto alla TCDD, non è stata evidenziata alcuna differenza nella capacità proliferativa dei preadipociti umani trattati con il PCB 77 verso il controllo.

Infine, il tessuto adiposo è, oggi, considerato come un organo molto dinamico coinvolto in una vasta gamma di processi fisiologici e metabolici ben oltre la tradizionale ipotesi di considerarlo un semplice sito di immagazzinamento di lipidi.

Il dinamismo di questo organo è stato recentemente confermato con la constatazione che nuovi adipociti si formino costantemente per sostituire gli adipociti persi nell'uomo (Spalding *et al.*, 2008).

L'idea che i preadipociti, nel tessuto adiposo adulto, possano essere stimolati a proliferare e a differenziarsi a cellule mature è stata dimostrata anche in modelli animali (Rodeheffer *et al.*, 2008; Tang *et al.*, 2008). Sulla base di questi risultati, è possibile asserire che gli OC stimolino la capacità proliferativa dei preadipociti del 30-70%. Inoltre è possibile ipotizzare che, sia gli OC che una dieta eccedente il dispendio energetico, possano parimenti contribuire ad indurre il differenziamento dei preadipociti ad adipociti maturi ricchi di lipidi, favorendo l'aumento della massa grassa.

#### **4.4 CANCEROGENICITÀ**

Sebbene molti PCB non siano dotati di una particolare tossicità acuta, la notevole stabilità chimica, la lipofilia come pure la loro tendenza ad accumularsi nel tessuto adiposo, li rendono responsabili di casi di tossicità cronica. Negli animali e nell'uomo, l'esposizione cronica ai PCB produce una serie di effetti tossici tra i quali si annoverano: diminuzione del peso

corporeo, edema, acne clorica, ipertrofia epatica, porfiria, attività estrogenica, immunosoppressione e neurotossicità (National Research Council, 1979; Robertson e Hansen, 2001). Diversi studi epidemiologici hanno esaminato l'attività cancerogena dei PCB nell'uomo ed evidenziato la correlazione fra l'esposizione cronica ai PCB e l'aumento dell'incidenza di cancro al fegato, alle vie biliari e all'intestino nonché del melanoma (Faroon *et al.*, 2001). In seguito all'incidente di Yusho, peraltro, si è registrato un aumento statisticamente significativo della mortalità a causa di cancro al fegato negli uomini (ma non nelle donne) esposti ai PCB (Kuratsune *et al.*, 1996). Silberhon *et al.*, (1990), hanno dimostrato, in uno studio *in vivo*, che le miscele di PCB inducono lesioni preneoplastiche e carcinoma epatico se somministrate a dosi appropriate e per lunghi periodi. È riportato in letteratura, inoltre, che le miscele di bifenili alogenati e i singoli congeneri, sebbene la loro potenza vari, promuovono la cancerogenesi in diversi modelli di cancro al fegato (Glauert *et al.*, 2001). Generalmente i composti che inducono il citocromo P450 hanno una maggiore attività cancerogena (si tratta dei PCB con il più elevato grado di clorurazione). Sono stati effettuati, allo stesso modo, numerosi studi sulla correlazione tra l'esposizione dei soggetti ai PCB e l'incidenza del cancro al seno. Un'analisi condotta negli Stati Uniti non ha evidenziato nessun aumento di incidenza del tumore al seno nelle donne che presentavano elevati livelli ematici di PCB. Tale dato è stato

confermato anche da altri studi, sempre statunitensi, che hanno preso in esame anche i singoli congeneri (Laden *et al.*, 2001).

In uno studio canadese del 2002, invece, che valuta la tossicità dei singoli congeneri, è riportato che elevati livelli dei PCB 118 e 156 sono associati ad aumento di rischio di carcinoma mammario (Demers *et al.*, 2002). Come Archibeque-Engle *et al.*, (1997), affermano, in realtà, non bisogna prendere come riferimento i livelli ematici dei PCB, quanto piuttosto la loro concentrazione nel tessuto adiposo, dove tendono ad accumularsi, se si vuole trovare una correlazione fra l'esposizione a tali composti e l'incidenza del cancro al seno. Benchè uno studio recente, svolto in Danimarca, non abbia evidenziato un aumento del rischio per il tumore al seno nelle donne che presentano elevati livelli di PCB nel tessuto adiposo (Raaschou-Nielsen *et al.*, 2005), numerose ricerche hanno dimostrato il contrario. In particolare per il congenere 183, in uno studio svolto in Spagna, si è evidenziata una stretta correlazione tra i suoi livelli nel tessuto adiposo mammario e l'incidenza del cancro al seno (Lucena *et al.*, 2001). Joshua *et al.*, (2003), inoltre, hanno individuato, determinando i livelli di PCB nel grasso mammario in seguito a biopsia, una correlazione tra la loro concentrazione e l'incidenza di tumori dalla prognosi infausta.

Eum *et al.*, (2004), d'altro canto, hanno proposto per il PCB 104 come probabile meccanismo d'azione alla base della cancerogenesi, nel caso di tumori al seno, l'induzione del Fattore di Crescita dell'Endotelio Vascolare

(VEGF). Tale fattore aumenta la permeabilità endoteliale favorendo, così, la migrazione transendoteliale di cellule tumorali. Tra l'altro uno studio clinico condotto su donne affette da tumore al seno, previo dosaggio dei livelli di PCB nel tessuto adiposo, ha evidenziato un effetto antiestrogenico protettivo del congenere 156 e un aumento di rischio per i congeneri 180 e 183 (Holford *et al.*, 2000). Questa è un'ulteriore conferma sperimentale del fatto che l'attivazione del recettore Ah da parte dei PCB sortisce un'azione antiestrogenica ed antitumorale nelle cellule mammarie umane (Ramamoorthy *et al.*, 1999). È stato, inoltre, evidenziato, in uno studio clinico svolto su donne in post-menopausa, come la mutazione a carico del gene che codifica per il citocromo P450 1A1 (CYP450-1A1), con il quale i PCB interagiscono, associata ad elevati livelli dei PCB stessi nel tessuto adiposo, possa comportare un aumento del rischio di tumore di quasi tre volte (Kirsten *et al.*, 1999; Francine *et al.*, 2002; Li *et al.*, 2005). Tale mutazione è forse legata al fumo di sigaretta. Un altro possibile meccanismo d'azione potrebbe consistere nell'inibizione dell'espressione del gene BRCA1, che svolge un'attività antitumorale e di riparazione del DNA (Rattenborg *et al.*, 2002). In sintesi, il ruolo dei PCB nello sviluppo del tumore al seno è incerto e non pare che queste sostanze possano generare un notevole incremento del fattore di rischio, tuttavia, si può affermare con sicurezza che: 1) i congeneri, come il PCB 118 (un PCB DL oltre che PCB target), sono i più pericolosi anche se è stato loro assegnato un fattore di tossicità equivalente (TEF) inferiore ad altri,

2) la sottopopolazione di donne in post-menopausa è più esposta a tale rischio, 3) i PCB possono peggiorare la prognosi in corso di patologie tumorali e aumentare la mortalità, piuttosto che l'incidenza del tumore. Quindi, non si può escludere che l'inquinamento da PCB abbia giocato un ruolo essenziale nell'incremento della mortalità in seguito a tumore al seno. È stata, tuttavia, dimostrata anche una correlazione significativa tra i livelli del PCB 180 e l'aumento dell'incidenza di tumore maligno alla prostata (Ritchie *et al.*, 2003). Anche in questo caso, i congeneri mostrano un profilo d'azione diverso a seconda della struttura: i PCB 126 e 77, diossino-simili, mostrano un'attività anti-androgenica, mediata dal recettore Ah, e inibiscono la crescita delle cellule tumorali, mentre i PCB 118 e 153, diossino-simili, non attivando il recettore Ah, stimolano la crescita delle cellule tumorali (Endo *et al.*, 2003). In letteratura sono disponibili solo pochi studi sul rapporto fra questa patologia e i PCB. Per quanto concerne, invece, il tumore al colon, in uno studio condotto recentemente in Spagna, si è evidenziata una netta correlazione tra incremento del fattore di rischio (fino a tre volte) ed elevati livelli ematici dei congeneri 28 e 118, non diossino-simili. I congeneri non diossino-simili, come il 101, il 153 o il 180, d'altro canto, non sembrano essere coinvolti (Howsam *et al.*, 2004); si può, pertanto, dedurre da tale studio che solo l'esposizione ai PCB mono-ortosostituiti contribuisca allo sviluppo del cancro al colon.



Elevati livelli di PCB, come dimostra uno studio condotto sui pescatori del Mar Baltico, (1995), determinano, inoltre, un aumento significativo dell'incidenza di tumore allo stomaco. Benchè in tali soggetti fossero ingenti anche i livelli di diossine e furani, è comunque plausibile ipotizzare che l'inquinamento da PCB abbia svolto un ruolo nell'aumento di mortalità in seguito a tale tumore. Infine per quanto concerne il melanoma, è stato condotto uno studio su lavoratori esposti ai PCB, che ha evidenziato un aumento della mortalità, sebbene non si trattasse di un'esposizione cronica (Sinks *et al.*, 1992). Anche De Guire *et al.*, (1992), riscontrano questo aumento, ma il loro studio è poco significativo per il numero esiguo dei casi presi in esame. Tuttavia uno studio statunitense successivo, condotto su una vasta popolazione di operatori di centrali elettriche, risolve il problema della insufficiente significatività e ci consente di asserire con sicurezza che in seguito ad esposizione ad elevati livelli di PCB si ha un aumento di mortalità a causa di melanoma (Loomis *et al.*, 1997). È stata, infine, riscontrata un'associazione positiva tra l'esposizione ai PCB e ai campi magnetici e l'incremento di casi di melanoma (Tynes *et al.*, 1994).

#### **4.5 NEUROTOSSICITÀ E TOSSICITÀ CARDIOVASCOLARE**

Oltre all'attività cancerogena, i PCB, sempre per esposizione cronica, causano un aumento dell'incidenza di casi di ansia, di depressione e di altri disturbi psichiatrici (Michelek *et al.*, 2003). In generale, i neonati sono, fra i soggetti a

rischio, quelli più suscettibili alla tossicità dei PCB, che vengono assorbiti sia durante la gestazione che l'allattamento. Studi epidemiologici suggeriscono che l'esposizione prenatale ai bifenili policlorurati causa: diminuzione delle capacità di memoria e apprendimento, disfunzioni psicomotorie e deficit dell'attenzione (Ribas-Fito *et al.*, 2001). Nonostante siano indispensabili ricerche più approfondite, si può affermare con sicurezza che il meccanismo molecolare, che media queste alterazioni, si fonda sulla diminuzione di dopamina nei gangli della base e nella corteccia prefrontale (Faroon *et al.*, 2001).

È stato anche evidenziato, nel caso di esposizione cronica, un significativo aumento di tutti gli indici di rischio per neuropatia periferica (Michelek *et al.*, 2001). Nello specifico, il PCB 126 e la diossina (TCDD), inoltre, inducono cardiomiopatia nei ratti (Jokinen *et al.*, 2003). Il PCB 77 e la diossina (TCDD), inoltre, causano stress ossidativo e conseguenti processi infiammatori a livello delle cellule endoteliali, attraverso l'attivazione del recettore per gli idrocarburi arilici Ah e del citocromo P450 1A (CYP1A1) (Pachaikani *et al.*, 2003; Scott *et al.*, 2001). In particolare, il PCB104 è capace di stimolare la sintesi e il rilascio dei mediatori dell'infiammazione nelle cellule endoteliali umane. Si è ipotizzato che la sua azione proinfiammatoria possa contribuire allo sviluppo di metastasi, oltre che all'aterogenesi in pazienti esposti ai PCB (Wangsun *et al.*, 2003). Un'aumentata mortalità per patologie cardiovascolari è stata osservata, infatti, sia negli operai di una

fabbrica svedese di condensatori sia in quelli di una centrale elettrica canadese esposti a PCB (Gustavsson *et al.*, 1997; Hay *et al.*, 1997). L'aumento di mortalità per patologie cardiovascolari potrebbe essere associato con la capacità dei PCB di alterare i livelli plasmatici dei lipidi e la pressione arteriosa, modificazioni che si osservano anche in popolazioni esposte per motivi non professionali (Stehr-Green *et al.*, 1986; Tokunaga *et al.*, 2003).

## 5. PCB E APOPTOSI

### 5.1 EFFETTI APOPTOTICI DEI PCB

Studi *in vitro* hanno dimostrato che l'esposizione a miscele commerciali di PCB (Aroclor) causa diminuzione della vitalità cellulare e accelerazione dell'apoptosi in colture cellulari di neuroni (Mariussen *et al.*, 2002), di nefroni (Pèrez-Reyes *et al.*, 2001) e di splenociti (Yoo *et al.*, 1997). Anche i singoli congeneri si sono mostrati capaci di indurre apoptosi in diverse linee cellulari. In particolare, si è visto che i PCB 153, 118 e 74 inducono apoptosi nella linea continua GT1-7 di cellule ipotalamiche, che sintetizzano l'ormone neuroendocrino rilasciante il peptide gonadotropina (GnRH) (Dickerson *et al.*, 2009). Il PCB 153, inoltre, insieme al PCB 77 induce tale processo in colture primarie di neuroni corticali (Sánchez-Alonso *et al.*, 2003). Di notevole interesse, peraltro, risulta lo studio di Howard *et al.*, (2003), in cui non solo si evidenziano gli effetti apoptotici dei PCB 47 e 77 su colture primarie di neuroni ippocampali ma si chiarisce anche il meccanismo d'azione di tali congeneri. Si dimostra, infatti, che questi composti inducono morte cellulare con un meccanismo caspasi-dipendente attivando il recettore della rianodina (RyR). Infine in letteratura è riportato che i PCB 153 e 126 inducono apoptosi anche nelle cellule ipofisarie AtT20 (Jhoansson *et al.*, 2006).

## 5.2 APOPTOSI

L'apoptosi è un processo fisiologico, presente in tutti gli eucarioti multicellulari (Ellis *et al.*, 1991), che consente l'omeostasi tra la proliferazione e la morte cellulare. Tale processo, geneticamente controllato e altamente conservato nel corso dell'evoluzione, permette il corretto sviluppo nello stadio embrionale nonché l'omeostasi dei tessuti quando l'organismo è adulto (Orrenius *et al.*, 2003). In particolare, l'apoptosi ha un ruolo chiave nella morfogenesi (Vaux *et al.*, 1994), nella differenziazione sessuale e nella regolazione dei sistemi immunitario e nervoso (Ameisen, 2002). Studi approfonditi hanno evidenziato una diminuzione dell'apoptosi in patologie neoplastiche e/o autoimmuni e un incremento della morte cellulare in patologie degenerative e nell'immunodeficienza.

## 5.3 APOPTOSI E NECROSI

Il termine apoptosi, coniato da Kerr nel 1972, è sinonimo della definizione "morte cellulare programmata" introdotta da Lockshin nel 1964. L'apoptosi, a differenza della necrosi non è un processo silente, ma è la cellula stessa che, trascrivendo geni specifici, sintetizzando nuovi enzimi e consumando energia, inizia e porta avanti il processo di morte; ed alla fine morendo, emette segnali che capaci di modificare il comportamento delle cellule vicine, comprese quelle che la devono ingerire (Arnoult *et al.*, 2002) (Tab. 2). La morte per necrosi, invece, avviene in seguito a gravi ed irreversibili danni patologici

come ipossia, ipertermia, infezioni virali, esposizione a vari agenti tossici o per l'attacco del complemento (Israels, 1999). Questi eventi portano alla perdita dell'integrità delle membrane degli organuli cellulari, incluso il nucleo, con conseguente rilascio del loro contenuto (ATP, proteasi e lisozimi) sino alla rottura dell'intera cellula e degradazione del DNA in modo aspecifico.

	<b>APOPTOSI</b>	<b>NECROSI</b>
Istologia	Colpisce cellule isolate in tessuti vitali	Muiono gruppi di cellule distruggendo la struttura del tessuto
Citologia	Nuclei picnotici, citoplasma condensato, frammenti cellulari rotondi	Edema cellulare; Nuclei intatti ma colorati debolmente ;
Test di esclusione del colorante	I coloranti sono inizialmente esclusi	I coloranti entrano
Ultrastruttura citoplasma	Reticolo endoplasmatico dilatato; Membrana plasmatica intatta	I mitocondri mostrano un rigonfiamento di grande entità e corpi densi nella matrice; Profili di organuli dilatati; Rotture della membrana plasmatica e delle membrane interne
Nucleo	Cromatina condensata in semilune e toroidi; Disintegrazione nucleare	Cromatina con struttura più grossolana, ma mantiene una distribuzione normale
Circostanze	Spesso in casi di "morte programmata"; Atrofia; Uccisione immunitaria cellulo-mediata; Tossine (basse dosi)	Mai in condizioni fisiologiche; Complemento; Ipossia; Tossine (alte dosi)
Effetti sui tessuti	Nessuna infiammazione; Fagocitosi ad opera di cellule adiacenti; Rapida involuzione senza collasso della struttura dell'intero tessuto	Infiammazione acuta; Cicatrizzazione tardiva

*Tabella 2: Differenze morfologiche tra apoptosi e necrosi*

Tale fenomeno, che la cellula subisce passivamente, innesca una risposta infiammatoria con rilascio di citochine da parte dei macrofagi. Durante l'apoptosi, invece, le cellule si condensano, in quanto il volume citosolico diminuisce, perdono le specializzazioni di membrana e si staccano dalle cellule vicine senza che ci sia una risposta infiammatoria, perchè a differenza

della necrosi, non avviene rilascio del contenuto citosolico nei tessuti circostanti. Tuttavia, l'integrità degli organuli interni viene mantenuta almeno nelle fasi precoci del processo, mentre a livello nucleare avviene la disgregazione del/i nucleolo/i, la condensazione e la frammentazione della cromatina in porzioni di 180-200 paia di basi o multipli.

La cromatin, degradata, si compatta in granuli che si spostano verso la periferia del nucleo e raggiungono la membrana plasmatica, dove vengono circondati da evaginazioni della stessa, fornendo alla cellula un aspetto simile a bolle (dall'inglese "blebbing"). Queste si staccano dal corpo cellulare trascinando con sé parte del citoplasma e del materiale nucleare dando origine ai cosiddetti "corpi apoptotici", fagocitati rapidamente dai macrofagi, senza che si abbia una reazione infiammatoria.

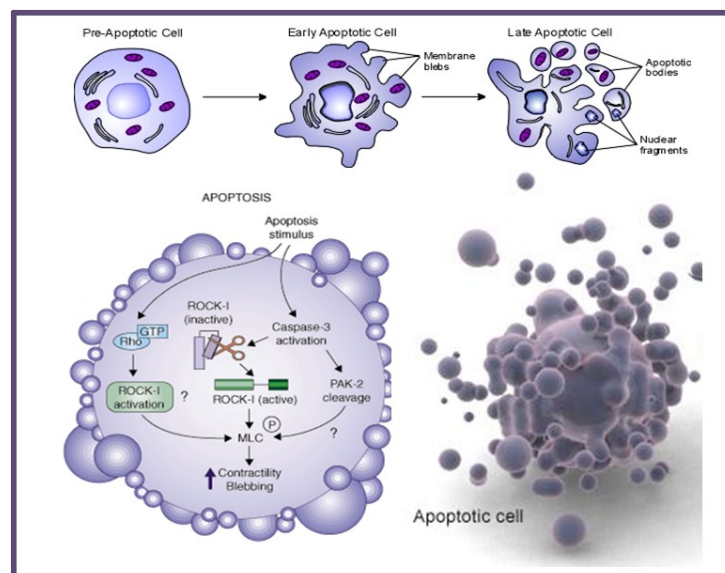


Figura 4: Formazione delle "membrane blebbing"

L'apoptosi può essere indotta da molteplici stimoli, sia intra che extra-cellulari, i quali attivano diverse vie. Tra queste la via estrinseca richiede la

presenza di recettori sulla membrana citoplasmatica e coinvolge la caspasi-8; la via intrinseca è incentrata sul ruolo svolto dai mitocondri e coinvolge la caspasi-9 (Hengartner, 2000).

#### **5.4 LA VIA ESTRINSECA**

La via estrinseca richiede l'attivazione di specifici recettori di morte (death receptors, DR). Questi appartengono ad una famiglia denominata TNF-R (Tumor Necrosis Factors Receptors) che include sei recettori (TNF-R1, Fas, DR3, DR4, DR5 e DR6). Il legame, ad esempio, del TNF (Tumor Necrosis Factor) al TNFR-1 può determinare l'attivazione della caspasi-8 ed innescare la via estrinseca. Questo è un processo complesso che richiede la trimerizzazione del recettore, reclutando il dominio di morte (death domain, DD) e due proteine adattatrici (TRADD e FADD/MORT-1). La proteina FADD/MORT-1, a sua volta, contiene un dominio che lega procaspasi-8 attivandola (Hengartner, 2000; Strasser *et al.*, 2000) (Fig. 5).

#### **5.5 LA VIA INTRINSECA O MITOCONDRIALE**

La via mitocondriale è attivata in risposta sia ad insulti interni, come il danneggiamento del DNA, che a segnali extracellulari, come la mancanza di fattori di crescita. Tali stimoli convergono sui mitocondri e conducono al rilascio del citocromo c, della proteina secondaria attivatrice di caspasi



(SMAC), del fattore inducente l'apoptosi (AIF) che è legato alla condensazione della cromatina e della endonucleasi G.

In questo processo sono implicati i membri della famiglia Bcl-2 pro-apoptotici e, in particolare, Bax. Questi traslocano dal citosol (dove sono inattivi) agli organuli cellulari dove sono attivati via proteolisi, defosforilazione o altri meccanismi. Una volta localizzati sulla membrana mitocondriale esterna, i membri pro-apoptotici competono con quelli anti-apoptotici nella formazione di canali attraverso cui verranno rilasciate le varie proteine. Una volta rilasciato, il citocromo c si associa con la proteina fattore attivante proteasi apoptotiche (Apaf-1) e con la procaspasi-9 formando l'apoptosoma, complesso in grado di attivare la caspasi-9. L'azione dell'apoptosoma viene antagonizzata da una famiglia di inibitori di caspasi chiamati inibitori dell'apoptosi (IAPs), ma questi, a loro volta, sono inibiti da SMAC/DIABLO e Htra/Omi (Breckenridge e Xue, 2004).

Il citocromo c è rilasciato nel citosol grazie a diversi meccanismi. Tra questi di notevole interesse è il meccanismo che prevede la permeabilizzazione della membrana mitocondriale esterna e coinvolge i membri della famiglia di proteine Bcl-2 (come Bax). Il citocromo normalmente è legato alla membrana mitocondriale interna attraverso un fosfolipide anionico detto cardiolipina. La dissociazione del citocromo c dalla cardiolipina è un importante primo passo per il rilascio del citocromo c nel citosol. Tale rilascio può essere stimolato

dalla produzione di specie reattive dell'ossigeno (ROS) così come dal legame del  $\text{Ca}^{2+}$  alla cardiolipina (Orrenius, 2003).

Recenti studi hanno dimostrato il coinvolgimento dei membri pro-apoptotici Bax e Bak nella regolazione del  $\text{Ca}^{2+}$  cellulare (Petronilli *et al.*, 2001). Bax e Bak traslocano dal citosol al reticolo endoplasmatico (dove causano diminuzione delle scorte di  $\text{Ca}^{2+}$ ) ed ai mitocondri (nei quali aumentano la capacità di captare il  $\text{Ca}^{2+}$ ), causando variazioni della permeabilità (Petronilli *et al.*, 2001). La via estrinseca e quella intrinseca conducono entrambe all'attivazione di enzimi effettori chiamati caspasi (Cisteina ASPartato proteASI), il cui ruolo principale consiste nell'amplificazione dei segnali apoptotici (Fig. 5).

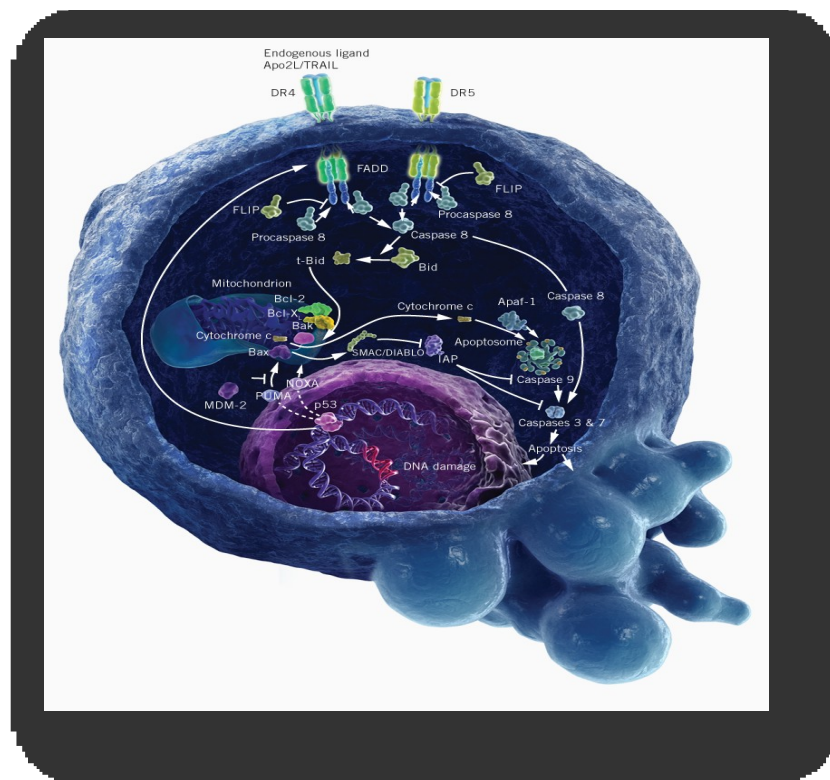


Figura 5: Via estrinseca ed intrinseca dell'apoptosi

## 6. TESSUTO ADIPOSO

### 6.1 STRUTTURA E FUNZIONE DELL'ADIPOCITA

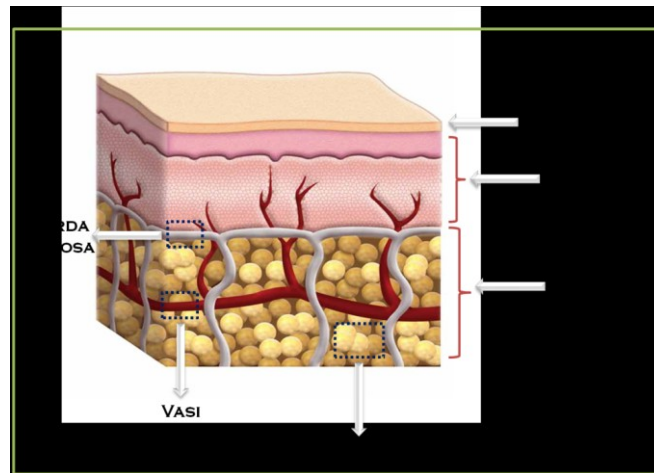


Figura 6: Struttura del tessuto adiposo sottocutaneo

Nel corpo, il tessuto adiposo è suddiviso in due principali depositi: tessuto adiposo sottocutaneo (SCAT) (Fig. 6) e tessuto adiposo viscerale (VAT). Numerosi studi riportano che il tessuto adiposo, oltre ad essere un sito di riserva energetica, produce varie sostanze con azione autocrina, paracrina e neuroendocrina che influenzano il comportamento, la regolazione dell'energia, l'ossidazione dei lipidi, la funzione immunitaria e vascolare, nonché lo stato ormonale, il metabolismo e la funzione cellulare (Galic *et al.*, 2010; Ouchi *et al.*, 2011). Il tessuto adiposo si caratterizza per avere numerose funzioni, in parte dovute alla grande varietà di cellule che “popolano” questo tessuto, come le cellule progenitrici degli adipociti (preadipociti) in diversi stati di differenziazione, le cellule vascolari, cellule del sistema nervoso centrale, i fibroblasti e molte cellule immunitarie quali linfociti, macrofagi, mast cellule e cellule satellite connesse ai vasi e ai nervi (Cinti, 1999).

Le cellule adipose si sviluppano dai lipoblasti derivati dal mesenchima e sono distinti in adipociti bruni e bianchi (Fig. 7). Essi sembrano avere una differente morfologia ed opposte funzioni. Nonostante ciò, dettagliati studi anatomici riportano che entrambi i tipi cellulari sono contenuti insieme in numerose locazioni anatomiche, formando organi multipli di deposito adiposo (Cinti, 1999; Cinti, 2005). Forme intermedie tra adipociti bianchi e bruni sono presenti in tutti i depositi dell'organo adiposo (Murano *et al.*, 2009; Vitali *et al.*, 2012).

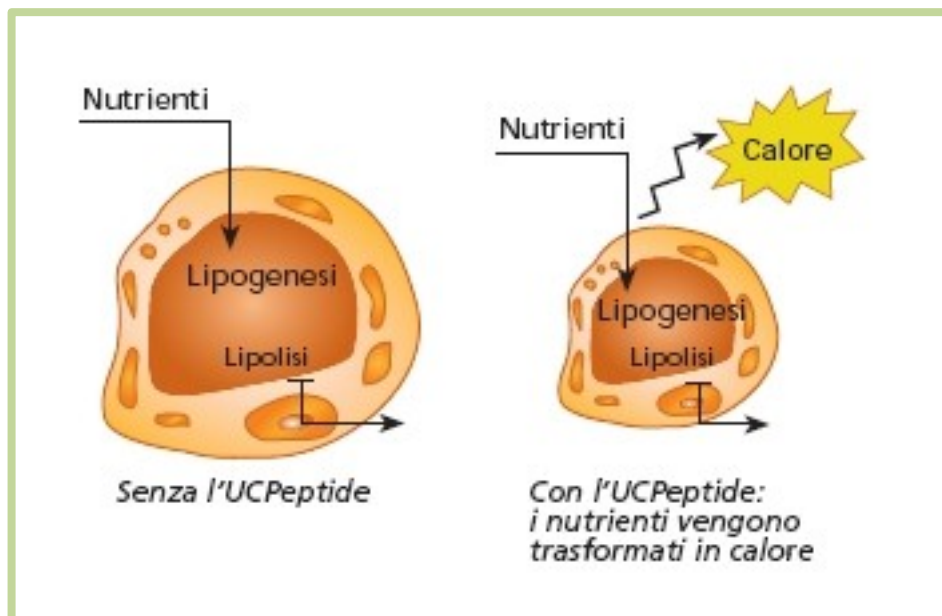


Figura 7: Adipociti bianchi e bruni

In particolare gli adipociti intermedi sono multiloculari e non esprimono la proteina UCP-1. Tale proteina, originariamente chiamata “termogenina” (Cannon *et al.*, 1982), rappresenta un critico elemento della macchina della termogenesi. Essa è una proteina mitocondriale che consente di controllare la “perdita” di protoni attraverso la membrana mitocondriale interna, mediante il gradiente del potenziale elettrochimico, al fine della generazione di calore a

spese della produzione di adenosina trifosfato (ATP). Inoltre gli adipociti intermedi presentano anche mitocondri con caratteristiche miste tra quelle trovate negli adipociti bianchi e bruni. Per tale motivo potrebbero avere una gocciolina lipidica predominante e per questo sono chiamati adipociti pauciloculari (Barbatelli *et al.*, 2010).

## 6.2 TESSUTO ADIPOSO BIANCO E BRUNO

Il tessuto adiposo è oggi al centro della ricerca sull'obesità, in quanto, nell'ultima decade, le conoscenze sul suo ruolo biologico sono state completamente rivoluzionate. Inoltre, la biologia del tessuto adiposo è una delle aree "calde" della scienza biomedica principalmente perché esso è oggi riconosciuto come uno dei maggiori organi endocrini (Trayhurn *et al.*, 2001). Il tessuto adiposo, definito da Cinti (Cinti, 2001) "*l'organo adiposo*", si compone di due parti: il tessuto adiposo bianco (WAT) e il tessuto adiposo bruno (BAT).

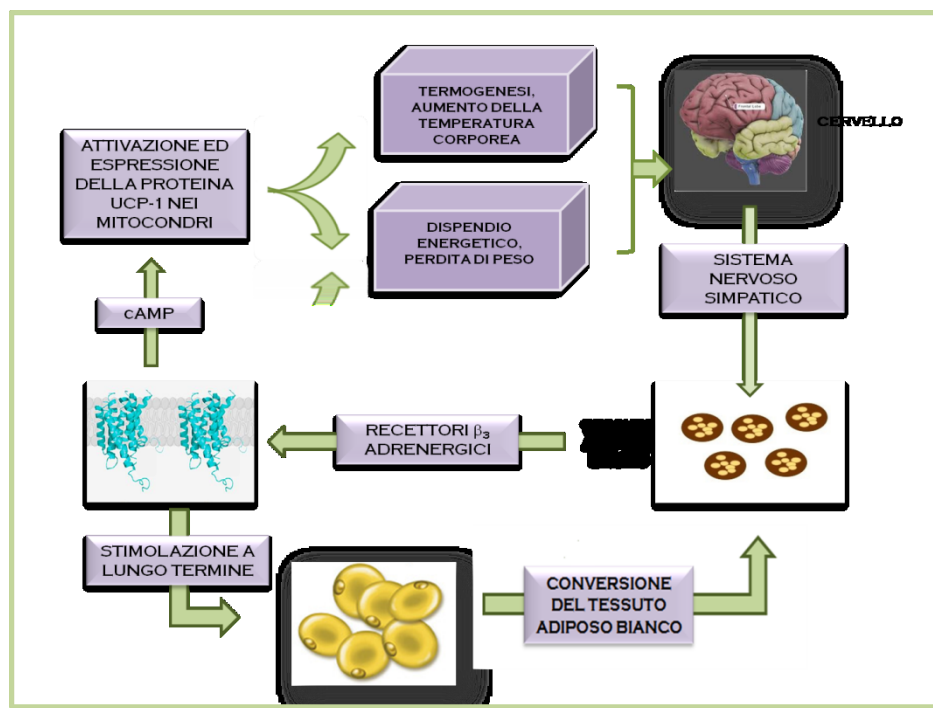
Il tessuto adiposo bruno (BAT) è specializzato nella produzione di calore mediante termogenesi "*senza brividi*". In questo tessuto l'immagazzinamento dei lipidi in gocce serve primariamente come carburante per la produzione di calore. Nel tessuto adiposo bianco (WAT), invece, l'immagazzinamento dei trigliceridi dalle calorie della dieta in eccesso, provvede a creare riserve di carburante a lungo termine per gli animali. Oltre all'immagazzinamento del carburante, il tessuto adiposo bianco può agire come isolante termico e

proteggere gli altri organi dai danni meccanici. Inoltre, il WAT e BAT hanno una differente vascolarizzazione e differenti innervazioni. Il BAT ha un più denso network di capillari e numerose fibre parenchimali rispetto al WAT (Nechad, 1987; Giordano *et al.*, 2007). Le fibre nervose parenchimali maggiormente rappresentate sono fibre simpatiche noradrenergiche (Giordano *et al.*, 2007; Giordano *et al.*, 1996).

In aggiunta al suo ruolo chiave nel metabolismo lipidico, il WAT ha anche un'azione endocrina, secernendo un grande numero di proteine, collettivamente definite adipocitochine, che influenzano il metabolismo sistemico e locale e il pathways infiammatorio. Il WAT rappresenta la più grande porzione di tessuto adiposo nell'uomo, sebbene ci siano un aumento delle evidenze che dimostrano che il BAT è presente in quantità significative e co-esiste con il WAT nello stesso deposito (Marzolla *et al.*, 2012; Tam *et al.*, 2012).

### **6.3 SISTEMA $\beta$ -ADRENERGICO, LIPOLISI E LIPOGENESI**

I recettori  $\beta$ -adrenergici ( $\beta$ AR) sono membri di una grande famiglia di recettori accoppiati a proteine G. Ci sono 3 sottotipi di  $\beta$ AR ( $\beta_1$ AR,  $\beta_2$ AR e  $\beta_3$ AR), ognuno di essi è accoppiato a proteine  $G_{\alpha s}$  e stimola i livelli intracellulare di cAMP. Mentre i  $\beta_1$ AR e  $\beta_2$ AR sono ampiamente espressi in tutti i tessuti del corpo, i  $\beta_3$ AR, invece, si trovano principalmente espressi negli adipociti.



Hofbauer K.G., 2002. Molecular pathways to obesity. International Journal of Obesity, 26, Suppl 2, S18 – S27.

Figura 8: Regolazione del dispendio energetico ed accumulo lipidico

La stimolazione dei  $\beta$ AR porta alla lipolisi negli adipociti bianchi e a termogenesi *senza brividi* nel grasso bruno. In tutti i modelli animali di obesità, il sistema  $\beta$ -adrenenrgico non è funzionante e la capacità di stimolare la lipolisi e la termogenesi è compromessa. Tuttavia, numerosi studi riportano che gli agonisti selettivi per i  $\beta$ AR sono in grado di prevenire o invertire l'obesità, la perdita dell'espressione dei  $\beta$ AR e di stimolare la termogenesi.

Comune a tutti i modelli animali di obesità, oltre che ad una grande percentuale di soggetti obesi, è la coesistenza di iperinsulinemia e l'insulino-resistenza. A causa di questa forte associazione tra controllo glicemico compromesso, l'obesità, l'espressione dei  $\beta$ AR e loro funzione, è stato proposto che ciò contribuisca, direttamente o indirettamente, alla inibizione dell'espressione e funzione dei  $\beta$ AR negli adipociti (Collins *et al.*, 1999).

Il risultato è la compromissione della lipolisi stimolata dalle catecolammine, che porta ad un'eccessivo accumulo di lipidi negli adipociti di soggetti obesi. Numerosi studi sostengono quest'ipotesi includendo l'osservazione che l'espressione dei  $\beta_3$ AR rapidamente declina negli adipociti di topo 3T3-F442A indifferenziati trattati con insulina (Feve *et al.*, 1994). Il meccanismo attraverso cui l'insulina può negativamente agire sulla funzione dei  $\beta$ AR non è noto ma può essere correlato all'espressione insulino-dipendente o alla funzione di C/EBP $\alpha$ : (MacDougald *et al.*, 1995), che è noto essere un fattore critico per l'espressione dei  $\beta_3$ AR negli adipociti (Dixon *et al.*, 2000).

#### **6.4 L'ADIPOCITA: ADIPOGENESI DA FIBROBLASTO A CELLULA ENDOCRINA SPECIALIZZATA**

L'obesità è una malattia che deriva dalla disregolazione nella massa del tessuto adiposo bianco, con cambiamenti nelle dimensioni degli adipociti e/o nel loro numero. Le variazioni nel numero sono determinate da una complessa interazione tra proliferazione e differenziamento dei preadipociti.

L'adipogenesi è un processo altamente controllato, i cui eventi cellulari e molecolari sono stati ampiamente studiati negli ultimi anni. Essa si caratterizza, nelle prime fasi, nell'attivazione e/o nella repressione trascrizionale di geni nei preadipociti (Rangwala *et al.*, 2000; Rosen *et al.*, 2000). Uno dei primi eventi dell'adipogenesi è rappresentato dall'arresto della crescita, che normalmente avviene mediante inibizione da contatto. Dopo tale



evento, i preadipociti devono ricevere un'appropriata combinazione di segnali mitogeni ed adipogenici per continuare attraverso le fasi successive del differenziamento, che porteranno alla progressiva acquisizione delle caratteristiche morfologiche e biochimiche tipiche degli adipociti maturi. Il processo adipogenico è inizializzato dal drastico passaggio dalla forma allungata dei fibroblasti, a quella sferica, tipica degli adipociti. Le modificazioni morfologiche sono, poi, accompagnate da variazioni del tipo dei componenti della matrice extracellulare (ECM) e del citoscheletro (Gregoire *et al.*, 1998).

La fase terminale del differenziamento è caratterizzata dall'attivazione della cascata trascrizionale che porta ad una maggiore espressione di importanti proteine coinvolte: nella sintesi dei trigliceridi, nell'aumento del numero dei trasportatori del glucosio e nell'incremento della sensibilità dei recettori dell'insulina. In quest'ultima fase, l'adipocita neoformato è diventato una cellula endocrina altamente specializzata, capace di secernere importanti ormoni correlati alla regolazione dell'omeostasi energetica (Gregoire *et al.*, 1998).

Gli adipociti maturi sono i principali componenti cellulari del WAT. Essi sono capaci di funzionare come sede di immagazzinamento di energia sotto lo stretto controllo ormonale. Tuttavia, considerato che i fattori secreti dagli adipociti giocano un ruolo fondamentale nelle risposte immunologiche, nelle malattie vascolari e nella regolazione dell'appetito, è emerso che il WAT

svolge un ruolo molto più complesso e dinamico. Oltre a proteine coinvolte nel metabolismo lipidico e lipoproteico, citochine e fattori di crescita, gli adipociti sintetizzano anche fattori coinvolti nella regolazione dell'assunzione di cibo e dell'omeostasi energetica. I fattori derivati dagli adipociti includono leptina, adiposina, agouti, angiotensina II, prostaglandine, l'adiponectina, resistina, TNF $\alpha$ , fattore inibitorio della migrazione dei macrofagi, proteina secreta acida e ricca di cisteina (SPARC). I fattori, secreti dagli adipociti, possono svolgere un ruolo cruciale nell'omeostasi energetica e/o influenzare funzioni chiave nel tessuto adiposo in modo fisiologico o patologico.

## **6.5 RECETTORI ATTIVATI DALLA PROLIFERAZIONE DEI PEROSSISOMI (PPAR) E DIFFERENZIAMENTO**

Ad oggi sono stati identificati tre diversi sottotipi recettoriali del PPAR ( $\alpha$ ,  $\beta/\delta$  e  $\gamma$ ), le cui azioni si risolvono in una vasta e differenziata gamma di effetti biologici dipendenti dalla localizzazione tissutale e dal profilo chimico del ligando coinvolto nell'attivazione (Kliwer *et al.*, 1994; Forman *et al.*, 1997). I PPAR sono fattori di trascrizione appartenenti alla superfamiglia dei recettori nucleari. I tre sottotipi recettoriali, inoltre, sono bersaglio di farmaci per il controllo del metabolismo lipidico e glucidico.

In particolare, il PPAR $\alpha$  si trova in una varietà di tessuti compresi il fegato, il cuore e il muscolo scheletrico, in cui ha la funzione di ossidazione gli acidi grassi (Semple *et al.*, 2006; Kiec-Wilk *et al.*, 2005; Wu *et al.*, 1996; Chinetti *et al.*, 2000; Ferre, 2004), e ha attività antinfiammatoria (Kiec-Wilk *et al.*,

2005). PPAR $\beta/\delta$  è ubiquitario (Semple *et al.*, 2006; Kiec-Wilk *et al.*, 2005; Gurnell, 2005; Chinetti *et al.*, 2000) e, durante lo sviluppo prenatale, favorisce la formazione degli organi attraverso la regolazione della migrazione del citotrofoblasto (Kiec-Wilk *et al.*, 2005), inoltre influenza il differenziamento delle cellule staminali (Kiec-Wilk *et al.*, 2005). Il terzo, il PPAR $\gamma$ , è stato identificato come un importante regolatore dell'adipogenesi. Esso, infatti, fornisce una regolazione dinamica e specifica durante il differenziamento da una cellula precursore a adipocita completamente differenziato (Rosen *et al.*, 2006; Feve, 2005; Semple *et al.*, 2006; Kiec-Wilk *et al.*, 2005; Wu *et al.*, 1996; Montague, 2002).

I tre membri della famiglia dell'C/EBP  $\alpha$ ,  $\beta$  e  $\delta$  sono espressi in momenti specifici dell'adipogenesi, sottolineando la necessità di regolare il processo di differenziamento (Wu *et al.*, 1996). In linee cellulari di roditori, l'espressione di C/EBP $\beta$  e C/EBP $\delta$  si verifica dopo 24-48 ore dalla attivazione dell'adipogenesi (Rosen, 2002; Wu *et al.*, 1996; Fujimoto *et al.*, 2005).

Queste molecole di segnalazione regolano a monte l'espressione iniziale di due fattori chiave di trascrizione dell'adipogenesi: C/EBP $\alpha$  e PPAR $\gamma$  (Rosen, 2002; Farmer, 2005; Feve, 2005; Otto *et al.*, 2005; Wu *et al.*, 1996; Rosen *et al.*, 2000; Fujimoto *et al.*, 2005; Zuo *et al.*, 2006). Il C/EBP $\alpha$  e PPAR $\gamma$  sono inizialmente espressi a bassi livelli, per tanto sono in grado di indurre l'espressione di altri fattori in un ciclo di feedback positivo (Rosen *et al.*, 2002). Il C/EBP $\alpha$  aiuta a mantenere i livelli di PPAR $\gamma$  negli adipociti

differenziati (Rosen *et al.*, 2002; Otto *et al.*, 2005; Pessler-Cohen *et al.*, 2006) ma, attraverso studi sulla perdita della funzione, è stato determinato che il PPAR $\gamma$  è essenziale per adipogenesi *in vivo* e *in vitro* e che cellule mancanti di tale fattore mostrano una marcata riduzione dell'C/EBP $\alpha$  (Rosen, 2002) (Fig. 9).

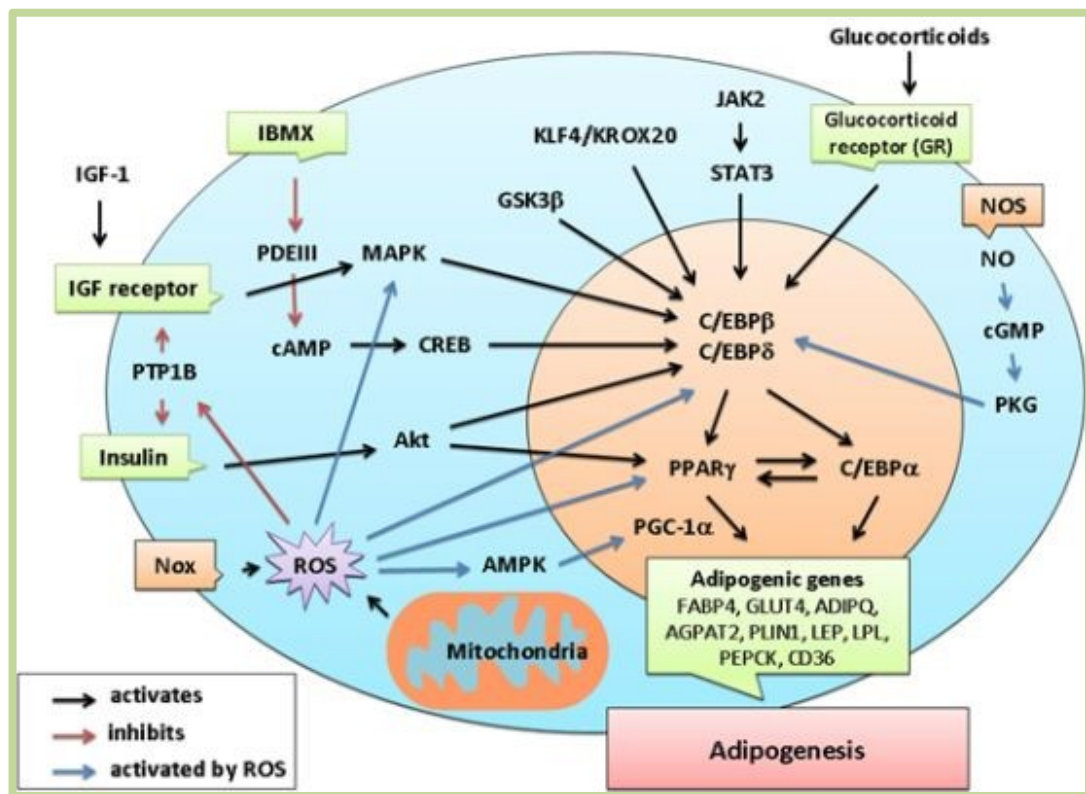


Figura 9: Pathway coinvolti nell'adipogenesi

## 6.6 ADIPOCHINE

### 6.6.1 LEPTINA E IL RECETTORE ObRb

La leptina (dal greco λεπτός, magro) è un ormone non glicosilato (16 kDa) (Zhang *et al.*, 1994), codificato dal gene *ob*.

Esercita la sua azione biologica attraverso l'attivazione del recettore ObR. È secreta dagli adipociti in rapporto al volume ed al contenuto in trigliceridi (Zhang *et al.*, 2002), agisce a livello centrale, principalmente nell'ipotalamo dove riduce l'assunzione del cibo e il peso corporeo. Mutazioni nel gene *ob* o nel gene che codifica per il suo recettore (gene *db*) sono correlate all'obesità, dimostrando così che la leptina ha un ruolo fondamentale nella via di segnalazione che regola il peso corporeo. La leptina circola nel plasma come peptide libero o associata ad una proteina di legame, la forma solubile del suo recettore (Sinha *et al.*, 1996), e raggiunge il SNC. A livello della barriera ematoencefalica (BEE) è presente un sistema di trasporto saturabile, costituito probabilmente dall'isoforma corta del recettore, che favorisce l'ingresso della leptina a livello del SNC, dove si lega a specifici recettori a livello dell'ipotalamo e svolge la funzione di fattore di sazietà (Caro *et al.*, 1996; Gavrilova *et al.*, 1997; Schwartz *et al.*, 1997). Quest'ormone è noto per diminuire il *food intake* ed incrementare il dispendio energetico agendo su specifici nuclei ipotalamici, dove induce fattori anoressigenici quali il trascritto cocaina-amfetamina-correlato (CART) e sopprimendo neuropeptidi oressigenici quali il neuro peptide Y (NPY) e la proteina correlata all'Agouti

(Ahima *et al.*, 1996). I livelli di leptina sono pienamente dipendenti dalla quantità di grasso corporeo, ma la sua sintesi è anche regolata da mediatori infiammatori (Gualillo *et al.*, 2000).

L'espressione del gene *ob* nel tessuto adiposo ed i livelli di leptina circolanti sono soggetti ad una regolazione a breve termine. Essi aumentano in risposta all'insulina e ai glucocorticoidi (Wabitsch *et al.*, 1996), al TNF- $\alpha$  e all'IL-1 (Zhang *et al.*, 2000), agli estrogeni (Shimizu *et al.*, 1999); diminuiscono, invece, in risposta al testosterone (Wabitsch *et al.*, 1997), alle ammine simpaticomimetiche, all'esposizione al freddo e al digiuno (Rayner *et al.*, 2001).

Tartaglia e coll.(1997) avevano identificato e clonato il recettore al quale si legava la leptina (Ob-R), espresso principalmente nelle regioni del cervello che controllano l'assunzione di cibo, ossia i neuroni del nucleo arcuato dell'ipotalamo. È stato dimostrato che il gene *db* codifica per il recettore della leptina e che eventuali mutazioni di questo gene possono essere responsabili dei meccanismi di leptino-resistenza.

Ob-R è una proteina di membrana costituita da circa 1200 amminoacidi espressa nell'ipotalamo e in diversi tessuti periferici come fegato, polmone, reni, muscolo, tessuto adiposo e tratto gastrointestinale (Kaplan, 1998).

Esistono diverse isoforme del recettore Ob-R, tutte dovute a fenomeni di *splicing* alternativo tessuto-specifico: Ob-Ra, Ob-Rb, Ob-Rc, Ob-Rd, Ob-Re ed Ob-Rf (Lee *et al.*, 1996).

Ob-Rb presenta dei motivi intracellulari nella porzione carbossiterminale, assenti in tutte le altre isoforme, necessari per l'attivazione della via di trasduzione del segnale della chinasi associata alla famiglia Janus (JAK) e dei traduttori del segnale e attivatori della trascrizione (STAT), responsabile dell'attività biologica dell'ormone.

### 6.6.2 LEPTINO-RESISTENZA

La leptino-resistenza può derivare da un difetto nel sistema del trasporto della leptina attraverso la BEE (Banks *et al.*, 2003). Tale sistema di trasporto è mediato dalla forma corta del recettore della leptina (Ob-Ra), una proteina espressa nei plessi coroidei, che funge appunto da trasportatore della leptina nel fluido cerebrospinale (CSF). Questo sistema di trasporto è saturabile (Banks *et al.*, 2003) e la sua efficienza (misurata come il rapporto delle concentrazioni di leptina tra il CSF ed il plasma) è più bassa nei soggetti obesi piuttosto che nei soggetti magri. La concentrazione di leptina nel CSF è probabilmente simile alla concentrazione interstiziale di leptina nell'ipotalamo, quindi un difetto nel trasporto potrebbe spiegare perché le persone obese non manifestano i sintomi attesi in risposta all'iperleptinemia (come ad esempio una riduzione dell'assunzione di cibo e un incremento del consumo energetico). C'è una soglia della concentrazione sierica di leptina (circa 25 ng/mL) sopra la quale il trasporto di leptina nel CSF non aumenta più nonostante ci siano elevati livelli di leptina nel sangue. In pazienti con

obesità grave, l'iperleptinemia non è in grado di controllare l'eccessivo aumento di peso. Dopo il trasporto attraverso la BEE, mediato da Ob-Ra, la leptina si lega ed attiva la forma lunga del recettore della leptina (Ob-Rb) nell'ipotalamo (Elmqvist *et al.*, 1999). La leptino-resistenza nei pazienti obesi raramente dipende da una mutazione del gene che codifica per il recettore Ob-Rb (Clémente *et al.*, 1998), ma piuttosto è correlata alla down-regulation del trasportatore della leptina indotta dall'iperleptinemia, come dimostrato in topi db/db (Lynn *et al.*, 1996; Malik *et al.*, 1996).

Alcuni meccanismi di inibizione della via di trasduzione della leptina nei neuroni dell'ipotalamo sono stati recentemente descritti (Vaisse *et al.*, 1996; Bjorbaek *et al.*, 2000-2001). Numerosi studi suggeriscono che esistono due meccanismi di leptino-resistenza: il primo dovuto ad un difetto nell'accesso di leptina nel sito d'azione a livello ipotalamico; il secondo ad un difetto di segnalazione intracellulare, a monte, dell'attivazione di STAT-3. Quando la leptina interagisce con il recettore Ob-Rb, si ha la fosforilazione di due residui di tirosina mediante l'attivazione di JAK-2. L'attivazione di STAT-3, in seguito a fosforilazione da parte di JAK-2, porta all'attivazione della trascrizione del gene che codifica per SOCS-3. SOCS-3 va poi a fosforilare Ob-Rb comportando l'inibizione dei vari segnali mediati dal recettore stesso (Bjorbaek *et al.*, 2000-2001). Oltre a SOCS-3, anche la fosfatasi dei residui tirosinici delle proteine (PTP1B) è un regolatore negativo del signaling della leptina, nonché di quello dell'insulina. Tale fosfatasi defosforila JAK2, la



prima chinasi che interviene nella via di trasduzione del segnale del recettore della leptina, riducendo la sensibilità all'ormone. La sua espressione nelle cellule in coltura è infatti inversamente proporzionale alla sensibilità alla leptina (Zabolotony *et al.*, 2002). Negli animali in cui il gene di questa fosfatasi è deletato, non solo si ha resistenza allo sviluppo di obesità, ma è stata dimostrato anche un aumento della sensibilità alla leptina (Klaman *et al.*, 2000). Grazie al suo importante ruolo nella regolazione del metabolismo, PTP1B è un bersaglio terapeutico promettente per il trattamento dell'obesità e del diabete mellito di tipo 2. PTP1B è codificato dal gene PTPN1, presente sulla regione 20q13 del cromosoma umano, che è correlato con l'insulina resistenza, il diabete mellito di tipo 2 e l'obesità (Tsou e Bence, 2012) (Fig. 10).

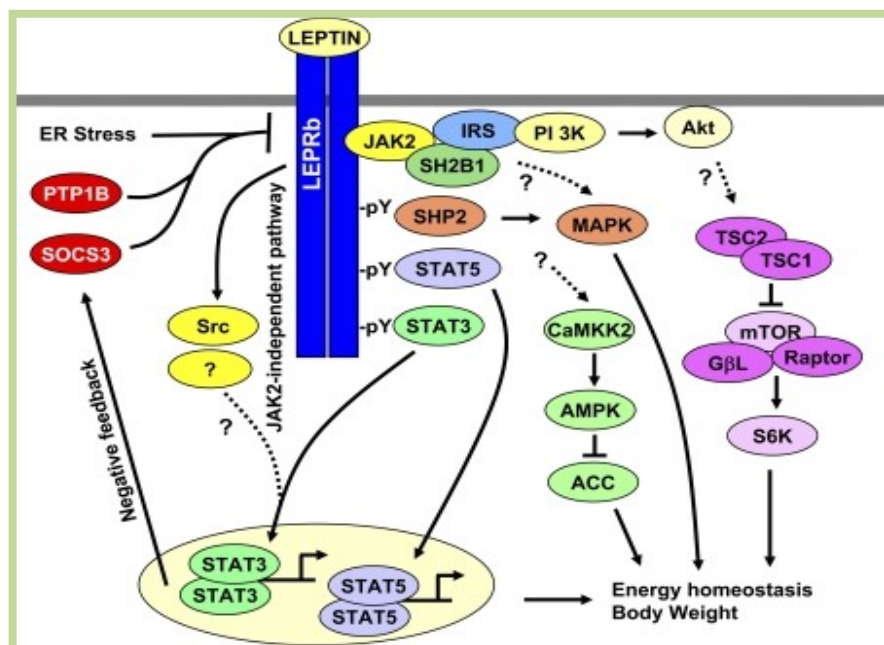


Figura 10: Pathway di segnalazione coinvolto nella leptino-resistenza

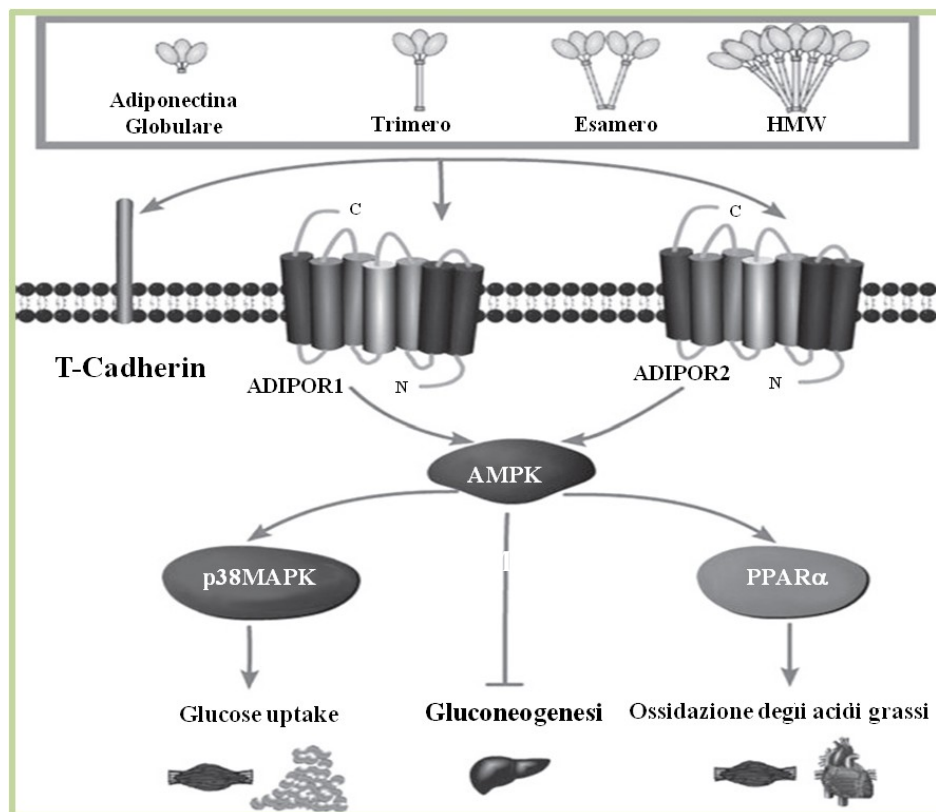
### 6.6.3 ADIPONECTINA E RECETTORI ADIPOR1 E ADIPOR2

L'adiponectina (ACRP) è prodotta esclusivamente dagli adipociti maturi. Essa contiene una sequenza segnale N-terminale, il dominio variabile, un dominio simile al collagene, la coda e un dominio globulare C-terminale, la testa.

Strutturalmente appartiene alla superfamiglia del collagene e si presenta in tre forme oligomeriche: un trimero a basso peso molecolare, un esamero con peso molecolare intermedio e l'isoforma biologicamente attiva ad alto peso molecolare. A differenza di altri ormoni adipocitari come la leptina, i livelli di ACRP sono ridotti nell'obesità e risultano incrementati dopo perdita di peso. Una riduzione della concentrazione dell'ACRP è associata con insulino-resistenza, dislipidemie ed aterosclerosi. Questi effetti sono associati con la fosforilazione del recettore per l'insulina, l'attivazione dell'AMPK e la modulazione di NFkB. L'adiponectina è espressa abbondantemente negli adipociti, ma, diversamente da altre adipochine, i suoi livelli plasmatici sono ridotti dall'adiposità addominale; ciò è, probabilmente, dovuto al fatto che il tessuto adiposo viscerale produce un fattore inibente la sintesi dell'adiponectina, che alcuni ipotizzano essere il TNF $\alpha$ . I livelli plasmatici di adiponectina, oltre che nell'obesità addominale, sono ridotti negli uomini e nelle donne in postmenopausa, nell'ipertensione arteriosa, nell'ipertrigliceridemia, nel diabete di tipo 2 e nella cardiopatia ischemica. L'adiponectina mostra possedere importanti proprietà antiaterogene, antidiabetiche e antinfiammatorie anche nell'uomo. I soggetti con elevati

livelli plasmatici di adiponectina hanno un rischio significativamente ridotto di eventi cardiovascolari. Infatti, l'ipoadiponectinemia, che caratterizza i soggetti con obesità addominale e sindrome metabolica, sarebbe l'elemento chiave per giustificare il rischio cardiometabolico (Kadowaki *et al.*, 2006).

L'adiponectina esercita le sue azioni biologiche legandosi a due recettori, contenenti sette domini transmembrana ma strutturalmente e funzionalmente distinti dai recettori accoppiati a proteine G (Yamauchi *et al.*, 2003). AdipoR1, espresso prevalentemente nel muscolo scheletrico, lega con alta affinità l'adiponectina globulare e con bassa affinità quella pienamente allungata. AdipoR2, invece, espresso abbondantemente nel fegato, presenta un'affinità intermedia per entrambe le forme di adiponectina; La trasduzione del segnale dell'adiponectina attraverso AdipoR1 e AdipoR2 coinvolge l'attivazione di AMPK, PPAR  $\alpha$ , PPAR  $\gamma$  e altre molecole segnale (Yamauchi *et al.*, 2007). In particolare l'interazione tra l'ACRP e questi recettori attiva l'AMPK, il PPAR $\alpha$  e il p38MAPK, modulando molti aspetti del metabolismo cellulare includendo l'accelerazione dell'*uptake* del glucosio negli adipociti e nei miociti, la riduzione degli enzimi coinvolti nella gluconeogenesi negli epatociti e la promozione dell'ossidazione degli acidi grassi nei miociti (Fig. 11).



Li L., Wu LL., 2012. Adiponectin and Interleukin-6 in inflammation-associated disease. *Vitam Horm.* 2012;90:375-95

Figura 11. Singaling dell'adiponectina nella regolazione del metabolismo delo glucosio e degli acidi grassi

## 6.7 CITOCHINE

### 6.7.1 INTERLEUCHINA-6 (IL-6)

L'interleuchina-6 (IL-6) è una citochina secreta da vari tipi di cellule e tessuti, gli adipociti contribuiscono per 15-30% ad incrementare i livelli circolanti in assenza di infiammazione acuta (Mohamed-Ali *et al.*, 1997). È noto che i livelli di IL-6 risultano notevolmente aumentati nel tessuto adiposo di soggetti obesi (Fried *et al.*, 1998). In particolare un basso grado di infiammazione sistemica è stato riscontrato in pazienti affetti da obesità, spiegando la correlazione positiva tra l'incremento dei livelli e l'aumento della secrezione, da parte degli adipociti, di tale citochina proinfiammatoria negli obesi da parte

degli adipociti, di tale citochina proinfiammatoria negli obesi (Vozarova *et al.*, 2001).

Inoltre alti livelli di IL-6 sono correlati con l'insulino-resistenza e il maggior rischio di complicanze cardiovascolari. Elevati livelli plasmatici di IL-6 sono considerati come un fattore predisponente al diabete di tipo 2 ed all'infarto del miocardio (Vozarova *et al.*, 2001; Ridker *et al.*, 2000). La somministrazione di IL-6 a volontari sani induce un aumento dose-dipendente della concentrazione di glucosio nel sangue (Tsigos *et al.*, 1997). Questo effetto probabilmente, è causato da una resistenza all'azione dell'insulina, dovuto all'inibizione della trasduzione del segnale del recettore dell'insulina negli epatociti, comportando un aumento degli acidi grassi liberi circolanti dal tessuto adiposo e una riduzione della secrezione di adiponectina (Fasshauer *et al.*, 2003; Boden *et al.*, 2002).

L'IL-6 induce la produzione epatica della proteina C-reattiva (PCR), che è nota per essere un fattore di rischio favorente complicanze cardiovascolari (Sacheck *et al.*, 2008). Elevati livelli di IL-6 sono stati rilevati nelle placche aterosclerotiche negli uomini. Inoltre, IL-6 altera la dilatazione endotelio-dipendente nelle vene, per tale motivo sembra essere un importante fattore aggravante la malattia coronarica (Bhagat *et al.*, 1997).

### **6.7.2 FATTORE DI NECROSI TUMORALE $\alpha$ (TNF $\alpha$ )**

Il fattore di necrosi tumorale  $\alpha$  (TNF $\alpha$ ) è una citochina proinfiammatoria,

prodotta principalmente dai macrofagi e dai linfociti. L'aumento dei livelli circolanti di TNF $\alpha$ , osservati nei soggetti obesi, non è associato all'aumento della massa adiposa, in quanto è stato ipotizzato che gli effetti sistemici della leptina o di altre adipochine possano indurre la secrezione del TNF $\alpha$  da macrofagi e linfociti (Koistinen *et al.*, 2000). I due effetti clinicamente importanti esercitati dal TNF $\alpha$ , nei bambini e negli adulti obesi, sono l'insulino-resistenza e le alterazioni infiammatorie endoteliali. Infatti, è stato dimostrato, in modelli animali, che il TNF $\alpha$  svolge un ruolo importante nella fisiopatologia dell'insulino-resistenza attraverso la fosforilazione dei residui di serina del recettore dell'insulina substrato-1 (IRS-1) (Hotamisligil *et al.*, 1993). Un miglioramento della sensibilità all'insulina è stata dimostrata dopo la neutralizzazione del TNF $\alpha$  endogeno nei ratti obesi (Hotamisligil e Spiegelman, 1994). L'aumento dei livelli plasmatici della frazione solubile del recettore-2 (TNFR2 o p75) del TNF $\alpha$  sono associate alla resistenza all'insulina in volontari sani (Greenberg e McDaniel, 2002). È noto che il TNF $\alpha$  attiva la trascrizione del fattore nucleare kB (NF-kB), che porta ad una serie di alterazioni infiammatorie nel tessuto vascolare, causando disfunzione endoteliale ed ipertensione (Lyon *et al.*, 2003).

Gli elevati livelli del TNF $\alpha$  sono correlati ad un aumento del metabolismo del tessuto adiposo (Hotamisligil e Spiegelman, 1994). Infatti, esso è anche secreto dai preadipociti e dagli adipociti e la sua produzione risulta essere

incrementata nei soggetti obesi (Hotamisligil *et al.*, 1995). È possibile che tale citochina possa regolare la funzione e il numero degli adipociti. Riguardo alla funzione negli adipociti, il TNF $\alpha$  induce insulino-resistenza mediante almeno due meccanismi: down-regolazione dell'attività dei recettori tirosina chinasi dell'insulina (Hotamisligil *et al.*, 1994) e mediante induzione di un'anormalità nel recettore dell'insulina substrato-1 (IRS-1), di cui ne inibisce la fosforilazione dei componenti della cascata del signaling dell'insulina (Hotamisligil *et al.*, 1996). Il netto effetto dell'induzione dell'insulino-resistenza negli adipociti è chiaramente legato alla lipolisi, dato che l'insulina ha un funzione anti-lipolitica primariamente in queste cellule. In particolare, tale citochina induce lipolisi negli adipociti mediante un effetto diretto sull'attività della lipoproteina lipasi (down-regolazione) e l'attività della lipasi ormone-sensibile (up-regolazione) (Hauner *et al.*, 1995). Riguardo al numero delle cellule adipose, il TNF $\alpha$  ha azioni multiple. Infatti esso è capace di sopprimere il differenziamento dei preadipociti e indurre delipidazione e dedifferenziamento degli adipociti (Petruschke *et al.*, 1993) e per tale motivo il TNF $\alpha$  sembra essere strettamente correlato all'insulino-resistenza e all'obesità.

### **6.7.3 INTERLEUCHINA-10 (IL-10)**

L'interleuchina-10 (IL-10) è un polipeptide omodimerico di 17 kDa, è stato

inizialmente descritto come un fattore prodotto dai linfociti T helper (tipo 2) con proprietà inibitorie in cloni di linfociti T helper (tipo 1) (Malefyt, 1999). È prodotta da vari tipi di cellule, in particolare dalle cellule infiammatorie quali macrofagi e linfociti T, in cui è il principale inibitore della sintesi delle citochine e della funzione dei macrofagi. La sua attività biologica è mediata dal suo recettore di membrana (IL-10R), appartenente alla famiglia dei recettori delle citochine di classe II (Malefyt, 1999; Moore *et al.*, 2001). Pertanto, IL-10 può inibire la produzione di diverse citochine quali il TNF $\alpha$ , l'IL-1 $\beta$  e l'IL-6, in vari tipi di cellule, ed è anche capace di automodularsi (Yamaoka *et al.*, 1999; Malefyt, 1999). Inoltre inibisce la generazione di specie reattive dell'ossigeno ed aumenta il rilascio di recettori del TNF $\alpha$ , di cui ne può antagonizzare gli effetti (Nozaki *et al.*, 1998).

In particolare, una scarsa capacità di produrre IL-10 è stata rilevata in patologie quali obesità, sindrome metabolica e diabete di tipo 2 (Gtowinska e Urban, 2003). IL-10 è insulino-sensibilizzante, anti-infiammatoria e ha proprietà protettive sull'endotelio antagonizzando l'attività del TNF $\alpha$  e IL-6 (Gunnnett *et al.*, 2002; Esposito *et al.*, 2004). Ridotti livelli di tale citochina, in pazienti obesi, rappresentano un importante fattore di rischio per l'insulino-resistenza, per l'instabilità delle placche aterosclerotiche e per l'ischemia coronarica acuta.



## 7. SCOPO DELLA TESI

Durante il primo anno di dottorato, abbiamo valutato, *in vitro*, degli effetti immunotossici, stimati come induzione dell'apoptosi indotta dai bifenili policlorurati non diossino-simili 101, 153 e 180 (PCB 101, 153, 180), in una linea continua di macrofagi murini J774.A1.

La tossicità dei PCB è stata valutata considerando tali congeneri da soli o in associazione per evidenziarne l'eventuale effetto sinergico.

Mentre l'azione immunosoppressiva delle diossine e dei PCB-DL è stata oggetto di numerosi studi, solo di recente i ricercatori, riscontrati elevati livelli residuali dei PCB-NDL nell'ambiente, nell'uomo, nei mammiferi e nei pesci, si sono dedicati alla determinazione del meccanismo d'azione alla base della tossicità indotta da tali PCB indicatori.

La scelta è ricaduta su questi composti, in quanto i PCB 153 e 180 sono quelli più abbondanti nel tessuto adiposo (Duarte-Davidson *et al.*, 1994) e il PCB 153, in particolare, è il congenere che si presenta alla più alta concentrazione nel latte materno (De Saeger *et al.*, 2005; Furst, 2006; Kostyaniak, 1999).

I policlorobifenili, oggetto del nostro studio, sono tra i PCB-NDL più diffusi, in quanto, come riportato in numerosi studi, sono i contaminanti organici rilevati a livelli residuali in specie ittiche di largo consumo alimentare o in prodotti lattiero-caseari. Al fine di stimarne gli effetti sulla vitalità cellulare e sul processo apoptotico, si sono utilizzate concentrazioni crescenti di tali congeneri, da soli o in associazione. È stata valutata la frammentazione del

DNA, la presenza di nuclei apoptotici mediante fluorescenza con il DAPI, la percentuale di nuclei ipodiploidi mediante colorazione con propidio ioduro (PI) e la modulazione dell'espressione di proteine coinvolte nel fenomeno apoptotico, quali la caspasi-3, Bcl-2 (antiapoptotica) e Bax (proapoptotica), mediante analisi Western blot.

Durante il secondo e terzo anno di dottorato, abbiamo valutato, *in vitro*, gli effetti degli stessi congeneri non diossino-simili (PCB 101, 153 e 180), da soli o in associazione, sulla capacità proliferativa e differenziativa dei preadipociti murini 3T3L1. In particolare è stata determinato l'effetto di tali inquinanti sulla funzione degli adipociti maturi.

Al fine di stimarne gli effetti sulla vitalità cellulare sono state utilizzate concentrazioni crescenti di tali congeneri, da soli (10-30-100 nM e 1-3-10  $\mu$ M) o in associazione (100 nM e 1  $\mu$ M). Inoltre, l'adipogenesi è stata determinata tramite: la tecnica istologica di colorazione con il Red oil O' (Ramirez-Zacarias *et al.*, 1992) e la modulazione dell'espressione di una delle principali proteine coinvolte nel differenziamento adipocitario e nel mantenimento dello stato differenziato della cellula, il PPAR  $\gamma$  mediante analisi Western blot. Infine abbiamo valutato come tali inquinanti modulano l'espressione di numerosi fattori di trascrizione, coinvolti nella regolazione della funzione endocrina e metabolica dell'adipocita maturo.

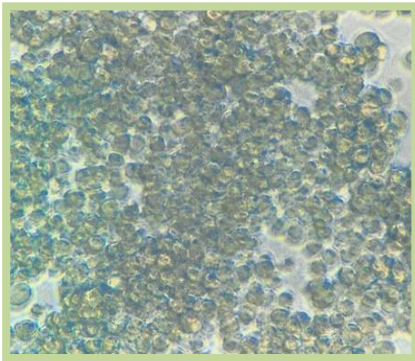
## **8. MATERIALI E METODI**

### **8.1 ESPERIMENTI CONDOTTI SUI MACROFAGI MURINI J774A.1**

#### **8.1.1 MATERIALI E REAGENTI**

2,2',4,5,5'-pentaclorobifenile (PCB 101), 2,2',4,4',5,5'-esaclorobifenile (PCB 153) e 2,2', 3,4,4',5,5'-eptaclorobifenile (PCB 180) (99% di purezza) sono stati acquistati dall'Ultra Scientific (Kingstown, RI). Tutti i PCB sono stati sciolti in una soluzione 10 mM di dimetilsolfossido (DMSO). La linea cellulare J774.A1 di macrofagi murini è stata fornita dall'European Collection of Animal Cell Cultures (Salisbury, Wiltshire, U.K.). Il siero fetale bovino (FBS), i mezzi di coltura cellulare e i suoi supplementi sono stati acquistati dalla Cambrex Bio Science Verviers (Verviers, Belgium). L'albumina sierica bovina (BSA), il Bio-rad protein assay, il 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolio bromuro (MTT), il 4',6-diamidino-2-fenilindolo diidrocloreidrato (DAPI), l'enzima DNase-free RNase-A, l'anticorpo anti-GAPDH e la Proteinasi-K sono stati forniti dalla Sigma (St. Louis, MO, U.S.A.), gli anticorpi anti-Bcl-2 (clone H-5), anti-Bax (clone P-19) e anti-caspasi 3 (clone H-277) sono stati acquistati dalla Santa Cruz Biotechnology.

### 8.1.2 COLTURE CELLULARI: MACROFAGI MURINI J774.A1



Per questo studio sono stati utilizzati macrofagi murini della linea cellulare continua J774.A1 (numero ATTC<sup>®</sup>: TIB-67<sup>™</sup>). Le cellule sono state tenute in coltura in monostrato in dischi di Petri dalla superficie di 75 cm<sup>2</sup> (P100), ed incubate a 37°C in atmosfera umidificata con una pressione parziale di CO<sub>2</sub> pari al 5%. Il mezzo di coltura completo era costituito da Dulbecco's modified Eagle Medium (DMEM) supplementato con FBS al 10%, penicillina (100 U/ml), streptomicina (100 µg/ml), L-glutammina (2 mM) e HEPES (25 mM).

In tutti gli esperimenti le cellule sono state staccate meccanicamente, contate e piastrate. Dopo 4 ore di adesione, le stesse sono state poste in “starvation” ovvero incubate per due ore con un mezzo al 5% di FBS e successivamente trattate con i PCB 101, 153 e 180 da soli (1, 3 e 10 µM) o in associazione (1 µM) per 24 ore. La concentrazione di DMSO in ogni campione è stata dell'1% (v/v), valore che ha consentito l'ottimale solubilizzazione dei PCB nelle soluzioni acquose. Per i PCB analizzati sono stati scelti questi valori di concentrazione perché riflettono le concentrazioni presenti nel siero dopo l'esposizione ai PCB ed i livelli residui nel cibo di origine animale (Ferrante *et al.*; 2010; Jensen, 1989).

### 8.1.3 DETERMINAZIONE DELLA VITALITÀ CELLULARE: MACROFAGI MURINI J774.A1

La vitalità cellulare dei macrofagi incubati con i diversi PCB è stata valutata attraverso il saggio dell'MTT. Questo sale solubile di tetrazolio, di colore giallo, viene convertito nella forma insolubile (sale di formazano) di colore amaranto dalle deidrogenasi mitocondriali delle cellule vitali, per cui la misura spettrofotometrica dell'assorbanza del campione è funzione della quota di colorante convertito dalle cellule vive (Mosmann, 1983). La proporzione delle cellule vitali trattate con i PCB veniva paragonata a quella delle cellule di controllo trattate con il veicolo.

Dopo distacco meccanico, le cellule sono state poste in piastre da 96 pozzetti in numero di  $3 \times 10^4$  / 150  $\mu$ l / pozzetto in mezzo completo (DMEM al 10% di FBS). Dopo 24 ore di incubazione con i PCB a 37°C, sono stati aggiunti 25  $\mu$ l di MTT alla concentrazione di 5 mg/ml in ogni pozzetto; trascorse 3 ore le cellule sono state lisate con 100  $\mu$ l di una soluzione lisante contenente 20% (w/v) di sodio dodecil solfato e 50% (v/v) di dimetilformamide (pH 4.5). Dopo un'incubazione di 20 ore a 37°C, è stata misurata la densità ottica dei campioni ( $OD_{620}$ ). La vitalità dei macrofagi in risposta al trattamento con i PCBs, da soli o in associazione, veniva calcolata come % di cellule vive =  $(OD_{\text{delle cellule trattate}} / OD_{\text{delle cellule di controllo}}) \times 100$ .

#### 8.1.4 DETERMINAZIONE DELLA FRAMMENTAZIONE DEL DNA MEDIANTE ELETTROFORESI

L'apoptosi indotta dai PCB è stata determinata mediante frammentazione del DNA. Le cellule sono state piastrate ( $1.5 \times 10^6$ /piastra) in dischi di Petri dalla superficie di 28 cm<sup>2</sup> (P60) e stimolate come già riportato. Dopo 24 ore di incubazione, le cellule sono state lavate due volte, staccate meccanicamente e raccolte in tampone fosfato salino (PBS), centrifugate a 1000 x g per 5 min a 4°C. Il pellet è stato risospeso in 500 µl di lysis buffer (0.1 mM NaCl, 25 mM EDTA, 10 mM Tris-HCl, pH 8.0, 1% (v/v) Nonidet P40). I campioni sono stati nuovamente centrifugati a 1000 x g per 5 minuti a temperatura ambiente. I surnatanti sono stati trattati con l'enzima DNase-free RNase-A (5 mg/ml) in SDS all'1% per 2 ore a 56 °C. Quindi, è stata aggiunta la proteinasi K ad una concentrazione finale di 10 µM. I campioni sono stati incubati per 16 ore a 37°C e successivamente sottoposti a precipitazione con 10 M di ammonio acetato e alcol etilico assoluto (1:6 v/v). Dopo un'ora di incubazione a -80°C, i campioni sono stati centrifugati a 13.400 g per 20 minuti a 4°C. In seguito gli stessi sono stati risospesi in 50 µl di TE (EDTA 1 mM, Tris HCl 10 mM pH 8). I campioni di DNA (5 µg/line) sono stati sottoposti ad elettroforesi per 30 minuti a 100 V su un gel di agarosio al 2% (w/v), contenente 0.5 mg/l di etidio bromuro. Le bande sono state visualizzate con un transilluminatore agli UV e trasformate in formato digitale con il dispositivo Image Quant-800 (Pregi *et al.*, 2009).

### **8.1.5 COLORAZIONE DEI NUCLEI APOPTOTICI MEDIANTE DAPI**

Le cellule macrofagiche ( $3 \times 10^5$ /pozzetto) sono state incubate per 24 ore con i PCB da soli (1, 3 e 10  $\mu\text{M}$ ) o in associazione (1  $\mu\text{M}$ ) in piastre da 24 pozzetti, nelle quali sono stati precedentemente posti dei vetrini dal diametro di 12 mm. L'induzione dell'apoptosi è stata poi evidenziata e quantizzata mediante colorazione con il DAPI. Le cellule in apoptosi sono state identificate grazie alla comparsa dei nuclei picnotici. Per visualizzare tale fenomeno, i vetrini, con le cellule adese, sono stati lavati due volte con PBS e le cellule sono state fissate per 5 minuti a temperatura ambiente con la paraformaldeide al 3.7% in PBS. Dopo la fissazione, sono stati eseguiti due lavaggi con PBS 1X, uno con la glicina allo 0,1% in PBS 1X (per eliminare l'eccesso di paraformaldeide) e di nuovo due lavaggi con PBS 1X. Subito dopo le membrane cellulari sono state permeabilizzate per 5 minuti a temperatura ambiente con il Triton X-100 allo 0.05% in PBS. Dopo due lavaggi con PBS ed uno con H<sub>2</sub>O milliq, è stato aggiunto il DAPI (1  $\mu\text{g/ml}$ ) in PBS. Dopo 20 minuti di incubazione a temperatura ambiente, le cellule sono state lavate con PBS 1X e due volte con H<sub>2</sub>O milliq e visualizzate grazie ad un microscopio confocale a fluorescenza.

### **8.1.6 STUDIO DEL PROCESSO APOPTOTICO**

Il DNA ipodiploide è stato analizzato, utilizzando la colorazione con propidio ioduro (PI), mediante citofluorimetria a flusso. In sintesi, le cellule sono state

incubate con i PCB, da soli (1, 3 e 10  $\mu\text{M}$ ) e in associazione (1  $\mu\text{M}$ ) per 24 ore. Dopodichè il mezzo di coltura veniva rimosso e la cellule venivano lavate con PBS e risospese in 500  $\mu\text{L}$  di una soluzione contenente sodio citrato (0.1% w/v), Triton X-100 (0.1%) e PI (50  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ). Il mezzo di coltura originario ed il PBS venivano centrifugati e le pellet cellulari venivano unite con la sospensione cellulare per ottenere tutte le cellule vive e morte per l'analisi. Dopo un'incubazione a 4°C per 30 minuti al buio, i nuclei delle cellule sono stati analizzati con il citometro a flusso Becton Dickinson FACScan utilizzando il programma CellQuest. I frammenti cellulari sono stati esclusi dall'analisi aumentando il limite superiore e il contenuto di DNA dei nuclei è stato registrato su scala logaritmica; quindi è stata calcolata la percentuale delle cellule presenti nella regione ipodiploide (sub G0/G1).

### **8.1.7 ANALISI WESTERN BLOT**

Dopo 24 ore di incubazione con i PCB, le cellule sono state lavate due volte con PBS freddo, raccolte e risospese in Tris-HCl (20 mM pH 7.5), NaF (10 mM), NaCl (150 mM), Nonidet P-40 (1%), fenil metil sulfonil fluoruro (PMSF) 1 mM,  $\text{Na}_3\text{VO}_4$  1 mM, leupeptina e Trypsin inhibitor (10  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ). Dopo 40 minuti di incubazione, sono stati ottenuti i lisati cellulari per centrifugazione a 20.000 x g per 15 minuti a 4°C. La concentrazione proteica è stata determinata con il Bio-Rad protein assay usando come



concentrazione nota di riferimento quella dell'albumina sierica bovina (BSA).

Trenta microgrammi di proteine di lisato cellulare sono stati sciolti nella soluzione di Laemmli, bolliti per 5 minuti a 95°C e sottoposti ad elettroforesi su un gel di acrilamide al 15% in presenza di sodio dodecil solfato (SDS). Le proteine separate sono state poi trasferite dal gel su una membrana di nitrocellulosa (Protran<sup>®</sup>, Whatman) mediante un dispositivo di trasferimento semi-umido (Bio-Rad) ad amperaggio costante di 240 mA per 45 minuti a temperatura ambiente. Il legame aspecifico è stato bloccato trattando la membrana con PBS al 5% di latte scremato per 40 minuti a temperatura ambiente. La membrana è stata, quindi, incubata con l'anticorpo primario in PBS al 5% di latte scremato allo 0.1% di Tween 20 per 2 ore a temperatura ambiente. Sono stati utilizzati gli anticorpi primari anti-caspasi-3 (1:500), anti-Bax (1:500) o anti-Bcl-2 (1:200). Le membrane, poi, sono state incubate con un appropriato anticorpo secondario coniugato alla perossidasi di rafano, (HRP) per 1 ora a temperatura ambiente. Le bande proteiche sono state visualizzate con il dispositivo Image Quant-800 utilizzando metodiche di chemiluminescenza (ECL-Kit, Amersham). Western blot per GAPDH è stato eseguito per assicurarsi di un uguale caricamento dei campioni. Le bande proteiche relative alla caspasi-3 (~17 kDa), a Bax (~23 kDa) e a Bcl-2 (~29 kDa) sono state sottoposte ad analisi

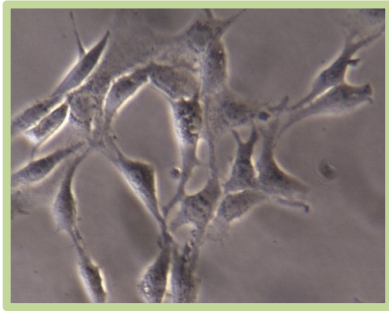
densitometrica con il dispositivo GS-800 (Bio-Rad Laboratories, Segrate, Milano, Italia).

### **8.1.8 ANALISI STATISTICA**

I dati sono stati espressi come  $\text{media} \pm \text{S.E.M.}$  (standard error mean) dei valori ottenuti nei singoli esperimenti, che sono stati ripetuti almeno tre volte ed ogni volta con tre o più osservazioni. Per la valutazione statistica dei risultati è stata utilizzata l'analisi della varianza e le comparazioni multiple sono state effettuate con il test Bonferroni. Un valore di P inferiore a 0.05 è stato considerato significativo.

## 8.2 ESPERIMENTI CONDOTTI SUGLI ADIPOCITI MATURI 3T3L1

### 8.2.1 FIBROBLASTI MURINI 3T3L1 E DIFFERENZIAMENTO ADIPOGENICO



I fibroblasti murini 3T3L1, acquistati dall'European Collection of Animal Cell Cultures (Salisbury, Wiltshire, U.K.), vengono tenuti in coltura in Dulbecco Eagle modificato (DMEM) al 10% FBS, 100 U/ml di penicillina e 100 µg/ml streptomicina in fiasche da 75 cm<sup>2</sup> a 37 °C in atmosfera umidificata al 5% di CO<sub>2</sub>. La procedura standard (SP) di differenziamento/adipogenesi è mostrato nella Fig. 10. I preadipociti 3T3L1 vengono piastrati e dopo tre giorni, alla confluenza, vengono incubati in un mezzo MD I contenente DMEM (10 µg/mL INS, IBMX 0,5 µM, 10 µM DEX e 10% FBS) per altri due giorni (D 0-2). Il mezzo è poi cambiato con MD II contenete DMEM (10% FBS con 10 µg/mL di INS) per altri due giorni (D 2-4). Infine le cellule sono alimentate con MD III contenete DMEM al (10% FBS) per tre giorni (D 4-7) (Madsen *et al.*, 2003).

### 8.2.2 DETERMINAZIONE DELLA VITALITÀ CELLULARE

L'attività citotossica dei PCB 101, 153 e 180 sui preadipociti 3T3L1 è stata valutata attraverso il saggio di citotossicità con l'MTT. Dopo aver staccato le

cellule con tripsina, le stesse sono poste in piastre da 96 pozzetti in numero di  $8 \times 10^3 / 150 \mu\text{l} / \text{pozzetto}$  in mezzo completo (DMEM al 10% di FBS) e sottoposte al differenziamento adipocitario, come sopra riportato. Al giorno 7 di differenziamento, le cellule sono state incubate in DMEM al 10% di FBS e trattate con i PCB 101, 153 e 180 da soli (10-30-100 nM e 1-3-10  $\mu\text{M}$ ) o in associazione (100 nM e 1  $\mu\text{M}$ ). Dopo 48 ore di incubazione a 37°C sono stati aggiunti 25  $\mu\text{l}$  di MTT alla concentrazione di 5 mg/ml in ogni pozzetto; trascorse 3 ore le cellule sono state lisate con 100  $\mu\text{l}$  di una soluzione lisante (20% di sodio dodecil solfato e 50% di dimetilformamide, pH 4.7). Dopo un'incubazione di 20 ore a 37°C, la densità ottica dei campioni ( $\text{OD}_{620}$ ) è stata confrontata con quella dei controlli.

### 8.2.3 COLORAZIONE RED OIL O

L'accumulo dei lipidi negli adipociti è stato quantificato mediante colorazione Red Oil O. Le cellule 3T3L1, adipociti maturi sono state colorate con Red Oil O come descritto da Ramírez-Zacarias *et al.* (1992). Brevemente, dopo il differenziamento dei preadipociti ad adipociti maturi, le cellule vengono fissate in formalina al 10% per 1 ora e poi lavate con isopropanolo al 60%.

Successivamente le cellule vengono incubate con una soluzione di Red Oil O (costituita da 6 parti di 0,5% della soluzione madre o 0,5 g in 100 mL di isopropanolo come descritto da Suryawan e Hu (Suryawan e Hu, 1997) per 30 minuti e lavate con acqua distillata. L'assorbanza era misurata a 510 nm.

#### 8.2.4 ANALISI WESTERN BLOT

Dopo 24 ore di incubazione, le cellule sono state lavate due volte con PBS 1X freddo, raccolte e risospese in Tris-HCl (20 mM pH 7.5), NaF (10 mM), NaCl (150 mM), Nonidet P-40 (1%), fenil metil sulfonil fluoruro PMSF 1 mM, Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub> 1 mM, leupetina e Trypsin inhibitor (10 µg/ml). Dopo 40 minuti di incubazione, sono stati ottenuti i lisati cellulari per centrifugazione a 20.000 x g per 15 minuti a 4°C. La concentrazione proteica è stata determinata con il Bio-Rad protein assay usando come concentrazione nota di riferimento quella dell'albumina sierica bovina (BSA).

Cinquanta microgrammi di proteine di lisato cellulare sono stati sciolti nella soluzione di Laemmli, bolliti per 5 minuti a 95°C e sottoposti ad elettroforesi su un gel di acrilamide al 15% in presenza di sodio dodecil solfato (SDS). Le proteine separate sono state poi trasferite dal gel su una membrana di nitrocellulosa (Protran<sup>®</sup>, Whatman) mediante un dispositivo di trasferimento semi-dry (Bio-Rad) ad amperaggio costante di 240 mA per 45 minuti a temperatura ambiente. Il legame aspecifico è stato bloccato trattando la membrana con PBS 1X al 5% di latte scremato per 40 minuti a temperatura ambiente. La membrana è stata, quindi, incubata con l'anticorpo primario in PBS 1X al 5% di latte scremato allo 0.1% di Tween 20 per 2 ore a temperatura ambiente.

È stato utilizzato l' anticorpo primario anti-PPAR $\gamma$  (1:1000), anti-PTP1B (1:500), anti-p-STAT3 (1:500) e anti-STAT3 (1:1000). La membrana, poi, è

stata incubata con un anticorpo secondario coniugato alla HRP per 1 ora a temperatura ambiente. Le bande proteiche sono state visualizzate con il dispositivo Image Quant-800 utilizzando metodiche di chemiluminescenza (ECL-Kit, Amersham). Western blot per  $\beta$ -actina (in lisati cellulari) è stato eseguito per assicurarsi di un uguale caricamento dei campioni.

Le bande proteiche relative al PPAR  $\gamma$  (~75 kDa), PTP1B (~50 kDa), p-STAT3 (~86 kDa) e STAT3 (~79 kDa), sono state sottoposte ad analisi densitometrica con il dispositivo GS-800 (Bio-Rad Laboratories, Segrate, Milano, Italia).

### **8.2.5 ANALISI REVERSE TRANSCRIPTION-POLYMERASE CHAIN REACTION (RT-PCR)**

L'RNA totale è stato estratto dagli adipociti maturi, con un metodo modificato di Chomczynski & Sacchi (1987), con Trizol Reagent (Life Technologies). La trascrizione inversa (RT) è stata effettuata con una procedura standard (Brenner *et al.*, 1989) utilizzando 2.5  $\mu$ g di RNA totale. Dopo la conversione di RNA in DNA, 2  $\mu$ l di RT sono stati diluiti con 48  $\mu$ l di soluzione per PCR, composta da 1U/ml di Taq DNA polymerase (TaKaRa Ex Taq™), 0.2  $\mu$ M di 5' and 3' primers, 0.2 mM di ogni deossiribonucleotide trifosfato (dNTP), 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, e 1xPCR buffer 20 mM Tris-HCl (pH 8.4), 50 mM KCl. I primers per PCR sono stati sintetizzati da EUROGENTEC Explera s.r.l (Ancona, Italia) e sono riportati in Tabella 3. Il profilo di amplificazione è stato: denaturazione a 94°C per 1 min per la leptina, ObRb, AdipoR1,

AdipoR2, IL-6, IL-10 e TNF $\alpha$  mentre a 94° per 15 sec per l'ACRP30. Le temperature di annealing per ciascun primer sono riportate in Tabella 3 ed estensione a 72°C per 1 minuto. L'amplificazione è stata effettuata in un termocicizzatore automatico (Biometra, Germania). Per assicurarsi che la PCR fosse stata svolta nell'intervallo di amplificazione lineare, i campioni sono stati amplificati per 15, 20, 25, 30, 35, e 40 cicli, mostrando che la reazione risulta lineare fino ai 40 cicli. Successivamente 20  $\mu$ l di amplificato RT-PCR sono stati sottoposti ad elettroforesi su gel di agarosio all'1-2% in TBE 1x (0.089 M Tris base, 0.089 M acido borico) contenente 0.2  $\mu$ g/ml di bromuro di etidio. I frammenti di DNA amplificati sono stati evidenziati agli UV utilizzando l'apparecchio Imagequant 400 (GE Health Care) e analizzati densitometricamente con un modello GS-700 (imaging densitometer; Bio-Rad Laboratories). La GAPDH è stata utilizzata come controllo interno.

Target gene	Forward (5'→3')	Reverse (3'→5')	Bp	Tm °C
<b>Leptina</b>	GATGACACCAAAA- CCCTCATCAAG	TCAAGGCCACCACCTC- TGTGGAGTAG	352	56
<b>ObRb</b>	GATATTTGGTCCTCTT- CTTCTGGAG	AGTTGTGGTGAAA- TCACATTGG	437	46
<b>ACRP30</b>	ACAGCTCACTTATGG- TCGTGCC	AAACAGTGATGAAG- CCTGCTCG	120	58
<b>AdipoR1</b>	ACGTTGGAGAGTCA- TCCCGTATG	GCATCGTCAAGATTCCC- AGAAAGAG	199	48
<b>AdipoR2</b>	CCCTCTGCAAGAGAA- AGTGGT	TTAGCCAGCCTATC- TGCCCTA	412	45
<b>IL-6</b>	CTGGTGACAACCACGG- CCTTCCCTA	ATGCTTAGGCATAACGCA- CTAGGTT	599	50
<b>TNF<math>\alpha</math></b>	GGCAGGTCTACTTTGGAG- TCATTGC	ACATTCGAGGCTCCAGTG AATTCGG	307	52
<b>IL-10</b>	TTACCTGGTAGAAGTGATG- CCCC	TCCAAGGAGTTGCTCCCG TTAG	358	60
<b>GAPDH</b>	GGCACAGTCAAGGCTG- AGAATG	ATGGTGGTGAAGACGC- CAGTA	142	

*Tabella 3: Sequenze forward e reverse dei primers utilizzati*

## 8.2.6 ANALISI STATISTICA

I dati sono stati espressi come  $media \pm S.E.M.$  (standard error mean) dei valori ottenuti nei singoli esperimenti, che sono stati ripetuti almeno tre volte ed ogni volta con tre o più osservazioni. Per la valutazione statistica dei risultati è stata utilizzata l'analisi della varianza e le comparazioni multiple sono state effettuate con il test Bonferroni. Un valore di P inferiore a 0.05 è stato considerato significativo.



## 9. RISULTATI

### 9.1 ESPERIMENTI CONDOTTI SUI MACROFAGI J774A.1

#### 9.1.1 EFFETTI DEI PCB SULLA VITALITÀ CELLULARE

Tutti i PCB analizzati inducono una diminuzione della vitalità cellulare in modo concentrazione-dipendente (Fig. 12). Tale effetto è altamente significativo alla concentrazione più alta tra quelle utilizzate ( $p < 0.001$ ); inoltre, alla concentrazione di 3  $\mu\text{M}$  sia il PCB 101 sia il PCB180 mostrano un effetto citotossico statisticamente significativo (rispettivamente con  $p < 0.01$  e  $p < 0.001$ ).

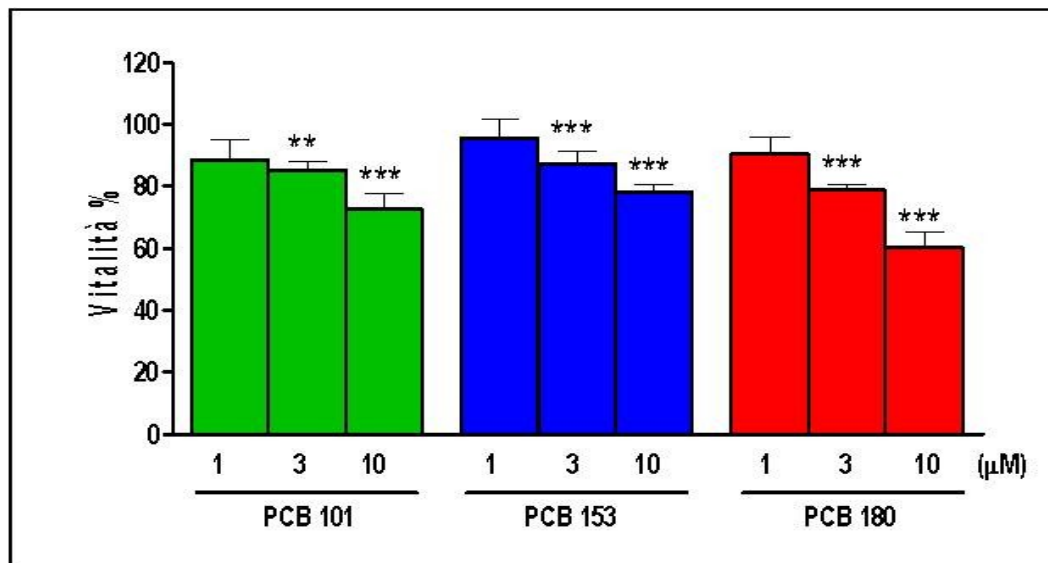


Figura.12: Effetto dei PCB 101, 153 e 180 sulla vitalità cellulare

Per discriminare tra un eventuale effetto sinergico o additivo sulla vitalità cellulare nel caso dei PCB in associazione, le cellule sono state incubate con i PCB alla concentrazione non citotossica (1  $\mu\text{M}$ ). Comunque siano stati associati: a due a due (il PCB 101 con il PCB 153, il PCB 101 con il PCB 180, il PCB 153 con il PCB 180) o tutti e tre insieme, si è registrata una

riduzione significativa della vitalità cellulare ( $p < 0.001$ , Fig. 13) rispetto al controllo (100% di vitalità).

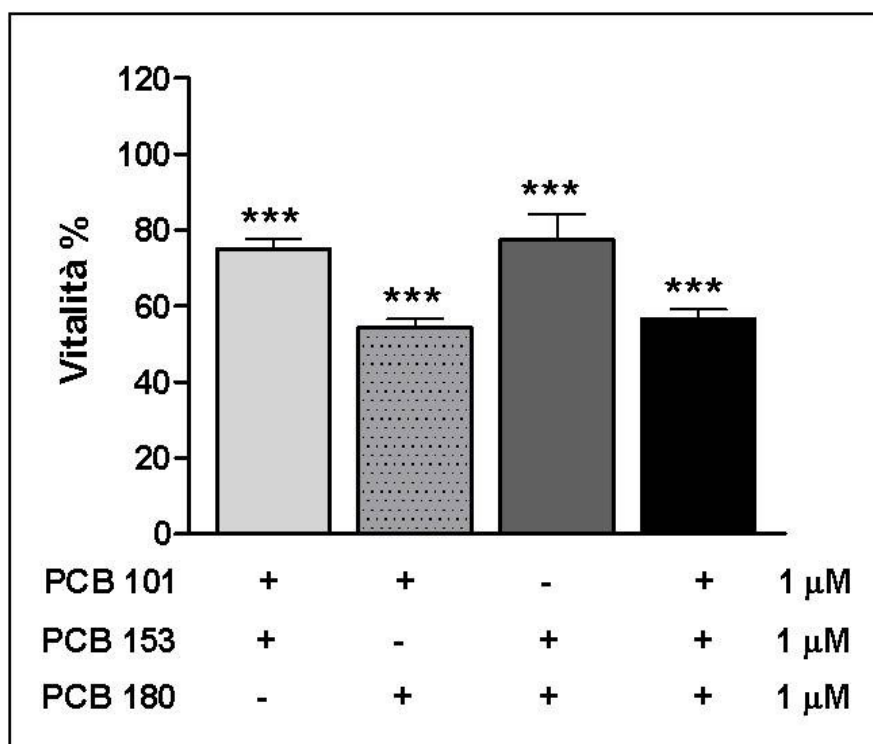


Figura 13: Effetto dei PCB in associazione sulla vitalità cellulare

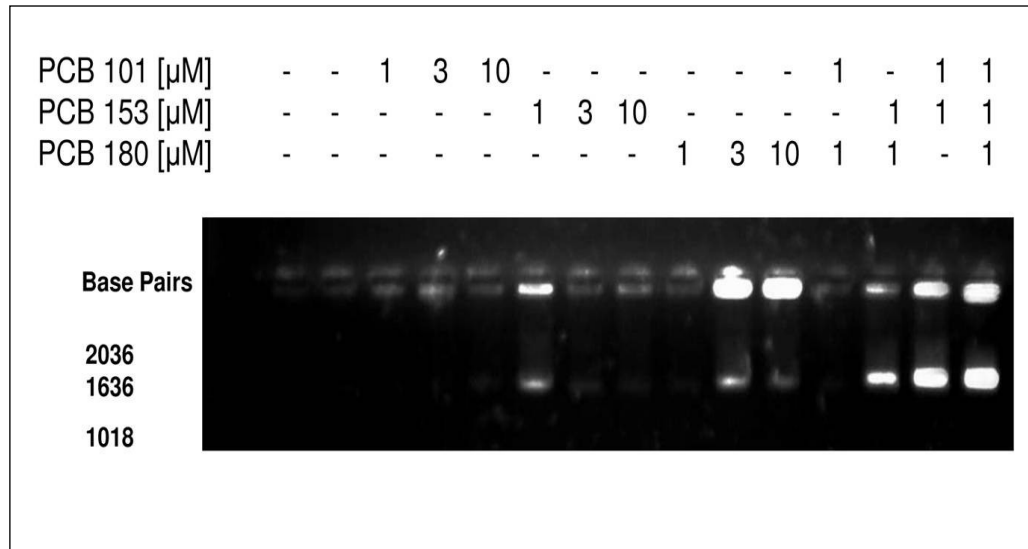
### 9.1.2 INDUZIONE DELL' APOPTOSI NELLE CELLULE J774A.1

Per determinare se l'effetto citotossico dei PCB fosse associato all'apoptosi, dopo 24 ore di esposizione a tali composti, dalle cellule J774A.1 è stato estratto il DNA e sottoposto ad elettroforesi su un gel di agarosio. È stata rilevata la frammentazione del DNA, fenomeno peculiare dell'apoptosi, come è illustrato nella Fig. 14.

Il PCB 101 danneggia di meno il DNA, mentre il PCB 153 e il PCB 180 mostrano un chiaro effetto apoptotico, che si palesa alle concentrazioni più alte tra quelle usate (3 e 10  $\mu$ M).

Inoltre è stato rilevato un aumento del danno al DNA sia quando le cellule

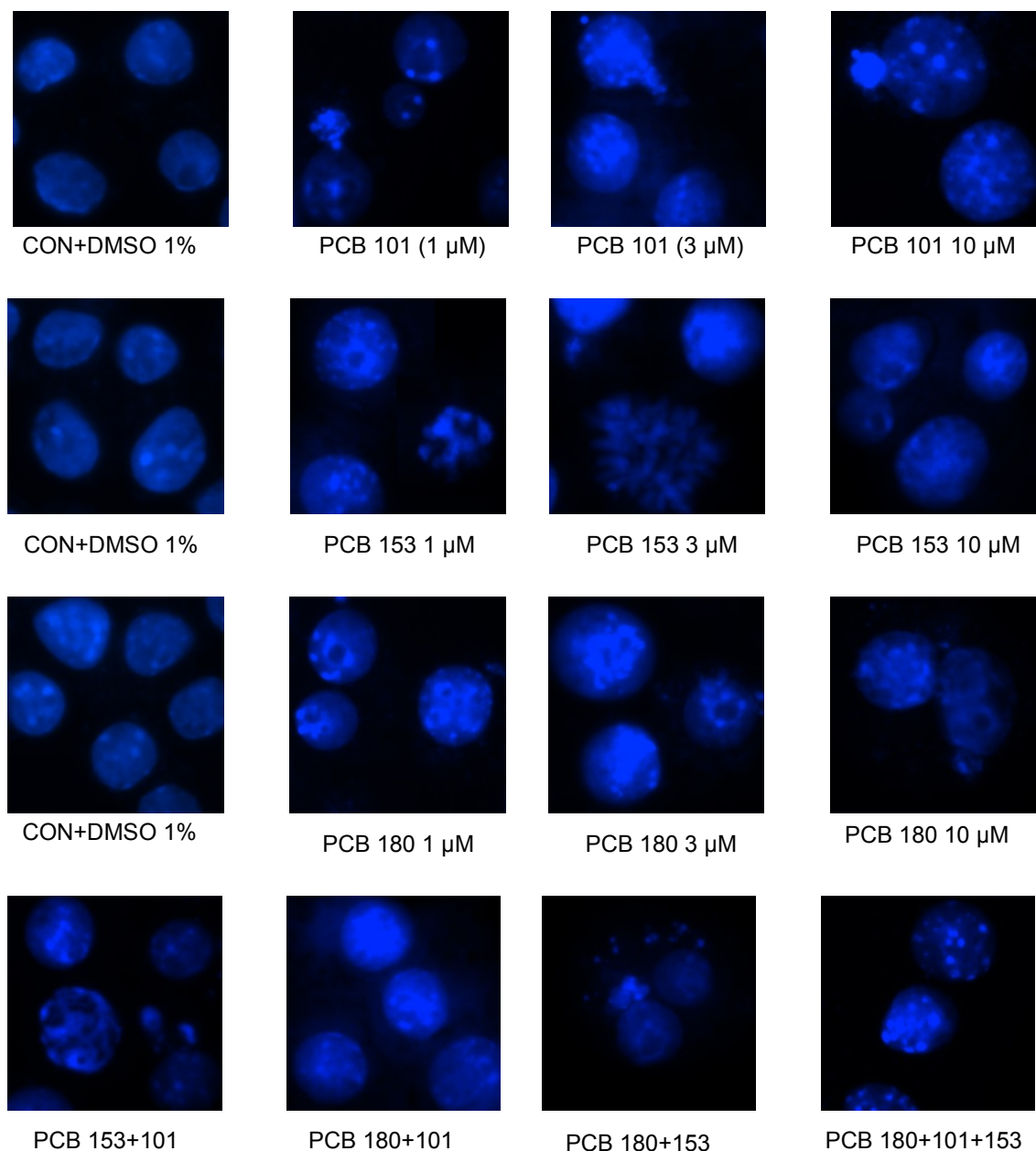
macrofagiche sono state stimulate con tutti e tre i PCB sia quando sono trattate con i PCB associati a due a due, anche a dosi alle quali da soli erano scarsamente tossici.



*Figura 14: Frammentazione del DNA*

L'induzione dell'apoptosi è stata, inoltre, valutata mediante colorazione con il DAPI (Fig. 15). Dopo 24 ore di incubazione con i PCB, le cellule in apoptosi sono state identificate grazie alla comparsa di nuclei picnotici. Le immagini riportate in Figura 15 mostrano i corpi apoptotici (nuclei frammentati e condensati) delle cellule macrofagiche trattate con i PCB da soli o in associazione. Il PCB 101 induce la formazione dei corpi apoptotici alla concentrazione più alta tra quelle utilizzate (10  $\mu\text{M}$ ), mentre per il PCB 153 gli stessi si presentano già alla concentrazione intermedia di 3  $\mu\text{M}$ . Per il congenere PCB 180 i corpi apoptotici sono stati visualizzati alla concentrazione più bassa (1  $\mu\text{M}$ ), per cui tale congenere è risultato essere il più citotossico.

Infine i corpi apoptotici si sono formati anche quando i PCB sono stati associati a due a due o tutti e tre insieme alla concentrazione non citotossica (1  $\mu$ M).



*Figura 15: Colorazione dei corpi apoptotici con il DAPI*

### 9.1.3 COLORAZIONE DEI NUCLEI IPODIPLOIDI CON PI

Per identificare il meccanismo che media l'effetto antiproliferativo dei PCB nelle cellule macrofagiche è stata effettuata un'analisi citofluorimetrica incubando le stesse con i PCB da soli o in associazione. L'apoptosi è stata quantificata con un'analisi citofluorimetrica mediante colorazione dei nuclei ipodiploidi con propidio ioduro (PI) (Fig. 16). I risultati ottenuti dimostrano che tutti i PCB analizzati inducono l'apoptosi nelle cellule J774A.1 in maniera concentrazione-dipendente e per ogni concentrazione saggiata ( $P < 0.01$  o  $P < 0.001$  vs. il controllo). Da notare è il marcato aumento dell'attività proapoptotica che si è evidenziato quando i PCB sono stati associati, a due a due o tutti e tre insieme, alla concentrazione più bassa.

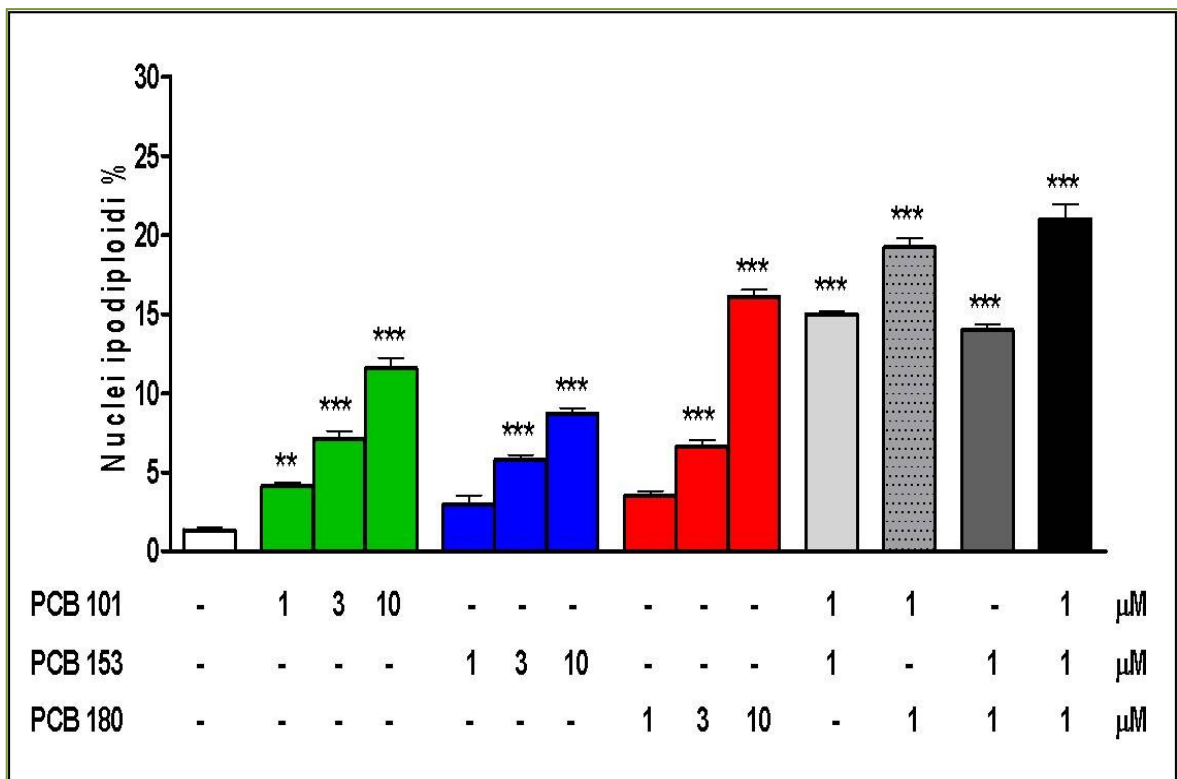


Figura 16: Percentuale dei nuclei ipodiploidi con PI

### 9.1.4 MODULAZIONE DELL'ESPRESSIONE DELLA CASPASI-3, DI BAX E DI BCL-2

Poichè l'attivazione della caspasi-3 è un segnale precoce e necessario per il fenomeno dell'apoptosi, è stato determinato l'effetto dei PCB su questa proteina. La caspasi-3 è poco espressa nelle cellule di controllo, mentre i PCB (1, 3 e 10  $\mu\text{M}$ ) ne aumentano l'espressione in maniera concentrazione dipendente (Fig. 17).

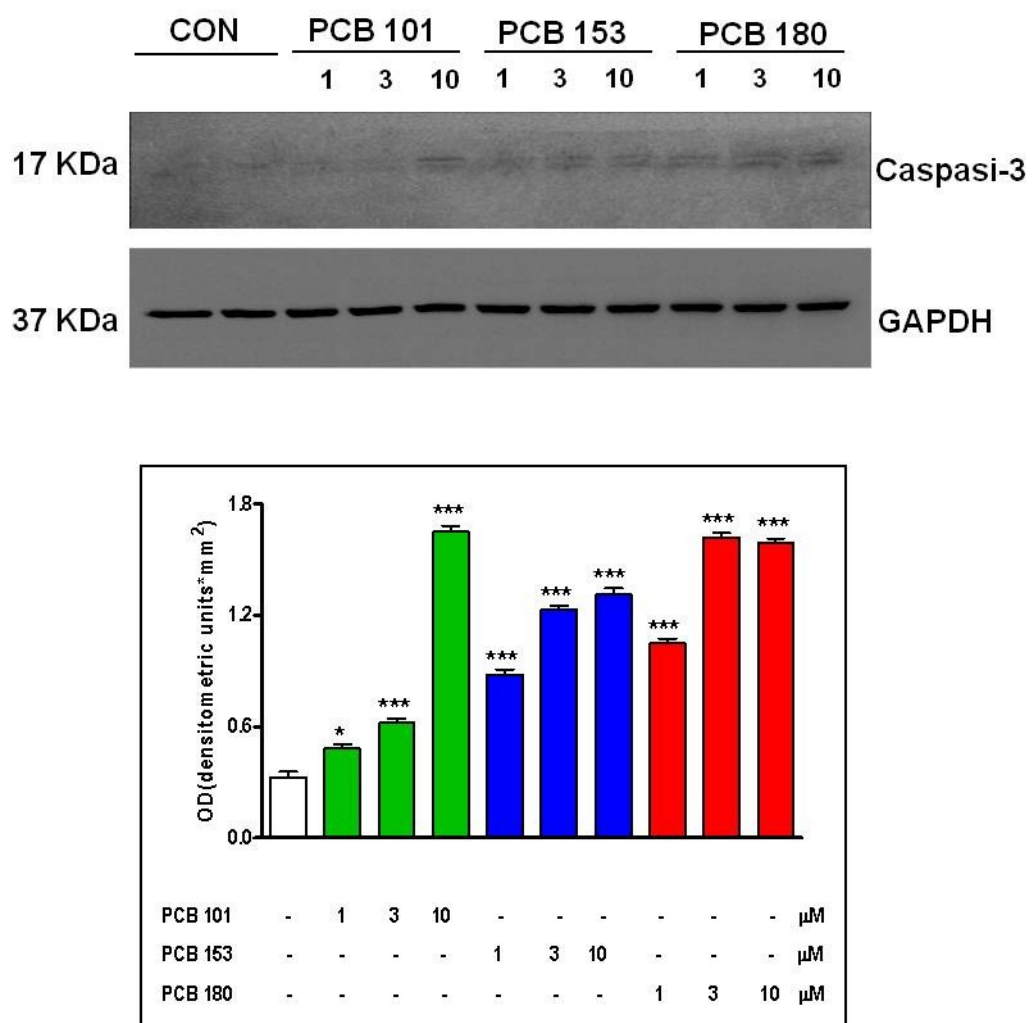


Figura 17: Effetto dei singoli PCB sull'espressione della caspasi-3

Come è mostrato nella Fig.18 si ha un aumento significativo dell'espressione della caspasi-3 quando le cellule sono stimulate con i PCB diversamente

associati a due a due alla concentrazione non citotossica o con la stimolazione congiunta dei tre PCB in esame.

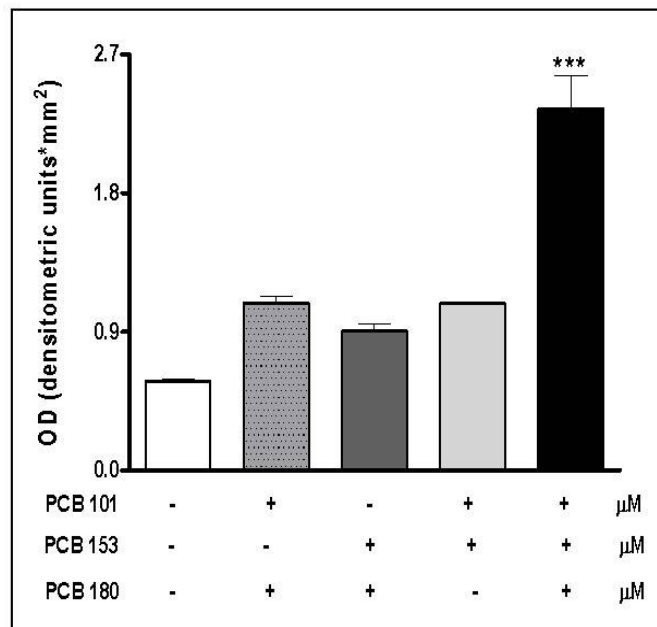
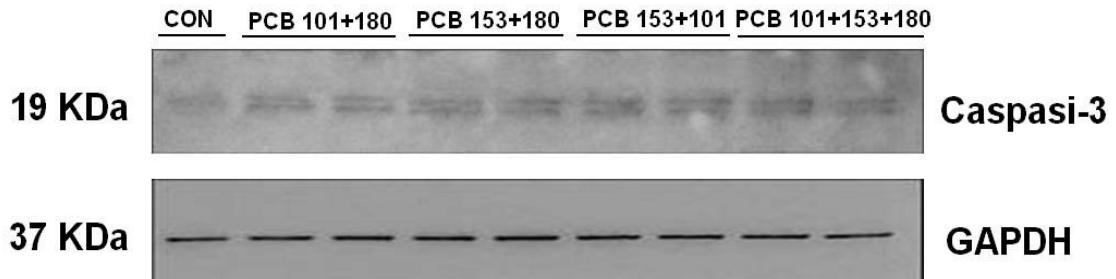


Figura 18: Effetto dei PCB in associazione sull'espressione della caspasi-3

Abbiamo altresì valutato la modulazione dell'espressione di due proteine: Bcl-2 e Bax, rispettivamente l'una anti-apoptotica l'altra pro-apoptotica. Come mostrato nella Fig. 19, l'esposizione dei macrofagi ai PCB 101, 153 e 180 alle concentrazioni di 1, 3 e 10  $\mu\text{M}$  determina una diminuzione dell'espressione di Bcl-2 e un aumento dell'espressione di Bax rispetto alle cellule di controllo non trattate. L'analisi densitometrica delle bande proteiche

ha evidenziato una riduzione significativa del ratio Bcl-2/Bax ( $P < 0.001$ ), che, nelle cellule trattate con i PCB 153 e 180 è concentrazione dipendente.

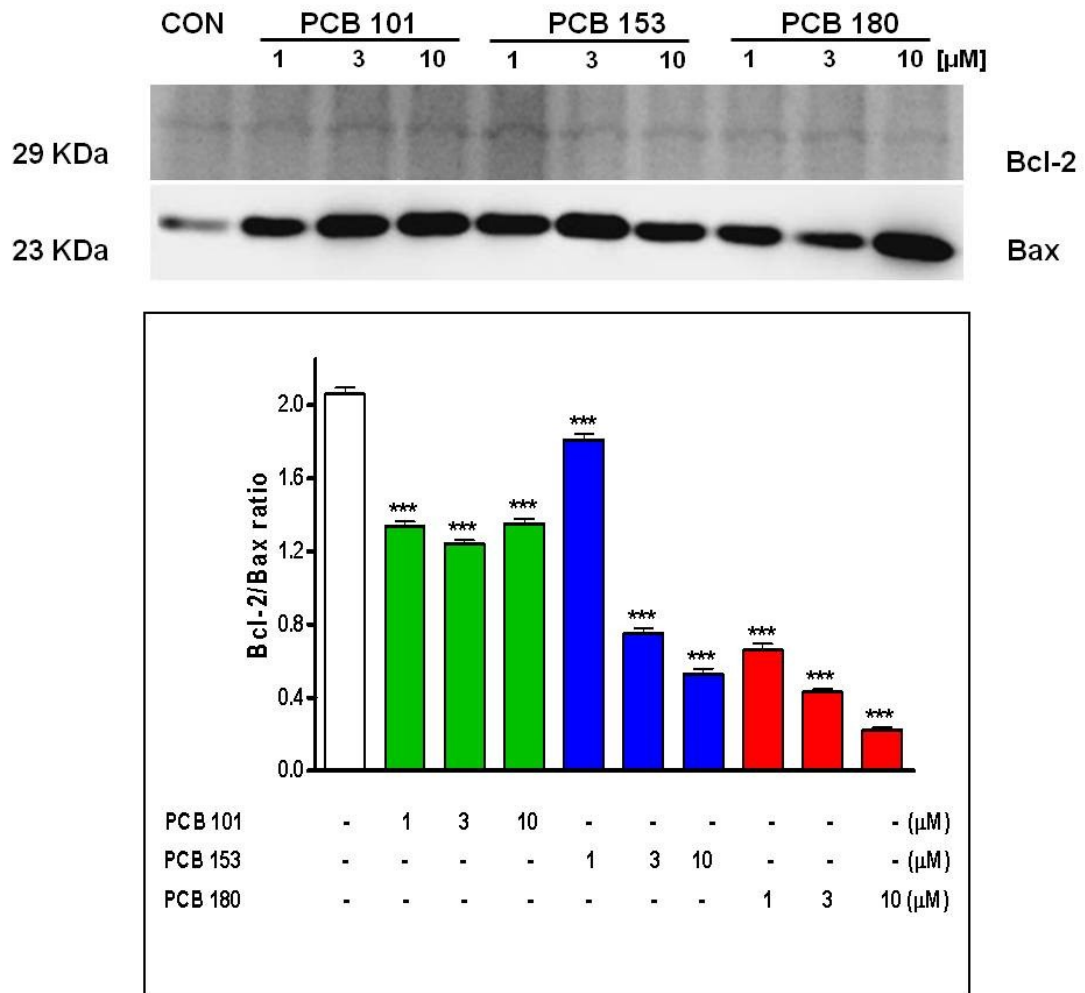


Figura 19: Effetto dei PCB singoli sul rapporto di Bcl-2/Bax

Come atteso, l'espressione di Bcl-2, nota proteina anti-apoptotica, diminuisce in modo significativo nelle cellule trattate con le associazioni dei PCB a due a due o con tutti e tre i PCB (Fig. 20).



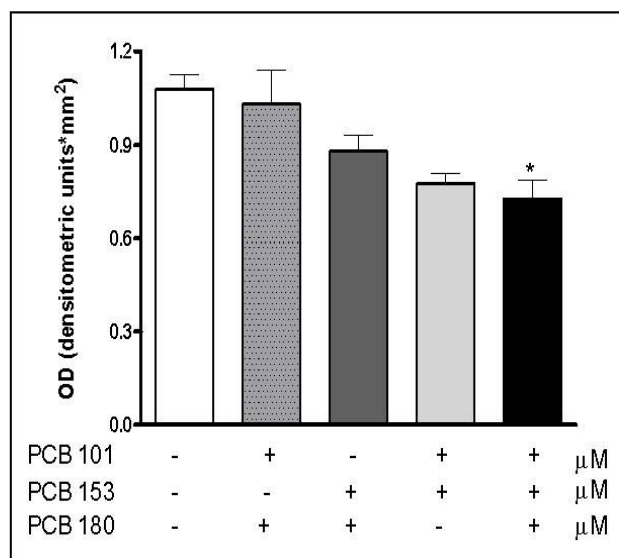
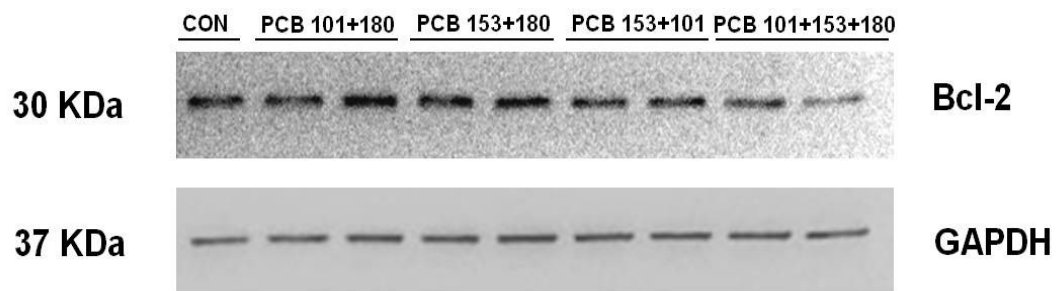


Figura 20: Effetto dei PCB in associazione sull'espressione di Bcl-2

## 9.2 ESPERIMENTI CONDOTTI SUGLI ADIPOCITI MATURI 3T3L1

### 9.2.1 PROTOCOLLO DI DIFFERENZIAMENTO P0

Nella Fig. 21 è riportato il protocollo utilizzato per indurre il differenziamento dei preadipociti ad adipociti maturi. I fibroblasti murini 3T3-L1 sono coltivati alla confluenza (CF). Dopo tre giorni, quando le cellule appaiono confluenti (ID 0), sono incubate con un mezzo di induzione al differenziamento composto da desametasone (Dex, 10  $\mu$ M), isobultimetilxantina (IBMX, 0.5 mM), insulina (Ins, 10  $\mu$ g/mL) e FBS al 10% (Neal JW & Clipstone NA, 2002.). Dopo 2 giorni (ID 2) le cellule sono incubate con il mezzo contenente solo insulina 10  $\mu$ g/mL e FBS al 10% per altri 2 giorni (ID 4). Al giorno ID 4 le cellule vengono incubate solo con DMEM al 10% FBS per ulteriori 3 giorni (ID 7). Alla fine del trattamento le cellule, differenziate in adipociti, vengono utilizzate per i diversi esperimenti.

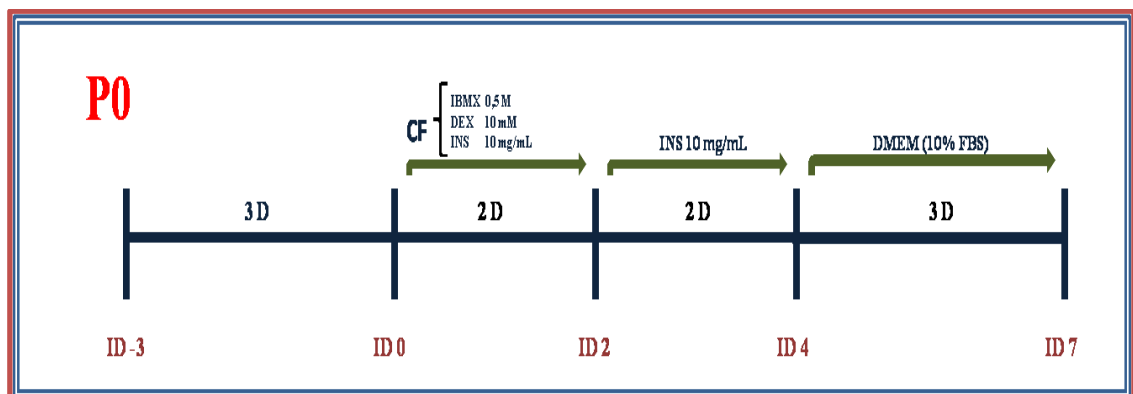


Figura 21: Protocollo di differenziamento adipocitario

### 9.2.2 PROTOCOLLO DI TRATTAMENTO P4

Gli effetti dei PCB sugli adipociti maturi sono stati valutati secondo un protocollo definito *P4*. Le cellule 3T3L1 indifferenziate sono trattate come da protocollo *P0*. Successivamente, al giorno ID 7 le cellule, ormai differenziate ad adipociti maturi, erano incubate con i diversi PCB, da soli o in associazione, alla concentrazione di 1  $\mu\text{M}$  per 48 ore (fino al giorno ID 9) (Fig. 22).

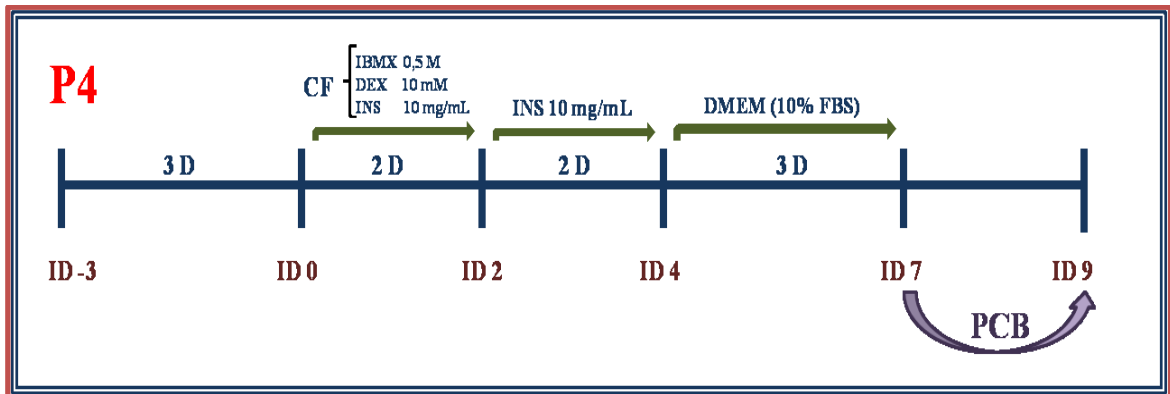


Figura 22: Protocollo di trattamento per gli adipociti maturi (*P4*)

### 9.2.3 EFFETTI DEI PCB SULLA VITALITÀ CELLULARE

La valutazione della vitalità cellulare è stata eseguita mediante saggio di vitalità cellulare (MTT assay). I PCB 101, 153 e 180, da soli, alle concentrazioni utilizzate 10-30-100 nM (Fig. 23 A) e 1-3-10  $\mu\text{M}$  (Fig. 23 B) non inducono una modificazione significativa della vitalità cellulare rispetto al controllo posto come 100%.

Le densità ottiche ( $\text{OD}_{620}$ ) delle cellule trattate con i PCB sono state comparate con le  $\text{OD}_{620}$  del controllo, dove le cellule avevano ricevuto solo il

veicolo. I valori percentuali sono valutati come  $media \pm SEM$  di tre esperimenti indipendenti.

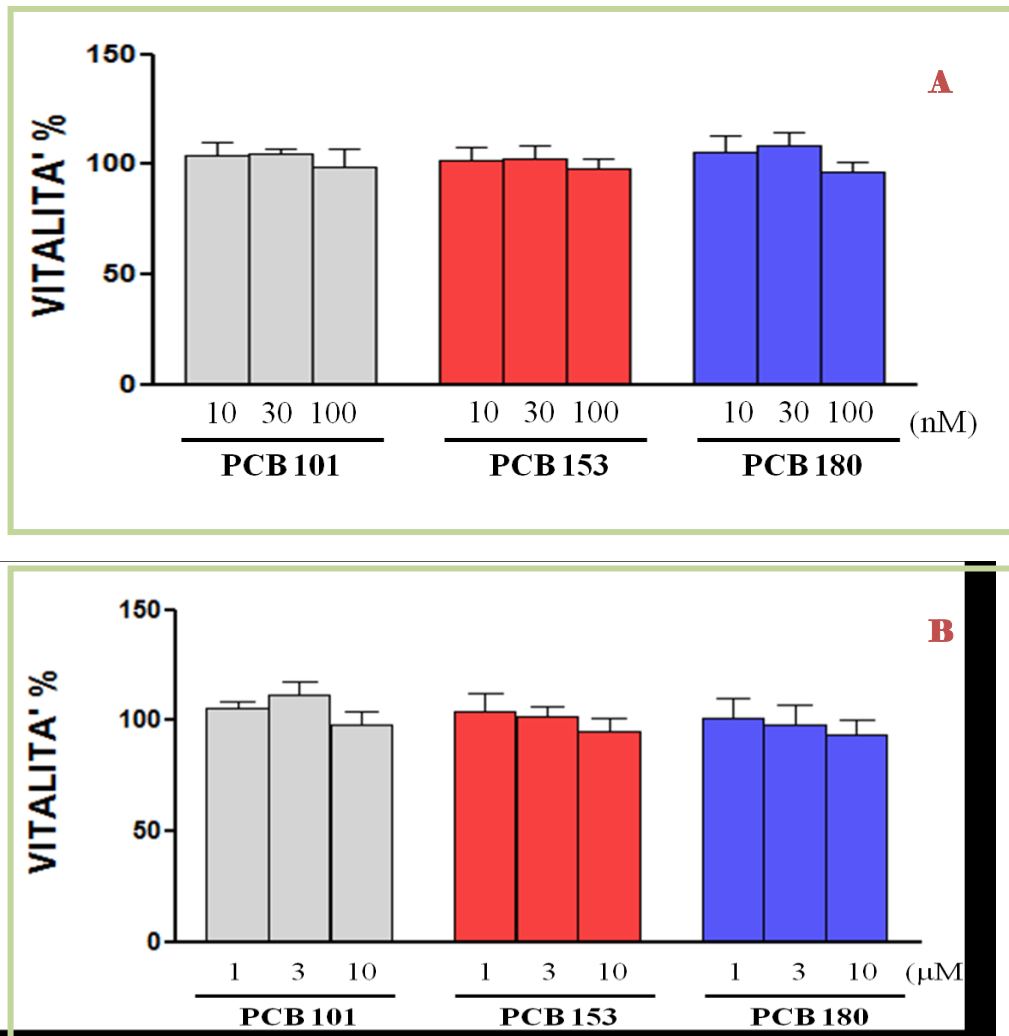


Figura 23: Effetto dei PCB 101, 153 e 180 sulla vitalità cellulare. I valori percentuali sono valutati come  $media \pm SEM$  di tre esperimenti indipendenti.

Inoltre, per discriminare fra un eventuale effetto sinergico o additivo sulla vitalità cellulare nel caso dei PCB in associazione, le cellule sono state incubate con i PCB in associazione a due a due o tutti e tre insieme alle concentrazioni di 100 nM (Fig. 24 A) e 1  $\mu$ M (Fig. 24 B). Comunque siano stati associati non si è registrata una riduzione significativa della vitalità cellulare.

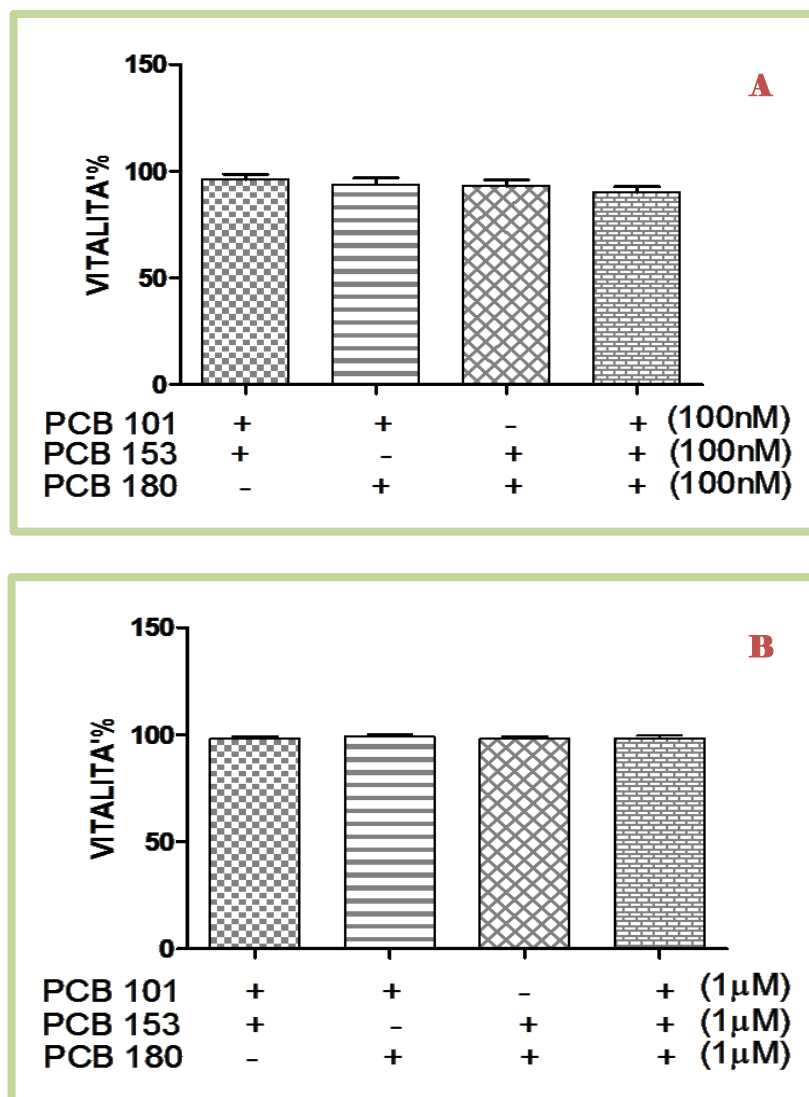


Figura 24: Effetto dei PCB in associazione sulla vitalità cellulare. Le densità ottiche (OD<sub>620</sub>) delle cellule trattate con i PCB sono comparate con le OD del controllo, dove le cellule hanno ricevuto solo il veicolo. I valori percentuali sono valutati come media±SEM di tre esperimenti indipendenti.

#### 9.2.4 EFFETTI DEI PCB SULL'ACCUMULO LIPIDICO

I PCB si accumulano nel tessuto adiposo a causa della loro elevata lipofilia. In particolare, il PCB 153 è uno degli inquinanti maggiormente rilevati nell'uomo. Ciò porta a supporre che tali composti possano avere effetti sulla funzione e sul rilascio di ormoni dal tessuto adiposo. Per tale motivo, in prima analisi, abbiamo esaminato se l'esposizione ai PCB da soli o in associazione

(1  $\mu$ M), avesse effetti sull'accumulo lipidico mediante una tecnica istologica:  
Red oil O' Staining.

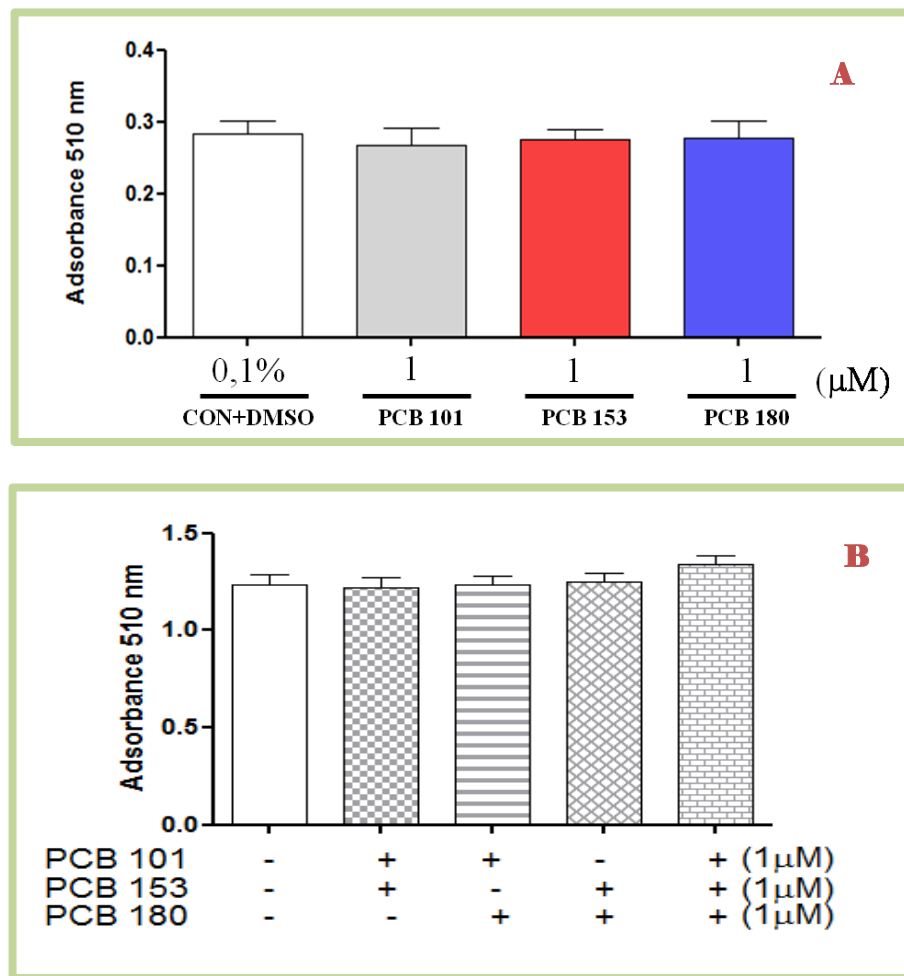


Figura 25: Effetto dei PCB 101, 153 e 180 da soli (A) e in associazione (B) sull'accumulo lipidico. Le densità ottiche ( $OD_{510}$ ) delle cellule trattate con i PCB sono comparate con le  $OD$  del controllo, dove le cellule hanno ricevuto solo il veicolo. I valori delle  $OD_{510}$  sono valutati come  $media \pm SEM$  di tre esperimenti indipendenti.

I dati ottenuti mostrano che i PCB da soli o in associazione alla concentrazione non citotossica non inducono una variazione significativa del contenuto lipidico degli adipociti maturi trattati secondo il protocollo P4 (Fig. 25 A e B) anche se si evidenzia un trend di aumento nel caso della triplice associazione.

### 9.2.5 MODULAZIONE DELL'ESPRESSIONE DEL PPAR $\gamma$

Il differenziamento adipogenico è un processo ben organizzato, che avviene in diverse fasi, coinvolgendo il blocco dell'espansione clonale mitotica e la trascrizione di numerosi fattori genici responsabili dei cambiamenti morfologici, biochimici e fisiologici che contribuiscono alla maturazione dell'adipocita (Rosen *et al.*, 2006; Farmer, 2008; Lefterova *et al.*, 2009). Per tale motivo abbiamo valutato, mediante analisi Western Blot, se l'esposizione ai PCB 101, 153 e 180, da soli o in associazione, fosse capace di modulare l'espressione del più importante fattore di trascrizione coinvolto nell'adipogenesi e nel mantenimento dello stato differenziato, il PPAR  $\gamma$ .

È noto che i recettori nucleari, a cui appartiene il PPAR  $\gamma$ , agiscono anche come sensori lipidici, regolando l'espressione di geni fondamentali per la regolazione del metabolismo energetico.

In particolare, il PPAR  $\gamma$  è stato identificato come un regolatore trascrizionale chiave coinvolto sia nel metabolismo energetico che nutrizionale (Wang, 2010; Kawai e Rosen, 2010).

In Fig. 26 è riportato l'effetto dei PCB (1  $\mu$ M), da soli (Fig. 26 A) e in associazione (Fig. 26 B), sull'espressione del PPAR  $\gamma$ . Dai nostri grafici si evince che l'esposizione a tali sostanze non induce una modificazione significativa dell'espressione del PPAR  $\gamma$  negli adipociti maturi, anche se un trend di riduzione è riscontrato nelle diverse associazioni.

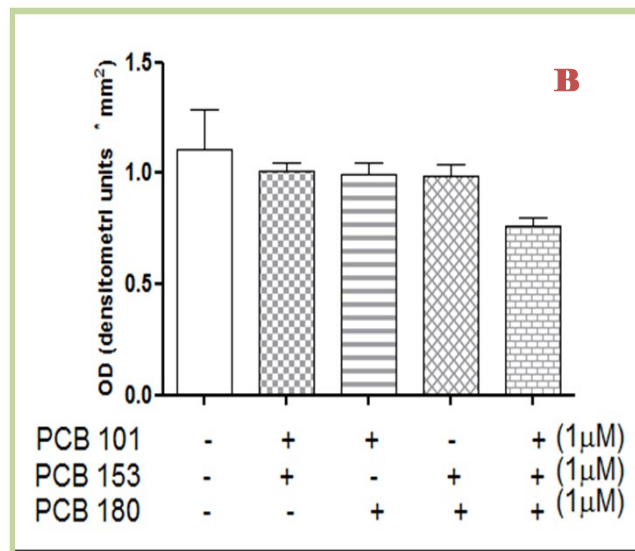
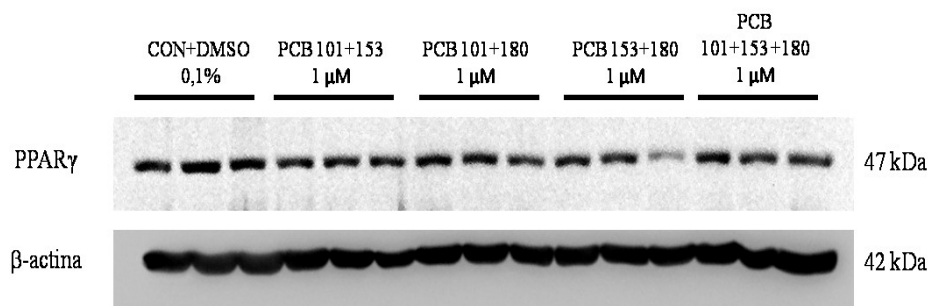
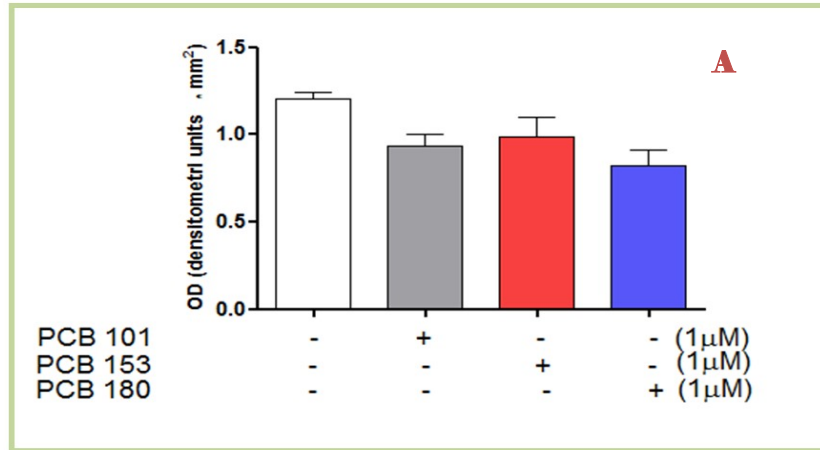
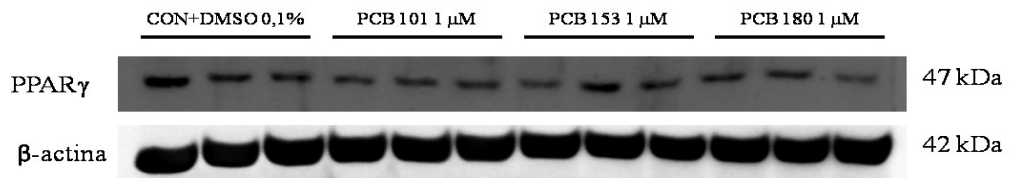


Figura 26: Espressione ed analisi densitometrica del PPAR $\gamma$  mediante analisi Western Blot. Protocollo di trattamento P4. Le cellule 3T3L1 vengono trattate con i PCB 101, 153 e 180, da soli (A) e in associazione (B) (1  $\mu$ M) per 48 ore. L'espressione della  $\beta$ -actina è utilizzata come riferimento. I valori ottenuti sono valutati come media $\pm$ SEM di tre esperimenti indipendenti.



### **9.2.6 EFFETTI DEI PCB SULLA FUNZIONE DEGLI ADIPOCITI MATURI**

Per meglio comprendere gli effetti dei PCB non diossino-simili in esame sulle funzioni adipocitarie, abbiamo indagato come tali congeneri potessero modulare la trascrizione di importanti adipochine secrete quali: la leptina e l'isoforma attiva del suo recettore ObRb, l'adiponectina, i rispettivi recettori AdipoR1 e AdipoR2 e quelle di proteine coinvolte nel signaling della leptina, la cui espressione risulta alterata in caso di resistenza all'ormone quali PTP1B e STAT3 e pSTAT3. Sono state esaminate anche la modulazione di citochine pro- e anti-infiammatorie l'interleuchina-6 (IL-6); il fattore di necrosi tumorale  $\alpha$  (TNF $\alpha$ ) e l'interleuchina-10 (IL-10).

### **9.2.7 LEPTINA E SUO RECETTORE ObRb**

L'iperleptinemia, che caratterizza la grande maggioranza degli obesi, sembra avere un ruolo proaterogeno contribuendo all'insulino-resistenza, alterando la funzione endoteliale, favorendo l'aggregazione piastrinica e la trombosi arteriosa (Mertens *et al.*, 2006). Per tale motivo abbiamo investigato l'effetto di tali inquinanti sull'espressione della leptina e del suo recettore ObRb negli adipociti maturi. Come da protocollo *P4*, quando gli adipociti maturi sono trattati con i PCB, da soli (1  $\mu$ M), si assiste ad un trend di aumento della trascrizione del gene della leptina. In particolare, tale aumento è significativo ( $p < 0.05$ ) quando le cellule sono trattate con il PCB 153 (Fig. 27 A). Alle

stesse condizioni sperimentali non si assiste ad una modificazione della trascrizione dell'mRNA per il suo recettore ObRb (Fig. 27 B).

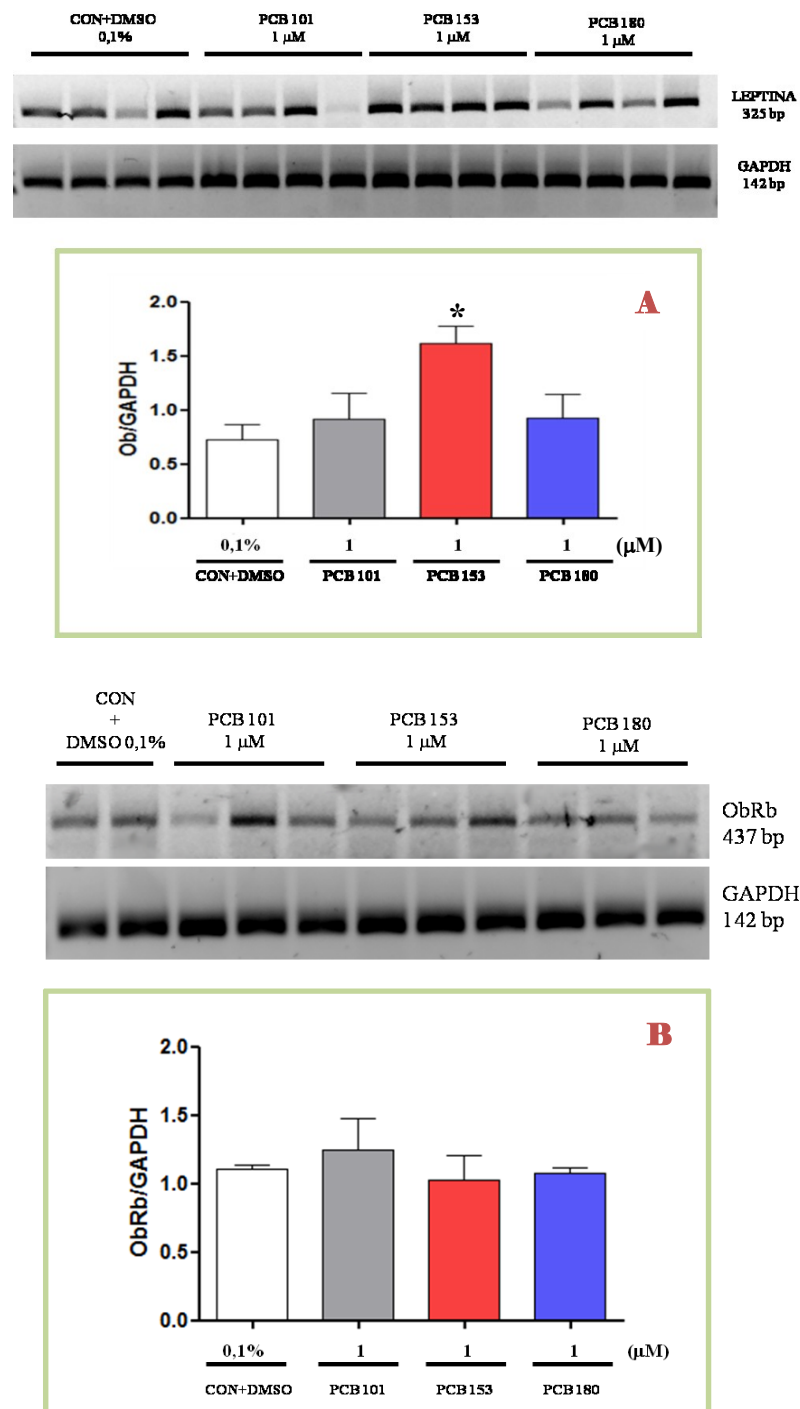
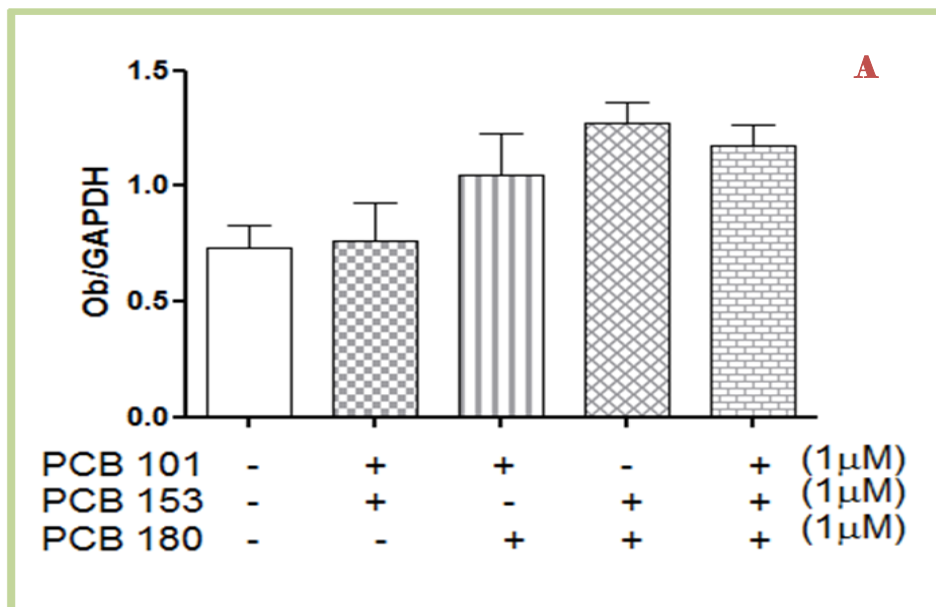
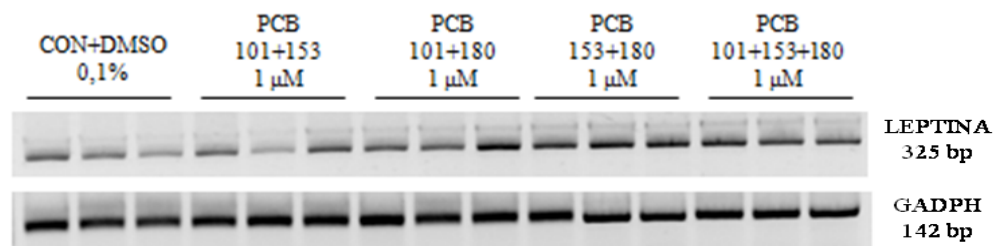


Figura 27: Effetti dei PCB 101,153 e 180 da soli alla concentrazione di 1 μM sulla trascrizione della leptina (A) (\* $p < 0.05$  vs CON+DMSO 0,1%) e del suo recettore ObRb (B) del suo recettore ObRb. L'espressione della GAPDH è utilizzata come riferimento. I valori ottenuti sono valutati come  $media \pm SEM$  di tre esperimenti.

Inoltre, come mostrato in Fig. 28 A, quando i PCB sono associati si osserva un aumento dell'espressione della leptina in particolare quando si associa il PCB 153 con il 180.

I grafici in Fig. 28 B mostrano una riduzione significativa (\*\* $p < 0.001$  vs *CON+DMSO* 0,1%; \* $p < 0.05$  vs *CON+DMSO* 0,1%) dell'espressione dell'isoforma del recettore della leptina, ObRb, che risulta essere particolarmente significativo quando si associava il PCB 101 con il 153 ( $p < 0.001$ ) e il PCB 101 con il PCB 180 ( $p < 0.05$ ).



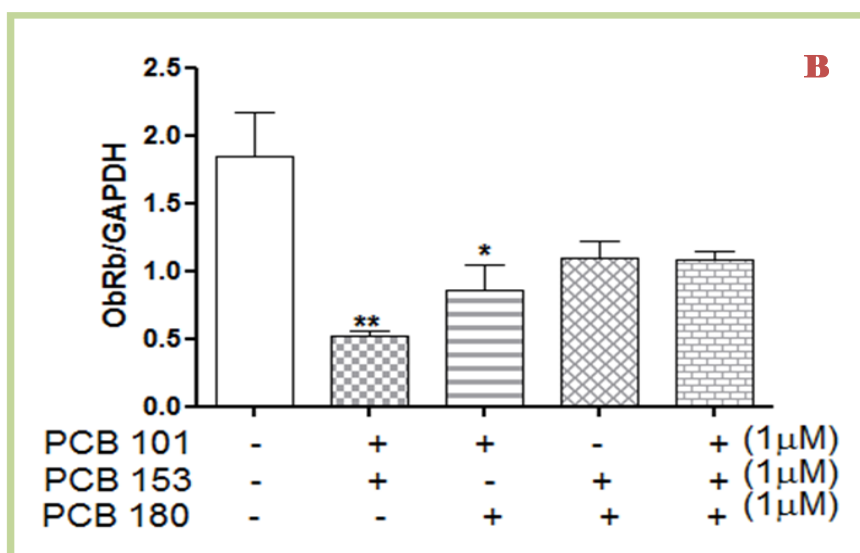
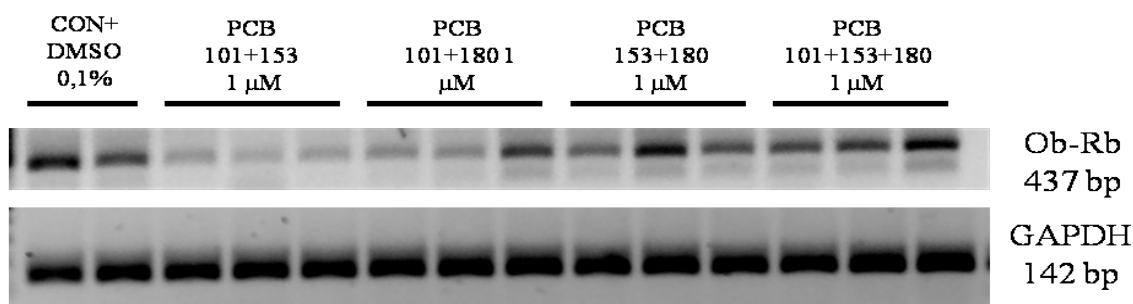


Figura 28: Effetti dei PCB 101,153 e 180 in associazione alla concentrazione di 1  $\mu$ M sulla trascrizione della leptina (A) e del suo recettore ObRb (B) (\*\* $p$ <0.001 vs CON+DMSO 0,1%; \* $p$ <0.05 vs CON+DMSO 0,1%); L'espressione della GAPDH è utilizzata come riferimento. I valori ottenuti sono valutati come media $\pm$ SEM di tre esperimenti indipendenti.

## 9.2.8 LEPTINO-RESISTENZA

Per definire l'effetto dei PCB in associazione sulla leptino-resistenza che si instaura negli adipociti è stata valutata, in prima analisi, l'espressione della proteina PTP1B (Fig. 29), regolatore negativo del signaling della leptina. Tale fosfatasi defosforila la chinasi JAK2, che interviene nella via di trasduzione del segnale del recettore della leptina, riducendo la sensibilità cellulare e/o tissutale all'ormone.

Dai nostri dati si evince che l'espressione di tale inibitore del signaling risulta aumentata da tutti i PCB, in particolare tale modificazione risulta significativa nelle associazioni (PCB 153+180) e quando sono tutti e tre insieme ( $p < 0.05$ ).

Successivamente abbiamo valutato la via di trasduzione del segnale intracellulare JAK/STAT, che è maggiormente attivata dal legame ormone al recettore Ob-Rb. Infatti una volta attivato, il recettore dimerizza con conseguente attivazione di JAK, che fosforila entrambi i monomeri del recettore Ob-Rb. Tale fosforilazione crea nel recettore siti di legame per le proteine STAT, anch'esse fosforilate dalle proteine JAK.

I dimeri di STAT fosforilati, a questo punto, lasciano il recettore e si legano a sequenze specifiche del DNA promuovendo la trascrizione di diversi geni target coinvolti nell'incremento del "feeding", in particolare NPY, CRH e POMC.

In Fig. 30 è mostrato l'effetto dei PCB sulla via di trasduzione del segnale di STAT 3. Come si può osservare, l'espressione di pSTAT 3 risulta diminuita e quella di STAT 3 aumentata rispetto alle cellule di controllo che hanno ricevuto il solo veicolo. L'analisi densitometrica delle bande proteiche ha evidenziato una riduzione significativa della ratio pSTAT3/STAT3 ( $p < 0.05$ ) nelle cellule trattate con i PCB in associazione.

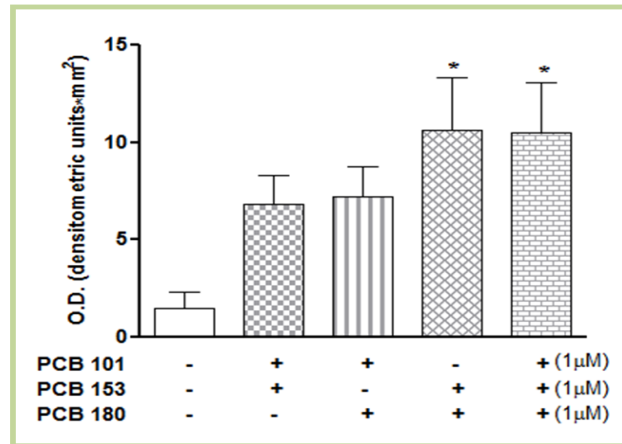
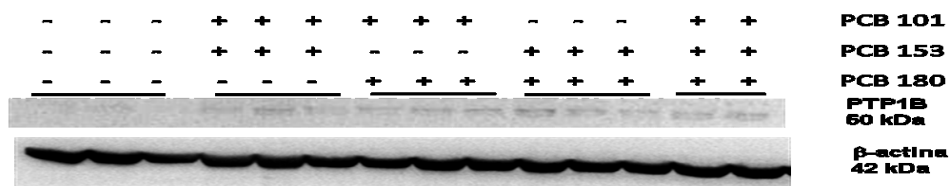


Figura 29: Espressione ed analisi densitometrica del PTP1B mediante analisi Western Blot. Protocollo di trattamento P4. Le cellule 3T3L1 vengono trattate con i PCB 101, 153 e 180 in associazione (1 μM) per 48 ore ( $p < 0.05$ ). L'espressione della β-actina è utilizzata come riferimento. I valori ottenuti sono valutati come  $media \pm SEM$  di tre esperimenti indipendenti.

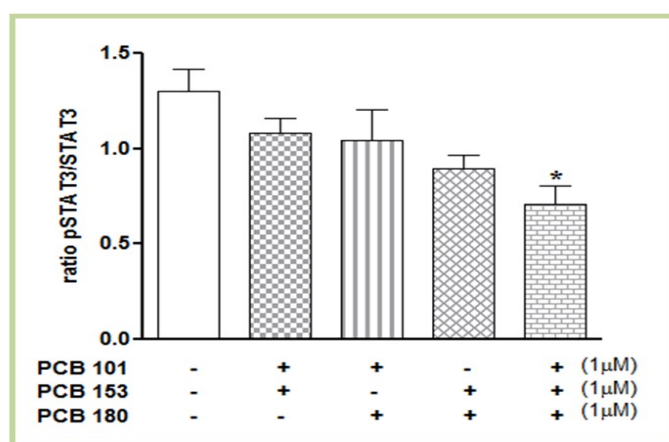
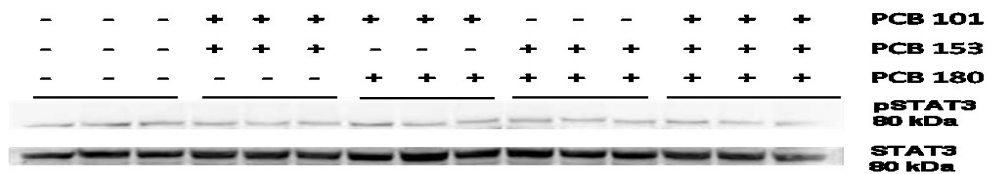


Figura 30: Espressione ed analisi densitometrica della ratio pSTAT3/STAT3 mediante analisi Western Blot. Protocollo di trattamento P4. Le cellule 3T3L1 vengono trattate con i PCB 101, 153 e 180 in associazione (1 μM) per 48 ore ( $p < 0.05$ ). L'espressione della β-actina è utilizzata come riferimento. I valori ottenuti sono valutati come  $media \pm SEM$  di tre esperimenti indipendenti.

### 9.2.9 ADIPONECTINA E SUOI RECETTORI ADIPOR1 E ADIPOR2

Alcuni studi riportano che i livelli di mRNA della adiponectina (ACRP30) sono fortemente aumentati durante il differenziamento degli adipociti (Hu *et al.*, 1996; Scherer *et al.*, 1995), sono abbondanti nel siero normale e, *in vitro*, la sua secrezione è aumentata dall'insulina (Scherer *et al.*, 1995). Inversamente, i livelli di mRNA delle adipochine risultano significativamente ridotti nel WAT derivato da topi e uomini obesi (Hu *et al.*, 1996). Inoltre, nei soggetti obesi, le concentrazioni plasmatiche di adiponectina sono notevolmente più basse rispetto a quelle rilevate nei soggetti magri (Arita *et al.*, 1999), suggerendo che questo fattore, secreto dagli adipociti, giochi un ruolo fondamentale nella regolazione del bilancio energetico.

Il grafico in Fig. 31 A mostra l'effetto dei PCB sulla trascrizione dell'ACRP30. Dai nostri dati si osserva che tali composti non inducono un aumento della trascrizione di tale gene, sebbene quando gli adipociti maturi sono trattati con il congenere 101 si assiste ad un aumento dell'espressione di tale adipochina. I dati in Fig. 31 B mostrano l'effetto sulla trascrizione dell'adiponectina quando si associano i vari PCB in esame alla concentrazione complessiva di 1  $\mu$ M. In tutti i casi analizzati si osserva un aumento molto significativo ( $p < 0.001$ ) sulla trascrizione dell'ACRP30, suggerendo che tali congeneri agiscano con un meccanismo sinergico.

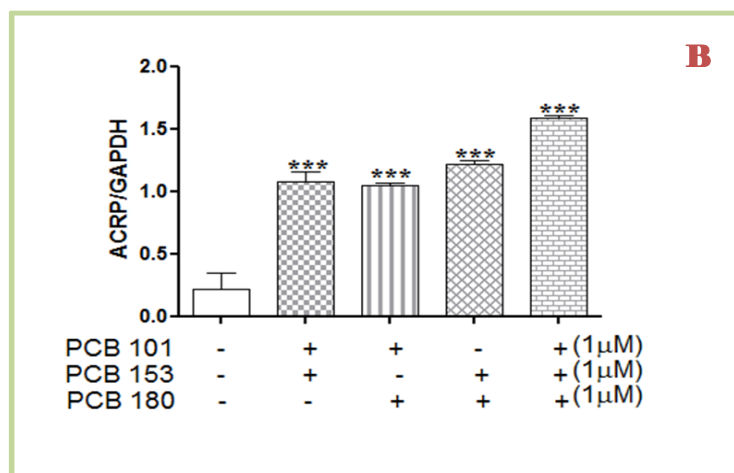
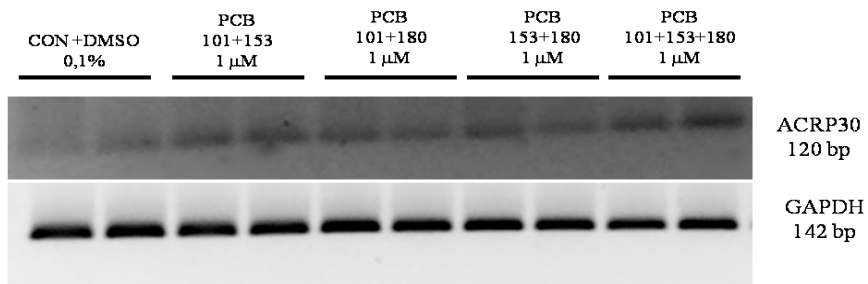
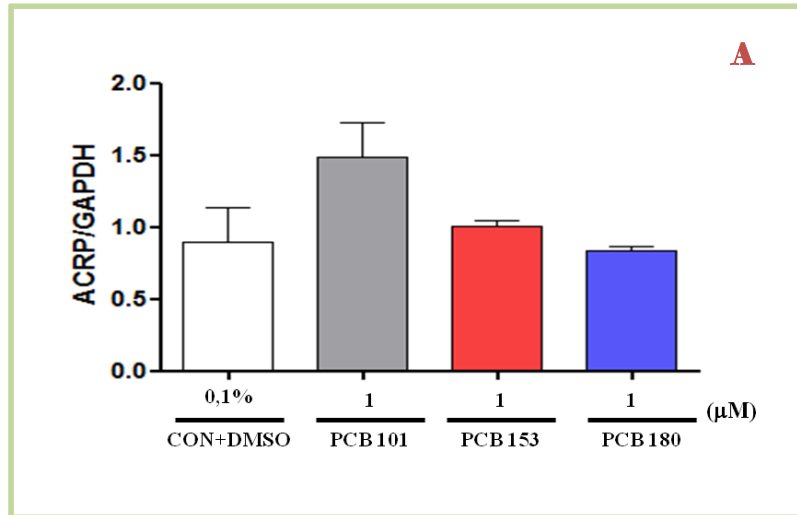
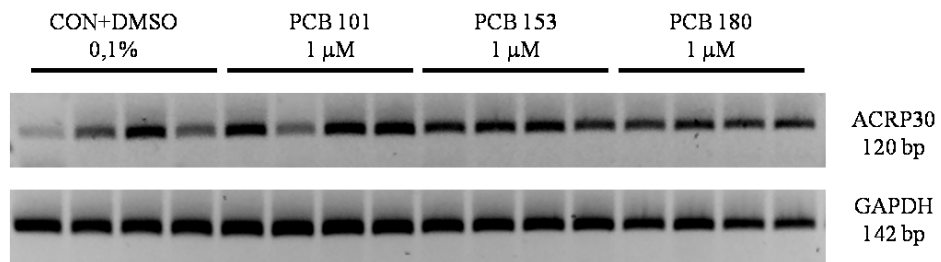


Figura 31: Effetti dei PCB, da soli (A) e in associazione (B), alla concentrazione di 1  $\mu$ M, sulla trascrizione del gene della Adiponectina (\*\*\*) $p < 0.001$  vs CON+DMSO 0,1%). L'espressione della GAPDH è utilizzata come riferimento. I valori ottenuti sono valutati come media  $\pm$  SEM di tre esperimenti.



Successivamente, abbiamo valutato se l'esposizione a tali inquinanti avesse effetti sull'espressione dei recettori per ACRP30, AdipoR1 e AdipoR2.

Come mostrato in Fig. 32, nelle condizioni sperimentali scelte, non si assiste ad una modificazione significativa della trascrizione dell'mRNA per il recettore AdipoR1 sia quando le cellule sono trattate con i PCB da soli (Fig. 32 A) sia quando in associazione (Fig.32 B).

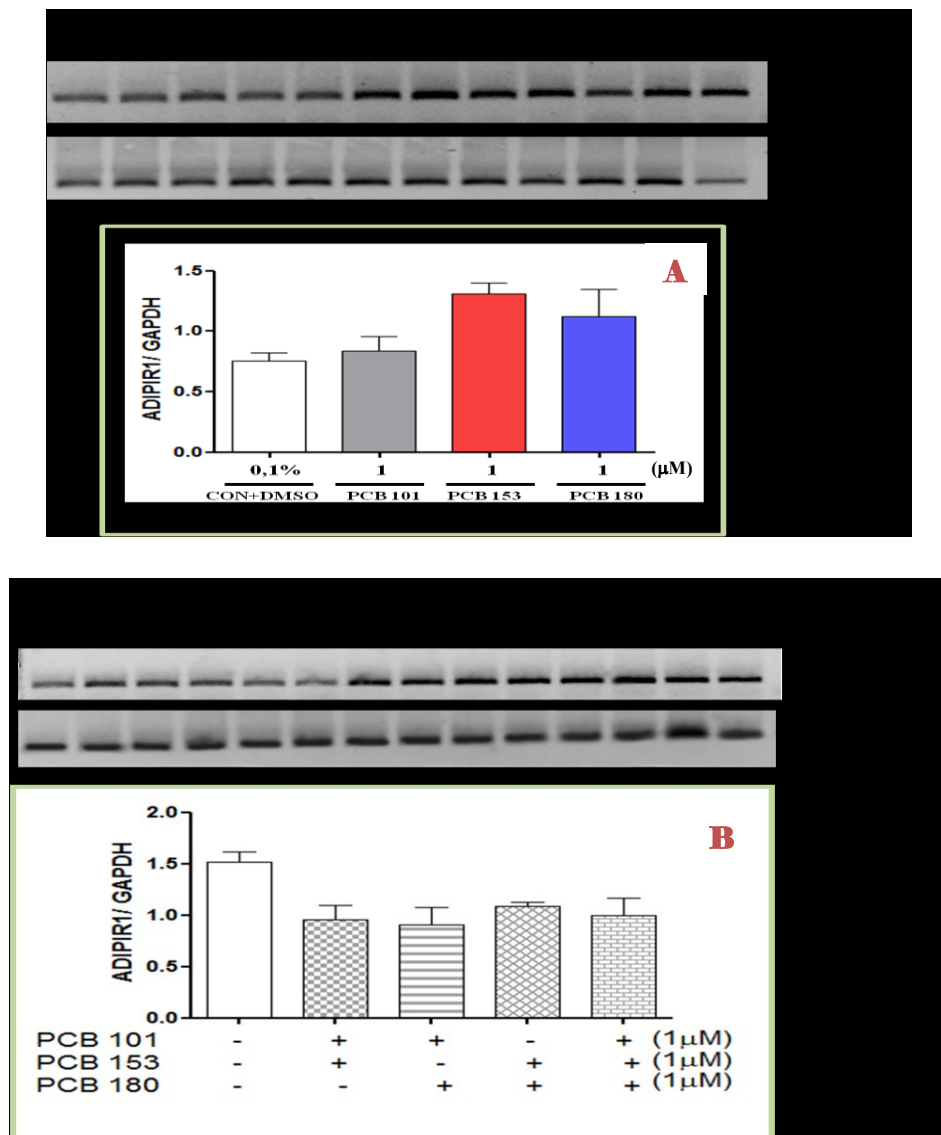


Figura 32. Effetti dei PCB, da soli (A) e in associazione (B), alla concentrazione di 1 μM, sulla trascrizione dei geni ADIPOR1. L'espressione della GAPDH è utilizzata come riferimento. I valori ottenuti sono valutati come media±SEM di tre esperimenti.

I PCB 101, 153 e 180, sia da soli sia in associazione, inducono, invece un leggero trend di diminuzione della trascrizione del mRNA dell'AdipoR2 come mostrato in Fig. 33 A e B.

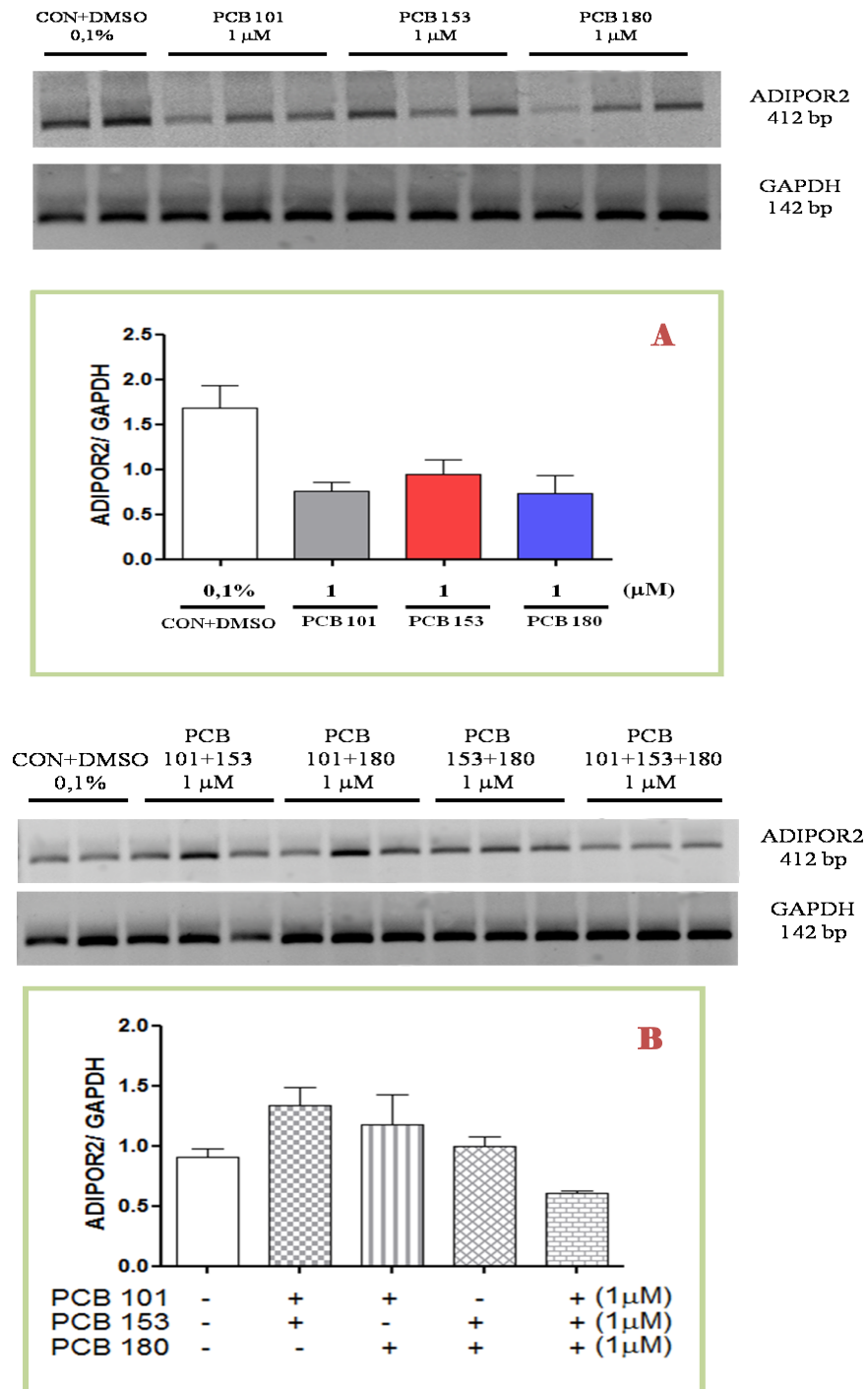


Figura 33: Effetti dei PCB da soli e in associazione, alla concentrazione di 1  $\mu$ M, sulla trascrizione del gene ADIPOR2. L'espressione della GAPDH è utilizzata come riferimento. I valori ottenuti sono valutati come media  $\pm$  SEM di tre esperimenti.

### 9.2.10 EFFETTI DEI PCB SULLA TRASCRIZIONE DELLE CITOCHINE IL-6, TNF $\alpha$ E IL-10

Numerosi studi hanno dimostrato che il tessuto adiposo è il maggiore compartimento di *storage energetico* ed è riconosciuto come il maggior organo endocrino secernente numerose molecole bioattive e citochine quali IL-6, TNF $\alpha$  e IL-10 (Lago *et al.*, 2007a; Lago *et al.*, 2007b). Il profilo di secrezione di tali molecole risulta alterato nell'obesità, con conseguente modulazione dei processi infiammatori che sottendono la fisiopatologia dei disordini metabolici e cardiovascolari legati all'obesità. Per tale motivo abbiamo indagato come il trattamento degli adipociti maturi con i PCB 101, 153 e 180 moduli l'espressione di tali citochine.

È noto che esista una correlazione positiva tra l'incremento dei livelli circolanti di IL-6, quelli secreti dagli adipociti e l'insulino-resistenza nei soggetti obesi (Vozarova *et al.*, 2001). Infatti l'IL-6 può contribuire all'insulino-resistenza mediante la gluconeogenesi e impoverendo il signaling del recettore dell'insulina nel fegato. Numerosi dati, infine, mostrano che l'adiponectina e IL-6 hanno ruoli opposti sulla modulazione dell'insulino sensibilità.

I grafici riportati in Fig. 34 A e B mostrano l'effetto dei PCB 101, 153 e 180, da soli o in associazione rispettivamente, sulla trascrizione dell'mRNA dell'IL-6. I nostri dati mostrano che i PCB inducono un aumento dell'espressione di tale citochina pro-infiammatoria sia quando gli adipociti

sono trattati sia con i PCB da soli che in associazione. In particolare, l'aumento della trascrizione risulta significativo ( $p < 0.05$ ) quando si associano tutti e tre i PCB.

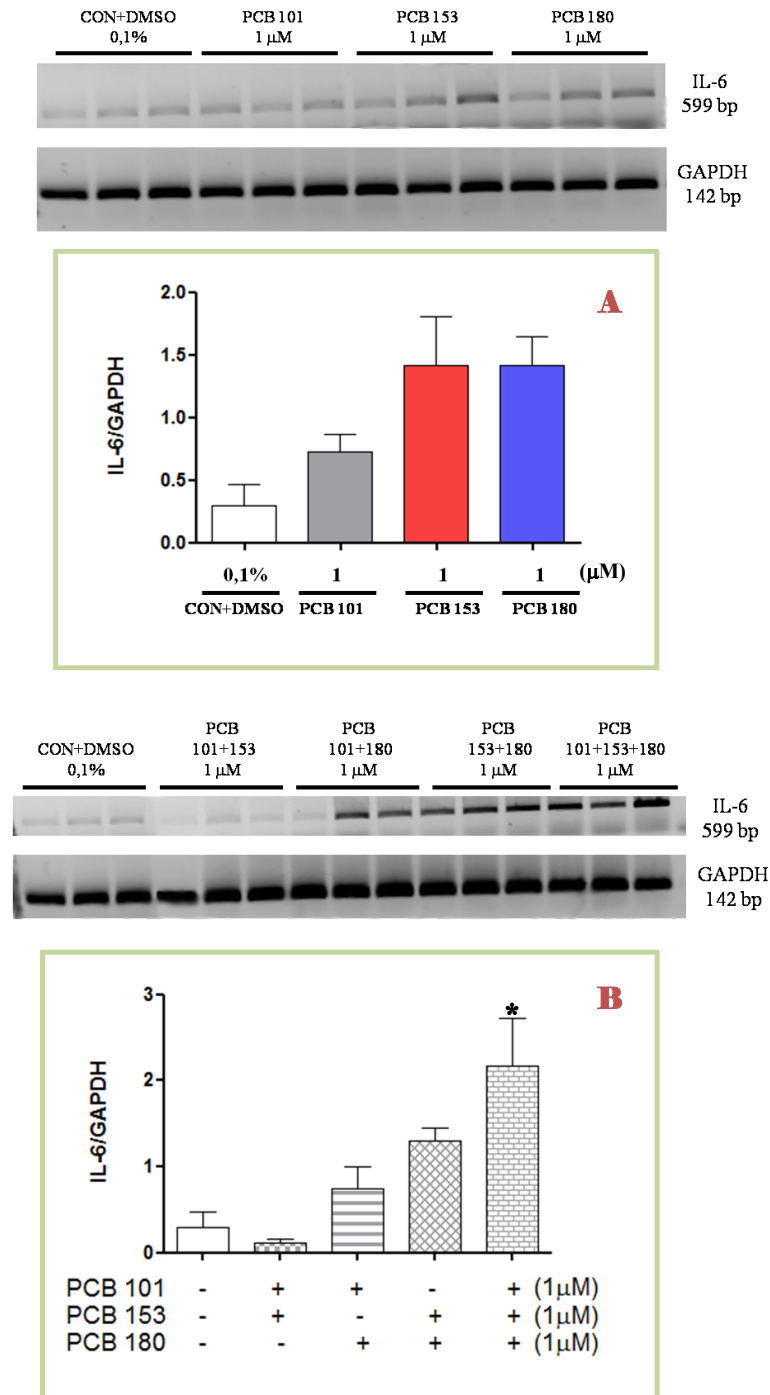
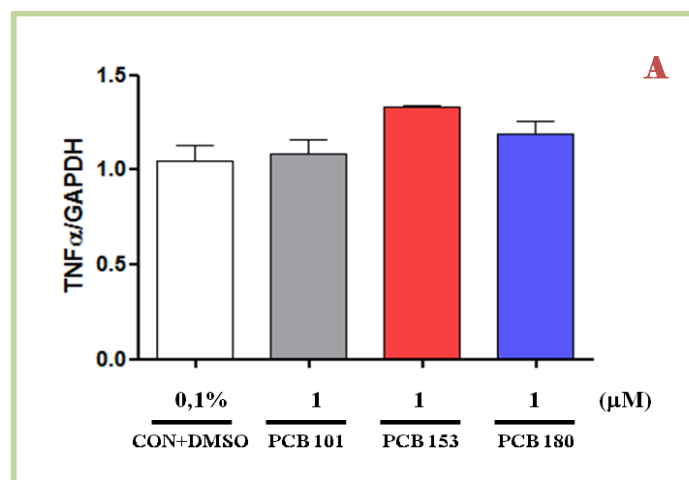
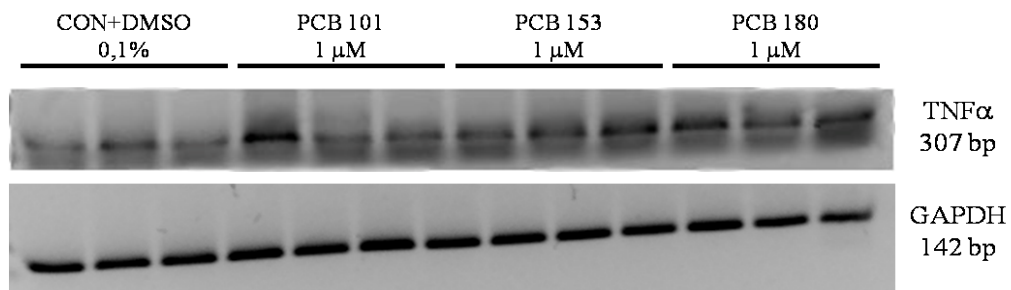


Figura 34: Effetti dei PCB, da soli (A) e in associazione (B), alla concentrazione di 1 μM, sulla trascrizione del gene dell'IL-6 (\* $p < 0.05$  vs CON+DMSO 0,1%). L'espressione della GAPDH è utilizzata come riferimento. I valori ottenuti sono valutati come media ± SEM di tre esperimenti.

Il fattore di necrosi tumorale  $\alpha$  è prodotto in grandi quantità nei soggetti obesi, in quanto regola la funzione e il numero degli adipociti (Dandona *et al.*, 1996). Il TNF $\alpha$  induce insulino-resistenza negli adipociti mediante lipolisi, dato che l'insulina ha primariamente un'azione anti-lipolitica in queste cellule. Se l'insulino-resistenza indotta dal TNF $\alpha$  sia causata semplicemente da un effetto metabolico dell'insulina non è noto (Prins e O'Rahilly, 1997). Dai nostri dati si evince che i PCB da soli non inducono una variazione dell'espressione del TNF $\alpha$  rispetto al controllo dove le cellule hanno ricevuto solo il veicolo (Fig. 35 A). Di contro quando i PCB si associano alla concentrazione complessiva di 1  $\mu$ M si osserva un aumento della trascrizione di tale citochina pro-infiammatoria.



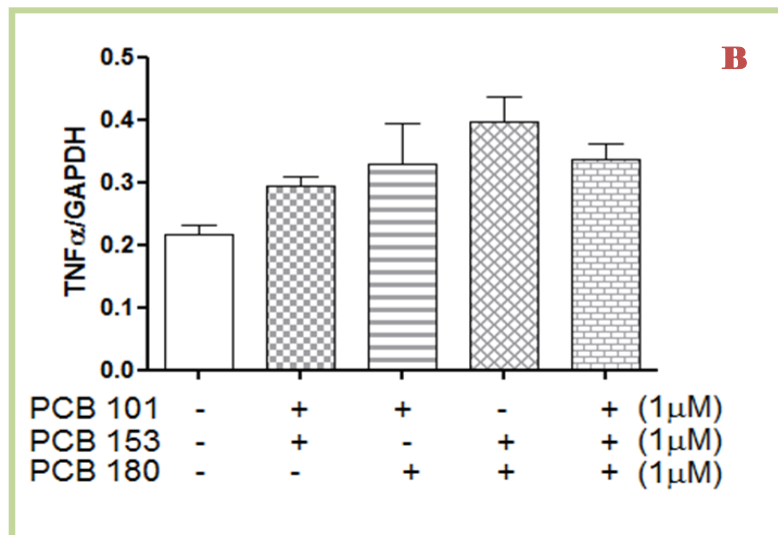
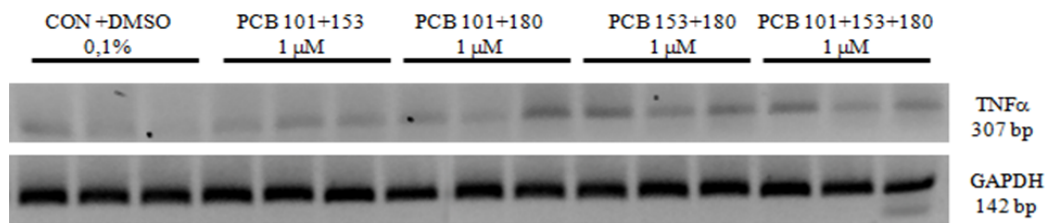


Figura 35: Effetti dei PCB, da soli (A) e in associazione (B), alla concentrazione di 1  $\mu$ M, sulla trascrizione del gene del TNF $\alpha$ . L'espressione della GAPDH è utilizzata come riferimento. I valori ottenuti sono valutati come media  $\pm$  SEM di tre esperimenti.

Infine, abbiamo valutato la trascrizione della citochina anti-infiammatoria IL-10, in quanto capace di inibire la produzione di diverse citochine quali il TNF $\alpha$ , l'IL-1 $\beta$  e l'IL-6, in vari tipi di cellule e di automodularsi (Yamaoka *et al.*, 1999; Malefyt, 1999). Inoltre inibisce la generazione di specie reattive dell'ossigeno e aumenta il rilascio di recettori del TNF $\alpha$ , di cui ne può antagonizzare gli effetti (Nozaki *et al.*, 1998).

In Fig. 36 è riportato l'effetto dei PCB da soli (Fig. 36 A) e in associazione (Fig. 36 B). Si osserva una leggera diminuzione dell'espressione di tale citochina quando gli adipociti maturi sono trattati con il PCB 180. Di contro,

quando si associano i diversi PCB si evidenzia un trend di aumento della trascrizione dell'mRNA dell'IL-10.

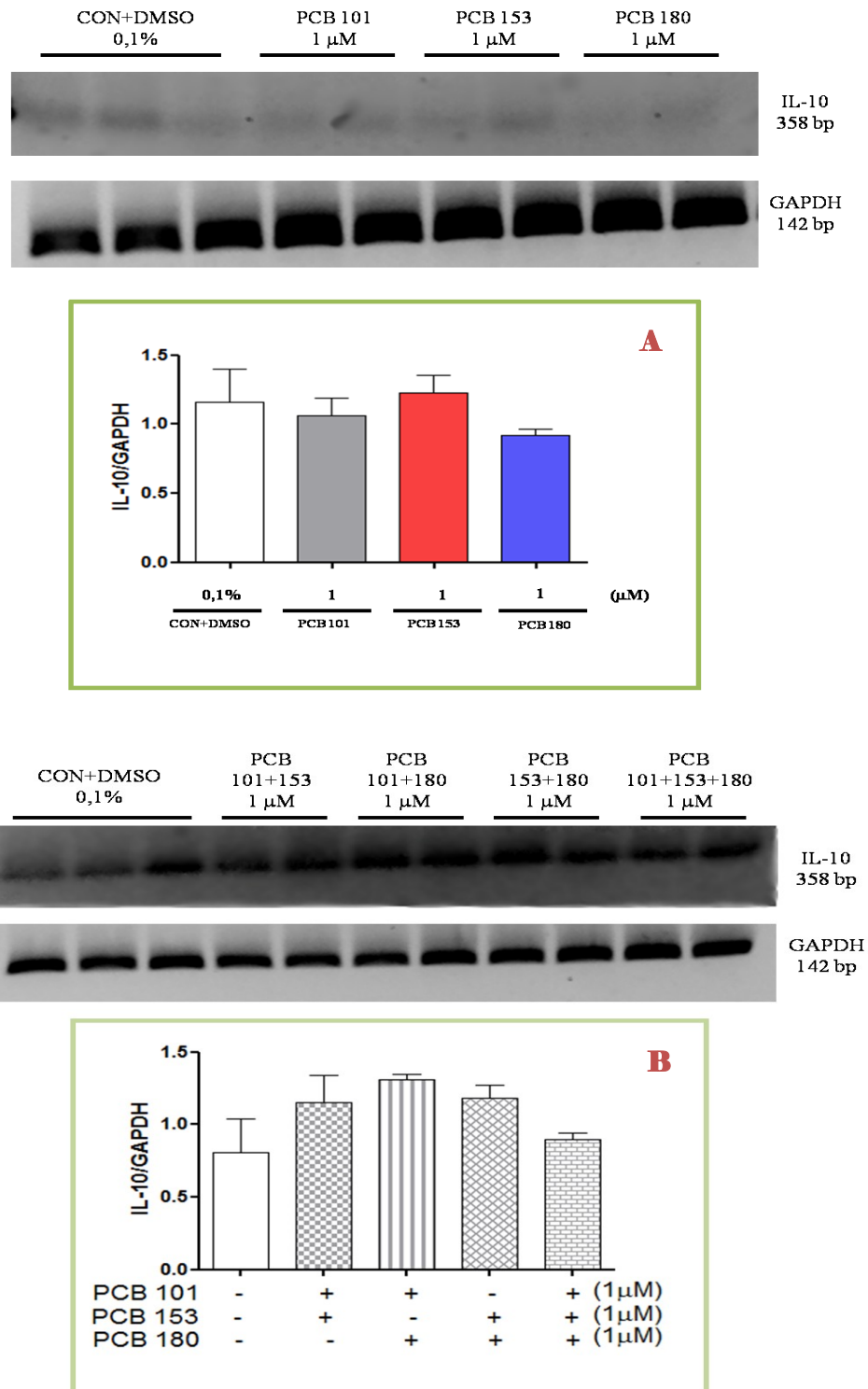


Figura 36: Effetti dei PCB, da soli (A) e in associazione (B), alla concentrazione di 1 μM, sulla trascrizione del gene dell'IL-10. L'espressione della GAPDH è utilizzata come riferimento. I valori ottenuti sono valutati come media±SEM di tre esperimenti.

## 10. DISCUSSIONE

In letteratura sono riportati solo pochi studi riguardanti l'attività immunosoppressiva dei PCB, che utilizzano modelli sperimentali *in vitro*.

Questo studio dimostra che i PCB inducono, in maniera concentrazione-dipendente, una diminuzione della vitalità delle cellule macrofagiche J774.

E' stato evidenziato, inoltre, che la composizione chimica e, in particolare, il grado di clorurazione influenzano la capacità di tali composti di indurre la morte cellulare. Nello specifico, i PCB penta ed esa-clorurati (rispettivamente il 101 e il 153) sono risultati meno attivi di quelli epta-clorurati (come il PCB 180).

I nostri dati evidenziano, inoltre, che quando i PCB sono associati a due a due o tutti in combinazione si ottiene un effetto sinergico che induce un aumento significativo della morte cellulare ad una concentrazione alla quale, usate singolarmente, le sostanze risultano inattive. In particolare, il sinergismo è massimo quando il PCB 101 è associato al PCB 180 mentre quando sono associati tutti e tre i PCB analizzati si evidenzia un ulteriore incremento dell'effetto apoptotico. Dai nostri dati, inoltre, si osserva che il congenere penta-clorurato è quello che contribuisce meno all'azione citotossica.

Le cellule vanno incontro a morte mediante due principali meccanismi: l'apoptosi o la necrosi. Sebbene l'apoptosi e la necrosi siano generalmente considerate due processi distinti di morte cellulare, molti studi, riportati in



letteratura, hanno dimostrato che, in realtà, sono influenzati in più punti dagli stessi intermedi biochimici, inclusi fattori di morte cellulare, specie reattive dell'ossigeno ed inquinanti ambientali (Voie e Fonnum, 2000).

Per discriminare tra l'effetto apoptotico o di necrosi sulla morte cellulare, abbiamo analizzato il pathway della via intrinseca.

Le proteasi della famiglia delle caspasi sono le principali componenti del pathway apoptotico. In particolare, la caspasi-3 (enzima attivo) è una proteina citosolica sintetizzata a partire da un precursore inattivo (la procaspasi-3), sia quando è attivata la via intrinseca che quella estrinseca. L'attivazione della caspasi-3 è il primo segnale che innesca l'apoptosi che poi prosegue in modo irreversibile.

Questo studio dimostra che i PCB analizzati inducono in modo significativo l'apoptosi proprio attivando le caspasi. L'aumento dell'attività della caspasi-3 è stato correlato ad una diminuzione dell'espressione della procaspasi-3 valutata tramite un'analisi di immunoblot in cui si è utilizzato un anticorpo specifico anti-procaspasi-3 (dati non mostrati).

Come è noto, l'apoptosi nelle cellule dei mammiferi è mediata da due diversi pathway: quello intrinseco e quello estrinseco (Strasser *et al.*, 2000). Il pathway estrinseco dell'apoptosi è indotto dall'attivazione ligando-dipendente dei recettori di membrana della famiglia del tumor necrosis factor (TNF). Il pathway intrinseco, che è quello più comune, coinvolge il citocromo c e l'attivazione delle caspasi ed è regolato da Bcl-2 (Baliga e Kumar, 2002). La

famiglia di Bcl-2 comprende proteine che possono sia indurre che inibire l'apoptosi.

Numerosi studi hanno rivelato che una sovraespressione di Bcl-2 aumenta la sopravvivenza dei neuroni simpatici in assenza di NGF (la deprivazione di NGF induce apoptosi) ed inoltre protegge dall'apoptosi indotta da radiazioni ionizzanti, farmaci chemioterapici, ipossia ed infezioni virali. Proteine anti-apoptotiche come Bcl-2 possono impedire il rilascio del citocromo c oppure sequestrare la proteina Apaf-1, bloccando l'attivazione della procaspasi-9 (Granville *et al.*, 1998).

Le proteine di questa famiglia hanno una localizzazione che dipende dal ruolo svolto. L'elemento anti-apoptotico Bcl-2 è situato soprattutto sulle membrane degli organelli (reticolo endoplasmatico, nucleo e la membrana esterna del mitocondrio). Bax, invece, è situata principalmente nel citoplasma, ancorata alle strutture citoscheletriche (Desagher e Martinou, 2000).

Gli stimoli apoptotici determinano la dimerizzazione di Bax in seguito alla quale si scopre il residuo C-terminale idrofobico che può quindi intercalarsi tra i lipidi di membrana (Suzuki *et al.*, 2000).

Per quanto riguarda l'interazione Bax/Bcl-2 è noto che Bcl-2 è inibita da p53 e forma un eterodimero con Bax, il bersaglio proapoptotico di p53, neutralizzando i suoi effetti. Quando Bcl-2 è presente in eccesso, le cellule sono protette dall'apoptosi. Quando, invece, Bax è in eccesso e predomina

l'omodimero di Bax, le cellule possono subire un processo di morte programmata.

Dopo incubazione dei macrofagi con i PCB 101, 153 e 180, risulta modificata sia l'espressione della proteina proapoptotica Bax che di quella antiapoptotica Bcl-2.

L'espressione di Bcl-2 risulta ridotta mentre quella di Bax è significativamente aumentata. Infatti il ratio Bcl-2/Bax si riduce, in accordo con l'induzione dell'apoptosi, e appare concentrazione dipendente per i PCB 153 e 180.

Inoltre, è stata osservata una riduzione significativa dell'espressione di Bcl-2 quando le cellule sono state stimulate con una miscela di tutti i PCB alla concentrazione inferiore.

Si può quindi concludere che, nelle nostre condizioni sperimentali, i PCB in associazione avevano un effetto citotossico sinergico, in quanto aumentavano, in modo significativo, la mortalità cellulare a concentrazioni alle quali da soli non esprimevano un evidente effetto apoptotico.

Molti xenobiotici inducono apoptosi e mostrano immunotossicità, fra questi è riportato in letteratura che la 2,3,7,8-TCDD, inquinante ambientale che è stato ampiamente studiato, causa apoptosi *in vivo* e *in vitro*. L'apoptosi è mediata contemporaneamente da una up-regolazione del gene che codifica per Bax, il bersaglio pro-apoptotico di p53, e da una down-regolazione della proteina anti-apoptotica Bcl-2, che è inibita da p53 (Agarwal *et al.*, 1998).

La famiglia Bcl-2, coinvolta nella regolazione della morte cellulare, comprende proteine di membrana che sono capaci di formare omo ed eterodimeri che fungono rispettivamente da regolatori positivi e negativi del processo di morte cellulare (Oltvai e Korsmeyer, 1994). È stato dimostrato, peraltro, che l'espressione di Bcl-2 può prevenire l'apoptosi di cellule delle linee mieloide e linfoide quando determinati fattori di crescita sono carenti (Vaux *et al.*, 1994).

La proteina Bcl-2, quindi, funziona come un antagonista del meccanismo responsabile della morte cellulare. Dai nostri dati risulta che l'esposizione a miscele di PCB determina l'inibizione di Bcl-2 e la conseguente riduzione della sua funzione di antagonista del processo apoptotico.

In letteratura sono riportati pochi studi sull'effetto apoptotico dei PCB-NDL da noi analizzati. Recentemente Levin *et al.* (2005), hanno evidenziato che i PCB-NDL inibiscono la fagocitosi grazie ad un meccanismo indipendente dal recettore degli idrocarburi arilici (AhR). Dati precedenti hanno rivelato che la riduzione della fagocitosi è causata principalmente dai congeneri non diossino-simili.

I nostri risultati confermano l'effetto immunotossico dei PCB-NDL sui macrofagi, cellule coinvolte in prima linea nella difesa dell'organismo, e comprovano la correlazione fra l'esposizione a tali inquinanti ambientali e l'incremento del rischio di contrarre patologie infettive.

Ulteriori studi saranno necessari per evidenziare l'eventuale meccanismo responsabile di un'alterazione dell'attività macrofagica da parte di questi inquinanti ambientali. La riduzione della fagocitosi potrebbe manifestarsi nei soggetti esposti a tali composti che si ritrovano nell'ambiente a livelli di concentrazione più elevati di quelli diossino-simili e che, come da noi dimostrato, presentano effetti sinergici che ne potenziano la tossicità.

Noto il “*crosstalk*” esistente tra macrofagi ed adipociti, il nostro studio è proseguito analizzando gli effetti dei PCB 101, 153 e 180 sulla funzione endocrina degli adipociti maturi.

E' ormai riconosciuto che l'elevata lipofilia dei PCB e dei composti tossici correlati favorisce la loro localizzazione nel tessuto adiposo. Questo tessuto ricopre un ruolo cardine non solo nel deposito e nella mobilizzazione di sostanze ad elevata energia metabolica ma ricoprire un ruolo importante nella regolazione dell'omeostasi energetica dell'intero organismo attraverso la secrezione di specifici ormoni (Grun e Blumberg 2009).

Gli ormoni adipocitari includono la leptina che è secreta in maniera proporzionale alla massa di tessuto adiposo e allo stato nutrizionale. Molti casi di obesità sono associati ad un aumento dei livelli circolanti di questo ormone mentre restrizione calorica e perdita di peso corporeo si associano ad una riduzione dei livelli sierici di leptina (Kershaw e Flier, 2004). Inoltre l'iperleptinemia, che come detto caratterizza la grande maggioranza degli obesi, sembra avere un ruolo proaterogeno contribuendo all'insulino-

resistenza, alterando la funzione endoteliale, favorendo l'aggregazione piastrinica e la trombosi arteriosa (Mertens *et al.*, 2006).

Nei nostri esperimenti condotti sugli adipociti maturi trattati con i PCB separatamente si assiste ad un trend di aumento della trascrizione del gene della leptina, che risulta significativo con il PCB 153. Nelle stesse condizioni sperimentali non si rileva alcuna modificazione della trascrizione dell'mRNA del suo recettore ObRb.

Di contro quando i PCB erano associati a due a due o tutti e tre insieme, si osserva un aumento dell'espressione della leptina in particolare quando si associa il PCB 153 con il 180 ed una concomitante riduzione dell'isoforma recettoriale ad attività biologica. Tale riduzione di Ob-Rb negli adipociti, associata alla elevata produzione dell'ormone, supporta l'insorgenza di una insensibilità all'ormone correlabile alla leptino-resistenza del tessuto adiposo tipica dell'alterazione metabolica periferica dell'obesità.

Per confermare tale ipotesi, abbiamo investigato come tali inquinanti ambientali modificassero l'espressione di importanti proteine coinvolte nel signaling della leptino-resistenza. In particolare i nostri dati dimostrano che l'espressione della proteina PTP1B, regolatore negativo del signaling della leptina, è aumentata per l'associazione del PCB 153 con il 180 o di tutti i PCB, sostenendo l'ipotesi che tali congeneri possano agire con meccanismo sinergico. Successivamente abbiamo valutato come tali inquinanti modulino una delle vie di trasduzione del segnale intracellulare specifiche per il

recettore Ob-Rb.

L'effetto indotto dai PCB in esame sulla via di trasduzione del segnale di STAT 3 negli adipociti maturi induce una diminuzione dell'espressione di pSTAT 3 ed un aumento dell'espressione di STAT 3 rispetto alle cellule di controllo che ricevono il veicolo. In particolare dai dati ottenuti si evidenzia una riduzione significativa della ratio pSTAT3/STAT3 nelle cellule trattate con i PCB in associazione (PCB 153+180 e tutti e tre insieme).

Negli adipociti maturi abbiamo anche valutato l'effetto dei PCB sull'espressione dell'adiponectina (ACRP30). I dati ottenuti evidenziano una modificazione della trascrizione di tale gene in particolare quando gli adipociti sono tratti con il PCB 101, mentre la loro associazione mostra un aumento della trascrizione di tale adipochina.

Questi dati sembrano discordanti con dati di letteratura poiché è riportato che i livelli di mRNA di adiponectina sono significativamente ridotti nel WAT derivato da topi e uomini obesi (Hu *et al.*, 1996). Inoltre, nei soggetti obesi, le concentrazioni plasmatiche di adiponectina sono notevolmente più basse rispetto a quelle rilevate in soggetti magri (Arita *et al.*, 1999), suggerendo che questo fattore, secreto dagli adipociti, giochi un ruolo nella regolazione del bilancio energetico. In realtà i nostri dati confermano altri dati in letteratura in cui è stato evidenziato che il PCB 153 aumenta il rilascio di leptina, adiponectina e resistina senza modificazioni significative dell'espressione del PPAR- $\gamma$  (Taxvig *et al.*, 2012). L'adiponectina esercita le sue azioni legandosi a

due specifici recettori AdipoR1 e AdipoR2 (Yamauchi *et al.*, 2003). È stato dimostrato che il legame dell'ACRP30 con i suoi recettori induce un aumento del recettore attivato dai perossisomi  $\alpha$  (PPAR $\alpha$ ) (Yamauchi *et al.*, 2003; Tsuchida *et al.*, 2004), della fosforilazione della proteina chinasi adenosina monofosfato (AMPK) (Yamauchi *et al.*, 2003; Fischer-Posovszky *et al.*, 2007) e dell'acetil coenzima A carbossilasi (Yamauchi *et al.*, 2003). Questo porta ad un incremento del glucosio uptake e dell'ossidazione degli acidi grassi nel muscolo scheletrico (AdipoR1) e del decremento dell'*output* del glucosio nel fegato (AdipoR2) (Berg *et al.*, 2002; Fruebis *et al.*, 2001). Per tale motivo, abbiamo valutato se l'esposizione a tali inquinanti avesse effetti sull'espressione dei recettori per ACRP30, AdipoR1 e AdipoR2, negli adipociti maturi. Non si assiste ad una modificazione significativa della trascrizione dell'mRNA per entrambi i recettori, anche se per AdipoR2 si osserva un trend di diminuzione della sua trascrizione. L'espressione di tali recettori andrebbe valutata in tessuti più specifici come il tessuto muscolare per AdipoR1 e quello epatico per AdipoR2 nei quali tali recettori modulano aspetti del metabolismo cellulare, dell'uptake del glucosio, degli enzimi coinvolti nella gluconeogenesi epatica e della promozione dell'ossidazione degli acidi grassi.

Nonostante sia la leptina che l'adiponectina rappresentino le adipochine più studiate e che risentono maggiormente dei cambiamenti metabolici e nutrizionali, la leptina presenta effetti sempre più immediati rispetto



all'adiponectina, i cui effetti, nei nostri protocolli sperimentali, diminuirebbero, probabilmente, dopo un trattamento protratto con i PCB.

Infine, poiché l'obesità si caratterizza per lo sviluppo di uno stato infiammatorio di tipo sistemico siamo andati a valutare come tali inquinanti agissero sulla modulazione dell'espressione di due importanti citochine pro-infiammatorie l'IL-6 e il TNF $\alpha$  e sulla trascrizione della citochina anti-infiammatoria IL-10. Numerosi studi riportano che esiste una correlazione positiva tra l'incremento dei livelli circolanti di IL-6 e di quelli secreti dagli adipociti e l'insulino-resistenza nei soggetti obesi (Vozarova *et al.*, 2001). L'IL-6 contribuisce all'insulino-resistenza mediante la gluconeogenesi e impoverendo il signaling del recettore dell'insulina nel fegato. È noto, inoltre, che i livelli di IL-6 risultano notevolmente aumentati nel tessuto adiposo di soggetti obesi (Fried *et al.*, 1998) e un basso grado di infiammazione sistemica è stato riscontrato in pazienti affetti da obesità. Inoltre alti livelli di IL-6 sono correlati con l'insulino-resistenza e il maggior rischio di complicanze cardiovascolari. Inoltre il TNF $\alpha$  induce insulino-resistenza negli adipociti mediante lipolisi, dato che l'insulina ha primariamente un'azione anti-lipolitica in queste cellule, mentre l'IL-10 anti-infiammatoria è capace di inibire la produzione di diverse citochine (Yamaoka *et al.*, 1999; Malefyt, 1999), la generazione di specie reattive dell'ossigeno ed aumenta il rilascio di recettori del TNF $\alpha$ , di cui ne può antagonizzare gli effetti.

I nostri dati mostrano che i PCB inducono un aumento dell'espressione delle

citochine pro-infiammatoria sia quando gli adipociti maturi erano trattati con i PCB da soli e in associazione.

I dati riportati in questa tesi evidenziano gli effetti di questi PCB sul rilascio delle principali adipochine anche se non è stato evidenziato per tali PCB effetti determinabili sull'accumulo dei lipidi intracellulari. L'effetto sinergico dei PCB in esame sul rilascio di questi marker correlati allo sviluppo dell'obesità si evidenzia quando i PCB sono associati in concentrazioni che da sole non mostrano alcuna attività.

I nostri dati appaiono particolarmente interessanti poiché 1) è noto che la sensibilità degli adipociti umani è generalmente maggiore degli adipociti murini, 2) dimostrano che i PCB non diossino-simili, come altre sostanze nocive considerate distruttori endocrini (Hass *et al.*, 2007; Rider *et al.*, 2008, Kortenkamp *et al.*, 2009), possono esercitare effetti additivi e che la contemporanea esposizione dell'uomo a diversi agenti chimici con più debole attività possa avere effetti avversi non evidenziati per esposizione singola, 3) concentrazioni attive *in vitro* sono spesso comparabili ai livelli dell'esposizione nell'uomo ma si deve però considerare che i livelli *in vivo* possono variare in funzione al legame con le proteine plasmatiche e alla durata dell'esposizione, ed infine 4) supportano l'ipotesi che tali sostanze possono interferire con le pathway di adipochine e citochine correlate allo sviluppo dell'obesità e alle patologie ad essa correlate.

## 11. BIBLIOGRAFIA

- ✚ *Acheson K.J.*, Gremaud G., Meirim I., Montigon F., Krebs Y., Acheson K.J., Fay L.B., Gay L.J., Schneiter P., Schindler C., Tappy L., 2004. Metabolic effects of caffeine in humans: lipid oxidation or futile cycling; *Am. J. Clin. Nutr*; 79:40–46.
- ✚ *Agarwal M.L.*, Taylor W.R., Chernov M.V., Chernova O.B., Stark G.R., 1998. The p53 network. *J Biol Chem*; 273(1):1-4.
- ✚ *Ahima R.S.*, 2005. Central actions of adipocyte hormones. *Trends Endocrinol Metab*; 16: 307–313.
- ✚ *Ahima R.S.*, Osei S.Y., 2001. Molecular regulation of eating behavior: new insights and prospects for therapeutic strategies. *Trends Mol Med*; 7: 205 – 213.
- ✚ *Ahlborg U.G.*, Becking G.C., Birnbaum L.S., Brouwer A., Derks H.J.G.M., Feeley M., Golor G., Hanberg A., Larsen J.C., Liem A.K.D., Safe S.H., Schlatter C., Waern F., Younes M., and E. Yrjanheikki, 1994. Toxic equivalency factors for dioxin-like PCBs. Report on a WHO-ECEH and IPCS Consultation, December 1993. *Chemosphere*, 28, 1049-1067
- ✚ *Ailhaud G.*, 1999. Cell surface receptors, nuclear receptors and ligands that regulate adipose tissue development. *Clin Chim Acta*; 286:181–90.
- ✚ *Ailhaud G.*, Grimaldi P., Negrel R., 1992. Cellular and molecular aspects of adipose tissue development. *Annu Rev Nutr*; 12: 207–233.
- ✚ *Albu J.B.*, Curi M., Shur M., Murphy L., Matthews D.E., Pi-Sunyer F.X., 1999. Systemic resistance to the antilipolytic effect of insulin in black and white women with visceral obesity. *Am. J. Physiol*; 277:E551–60.
- ✚ *Alemzadeh R.*, Jacobs W., Pitukcheewanont P., 1996. Antiobesity effect of diazoxide in obese Zucker rats. *Metabolism*. Mar; 45(3):334-41.
- ✚ *Alemzadeh R.*, Langley G., Upchurch L., Smith P., Slonim A.E., 1998. Beneficial effect of diazoxide in obese hyperinsulinemic adults. *J. Clin Endocrinol Metab*. Jun; 83(6):1911-5.
- ✚ *Ameisen, J. C.*, 2002. "On the origin, evolution, and nature of programmed cell death: a time line of four billion years." *Cell Death Differ* 9(4): 367-93.
- ✚ *Andersson P.L.*, Blom A., Johannisson A., Pesonen M., Tysklind M., Berg A.H., Olsson P.E., Norrgren L., 1999. Assessment of PCBs and hydroxylated PCBs as potential xenoestrogens: In vitro studies based on MCF-7 cell proliferation and induction of vitellogenin in primary culture of rainbow trout hepatocytes. *Arch Environ Contam Toxicol*. Aug; 37(2): 145-50.
- ✚ *Angin Y.*, Kuralay F., Arslan N., 2009. Evolution of metabolic, antioxidant and oxidant systemic determinants in nonalcoholic fatty liver disease relevant to pediatric obesity. In: Sahin MF, Zefirov NS, editors, 1st Turkish-Russian Joint Meeting on Organic and Medicinal Chemistry; October 14-17; Antalya, Turkey, p. 64.
- ✚ *Angulo R.*, Martinez P., Jodral M.L., 1999. PCB congeners transferred by human milk, with an estimate of their daily intake. *Food Chem Toxicol*. 37; 1081–1088.
- ✚ *Anker S.D.*, Von Haehling S., 2004. Inflammatory mediators in chronic heart failure: an overview. *Heart*; 90 (4): 464-70.
- ✚ *Arcaro K.F.*, Yi L., Seegal R.F., Vakharia D.D., Yang Y., Spink D.C., Brosch K., Gierthy J.F., 1999. 2,2',6,6'-Tetrachlorobiphenyl is estrogenic in vitro and in vivo. *J Cell Biochem*. Jan 1; 72(1):94-102.
- ✚ *Archibeque-Engle S.L.*, Tessari J.D., Winn D.T., Keefe T.J., Nett T.M., Zheng T., 1997. Comparison of organochlorine pesticide and polychlorinated biphenyl residues in human breast adipose tissue and serum. *J Toxicol Environ Health*. Nov; 52(4):285-93.
- ✚ *Arita Y.*, Kihara S., Ouchi N., Takahashi M., Maeda K., Miyagawa J., et al., 1999. Paradoxical decrease of an adipose-specific protein, adiponectin, in obesity. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 257, 79–83.

- ✚ *Arner P.*, 1992. Adrenergic receptor function in fat cells. *Am. J. Clin. Nutr.* 55: 228S–236S.
- ✚ *Arner P.*, Spalding K.L., 2010. Fat cell turnover in humans. *Biochem Biophys Res Commun* 396:101–104.
- ✚ *Arnold D.L.*, Nera EA, Stapley R., Tolnai G., Claman P., Hayward S., Tryphonas H., Bryce F., 1996. Prevalence of endometriosis in rhesus (*Macaca mulatta*) monkeys ingesting PCB (Aroclor 1254): review and evaluation. *Fundam Appl Toxicol.* May; 31(1):42-55.
- ✚ *Arnoult D.*, Akarid K., et al., 2002. "On the evolution of programmed cell death: apoptosis of the unicellular eukaryote *Leishmania major* involves cysteine proteinase activation and mitochondrion permeabilization." *Cell Death Difer* 9(1): 65-81.
- ✚ *Auwerx J.* 1999. PPAR $\gamma$ , the ultimate thrifty gene. *Diabetologia* 42:1033–49.
- ✚ *Baillie-Hamilton P.F.*, 2002. Chemical toxins: a hypothesis to explain the global obesity epidemic. *J. Altern. Complement Med.* 8:185–92.
- ✚ *Baliga B.C.*, Kumar S., 2002. Role of Bcl-2 family of proteins in malignancy. *Hematol Oncol.*;20(2):63-74.
- ✚ *Banks A.S.*, Davis S.M., Bates S.H., Myers MG Jr., 2000. Activation of downstream signals by the long form of the leptin receptor. *J Biol Chem.* 275:14563-72.
- ✚ *Barbatelli G.*, Murano I., Madsen L., Hao Q., Jimenez M., Kristiansen K., Giacobino J.P., De Matteis R., Cinti S., 2010. The emergence of cold-induced brown adipocytes in mouse white fat depots is determined predominantly by white to brown adipocyte transdifferentiation. *Am J Physiol Endocrinol Metab*; 298: E1244–E1253.
- ✚ *Ben-Jonathan N.*, Hugo E.R., Brandebourg T.D., 2009. Effects of bisphenol A on adipokine release from human adipose tissue: implications for the metabolic syndrome. *Mol. Cell. Endocrinol.* 304:49–54.
- ✚ *Berg A.H.*, Combs T.P., Scherer P.E., 2002. ACRP30/adiponectin: an adipokine regulating glucose and lipid metabolism. *Trends Endocrinol Metab* 13:84–89.
- ✚ *Berg A.H.*, Combs T.P., Scherer P.E., 2002. ACRP30/adiponectin:an adipokine regulating glucose and lipid metabolism. *Trends Endocrinol Metab* 13:84–89.
- ✚ *Berggreen C.*, Gormand A., Omar B., Degerman E. and Göransson O., 2009. Protein kinase B activity is required for the effects of insulin on lipid metabolism in adipocytes. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 296, E635–E646.
- ✚ *Bhagat K.*, Balance P., 1997. Inflammatory cytokines impair endothelium dependent dilatation in human veins in vivo. *Circulation* 1997; 96: 3042-3047.
- ✚ *Bijland S.*, Mancini J.S., Salt I., 2013. Role of AMP-activated protein kinase in adipose metabolism and inflammation. *Clinical Science*; 124-491-507.
- ✚ *Bjorbaek C.*, El-Haschimi K., Frantz J.D., Flier J.S., 1999. The role of SOCS-3 in leptin signaling and leptin resistance. *J. Biol. Chem.* 274 (42): 30059-65.
- ✚ *Bjorbaek C.*, Elmquist J.K., Frantz J.D., Flier J.S., Shoelson S.E., 1998. Identification of SOCS-3 as a potential mediator of central leptin resistance. *Molecular Cell* 1(4): 619-25.
- ✚ *Bjorntorp P.*, 1974. Size, number and function of adipose tissue cells in human obesity. *Horm Metab Res*; 4: 77–83.
- ✚ *Boden G.*, Shulman G.I., 2002. Free fatty acids in obesity and type 2 diabetes: Defining their role in the development of insulin resistance and  $\beta$ -cell dysfunction. *Eur J Clin Invest*; 32: 14-23.
- ✚ *Bonefeld-Jørgensen E.C.*, Andersen H.R., Rasmussen T.H., Vinggaard A.M., 2001. Effect of highly bioaccumulated polychlorinated biphenyl congeners on estrogen and androgen receptor activity. *Toxicology.* Feb 14;158(3):141-53.
- ✚ *Bonefeld-Jørgensen EC.*, Andersen HR., Rasmussen TH., Vinggaard AM., 2001. Effect of highly bioaccumulated polychlorinated biphenyl congeners on estrogen and androgen receptor activity. *Toxicology.* Feb 14;158(3):141-53.
- ✚ *Bougnères P.C.*, Le Stunff C., Pecqueur E., Pinglier P., Adnot and D. Ricquier., 1997. In vivo resistance of lipolysis to epinephrine. A new feature of childhood onset obesity. *J. Clin.*

- Invest. 99: 2568–2573.
- ✚ *Breckenridge D. G.* and *Xue D.*, 2004. "Regulation of mitochondrial membrane permeabilization by BCL-2 family proteins and caspases." *Curr Opin Cell Biol* 16(6): 647-52.
  - ✚ *Brun R.P.*, *Kim J.B.*, *Hu E.*, *Altiock S.*, *Spiegelman B.M.*, 1996. Adipocyte differentiation: a transcriptional regulatory cascade. *Curr Opin Cell Biol*; 8:826–32.
  - ✚ *Butterwith S.C.*, 1994. Molecular events in adipocyte development. *Pharmacol Ther*; 61: 399–411.
  - ✚ *Cannon B.*, *Hedin A.*, *Nedergaard J.*, 1982. Exclusive occurrence of thermogenin antigen in brown adipose tissue. *FEBS Lett. Dec* 13;150(1):129-32.
  - ✚ *Chang Y.C.*, *Lin P.*, 2008. Trans, trans-2,4-decadienal induced cell proliferation via p27 pathway in human bronchial epithelial cells. *Toxicol Appl Pharmacol* 228:76–83. 2007.11.028.
  - ✚ *Chapados N.A.*, *Casimiro C.*, *Robidoux M.A.*, *Haman F.*, *Batal M.*, *Blais J.M.*, *Imbeault P.*, 2012. Increased proliferative effect of organochlorine compounds on human preadipocytes. *Mol Cell Biochem*; doi: 10.1007/s11010-012-1268-0.
  - ✚ *Charron M.J.*, *Katz E.B.*, *Olson A.L.*, 1999. GLUT4 gene regulation and manipulation. *J Biol Chem*; 274:3253–6.
  - ✚ *Chen J.Q.*, *Brown T.R.*, *Russo J.*, 2009. Regulation of energy metabolism pathways by estrogens and estrogenic chemicals and potential implications in obesity associated with increased exposure to endocrine disruptors. *Biochim. Biophys. Acta* 1793:1128–43.
  - ✚ *Chinetti G.*, *Fruchart J.C.*, *Staels B.*, 2000. Peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs): nuclear receptors at the crossroads between lipid metabolism and inflammation. *Inflamm Res*;49:497–505.
  - ✚ *Cimafranca M.A.*, *Hanlon P.R.*, *Jefcoate C.R.*, 2004. TCDD administration after the pro-adipogenic differentiation stimulus inhibits PPAR $\gamma$  through a MEK-dependent process but less effectively suppresses adipogenesis. *Toxicol Appl Pharmacol.*;196:156-68.
  - ✚ *Cinti S.*, 1999. *The Adipose Organ*. Editrice Kurtis: Milano.
  - ✚ *Cinti S.*, 2001. The adipose organ: morphological perspectives of adipose tissues. *Proc Nutr Soc*; 60:319–328.
  - ✚ *Cinti S.*, 2005. The adipose organ. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*; 73: 9–15.
  - ✚ *Clement K.*, *Vaisse C.*, *Lahlou N.*, *Cabrol S.* et al. A mutation in the human leptin receptor gene causes obesity and pituitary dysfunction.(1998) *Nature* 392: 398-401.
  - ✚ *Clement K.*, *Vaisse C.*, *Lahlou N.*, *Cabrol S.*, et al., 1998. A mutation in the human leptin receptor gene causes obesity and pituitary dysfunction. *Nature* 392: 398-401
  - ✚ *Colborn T.*, *vom Saal F.S.*, *Soto A.M.*, 1993. Developmental effects of endocrine-disrupting chemicals in wildlife and humans. *Environ. Health Perspect.* 101:378–84.
  - ✚ *Collins S.*, *Cao W.*, et al., 2000. In "Adipocyte Biology and Hormone.
  - ✚ *Cornelius P.*, *MacDougald O.A.*, *Lane M.D.*, 1994. Regulation of adipocyte development. *Annu Rev Nutr*; 14: 99–129.
  - ✚ *Covaci A.*, *Boer J.*, *Ryan J.J.*, *Voorspoels S.*, *Schepens P.*, 2002. Distribution of organobrominated and organochlorinated contaminants in Belgian human adipose tissue. *Environm Res Section* 88: 210 -218.
  - ✚ *Crandall D.L.*, *DiGirolamo M.*, 1990. Hemodynamic and metabolic correlates in adipose tissue: pathophysiologic considerations. *FASEB J*; 4: 141–147.
  - ✚ *Crandall D.L.*, *Hausman G.J.*, *Kral J.G.*, 1997. A review of the microcirculation of adipose tissue: anatomic, metabolic, and angiogenic perspectives. *Microcirculation*; 4: 211–232.
  - ✚ *Dandona P.*, *Weinstock R.*, *Love J.*, *Thusu K.*, *Aljada A.*, *Wadden T.*, 1996. Elevated tumor necrosis factor  $\alpha$  in sera of obese patients: fall with weight loss. *Diabetes*.45 (Suppl.) 173A.
  - ✚ *Dandona P.*, *Weinstock R.*, *Love J.*, *Thusu K.*, *Aljada A.*, *Wadden T.*, 1996. Elevated tumor necrosis factor- $\alpha$  in sera of obese patients: fall with weight loss. *Diabetes*; 45 (Suppl.) 173A.

- ✚ *Daval M., Foufelle F., Ferre P., 2006. Functions of AMP-activated protein kinase in adipose tissue. J. Physiol. 574,55–62.*
- ✚ *De Guire L., Cyr D., Theriault G., Provencher S., Iturra H., Case BW., 1992. Malignant melanoma of the skin among workers in a telecommunications industry: mortality study 1976-83.Br J Ind Med. Oct;49(10):728-31. Loomis D, Browning SR, Schenck AP, Gregory E, Savitz DA.Cancer mortality among electric utility workers exposed to polychlorinated biphenyls. Occup Environ Med. 1997 Oct;54(10):720-8.*
- ✚ *De Saeger S., Sergeant H., Piette M., Bruneel N., Van de Voorde W., Van Peteghem C., 2005. Monitoring of polychlorinated biphenyls in Belgian human adipose tissue samples. Chemosphere; 58(7):953–960.*
- ✚ *Demartinis F.D., Francendese A., 1982. Very small fat cell populations: mammalian occurrence and effect of age. J Lipid Res; 23: 1107–1120.*
- ✚ *Demers A., Ayotte P., Brisson J., Dodin S., Robert J., Dewailly E., 2002. Plasma concentrations of polychlorinated biphenyls and the risk of breast cancer: a congener-specific analysis. Am J Epidemiol. Apr 1;155(7):629-35.*
- ✚ *Desagher S., Martinou J.C., 2000. Mitochondria as the central control point of apoptosis. Trends Cell Biol.;10(9):369-77.*
- ✚ *Descotes J., Choquet-Kastylevsky G., Van Ganse E., Vial T., 2000. Responses of the immune system to injury. Toxicol Pathol, 28(3): 479-481.*
- ✚ *Descotes J., Choquet-Kastylevsky G., Van Ganse E., Vial T., 2000. Responses of the immune system to injury. Toxicol Pathol, 28(3): 479-481.*
- ✚ *Dewailly E., Ayotte P., Bruneau S., Gingras S., Belles-Isles M., and Roy R., 2000. Susceptibility to infections and immune status in Inuit infants exposed to organochlorines. Environ. Health Perspect. 108, 205–211.*
- ✚ *Dickerson S.M., Guevara E., Woller M.J., Gore A.C., 2009. Cell death mechanisms in GT1-7 GnRH cells exposed to polychlorinated biphenyls PCB 74, PCB 118, and PCB 153. Toxicology and Applied Pharmacology. 237: 237-245.*
- ✚ *DiGirolamo M., Skinner N.S. Jr, Hamley H.G., Sachs R.G., 1971. Relationship of adipose tissue blood flow to fat cell size and number. Am J Physiol; 220: 932–937.*
- ✚ *Dixon T.M., Daniel K.W., Farmer S.R., and Collins S., 2000. J. Biol. Chem., in press.*
- ✚ *Duarte-Davidson R., Wilson S.C., Jones K.C., 1994. PCBs and other organochlorines in human tissue samples from the Welsh population. I: Adipose. Environ Pollut 84:69–77.*
- ✚ *Elferink C.J., Ge N.L., Levine A., 2001. Maximal aryl hydrocarbon receptor activity depends on an interaction with the retinoblastoma protein. Mol Pharmacol 59:664–673.*
- ✚ *Ellis R.E., Yuan J. Y., Horvitz H.R., 1991. "Mechanisms and functions of cell death." Annu Rev Cell Biol 7: 663-98.*
- ✚ *Elmqvist J.K., Bjorbaek C., Ahima R.S., Flier J.S., Saper C.B.,1998. Distributions of leptin receptor mRNA isoforms in the rat brain. J. Comp. Neurol. 395: 535-547.*
- ✚ *Elobeid M.A., Allison D.B., 2008. Putative environmental-endocrine disruptors and obesity: a review. Curr. Opin. Endocrinol. Diabetes Obes. 15:403–8.*
- ✚ *Endo F., Monsees TK., Akaza H., Schill WB., Pflieger-Bruss S., 2003. Effects of single non-ortho, mono-ortho, and di-ortho chlorinated biphenyls on cell functions and proliferation of the human prostatic carcinoma cell line, LNCaP. Reprod Toxicol. Mar-Apr;17(2):229-36.*
- ✚ *Endo F.M.T., Akaza H., Schill W.B., Pflieger-Bruss S., 2003. Effects of single non-ortho, mono-ortho, and di-ortho chlorinated biphenyls on cell functions and proliferation of the human prostatic carcinoma cell line. LNCaP Reprod Toxicol 17:229–236.*
- ✚ *Entenmann G., Hauner H., 1996. Relationship between replication and differentiation in cultured human adipocyte precursor cells. Am J Physiol 270:C1011–C1016.*



- ✚ *Esposito K., Giugliano D., Nappo F., Marfella L., 2004.* Regression of carotid atherosclerosis by control of postprandial hyperglycemia in type 2 diabetes mellitus: Campanian Postprandial Hyperglycemia Study Group. *Circulation*; 110: 214-219.69-70.
- ✚ *Eum S.Y., Lee Y.W., Hennig B., Toborek M., 2004.* VEGF regulates PCB 104-mediated stimulation of permeability and transmigration of breast cancer cells in human microvascular endothelial cells. *Exp Cell Res.* 10;296(2):231-44.
- ✚ *Eum SY., Lee YW., Hennig B., Toborek M., 2004.* VEGF regulates PCB 104-mediated stimulation of permeability and transmigration of breast cancer cells in human microvascular endothelial cells. *Exp Cell Res.* Jun 10;296(2):231-44.
- ✚ *Eur J Clin Invest ; 30: 302-310*
- ✚ *Fantuzzi G. and Faggioni R., 2000.* Leptin in the regulation of immunity, inflammation, and hematopoiesis. *J Leukoc Biol.*; 68(4):437-46.
- ✚ *Farmer S.R., 2008.* *Genes Dev.*, 22, 1269—1275.
- ✚ *Faroon O., Jones D., De Rosa C., 2001.* Effects of polychlorinated biphenyls on the nervous system. *Toxicol Ind Health Sep*;16(7-8):305-33.
- ✚ *Farrington J.W., 1991.* *Environ. Health Perspect.* 90; 75-84.
- ✚ *Fasshauer M., Kralisch S., Klier M., Lossner U., Bluher M., Klein J., et al., 2003.* Adiponectin gene expression and secretion is inhibited by interleukin- 6 in 3T3-L1 adipocytes. *Biochem Biophys Res Commun*; 301: 1045-1050.
- ✚ *Faust I.M., Johnson P.R., Stern J.S., Hirsch J., 1978.* Diet-induced adipocyte number increase in adult rats: a new model of obesity. *Am J Physiol ; 235: E279–E286.*
- ✚ *Feige J.N., Gelman L., Michalik L., Desvergne B., Wahli W., 2006.* From molecular action to physiological outputs: Peroxisome proliferator-activated receptors are nuclear receptors at the crossroads of key cellular functions. *Prog. Lipid. Res.* 45:120–59.
- ✚ *Ferrante M.C., Clausi M.T., Meli R., Fusco G., Naccari C., Lucisano A., 2010.* Polychlorinated biphenyls and organochlorine pesticides in European eel (*Anguilla anguilla*) from the Garigliano River (Campania region, Italy). *Chemosphere* 78:709–716.
- ✚ *Fève B., Elhadri K., Quignard-Boulangé A., Pairault J., 1994.* Transcriptional down-regulation by insulin of the beta 3-adrenergic receptor expression in 3T3-F442A adipocytes: a mechanism for repressing the cAMP signaling pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A.* Jun 7;91(12):5677-81.
- ✚ *Fève B., Elhadri K., Quignard-Boulangé A., Pairault J., 1994.* Transcriptional down-regulation by insulin of the beta 3-adrenergic receptor expression in 3T3-F442A adipocytes: a mechanism for repressing the cAMP signaling pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A.* Jun 7;91(12):5677-81.
- ✚ *Fielden M.R., Chen I., Chittim B., Safe S.H., Zacharewski T.R., 1997.* Examination of the estrogenicity of 2,4,6,2',6'-pentachlorobiphenyl (PCB 104), its hydroxylated metabolite 2,4,6,2',6'-pentachloro-4-biphenylol (HO-PCB 104), and a further chlorinated derivative, 2,4,6,2',4',6'-hexachlorobiphenyl (PCB 155). *Environ Health Perspect.* Nov;105(11):1238-48.
- ✚ *Fischer-Posovszky P., Wabitsch M., Hochberg Z., 2007.* Endocrinology of adipose tissue—an update. *Horm Metab Res* 39:314–321.
- ✚ *Flachs P., Horáková O., Brauner P., Rossmeisl M., Pecina P., Franssen-Van Hal N., Růžičková J., Šponarová J., 2005.* DR acids of marine origin upregulate mitochondrial biogenesis and induce beta-oxidation in white fat. *Diabetologia* 48: 2365-2375.
- ✚ *Formiguera X., Canton A., 2004.* Obesity: epidemiology and clinical aspects. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* 18:1125–1146.
- ✚ *Francine Laden et al., 2002.:* Polychlorinated Biphenyls, Cytochrome P450 1A1, and Breast Cancer Risk in the Nurses' Health Study *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention*, Vol. 11, 1560–1565, December.

- ✚ *Frayn K.N., Karpe F., Fielding B.A., Macdonald I.A., Coppack S.W., 2003. Integrative physiology of human adipose tissue. Int J Obes; 27:875–888.*
- ✚ *Fried S.K., Bunkin D.A., Greenberg A.S., 1998. Omental and subcutaneous adipose tissues of obese subjects release interleukin-6: depot difference and regulation by glucocorticoid. J Clin Endocrinol Metab; 83: 847-850. 59.*
- ✚ *Fruebis J., Tsao T.S., Javorschi S., Ebbets-Reed D., Erickson M.R., Yen F.T., Bihain B.E., Lodish H.F., 2001. Proteolytic cleavage product of 30-kDa adipocyte complement-related protein increases fatty acid oxidation in muscle and causes weight loss in mice. Proc Natl Acad Sci USA 98:2005–2010.*
- ✚ *Fruebis J., Tsao T.S., Javorschi S., Ebbets-Reed D., Erickson M.R., Yen F.T., Bihain B.E., Lodish H.F., 2001. Proteolytic cleavage product of 30-kDa adipocyte complement-related protein increases fatty acid oxidation in muscle and causes weight loss in mice. Proc Natl Acad Sci USA 98:2005–2010*
- ✚ *Fujimoto K., Sasaki T., Nemoto M., Nakai N., Sakai K., Yamasaki K., 2005. Enhanced insulin secretion from engineered 3T3-L1 preadipocytes by induction of cellular differentiation. Mol Cell Biochem; 268:1–8.*
- ✚ *Furst P., 2006. Dioxins, polychlorinated biphenyls and other organohalogen compounds in human milk. Levels, correlations, trends and exposure through breastfeeding. Mol Nutr Food Res 50(10):922–933.*
- ✚ *Ganey P.E., Sirois J.E., Denison M., Robinson J.P., Roth R.A., 1993. Neutrophil function after exposure to polychlorinated biphenyls in vitro. Environ Health Perspect.; 101(5):430-4.*
- ✚ *Gavrilova O., Barr V., Marcus-Samuels B., Reitman M., 1997. Hyperleptinemia of pregnancy associated with the appearance of a circulating form of the leptin receptor.,J. Biol. Chem. 272: 30546-551.*
- ✚ *Giordano A., Kay Song C., Bowers R.R., Ehlen J.C., Frontini A., Cinti S., Bartness T.J., 2007. Reply to Kreier and Buijs: no sympathy for the claim of parasympathetic innervations of white adipose tissue. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol; 293: R550–R552.*
- ✚ *Giordano A., Morroni M., Santone G., Marchesi G.F., Cinti S., 1996. Tyrosine hydroxylase, neuropeptide Y, substance P, calcitonin gene-related peptide and vasoactive intestinal peptide in nerves of rat periovarian adipose tissue: an immunohistochemical and ultrastructural investigation. J Neurocytol; 25: 125–136.*
- ✚ *Glauert H.P., Robertson L.W., Silberhorn E.M., 2001. PCBs and tumor promotion. In: Robertson, L.W., Hansen, L. (Eds.), Recent Advances in the Environment Toxicology and Health Effect of PCBs. The University Press of Kentucky, Lexington, KY; pp. 355-371.*
- ✚ *Granville D.J., Carthy C.M., et al., 1998. "Apoptosis: molecular aspects of cell death and disease." Lab Invest 78(8): 893-913.*
- ✚ *Greenberg, A.S. and McDaniel M.L., 2002. Identifying the links between obesity, insulin resistance and  $\beta$ -cell function: Potential role of adipocyte-derived cytokines in the pathogenesis of type 2 diabetes. Eur J Clin Invest; 32: 24-34.*
- ✚ *Gregoire F., Todoroff G., Hauser N., Remacle C., 1990. The stromavascular fraction of rat inguinal and epididymal adipose tissue and the adipoconversion of fat cell precursors in primary culture. Biol Cell; 69: 215–222.*
- ✚ *Gregoire F.M., Smas C.M., Sul H.S., 1998. Understanding adipocyte differentiation. Physiol Rev 1998; 78: 783–809.*
- ✚ *Grun F., Blumberg B., 2007. Perturbed nuclear receptor signaling by environmental obesogens as emerging factors in the obesity crisis. Rev Endocr Metab Disord; 8:161–171.*
- ✚ *Grün F., Blumberg B., 2006. Environmental obesogens: organotins and endocrine disruption via nuclear receptor signaling. Endocrinology 147:S50–55.*
- ✚ *Grün F., Blumberg B., 2009. Endocrine disrupters as obesogens. Mol. Cell. Endocrinol. 304:19–29.*



- ✚ *Gtowinska B.*, Urban M., 2003. Selected cytokines (IL-6, IL-8, IL-10, MCP-1, TNF-alpha) in children and adolescents with atherosclerosis risk factors: obesity, hypertension, diabetes. *Wiad Lek*;56: 109-116.95.
- ✚ *Gtowinska B.*, Urban M., 2003. Selected cytokines (IL-6, IL-8, IL-10, MCP-1, TNF $\alpha$ ) in children and adolescents with atherosclerosis risk factors: obesity, hypertension, diabetes. *Wiad Lek*;56: 109-116.
- ✚ *Gualillo O.*, Eiras S., Lago F., Dieguez C., Casanueva F.F., 2000. Elevated serum leptin concentrations induced by experimental acute inflammation. *Life Sci.*, 67 1198-1201.
- ✚ *Gunnnett C.A.*, Heistad D.D., Faraci F.M., 2002. Interleukin-10 protects nitric oxide-dependent relaxation during diabetes: Role of superoxide. *Diabetes* 2002; 51: 1931-1937.
- ✚ *Gurnell M.*, 2005. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma and the regulation of adipocyte function: lessons from human genetic studies. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab*;19:501–23.
- ✚ *Gustavsson P.*, Hogstedt C., 1997. A cohort study of Swedish capacitor manufacturing workers exposed to polychlorinated biphenyls (PCBs). *Am J Ind Med.* Sep;32(3):234-9.
- ✚ *Haddad S.*, Poulin P., Krishnan K., 2000. Relative lipid content as the sole mechanistic determinant of the adipose tissue: blood partition coefficients of highly lipophilic organic chemicals. *Chemosphere* 40:839–843.
- ✚ *Hahn M.E.*, 2002 Aryl hydrocarbon receptors: diversity and evolution. *Chem Biol Interact* Sep 20;141(1-2):131-60.
- ✚ *Hansen L.G.*, 1998. Stepping backward to improve assessment of PCB congener toxicities. *Environ. Health. Perspect*; 106 (Suppl. 1), 171-189.
- ✚ *Hany J.*, Lilienthal H., Sarasin A., Roth-Harer A., Fastabend A., Dunemann L., Lichtensteiger W., Winneke G., 1999. Developmental exposure of rats to a reconstituted PCB mixture or aroclor 1254: Effects on organ weights, aromatase activity, sex hormone levels, and sweet preference behavior. *Toxicol Appl Pharmacol* 158: 241-243.
- ✚ *Hass U.*, Scholze M., Christiansen S., Dalgaard M., Vinggaard A.M., Axelstad M., Metzdorff S.B., Kortenkamp A., 2007. Combined exposure to anti-androgens exacerbates disruption of sexual differentiation in the rat. *Environ Health Perspect.*;115 Suppl 1:122-8.
- ✚ *Hatch E.E.*, Nelson J.W., Stahlhut R.W., Webster T.F., 2010. Association of endocrine disruptors and obesity: perspectives from epidemiological studies. *Int. J. Androl.* 33:324–32.
- ✚ *Hauner H.*, Petruschke T., Russ M., Eckel J., 1995. Effects of tumor necrosis factor alpha (TNF $\alpha$ ) on glucose transport and lipid metabolism of newly-differentiated human fat cells in culture. *Diabetologia*; 38:746-71.
- ✚ *Hay A.*, Tarrel J., 1997. Mortality of power workers exposed to phenoxy herbicides and polychlorinated biphenyls in waste transformer oil. *Ann N Y Acad Sci.* Dec 26;837:138-56.
- ✚ *Hellström L.D.*, Langin S., Reynisdottir M., Dauzats and Arner P., 1996. Adipocyte lipolysis in normal weight subjects with obesity among first-degree relatives. *Diabetologia.* 39: 921–928.
- ✚ *Hengartner M. O.*, 2000. "The biochemistry of apoptosis." *Nature* 407(6805): 770-6.
- ✚ *Hishida T.*, Nishizuka M., Osada S., Imagawa M., 2009. The role of C/EBPdelta in the early stages of adipogenesis. *Biochimie*; 91:654–7.
- ✚ *Hoegberg P.*, Schmidt C.K., Fletcher N., Nilsson CH.B., Trossvik CH., Schuur A.G., Brouwer A., Nau H., Ghyselinck N.B., Chambon P., Hakansson H., 2005. Retinoid status and responsiveness to retinoid binding protein or retinoid receptor forms. *Chem Biol Interact* 156: 25-39.
- ✚ *Holford TR.*, Zheng T., Mayne ST., Zahm SH., Tessari JD., Boyle P., 2000. Joint effects of nine polychlorinated biphenyl (PCB) congeners on breast cancer risk. *Int J Epidemiol.* Dec; 29(6):975-82.
- ✚ *Hong C.S.*, Xiao J., Bush B., Shaw S.D., 1998. Environmental occurrence and potential toxicity of planar, mono-, and di-ortho polychlorinated biphenyls in the biota..

- Chemosphere; Mar; 36(7):1637-51.
- ✚ *Hotamisligil G.S., Arner P., Caro J.F., Atkinson R.L., Spiegelman B.M., 1995. Increased adipose tissue expression of tumor necrosis factor- $\alpha$  in human obesity and insulin resistance. J. Clin. Invest.; 95:2409-15.*
  - ✚ *Hotamisligil G.S., Budavari A., Murray D., Spiegelman B., 1994. Reduced tyrosine kinase activity of the insulin receptor in obesity-diabetes. Central role of tumor necrosis factor alpha. J. Clin. Invest.; 94:1543-9*
  - ✚ *Hotamisligil G.S., Peraldi P., Budavari A., Ellis R., White M.F., Spiegelman B.M., 1996. IRS-1 mediated inhibition of insulin receptor tyrosine kinase activity in TNF $\alpha$  and obesity-induced insulin resistance. Science (Washington DC); 271:665-8.*
  - ✚ *Hotamisligil G.S., Shargill N.S., Spiegelman B.M., 1993. Adipose expression of tumor necrosis factor-alpha: direct role in obesity-linked insulin resistance. Science; 259:87-91.*
  - ✚ *Hotamisligil G.S., Shargill N.S., Spiegelman B.M., 1993. Adipose expression of tumor necrosis factor-alpha: direct role in obesity-linked insulin resistance. Science; 259: 87-91.*
  - ✚ *Hotamisligil G.S., Spiegelman B.M., 1994. Tumor necrosis factor alpha: a key component of the obesity-diabetes link. Diabetes;43:1271-8.*
  - ✚ *Hotamisligil G.S., Spiegelman B.M., 1994. Tumor necrosis factor: A key component of the obesity-diabetes link. Diabetes; 43: 1271-1278.*
  - ✚ *Howard A.S., Fitzpatrick R., Pessah I., Kostyniak P. and Lein P.J., 2003. Polychlorinated biphenyls induce caspase-dependent cell death in cultured embryonic rat hippocampal but not cortical neurons via activation of the ryanodine receptor. Toxicology and Applied Pharmacology 190: 72-86.*
  - ✚ *Howsam M., Grimalt JO., Guino E., Navarro M., Marti-Rague J., Peinado MA., Capella G., Moreno V., 2004. Organochlorine exposure and colorectal cancer risk. Bellvitge Colorectal Cancer Group. Environ Health Perspect. Nov;112(15):1460-6.*
  - ✚ *Hu E., Liang P., & Spiegelman B. M., 1996. AdipoQ is a novel adipose-specific gene dysregulated in obesity. The Journal of Biological Chemistry, 271, 10697–10703.*
  - ✚ *Hue O., Marcotte J., Berrigan F., Simoneau M., Doré J., Marceau P., et al.. 2006. Increased plasma levels of toxic pollutants accompanying weight loss induced by hypocaloric diet or by bariatric surgery. Obes Surg 16:1145–1154*
  - ✚ *Hutley L., Prins J.B., 2005. Fat as an endocrine organ: relationship to the metabolic syndrome. Am J Med Sci.; 330:280-9.*
  - ✚ *Imbeault P., Tremblay A., Simoneau J-A., Joannisse D.R., 2002. Weight loss-induced rise in plasma pollutant is associated with reduced skeletal muscle oxidative capacity. Am J Physiol 282: E574-E579.*
  - ✚ *Ishiki M., Klip A., 2005. Minireview: recent developments in the regulation of glucose transporter-4 traffic: new signals, locations, and partners. Endocrinology;146:5071–8.*
  - ✚ *Israels L.G., I. E. D., 1999. "Apoptosis." STEM CELLS 17: 306-313.*
  - ✚ *Jandacek R.J., Anderson N., Liu M., Zheng S., Yang Q., Tso P., 2005. Effects of yo-yo diet, caloric restriction, and olestra on tissue distribution of hexachlorobenzene. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol 288:G292–G299.*
  - ✚ *Jensen A.A., 1989. Background levels in humans. In: Kimbrough R.D., Jensen A.A. (eds) Halogenated biphenyls, terphenyls, naphthalenes, dibenzodioxins, and related products. Elsevier Science, Amsterdam; pp 345–364.*
  - ✚ *Jernas M., Palming J., Sjöholm K., Jennische E., Svensson P.A., Gabrielsson B.G., Levin M., Sjögren A., Rudemo M., Lystig T.C., Carlsson B., Carlsson L.M., Lönn M., 2006. Separation of human adipocytes by size: hypertrophic fat cells display distinct gene expression. FASEB J; 20: 1540-2.*
  - ✚ *Johansen H.R., Alexander J., Rossland O.J., Planting S., Levik M., Gaarder P.I., Gdynia W., Bjerve K.S., and Becher G., 1996. PCDDs, PCDFs, and PCBs in human blood in relation to*

- consumption of crabs from a contaminated fjord area in Norway. *Environ Health Perspect*; 104, 756-764.
- ✚ *Johansson C., Tofighi R., Tamm C., Goldoni M., Mutti A., Ceccatelli S., 2006. Cell death mechanisms in AtT20 pituitary cells exposed to polychlorinated biphenyls (PCB 126 and PCB 153) and methylmercury. Toxicology Letters 167: 183-190.*
  - ✚ *Johansson C., Tofighi R., Tamm C., Goldoni M., Mutti A., Ceccatelli S., 2006. Cell death mechanisms in AtT20 pituitary cells exposed to polychlorinated biphenyls (PCB 126 and PCB 153) and methylmercury. Toxicology Letters 167: 183-190.*
  - ✚ *Johnson P.R., Zucker L.M., Cruce J.A.F., Hirsch J., 1971. Cellularity of adipose depots in the genetically obese Zucker rat. J Lipid Res; 12: 706–714.*
  - ✚ *Jokinen M.P., Walker N.J., Brix A.E., Sells D.M., Haseman J.K., Nyska A., 2003. Increase in cardiovascular pathology in female Sprague-Dawley rats following chronic treatment with 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin and 3,3',4,4',5-pentachlorobiphenyl. Cardiovasc Toxicol.;3(4):299-310.*
  - ✚ *Joshua E., Muscat, et al., 2003. Adipose Concentrations of Organochlorine Compounds and Breast Cancer Recurrence in Long Island, New York Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention, Vol. 12, 1474–1478.*
  - ✚ *Kadowaki T., Yamauchi T., Kubota N., Hara K., Ueki K., Tobe K., 2006. Adiponectin and adiponectin receptors in insulin resistance, diabetes, and the metabolic syndrome. J Clin Inv.*
  - ✚ *Kahn B.B. and Flier J.S., 2000. Obesity and insulin resistance. The J. of Clin. Invest.; Volume 106; 4:473-480.*
  - ✚ *Kamei Y., Suzuki M., Miyazaki H., Tsuboyama-Kasaoka N., Wu J., Ishimi Y., Ezaki O., 2005. Ovariectomy in mice decreases lipid metabolism-related gene expression in adipose tissue and skeletal muscle with increased body fat. J Nutr Sci Vitam 51: 110-117.*
  - ✚ *Kaplan L.M., 1998. Gastroenterology 15: 997-1001.*
  - ✚ *Kawai M., and Rosen C.J., 2010. PPAR $\gamma$ : a circadian transcription factor in adipogenesis and osteogenesis. Nat. Rev. Endocrinol. 6, 629–636.*
  - ✚ *Kelce W.D., Stone C.R., Laws S.C., Gray L.E., Kemppainen J.A., Wilson E.M., 1995. The persistent DDT metabolite p,pV-DDE is a potent androgen receptor antagonist. Nature; 375:581–5.*
  - ✚ *Kelce W.R., Stone Ch R., Laws S.C., Gray L.E., Kemppainen J.A., Wilson E.M., 1995. Persistent DDT metabolite p,p'-DDE is a potent androgen receptor antagonist. Nature 375: 581-585.*
  - ✚ *Kerkvliet N.I., 1995. Immunological effects of chlorinated dibenzo-p-dioxins. Environ Health Perspect, 103: 47-53.*
  - ✚ *Kern P.A., Dicker-Brown A., Said S.T., Kennedy R., Fonseca V.A., 2002. The stimulation of tumor necrosis factor and inhibition of glucose transport and lipoprotein lipase in adipose cells by 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin. Metabolism 51: 65-68.*
  - ✚ *Kershaw E.E., Flier J.S., 2004. Adipose tissue as an endocrine organ. J Clin Endocrinol Metab.;89(6):2548-56.*
  - ✚ *Khan A.H., Pessin J.E., 2002. Insulin regulation of glucose uptake: a complex interplay of intracellular signalling pathways. Diabetologia ;45:1475–83.*
  - ✚ *Kiec-Wilk B., Dembinska-Kiec A., Olszanecka A., Bodzioch M., Kawecka-Jaszcz K., 2005. The selected pathophysiological aspects of PPARs activation. J Physiol Pharmacol;56:149–62.*
  - ✚ *Kim M.J., Marchand P., Henegar C., Antignac J.P., Alili R., Poitou C., et al., 2011. Fate and complex pathogenic effects of dioxins and polychlorinated biphenyls in obese subjects before and after drastic weight loss. Environ Health Perspect 119:377–383*
  - ✚ *Kirsten B., Moysich K.B., Shields P.G., Freudenheim J.L., Schisterman E.F., Vena J.E., Kostyniak P., Greizerstein H., Marshall J.R., Graham S., Ambrosone C.B., 1999.*

- Polychlorinated Biphenyls, Cytochrome P4501A1 Polymorphism, and Postmenopausal Breast Cancer Risk *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention* 41 Vol. 8, 41–44.
- ✚ *Kiviranta H.*, Tuomisto J.T., Tuomisto J., Tukiainen E., Vartianen T., 2005. Polychlorinated dibenzo-p-dioxins, dibenzofurans, and biphenyls in the general population in Finland. *Chemosphere* 60; 854–869.
  - ✚ *Klaman L.D.*, Boss O., Peroni O.D., Kim J.K., Martino J.L., Zabolotny J.M., Moghal N., Lubkin M., Kim Y.B. et al., 2000. Increased energy expenditure, decreased adiposity, and tissue-specific insulin sensitivity in protein-tyrosine phosphatase 1B-deficient mice. *Mol Cell Biol.* 20(15):5479-89.
  - ✚ *Koistinen H.A.*, Bastard J.P., Dusserre E., Ebeling P., Zegari N., Andreelli F., et al, 2000. Subcutaneous adipose tissue expression of tumour necrosis factor-alpha is not associated with whole body insulin resistance in obese nondiabetic or in type-2 diabetic subjects.
  - ✚ *Kokta T.A.*, Dodson M.V., Gertler A., Hill R.A., 2004. Intercellular signaling between adipose tissue and muscle tissue. *Domest Anim Endocrinol*; 27:303–31.
  - ✚ *Kostyniak P.J.*, Stinson C., Greizerstein H.B., Vena J., Buck G., Mendola P., 1999. Relation of Lake Ontario fish consumption, lifetime lactation, and parity to breast milk polychlorobiphenyl and pesticide concentrations. *Environ Res*; 80:S166–S174.
  - ✚ *Kostyniak P.J.*, Stinson C., Greizerstein H.B., Vena J., Buck G., Mendola P., 1999. Relation of Lake Ontario fish consumption, lifetime lactation, and parity to breast milk polychlorobiphenyl and pesticide concentrations. *Environ Res*; 80:S166–S174.
  - ✚ *Kostyniak P.J.*, Stinson C., Greizerstein H.B., Vena J., Buck G., Mendola P., 1999. Relation of Lake Ontario fish consumption, lifetime lactation, and parity to breast milk polychlorobiphenyl and pesticide concentrations. *Environ Res* 80:S166–S174.
  - ✚ *Kuratsume M.*, Yoshimura H., Hori Y., Okumura M., Masuda Y., 1996. Yusho: A Human Disaster Caused by PCBs and Related Compounds. Kyushu University Press, Fukuoka, Japan.
  - ✚ *Laden F.*, Collman G., Iwamoto K., Alberg AJ., Berkowitz GS., Freudenheim JL., Hankinson SE., Helzlsouer KJ., Holford TR., Huang HY., Moysich KB., Tessari JD., Wolff MS., Zheng T., Hunter DJ., 2001. 1,1-Dichloro-2,2-bis (p-chlorophenyl) ethylene and polychlorinated biphenyls and breast cancer: combined analysis of five U.S. studies *J Natl Cancer Inst.* May 16;93(10):768-76.
  - ✚ *Lafontan M.*, M. Berlan., 1993. Fat cell adrenergic receptors and the control of white and brown fat cell function. *J. Lipid Res.* 34: 1057–1091.
  - ✚ *Lago F.*, Dieguez C., Gómez-Reino J., & Gualillo O.; 2007a. Adipokines as emerging mediators of immune response and inflammation. *Nature Clinical Practice. Rheumatology*,3, 716–724.
  - ✚ *Lago F.*, Dieguez C., Gómez-Reino J., Gualillo O. (2007b). The emerging role of adipokines as mediators of inflammation and immune responses. *Cytokine & Growth Factor Reviews*, 18, 313–325.
  - ✚ *Lee G.H.*, Proenca R., Montez J.M., Carroll K.M., 1996. Abnormal splicing of the leptin receptor in diabetic mice. *Nature* 379: 632-635.
  - ✚ *Lefterova M.I.*, Lazar M.A., 2009. *Trends Endocrinol. Metab.*, 20, 107-114.
  - ✚ *Levin M.*, Morsey B., Mori C., Nambiar P.R., De Guise S., 2005. Non-coplanar PCB-mediated modulation of human leukocyte phagocytosis: a new mechanism for immunotoxicity. *J Toxicol Environ Health A.* 26;68(22):1977-93.
  - ✚ *Li Y.*, Millikan RC., Bell DA., Cui L., Tse CK., Newman B., Conway K., 2005. Polychlorinated biphenyls, cytochrome P450 1A1 (CYP1A1) polymorphisms, and breast cancer risk among African American women and white women in North Carolina: a population-based case-control study. *Breast Cancer Res.*;7(1):R12-8. Epub 2004 Oct 22.



- ✚ *Lim J.S., Son H.K., Park S.K., Jacobs D.R. Jr, Lee D.H., 2010. Inverse associations between long-term weight change and serum concentrations of persistent organic pollutants. Int J Obes 35:744–747.*
- ✚ *Loffler G., Mirter G., Hartrampf R., 1994. Culture of mature adipocytes: evidence for cell division induced by growth factors. Int J Obes (Suppl 2); 18:88.*
- ✚ *Longnecker M.P., Rogan W.J., Lucier G., 1997. The human health effects of DDT (dichlorodiphenyltrichloroethane) and PCBS (polychlorinated biphenyls) and an overview of organochlorines in public health. Annu Rev Public Health 18:211–244.*
- ✚ *Loomis D., Browning S.R., Schenck A.P., Gregory E., Savitz D.A., 1997. Cancer mortality among electric utility workers exposed to polychlorinated biphenyls. Occup Environ Med. Oct;54(10):720-8.*
- ✚ *Lord G.M., Matarese G., Howard J.K. Baker R.J., Bloom S.R., Lechler R.I., 1998. Leptin modulates the T-cell immune response and reverses starvation-induced immunosuppression. Nature;394(6696):897-901.*
- ✚ *Lowell B.B., Spiegelman B.M., 2000. Towards a molecular understanding of adaptive thermogenesis. Nature; 404: 652– 660.*
- ✚ *Lu Z., Tharappel J.C., Lee E.Y., Robertson L.W., Spear B.T., Glauert H.P., 2003. Effect of a single dose of polychlorinated biphenyls on hepatic cell proliferation and the DNA binding activity of NF-kappaB and AP-1 in rats. Mol Carcinog. Aug;37(4):171-80.*
- ✚ *Lucena RA., Allam MF., Costabeber IH., Villarejo ML, Navajas RF., 2001. Breast cancer risk factors: PCB congeners. Eur J Cancer Prev. Feb;10(1):117-9.*
- ✚ *Ludewig G., Esch, H., Robertson, L.W., 2007. Polyhalogenierte bi- und terphenyle. In Dulkelberg, H., Gebel, T., Hartvig, A., (Eds.) Handbuk der lebensmitteltoxikologie. Wiley-VCH Weinheim, Germany, pp.1031-1094 Hahn ME: Aryl hydrocarbon receptors: diversity and evolution. Chem Biol Interact 2002 Sep 20;141(1-2):131-60.*
- ✚ *Lyche J., Larsen H., Skaare J.U., Tverdal A., Dahl E., Johansen G., Ropstad E., 2004. Effects of perinatal exposure to low doses of PCB 153 and PCB 126 on lymphocyte proliferation and hematology in goat kids. J Toxicol Environ Health A; 889-904.*
- ✚ *Lynn R.B., Cao G.U., Considine R.V. et al., 1996. Autoradiographic localization of leptin binding in the choroid plexus of ob/ob and db/db mice. Biochem. Biophys. Res. Commun. 219: 884.*
- ✚ *Lyon C.J., Law R.E., Hsueh V.A., 2003. Minireview: Adiposity, inflammation, and atherogenesis. Endocrinology; 144: 2195-2200.*
- ✚ *MacDougald O.A., Lane M.D., 1995. Transcriptional regulation of gene expression during adipocyte differentiation. Annu Rev Biochem 64:345–373.*
- ✚ *Madsen L., et al., 2003. Adipocyte differentiation of 3T3-L1 preadipocytes is dependent on lipoxygenase activity during the initial stages of the differentiation process. J Biochem; 375:539-549.*
- ✚ *Magré J.H., Laurell C., Fizames P. J., Anotine C., Dib C., Vigouroux J., Capeau J., Weissenbach D., Langin., 1998. Human hormone-sensitive lipase: genetic mapping, identification of a new dinucleotide repeat, and association with obesity and NIDDM. Diabetes.47: 284–286.*
- ✚ *Malefyt R., 1999. Interleukin-10. In: Mire-Sluis A, Thorpe R (eds.). Cytokines. 2nd ed. London: Academic Press; p. 151-61.*
- ✚ *Malik K.F., Young W.S., 1996. Localization of binding sites in the central nervous system for leptin (OB protein) in normal, obese (ob/ob) and diabetic (db/db) C57BL/6J mice. Endocrinology 137: 1497-1500.*
- ✚ *Mariussen E., Myhre O., Reistad T., Fonnum F., 2002. The polychlorinated biphenyl mixture aroclor 1254 induces death of rat cerebellar granule cells: the involvement of the N-methyl-D-aspartate receptor and reactive oxygen species. Toxicol. Appl. Pharmacol. 179, 137-144.*

- ✚ *Marzolla V.*, Armani A., Zennaro M. C., Cinti F., Mammi C., Fabbri A., Rosano G. M. and Caprio M., 2012. The role of the mineralocorticoid receptor in adipocyte biology and fat metabolism. *Mol. Cell. Endocrinol.* 350, 281–288.
- ✚ *Mauriege P.J. P.*, Despres D., Prud'Homme M.C., Pouliot M., Marcotte A., 1991. Tremblay, and C. Bouchard. Regional variation in adipose tissue lipolysis in lean and obese men. *J. Lipid Res.* 32:1625–1633.
- ✚ *McAllister E.J.*, Dhurandhar N.V., Keith S.W., Aronne L.J., Barger J., Baskin M., Benca R.M., Biggio J., Boggiano M.M., Eisenmann J.C., Elobeid M., Fontaine K.R., Gluckman P., Hanlon E.C., Katzmarzyk P., Pietrobelli A., Redden D.T., Ruden D.M., Wang C., Waterland R.A., Wright S.M., Allison D.B., 2009. Ten putative contributors to the obesity epidemic. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 49:868–913.
- ✚ *McGarry J.D.*, 2002. Banting lecture 2001: dysregulation of fatty acid metabolism in the etiology of type 2 diabetes. *Diabetes. Jan;* 51(1):7-18.
- ✚ *Mertens I.*, Considine R.V., Van der Planken M., Van Gaal L.F., 2006. Hemostasis and fibrinolysis in non-diabetic overweight and obese men and women. Is there still a role for leptin; *Eur J Endocrinol;* 155: 477-84.
- ✚ *Michalek J.E.*, Akhtar F.Z., Arezzo J.C., Garabrant D.H., Albers J.W., 2001. Serum dioxin and peripheral neuropathy in veteran of Operation Ranch Hand. *Neurotoxicology.* Aug; 22(4):470-90.
- ✚ *Michalek J.E.*, et al., 2001. Serum dioxin and peripheral neuropathy in veteran of Operation Ranch Hand. *Neurotoxicology* Aug;22(4):470-90.
- ✚ *Michalek J.E.*, Ketchum N.S., Tripathi R.C., 2003.: Diabetes mellitus and TCDD elimination in veterans of Operation Ranch Hand. *J Toxicol Environ Health A* Feb 14;66(3):211-21.
- ✚ *Michalik L.*, Wahli W., 2007. Peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs) in skin health, repair and disease. *Biochim. Biophys. Acta* 1771:991–98126.
- ✚ *Mimura J.*, Fujii-Kuriyama Y., 2003. Functional role of AhR in the expression of toxic effects by TCDD. *Biochem Biophys Acta* 1619: 263-268.
- ✚ *Mohamed-Ali V.*, Goodrick S., Rawesh A., Katz D.R., Miles J.M., Yudkin J.S., Klein S., Coppack S.W., 1997. Subcutaneous adipose tissue releases interleukin-6, but not tumor necrosis factor-alpha, in vivo. *J Clin Endocrinol Metab;* 82: 4196-4200.57.
- ✚ *Montague C.T.*, 2002. Adipose depot-specific effects of PPAR gamma agonists: a consequence of differential expression of PPAR gamma in adipose tissue depots? *Diabetes Obes Metab;*4:356–61. -78
- ✚ *Montague C.T.*, 2002. Adipose depot-specific effects of PPAR gamma agonists: a consequence of differential expression of PPAR gamma in adipose tissue depots? *Diabetes Obes Metab;* 4:356–61.
- ✚ *Moore K.*, Malefyt R., Coffman R., O'Garra A., 2001. Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor. *Annu Rev Immunol.;* 19 (1): 683-765.22.
- ✚ *Mori C.*, Morsey B., Levin M., Gorton T.S., De Guise S., 2008. Effects of organochlorines, individually and in mixtures, on b-cell proliferation in marine mammals and mice. *J Toxicol Environ Health A.;* 71(4):266-75.
- ✚ *Morrone M.*, Barbatelli G., Zingaretti M.C., Cinti S., 1995. Immunohistochemical, ultrastructural and morphometric evidence for brown adipose tissue recruitment due to cold acclimation in old rats. *Int J Obes Relat Metab Disord;* 19: 126–131.
- ✚ *Mosmann T.*, 1983. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods.* 16;65(1-2):55-63.
- ✚ *Murano I.*, Barbatelli G., Giordano A., Cinti S., 2009. Noradrenergic parenchymal nerve fiber branching after cold acclimatisation correlates with brown adipocyte density in mouse adipose organ. *J Anat;* 214: 171–178.

- ✦ *Muscat J.E., Britton J.A., Djordjevic M.V., Citron M.L., Kemeny M., Busch-Devereaux E., Pittman B., Stellman S.D., 2003. Adipose Concentrations of Organochlorine Compounds and Breast Cancer Recurrence in Long Island, New York Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention, Vol. 12, 1474–1478.*
- ✦ *National Research Council, 1979. Polychlorinated Biphenyls. National Academy of Sciences, Washington, DC.*
- ✦ *Neal J.W. & Clipstone N.A., 2002. Calineurin mediates the calciumdependent inhibition of adipocyte differentiation in 3T3-L1 cells. J Biol Chem; 277(51):49776-49781.*
- ✦ *Nechad M., 1987. Structure and development of brown adipose tissue. In Brown Adipose Tissue, ed. P Trayhurn, DG Nicholls, pp. 1–30. London: Arnold.*
- ✦ *Nedergaard J., Bengtsson T., Cannon B., 2010. Three years with adult human brown adipose tissue. Ann N Y Acad Sci; 1212: E20–E36.*
- ✦ *Negrel R., 1994. Fat cells cannot divide. Int J Obes 1994 (Suppl 2);18: 88.*
- ✦ *Negri E., Bosetti C., Fattore E., La Vecchia C., 2003. Environmental exposure to polychlorinated biphenyls (PCBs) and breast cancer: a systematic review of the epidemiological evidence. Eur J Cancer Prev. Dec;12(6):509-16.*
- ✦ *Nilsson C.B., Hakansson H., 2002. The retinoic signaling system – a target in dioxin toxicity. Crit Rev Toxicol 32: 211-232.*
- ✦ *Noren K., Meironyte D., 2000. Certain organochlorine and organobromine contaminants in Swedish human milk in perspective of past 20–30 years. Chemosphere 40; 1111–112.*
- ✦ *Novakofski J., Hu C.Y., 1987. Culture of isolated adipose tissue cells. J Anim Sci; 65: 12–24.*
- ✦ *Nozaki N., Yamaguchi S., Yamaoka M., Okuyama M., Nakamura H., 1998. Enhanced expression and shedding of tumor necrosis factor (TNF) receptors from mononuclear leukocytes in human heart failure. J Moll Cell Cardiol.; 30: 2003-1 44*
- ✦ *Oltvai Z.N., Korsmeyer S.J., 1994. Checkpoints of dueling dimers foil death wishes. Cell. 21;79(2):189-92.*
- ✦ *Orrenius S., Zhivotovsky B., Nicotera P., 2003. Regulation of cell death: the calciumapoptosis link. Nature 4: 552-565.*
- ✦ *Otto T.C., Lane M.D., 2005. Adipose development: from stem cell to adipocyte. Crit Rev Biochem Mol Biol;40:229–42.*
- ✦ *Pachaikani Ramadass et al., 2003.:Dietary Flavonoids Modulate PCB-Induced Oxidative Stress, CYP1A1 Induction, and AhR-DNA Binding Activity in Vascular Endothelial Cells Toxicological Sciences 76, 212–219.*
- ✦ *Palut D., Ludwicki J.K., Kostka G., Kopec-Szlezak J., Wladowska B., Lembowicz K., 2001. Studies of early hepatocellular proliferation and peroxisomal proliferation in Wistar rats treated with herbicide diclofop. Toxicology 158:119–26.*
- ✦ *Patterson D.G., Todd G.D., Turner W.E., Maggio V., Alexander L.R., and Needham L.L., 1994. Levels of non-ortho substituted (coplanar), mono and di-ortho substituted polychlorinated biphenyls, dibenzo-p-dioxms and dibenzofurans in human sera and adipose tissue. Environ. Health Perspect; 102 (Suppl. 1). 195-204.*
- ✦ *Pavan I., Baroffio C., Passini V. Bilei T., Pira E., Minoia C., 2003. Policlorobifenili; Valori Di Riferimento. G Ital Med Lav Erg, Pavia. 25 (1): 61-67.*
- ✦ *Pérez-Reyes P.L., Sánchez-Alonso J.A., López-Aparicio P., Recio M.N., Pérez-Albarsanz M.A., 2001. Different molecular capacity in the induction of apoptosis by polychlorinated biphenyl congeners in rat renal tubular cell cultures. Biosci Rep;21(6):765-78.*
- ✦ *Pérez-Reyes PL., Sánchez-Alonso JA., López-Aparicio P., Recio M.N., Pérez-Albarsanz M.A., 2001. Different molecular capacity in the induction of apoptosis by polychlorinated biphenyl congeners in rat renal tubular cell cultures. Biosci Rep. Dec;21(6):765-78.*
- ✦ *Pessah I.N., Hansen L.G., Albertson T.E., Garner C.E., Ta T.A., Do Z., Kim K.H., Wong P.W., 2006. Structure-activity relationship for noncoplanar polychlorinated biphenyl*

- congeners toward the ryanodine receptor-Ca<sup>2+</sup> channel complex type 1 (RyR1). *Chem. Res. Toxicol.*; 19, 92-101.
- ✚ *Pessin J.E.*, Thurmond D.C., Elmendorf J.S., Coker K.J., Okada S., 1999. Molecular basis of insulin-stimulated GLUT4 vesicle trafficking. Location! Location! Location! *J Biol Chem* ;274:2593–6
  - ✚ *Pessler-Cohen D.*, Pekala P.H., Kovsan J., Bloch-Damti A., Rudich A., Bashan N., 2006. GLUT4 repression in response to oxidative stress is associated with reciprocal alterations in C/EBP alpha and delta isoforms in 3T3-L1 adipocytes. *Arch Physiol Biochem*;112:3–12.
  - ✚ *Petersen K.F.*, Befroy D., Dufour S., Dziura J., Ariyan C., Rothman D.L., Dipietro L., Cline G.W., Shulman G.I., 2003. Mitochondrial dysfunction in the elderly: possible role in insulin resistance. *Science* 16: 1140-1142.
  - ✚ *Petronilli V.*, Penzo D., Scorrano L., Bernardi P., Di Lisa F., 2001. The mitochondrial permeability transition, release of cytochrome c and cell death. Correlation with the duration of pore openings in situ. *Biol Chem*; 276(15): 12030-4.
  - ✚ *Petruschke T.H.*, Hauner H., 1993. Tumor necrosis factor- $\alpha$  prevents the differentiation of human adipocyte precursor cells and causes delipidation of newly developed fat cells. *J. Clin Endocrinol Metab.*; 76:742-7.
  - ✚ *Pitteloud N.*, Mootha V.K., Dwyer A.A., Hardin M., Lee H., Eriksson K.F., Tripathy D., Yialamas M., Groop L., Elahi D., Hayes F.J., 2005. Relationship between testosterone levels, insulin sensitivity, and mitochondrial function in men. *Diabetes Care* 28: 1636-1642.
  - ✚ *Pizzin G.*, Bentley S., 2006. Diossine, furani, PCB e alimenti di origine animale: stato dell'arte. *Ann. Fac. Medic. Vet. Di Parma (Vol. XXVI, 2006)* pag. 247- pag. 264.
  - ✚ *Prins J.B. and O'Rahilly S.*, 1997. Regulation of adipose cell number in man. *Clinical Science*; 92,3-11.
  - ✚ *Prins J.B.*, O'Rahilly S., 1997. Regulation of adipose cell number in man. *Clin Sci (Lond)*; 92:3–11.
  - ✚ *Puga A.*, Marlowe J., Barnes S., Chang C.Y., Maier A., Tan Z., Kerzee J.K., Chang X., Strobeck M., Knudsen E.S., 2002. Role of the aryl hydrocarbon receptor in cell cycle regulation. *Toxicology* 181–182:171–177.
  - ✚ *Qiu Z.*, Wei Y., Chen N., Jiang M., Wu J., Liao K., 2001. DNA synthesis and mitotic clonal expansion is not a required step for 3T3-L1 preadipocytes differentiation into adipocytes. *J Biol Chem* 276:11988–11995.
  - ✚ *Raaschou-Nielsen O.*, Pavuk M., Leblanc A., Dumas P., Philippe Weber J., Olsen A., Tjonneland A., Overvad K., Olsen J.H., 2005. Adipose organochlorine concentrations and risk of breast cancer among postmenopausal Danish women. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev. Jan*;14(1):67-74.
  - ✚ *Radice S.*, Chiesara E., Fucile S., Marabini L., 2008. Different effects of PCB101, PCB118, PCB138 and PCB153 alone or mixed in MCF-7 breast cancer cells. *Food Chem Toxicol* 46:2561–2567.
  - ✚ *Ramadass P.*, Meerarani P., Toborek M., Robertson L.W., Hennig B., 2003. Dietary Flavonoids Modulate PCB-Induced Oxidative Stress, CYP1A1 Induction, and AhR-DNA Binding Activity in Vascular Endothelial Cells *Toxicological Sciences* 76, 212–219.
  - ✚ *Ramamoorthy K.*, Gupta M.S., Sun G., McDougal A., Safe S.H., 1999. 3,3',4,4'-Tetrachlorobiphenyl exhibits antiestrogenic and antitumorigenic activity in the rodent uterus and mammary cells and in human breast cancer cells. *Carcinogenesis. Jan*;20(1):115-23.
  - ✚ *Ramirez-Zacarias J.L.*, Castro-Munozledo F., Kuri-Harcuch W., 1992. Quantitation of adipose conversion and triglycerides by staining intracytoplasmic lipids with Oil red O. *Histochemistry* 97; 493–497.
  - ✚ *Rangwala S.M.*, Lazar M.A., 2000. Transcriptional control of adipogenesis. *Annu Rev Nutr* 20:535–559.
  - ✚ *Ratcliffe D.A.*, 1967. Decrease in eggshell weight in certain birds of pray. *Nature*; 215:208–



10.

- ✚ *Rattenborg T.*, Gjermandsen I., Bonefeld-Jorgensen E.C., 2002. Inhibition of E2-induced expression of BRCA1 by persistent organochlorines. *Breast Cancer Res.*;4(6):R12. Epub 2002 Jul 24.
- ✚ *Remillard R.B.*, Bunce N.J., 1998. Linking dioxins to diabetes: epidemiology and biology plausibility. *Environ Health Perspect* 110: 853-867.
- ✚ *Reynisdottir S.H.*, Wahrenberg K., Carlström S., Rössner and P. Arner., 1994. Catecholamine resistance in fat cells of women with upper-body obesity due to decreased expression of beta2-adrenoceptors. *Diabetologia*. 37: 428–435.
- ✚ *Ribas-Fito N.*, Sala M., Kogevinas M., Sunyer J., 2001. Polychlorinated biphenyls (PCBs) and neurological development in children: a systematic review. *J. Epidemiol. Community Health* 55, 537-546.
- ✚ *Ridker P.M.*, Rifai N., Stampfer M.J., Hennekens C.H., 2000. Plasma concentration of interleukin-6 and the risk of future myocardial infarction among apparently healthy men. *Circulation*; 101: 1767-1772.
- ✚ *Ritchie J.M.*, Vial S.L., Fuortes L.J., Guo H., Reedy V.E., Smith E.M., 2003. Organochlorines and risk of prostate cancer. *J Occup Environ Med*. Jul;45(7):692-702.
- ✚ *Robertson L.W.*, Hansen L., 2001. Recent Advances in the Environmental Toxicology and Health Effects of PCBs. The University Press of Kentucky, Lexington, K.Y.
- ✚ *Rodeheffer M.S.*, Birsoy K., Friedman J.M., 2008. Identification of white adipocyte progenitor cells in vivo. *Cell* 135:240–249.
- ✚ *Rodriguez-Cuenca S.*, Monjo M., Proenza A.M., Roca P., 2005. Depot differences in steroid receptor expression in adipose tissue: possible role of the local steroid milieu. *Am J Physiol* 288: E200-E207.
- ✚ *Rosen E.D.*, Spiegelman B.M., 2000. Molecular regulation of adipogenesis. *Annu Rev Cell Dev Biol* 16:145–171.
- ✚ *Rosen E.D.*, Spiegelman B.M., 2001. PPARgamma: a nuclear regulator of metabolism, differentiation, and cell growth. *J Biol Chem*;276:37731–4
- ✚ *Rosen E.D.*, Spiegelman B.M., 2001. PPARgamma: a nuclear regulator of metabolism, differentiation, and cell growth. *J Biol Chem*; 276:37731–4.
- ✚ *Sacheck J.*, 2008. Pediatric obesity: an inflammatory condition? *J Parenter Enteral Nutr* 2008; 32: 633- 637.
- ✚ *Safe S.*, Bandiera S., Sawyer T., Robertson L., Safe L., Parkinson A., Thomas P.E., Ryan D.E., Reik L.M., Levin W., Denomme M.A., Fuyita, T., 1985. PCBs: Structure-function relationships and mechanism of action. *Environ. Health Perspect.* 60; 47-56.
- ✚ *Safe S.*, Biegel L., 1990. Effects of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) on cell growth and the secretion of the estrogen-induced 34-, 52- and 160-kDa proteins in human breast cancer cells. *J Steroid Biochem Mol Biol*. Dec 10;37(5):725-32.
- ✚ *Safe S.H.*, 1994. Polychlorinated biphenyls (PCBs): environmental impact, biochemical and toxic responses, and implications for risk assessment. *Crit. Rev. Toxicol.*; 24, 87\_/149.
- ✚ *Sánchez-Alonso J.A.*, López-Aparicio P., Recio M.N., Pérez-Albarsanz M.A., 2003. Apoptosis-mediated neurotoxic potential of a planar (PCB 77) and a nonplanar (PCB 153) polychlorinated biphenyl congeners in neuronal cell cultures. *Toxicology Letters* 144: 337-349.
- ✚ *Santos-Alvarez J.*, Goberna R., Sánchez-Margalet V., 1999. Human leptin stimulates proliferation and activation of human circulating monocytes. *Cell Immunol.*; 194(1):6-11.
- ✚ *Schechter A.*, Birnbaum L., Ryan J.J., Constable J.D., 2006. Dioxins:an overview. *Environ Res* 101:419–428.
- ✚ *Scheepers A.*, Joost H.G., Schurmann A., 2004. The glucose transporter families SGLT and GLUT: molecular basis of normal and aberrant function. *J Parenter Enteral Nutr* 28:364–71.
- ✚ *Scherer P. E.*, Williams S., Fegliano M., Baldini G., & Lodish H.F., 1995. A novel serum

- protein similar to C1q produced exclusively in adipocytes. *The Journal of Biological Chemistry*, 270, 26746–26747.
- ✦ *Schrader T.J.*, Cooke G.M., 2003. Effects of Aroclors and individual PCB congeners on activation of the human androgen receptor in vitro. *Reprod Toxicol.* 17: 15-23.
  - ✦ *Scott E.*, Heid et al., 2001. Correlation of Cardiotoxicity Mediated by Halogenated Aromatic Hydrocarbons to Aryl Hydrocarbon Receptor Activation. *Toxicological Sciences* 61, 187–196.
  - ✦ *Selgrade M.K.*, 2007. Immunotoxicity—The Risk is Real. *Toxicol Sci.*100(2), 328–332.
  - ✦ *Selvarajan S.*, Lund L.R., Takeuchi T., Craik C.S., Werb Z., 2001. A plasma kallikrein-dependent plasminogen cascade required for adipocyte differentiation. *Nat Cell Biol* 3:267–275.
  - ✦ *Semple R.K.*, Chatterjee V.K., O’Rahilly S., 2006. PPAR gamma and human metabolic disease. *J Clin Invest*;116:581–9.
  - ✦ *Shantz S.L.*, Gasior D.M., Polverejan E., McCaffrey R.J., Sweeney A.M., Humphrey H.E., Gardiner J.C., 2001. Impairments of memory and learning in older adults exposed to polychlorinated biphenyls via consumption of Great Lakes fish. *Environ. Health Perspect.*;109, 605-611.
  - ✦ *Shimba S.*, Hayashi M., Ohno T., Tezuka, M., 2003. Transcriptional regulation of the AhR gene during adipose differentiation. *Biol Pharm Bull* 26: 1266-1271.
  - ✦ *Shimba S.*, Todoroki K., Aoyag, T., Tezuka M., 1998. Depletion of arylhydrocarbon receptor during adipose differentiation in 3T3-L1 cells. *Biochem Biophys Res Commun* 249: 131-137, 1998.
  - ✦ *Shimizu H.*, Shimomura Y., Nakanishi Y., Futawatari T., Ohtani K., Sato N., Mori M., 1997. Estrogen increases in vivo leptin production in rats and human subjects. *J. Endocrinol.* 154: 285-292.
  - ✦ *Shin K.J.*, Bae S.S., Hwang Y.A., Seo J.K., Ryu S.H., Suh P.G., 2000. 2,2,4,6,6-Pentachlorobiphenyl induces apoptosis in human monocytic cells. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*; 169, 1–7.
  - ✦ *Silbheron E.M.*, Glauert H.P., Robertson L.W., 1990. Carcinogenicity of polyhalogenated biphenyls: PCBs and PBBs. *Crit. Rev. Toxicol.* 20, 439-496.
  - ✦ *Silbheron E.M.*, Glauert H.P., Robertson, L.W., 1990. Carcinogenicity of polyhalogenated biphenyls: PCBs and PBBs. *Crit. Rev. Toxicol.* 20, 439-496.
  - ✦ *Simpson E.R.*, Misso M., Hewitt K.N., Hill R.A., Boon W.C., Jones M.E., Kovacic A., Zhou J., Clyne C.D., 2005. Estrogen – the good, the bad, and the unexpected. *Endocri Rev* 26: 322-330.
  - ✦ *Sinha M.K.*, Opertanova I., Ohannesian J.P., Heiman M.L., 1996. Evidence of free and bound leptin in human circulation. Studies in lean and obese subjects and during short-term fasting. *J. Clin. Invest.* 98: 1277-1282.
  - ✦ *Sinks T.*, Steele G., Smith AB., Watkins K., Shults RA., 1992. Mortality among workers exposed to polychlorinated biphenyls. *Am J Epidemiol.* Aug 15;136(4):389-98.
  - ✦ *Skaare J.U.*, Bernhoft A., Derocher A., Gabrielsen G.W., Gokøyr A., Henriksen E., Larsen H.J., Lie E., Wiig, 2000. Organochlorines in top predators at Svalbard occurrence, levels and effects. *Toxicol. Lett.*, 103-109.
  - ✦ *Smeds A.*, Saukko P., 2001. Identification and quantification of polychlorinated biphenyls (PCBs) and some endocrinedisrupting pesticides in human adipose tissue from Finland. *Chemosphere* 44: 1463-1471.
  - ✦ *Smyth M.J.*, Sparks R.L., Wharton W., 1993. Proadipocyte cell lines: models of cellular proliferation and differentiation. *J Cell Sci*; 106: 1–9.
  - ✦ *Spalding K.L.*, Arner E., Westermarck P.O., Bernard S., Buchholz B.A., Bergmann O., Blomqvist L., Hoffstedt J., Naslund E., Britton T., Concha H., Hassan M., Ryden M., Frisen J., Arner P., 2008. Dynamics of fat cell turnover in humans. *Nature* 453:783–787.

- ✚ Spiegelman B.M., Flier J.S., 2001. Obesity and the regulation of energy balance. *Cell*; 23: 531 – 543.
- ✚ Stehr-Green P.A., Welty E., Steele G., Steinberg K., 1986. Evaluation of potential health effects associated with serum polychlorinated biphenyl levels. *Environ Health Perspect. Dec*;70:255-9.
- ✚ Strasser A., O'Connor L., et al., 2000. "Apoptosis signaling." *Annu Rev Biochem* 69: 217-45.
- ✚ Sugihara H., Yonemitsu N., Miyabara S., Yun K., 1986. Primary cultures of unilocular fat cells: characteristics of growth in vitro and changes in differentiation properties. *Differentiation* 1986; 31: 42–49.
- ✚ Suzuki M., Youle R.J., Tjandra N., 2000. Structure of Bax: coregulation of dimer formation and intracellular localization. *Cell.*;10;103(4):645-54.
- ✚ Tabb M., Blumberg B., 2006. New modes of action for endocrine-disrupting chemicals. *Mol. Endocrinol.* 20:475–82.
- ✚ Takeuchi S., Matsuda T., Kobayashi S., Takahashi T., Kojima H., 2006. In vitro screening of 200 pesticides for agonistic activity via mouse peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) $\alpha$  and PPAR $\gamma$  and quantitative analysis of in vivo induction pathway. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 217:235–44.
- ✚ Tam C.S., Lecoultre V., Ravussin E., 2012. Brown adipose tissue: mechanisms and potential therapeutic targets. *Circulation* 125, 2782–2791.
- ✚ Tang W., Zeve D., Suh J.M., Bosnakovski D., Kyba M., Hammer R.E., Tallquist M.D., Graff J.M., 2008. White fat progenitor cells reside in the adipose vasculature. *Science* 322:583–586.
- ✚ Tang-Péronard J.L., Andersen H.R., Jensen T.K., Heitmann B.L., 2011. Endocrine-disrupting chemicals and obesity development in humans: a review. *Obes Rev.* doi:10.1111/j.1467-789X.2011.00871.x.
- ✚ Tartaglia L., Dembski M., Weng X., Deng N. et al., 1995. Identification and expression cloning of a leptin receptor, OB-R. *Cell* 83: 1263-1271.
- ✚ Taxvig C., Dreisig K., Boberg J., Nellemann C., Schelde A.B., Pedersen D., Boergesen M., Mandrup S., Vinggaard A.M., 2012. Differential effects of environmental chemicals and food contaminants on adipogenesis, biomarker release and PPAR $\gamma$  activation. *Mol Cell Endocrinol.*; 25; 361(1-2):106-15.
- ✚ Tchkonina T., Lenburg M., Thomou T., Giorgadze N., Frampton G., Pirtskhalava T., Cartwright A., Cartwright M., Flanagan J., Karagiannides I., Gerry N., Forse R.A., Tchoukalova Y., Jensen M.D., Pothoulakis C., Kirkland J.L., 2007. Identification of depot-specific human fat cell progenitors through distinct expression profiles and developmental gene patterns. *Am J Physiol Endocrinol Metab* ; 292: E298–E307.
- ✚ Toft G., Edwards T.M., Baatrup E., Guillette Jr L.J., 2003. Disturbed sexual characteristics in male mosquitofish (*Gambusia holbrooki*) from a lake contaminated with endocrine disruptors. *Environ Health Perspect*;111: 695–701.
- ✚ Tokunaga S., Kataoka K.A., 2003. longitudinal analysis on the association of serum lipids and lipoproteins concentrations with blood polychlorinated biphenyls level in chronic "Yusho" patients *Fukuoka Igaku Zasshi.*94(5):110-7.
- ✚ Trayhurn P., Beattie J.H., 2001. Physiological role of adipose tissue: white adipose tissue as an endocrine and secretory organ. *Proc Nutr Soc*; 60: 329–339.
- ✚ Tryphonas H., 1994. Immunotoxicity of polychlorinated biphenyls: present status and future considerations. *Exp Clin Immunogenet*, 11:149-162.
- ✚ Tryphonas H., 1994. Immunotoxicity of polychlorinated biphenyls: present status and future considerations. *Exp Clin Immunogenet*, 11:149-162.
- ✚ Tsai Y.S., Maeda N., 2005. PPAR $\gamma$ : a critical determinant of body fat distribution in humans and mice. *Trends Cardiovasc Med* ;15:81–5.

- ✦ *Tsigos C., Papanicolaou D.A., Kyrou I., Defensor R., Mitsiadis C.S., Chrousos G.P., Dose-dependent effects of recombinant human interleukin-6 on glucose regulation. J Clin Endocrinol Metab 1997; 82: 4167-4170.*
- ✦ *Tsou R.C., Bence K.K., 2012. The Genetics of PTPN1 and Obesity: Insights from Mouse Models of Tissue-Specific PTP1B Deficiency. J Obes 2012:926857.*
- ✦ *Tsou R.C., Bence K.K., 2012. The Genetics of PTPN1 and Obesity: Insights from Mouse Models of Tissue-Specific PTP1B Deficiency. J Obes 2012:926857.*
- ✦ *Tsuchida A., Yamauchi T., Ito Y., Hada Y., Maki T., Takekawa S., Kamon J., Kobayashi M., Suzuki R., Hara K., Kubota N., Terauchi Y., Froguel P., Nakae J., Kasuga M., Accili D., Tobe K., Ueki K., Nagai R., Kadowaki T., 2004. Insulin/Foxo1 pathway regulates expression levels of adiponectin receptors and adiponectin sensitivity. J Biol Chem 279:30817–30822.*
- ✦ *Tynes T., Reitan JB., Andersen A.,. Incidence of cancer among workers in Norwegian hydroelectric power companies.Scand J Work Environ Health. Oct;20(5): 339-44*
- ✦ *U.S. Environ. Prot. Agency. 2000. Endocrine Disruptor Screening and Testing Advisory Committee (EDSTAC). Washington. DC: U.S. Environ. Prot. Agency. <http://www.epa.gov/scipoly/oscpendo/edsoverview/edstac.htm> (accessed September 14, 2006.*
- ✦ *Vaisse C., Halaas J.L., Horvath C.M. et al., 1996. Leptin activation of Stat3 in the hypothalamus of wild-type and ob/ob mice but not db/db mice. Nat. Genet. 14: 95-97.*
- ✦ *Van Leeuwen F.X., Feeley M., Schrenk D., Larsen J.C., Farland W.,Younes M., 2000. Dioxins: WHO's tolerable daily intake (TDI) revisited. Chemosphere 40, 1095–1101.*
- ✦ *Vaux D.L., Haecker G., Strasser A., 1994. "An evolutionary perspective on apoptosis." Cell 76(5): 777-9.*
- ✦ *Villa R., Bonetti E., Penza M.L., Lacobello C., Bugari G., Bailo M., Parolini O., Apostoli P., Caimi L., Ciana P., Maggi A., Di Lorenzo D., 2004. Target-specific action of organochlorine compounds in reproductive and nonreproductive tissues of estrogen-reporter male mice. Toxicol Appl Pharmacol 201: 137-148.*
- ✦ *Vitali A., Murano I., Zingaretti M.C., Frontini A., Ricquier D., Cinti S., 2012. The adipose organ of obesity-prone C57BL/6J mice is composed of mixed white and brown adipocytes. J Lipid Res; 53: 619–629.*
- ✦ *Vitali A., Murano I., Zingaretti M.C., Frontini A., Ricquier D., Cinti S., 2012. The adipose organ of obesity-prone C57BL/6J mice is composed of mixed white and brown adipocytes. J Lipid Res; 53: 619–629.*
- ✦ *Voie O.A., Fonnum F., 2000. Effect of polychlorinated biphenyls on production of reactive oxygen species (ROS) in rat synaptosomes. Arch Toxicol.;73(10-11):588-93.*
- ✦ *Vozarova B., Weyer C., Hanson K., Tataranni P.A., Bogardus C., Pratley R.E., 2001. Circulating interleukin-6 in relation to adiposity, insulin action, and insulin secretion. Obes Res; 9: 414-417.*
- ✦ *Wang M., Wang J.J., Li J., Park K., Qian X., Ma J.X., Zhang S.X., 2009. Pigment epithelium-derived factor suppresses adipogenesis via inhibition of the MAPK/ERK pathway in 3T3-L1 preadipocytes. Am J Physiol Endocrinol Metab 297:E1378–E1387.*
- ✦ *Wang Y.X., 2010. PPARs: diverse regulators in energy metabolism and metabolic diseases. Cell. Res; 20, 124–137 .*
- ✦ *Wangsun Choi et al., 2003.: PCB 104-Induced Proinflammatory Reactions in Human Vascular Endothelial Cells: Relationship to Cancer Metastasis and Atherogenesis. Toxicological Sciences 75, 47–56*
- ✦ *Weijjs P.J., Bakker M.I., Korver K.R., van Goor Ghanaviztchi K., van Wijnen J.H.; 2006. Dioxin and dioxin-like PCB exposure of non-breastfed Dutch infants.Chemospere. Aug; 64(9):1521-5.*
- ✦ *WHO Consultation, 1998. Assessment of the health risk of dioxins: re-evaluation of the*

- Tolerable Daily Intake (TDI) May 25-29, Geneva, Switzerland.
- ✚ *Wolff M.S., Camann D., Gammon M., Stellman S.D., 1997. Proposed congener groupings for epidemiological studies. Environ Health Perspect 105:13–14.*
  - ✚ *Wu Z., Bucher N.L., Farmer S.R., 1996. Induction of peroxisome proliferator-activated receptor gamma during the conversion of 3T3 fibroblasts into adipocytes is mediated by C/EBPbeta, C/EBPdelta, and glucocorticoids. Mol Cell Biol;16:4128–36.*
  - ✚ *Xavier C.P., Lima C.F., Fernandes-Ferreira M., Pereira-Wilson C., 2009. Salvia fruticosa, Salvia officinalis, and rosmarinic acid induce apoptosis and inhibit proliferation of human colorectal cell lines: the role in MAPK/ERK pathway. Nutr Cancer.*
  - ✚ *Xu H., Barnes G.T., Yang Q., Tan G., Yang D., Chou C.J., Sole J., Nichols A., Ross J.S., Tartaglia L.A., Chen H., 2003. Chronic inflammation in fat plays a crucial role in the development of obesity-related insulin resistance. J Clin Invest; 112: 1821-30.*
  - ✚ *Yamaoka M., Yamaguchi S., Okuyama M., Tomoike H., 1999. Anti-inflammatory cytokine profile in human heart failure: behavior of interleukin-10 in association with tumor necrosis factor-alpha. Jpn Circ J.; 63 (12): 951-615.*
  - ✚ *Yamauchi T., Kamon J., Waki H., Imai Y., Shimozawa N., Hioki K., Uchida S., Ito Y., Takakuwa K., Matsui J., Takata M., Eto K., Terauchi Y., Komeda K., Tsunoda M., Murakami K., Ohnishi Y., Naitoh T., Yamamura K., Ueyama Y., Froguel P., Kimura S., Nagai R., Kadowaki T., 2003. Globular adiponectin protected ob/ob mice from diabetes and apoE-deficient mice from atherosclerosis. J Biol Chem 278:2461–2468.*
  - ✚ *Yoo B.S., Jung K.H., Hana S.B., Kim H.M., 1997. Apoptosis-mediated immunotoxicity of polychlorinated biphenyls (PCBs) in murine splenocytes. Toxicol. Lett.; 91, 83–89.*
  - ✚ *Zabolotny J.M., Bence-Hanulec K.K., Stricker-Krongrad A. et al., 2002. PTP1B regulates leptin signal transduction in vivo. Dev Cell. 2:489-95.*
  - ✚ *Zabolotny J.M., Bence-Hanulec K.K., Stricker-Krongrad A. et al., 2002. PTP1B regulates leptin signal transduction in vivo. Dev Cell. 2:489-95.*
  - ✚ *Zhang Y., Proenca R., Maffei M., Barone m., Leopold L., Friedman J.M., 1994. Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. Nature 372: 425-432.*
  - ✚ *Zhou C., Tabb M.M., Kholodovych V. Grun F., Welsh W.J., Blumberg B., 2004. Highly chlorinated PCBs inhibit the human xenobiotic response mediated by the steroid and xenobiotic receptor (SXR). Environ Health Perspect. Feb;112(2):163-9.*
  - ✚ *Zingaretti M.C., Crosta F., Vitali A., Guerrieri M., Frontini A., Cannon B., Nedergaard J., Cinti S., 2009. The presence of UCP1 demonstrates that metabolically active adipose tissue in the neck of adult humans truly represents brown adipose tissue.*
  - ✚