UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI MESSINA

DIPARTIMENTO DI SCIENZE VETERINARIE

CORSO DI DOTTORATO IN SCIENZE VETERINARIE, BIOTECNOLOGICHE E AGRARIE

XXXVIII CICLO

Curriculum Scienze Cliniche Veterinarie

Coordinatore: Chiar.ma Prof.ssa CRISTINA CRAVANA

MVET-04/A BIOS-07/A



FISIOPATOLOGIA DEGLI INTERFERENTI ENDOCRINI EMERGENTI IN OTTICA ONE HEALTH: MECCANISMI MOLECOLARI DI STRESS OSSIDATIVO E INFIAMMAZIONE INDOTTI DAL DIETIL FTALATO NELL'ASSE EPATO-RENALE

Candidato:

DOTT. FRANCESCO MOLINARI

Relatore

Ch.ma Prof.ssa

ROSALIA CRUPI

Co-Relatore

Ch.ma Prof.ssa

ROSANNA DI PAOLA

ANNO ACCADEMICO 2025/2026

PNRR - Missione 4, Componente 2, Investimento 1.5 - D.D. 3277 del 30.12.2021- Avviso pubblico per la presentazione di Proposte di intervento per la creazione e il rafforzamento di "ecosistemi dell'innovazione", costruzione di "leader territoriali di R&S" – Ecosistemi dell'Innovazione
Progetto SAMOTHRACE - Sicilian MicronanoTech Research And Innovation Center
CUP J43C22000310006 - codice identificativo ECS00000022

Il lavoro di ricerca descritto nella presente tesi è stato reso possibile grazie al supporto finanziario fornito dalla **SAMOTHRACE Foundation**, nell'ambito del **PNRR – Missione 4, Componente 2, Investimento 1.5 – Sicilian MicronanoTech Research and Innovation Center – SAMOTHRACE – ECS 00000022**.

INDICE

ABSTRACT *7*

INTERFERENTI ENDOCRINI *8*

1.1. DEFINIZIONI E ASPETTI GENERALI **8**

1.2. CATEGORIE DI EDCS **11**

1.3. DISTRIBUZIONE AMBIENTALE DEGLI EDCS **13**

1.4. ESPOSIZIONE UMANA AGLI EDCS **15**

EFFETTI DEGLI INTERFERENTI ENDOCRINI *18*

2.1. ALTERAZIONI DELLA SEGNALAZIONE ENDOCRINA **18**

2.2. EFFETTI SUL METABOLISMO E OMEOSTASI ENERGETICA **21**

2.3. STRESS OSSIDATIVO E DANNO CELLULARE **24**

2.4. INFIAMMAZIONE **27**

2.5. EPIGENETICA **30**

2.6. INFLAMMASOMA E RISPOSTA INFIAMMATORIA INNATA **32**

2.7. EFFETTI ORGANO-SPECIFICI **36**

2.7.1. FEGATO 37

2.7.2. RENE 40

2.7.3. ASSE FEGATO–RENE NELLA TOSSICITÀ DA INTERFERENTI ENDOCRINI 42

2.7.4. IMPLICAZIONI FISIOPATOLOGICHE DEGLI EFFETTI ORGANO-SPECIFICI 44

FTALATI COME INTERFERENTI ENDOCRINI EMERGENTI *45*

3.1. CARATTERISTICHE E CLASSIFICAZIONE **45**

3.2. ESPOSIZIONE E DIFFUSIONE **47**

3.2.1. DINAMICHE DI TRASFERIMENTO DEI FTALATI NELLA FILIERA AGROALIMENTARE 49

3.3. TOSSICOCINETICA **52**

3.4. MECCANISMI D'AZIONE **54**

3.5. EFFETTI BIOLOGICI **57**

3.6. LOW-MW FTALATI **59**

3.7. DIETIL FTALATO **61**

3.8. APPROCCI SPERIMENTALI INTEGRATI PER LO STUDIO DELLA TOSSICITÀ DEGLI FTALATI 64

SCOPO DELLA TESI ***68***

MATERIALI E METODI ***70***

4.1 DISEGNO SPERIMENTALE GENERALE **70**

4.2 STUDIO IN VITRO **71**

4.2.1 COLTURA DELLE CELLULE HEPG2 71

4.2.2 COLTURA DELLE CELLULE HEK-293 72

4.2.3 ESPOSIZIONE CELLULARE AL DIETIL FTALATO 73

4.2.4 SAGGIO DI VITALITÀ CELLULARE (MTT) 74

4.2.5 PRODUZIONE DI ROS 75

4.2.5.1 ANALISI CITOFLUORIMETRICA DELLA PRODUZIONE DI ROS 76

4.2.6 VALUTAZIONE DEI MARKER INFIAMMATORI MEDIANTE ELISA 77

4.2.7 VALUTAZIONE STATISTICA 78

4.3 STUDIO IN VIVO **79**

4.3.1 ANIMALI E CONDIZIONI SPERIMENTALI 79

4.3.2 ESPOSIZIONE A DIETIL FTALATO 80

4.3.3 GRUPPI SPERIMENTALI 81

4.3.4 RACCOLTA E PREPARAZIONE DEI CAMPIONI 81

4.3.5 ANALISI MORFOLOGICA E ISTOPATOLOGICA DEI TESSUTI EPATICI E RENALI 82

4.3.6 VALUTAZIONE DELLA FIBROSI MEDIANTE COLORAZIONE TRICROMICA DI MASSON 84

4.3.7 ANALISI IMMUNOISTOCHIMICA 86

4.3.8 VALUTAZIONE DELL'APOPTOSI MEDIANTE TUNEL ASSAY 87

4.3.9 VALUTAZIONE STATISTICA 87

RISULTATI **88**

5.1 RISULTATI DEGLI STUDI IN VITRO **88**

5.1.1 VALUTAZIONE DEGLI EFFETTI DEL DEP SULLE CELLULE HEPG2 88

5.1.1.1 EFFETTI DEL DEP SULLA VITALITÀ CELLULARE DELLE CELLULE HEPG2 89

5.1.1.2 VALUTAZIONE DELLA PRODUZIONE INTRACELLULARE DI ROS NELLE CELLULE HEPG2 91

5.1.1.3 ANALISI CITOFLUORIMETRICA DELLA PRODUZIONE DI ROS NELLE CELLULE HEPG2 94

5.1.1.4 VALUTAZIONE DELLA RISPOSTA INFIAMMATORIA NELLE CELLULE HEPG2 MEDIANTE ELISA 97

5.1.2 VALUTAZIONE DEGLI EFFETTI DEL DEP SULLE CELLULE HEK-293 101

5.1.2.1 Effetti del DEP sulla vitalità cellulare delle cellule HEK-293 101

5.1.2.2 VALUTAZIONE DELLA PRODUZIONE INTRACELLULARE DI ROS NELLE CELLULE HEK-293 103

5.1.2.3 Analisi citofluorimetrica della produzione di ROS nelle cellule HEK-293 106
5.1.2.4 Valutazione della risposta infiammatoria nelle cellule HEK-293 mediante ELISA 109

5.2 Risultati degli studi in vivo 112
5.2.1 Valutazione degli effetti del DEP sul tessuto epatico 112
5.2.1.1 Analisi istopatologica del fegato mediante colorazione Ematossilina/Eosina 113
5.2.1.2 Valutazione della fibrosi epatica mediante colorazione Tricromica di Masson 115
5.2.1.3 Valutazione dell'apoptosi epatica mediante TUNEL assay 117
5.2.1.4 Analisi immunoistochimica nel tessuto epatico 119
5.2.1.4.1 Valutazione dei marker apoptotici BAX e Bcl-2 120
5.2.1.4.2 Valutazione del pathway dell'inflammasoma 122
5.2.2 Valutazione degli effetti del DEP sul tessuto renale 124
5.2.2.1 Analisi istopatologica del rene mediante colorazione Ematossilina/Eosina 124
5.2.2.2 Valutazione della fibrosi renale mediante colorazione Tricromica di Masson 126
5.2.2.3 Valutazione dell'apoptosi renale mediante TUNEL assay 128
5.2.2.4 Analisi immunoistochimica nel tessuto renale 130
5.2.2.4.1 Valutazione dei marker apoptotici BAX e Bcl-2 130
5.2.2.4.2 Valutazione del pathway dell'inflammasoma 132

Discussione *135*

Indice delle figure *149*

Bibliografia ..... *I*

ABSTRACT

Gli interferenti endocrini emergenti rappresentano una classe eterogenea di contaminanti ambientali in grado di interferire con processi biologici essenziali attraverso meccanismi complessi e multifattoriali. Tra questi, i ftalati costituiscono un gruppo di composti ampiamente impiegati in prodotti di consumo, materiali plastici, cosmetici e formulazioni industriali, contribuendo in modo significativo all'esposizione umana e ambientale. Il Dietil Ftalato (DEP), ftalato a catena corta frequentemente rilevato in matrici ambientali e biologiche, è generalmente considerato meno persistente rispetto ai ftalati ad alto peso molecolare. Tuttavia, la sua ampia diffusione, la possibilità di esposizione ripetuta e la crescente evidenza di effetti biologici associati anche a composti ritenuti a minore impatto tossicologico rendono necessaria una più approfondita caratterizzazione dei suoi potenziali meccanismi di tossicità.

La presente tesi ha avuto l'obiettivo di valutare gli effetti del DEP sull'asse epato-renale, con particolare attenzione ai processi di stress ossidativo, infiammazione, apoptosi e attivazione dell'inflammasoma. A tale scopo è stato adottato un approccio sperimentale integrato, combinando analisi in vivo su tessuti epatici e renali con studi in vitro condotti su cellule HepG2 e HEK-293, utilizzate rispettivamente come modelli cellulari epatico e renale. Questa strategia ha consentito di mettere in relazione le alterazioni osservate a livello tissutale con specifiche risposte cellulari e molecolari, fornendo una visione complessiva dei meccanismi attraverso cui il DEP può influenzare l'omeostasi dell'asse fegato-rene.

Nel complesso, i dati ottenuti indicano che il DEP è in grado di interferire con l'omeostasi epato-renale attraverso meccanismi convergenti che coinvolgono stress ossidativo, risposta infiammatoria, apoptosi e attivazione di pathway associati all'inflammasoma. L'integrazione dei risultati in vitro e in vivo suggerisce che lo stress ossidativo possa rappresentare un evento centrale nella tossicità indotta dal DEP, contribuendo alla modulazione della risposta infiammatoria e alla progressione del danno cellulare e tissutale. Questi risultati ampliano la conoscenza sugli effetti biologici dei ftalati a catena corta e sottolineano l'importanza di includere endpoint molecolari e cellulari sensibili nella valutazione tossicologica degli interferenti endocrini emergenti. Inoltre, il coinvolgimento dell'asse epato-renale evidenzia la necessità di considerare fegato e rene come compartimenti funzionalmente interconnessi nella risposta agli xenobiotici, soprattutto in relazione a contaminanti ambientali ampiamente diffusi e potenzialmente associati a esposizioni ripetute.

CAPITOLO 1:

INTERFERENTI ENDOCRINI

1.1. DEFINIZIONI E ASPETTI GENERALI

Nel corso degli ultimi decenni, l'intensificazione delle attività antropiche e il rapido sviluppo delle tecnologie chimiche hanno determinato una trasformazione profonda degli equilibri ambientali, accompagnata da un incremento significativo della produzione, dell'utilizzo e della dispersione di sostanze chimiche nei diversi comparti ecosistemici [1]. Questo processo ha condotto a una crescente contaminazione diffusa, spesso caratterizzata da basse concentrazioni ma da esposizioni prolungate nel tempo, delineando un nuovo scenario per la tossicologia ambientale e la salute pubblica [2].

In tale contesto si inserisce il concetto di interferenti endocrini (endocrine disrupting chemicals, EDCs), una classe di composti di particolare rilevanza per la loro capacità di alterare sistemi biologici altamente regolati attraverso meccanismi che non si limitano alla tossicità diretta, ma coinvolgono la modulazione fine dei segnali fisiologici [3]. Un interferente endocrino è generalmente definito come una sostanza esogena o una miscela in grado di modificare la funzione del sistema endocrino e di determinare effetti avversi sull'organismo, sulla sua progenie o su una popolazione [4].

Il sistema endocrino rappresenta una rete complessa di ghiandole, ormoni e recettori, deputata alla regolazione di numerosi processi fisiologici, tra cui crescita, sviluppo, metabolismo energetico, riproduzione e risposta allo stress [5, 6]. La sua caratteristica distintiva è l'elevata sensibilità a variazioni anche minime della concentrazione ormonale, nonché la stretta integrazione con altri sistemi di regolazione, in particolare quello nervoso e immunitario [7]. In questo contesto, gli EDCs possono essere considerati perturbatori della comunicazione intercellulare, in grado di alterare l'omeostasi attraverso l'interferenza con segnali endocrini altamente specifici [8].

I meccanismi d'azione degli interferenti endocrini sono molteplici e spesso interconnessi. Essi includono l'agonismo o l'antagonismo dei recettori ormonali, l'interferenza con la sintesi e la secrezione degli ormoni, la modulazione delle proteine di trasporto plasmatico e l'alterazione

dei processi di metabolismo e clearance degli ormoni stessi [9, 10]. A livello molecolare, tali effetti possono tradursi in variazioni dell'espressione genica, attraverso l'attivazione o l'inibizione di fattori di trascrizione sensibili agli ormoni, con conseguenze che si estendono ben oltre il singolo bersaglio cellulare [11].

Un aspetto particolarmente rilevante è rappresentato dalla capacità degli EDCs di interagire con i sistemi di biotrasformazione degli xenobiotici [12]. In particolare, enzimi epatici coinvolti nelle reazioni di fase I e fase II possono essere modulati da questi composti, determinando alterazioni sia nel metabolismo degli EDCs stessi sia in quello di altri composti endogeni ed esogeni, inclusi gli ormoni [13]. Questo introduce una dimensione ulteriore di complessità, in cui l'interferenza endocrina si intreccia con la regolazione metabolica sistemica.

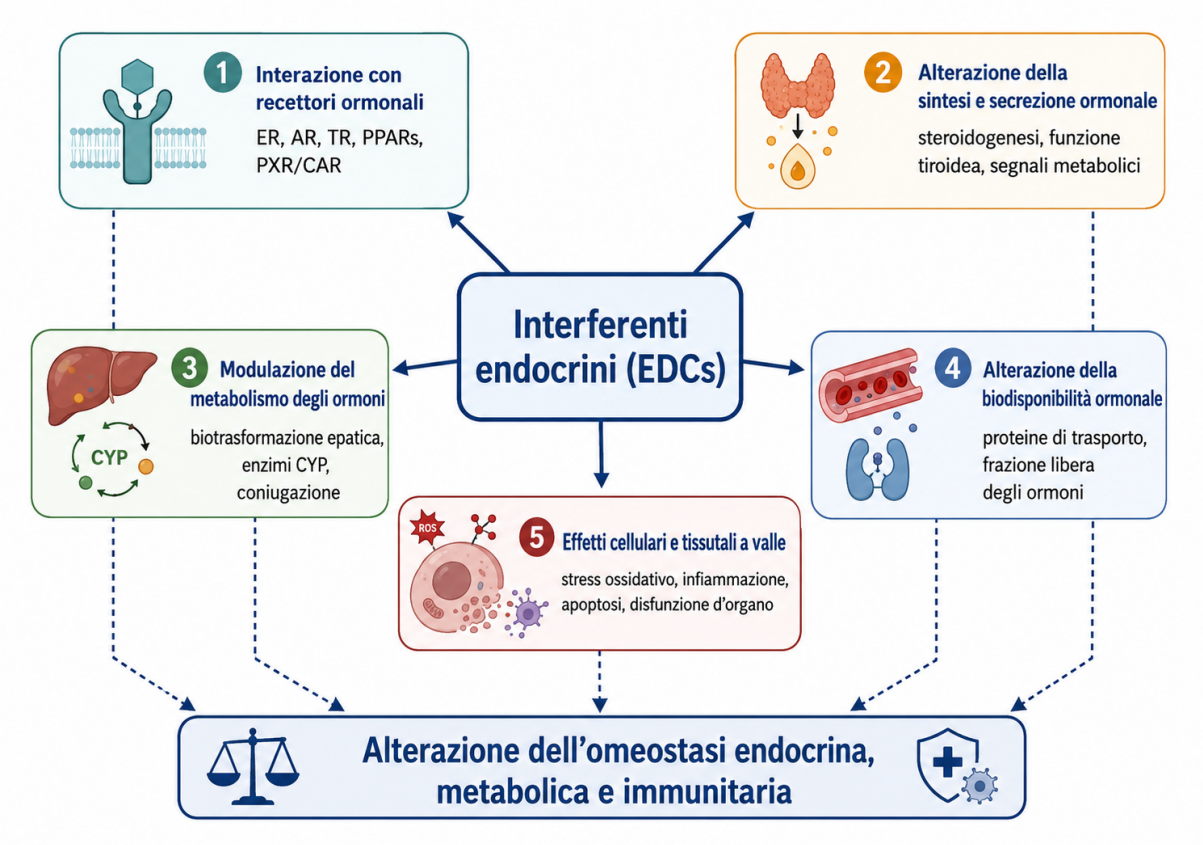


Figura 1 Meccanismi generali di interferenza endocrina indotti dagli EDCs. Gli interferenti endocrini possono alterare l'omeostasi biologica attraverso molteplici meccanismi, tra cui l'interazione con recettori ormonali, la modulazione della sintesi, secrezione, trasporto e metabolismo degli ormoni, nonché l'interferenza con pathways cellulari coinvolti nella risposta allo stress. Tali alterazioni possono tradursi in effetti sistemici che interessano metabolismo, risposta infiammatoria, stato redox e funzionalità degli organi bersaglio.

Dal punto di vista tossicologico, gli EDCs si distinguono per la presenza di relazioni dose–risposta non monotone, che riflettono la natura altamente regolata del sistema endocrino [14]. In tali condizioni, basse dosi possono attivare specifici pathway di segnalazione che risultano inattivi o saturati a concentrazioni più elevate, generando effetti qualitativamente diversi [2]. Questo comportamento mette in discussione i modelli tradizionali di valutazione del rischio, basati sull'assunzione che l'effetto aumenti proporzionalmente alla dose.

Un ulteriore elemento distintivo è rappresentato dalla dipendenza temporale degli effetti. Il sistema endocrino è strettamente legato a ritmi circadiani e a finestre critiche dello sviluppo, durante le quali l'organismo risulta particolarmente sensibile a perturbazioni esterne [15, 16]. L'esposizione in queste fasi può determinare effetti persistenti o permanenti attraverso meccanismi di programmazione biologica [17]. In questo contesto, i processi epigenetici assumono un ruolo centrale, consentendo la modulazione stabile dell'espressione genica senza alterazioni della sequenza del DNA e contribuendo potenzialmente alla trasmissione intergenerazionale degli effetti [18].

Nel loro complesso, queste caratteristiche delineano gli interferenti endocrini come una categoria di contaminanti che agisce attraverso meccanismi sottili ma profondamente integrati nella fisiologia dell'organismo [19]. Piuttosto che indurre un danno immediato e facilmente rilevabile, gli EDCs possono determinare alterazioni progressive e multifattoriali, che coinvolgono l'interazione tra segnali endocrini, metabolismo e risposta adattativa agli stimoli ambientali.

1.2. CATEGORIE DI EDCS

Gli interferenti endocrini costituiscono una classe estremamente eterogenea di composti, la cui classificazione non può essere ricondotta a un singolo criterio, ma richiede un approccio integrato che consideri origine, struttura chimica, proprietà fisico-chimiche, comportamento ambientale e meccanismi di azione biologica [20]. Questa eterogeneità rappresenta una delle principali difficoltà nella loro caratterizzazione, ma al contempo riflette la complessità delle interazioni tra contaminanti ambientali e sistemi biologici [21].

Un primo livello di classificazione distingue gli EDCs in base alla loro origine, separando composti naturali e composti di sintesi. I primi includono sostanze come i fitoestrogeni e alcune micotossine, che interagiscono con il sistema endocrino come parte delle loro funzioni biologiche intrinseche [22, 23]. Tuttavia, è soprattutto con i composti di sintesi che emerge la rilevanza tossicologica degli EDCs, in quanto la loro produzione su larga scala e il loro impiego diffuso hanno determinato una presenza ubiquitaria nell'ambiente [24]. Tra gli EDCs di origine antropica rientrano numerose classi di composti utilizzati in ambito industriale, agricolo e domestico [25]. Tra questi, un ruolo centrale è occupato dai plastificanti, come gli ftalati, impiegati per conferire flessibilità ai materiali polimerici; dai monomeri e additivi plastici, come i bisfenoli; dai composti perfluoroalchilici, caratterizzati da elevata stabilità chimica; dai pesticidi e erbicidi utilizzati in agricoltura; dai ritardanti di fiamma impiegati nei materiali elettronici e tessili; e dai contaminanti organici persistenti, quali policlorobifenili e diossine [26]. Queste categorie, pur distinte per struttura e utilizzo, condividono la capacità di interferire con sistemi endocrini attraverso meccanismi spesso convergenti.

Un secondo livello di classificazione riguarda le proprietà chimico-fisiche dei composti, in particolare lipofilia, solubilità e stabilità [27]. La lipofilia rappresenta un determinante importante del comportamento biologico degli EDCs, influenzando la capacità di attraversare le membrane cellulari, accumularsi nei tessuti e distribuirsi nell'organismo [28]. I composti altamente lipofili tendono a concentrarsi nel tessuto adiposo e a presentare una lunga emivita biologica, mentre quelli più idrofili risultano generalmente più rapidamente eliminati, ma possono comunque determinare esposizioni continue a causa della loro presenza diffusa [29].

Queste caratteristiche si riflettono direttamente sulla tossicocinetica degli EDCs, ovvero sui processi di assorbimento, distribuzione, metabolismo ed escrezione [30]. In particolare, la biotrasformazione epatica gioca un ruolo fondamentale nel determinare la forma attiva del

composto, attraverso reazioni di ossidazione, riduzione e coniugazione [31]. È importante sottolineare che tali processi non conducono necessariamente a una detossificazione completa: in alcuni casi, i metaboliti prodotti possono mantenere o addirittura amplificare l'attività endocrina [32]. Successivamente, i metaboliti idrosolubili vengono eliminati principalmente per via renale, rendendo il rene un organo chiave nella regolazione dell'esposizione sistemica [33].

Un ulteriore criterio di classificazione riguarda la persistenza ambientale [34]. I composti persistenti, spesso caratterizzati da elevata stabilità chimica e resistenza alla degradazione, possono permanere nell'ambiente per lunghi periodi, accumularsi negli organismi viventi e biomagnificarsi lungo la catena alimentare [35]. Al contrario, i composti non persistenti presentano una rapida degradazione e una breve emivita biologica, ma la loro continua introduzione nell'ambiente e nei prodotti di consumo determina una esposizione cronica apparentemente "continua" [36]. Dal punto di vista funzionale, gli EDCs possono essere classificati in base ai sistemi endocrini bersaglio, includendo modulatori dei recettori estrogenici, androgenici, tiroidei, glucocorticoidi e di altri assi ormonali [20]. Tuttavia, questa classificazione risulta spesso limitata, poiché molti EDCs esercitano effetti pleiotropici, interferendo simultaneamente con più pathway di segnalazione [37]. Inoltre, alcuni composti sono in grado di modulare indirettamente l'attività endocrina attraverso l'interferenza con il metabolismo energetico, la funzione epatica o i sistemi di detossificazione [38].

Negli ultimi anni, è emersa con crescente evidenza la necessità di considerare gli EDCs all'interno di un contesto di esposizione combinata [39]. Piuttosto che agire come singoli agenti isolati, questi composti sono spesso presenti in miscele complesse, nelle quali le interazioni tra i diversi componenti possono determinare effetti additivi, sinergici o antagonisti [40]. Questo approccio, noto come "mixture toxicology", rappresenta una delle principali sfide per la ricerca contemporanea, in quanto richiede modelli sperimentali e strumenti analitici in grado di catturare la complessità delle esposizioni reali [41]. Nel loro insieme, queste diverse modalità di classificazione evidenziano come gli interferenti endocrini non possano essere considerati una categoria uniforme, ma piuttosto un insieme dinamico di composti caratterizzati da proprietà e meccanismi d'azione eterogenei [20]. La comprensione di tale eterogeneità è fondamentale per interpretare correttamente i loro effetti biologici e per identificare specifiche classi di composti meritevoli di approfondimento, in relazione sia alla loro diffusione sia al loro potenziale impatto sulla salute umana [42].

1.3. DISTRIBUZIONE AMBIENTALE DEGLI EDCS

La distribuzione ambientale degli interferenti endocrini rappresenta un processo dinamico e complesso, che coinvolge emissione, trasporto, trasformazione e accumulo nei diversi comparti ecosistemici [43]. A differenza di molti contaminanti tradizionali, gli EDCs non sono confinati a specifiche matrici ambientali, ma mostrano una diffusione ubiquitaria, risultando rilevabili in aria, acqua, suolo e biota, spesso a concentrazioni basse ma biologicamente rilevanti [44].

Le principali fonti di immissione degli EDCs nell'ambiente includono attività industriali, pratiche agricole, scarichi urbani e rilascio da prodotti di consumo durante il loro ciclo di vita [45]. In particolare, materiali plastici, cosmetici, prodotti per la cura personale e dispositivi elettronici rappresentano sorgenti diffuse e continue di contaminazione, contribuendo a un flusso costante di composti nell'ambiente [46].

Una volta rilasciati, gli EDCs sono soggetti a processi di trasporto e redistribuzione che ne determinano la presenza nei diversi comparti ambientali [44]. Nel comparto acquatico, essi derivano principalmente da effluenti di impianti di trattamento delle acque reflue, che spesso non sono progettati per rimuovere efficacemente queste sostanze [47]. Di conseguenza, fiumi, laghi e acque costiere rappresentano importanti serbatoi di EDCs, dai quali possono essere assorbiti da organismi acquatici e successivamente trasferiti lungo la catena alimentare [48].

Nel suolo, gli interferenti endocrini si accumulano attraverso l'applicazione di pesticidi, fertilizzanti e fanghi di depurazione, oltre che tramite deposizione atmosferica [49]. La matrice suolo svolge un ruolo chiave come comparto di accumulo e rilascio secondario, in quanto può trattenere i contaminanti e rilasciarli gradualmente verso acque superficiali e sotterranee [50].

L'atmosfera, sebbene spesso considerata un comparto secondario, rappresenta un vettore fondamentale per il trasporto a lunga distanza degli EDCs [51]. Composti volatili o associati al particolato atmosferico possono essere dispersi su scala globale, raggiungendo regioni remote e contribuendo alla contaminazione di ecosistemi apparentemente incontaminati [52]. Questo fenomeno evidenzia la natura transfrontaliera della contaminazione da EDCs e la difficoltà di limitarne la diffusione attraverso interventi localizzati.

Un aspetto importante della distribuzione ambientale è rappresentato dai processi di trasformazione chimica e biologica. Gli EDCs possono subire degradazione abiotica, come

fotolisi e ossidazione, o trasformazioni biotiche mediate da microrganismi [53]. Tuttavia, tali processi non determinano necessariamente una perdita di attività biologica: in molti casi, i metaboliti ambientali conservano proprietà endocrine o acquisiscono nuove caratteristiche di interazione con i sistemi biologici [54]. Questo implica che la valutazione del rischio non può limitarsi ai composti parentali, ma deve includere anche i prodotti di trasformazione.

La capacità di bioaccumulo rappresenta un ulteriore elemento chiave nella dinamica ambientale degli EDCs [44]. I composti lipofili tendono ad accumularsi nei tessuti degli organismi viventi, in particolare nel tessuto adiposo, dove possono essere immagazzinati per lunghi periodi [55]. Questo accumulo può essere seguito da fenomeni di biomagnificazione lungo la catena alimentare, con un incremento progressivo delle concentrazioni nei livelli trofici superiori [56]. Di conseguenza, gli organismi apicali, inclusi gli esseri umani, risultano esposti a carichi complessivi più elevati rispetto all'ambiente circostante.

Oltre al bioaccumulo, è importante considerare i processi di bioaccessibilità e biodisponibilità, che determinano la frazione di contaminante effettivamente disponibile per l'assorbimento da parte degli organismi [57]. Questi processi dipendono da numerosi fattori, tra cui le proprietà chimico-fisiche del composto, le caratteristiche della matrice ambientale e le condizioni fisiologiche dell'organismo esposto [58].

Nel loro insieme, questi fenomeni delineano un ciclo continuo in cui gli EDCs vengono rilasciati nell'ambiente, trasportati e trasformati, accumulati negli organismi e, infine, reintrodotti nei comparti ambientali attraverso processi biologici ed escrezione [28]. Questa visione ciclica sottolinea come la distinzione tra ambiente e organismo sia in realtà sfumata, e come la contaminazione da interferenti endocrini rappresenti il risultato di una interazione dinamica tra sistemi ecologici e biologici [48, 59].

Alla luce di queste considerazioni, la distribuzione ambientale degli EDCs non può essere interpretata come un fenomeno statico, ma deve essere considerata come un processo integrato, in cui mobilità, trasformazione e accumulo contribuiscono a determinare l'esposizione reale degli organismi [60, 61]. Tale prospettiva risulta fondamentale per comprendere le modalità attraverso cui questi composti raggiungono l'organismo umano e interagiscono con i sistemi fisiologici, ponendo le basi per l'analisi dei meccanismi di esposizione e degli effetti biologici.

1.4. ESPOSIZIONE UMANA AGLI EDCS

L'esposizione umana agli interferenti endocrini rappresenta un fenomeno continuo, complesso e multifattoriale, derivante dall'interazione tra ambiente, dieta, stile di vita e utilizzo di prodotti di consumo [62]. A differenza di altre forme di contaminazione, essa non è generalmente riconducibile a singoli eventi acuti, ma si configura come una esposizione cronica a basse dosi, spesso caratterizzata dalla contemporanea presenza di molteplici composti [63].

Le principali vie di ingresso degli EDCs nell'organismo includono ingestione, inalazione e assorbimento dermico [64]. La via alimentare costituisce una delle fonti più rilevanti, in quanto riflette direttamente i fenomeni di bioaccumulo e biomagnificazione lungo la catena trofica [65]. Alimenti di origine animale e vegetale possono contenere residui di contaminanti ambientali, mentre materiali a contatto con gli alimenti possono rappresentare una fonte aggiuntiva di esposizione [66]. Parallelamente, l'ambiente indoor contribuisce in maniera significativa all'esposizione, attraverso il rilascio di composti da materiali plastici, rivestimenti, arredi e prodotti per la cura personale [67]. L'inalazione di particolato e composti volatili, così come l'assorbimento attraverso la cute, rappresentano ulteriori vie di ingresso, spesso sottostimate ma rilevanti nel contesto dell'esposizione quotidiana [68].

Una volta entrati nell'organismo, gli EDCs seguono percorsi complessi di assorbimento e distribuzione, determinati dalle loro proprietà chimico-fisiche [69]. I composti lipofili tendono ad attraversare facilmente le membrane biologiche e a distribuirsi nei tessuti ricchi in lipidi, mentre quelli più idrofili rimangono prevalentemente nel compartimento ematico e vengono eliminati più rapidamente [70]. Tuttavia, anche composti apparentemente non persistenti possono determinare una esposizione sistemica significativa, a causa della loro continua introduzione nell'organismo.

Il destino biologico degli EDCs è fortemente influenzato dai processi di biotrasformazione, che avvengono prevalentemente a livello epatico [71]. Il fegato rappresenta il principale organo deputato al metabolismo degli xenobiotici, attraverso un sistema enzimatico altamente specializzato che comprende reazioni di fase I, volte a introdurre o esporre gruppi funzionali reattivi, e reazioni di fase II, che ne aumentano la solubilità mediante coniugazione con molecole endogene [72]. Questi processi, sebbene generalmente finalizzati alla detossificazione, possono generare metaboliti biologicamente attivi o reattivi, in grado di contribuire agli effetti tossici complessivi [73].

Nel caso degli interferenti endocrini, la biotrasformazione assume un ruolo particolarmente critico, in quanto può modulare l'attività endocrina del composto [71]. Alcuni metaboliti possono presentare affinità recettoriale diversa rispetto al composto parentale, mentre altri possono interferire con enzimi coinvolti nel metabolismo degli ormoni endogeni, alterando indirettamente l'equilibrio endocrino [74, 75]. Inoltre, gli EDCs stessi possono modulare l'espressione e l'attività degli enzimi epatici, introducendo meccanismi di auto-regolazione o di interazione con altri xenobiotici [76].

Successivamente alla biotrasformazione, i composti e i loro metaboliti vengono eliminati principalmente attraverso il rene [77]. L'escrezione renale rappresenta una fase importante nella regolazione dell'esposizione sistemica, in quanto determina la durata di permanenza dei contaminanti nell'organismo [78]. I processi di filtrazione glomerulare, secrezione tubulare e riassorbimento contribuiscono in maniera coordinata alla clearance dei composti idrosolubili [79].

Tuttavia, l'esposizione cronica agli EDCs può influenzare la funzione renale sia direttamente, attraverso effetti sulle cellule tubulari e sull'integrità della barriera glomerulare, sia indirettamente, mediante alterazioni sistemiche del metabolismo e dell'omeostasi endocrina. In questo senso, il rene non rappresenta soltanto un organo di eliminazione, ma un elemento attivo nella risposta dell'organismo alla presenza di contaminanti [80, 81].

Un ulteriore livello di complessità è rappresentato dall'esposizione a miscele di composti, che riflette condizioni realistiche e introduce dinamiche di interazione difficilmente prevedibili [82]. Gli effetti combinati possono essere additivi, sinergici o antagonisti, e dipendono non solo dalle proprietà dei singoli composti, ma anche dalla loro concentrazione relativa, dalla tempistica di esposizione e dalla suscettibilità dell'organismo [83].

La risposta individuale agli EDCs è infatti modulata da una serie di fattori, tra cui variabilità genetica, stato fisiologico, età e condizioni ambientali [84]. In particolare, differenze nell'espressione degli enzimi metabolici e nei meccanismi di escrezione possono determinare variazioni significative nella biodisponibilità e negli effetti biologici dei contaminanti [85].

Nel loro complesso, i processi di assorbimento, distribuzione, metabolismo ed escrezione definiscono il profilo di esposizione interna agli interferenti endocrini, che rappresenta il determinante principale degli effetti biologici osservati [86]. In questo contesto, il fegato e il

rene emergono come nodi centrali nella regolazione dell'interazione tra organismo e ambiente, mediando sia la trasformazione sia l'eliminazione dei contaminanti. Questa prospettiva integrata consente di interpretare l'esposizione agli EDCs non come un evento isolato, ma come un processo dinamico e continuo, in cui la relazione tra ambiente e organismo è modulata da sistemi fisiologici complessi [87, 88].

In questo contesto, la comprensione dei meccanismi che regolano l'interazione tra interferenti endocrini e sistemi di biotrasformazione rappresenta un passaggio importante per identificare i composti maggiormente rilevanti dal punto di vista tossicologico. In particolare, risulta di crescente interesse approfondire il ruolo di specifiche classi di contaminanti ampiamente diffuse, ma ancora non completamente caratterizzate, al fine di chiarire come l'esposizione cronica possa tradursi in alterazioni funzionali e strutturali a livello degli organi bersaglio.

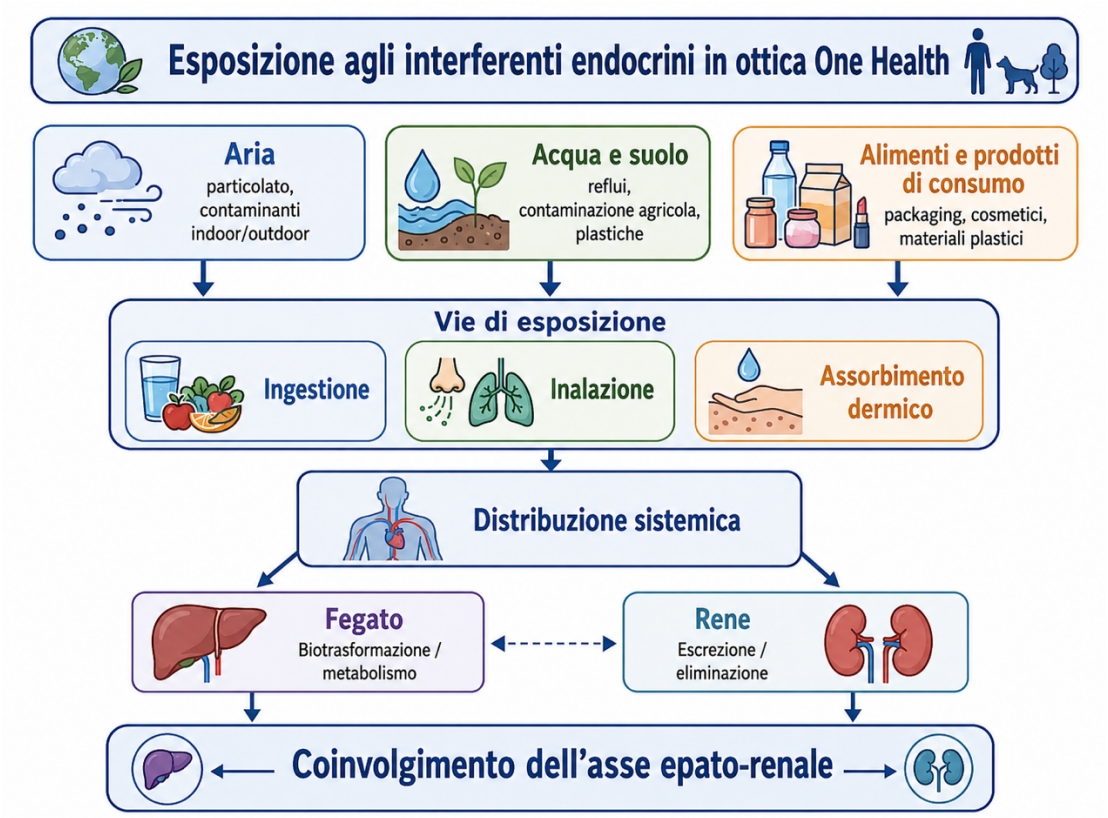


Figura 2 Principali vie di esposizione umana agli EDCs in una prospettiva One Health. *Gli interferenti endocrini possono raggiungere l'organismo attraverso matrici ambientali e fonti di esposizione quotidiana, inclusi aria, acqua, suolo, alimenti, materiali plastici, cosmetici e prodotti di consumo. Le principali vie di ingresso comprendono ingestione, inalazione e assorbimento dermico. Dopo l'assorbimento, questi composti possono distribuirsi a livello sistemico e coinvolgere organi centrali nella gestione degli xenobiotici, quali fegato e rene, rispettivamente implicati nei processi di biotrasformazione ed eliminazione.*

CAPITOLO 2:

EFFETTI DEGLI INTERFERENTI ENDOCRINI

2.1. ALTERAZIONI DELLA SEGNALAZIONE ENDOCRINA

Gli interferenti endocrini esercitano i loro effetti biologici principalmente attraverso l'alterazione dei meccanismi di segnalazione endocrina, interferendo con sistemi di regolazione altamente specifici e finemente modulati [89]. A differenza di molti agenti tossici tradizionali, la cui azione si basa prevalentemente su effetti citotossici diretti, gli EDCs agiscono modulando processi fisiologici già esistenti, alterando l'equilibrio tra segnali ormonali e risposta cellulare [76]. Questa caratteristica conferisce alla loro azione una natura particolarmente complessa, in quanto gli effetti non derivano necessariamente da un danno immediato, ma da una perturbazione progressiva dei sistemi di regolazione.

Uno dei principali meccanismi attraverso cui gli interferenti endocrini esplicano la loro azione è rappresentato dall'interazione con i recettori ormonali. Numerosi EDCs sono in grado di legarsi ai recettori nucleari, come i recettori degli estrogeni (ERα e ERβ), degli androgeni (AR) e degli ormoni tiroidei (TR), agendo come agonisti o antagonisti [90]. Ad esempio, alcuni composti plastici e pesticidi possono mimare l'azione degli estrogeni, attivando il recettore estrogenico e inducendo una risposta trascrizionale anche in assenza dell'ormone endogeno. Al contrario, altri composti possono bloccare il legame degli androgeni al loro recettore, inibendo la segnalazione fisiologica. Questo duplice comportamento, agonista o antagonista, dipende spesso dalla struttura chimica del composto e dal contesto cellulare in cui avviene l'interazione [91].

Oltre ai recettori classici, numerosi interferenti endocrini sono in grado di interagire con altri recettori nucleari coinvolti nella regolazione metabolica, come i recettori attivati dai proliferatori dei perossisomi (PPARs), i recettori X del fegato (LXR) e i recettori pregnano X (PXR) [92]. L'attivazione di questi recettori può determinare alterazioni significative nell'espressione di geni coinvolti nel metabolismo lipidico, nella detossificazione e nella risposta allo stress. Questo aspetto è particolarmente rilevante, in quanto evidenzia come gli EDCs possano agire non solo come perturbatori endocrini in senso stretto, ma anche come modulatori del metabolismo cellulare e sistemico [93].

Un ulteriore meccanismo di azione riguarda l'interferenza con la sintesi e la secrezione degli ormoni. Gli EDCs possono modulare l'attività di enzimi chiave coinvolti nella steroidogenesi, come l'aromatasi (CYP19), responsabile della conversione degli androgeni in estrogeni, o la 5α-reduttasi, implicata nella conversione del testosterone in diidrotestosterone [94]. Alterazioni dell'attività di questi enzimi possono determinare squilibri nei livelli ormonali circolanti, con effetti che si riflettono su numerosi sistemi fisiologici. Analogamente, alcuni interferenti endocrini possono influenzare la funzione della tiroide, alterando la sintesi e il rilascio degli ormoni tiroidei o interferendo con il loro trasporto e metabolismo [95].

La regolazione della biodisponibilità ormonale rappresenta un ulteriore livello di interferenza. Gli ormoni circolanti sono in gran parte legati a proteine plasmatiche, come la sex hormone-binding globulin (SHBG) o la transtiretina per gli ormoni tiroidei. Gli EDCs possono competere con gli ormoni per il legame a queste proteine, modificando la frazione libera e biologicamente attiva. Questo fenomeno può determinare variazioni significative nella disponibilità ormonale a livello dei tessuti bersaglio, anche in assenza di variazioni nella concentrazione totale dell'ormone [96-98].

A livello intracellulare, l'attivazione dei recettori nucleari da parte degli EDCs si traduce in una modulazione dell'espressione genica [99]. Questi recettori, una volta attivati, si legano a specifiche sequenze del DNA, regolando la trascrizione di geni coinvolti in processi chiave quali proliferazione, differenziamento cellulare, metabolismo e risposta allo stress. Tuttavia, l'azione degli EDCs non si limita alla semplice attivazione o inibizione dei recettori, ma può coinvolgere anche l'interazione con co-attivatori e co-repressori trascrizionali, modificando ulteriormente la risposta genica [100]. Questo contribuisce alla variabilità degli effetti osservati nei diversi tessuti e condizioni sperimentali.

Un aspetto particolarmente rilevante è rappresentato dall'interferenza con i meccanismi di feedback endocrino. In condizioni fisiologiche, la secrezione ormonale è regolata da circuiti di retroazione negativa che consentono di mantenere l'omeostasi [101]. Gli EDCs possono alterare questi circuiti, inducendo risposte compensatorie che, nel lungo termine, possono risultare maladattative. Ad esempio, una riduzione apparente della segnalazione ormonale a livello recettoriale può indurre un aumento compensatorio della produzione ormonale, con effetti complessi sull'equilibrio sistemico [102].

La segnalazione endocrina è inoltre caratterizzata da una forte componente temporale, legata ai ritmi circadiani e alle variazioni fisiologiche dello sviluppo. Gli EDCs possono interferire con questi ritmi, alterando la sincronizzazione tra produzione ormonale e risposta dei tessuti bersaglio [103]. Questo aspetto è particolarmente critico durante le cosiddette "finestre di suscettibilità", come la vita prenatale, l'infanzia e la pubertà, durante le quali il sistema endocrino è particolarmente sensibile a perturbazioni esterne [104]. In queste fasi, l'esposizione agli EDCs può determinare effetti persistenti attraverso meccanismi di programmazione biologica.

Infine, è importante sottolineare come molti interferenti endocrini non agiscano attraverso un singolo meccanismo, ma attraverso una combinazione di effetti che coinvolgono simultaneamente più livelli della segnalazione endocrina. Questa azione pleiotropica, unita alla possibilità di esposizione a miscele di composti, contribuisce alla complessità degli effetti biologici osservati e rende particolarmente difficile l'identificazione di relazioni causali dirette [39].

Nel loro insieme, questi meccanismi evidenziano come gli interferenti endocrini agiscano come modulatori della segnalazione biologica, in grado di alterare in maniera sottile ma significativa l'equilibrio tra stimolo ormonale e risposta cellulare. Tale perturbazione rappresenta il punto di partenza per una serie di effetti a valle che coinvolgono metabolismo, stress ossidativo e risposta infiammatoria, ponendo le basi per l'insorgenza di alterazioni funzionali a livello cellulare e tissutale.

2.2. EFFETTI SUL METABOLISMO E OMEOSTASI ENERGETICA

L'interferenza degli EDCs con la segnalazione endocrina si traduce frequentemente in alterazioni del metabolismo energetico, evidenziando come questi composti non agiscano esclusivamente su singoli assi ormonali, ma possano influenzare in maniera integrata l'omeostasi dell'organismo [105]. Il metabolismo energetico è infatti regolato da una rete complessa di segnali endocrini, nutrizionali e cellulari, che coordinano l'utilizzo e lo stoccaggio dei substrati energetici in risposta alle esigenze fisiologiche. L'alterazione di tale equilibrio rappresenta uno dei principali meccanismi attraverso cui gli interferenti endocrini contribuiscono allo sviluppo di disfunzioni metaboliche [106].

Uno degli effetti più studiati riguarda la modulazione del metabolismo lipidico. Numerosi EDCs sono in grado di influenzare l'accumulo e la mobilizzazione dei lipidi, agendo sia a livello sistemico sia a livello cellulare [107]. In particolare, l'attivazione di recettori nucleari come i peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs), in particolare PPARγ, è stata associata a un aumento della differenziazione adipocitaria e all'accumulo di trigliceridi [108]. Questo fenomeno ha portato all'introduzione del concetto di "obesogens", ovvero sostanze chimiche in grado di promuovere lo sviluppo dell'obesità attraverso l'alterazione dei meccanismi di regolazione del metabolismo lipidico [109].

Parallelamente, gli EDCs possono interferire con il metabolismo glucidico, influenzando la sensibilità insulinica e la regolazione della glicemia [105]. Alcuni composti sono stati associati a una riduzione della risposta insulinica nei tessuti periferici, contribuendo allo sviluppo di insulino-resistenza, mentre altri possono alterare la secrezione di insulina a livello pancreatico [110, 111]. Queste alterazioni si inseriscono in un quadro più ampio di disfunzione metabolica, che può evolvere verso condizioni patologiche quali il diabete di tipo 2 [112].

Un ruolo centrale nella regolazione del metabolismo energetico è svolto dal fegato, che rappresenta il principale organo deputato alla sintesi, ossidazione e distribuzione dei lipidi, nonché alla regolazione del metabolismo glucidico [113]. In questo contesto, l'esposizione a EDCs può determinare una perturbazione dei processi metabolici epatici, favorendo l'accumulo di lipidi intracellulari e la comparsa di steatosi epatica [38]. Tale condizione è spesso il risultato di un disequilibrio tra sintesi e degradazione dei lipidi, che può essere indotto da alterazioni nella regolazione dei pathways metabolici e dell'espressione genica.

Accanto al fegato, anche il rene contribuisce in maniera significativa al mantenimento dell'omeostasi metabolica e alla gestione dei composti esogeni [114]. Sebbene tradizionalmente considerato principalmente come organo deputato all'escrezione, il rene partecipa attivamente alla regolazione del metabolismo attraverso processi di riassorbimento, secrezione e modulazione del bilancio energetico e ionico [115]. In condizioni di esposizione a interferenti endocrini, il tessuto renale può essere coinvolto sia direttamente, attraverso l'accumulo di metaboliti e l'esposizione a composti reattivi, sia indirettamente, come conseguenza delle alterazioni sistemiche del metabolismo [80].

In particolare, le cellule tubulari renali, caratterizzate da elevata attività metabolica e ricca dotazione mitocondriale, risultano particolarmente sensibili a variazioni dello stato redox e a condizioni di stress metabolico [116]. L'alterazione dei processi energetici e la produzione di specie reattive dell'ossigeno (ROS) possono quindi contribuire al danno cellulare anche a livello renale, suggerendo un possibile coinvolgimento di questo organo nei meccanismi di tossicità associati agli EDCs [117].

A livello molecolare, le alterazioni metaboliche indotte dagli EDCs sono frequentemente associate alla modulazione di fattori di trascrizione e recettori nucleari coinvolti nel metabolismo energetico, tra cui PPARα, PPARγ e sterol regulatory element-binding proteins (SREBPs) [118]. L'attivazione o l'inibizione di questi pathways può determinare cambiamenti nell'espressione di enzimi chiave della lipogenesi e della β-ossidazione, contribuendo all'accumulo di lipidi e alla disfunzione metabolica. Inoltre, l'interferenza con il metabolismo mitocondriale può compromettere l'efficienza della produzione energetica, favorendo ulteriormente l'accumulo di substrati metabolici [119].

Un ulteriore elemento di rilievo è rappresentato dall'interazione tra metabolismo e stato redox cellulare. L'alterazione dei processi metabolici può infatti determinare un aumento della produzione di specie reattive dell'ossigeno (ROS), contribuendo allo sviluppo di stress ossidativo [120]. Questo fenomeno rappresenta un punto di convergenza tra disfunzione metabolica e danno cellulare, in quanto l'accumulo di ROS può a sua volta compromettere ulteriormente le funzioni metaboliche, instaurando un circolo vizioso [121].

Nel contesto degli EDCs, è importante sottolineare come tali effetti metabolici possano manifestarsi anche in assenza di un danno strutturale immediato, riflettendo una modulazione funzionale dei sistemi regolatori [10]. Tuttavia, l'esposizione cronica a basse dosi può portare

a una progressiva perdita della capacità di adattamento, con conseguente evoluzione verso condizioni patologiche più stabili. Questo aspetto è particolarmente rilevante in relazione alle patologie metaboliche croniche, tra cui obesità, sindrome metabolica e steatosi epatica non alcolica [122].

Infine, la complessità degli effetti metabolici degli EDCs è ulteriormente amplificata dall'esposizione a miscele di composti, che possono agire su differenti pathways in maniera simultanea. L'interazione tra questi effetti può determinare risposte difficilmente prevedibili, evidenziando la necessità di approcci integrati per la loro comprensione [37].

Nel loro insieme, queste evidenze indicano come gli interferenti endocrini possano alterare in maniera significativa l'omeostasi energetica, agendo su molteplici livelli della regolazione metabolica. Tali alterazioni rappresentano un elemento centrale nella comprensione degli effetti biologici di questi composti e costituiscono un importante punto di partenza per l'analisi dei meccanismi di danno cellulare, tra cui lo stress ossidativo e la risposta infiammatoria.

2.3. STRESS OSSIDATIVO E DANNO CELLULARE

Lo stress ossidativo rappresenta uno dei principali meccanismi attraverso cui gli interferenti endocrini esercitano i loro effetti a livello cellulare e tissutale [9]. Esso deriva da uno squilibrio tra la produzione di specie reattive dell'ossigeno (reactive oxygen species, ROS) e la capacità dei sistemi antiossidanti cellulari di neutralizzarle. In condizioni fisiologiche, le ROS svolgono un ruolo fondamentale come molecole segnale, partecipando alla regolazione di processi quali proliferazione, differenziamento e risposta allo stress. Tuttavia, un'eccessiva produzione o una ridotta capacità di detossificazione può determinare un accumulo di ROS, con conseguente danno ossidativo alle componenti cellulari [123]. Gli interferenti endocrini possono contribuire allo sviluppo di stress ossidativo attraverso diversi meccanismi. In primo luogo, la loro biotrasformazione metabolica, in particolare a livello epatico, può generare intermedi reattivi in grado di aumentare la produzione di ROS. Le reazioni di fase I, mediate principalmente dal sistema del citocromo P450, rappresentano una fonte significativa di specie ossidanti, soprattutto quando il metabolismo degli xenobiotici è aumentato o alterato [124]. Inoltre, alcuni EDCs possono interferire direttamente con la funzione mitocondriale, compromettendo l'efficienza della catena di trasporto degli elettroni e favorendo la formazione di radicali liberi [125].

A livello cellulare, le principali fonti di ROS includono i mitocondri, le NADPH ossidasi e altri sistemi enzimatici coinvolti nel metabolismo ossidativo. L'alterazione di questi sistemi da parte degli EDCs può determinare un aumento della produzione di anione superossido, perossido di idrogeno e radicali ossidrilici, molecole altamente reattive in grado di interagire con lipidi, proteine e acidi nucleici [126]. Il danno ossidativo ai lipidi di membrana, noto come perossidazione lipidica, rappresenta uno degli effetti più comuni e può compromettere l'integrità delle membrane cellulari e degli organelli intracellulari [118]. Parallelamente, il danno alle proteine può alterarne la struttura e la funzione, influenzando enzimi, recettori e proteine di trasporto [127]. A livello del DNA, lo stress ossidativo può indurre modificazioni delle basi, rotture dei filamenti e alterazioni della stabilità genomica, contribuendo a processi di mutagenesi e disfunzione cellulare. L'insieme di questi effetti determina una compromissione della funzionalità cellulare che, se non adeguatamente controllata, può evolvere verso apoptosi o necrosi [128].

Per contrastare gli effetti delle ROS, le cellule dispongono di un sistema antiossidante complesso, che include enzimi come superossido dismutasi (SOD), catalasi (CAT) e glutatione

perossidasi (GPx), nonché molecole non enzimatiche come il glutatione (GSH) [129]. Gli EDCs possono alterare anche questi sistemi di difesa, riducendo la capacità della cellula di neutralizzare le specie reattive e amplificando ulteriormente lo stato di stress ossidativo. In alcuni casi, è stata osservata una iniziale attivazione compensatoria delle difese antiossidanti, seguita da un loro esaurimento in condizioni di esposizione prolungata [130].

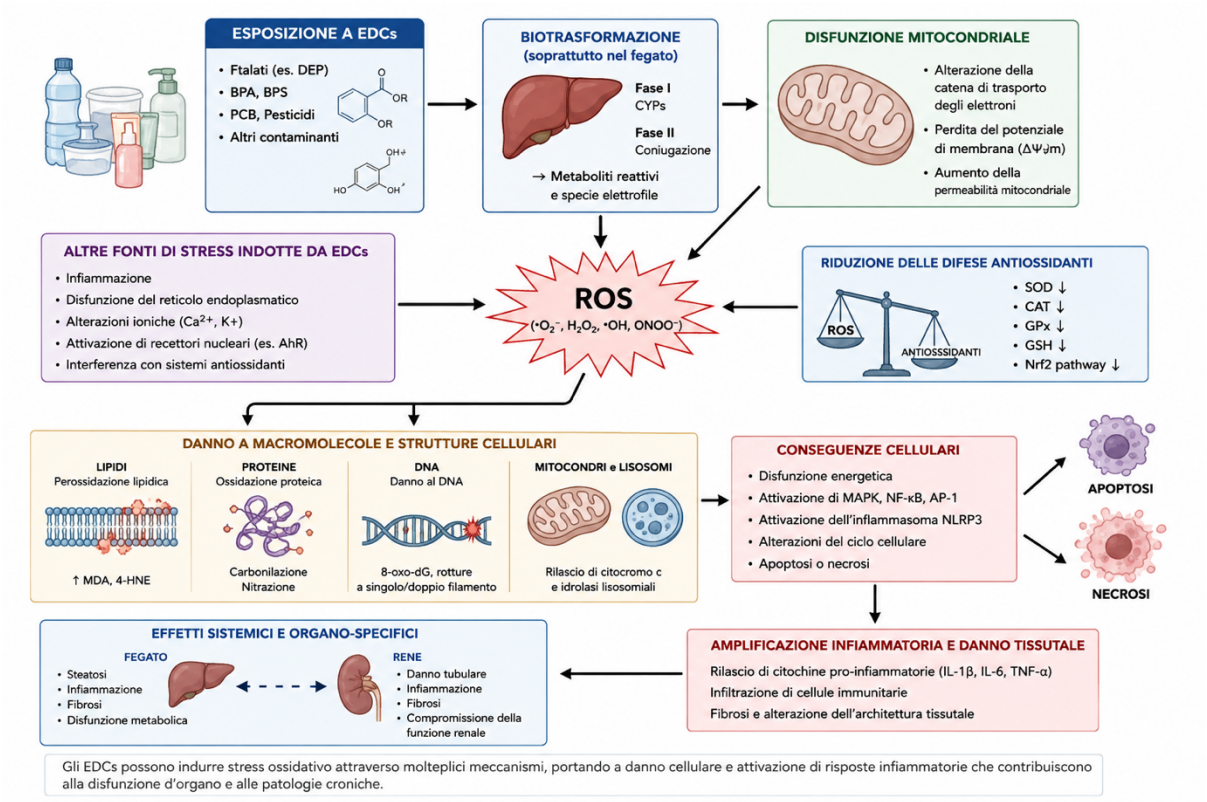


Figura 3 Stress ossidativo e danno cellulare indotti dagli interferenti endocrini. *Gli interferenti endocrini possono promuovere la produzione di specie reattive dell'ossigeno (ROS) attraverso molteplici meccanismi, tra cui biotrasformazione epatica, formazione di metaboliti reattivi, disfunzione mitocondriale, alterazione delle difese antiossidanti e attivazione di ulteriori fonti intracellulari di stress. L'eccessivo accumulo di ROS può determinare danno ossidativo a lipidi, proteine, DNA e organelli intracellulari, compromettendo l'omeostasi cellulare e favorendo disfunzione energetica, attivazione di pathway infiammatori, apoptosi o necrosi. Tali alterazioni possono contribuire all'amplificazione della risposta infiammatoria e alla progressione del danno tissutale, con particolare rilevanza per organi coinvolti nel metabolismo e nell'eliminazione degli xenobiotici, quali fegato e rene.*

Nel contesto degli organi coinvolti nella gestione degli xenobiotici, il fegato rappresenta uno dei principali siti di generazione di stress ossidativo, in quanto sede primaria della biotrasformazione. L'elevata attività metabolica degli epatociti, unita alla presenza di sistemi enzimatici coinvolti nelle reazioni di ossidazione, rende questo tessuto particolarmente suscettibile all'accumulo di ROS [131]. Lo stress ossidativo epatico è spesso associato a disfunzione mitocondriale, alterazione del metabolismo lipidico e attivazione di processi

infiammatori, contribuendo allo sviluppo di condizioni patologiche come la steatosi e altre forme di danno epatico [132]. Analogamente, anche il rene può essere significativamente coinvolto nei processi di stress ossidativo indotti dagli EDCs. Le cellule tubulari renali, caratterizzate da elevato consumo energetico e intensa attività mitocondriale, risultano particolarmente vulnerabili all'accumulo di ROS. L'esposizione a metaboliti reattivi e l'alterazione dei processi di detossificazione possono determinare danno ossidativo a livello renale, compromettendo la funzionalità cellulare e contribuendo all'insorgenza di alterazioni strutturali e funzionali [117]. Un aspetto particolarmente rilevante è rappresentato dall'interazione tra stress ossidativo e altri processi cellulari, in particolare la risposta infiammatoria. Le ROS possono infatti attivare pathways di segnalazione intracellulare che portano all'espressione di citochine pro-infiammatorie, instaurando un circuito di amplificazione del danno. Questo cross-talk tra stress ossidativo e infiammazione rappresenta un elemento chiave nella comprensione degli effetti biologici degli EDCs e costituisce un punto di collegamento fondamentale con i processi patologici a livello tissutale [133].

Nel loro insieme, queste evidenze indicano come lo stress ossidativo rappresenti un meccanismo centrale nella tossicità degli interferenti endocrini, fungendo da punto di convergenza tra alterazioni metaboliche, danno cellulare e risposta infiammatoria. La comprensione di questi processi risulta quindi essenziale per interpretare gli effetti degli EDCs a livello degli organi bersaglio e per chiarire i meccanismi alla base delle disfunzioni osservate in condizioni di esposizione cronica.

2.4. INFIAMMAZIONE

L'infiammazione rappresenta uno dei principali processi attraverso cui gli interferenti endocrini contribuiscono all'alterazione dell'omeostasi cellulare e tissutale [134]. In condizioni fisiologiche, la risposta infiammatoria costituisce un meccanismo di difesa essenziale, finalizzato all'eliminazione di agenti dannosi e al ripristino dell'integrità dei tessuti [135]. Tuttavia, quando tale risposta viene attivata in maniera persistente o inappropriata, può evolvere verso uno stato di infiammazione cronica a bassa intensità, che rappresenta un elemento chiave nella patogenesi di numerose patologie metaboliche e degenerative [136].

Gli interferenti endocrini sono in grado di modulare la risposta immunitaria attraverso una molteplicità di meccanismi, sia diretti sia indiretti. A livello molecolare, uno dei principali bersagli è rappresentato dai pathways di segnalazione intracellulare sensibili allo stato redox, in particolare quelli mediati dai fattori di trascrizione nuclear factor kappa B (NF-κB) e activator protein-1 (AP-1). L'attivazione di questi fattori trascrizionali determina l'induzione dell'espressione di numerosi geni coinvolti nella risposta infiammatoria, tra cui citochine pro-infiammatorie, chemochine e molecole di adesione cellulare [137, 138].

Tra i mediatori più frequentemente coinvolti si annoverano tumor necrosis factor-alpha (TNF-α), interleuchina-6 (IL-6) e interleuchina-1β (IL-1β), che svolgono un ruolo importante nel coordinare la risposta infiammatoria sia a livello locale sia sistemico. L'aumento della produzione di queste citochine rappresenta uno dei marker più comuni dell'attivazione immunitaria indotta da EDCs ed è spesso associato a condizioni di stress cellulare e disfunzione metabolica [139, 140].

Un ruolo particolarmente rilevante è svolto anche dall'inflammasoma, un complesso multiproteico intracellulare che agisce come sensore di segnali di danno. L'attivazione dell'inflammasoma, in particolare del complesso NLRP3, porta alla maturazione e al rilascio di IL-1β e IL-18, amplificando la risposta infiammatoria. Diversi studi suggeriscono che gli EDCs possano contribuire all'attivazione di questo sistema attraverso meccanismi legati allo stress ossidativo e alla disfunzione mitocondriale [140].

Il legame tra stress ossidativo e infiammazione rappresenta un elemento centrale nella comprensione degli effetti degli EDCs. L'accumulo di specie reattive dell'ossigeno può attivare pathways di segnalazione intracellulare che promuovono la risposta infiammatoria,

mentre le citochine rilasciate durante l'infiammazione possono a loro volta aumentare la produzione di ROS. Questo circuito di amplificazione crea un ambiente cellulare caratterizzato da uno stato di infiammazione persistente e stress ossidativo cronico, che contribuisce al danno tissutale progressivo [141].

A livello degli organi bersaglio, il fegato rappresenta uno dei principali siti di integrazione tra metabolismo e risposta immunitaria. Le cellule di Kupffer, macrofagi residenti del fegato, svolgono un ruolo fondamentale nel riconoscimento dei segnali di danno e nell'attivazione della risposta infiammatoria [142]. L'esposizione a EDCs può determinare l'attivazione di queste cellule attraverso recettori di riconoscimento del pattern molecolare (pattern recognition receptors, PRRs), come i Toll-like receptors (TLRs), con conseguente rilascio di mediatori infiammatori e reclutamento di cellule immunitarie. Questo processo contribuisce alla creazione di un microambiente pro-infiammatorio che può alterare la funzionalità epatica e favorire la progressione del danno metabolico [92, 143].

Parallelamente, anche il rene rappresenta un organo sensibile all'attivazione della risposta infiammatoria indotta dagli interferenti endocrini. Le cellule tubulari renali, oltre a svolgere funzioni di trasporto e metabolismo, partecipano attivamente alla risposta immunitaria innata, esprimendo recettori e producendo mediatori infiammatori in risposta a stimoli dannosi. L'attivazione di pathways infiammatori a livello renale può determinare alterazioni dell'integrità cellulare, promuovere l'infiltrazione di cellule immunitarie e contribuire alla progressione del danno tissutale [144].

Un ulteriore aspetto di rilievo riguarda la capacità degli EDCs di modulare il sistema immunitario adattativo, influenzando la funzione di linfociti T e B e alterando l'equilibrio tra risposte pro- e anti-infiammatorie. Questo può tradursi in una alterata regolazione della risposta immunitaria, con possibili conseguenze sulla suscettibilità a condizioni infiammatorie croniche e autoimmuni [145].

Nel contesto dell'esposizione cronica, l'attivazione persistente della risposta infiammatoria rappresenta un fattore determinante nella progressione del danno cellulare. A differenza dell'infiammazione acuta, che è generalmente autolimitante, l'infiammazione cronica è caratterizzata da una produzione continua di mediatori infiammatori e da una mancata risoluzione del processo, che può condurre a rimodellamento tissutale e perdita della funzione d'organo [134, 146].

Infine, è importante sottolineare come l'infiammazione rappresenti un punto di convergenza tra diversi processi alterati dagli EDCs, inclusi metabolismo energetico, stress ossidativo e segnalazione endocrina [140]. L'interazione tra questi sistemi contribuisce a definire il quadro complessivo degli effetti biologici degli interferenti endocrini, evidenziando la natura multifattoriale e sistemica della loro azione [76].

Nel loro insieme, queste evidenze indicano come la modulazione della risposta infiammatoria rappresenti un meccanismo centrale attraverso cui gli EDCs possono influenzare la funzionalità cellulare e tissutale. La comprensione di tali processi risulta quindi fondamentale per interpretare gli effetti osservati a livello degli organi bersaglio e per chiarire il ruolo dell'infiammazione nella progressione del danno indotto da questi composti.

2.5. EPIGENETICA

Oltre agli effetti diretti sulla segnalazione endocrina, sul metabolismo e sulla risposta infiammatoria, gli interferenti endocrini sono in grado di modulare l'espressione genica attraverso meccanismi epigenetici, introducendo un ulteriore livello di complessità nella loro azione biologica [147]. I processi epigenetici regolano l'attività dei geni senza alterare la sequenza del DNA e rappresentano un sistema dinamico di adattamento dell'organismo agli stimoli ambientali.

Tra i principali meccanismi epigenetici coinvolti si annoverano la metilazione del DNA, le modificazioni post-traduzionali degli istoni e la regolazione mediata da RNA non codificanti [148]. La metilazione del DNA, che avviene principalmente a livello delle regioni CpG, è generalmente associata alla repressione dell'espressione genica, mentre le modificazioni degli istoni, come acetilazione e metilazione, possono modulare l'accessibilità della cromatina ai fattori di trascrizione [149]. Gli RNA non codificanti, tra cui microRNA (miRNA) e long non-coding RNA (lncRNA), contribuiscono alla regolazione post-trascrizionale dell'espressione genica, influenzando la stabilità e la traduzione degli mRNA [150].

Gli interferenti endocrini possono alterare questi meccanismi attraverso l'interazione con enzimi epigenetici chiave, come DNA metiltransferasi (DNMTs), istone acetiltransferasi (HATs) e istone deacetilasi (HDACs) [147]. Tali interazioni possono determinare modificazioni stabili dell'espressione genica, che persistono anche in assenza del composto, suggerendo un possibile ruolo degli EDCs nella programmazione a lungo termine delle funzioni cellulari.

Un aspetto particolarmente rilevante è rappresentato dalla relazione tra epigenetica e metabolismo. Le modificazioni epigenetiche sono infatti strettamente influenzate dallo stato metabolico della cellula, in quanto molti cofattori necessari per gli enzimi epigenetici, come S-adenosilmetionina (SAM), acetil-CoA e NAD^+, derivano direttamente dai processi metabolici. Di conseguenza, l'interferenza degli EDCs con il metabolismo energetico può avere ripercussioni indirette sull'assetto epigenetico, contribuendo alla modulazione dell'espressione genica [151].

Nel fegato, le alterazioni epigenetiche possono influenzare l'espressione di geni coinvolti nella detossificazione, nel metabolismo lipidico e nella risposta allo stress, contribuendo allo

sviluppo di disfunzioni metaboliche [152]. Analogamente, nel rene, la modulazione epigenetica può interessare geni implicati nei processi di trasporto e risposta allo stress ossidativo, influenzando la capacità del tessuto di adattarsi a condizioni di esposizione prolungata [153].

Un ulteriore elemento di complessità è rappresentato dal fatto che gli effetti epigenetici degli EDCs possono essere particolarmente rilevanti durante specifiche finestre temporali, come lo sviluppo embrionale e le prime fasi della vita. In questi periodi, l'epigenoma è altamente plastico e sensibile agli stimoli ambientali, e l'esposizione a interferenti endocrini può determinare modificazioni stabili dell'espressione genica, con effetti che persistono nel tempo [154]. Inoltre, alcune evidenze suggeriscono che le alterazioni epigenetiche indotte dagli EDCs possano essere trasmesse alle generazioni successive, attraverso meccanismi di eredità epigenetica [18]. Sebbene questo aspetto sia ancora oggetto di studio, esso sottolinea il potenziale impatto a lungo termine dell'esposizione a questi composti, estendendo le conseguenze oltre l'individuo direttamente esposto.

Nel loro insieme, questi processi evidenziano come gli interferenti endocrini possano agire non solo modulando la segnalazione cellulare a breve termine, ma anche influenzando in maniera stabile i programmi di espressione genica. Tale capacità di indurre modificazioni epigenetiche contribuisce a spiegare la persistenza degli effetti biologici osservati in condizioni di esposizione cronica e rappresenta un elemento chiave nella comprensione della relazione tra ambiente e salute.

2.6. INFLAMMASOMA E RISPOSTA INFIAMMATORIA INNATA

L'inflammasoma rappresenta uno dei principali complessi molecolari coinvolti nella regolazione della risposta infiammatoria innata e costituisce un punto di convergenza tra segnali di stress cellulare, danno tissutale e attivazione immunitaria [155]. A differenza di altri pathway infiammatori prevalentemente associati alla regolazione trascrizionale delle citochine, l'inflammasoma agisce come piattaforma multiproteica intracellulare in grado di rilevare segnali di pericolo di diversa natura e di tradurli in una risposta infiammatoria rapida e amplificata.

Dal punto di vista funzionale, l'attivazione dell'inflammasoma consente alla cellula di riconoscere condizioni di alterata omeostasi, quali stress ossidativo, disfunzione mitocondriale, danno lisosomiale, alterazioni ioniche intracellulari e presenza di molecole associate al danno cellulare. Questi segnali, spesso indicati come damage-associated molecular patterns, possono derivare da processi di tossicità cellulare indotti da xenobiotici, contaminanti ambientali o metaboliti reattivi [156]. In questo contesto, l'inflammasoma non agisce soltanto come un sensore immunitario, ma come un vero e proprio integratore dello stato di stress della cellula.

Tra i diversi complessi inflammasomiali descritti, l'inflammasoma NLRP3 è quello maggiormente studiato e risulta particolarmente rilevante nei processi infiammatori associati a stress ossidativo e danno metabolico [155, 157]. NLRP3 appartiene alla famiglia dei recettori intracellulari NOD-like receptors ed è in grado di rispondere a una vasta gamma di stimoli, anche molto diversi tra loro. Questa caratteristica suggerisce che NLRP3 non riconosca necessariamente un singolo ligando specifico, ma piuttosto condizioni cellulari comuni di alterata omeostasi, tra cui l'aumento delle specie reattive dell'ossigeno, la perdita del potenziale di membrana mitocondriale, il rilascio di DNA mitocondriale e le variazioni delle concentrazioni intracellulari di ioni come il potassio e il calcio [158].

L'attivazione dell'inflammasoma NLRP3 è generalmente descritta come un processo a più fasi. Una prima fase, definita priming, comporta l'attivazione di pathway trascrizionali, in particolare quelli mediati da NF-κB, con conseguente aumento dell'espressione di NLRP3 e delle forme immature delle citochine pro-infiammatorie, come pro-IL-1β e pro-IL-18 [159]. Questa fase prepara la cellula alla successiva attivazione del complesso inflammasomiale. La seconda fase, definita activation, è indotta da segnali di stress intracellulare e determina l'assemblaggio del complesso multiproteico costituito da NLRP3, dalla proteina adattatrice

ASC e dalla pro-caspasi-1 [155]. L'oligomerizzazione di queste componenti consente l'attivazione della caspasi-1, enzima chiave responsabile del processamento proteolitico delle forme immature di IL-1β e IL-18 nelle rispettive forme mature e biologicamente attive [157].

La maturazione e il rilascio di IL-1β rappresentano uno degli eventi centrali dell'attivazione inflammasomiale. IL-1β è una citochina fortemente pro-infiammatoria, capace di promuovere il reclutamento e l'attivazione di cellule immunitarie, amplificare la produzione di altri mediatori infiammatori e contribuire alla progressione del danno tissutale. Parallelamente, l'attivazione della caspasi-1 può indurre la scissione della gasdermina D, favorendo la formazione di pori nella membrana cellulare e promuovendo un tipo di morte cellulare infiammatoria definita piroptosi [156, 157]. Questo processo determina il rilascio di contenuti intracellulari pro-infiammatori e contribuisce ulteriormente all'amplificazione della risposta immune locale.

Nel contesto della tossicità indotta dagli interferenti endocrini, l'inflammasoma assume particolare rilevanza poiché si colloca all'interfaccia tra stress ossidativo, infiammazione e morte cellulare [134, 160]. Numerosi EDCs sono in grado di alterare la funzione mitocondriale, aumentare la produzione di specie reattive dell'ossigeno e compromettere i meccanismi cellulari di detossificazione [161]. Queste alterazioni possono favorire l'attivazione di NLRP3, instaurando un circuito di amplificazione in cui lo stress ossidativo promuove la risposta infiammatoria e, a sua volta, l'infiammazione contribuisce al mantenimento dello stato redox alterato. Tale interazione risulta particolarmente importante in condizioni di esposizione cronica o ripetuta, nelle quali la persistenza dello stimolo può determinare una risposta maladattativa e favorire la progressione del danno.

Il fegato rappresenta uno degli organi maggiormente coinvolti nei processi inflammasomiali associati all'esposizione a xenobiotici [162]. La sua funzione centrale nel metabolismo dei contaminanti ambientali lo espone alla formazione di metaboliti reattivi e a condizioni di stress ossidativo. In questo contesto, l'attivazione dell'inflammasoma può contribuire alla risposta infiammatoria epatica attraverso il coinvolgimento degli epatociti, delle cellule di Kupffer e di altre popolazioni cellulari residenti. L'aumento di IL-1β e l'attivazione della caspasi-1 possono favorire il reclutamento di cellule infiammatorie, l'alterazione dell'architettura tissutale e l'attivazione di processi di rimodellamento, contribuendo alla progressione del danno epatico.

Anche il rene rappresenta un bersaglio rilevante dell'attivazione inflammasomiale [163]. Le cellule tubulari renali, caratterizzate da elevata attività metabolica e da un'intensa funzione mitocondriale, risultano particolarmente sensibili allo stress ossidativo e alle alterazioni dell'omeostasi intracellulare. L'esposizione a contaminanti o metaboliti eliminati per via renale può promuovere l'attivazione di pathway infiammatori locali, nei quali NLRP3 svolge un ruolo importante nel collegare il danno cellulare alla risposta immunitaria. In tale scenario, l'attivazione dell'inflammasoma può contribuire alla compromissione dell'integrità tubulare, all'amplificazione della risposta infiammatoria e alla progressione del danno renale.

Alla luce di queste considerazioni, l'inflammasoma può essere interpretato come un nodo molecolare centrale nella risposta agli interferenti endocrini, in quanto integra segnali derivanti da stress ossidativo, danno mitocondriale, alterazioni metaboliche e risposta infiammatoria. Nel contesto dell'asse epato-renale, l'attivazione del pathway NLRP3/caspasi-1/IL-1β rappresenta un meccanismo potenzialmente rilevante attraverso cui l'esposizione a contaminanti ambientali può tradursi in danno cellulare e tissutale [155, 162, 163]. Per tale motivo, la valutazione dei marker associati all'inflammasoma costituisce un approccio utile per comprendere più approfonditamente i meccanismi molecolari alla base della tossicità indotta dal Dietil Ftalato e per interpretare l'interazione tra stress ossidativo, infiammazione e apoptosi osservata a livello epatico e renale.

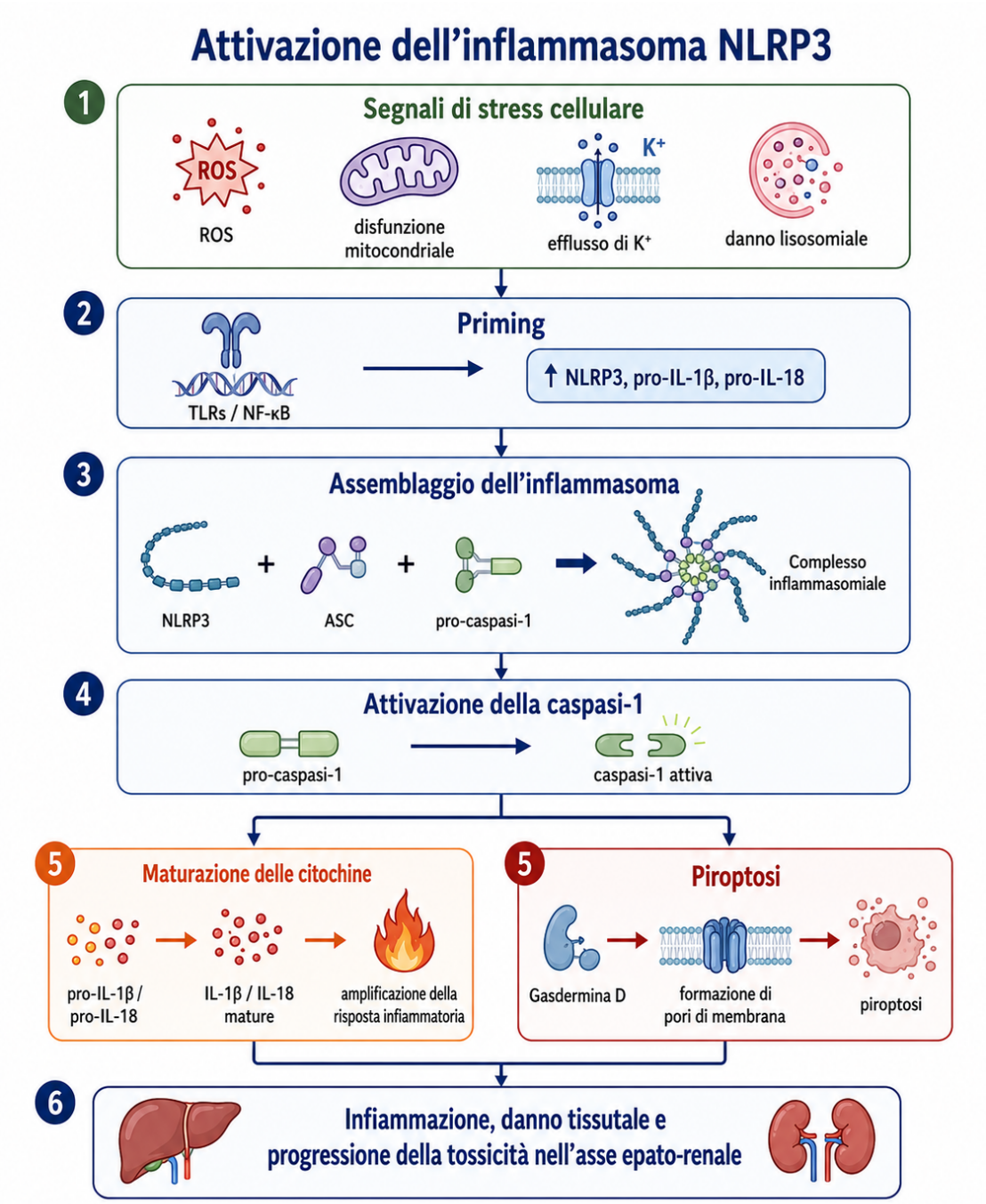


Figura 4 Attivazione dell'inflammasoma NLRP3 nella risposta a stress cellulare e danno tissutale. *Segnali di stress cellulare, tra cui aumento delle specie reattive dell'ossigeno, disfunzione mitocondriale, alterazioni ioniche intracellulari e danno lisosomiale, possono promuovere l'attivazione dell'inflammasoma NLRP3. Dopo una fase di priming, mediata prevalentemente da NF-κB e associata all'aumento dell'espressione di NLRP3 e delle forme inattive di IL-1β e IL-18, il complesso inflammasomiale si assembla attraverso l'interazione tra NLRP3, ASC e pro-caspasi-1. L'attivazione della caspasi-1 consente la maturazione di IL-1β e IL-18, amplificando la risposta infiammatoria, e può inoltre indurre piroptosi attraverso la gasdermina D. Nel contesto dell'esposizione a contaminanti ambientali, questo pathway rappresenta un importante collegamento tra stress ossidativo, infiammazione e danno tissutale nell'asse epato-renale.*

2.7. EFFETTI ORGANO-SPECIFICI

Le alterazioni indotte dagli interferenti endocrini a livello della segnalazione cellulare, del metabolismo energetico, dello stato redox e della risposta infiammatoria non si manifestano in maniera uniforme nell'organismo, ma tendono a concentrarsi in specifici organi caratterizzati da elevata attività metabolica e da un ruolo centrale nella gestione degli xenobiotici [121]. In questo contesto, l'analisi degli effetti organo-specifici rappresenta un passaggio fondamentale per comprendere come le perturbazioni molecolari e cellulari indotte dagli EDCs si traducano in alterazioni funzionali e strutturali a livello tissutale [93].

Tra gli organi maggiormente coinvolti emergono in particolare il fegato e il rene, che svolgono ruoli complementari nei processi di metabolismo ed eliminazione dei composti esogeni. Il fegato, principale sede di biotrasformazione, rappresenta il primo punto di contatto con numerosi contaminanti e il sito in cui si generano metaboliti potenzialmente reattivi [164]. Il rene, invece, è responsabile della filtrazione e dell'escrezione dei composti idrosolubili e dei loro metaboliti, risultando esposto a concentrazioni significative di tali sostanze durante i processi di eliminazione [165].

La stretta interconnessione funzionale tra questi organi determina una dinamica complessa in cui le alterazioni indotte dagli EDCs non possono essere considerate in maniera isolata, ma devono essere interpretate come il risultato di un'interazione tra metabolismo, stato redox e risposta infiammatoria. In tale prospettiva, l'analisi integrata degli effetti a livello epatico e renale consente di delineare in maniera più completa i meccanismi attraverso cui gli interferenti endocrini contribuiscono allo sviluppo di disfunzioni biologiche.

2.7.1. FEGATO

Il fegato rappresenta il principale organo coinvolto nella biotrasformazione degli xenobiotici ed è, di conseguenza, uno dei bersagli più rilevanti dell'azione degli interferenti endocrini [164]. La sua posizione anatomica, interposta tra il tratto gastrointestinale e la circolazione sistemica attraverso il sistema portale, lo espone direttamente ai composti assorbiti a livello intestinale, rendendolo il primo sito di interazione tra contaminanti ambientali e organismo. Questa caratteristica, nota come "first-pass effect", conferisce al fegato un ruolo fondamentale nella detossificazione, ma al tempo stesso lo rende particolarmente vulnerabile all'accumulo di sostanze reattive e ai loro effetti tossici [166].

Dal punto di vista strutturale e funzionale, il fegato è organizzato in unità altamente specializzate, i lobuli epatici, all'interno dei quali si sviluppa una complessa rete di interazioni tra diverse popolazioni cellulari [167]. Gli epatociti rappresentano la componente principale e sono responsabili della maggior parte delle funzioni metaboliche, tra cui il metabolismo lipidico, glucidico e proteico, nonché la biotrasformazione degli xenobiotici [166]. Accanto a essi, cellule non parenchimali quali le cellule di Kupffer, le cellule stellate epatiche e le cellule endoteliali sinusoidali contribuiscono al mantenimento dell'omeostasi tissutale, alla regolazione della risposta immunitaria e alla modulazione dei processi infiammatori [168]. L'interazione tra queste componenti cellulari determina un sistema altamente dinamico, capace di adattarsi a stimoli ambientali, ma anche suscettibile a disfunzioni in condizioni di esposizione cronica.

Il metabolismo degli xenobiotici a livello epatico si articola in una sequenza coordinata di reazioni enzimatiche, generalmente suddivise in fase I e fase II. Le reazioni di fase I, mediate principalmente dagli enzimi del citocromo P450 (CYP450), introducono o espongono gruppi funzionali reattivi attraverso processi di ossidazione, riduzione o idrolisi [169]. Sebbene tali trasformazioni abbiano lo scopo di facilitare l'eliminazione dei composti, esse possono generare intermedi altamente reattivi, capaci di interagire con le componenti cellulari e contribuire alla produzione di specie reattive dell'ossigeno [170]. Le reazioni di fase II, che includono processi di coniugazione con molecole endogene come glucuronato, solfato e glutatione, rendono i composti più idrosolubili e ne favoriscono l'escrezione, ma la loro efficacia dipende dall'integrità dei sistemi cellulari e dalla disponibilità di cofattori metabolici [171].

Nel contesto dell'esposizione agli interferenti endocrini, questi processi possono essere profondamente alterati. Numerosi EDCs sono in grado di modulare l'attività degli enzimi del citocromo P450, influenzando la velocità e le modalità di biotrasformazione degli xenobiotici [121]. Questa modulazione può determinare sia un aumento della produzione di metaboliti reattivi sia un'alterazione del metabolismo di composti endogeni, inclusi gli ormoni, contribuendo a uno squilibrio complessivo della regolazione fisiologica.

Uno degli effetti più rilevanti dell'esposizione agli EDCs a livello epatico riguarda l'alterazione del metabolismo lipidico. Il fegato svolge un ruolo centrale nella sintesi, ossidazione e distribuzione dei lipidi, e la sua funzione è strettamente regolata da una rete di fattori di trascrizione e recettori nucleari [118]. Tra questi, i peroxisome proliferator-activated receptors (PPARα e PPARγ) e gli sterol regulatory element-binding proteins (SREBPs) rappresentano nodi chiave nella regolazione dell'omeostasi lipidica. L'interferenza degli EDCs con questi pathways può determinare un aumento della lipogenesi, una riduzione della β-ossidazione e un'alterazione del trasporto lipidico, favorendo l'accumulo di trigliceridi negli epatociti e la comparsa di steatosi epatica [172].

Parallelamente alle alterazioni metaboliche, l'esposizione a interferenti endocrini è frequentemente associata a un aumento dello stress ossidativo. L'elevata attività metabolica degli epatociti, unita alla presenza di sistemi enzimatici ossidativi, rende il fegato una delle principali fonti di produzione di ROS in condizioni di esposizione a xenobiotici. La disfunzione mitocondriale, spesso indotta da questi composti, rappresenta un ulteriore fattore che contribuisce alla generazione di specie reattive, compromettendo l'efficienza della catena respiratoria e favorendo l'accumulo di radicali liberi [120]. Lo stress ossidativo a livello epatico si traduce in un danno diffuso alle macromolecole cellulari, tra cui lipidi, proteine e DNA, e rappresenta un elemento centrale nella progressione del danno cellulare. In particolare, la perossidazione lipidica può compromettere l'integrità delle membrane cellulari e degli organelli, mentre le modificazioni ossidative delle proteine possono alterarne la funzione enzimatica e strutturale [120].

L'interazione tra stress ossidativo e risposta infiammatoria rappresenta un ulteriore elemento chiave nella patogenesi del danno epatico indotto dagli EDCs. L'attivazione delle cellule di Kupffer e dei pathways di segnalazione intracellulare, come NF-κB, porta alla produzione di citochine pro-infiammatorie, tra cui TNF-α e IL-6, che contribuiscono alla creazione di un

microambiente infiammatorio. Questo stato può amplificare il danno metabolico e strutturale, instaurando un circuito di retroazione positiva tra infiammazione e stress ossidativo [134].

Un ulteriore livello di regolazione è rappresentato dai meccanismi epigenetici, che possono essere modulati dagli interferenti endocrini e contribuire alla persistenza degli effetti biologici. Alterazioni della metilazione del DNA, delle modificazioni degli istoni e dell'espressione di microRNA possono influenzare l'espressione di geni coinvolti nella detossificazione, nel metabolismo lipidico e nella risposta allo stress, contribuendo alla progressione del danno epatico [173].

Nel loro insieme, questi processi evidenziano come il fegato non sia semplicemente un organo di detossificazione, ma un sistema integrato in cui metabolismo, stato redox, risposta immunitaria ed epigenetica interagiscono in maniera dinamica. L'esposizione agli interferenti endocrini può alterare questo equilibrio, determinando una cascata di eventi che si traduce in disfunzioni cellulari e alterazioni strutturali del tessuto epatico [38]. Pertanto, il fegato rappresenta un modello privilegiato per lo studio degli effetti degli EDCs, in quanto consente di analizzare l'interazione tra metabolismo degli xenobiotici e risposta biologica dell'organismo. La comprensione dei meccanismi alla base della tossicità epatica risulta fondamentale per interpretare gli effetti sistemici di questi composti e per identificare i pathways coinvolti nello sviluppo di patologie associate all'esposizione cronica.

2.7.2. RENE

Accanto al fegato, il rene rappresenta un organo fondamentale nella gestione degli xenobiotici, svolgendo un ruolo centrale nei processi di filtrazione, riassorbimento ed escrezione dei composti esogeni e dei loro metaboliti. Sebbene tradizionalmente considerato principalmente come un organo deputato all'eliminazione, il rene possiede una significativa attività metabolica e partecipa attivamente al mantenimento dell'omeostasi sistemica, risultando pertanto un bersaglio rilevante degli effetti degli interferenti endocrini [116].

Dal punto di vista strutturale, il rene è organizzato in unità funzionali altamente specializzate, i nefroni, che comprendono il glomerulo e il sistema tubulare. Il glomerulo è responsabile della filtrazione del plasma, mentre le cellule tubulari svolgono funzioni complesse di riassorbimento e secrezione, contribuendo alla regolazione del bilancio idro-elettrolitico e all'eliminazione dei composti idrosolubili. In questo contesto, i metaboliti derivanti dalla biotrasformazione epatica degli xenobiotici vengono frequentemente concentrati a livello tubulare, esponendo le cellule renali a livelli relativamente elevati di sostanze potenzialmente reattive [174].

Le cellule tubulari renali, in particolare quelle del tubulo prossimale, sono caratterizzate da elevata attività metabolica e da una ricca dotazione mitocondriale, necessaria per sostenere i processi di trasporto attivo [175]. Questa elevata richiesta energetica le rende particolarmente vulnerabili a condizioni di stress ossidativo e a disfunzioni mitocondriali. L'esposizione a interferenti endocrini può infatti determinare un'alterazione della funzione mitocondriale, con conseguente aumento della produzione di specie reattive dell'ossigeno e compromissione dell'equilibrio redox cellulare [176].

Lo stress ossidativo rappresenta uno dei principali meccanismi di danno a livello renale. L'accumulo di ROS può indurre perossidazione lipidica, modificazioni delle proteine e danni al DNA, compromettendo la funzionalità delle cellule tubulari. Inoltre, la riduzione della capacità dei sistemi antiossidanti, spesso osservata in condizioni di esposizione a EDCs, può amplificare ulteriormente lo stato di stress ossidativo, favorendo la progressione del danno cellulare [177].

Parallelamente, l'esposizione agli interferenti endocrini può attivare una risposta infiammatoria a livello renale. Le cellule tubulari sono in grado di produrre citochine e chemochine in risposta

a stimoli dannosi, contribuendo al reclutamento di cellule immunitarie e all'instaurarsi di un microambiente infiammatorio. L'attivazione di pathways intracellulari, come quelli mediati da NF-κB, porta alla produzione di mediatori pro-infiammatori che possono amplificare il danno tissutale [134].

Un ulteriore aspetto rilevante riguarda l'interferenza degli EDCs con i sistemi di trasporto e con i meccanismi di escrezione. I trasportatori di membrana espressi nelle cellule tubulari, come quelli appartenenti alle famiglie degli organic anion transporters (OATs) e organic cation transporters (OCTs), svolgono un ruolo importante nella secrezione e nel riassorbimento dei composti. La modulazione di questi sistemi da parte degli interferenti endocrini può alterare la clearance renale dei contaminanti, influenzando la loro permanenza nell'organismo e contribuendo a un aumento dell'esposizione sistemica [178].

Analogamente a quanto osservato nel fegato, anche nel rene gli effetti degli EDCs possono essere modulati da meccanismi epigenetici. Alterazioni nella metilazione del DNA e nell'espressione di microRNA possono influenzare geni coinvolti nella risposta allo stress, nel metabolismo e nei processi di trasporto, contribuendo alla regolazione della risposta cellulare in condizioni di esposizione cronica [147].

Nel loro insieme, questi processi evidenziano come il rene non rappresenti soltanto un organo di eliminazione passiva, ma un sistema attivo nella risposta agli xenobiotici, in cui metabolismo, stato redox e risposta infiammatoria interagiscono in maniera dinamica. L'esposizione agli interferenti endocrini può alterare questo equilibrio, determinando una compromissione della funzionalità renale e contribuendo allo sviluppo di danno tissutale [80]. Pertanto, il rene, insieme al fegato, costituisce un nodo centrale nella regolazione dell'interazione tra organismo e ambiente, e il suo coinvolgimento nei processi di tossicità indotti dagli EDCs rappresenta un elemento fondamentale per comprendere l'impatto sistemico di questi composti.

2.7.3. ASSE FEGATO–RENE NELLA TOSSICITÀ DA INTERFERENTI ENDOCRINI

L'analisi degli effetti organo-specifici degli interferenti endocrini non può essere considerata in maniera isolata, ma deve essere inserita in un contesto di interazione funzionale tra i principali organi coinvolti nella gestione degli xenobiotici. In questo scenario, il fegato e il rene costituiscono un sistema integrato, spesso definito come asse fegato–rene, in cui i processi di metabolismo ed escrezione sono strettamente interconnessi e contribuiscono in maniera coordinata alla regolazione dell'esposizione sistemica ai contaminanti [179].

Il fegato rappresenta il principale sito di biotrasformazione, dove gli xenobiotici vengono convertiti in metaboliti più idrosolubili attraverso reazioni di fase I e fase II [180]. Tuttavia, questi processi non conducono necessariamente alla completa detossificazione: in molti casi, i metaboliti generati possono risultare più reattivi o biologicamente attivi rispetto ai composti parentali. Questi prodotti vengono successivamente rilasciati nel circolo sistemico e raggiungono il rene, dove vengono filtrati ed escreti [73].

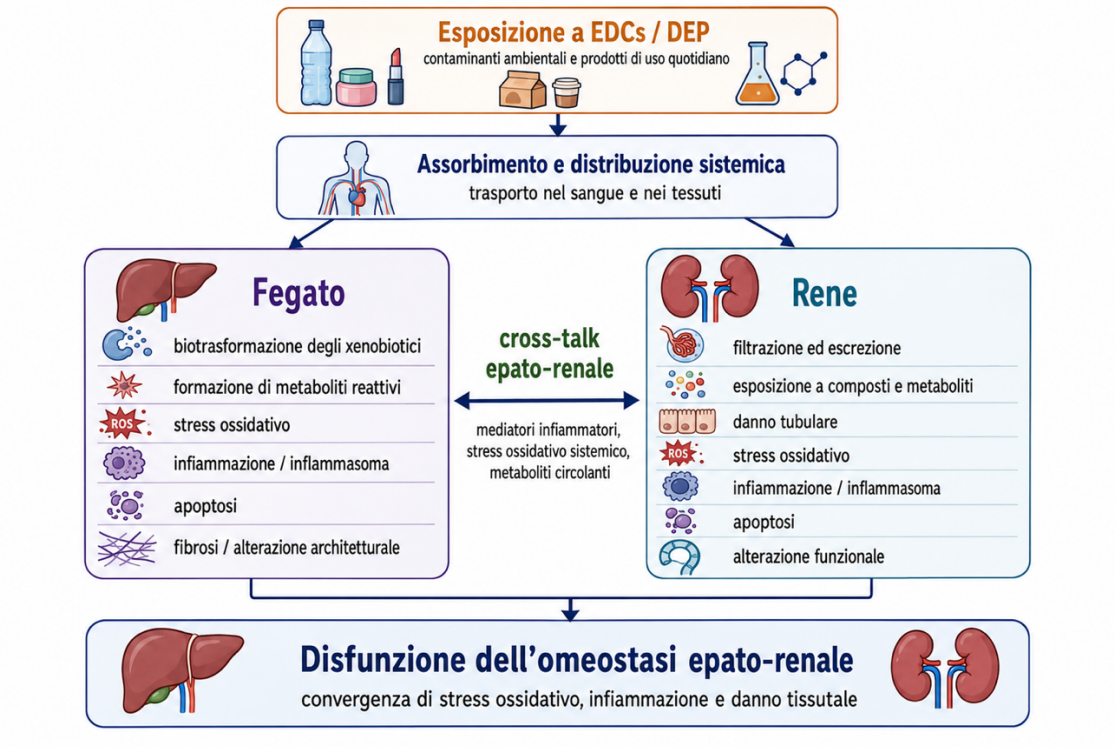


Figura 5 Asse fegato–rene nella tossicità da interferenti endocrini. *Dopo l'assorbimento, gli interferenti endocrini possono raggiungere fegato e rene, organi centrali nei processi di biotrasformazione ed eliminazione. In entrambi i tessuti, l'esposizione può indurre stress ossidativo, infiammazione e danno cellulare, contribuendo alla compromissione dell'omeostasi epato-renale.*

Il rene, attraverso i processi di filtrazione glomerulare e secrezione tubulare, rappresenta il principale organo deputato all'eliminazione dei composti idrosolubili. Tuttavia, questa funzione espone il tessuto renale a concentrazioni elevate di metaboliti, che possono accumularsi a livello delle cellule tubulari e contribuire allo sviluppo di danno cellulare. In questo contesto, il rene non agisce semplicemente come un sistema di eliminazione passiva, ma come un organo attivamente coinvolto nella risposta agli xenobiotici [181]. La relazione tra fegato e rene assume particolare rilevanza nel contesto degli interferenti endocrini, in quanto le alterazioni indotte a livello epatico possono influenzare direttamente la natura e la quantità dei composti che raggiungono il rene [117]. Una modulazione dell'attività degli enzimi epatici può infatti determinare un cambiamento nel profilo dei metaboliti circolanti, alterando il carico di sostanze reattive a cui il rene è esposto [182].

Parallelamente, la compromissione della funzione renale può influenzare la clearance degli xenobiotici e dei loro metaboliti, determinando un aumento della loro permanenza nell'organismo e una maggiore esposizione sistemica. Questo può tradursi in un ulteriore sovraccarico per il fegato, creando un circuito di retroazione in cui la disfunzione di un organo amplifica il danno dell'altro [183]. Un elemento chiave di questa interazione è rappresentato dal ruolo dello stress ossidativo e della risposta infiammatoria, che possono essere attivati sia a livello epatico sia renale e contribuire alla progressione del danno tissutale [184]. Le specie reattive dell'ossigeno generate durante il metabolismo epatico possono influenzare indirettamente il rene, mentre l'infiammazione sistemica può coinvolgere entrambi gli organi, amplificando gli effetti degli EDCs [185].

Inoltre, la modulazione dei sistemi di trasporto e dei meccanismi epigenetici in entrambi gli organi può contribuire a definire la risposta complessiva dell'organismo all'esposizione agli interferenti endocrini. L'alterazione dell'espressione di trasportatori, enzimi metabolici e fattori di regolazione genica rappresenta un ulteriore livello di integrazione tra fegato e rene [186].

Nel loro insieme, questi processi evidenziano come l'asse fegato–rene rappresenti un sistema dinamico e interdipendente, in cui metabolismo, escrezione, stato redox e risposta infiammatoria concorrono a determinare l'impatto biologico degli interferenti endocrini. La comprensione di questa interazione è fondamentale per interpretare in maniera integrata gli effetti osservati a livello degli organi bersaglio e per delineare i meccanismi alla base della tossicità sistemica.

2.7.4. IMPLICAZIONI FISIOPATOLOGICHE DEGLI EFFETTI ORGANO-SPECIFICI

Nel loro insieme, le evidenze relative agli effetti organo-specifici degli interferenti endocrini evidenziano come questi composti possano determinare alterazioni complesse e integrate a livello dei principali sistemi coinvolti nella gestione degli xenobiotici. Il fegato e il rene emergono come nodi centrali di questa rete, nei quali convergono processi metabolici, redox, infiammatori ed epigenetici che contribuiscono alla definizione della risposta biologica complessiva [187]. La vulnerabilità di questi organi è strettamente legata al loro ruolo fisiologico: il fegato, come principale sede di biotrasformazione, è esposto alla formazione di metaboliti potenzialmente reattivi, mentre il rene, attraverso i processi di filtrazione ed escrezione, è sottoposto a un'elevata concentrazione di tali composti durante la loro eliminazione. Questa distribuzione funzionale determina una esposizione differenziale, ma complementare, che contribuisce alla complessità degli effetti osservati [33, 188].

L'interazione tra metabolismo, stress ossidativo e risposta infiammatoria rappresenta un elemento chiave nella progressione del danno a livello di questi organi [189]. Alterazioni inizialmente di natura funzionale possono evolvere verso condizioni più stabili e strutturate, in cui la capacità di adattamento cellulare risulta compromessa. In questo contesto, anche i meccanismi epigenetici possono contribuire alla persistenza degli effetti, modulando in maniera stabile l'espressione genica e influenzando la risposta a lungo termine dell'organismo [147]. Tuttavia, la variabilità delle proprietà chimico-fisiche, della tossicocinetica e delle modalità di interazione con i sistemi biologici rende difficile una generalizzazione degli effetti, evidenziando la necessità di approcci mirati allo studio di singoli composti.

In questo scenario, assume particolare rilevanza l'analisi di classi specifiche di interferenti endocrini caratterizzate da ampia diffusione e da un profilo tossicologico ancora non completamente definito. Tra queste, i plastificanti appartenenti alla famiglia dei ftalati rappresentano un esempio emblematico, in quanto combinano una esposizione ubiquitaria con una crescente evidenza di effetti biologici a livello sistemico [190]. Pertanto, l'approfondimento degli effetti di specifici composti all'interno di questa classe consente di integrare le conoscenze relative ai meccanismi generali con l'analisi dettagliata delle interazioni molecolari e cellulari.

CAPITOLO 3:

FTALATI COME INTERFERENTI ENDOCRINI EMERGENTI

3.1. CARATTERISTICHE E CLASSIFICAZIONE

Tra le numerose classi di interferenti endocrini di origine antropica, i ftalati rappresentano una delle categorie più diffuse e rilevanti dal punto di vista tossicologico, in ragione della loro ampia produzione industriale e del loro impiego in una vasta gamma di prodotti di consumo [191]. Dal punto di vista chimico, i ftalati sono diesteri dell'acido ftalico (benzene-1,2-dicarbossilico), nei quali i due gruppi carbossilici sono esterificati con catene alchiliche di lunghezza e grado di ramificazione variabili [192]. Questa diversità strutturale costituisce un determinante fondamentale delle loro proprietà chimico-fisiche, influenzandone il comportamento ambientale, la tossicocinetica e le modalità di interazione con i sistemi biologici [193].

In base alla lunghezza delle catene alchiliche, i ftalati vengono comunemente distinti in composti a basso e ad alto peso molecolare. I ftalati a basso peso molecolare, generalmente caratterizzati da catene alchiliche corte (C1–C4), presentano una maggiore pressione di vapore e una minore lipofilia, risultando più volatili e più facilmente distribuiti tra le diverse matrici ambientali [194]. Al contrario, i ftalati ad alto peso molecolare, dotati di catene alchiliche più lunghe (≥C5), mostrano una maggiore idrofobicità e una più elevata affinità per le matrici lipidiche e polimeriche, con conseguente ridotta volatilità e maggiore tendenza al bioaccumulo [195].

Dal punto di vista applicativo, i ftalati sono impiegati prevalentemente come plastificanti, ovvero additivi in grado di aumentare la flessibilità e la lavorabilità dei materiali polimerici, in particolare del polivinilcloruro (PVC). La loro funzione si basa sull'inserimento tra le catene polimeriche, riducendo le interazioni intermolecolari e aumentando la mobilità del materiale. Questa proprietà ha favorito il loro utilizzo in numerosi ambiti, tra cui imballaggi alimentari, dispositivi medici, rivestimenti, materiali da costruzione, giocattoli e prodotti per la cura personale [196].

Una caratteristica distintiva dei ftalati è rappresentata dalla loro assenza di legame covalente con la matrice polimerica. Essi sono infatti incorporati nei materiali attraverso interazioni fisiche deboli, condizione che ne determina una progressiva migrazione verso l'esterno. Il rilascio può avvenire attraverso diversi processi, tra cui volatilizzazione, abrasione meccanica e lisciviazione in presenza di fluidi, contribuendo alla contaminazione dei comparti ambientali quali aria, acqua e suolo [197].

Le proprietà chimico-fisiche dei ftalati, tra cui il coefficiente di ripartizione ottanolo/acqua (log K_ow), la pressione di vapore e la solubilità, rappresentano parametri chiave nel determinare il loro destino ambientale e biologico. In particolare, il log K_ow è indicativo della lipofilia del composto e della sua capacità di attraversare le membrane biologiche, mentre la pressione di vapore influisce sulla volatilità e sulla distribuzione tra fase gassosa e particolata. Tali caratteristiche, combinate con l'elevato volume di produzione, contribuiscono alla loro diffusione ubiquitaria e alla conseguente esposizione continua [198].

Nel loro insieme, queste proprietà rendono i ftalati una classe di composti chimicamente e funzionalmente eterogenea, in cui variazioni anche relativamente modeste nella struttura molecolare possono determinare differenze significative nel comportamento tossicocinetico e negli effetti biologici [199].

3.2. ESPOSIZIONE E DIFFUSIONE

L'ampia diffusione dei ftalati nei diversi comparti ambientali è strettamente correlata al loro utilizzo su larga scala e alla loro peculiare modalità di incorporazione nei materiali. Come già evidenziato, la mancanza di un legame covalente con le matrici polimeriche ne facilita la migrazione verso l'ambiente circostante, determinando un rilascio continuo nel corso dell'intero ciclo di vita dei prodotti che li contengono [200]. Tale rilascio può verificarsi durante la produzione, l'utilizzo, l'usura e lo smaltimento dei materiali, contribuendo a una contaminazione diffusa e persistente dal punto di vista dell'esposizione [201].

Le principali fonti di emissione comprendono sia processi industriali sia il rilascio da prodotti di consumo durante il loro impiego quotidiano. Materiali plastici, imballaggi alimentari, rivestimenti, dispositivi medici, materiali da costruzione, prodotti per la cura personale e cosmetici rappresentano sorgenti diffuse di contaminazione [202]. In particolare, l'utilizzo di ftalati in prodotti cosmetici e fragranze contribuisce in maniera significativa all'esposizione diretta, soprattutto per via dermica, mentre il loro impiego in materiali plastici e imballaggi può favorire il trasferimento verso alimenti e superfici di contatto [203]. Una volta rilasciati, i ftalati possono distribuirsi nei diversi comparti ambientali in funzione delle loro proprietà chimico-fisiche. I composti caratterizzati da maggiore volatilità tendono a essere presenti nella fase gassosa dell'atmosfera o adsorbiti al particolato, contribuendo alla contaminazione dell'aria, in particolare negli ambienti indoor [204]. Questi ultimi rappresentano un importante microambiente di esposizione, poiché la presenza di materiali contenenti ftalati, associata a una ventilazione spesso limitata, può determinare concentrazioni superiori rispetto agli ambienti esterni. Nel comparto acquatico, i ftalati derivano principalmente da effluenti industriali e urbani, inclusi quelli provenienti dagli impianti di trattamento delle acque reflue, che non sempre sono in grado di rimuoverli completamente. Di conseguenza, essi possono essere rilevati in acque superficiali, sedimenti e acque destinate all'irrigazione, con potenziale trasferimento agli organismi acquatici e agli ecosistemi terrestri [205]. Analogamente, nel suolo, la presenza di ftalati è associata sia a fonti dirette, come l'utilizzo di materiali plastici in ambito agricolo, sia a deposizione atmosferica, irrigazione con acque contaminate e applicazione di fanghi di depurazione [206].

La contaminazione del suolo assume particolare rilevanza anche in relazione al trasferimento dei ftalati lungo la catena alimentare. Le piante possono infatti assorbire questi composti dal terreno contaminato o dall'acqua di irrigazione attraverso l'apparato radicale, con successiva

traslocazione verso i tessuti vegetali [207]. L'entità di questo processo dipende da diversi fattori, tra cui le proprietà chimico-fisiche del singolo ftalato, la composizione del suolo, il contenuto di sostanza organica, la biodisponibilità del contaminante e le caratteristiche della specie vegetale considerata. Questo passaggio rappresenta una via attraverso cui contaminanti ambientali possono entrare nei prodotti agricoli destinati al consumo umano e animale, trasformando la contaminazione del comparto ambientale in una fonte concreta di esposizione alimentare. In tale prospettiva, la catena suolo–pianta–alimento–organismo costituisce un elemento centrale nella comprensione dell'esposizione ai ftalati. L'ingestione di alimenti contaminati non rappresenta quindi soltanto una conseguenza del contatto diretto con materiali plastici o imballaggi alimentari, ma può riflettere anche processi più ampi di trasferimento ambientale, nei quali i contaminanti presenti nel suolo e nell'acqua vengono progressivamente incorporati nelle matrici biologiche [208]. Tale dinamica evidenzia come l'esposizione alimentare sia il risultato dell'interazione tra contaminazione ambientale, pratiche agricole, trasformazione degli alimenti e materiali utilizzati lungo la filiera produttiva [207, 209].

La diffusione ambientale dei ftalati si riflette nella loro frequente rilevazione in matrici biologiche, quali sangue e urine, a conferma di una esposizione pressoché ubiquitaria nella popolazione umana e animale [210]. Tale esposizione è il risultato della combinazione di diverse vie di ingresso nell'organismo. L'ingestione rappresenta una delle principali modalità, attraverso il consumo di alimenti contaminati, il trasferimento dai materiali a contatto con gli alimenti e l'incorporazione dei contaminanti lungo la catena alimentare [211]. L'inalazione costituisce un'ulteriore via rilevante, soprattutto in ambienti indoor, dove i ftalati possono essere presenti sotto forma di vapori o associati al particolato atmosferico [212]. L'assorbimento cutaneo, infine, assume particolare importanza nel caso di prodotti cosmetici e per la cura personale, nei quali questi composti sono frequentemente utilizzati come solventi, plastificanti o agenti fissativi [213].

È importante sottolineare come, nonostante molti ftalati siano caratterizzati da una persistenza ambientale inferiore rispetto ad altri contaminanti organici persistenti, la loro continua immissione nell'ambiente determini una condizione di esposizione cronica. Questo fenomeno, spesso definito come "pseudo-persistenza", implica che la presenza dei ftalati nei diversi comparti ambientali sia mantenuta nel tempo non tanto dalla loro stabilità intrinseca, quanto dalla costante introduzione da fonti antropiche [214].

3.2.1. DINAMICHE DI TRASFERIMENTO DEI FTALATI NELLA FILIERA AGROALIMENTARE

Un aspetto particolarmente rilevante nella valutazione dell'esposizione ai ftalati è rappresentato dal loro possibile trasferimento lungo la catena suolo–pianta–alimento [215]. Sebbene l'esposizione alimentare venga spesso associata principalmente alla migrazione di questi composti da imballaggi e materiali plastici a contatto con gli alimenti, un contributo significativo può derivare anche dalla contaminazione ambientale delle matrici agricole [216]. In questo contesto, il suolo rappresenta un comparto chiave, poiché può agire sia come serbatoio di accumulo sia come fonte di rilascio secondario di ftalati verso le colture vegetali.

I ftalati possono raggiungere i suoli agricoli attraverso diverse vie, tra cui deposizione atmosferica, irrigazione con acque contaminate, utilizzo di fanghi di depurazione, degradazione di materiali plastici impiegati in agricoltura e rilascio da film plastici utilizzati per pacciamatura o coltivazioni in serra [217]. Una volta presenti nel suolo, questi composti possono interagire con la frazione organica e minerale della matrice, con una biodisponibilità variabile in funzione delle loro proprietà chimico-fisiche, del contenuto di sostanza organica, del pH, della granulometria e delle condizioni ambientali. Tali fattori influenzano la quota di contaminante effettivamente disponibile per l'assorbimento da parte delle piante [218].

L'ingresso dei ftalati nelle piante può avvenire principalmente attraverso l'apparato radicale, a partire dal suolo contaminato o dall'acqua di irrigazione. Dopo l'assorbimento, i composti possono essere trattenuti a livello radicale oppure traslocati verso le parti aeree attraverso il sistema xilematico [219]. In alcuni casi, soprattutto per composti più volatili o associati al particolato atmosferico, può contribuire anche la deposizione sulle superfici fogliari, seguita da assorbimento attraverso la cuticola o gli stomi [220]. Questo duplice meccanismo, radicale e fogliare, rende le colture vegetali un possibile punto di connessione tra contaminazione ambientale ed esposizione alimentare.

La capacità di accumulo non è uniforme tra le diverse tipologie di colture. I vegetali a foglia larga, come lattuga, spinaci, cavoli e altre Brassicaceae, possono risultare particolarmente rilevanti per l'esposizione alimentare, sia per l'ampia superficie esposta alla deposizione atmosferica sia per il consumo diretto della parte vegetativa [221]. Le colture a radice e tubero, come carote, patate, ravanelli e altri ortaggi ipogei, possono invece essere maggiormente influenzate dal contatto diretto con il suolo contaminato e dalla capacità dei composti di

concentrarsi nella zona radicale [222]. Anche cereali e colture erbacee possono contribuire all'esposizione, soprattutto quando coltivati in aree caratterizzate da contaminazione del suolo, irrigazione con acque contaminate o uso intensivo di materiali plastici agricoli [223].

In generale, la distribuzione dei ftalati all'interno della pianta dipende da un equilibrio complesso tra assorbimento, traslocazione, metabolismo e sequestro nei tessuti vegetali. Alcuni composti tendono a concentrarsi prevalentemente nelle radici, mentre altri possono essere trasferiti in misura variabile verso fusti, foglie o organi edibili. La maggiore o minore traslocazione dipende dalla lipofilia del composto, dalla sua solubilità, dalla struttura della pianta e dalla velocità di traspirazione [224]. Per questo motivo, la valutazione del rischio alimentare non può basarsi esclusivamente sulla concentrazione nel suolo, ma deve considerare anche la capacità specifica della coltura di assorbire e accumulare tali contaminanti.

Le differenze tra i singoli ftalati assumono comunque un ruolo importante nel determinare l'entità del trasferimento dal suolo alla pianta. I composti più idrofobici tendono generalmente ad associarsi maggiormente alla frazione organica del suolo e a essere trattenuti nelle radici, mentre quelli caratterizzati da maggiore mobilità possono risultare più disponibili nella fase acquosa e, in determinate condizioni, essere traslocati verso i tessuti aerei [225]. Tuttavia, tale comportamento non dipende esclusivamente dalle proprietà del contaminante, ma anche dalle caratteristiche della coltura, dalla fisiologia della pianta e dalle condizioni ambientali [224]. Di conseguenza, la valutazione del trasferimento alimentare dei ftalati richiede un approccio composto-specifico e matrice-specifico, capace di considerare simultaneamente contaminante, suolo e specie vegetale.

La rilevanza del trasferimento suolo–pianta–alimento diventa particolarmente evidente nei sistemi agricoli caratterizzati da elevato impiego di plastiche, come serre, pacciamatura plastica e sistemi intensivi di coltivazione [226]. In tali contesti, il rilascio progressivo di additivi plastici può contribuire alla contaminazione del suolo e delle colture, aumentando la probabilità di incorporazione dei ftalati nelle matrici alimentari [227]. Questo aspetto è rilevante non solo per gli alimenti vegetali destinati al consumo umano diretto, ma anche per le colture utilizzate nell'alimentazione animale, che possono rappresentare un ulteriore passaggio nella catena alimentare.

La catena suolo–pianta–alimento costituisce quindi una via di esposizione che amplia la prospettiva tradizionale sull'ingestione di ftalati [225]. L'esposizione alimentare non deriva

esclusivamente dal contatto diretto tra alimenti e materiali plastici durante produzione, conservazione o confezionamento, ma può originare già nelle fasi primarie della filiera agroalimentare [201]. In questa prospettiva, la contaminazione ambientale assume una dimensione biologica concreta, poiché i contaminanti presenti nel suolo e nell'acqua possono essere progressivamente incorporati nelle matrici vegetali e trasferiti agli organismi attraverso la dieta [228].

Questa dinamica conferma come l'esposizione alimentare ai ftalati debba essere interpretata come il risultato di processi interconnessi, che originano nei comparti ambientali e proseguono attraverso l'assorbimento vegetale, l'incorporazione nelle matrici alimentari e il consumo di alimenti contaminati. Una volta introdotti attraverso la dieta, tali composti entrano nei processi di assorbimento, distribuzione, biotrasformazione ed eliminazione che ne definiscono il profilo tossicocinetico e il potenziale impatto biologico.

3.3. TOSSICOCINETICA

La tossicocinetica dei ftalati è caratterizzata da assorbimento relativamente rapido, biotrasformazione estensiva ed eliminazione prevalentemente urinaria [229]. Questi processi determinano la dinamica dell'esposizione interna e influenzano in maniera significativa la biodisponibilità dei composti parentali e dei loro metaboliti. Sebbene molti ftalati siano generalmente considerati composti non persistenti, in virtù della loro rapida metabolizzazione ed escrezione, la continua introduzione nell'organismo attraverso fonti ambientali, alimentari e prodotti di uso quotidiano può determinare una condizione di esposizione ripetuta e pressoché continua [230].

Le principali vie di assorbimento includono ingestione, inalazione e assorbimento dermico, con contributi variabili in funzione delle proprietà chimico-fisiche del singolo composto e dello scenario di esposizione. La via orale rappresenta una modalità rilevante, soprattutto per i ftalati associati agli alimenti, sia in seguito al trasferimento da materiali plastici e imballaggi, sia attraverso processi più ampi di contaminazione ambientale lungo la catena suolo–pianta–alimento–organismo [231]. In questo senso, l'esposizione alimentare non riflette esclusivamente il contatto diretto con materiali a uso alimentare, ma può derivare anche dall'assorbimento dei contaminanti da parte delle piante e dalla loro successiva incorporazione nelle matrici alimentari. La via inalatoria assume particolare importanza per i composti più volatili o associati al particolato, soprattutto negli ambienti indoor, mentre l'assorbimento cutaneo è particolarmente rilevante per i ftalati presenti in cosmetici, fragranze e prodotti per la cura personale [232].

Una volta entrati nell'organismo, i ftalati vengono rapidamente sottoposti a processi di biotrasformazione. Il primo passaggio metabolico consiste generalmente nell'idrolisi enzimatica dei diesteri ad opera di esterasi presenti a livello intestinale, epatico e plasmatico, con formazione dei corrispondenti monoesteri [233]. Questi metaboliti rappresentano una fase importante del destino biologico dei ftalati, poiché possono presentare proprietà chimico-fisiche e attività biologiche differenti rispetto ai composti parentali. In molti casi, i monoesteri costituiscono i principali metaboliti utilizzati come biomarcatori di esposizione nelle matrici biologiche, in particolare nelle urine [234].

Successivamente alla formazione dei monoesteri, alcuni ftalati possono subire ulteriori trasformazioni ossidative, mediate prevalentemente da enzimi del sistema del citocromo P450

[235]. Queste reazioni portano alla produzione di metaboliti più polari, che possono essere ulteriormente coniugati, ad esempio mediante glucuronidazione, al fine di aumentarne l'idrosolubilità e facilitarne l'eliminazione. L'entità di tali processi dipende dalla struttura del composto: in generale, i ftalati ad alto peso molecolare tendono a generare una maggiore varietà di metaboliti ossidativi, mentre quelli a basso peso molecolare sono spesso eliminati principalmente sotto forma di monoesteri e relativi coniugati [236].

Il fegato svolge un ruolo centrale nella tossicocinetica dei ftalati, non solo come sede primaria di biotrasformazione, ma anche come organo in grado di modulare la natura e la quantità dei metaboliti circolanti [237]. Attraverso le reazioni di fase I e fase II, il metabolismo epatico contribuisce a definire il profilo di esposizione interna e, di conseguenza, il potenziale impatto biologico dei composti. Tuttavia, la biotrasformazione non coincide necessariamente con una completa detossificazione: in alcuni casi, i metaboliti possono mantenere attività biologica o contribuire direttamente agli effetti tossici, interferendo con pathways endocrini, metabolici e cellulari [238].

I metaboliti idrosolubili derivanti dalla biotrasformazione vengono eliminati principalmente attraverso il rene. L'escrezione renale avviene mediante filtrazione glomerulare e secrezione tubulare, processi che contribuiscono alla clearance dei composti e alla riduzione della loro permanenza nell'organismo [239]. Tuttavia, durante questa fase, le cellule tubulari renali possono essere esposte a concentrazioni relativamente elevate di metaboliti, soprattutto in condizioni di esposizione ripetuta. Tale esposizione può assumere rilevanza biologica, poiché il tubulo renale rappresenta un distretto metabolicamente attivo e sensibile a stress ossidativo, disfunzione mitocondriale e alterazioni dei sistemi di trasporto [240].

La rapida eliminazione dei ftalati e dei loro metaboliti non esclude quindi la possibilità di effetti biologici significativi [241]. Al contrario, in presenza di esposizione cronica o ripetuta, può instaurarsi un equilibrio dinamico tra assorbimento, biotrasformazione ed escrezione, nel quale l'organismo viene continuamente esposto a basse concentrazioni di composti parentali e metaboliti [242]. Questo aspetto è particolarmente rilevante per i ftalati a basso peso molecolare, che pur essendo generalmente metabolizzati ed eliminati rapidamente, possono contribuire in maniera sostanziale all'esposizione complessiva a causa del loro uso diffuso e quotidiano [243].

3.4. MECCANISMI D'AZIONE

I ftalati esercitano i loro effetti biologici attraverso una molteplicità di meccanismi, che riflettono la loro capacità di interferire con sistemi endocrini, metabolici e cellulari altamente regolati. Sebbene il profilo tossicologico dei singoli ftalati possa variare in funzione della struttura chimica, del peso molecolare, della via di esposizione e del metabolismo, numerose evidenze indicano che questa classe di composti agisce attraverso pathway convergenti, tra cui la modulazione della segnalazione ormonale, l'interferenza con recettori nucleari, l'induzione di stress ossidativo e l'attivazione di risposte infiammatorie [93].

Un primo meccanismo rilevante riguarda l'interferenza con la segnalazione endocrina. I ftalati possono alterare l'equilibrio ormonale attraverso effetti diretti o indiretti sui sistemi regolatori. In particolare, diversi composti appartenenti a questa classe sono stati associati a modificazioni della steroidogenesi, con alterazioni nella sintesi e nella disponibilità di ormoni sessuali. Tali effetti possono derivare dalla modulazione dell'espressione o dell'attività di enzimi coinvolti nella biosintesi ormonale, nonché dall'interferenza con recettori ormonali e pathways di trasduzione del segnale. Questo aspetto ha reso i ftalati particolarmente studiati nel contesto della tossicità riproduttiva e dello sviluppo, ma le loro implicazioni biologiche si estendono anche ad altri sistemi fisiologici [244].

Accanto alla classica interferenza endocrina, un ruolo centrale è svolto dalla capacità dei ftalati e dei loro metaboliti di interagire con recettori nucleari coinvolti nella regolazione del metabolismo. Tra questi, i peroxisome proliferator-activated receptors, in particolare PPARα e PPARγ, rappresentano uno dei principali bersagli molecolari. La modulazione di questi recettori può influenzare l'espressione di geni coinvolti nel metabolismo lipidico, nella β-ossidazione degli acidi grassi, nell'adipogenesi e nella risposta infiammatoria. Tale meccanismo è particolarmente rilevante per comprendere il legame tra esposizione a ftalati e alterazioni dell'omeostasi energetica, incluse disfunzioni del metabolismo lipidico e accumulo di trigliceridi a livello cellulare [245].

L'interazione con i recettori nucleari non riguarda esclusivamente i PPARs. Alcuni ftalati possono influenzare anche pathways regolati da recettori coinvolti nella detossificazione e nel metabolismo degli xenobiotici, come pregnane X receptor (PXR) e constitutive androstane receptor (CAR). La modulazione di questi sistemi può alterare l'espressione di enzimi di fase I e fase II, inclusi membri della famiglia del citocromo P450 e degli enzimi di coniugazione.

Questo determina una possibile interferenza con la biotrasformazione non solo dei ftalati stessi, ma anche di altri xenobiotici e molecole endogene, contribuendo a una risposta biologica complessa e sistemica [246].

Un ulteriore meccanismo ampiamente descritto è rappresentato dall'induzione di stress ossidativo. Il metabolismo dei ftalati può contribuire alla formazione di specie reattive dell'ossigeno, sia attraverso l'attivazione di sistemi enzimatici ossidativi sia mediante alterazioni della funzione mitocondriale. L'aumento dei ROS può compromettere l'equilibrio redox cellulare e determinare danni a lipidi, proteine e DNA. In particolare, la perossidazione lipidica costituisce uno degli eventi più rilevanti, poiché altera l'integrità delle membrane cellulari e degli organelli, contribuendo alla disfunzione cellulare [247].

La disfunzione mitocondriale rappresenta un punto di convergenza tra alterazione metabolica e stress ossidativo. I mitocondri, essendo centrali nella produzione di energia e nella regolazione del metabolismo cellulare, risultano particolarmente sensibili all'azione di composti in grado di interferire con l'omeostasi redox [248]. L'esposizione a ftalati può compromettere l'efficienza della catena di trasporto degli elettroni, favorendo la dispersione elettronica e la produzione di ROS. Questo può tradursi in una riduzione della capacità energetica cellulare e in una maggiore vulnerabilità allo stress [236].

Parallelamente allo stress ossidativo, i ftalati possono promuovere l'attivazione di pathways infiammatori. L'accumulo di ROS può attivare fattori di trascrizione sensibili allo stato redox, come NF-κB e AP-1, inducendo l'espressione di citochine pro-infiammatorie quali TNF-α, IL-6 e IL-1β. Questo processo contribuisce alla creazione di un microambiente pro-infiammatorio che può amplificare il danno cellulare e tissutale. L'interazione tra stress ossidativo e infiammazione rappresenta quindi un meccanismo chiave nella tossicità dei ftalati, soprattutto in condizioni di esposizione cronica o ripetuta [249].

Oltre ai meccanismi redox e infiammatori, i ftalati possono influenzare la regolazione dell'espressione genica attraverso modificazioni epigenetiche. Alterazioni della metilazione del DNA, modificazioni degli istoni e variazioni nell'espressione di microRNA possono modulare geni coinvolti nel metabolismo, nella risposta allo stress e nei processi infiammatori. Questi meccanismi possono contribuire alla persistenza degli effetti biologici anche dopo la cessazione dell'esposizione, soprattutto quando l'esposizione avviene durante finestre temporali caratterizzate da elevata plasticità biologica [250].

È importante sottolineare che i meccanismi di azione dei ftalati non devono essere considerati come eventi separati, ma come processi strettamente interconnessi. L'interferenza con i recettori nucleari può alterare il metabolismo lipidico e mitocondriale; la disfunzione metabolica può favorire la produzione di ROS; lo stress ossidativo può attivare pathways infiammatori; e l'infiammazione cronica può contribuire ulteriormente alla disfunzione tissutale. Questa rete di interazioni rende complessa l'interpretazione degli effetti biologici dei ftalati, soprattutto in condizioni di esposizione reale, dove gli organismi sono esposti a miscele di composti e a basse dosi ripetute nel tempo [245].

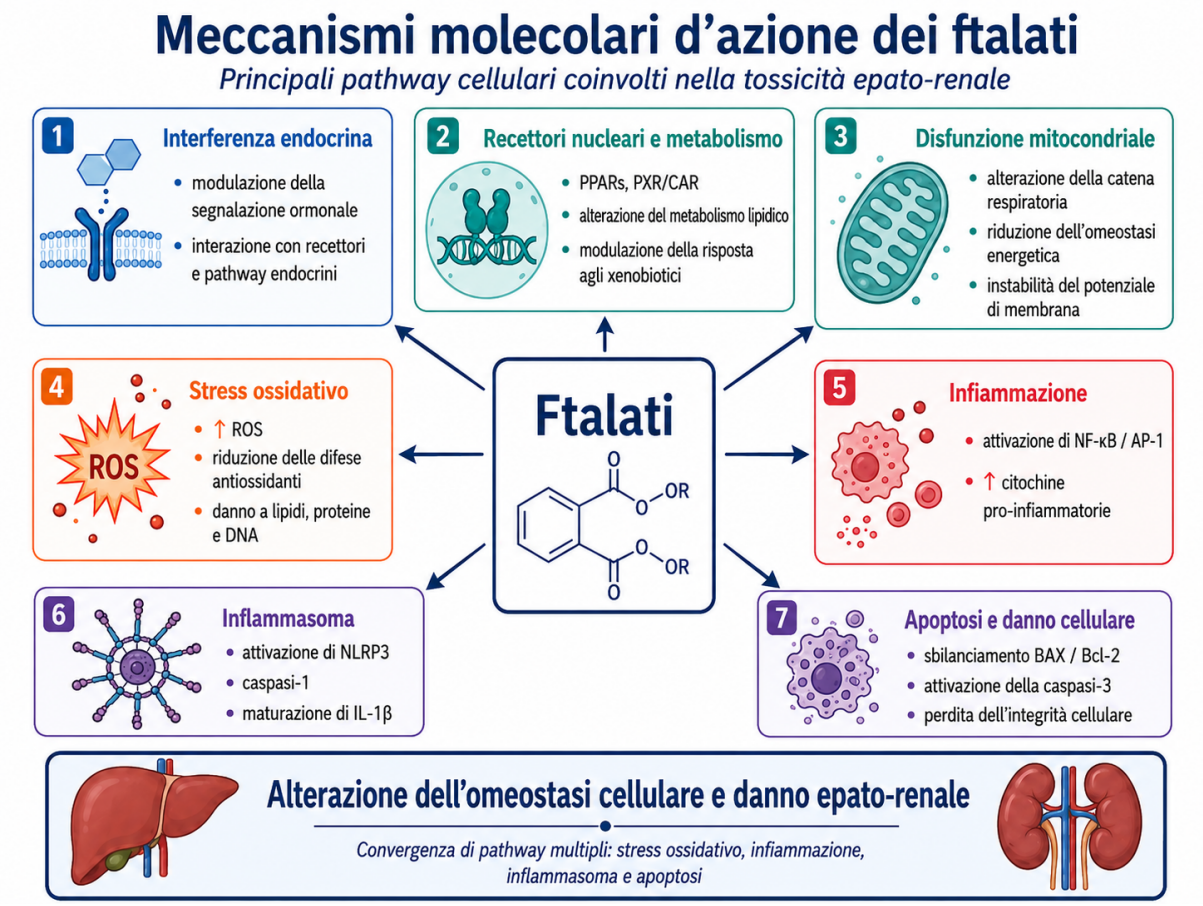


Figura 6 Meccanismi molecolari d'azione dei ftalati. *I ftalati possono alterare l'omeostasi cellulare attraverso pathway multipli e interconnessi, tra cui interferenza endocrina, modulazione di recettori nucleari coinvolti nel metabolismo, disfunzione mitocondriale, stress ossidativo, infiammazione, attivazione dell'inflammasoma e apoptosi. La convergenza di questi processi può contribuire al danno cellulare e tissutale, con particolare rilevanza per organi coinvolti nel metabolismo e nell'eliminazione degli xenobiotici, quali fegato e rene.*

3.5. EFFETTI BIOLOGICI

Gli effetti biologici dei ftalati riflettono la loro capacità di interferire con numerosi processi fisiologici, attraverso meccanismi che coinvolgono la segnalazione endocrina, il metabolismo cellulare, lo stato redox e la risposta infiammatoria. Sebbene il profilo tossicologico possa variare in funzione del singolo composto, della dose, della via di esposizione e della durata del trattamento, l'esposizione ai ftalati è stata associata a una vasta gamma di alterazioni biologiche, che interessano diversi sistemi dell'organismo [251].

Storicamente, l'attenzione scientifica verso i ftalati si è concentrata soprattutto sui loro effetti a livello del sistema riproduttivo. Numerosi composti appartenenti a questa classe sono stati infatti associati ad alterazioni della steroidogenesi, modificazioni della produzione di androgeni ed estrogeni, riduzione della qualità spermatica e alterazioni dello sviluppo dell'apparato riproduttivo [252]. Tali effetti sono particolarmente rilevanti durante le fasi critiche dello sviluppo, nelle quali la corretta regolazione ormonale è essenziale per il differenziamento dei tessuti e per la maturazione funzionale degli organi. Oltre alla tossicità riproduttiva, i ftalati sono stati progressivamente associati a effetti sul metabolismo energetico. La loro capacità di modulare recettori nucleari coinvolti nella regolazione lipidica e glucidica suggerisce un possibile contributo allo sviluppo di alterazioni metaboliche, tra cui aumento dell'adipogenesi, alterazione della sensibilità insulinica e modificazioni del metabolismo lipidico. In questo contesto, alcuni ftalati sono stati descritti come potenziali "obesogeni", ossia composti capaci di favorire l'accumulo di massa adiposa e di interferire con i meccanismi che regolano il bilancio energetico [253].

Il fegato rappresenta uno degli organi maggiormente coinvolti negli effetti biologici dei ftalati, in quanto sede primaria della loro biotrasformazione e organo centrale nella regolazione metabolica. L'esposizione a questi composti può contribuire ad alterazioni del metabolismo lipidico epatico, con accumulo intracellulare di lipidi, disfunzione mitocondriale e incremento dello stress ossidativo. Questi eventi possono favorire lo sviluppo di steatosi e di condizioni caratterizzate da infiammazione epatica a bassa intensità. In tale prospettiva, il fegato non rappresenta soltanto il sito di metabolismo dei ftalati, ma anche un possibile bersaglio funzionale della loro azione tossica [254].

Anche il rene può essere coinvolto negli effetti biologici dei ftalati, soprattutto in relazione alla sua funzione di eliminazione dei metaboliti idrosolubili. Le cellule tubulari renali possono

essere esposte a concentrazioni relativamente elevate di metaboliti durante i processi di filtrazione e secrezione, rendendole sensibili a stress ossidativo, disfunzione mitocondriale e attivazione infiammatoria. Questi meccanismi possono contribuire ad alterazioni della funzionalità renale e a modificazioni strutturali del tessuto, soprattutto in condizioni di esposizione cronica o ripetuta [255].

Un ulteriore ambito di interesse riguarda gli effetti dei ftalati sul sistema immunitario. L'esposizione a questi composti è stata associata alla modulazione della produzione di citochine, all'attivazione di pathways infiammatori e a modificazioni della risposta immunitaria innata e adattativa. Tali effetti possono contribuire allo sviluppo di uno stato infiammatorio persistente, che agisce come fattore di amplificazione del danno in diversi tessuti [256]. La stretta interazione tra infiammazione, stress ossidativo e metabolismo rappresenta quindi un elemento centrale per comprendere la complessità degli effetti biologici dei ftalati. I ftalati sono stati inoltre implicati in alterazioni dello sviluppo e della funzione neuroendocrina. Durante le fasi precoci della vita, l'esposizione a interferenti endocrini può influenzare processi di neurogenesi, differenziamento cellulare e maturazione dei circuiti neuronali, attraverso l'interferenza con segnali ormonali essenziali per lo sviluppo del sistema nervoso. Sebbene tali aspetti non rappresentino il focus principale di questa tesi, essi contribuiscono a evidenziare la natura sistemica degli effetti associati a questa classe di composti [257].

Un elemento trasversale a molti degli effetti descritti è rappresentato dalla dipendenza dalla finestra temporale di esposizione. L'impatto biologico dei ftalati può infatti variare significativamente in relazione al periodo della vita in cui avviene l'esposizione. Fasi quali lo sviluppo prenatale, l'infanzia e la pubertà rappresentano momenti di particolare suscettibilità, nei quali anche perturbazioni endocrine di lieve entità possono determinare conseguenze durature. Al contrario, nell'adulto, gli effetti possono manifestarsi più frequentemente come alterazioni metaboliche, infiammatorie o funzionali, spesso associate a esposizioni croniche a basse dosi [258]. È importante sottolineare che gli effetti biologici dei ftalati non sono necessariamente riconducibili a un singolo meccanismo o a un unico organo bersaglio. Piuttosto, essi derivano dall'interazione tra proprietà chimico-fisiche del composto, metabolismo, formazione di metaboliti attivi, suscettibilità individuale e condizioni di esposizione. Inoltre, nella realtà ambientale, l'esposizione ai ftalati avviene raramente in forma isolata, ma si inserisce in un contesto di miscele complesse di contaminanti, che possono modulare o amplificare gli effetti osservati [259].

3.6. LOW-MW FTALATI

All'interno della famiglia dei ftalati, i composti a basso peso molecolare rappresentano un gruppo di particolare interesse tossicologico, soprattutto in relazione alla loro ampia diffusione nei prodotti di consumo e alla frequenza con cui contribuiscono all'esposizione quotidiana. A differenza dei ftalati ad alto peso molecolare, prevalentemente impiegati come plastificanti in materiali polimerici, i ftalati a basso peso molecolare trovano largo impiego anche in prodotti non plastici, quali cosmetici, profumi, fragranze, lozioni, deodoranti e altri prodotti per la cura personale. Questa differenza di utilizzo determina scenari di esposizione peculiari, nei quali le vie dermica e inalatoria assumono un ruolo particolarmente rilevante [260].

Dal punto di vista chimico-fisico, i ftalati a basso peso molecolare sono generalmente caratterizzati da catene alchiliche più corte, maggiore volatilità e minore lipofilia rispetto ai ftalati ad alto peso molecolare. Queste proprietà ne influenzano sia il comportamento ambientale sia la tossicocinetica. La maggiore volatilità favorisce la loro presenza nell'aria indoor e nei composti associati alle fragranze, mentre la minore lipofilia contribuisce a una più rapida biotrasformazione ed eliminazione. Tuttavia, la loro rapida escrezione non deve essere interpretata come sinonimo di assenza di rischio, poiché l'impiego frequente e continuativo in prodotti di uso quotidiano può determinare un'esposizione ripetuta e pressoché costante [261].

Tra i principali ftalati a basso peso molecolare rientrano dimethyl phthalate, Dietil Ftalato, di-n-butyl phthalate e diisobutyl phthalate. Questi composti condividono alcune caratteristiche generali, ma presentano anche differenze rilevanti in termini di utilizzo, metabolismo e profilo tossicologico. Ad esempio, alcuni di essi sono maggiormente associati all'industria cosmetica e alle fragranze, mentre altri sono stati utilizzati in materiali plastici, adesivi, inchiostri o rivestimenti. Questa eterogeneità rende necessario valutare i singoli composti separatamente, evitando di attribuire all'intero gruppo un profilo biologico uniforme [262].

Un aspetto particolarmente rilevante riguarda il fatto che i ftalati a basso peso molecolare sono spesso considerati composti non persistenti, poiché vengono rapidamente metabolizzati ed eliminati attraverso le urine. Tuttavia, questa caratteristica può risultare fuorviante se non viene interpretata nel contesto dell'esposizione reale. Infatti, la loro presenza continua nei prodotti di consumo e negli ambienti indoor può determinare un flusso costante di esposizione, dando luogo a una condizione di pseudo-persistenza biologica. In altre parole, anche composti con

breve emivita possono mantenere una rilevanza tossicologica significativa quando l'assorbimento è ripetuto nel tempo [263].

Dal punto di vista biologico, i ftalati a basso peso molecolare sono stati associati a diversi effetti avversi, sebbene il livello di caratterizzazione vari considerevolmente tra le diverse molecole. Le evidenze disponibili indicano un possibile coinvolgimento in alterazioni endocrine, stress ossidativo, modulazione della risposta infiammatoria e interferenza con processi metabolici. Tuttavia, rispetto ad altri ftalati maggiormente studiati, come il DEHP, il profilo tossicologico di alcuni composti a basso peso molecolare risulta ancora meno definito, soprattutto per quanto riguarda gli effetti su organi metabolicamente attivi e coinvolti nella gestione degli xenobiotici [39].

Questa lacuna conoscitiva assume particolare importanza se si considera che l'esposizione ai ftalati a basso peso molecolare avviene spesso in maniera quotidiana, attraverso l'uso ripetuto di prodotti di largo consumo. Inoltre, tali composti possono contribuire in modo significativo all'esposizione complessiva a miscele di ftalati, rendendo difficile attribuire gli effetti osservati a una singola molecola. La co-esposizione a più ftalati e ad altri interferenti endocrini può infatti generare risposte biologiche complesse, nelle quali effetti additivi o sinergici non sono facilmente prevedibili sulla base dello studio dei singoli composti [264].

In questo contesto, emerge la necessità di approfondire lo studio dei ftalati a basso peso molecolare mediante approcci sperimentali mirati, capaci di chiarire non solo la loro tossicocinetica, ma anche i meccanismi cellulari e tissutali coinvolti nella loro azione biologica. Particolare attenzione deve essere rivolta agli organi che partecipano ai processi di biotrasformazione ed eliminazione, come fegato e rene, poiché rappresentano siti privilegiati di interazione tra il composto, i suoi metaboliti e la risposta dell'organismo [193].

Alla luce di queste considerazioni, i ftalati a basso peso molecolare non possono essere considerati semplicemente alternative meno problematiche rispetto ai ftalati ad alto peso molecolare, ma devono essere valutati come composti dotati di specifiche proprietà biologiche e tossicologiche. Tra questi, il Dietil Ftalato rappresenta un caso di particolare interesse, poiché il suo utilizzo diffuso, soprattutto in prodotti cosmetici e fragranze, contrasta con una conoscenza ancora parziale dei suoi effetti a livello cellulare e d'organo.

3.7. DIETIL FTALATO

Tra i ftalati a basso peso molecolare, il Dietil Ftalato (DEP) rappresenta uno dei composti maggiormente utilizzati in ambito industriale e nei prodotti di consumo, pur rimanendo, al contempo, relativamente meno caratterizzato dal punto di vista tossicologico rispetto ad altri membri della stessa classe. Il DEP è impiegato principalmente come solvente e agente fissativo, in particolare nell'industria cosmetica e nella formulazione di fragranze, dove contribuisce a stabilizzare i composti aromatici e a prolungarne la persistenza [193]. Tale utilizzo diffuso si traduce in una esposizione frequente e continuativa, spesso quotidiana, che interessa ampie fasce della popolazione attraverso diverse vie, tra cui il contatto dermico, l'inalazione di composti volatili e, in misura minore, l'ingestione [213].

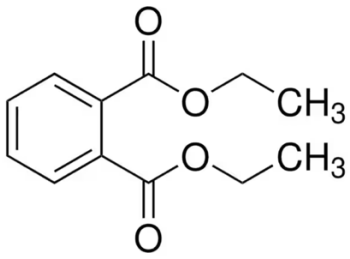


Figura 7 Struttura chimica del Dietil Ftalato (DEP). *Rappresentazione della struttura molecolare del Dietil Ftalato (DEP)*

Dal punto di vista chimico, il DEP (Fig. 7) è costituito da due gruppi etilici esterificati all'acido ftalico, configurazione che ne determina proprietà chimico-fisiche peculiari, tra cui una buona solubilità in solventi organici e una moderata volatilità [265]. Queste caratteristiche, unitamente alla sua natura non covalentemente legata alle matrici polimeriche, ne facilitano il rilascio nell'ambiente e la conseguente dispersione nei diversi comparti ambientali [261]. La presenza del DEP è stata infatti documentata in aria, polveri domestiche e numerosi prodotti di uso quotidiano, confermando la sua ampia distribuzione e il potenziale per una esposizione cronica a basse dosi [266].

Una volta assorbito, il DEP è rapidamente soggetto a processi di biotrasformazione enzimatica che ne determinano la conversione nel principale metabolita, il monoetil ftalato (MEP), attraverso reazioni di idrolisi mediate da esterasi [267]. Questo passaggio rappresenta una fase importante nella definizione del destino biologico del composto, in quanto il metabolita può presentare proprietà chimico-fisiche e attività biologiche differenti rispetto alla molecola parentale. Successivamente, ulteriori reazioni ossidative contribuiscono alla formazione di

metaboliti secondari più polari, facilitandone l'eliminazione attraverso le vie escretorie. Nonostante la relativa rapidità di questi processi, la continua esposizione al DEP può determinare una presenza persistente del composto e dei suoi metaboliti nei fluidi biologici, come dimostrato dalla loro frequente rilevazione nelle urine umane, rendendo il monoetil ftalato un biomarcatore comunemente utilizzato per valutare l'esposizione a questo composto [268].

Dal punto di vista tossicologico, il DEP è stato a lungo considerato un composto a bassa pericolosità rispetto ad altri ftalati più studiati; tuttavia, evidenze più recenti suggeriscono che tale classificazione potrebbe essere riduttiva. Studi sperimentali hanno infatti evidenziato la capacità del DEP e dei suoi metaboliti di indurre una serie di alterazioni a livello cellulare, che coinvolgono processi fondamentali per il mantenimento dell'omeostasi [266]. Tra questi, uno dei meccanismi maggiormente riportati è rappresentato dall'induzione di stress ossidativo, mediato dall'aumento della produzione di specie reattive dell'ossigeno (ROS) e dalla concomitante riduzione delle difese antiossidanti cellulari [269]. Questo squilibrio redox può determinare danni a macromolecole cellulari, tra cui lipidi, proteine e DNA, contribuendo all'insorgenza di disfunzioni cellulari.

Parallelamente, il DEP è stato associato alla modulazione della risposta infiammatoria, attraverso l'attivazione di pathways intracellulari che portano alla produzione di citochine pro-infiammatorie. L'interazione tra stress ossidativo e infiammazione rappresenta un elemento chiave nella comprensione degli effetti biologici di questo composto, suggerendo l'esistenza di un meccanismo integrato di danno cellulare. Inoltre, alcuni studi hanno evidenziato la capacità del DEP di interferire con la regolazione del metabolismo energetico e lipidico, probabilmente attraverso l'interazione con recettori nucleari e la modulazione dell'espressione genica, sebbene tali aspetti risultino ancora poco caratterizzati [270].

Un ulteriore elemento di complessità è rappresentato dalla variabilità dei risultati presenti in letteratura, spesso legata alle differenze nei modelli sperimentali utilizzati, nelle concentrazioni testate e nelle condizioni di esposizione. In molti casi, infatti, gli studi sono stati condotti utilizzando dosi relativamente elevate o condizioni acute, che non riflettono necessariamente l'esposizione cronica a basse dosi tipica della popolazione generale [271]. Questa discrepanza limita la possibilità di estrapolare conclusioni definitive sul reale impatto del DEP sulla salute, evidenziando la necessità di studi che considerino condizioni sperimentali più rappresentative dell'esposizione ambientale.

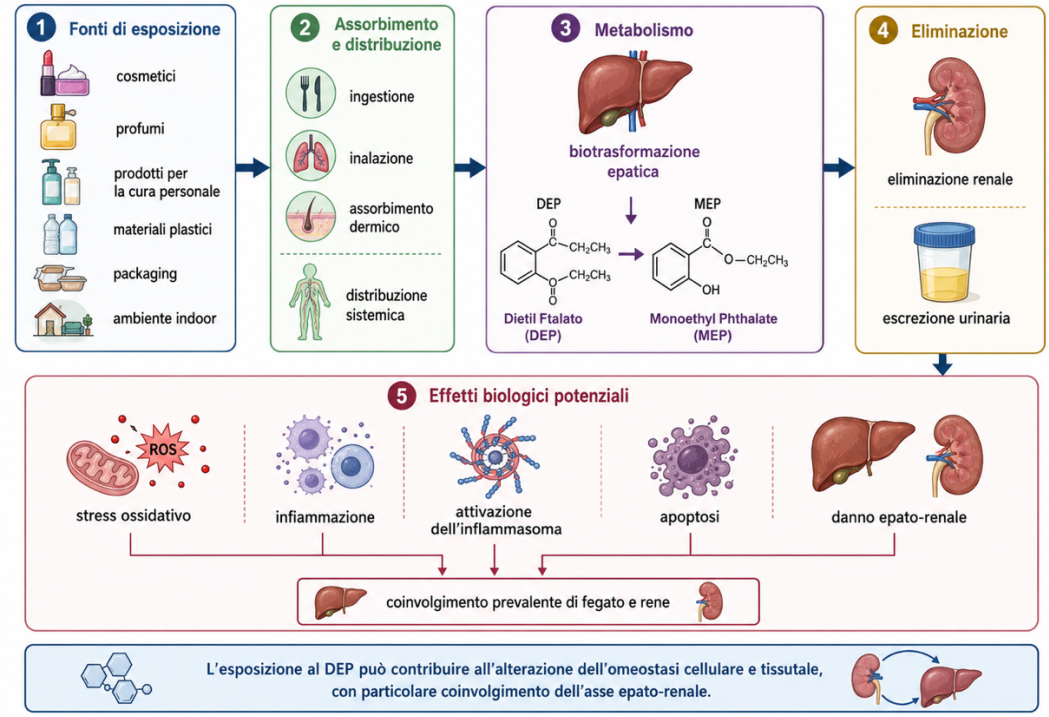


Figura 8 Dietil Ftalato: esposizione, metabolismo ed effetti biologici. Il Dietil Ftalato (DEP) è un ftalato a basso peso molecolare ampiamente utilizzato in prodotti di consumo e formulazioni industriali. Dopo l'assorbimento, il DEP può essere metabolizzato principalmente a livello epatico e successivamente eliminato per via urinaria. L'esposizione a questo composto può contribuire all'attivazione di processi cellulari associati a stress ossidativo, infiammazione, apoptosi e danno epato-renale.

Inoltre, la maggior parte delle conoscenze attualmente disponibili deriva da studi condotti in modelli in vitro o in vivo in maniera indipendente, con una limitata integrazione tra i diversi approcci sperimentali. Questo aspetto rappresenta una ulteriore lacuna, in quanto la comprensione completa degli effetti biologici del DEP richiede un'analisi che integri dati a livello cellulare, tissutale e sistemico. In particolare, l'identificazione dei meccanismi molecolari alla base della sua attività biologica risulta fondamentale per chiarire come l'esposizione a questo composto possa tradursi in alterazioni funzionali e strutturali a livello degli organi bersaglio [272].

Alla luce di queste considerazioni, emerge chiaramente la necessità di approfondire in maniera sistematica il profilo tossicologico del DEP, con particolare attenzione ai meccanismi cellulari e molecolari coinvolti e alle conseguenze derivanti da esposizioni croniche a basse dosi. In questo contesto, assume particolare rilevanza lo studio degli organi maggiormente coinvolti nei processi di biotrasformazione e nella risposta agli xenobiotici, che rappresentano i principali siti di interazione tra il composto e l'organismo.

3.8. APPROCCI SPERIMENTALI INTEGRATI PER LO STUDIO DELLA TOSSICITÀ DEGLI FTALATI

Lo studio della tossicità dei ftalati, così come più in generale degli interferenti endocrini, richiede l'impiego di approcci sperimentali in grado di cogliere la complessità dei loro effetti biologici. Questi composti non agiscono esclusivamente attraverso meccanismi citotossici diretti, ma modulano pathway endocrini, metabolici, redox e infiammatori, spesso con effetti dipendenti dalla dose, dalla durata dell'esposizione, dal tipo cellulare, dal metabolismo e dal contesto fisiologico dell'organismo. Per questo motivo, l'interpretazione dei risultati ottenuti da un singolo modello sperimentale può risultare limitata, rendendo particolarmente utile l'integrazione tra sistemi cellulari e modelli animali.

I modelli in vitro rappresentano strumenti fondamentali per lo studio dei meccanismi cellulari alla base della tossicità dei ftalati. L'impiego di colture cellulari consente di controllare in maniera precisa le condizioni sperimentali, quali concentrazione del composto, durata dell'esposizione e caratteristiche del microambiente di coltura. Questo permette di valutare in modo diretto specifici endpoint biologici, tra cui vitalità cellulare, produzione di specie reattive dell'ossigeno, alterazioni mitocondriali, modulazione della risposta infiammatoria e, nel caso di cellule epatiche, eventuali modificazioni del metabolismo lipidico.

In questo contesto, l'utilizzo di linee cellulari di diversa origine tissutale consente di distinguere, almeno in parte, la risposta diretta di specifici distretti cellulari. Le HepG2, derivate da epatocarcinoma umano, rappresentano un modello ampiamente utilizzato per lo studio della tossicità epatica, poiché mantengono alcune caratteristiche funzionali degli epatociti, inclusa la capacità di rispondere a stress metabolici e ossidativi. Pur non riproducendo pienamente la complessità del fegato in vivo, esse permettono di indagare in maniera controllata gli effetti diretti dei composti su cellule di origine epatica.

Accanto alle HepG2, le cellule HEK rappresentano un modello utile per valutare la risposta cellulare in un contesto renale. Sebbene le HEK non riproducano integralmente la complessità del nefrone né le caratteristiche funzionali altamente specializzate delle cellule tubulari renali mature, esse costituiscono un sistema sperimentale pratico e riproducibile per analizzare endpoint cellulari generali, quali vitalità, stress ossidativo e risposta infiammatoria, in cellule di origine renale. Il loro impiego consente quindi di affiancare al modello epatico un

riferimento cellulare renale, coerente con il ruolo del rene nei processi di escrezione e nella risposta agli xenobiotici.

Tuttavia, i modelli cellulari presentano limiti importanti che devono essere considerati nell'interpretazione dei risultati. Le cellule in coltura non riproducono completamente la complessità del tessuto di origine, in quanto mancano dell'organizzazione tridimensionale, delle interazioni tra diverse popolazioni cellulari e del contributo del sistema immunitario, vascolare ed endocrino. Inoltre, alcune linee cellulari possono mostrare una capacità metabolica ridotta o alterata rispetto ai tessuti in vivo. Questo aspetto è particolarmente rilevante nello studio dei ftalati, poiché la biotrasformazione del composto parentale e la formazione di metaboliti attivi rappresentano passaggi centrali nella definizione del profilo tossicologico.

I modelli in vivo, al contrario, consentono di valutare gli effetti dei ftalati all'interno di un organismo completo, nel quale assorbimento, distribuzione, metabolismo ed escrezione concorrono a determinare l'esposizione interna. Nel presente contesto, il modello murino permette di analizzare la risposta biologica a livello sistemico, considerando simultaneamente la biotrasformazione epatica, l'eliminazione renale, la regolazione endocrina, la risposta immunitaria e le interazioni tra organi. Questo approccio risulta particolarmente rilevante per valutare gli effetti degli interferenti endocrini su fegato e rene, che rappresentano due organi centrali nella gestione degli xenobiotici.

Anche i modelli animali, tuttavia, presentano alcune criticità. La maggiore complessità biologica comporta una maggiore variabilità dei risultati, legata a fattori quali specie, sesso, età, stato fisiologico, dieta e condizioni sperimentali. Inoltre, la risposta osservata in vivo deriva dall'interazione tra numerosi sistemi biologici, rendendo talvolta difficile distinguere gli effetti diretti del composto da quelli secondari o adattativi. A ciò si aggiunge la necessità di considerare le differenze specie-specifiche nei processi metabolici, che possono influenzare la traslazione dei risultati all'uomo.

Alla luce di questi elementi, la discrepanza talvolta osservata tra studi in vitro e in vivo non deve essere interpretata necessariamente come una contraddizione, ma come il riflesso della diversa scala biologica indagata. I modelli cellulari permettono di isolare meccanismi specifici e di identificare risposte dirette a livello cellulare, mentre i modelli animali consentono di valutare se e come tali risposte si manifestino in un contesto fisiologico più complesso.

L'integrazione dei due approcci risulta quindi particolarmente utile nello studio degli interferenti endocrini, nei quali l'effetto finale dipende dall'interazione tra esposizione, metabolismo, risposta tissutale e regolazione sistemica.

Nel contesto della tossicità da ftalati, tale integrazione consente di collegare gli eventi molecolari osservati a livello cellulare con le alterazioni funzionali e strutturali rilevabili a livello d'organo. In particolare, l'utilizzo combinato di modelli cellulari epatici e renali, insieme a un modello murino, permette di approfondire il contributo dello stress ossidativo, della risposta infiammatoria e delle alterazioni metaboliche nel determinare il danno epatico e renale. Questo approccio integrato rappresenta quindi una strategia metodologica particolarmente adatta per chiarire il profilo tossicologico di composti ampiamente diffusi ma ancora non completamente caratterizzati.

Aspetto	*Modelli in vitro:* *HepG2 e HEK*	*Modello in vivo:* *topo*
Controllo sperimentale	Elevato; consente di controllare concentrazione, durata dell'esposizione e condizioni del microambiente cellulare.	Più limitato, poiché la risposta dipende da variabili sistemiche e fisiologiche.
Rilevanza per organo bersaglio	HepG2 consentono di studiare risposte cellulari di origine epatica; HEK permettono di valutare endpoint cellulari in un contesto renale.	Consente di valutare fegato e rene come organi integrati in un organismo completo.
Studio dei meccanismi cellulari	Utile per valutare vitalità, stress ossidativo, disfunzione mitocondriale, infiammazione e alterazioni metaboliche cellulari.	Utile per verificare se i meccanismi osservati in vitro si manifestano anche a livello tissutale e sistemico.
Metabolismo del composto	Parziale e dipendente dalla linea cellulare utilizzata; può non riprodurre completamente la biotrasformazione in vivo.	Più completo; include assorbimento, distribuzione, metabolismo epatico ed escrezione renale.
Interazione tra organi	Assente; non consente di valutare asse fegato–rene o regolazione sistemica.	Presente; permette di analizzare interazioni tra metabolismo epatico, eliminazione renale, risposta endocrina e immunitaria.
Rilevanza fisiologica	Limitata rispetto al tessuto integro, per assenza di architettura tissutale, vascolarizzazione e microambiente complesso.	Maggiore, ma influenzata da differenze specie-specifiche rispetto all'uomo.
Variabilità sperimentale	Generalmente ridotta e maggiormente controllabile.	Maggiore, legata a sesso, età, stato fisiologico, dieta, metabolismo individuale e condizioni sperimentali.
Limiti principali	Assenza di complessità sistemica, risposta immunitaria completa, interazione tra cellule diverse e funzione d'organo integrata.	Maggiore complessità interpretativa e difficoltà nel distinguere effetti diretti, indiretti e adattativi.

Tabella 1 Vantaggi e limiti dei modelli in vitro e in vivo nello studio della tossicità da ftalait

SCOPO DELLA TESI

Negli ultimi anni, l'attenzione nei confronti degli interferenti endocrini emergenti è progressivamente aumentata a causa della loro ampia diffusione ambientale, della molteplicità delle vie di esposizione e della capacità di interferire con processi biologici fondamentali anche a concentrazioni relativamente basse. Tra questi composti, i ftalati rappresentano una classe di contaminanti di particolare interesse tossicologico, in quanto largamente utilizzati in numerosi prodotti di consumo e frequentemente rilevati in matrici ambientali e biologiche. Sebbene alcuni ftalati ad alto peso molecolare siano stati ampiamente studiati, le conoscenze relative agli effetti biologici dei ftalati a catena corta, come il Dietil Ftalato (DEP), risultano ancora parziali e meritevoli di ulteriori approfondimenti.

Il DEP è comunemente impiegato come solvente, fissativo e plastificante in diversi prodotti di uso quotidiano, inclusi cosmetici, fragranze, materiali plastici e formulazioni industriali. La sua ampia diffusione rende possibile un'esposizione continua o ripetuta attraverso diverse vie, tra cui assorbimento dermico, inalazione e ingestione. Nonostante venga spesso considerato meno persistente rispetto ad altri ftalati, il DEP può comunque rappresentare un potenziale fattore di rischio biologico, soprattutto in relazione alla sua capacità di indurre alterazioni cellulari e molecolari non sempre immediatamente evidenti attraverso i tradizionali endpoint tossicologici.

Alla luce di queste considerazioni, lo scopo della presente tesi è stato quello di valutare gli effetti del Dietil Ftalato sull'asse epato-renale, con particolare attenzione ai meccanismi di stress ossidativo, infiammazione, apoptosi e attivazione dell'inflammasoma. La scelta di focalizzare l'attenzione su fegato e rene deriva dal ruolo centrale di questi organi nei

processi di metabolismo, biotrasformazione, detossificazione ed eliminazione degli xenobiotici. Il fegato rappresenta infatti il principale compartimento deputato alla trasformazione metabolica dei composti esogeni, mentre il rene svolge una funzione essenziale nell'escrezione dei metaboliti e nel mantenimento dell'omeostasi sistemica.

L'obiettivo generale della tesi è stato quindi quello di caratterizzare il potenziale effetto tossicologico del DEP attraverso un approccio sperimentale integrato, combinando analisi in vivo e in vitro. Nel modello in vivo, l'attenzione è stata rivolta alla valutazione delle alterazioni istopatologiche, del rimodellamento tissutale, dell'apoptosi e dell'espressione di marker

associati alla risposta infiammatoria e al pathway dell'inflammasoma nei tessuti epatici e renali. Tale approccio ha permesso di analizzare il danno indotto dal DEP in un contesto tissutale complesso, considerando non solo le alterazioni morfologiche, ma anche i processi cellulari e molecolari ad esse associati.

Parallelamente, gli studi in vitro sono stati condotti utilizzando cellule HepG2 e HEK-293, rispettivamente come modelli cellulari rappresentativi del compartimento epatico e renale. In questi modelli, l'esposizione al DEP è stata valutata attraverso saggi di vitalità cellulare, analisi della produzione intracellulare di specie reattive dell'ossigeno e quantificazione di mediatori infiammatori rilasciati nel surnatante cellulare. L'utilizzo dei modelli cellulari ha consentito di approfondire, in condizioni sperimentali controllate, alcuni dei principali eventi biologici associati alla risposta al composto, contribuendo a chiarire il possibile legame tra citotossicità, stress ossidativo e infiammazione.

In particolare, la tesi si è proposta di verificare se l'esposizione al DEP fosse in grado di compromettere la vitalità cellulare, alterare lo stato redox intracellulare, modulare il profilo citochinico e attivare pathways associati alla morte cellulare e alla risposta infiammatoria. Un ulteriore obiettivo è stato quello di valutare il possibile coinvolgimento dell'asse NLRP3/Caspase-3/IL-1β, considerato un elemento chiave nell'interazione tra stress cellulare, infiammazione e danno tissutale.

Nel complesso, lo scopo della presente tesi è stato quello di contribuire alla caratterizzazione tossicologica del DEP, fornendo una visione integrata dei suoi effetti sull'asse epato-renale. L'approccio adottato ha permesso di analizzare il composto non solo in termini di citotossicità, ma anche come potenziale modulatore di processi biologici più complessi, quali stress ossidativo, infiammazione, apoptosi e rimodellamento tissutale. I risultati ottenuti possono contribuire ad ampliare le conoscenze sugli effetti dei ftalati a catena corta e supportare l'importanza di includere endpoint cellulari e molecolari sensibili nella valutazione del rischio associato agli interferenti endocrini emergenti.

CAPITOLO 4:

MATERIALI E METODI

4.1 DISEGNO SPERIMENTALE GENERALE

Il presente studio è stato progettato con l'obiettivo di valutare gli effetti biologici del Dietil Ftalato (DEP), un ftalato a basso peso molecolare ampiamente utilizzato in prodotti di consumo e ancora non completamente caratterizzato dal punto di vista tossicologico. L'approccio sperimentale è stato strutturato integrando modelli in vivo e in vitro, al fine di analizzare gli effetti del composto sia a livello sistemico sia a livello cellulare.

La scelta di combinare un modello animale con modelli cellulari deriva dalla necessità di indagare la tossicità del DEP secondo una prospettiva integrata. Lo studio in vivo consente infatti di valutare gli effetti del composto in un organismo completo, nel quale i processi di assorbimento, distribuzione, metabolismo ed escrezione contribuiscono alla definizione della risposta biologica complessiva. In questo contesto, particolare attenzione è stata rivolta al fegato e al rene, due organi centrali nella gestione degli xenobiotici, rispettivamente coinvolti nei processi di biotrasformazione e di eliminazione dei metaboliti.

Parallelamente, lo studio in vitro è stato condotto su linee cellulari di origine epatica e renale, rispettivamente HepG2 e HEK-293, al fine di valutare in maniera più controllata gli effetti diretti del DEP a livello cellulare. L'impiego di questi modelli ha permesso di analizzare endpoint specifici, quali citotossicità, produzione di specie reattive dell'ossigeno, risposta infiammatoria e modulazione dei sistemi antiossidanti endogeni.

Nel complesso, il disegno sperimentale è stato orientato alla valutazione di diversi livelli di risposta biologica, includendo analisi istologiche, istochimiche e immunoistochimiche nei tessuti animali, insieme a saggi cellulari e biochimici nei modelli in vitro. Tale approccio integrato consente di mettere in relazione le alterazioni osservate a livello cellulare con le modificazioni tissutali riscontrabili negli organi bersaglio, contribuendo a una comprensione più completa dei potenziali meccanismi di tossicità associati all'esposizione al DEP.

4.2 STUDIO IN VITRO

Lo studio in vitro è stato condotto al fine di valutare gli effetti diretti del Dietil Ftalato su modelli cellulari di origine epatica e renale. L'impiego di linee cellulari ha consentito di analizzare in condizioni sperimentali controllate gli effetti del composto su differenti endpoint biologici, tra cui citotossicità, produzione di specie reattive dell'ossigeno, risposta infiammatoria e modulazione dei sistemi antiossidanti endogeni. A tal fine sono state utilizzate cellule HepG2 e HEK-293, rispettivamente rappresentative di un modello epatico e renale, esposte a differenti concentrazioni di DEP per tempi variabili in funzione del protocollo sperimentale. Le analisi successive sono state effettuate mediante saggi biochimici, fluorimetrici e citofluorimetrici, al fine di caratterizzare la risposta cellulare al trattamento.

4.2.1 COLTURA DELLE CELLULE HEPG2

Le cellule HepG2 (Fig. 9), ottenute da ATCC (USA), sono una linea cellulare derivata da epatocarcinoma umano ampiamente utilizzata come modello sperimentale per lo studio della fisiologia e della tossicità epatica in vitro. Grazie alla loro origine epatica, queste cellule conservano numerose caratteristiche morfofunzionali degli epatociti, risultando particolarmente utili per la valutazione degli effetti di xenobiotici, composti tossici e alterazioni metaboliche (Fig. 9).

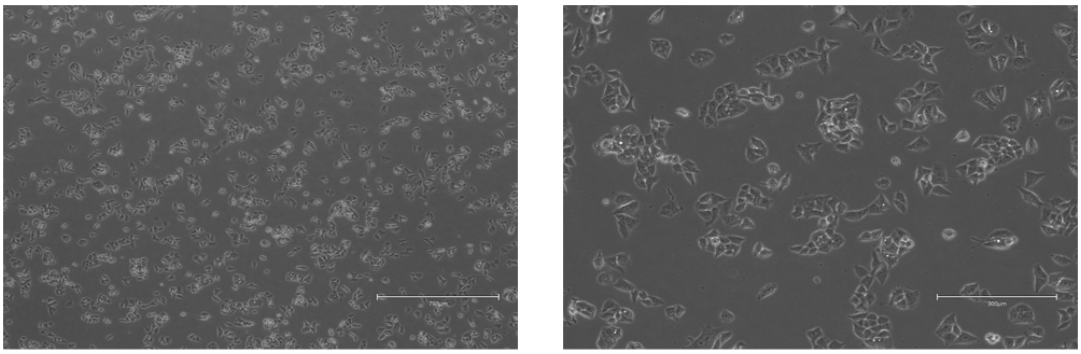


Figura 9 Morfologia delle cellule HepG2 in condizioni basali. *Immagini rappresentative al microscopio delle cellule HepG2 mantenute in condizioni standard di coltura, in assenza di trattamento. Le cellule mostrano un aspetto morfologico conservato, buona adesione al supporto di coltura e organizzazione regolare del monostrato. La valutazione microscopica consente di confermare il corretto stato della coltura prima dell'impiego sperimentale, evidenziando cellule sane e prive di evidenti segni di sofferenza cellulare. Le immagini sono rappresentative delle condizioni basali analizzate.*

Le cellule sono state mantenute in terreno DMEM ad alto contenuto di glucosio (DMEM high glucose; Sigma-Aldrich, cod. D0822), supplementato con 10% di fetal bovine serum (FBS; Sigma-Aldrich, cod. F7524) e 1% di soluzione Penicillin–Streptomycin Hybri-Max™ (Sigma-Aldrich, cod. P7539). Le colture cellulari sono state incubate a 37 °C in atmosfera umidificata contenente 5% di CO_2.

Le cellule sono state mantenute in condizioni sterili e sottoposte a periodico rinnovo del terreno di coltura, al fine di garantirne vitalità e crescita ottimali prima dell'esecuzione dei trattamenti sperimentali.

4.2.2 COLTURA DELLE CELLULE HEK-293

Le cellule HEK-293 (Fig. 10), ottenute da ATCC (USA), sono una linea cellulare derivata da rene embrionale umano ampiamente impiegata come modello sperimentale nello studio della biologia cellulare e della tossicità renale in vitro. Grazie alla loro elevata capacità proliferativa e alla facilità di mantenimento in coltura, le HEK-293 rappresentano un modello utile per la valutazione degli effetti cellulari indotti da xenobiotici e composti potenzialmente tossici (Fig. 10).

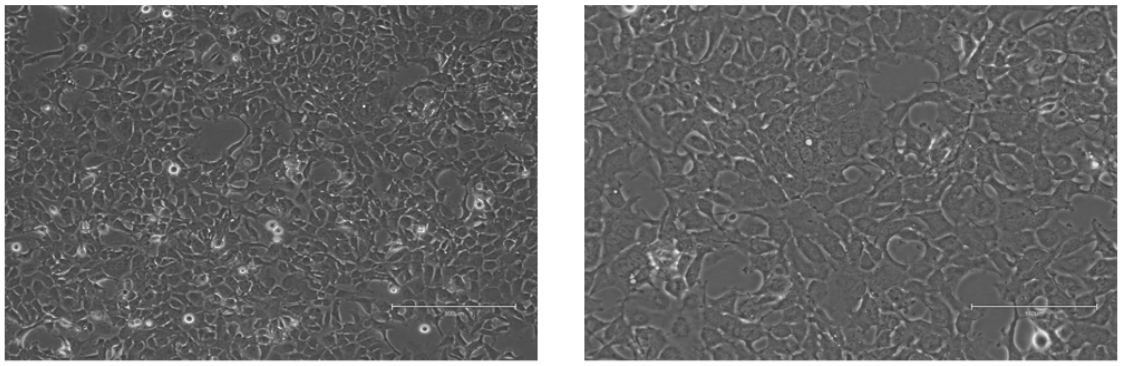


Figura 10. Morfologia delle cellule HEK-293 in condizioni basali. Immagini rappresentative al microscopio delle cellule HEK-293 mantenute in condizioni standard di coltura, in assenza di trattamento. Le immagini mostrano cellule sane, vitali e correttamente adese alla superficie di coltura, con morfologia conservata e distribuzione omogenea. L'osservazione del monostrato cellulare consente di valutare lo stato generale della coltura, la densità cellulare e l'assenza di evidenti alterazioni morfologiche. Le immagini sono rappresentative delle condizioni basali utilizzate negli esperimenti.

Le cellule sono state mantenute in terreno DMEM ad alto contenuto di glucosio (DMEM high glucose; Sigma-Aldrich, cod. D0822), supplementato con 10% di fetal bovine serum (FBS; Sigma-Aldrich, cod. F7524) e 1% di soluzione Penicillin–Streptomycin Hybri-Max™ (Sigma-

Aldrich, cod. P7539). Le colture cellulari sono state incubate a 37 °C in atmosfera umidificata contenente 5% di CO_2.

Le cellule sono state mantenute in condizioni sterili e sottoposte a periodico rinnovo del terreno di coltura, al fine di garantirne vitalità e crescita ottimali prima dell'esecuzione dei trattamenti sperimentali.

4.2.3 ESPOSIZIONE CELLULARE AL DIETIL FTALATO

Per la valutazione degli effetti biologici del Dietil Ftalato (DEP), le cellule HepG2 e HEK sono state esposte a differenti concentrazioni del composto per tempi variabili, in funzione del protocollo sperimentale previsto per ciascun saggio sperimentale. Il DEP è stato inizialmente solubilizzato in DMSO e successivamente diluito nel terreno di coltura fino al raggiungimento delle concentrazioni finali desiderate.

Le modalità di preparazione delle soluzioni, le diluizioni effettuate e le relative concentrazioni utilizzate per il trattamento delle cellule HEK e HepG2 sono riportate rispettivamente nella Tabella 2 e nella Tabella 3. Le cellule sono state seminate nelle rispettive piastre di coltura e lasciate aderire per 24 h prima dell'esposizione al composto. Successivamente, il terreno di coltura è stato sostituito con terreno contenente il DEP alle differenti concentrazioni sperimentali.

DEP finale	Volume DEP 10 mM da aggiungere	Terreno da aggiungere	DMSO finale
1600 µM	960 µL	5040 µL	0,32%
1000 µM	600 µL	5400 µL	0,20%
800 µM	480 µL	5520 µL	0,16%
600 µM	360 µL	5640 µL	0,12%
400 µM	240 µL	5760 µL	0,08%
200 µM	120 µL	5880 µL	0,04%
100 µM	60 µL	5940 µL	0,02%

Tabella 2 Condizioni sperimentali utilizzate per il trattamento delle cellule HEK239 con DEP, comprendenti concentrazioni finali, volumi di diluizione e percentuale finale di DMSO.

DEP finale	Volume DEP 10 mM da aggiungere	Terreno da aggiungere	DMSO finale
4,5 µM	2,25 µL	4997,75 µL	0,0009%
45 µM	22,50 µL	4977,50 µL	0,0090%
180 µM	90,00 µL	4910,00 µL	0,0360%
270 µM	135,00 µL	4865,00 µL	0,0540%
450 µM	225,00 µL	4775,00 µL	0,0900%
675 µM	337,50 µL	4662,50 µL	0,1350%
900 µM	450,00 µL	4550,00 µL	0,1800%

Tabella 3 Condizioni sperimentali utilizzate per il trattamento delle cellule HepG2 con DEP, comprendenti concentrazioni finali, volumi di diluizione e percentuale finale di DMSO.

Le cellule di controllo sono state trattate con la stessa quantità di veicolo utilizzata nei gruppi esposti, mantenendo costante la concentrazione finale di DMSO in tutte le condizioni sperimentali. I trattamenti sono stati effettuati mantenendo le cellule nelle normali condizioni di incubazione (37 °C, 5% CO_2 e atmosfera umidificata) fino ai tempi di esposizione previsti per ciascuna analisi.

Al termine del trattamento, le cellule sono state processate per le successive valutazioni sperimentali, comprendenti analisi di vitalità cellulare, produzione di specie reattive dell'ossigeno (ROS) e osservazione morfologica mediante microscopia ottica.

4.2.4 SAGGIO DI VITALITÀ CELLULARE (MTT)

La vitalità cellulare è stata valutata mediante saggio colorimetrico MTT, basato sulla capacità delle cellule metabolicamente attive di ridurre il sale tetrazolico 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio bromuro (MTT) a cristalli insolubili di formazano attraverso l'attività degli enzimi mitocondriali. Per il saggio è stato utilizzato MTT (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA; Cat. No. M5655-1G).

Le cellule HepG2 e HEK sono state seminate in piastre multiwell e lasciate aderire per 24 h prima dell'esposizione al DEP. Al termine dei trattamenti sperimentali, della durata di 24 e 48 h, il terreno di coltura è stato rimosso e sostituito con soluzione contenente MTT alla concentrazione finale di 0,5 mg/mL. Le cellule sono state quindi incubate per il tempo necessario alla formazione dei cristalli di formazano in condizioni standard di coltura cellulare.

Successivamente, la soluzione contenente MTT è stata rimossa e i cristalli di formazano formatisi sono stati solubilizzati mediante aggiunta di DMSO. L'assorbanza è stata misurata mediante lettore di micropiastre alla lunghezza d'onda di 570 nm. I valori ottenuti sono stati espressi come percentuale di vitalità rispetto al gruppo controllo, considerato pari al 100%.

I dati sono stati analizzati mediante one-way ANOVA seguita da test post hoc di Bonferroni. I risultati sono espressi come media ± SEM. Ogni condizione sperimentale è stata eseguita in duplicato, utilizzando 12 pozzetti per ciascuna condizione sperimentale.

4.2.5 PRODUZIONE DI ROS

La produzione intracellulare di specie reattive dell'ossigeno (ROS) è stata valutata mediante utilizzo della sonda fluorescente 2',7'-diclorodidrofluoresceina diacetato (DCFH-DA), comunemente impiegata per la determinazione dello stress ossidativo intracellulare. Per il saggio è stata utilizzata la sonda DCFH-DA (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA; Cat. No. 35845). La DCFH-DA, una volta penetrata all'interno della cellula, viene deacetilata dalle esterasi intracellulari formando DCFH, composto non fluorescente che, in presenza di ROS, viene ossidato a diclorofluoresceina (DCF), molecola altamente fluorescente.

Le cellule HepG2 e HEK sono state seminate in adeguate piastre di coltura e lasciate aderire per 24 h prima dell'esposizione al DEP alle differenti concentrazioni sperimentali. Al termine del trattamento, il terreno di coltura è stato rimosso e le cellule sono state incubate con la sonda DCFH-DA diluita in terreno privo di siero per il tempo necessario all'assorbimento intracellulare della sonda.

Successivamente, le cellule sono state lavate con PBS per rimuovere l'eccesso di sonda non internalizzata. Le cellule sono state quindi osservate e fotografate mediante microscopio a fluorescenza (Evos M5000, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). La fluorescenza è stata valutata alle lunghezze d'onda di eccitazione ed emissione pari rispettivamente a λ_{ex} 504 nm e λ_{em} 524 nm.

4.2.5.1 ANALISI CITOFLUORIMETRICA DELLA PRODUZIONE DI ROS

La produzione intracellulare di specie reattive dell'ossigeno (ROS) è stata ulteriormente valutata mediante analisi citofluorimetrica utilizzando la sonda fluorescente DCFH-DA (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA; Cat. No. 35845). Al termine dei trattamenti sperimentali con DEP, le cellule HepG2 e HEK sono state incubate con la sonda fluorescente nelle appropriate condizioni sperimentali.

Successivamente, le cellule sono state raccolte, lavate con PBS e analizzate mediante citofluorimetro a flusso Attune NxT Cytometer (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). La fluorescenza emessa dalla diclorofluoresceina (DCF), proporzionale alla produzione intracellulare di ROS, è stata rilevata alle lunghezze d'onda appropriate della sonda (λ_{ex} 504 nm; λ_{em} 524 nm).

Per ciascun campione è stato acquisito un adeguato numero di eventi cellulari, escludendo detriti e aggregati mediante opportune strategie di gating. I dati ottenuti sono stati successivamente elaborati utilizzando il software dedicato del sistema citofluorimetrico. I risultati sono stati espressi come media ± SEM e analizzati statisticamente mediante one-way ANOVA seguita da test post hoc di Bonferroni.

4.2.6 VALUTAZIONE DEI MARKER INFIAMMATORI MEDIANTE ELISA

La quantificazione dei marker infiammatori è stata effettuata mediante saggio immunoenzimatico ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay), al fine di valutare la risposta infiammatoria indotta dall'esposizione al Dietil Ftalato (DEP) nelle cellule HepG2 e HEK. Le analisi sono state eseguite sul surnatante delle colture cellulari raccolto al termine dei trattamenti sperimentali.

Dopo esposizione alle differenti concentrazioni di DEP, il surnatante cellulare è stato raccolto e centrifugato per rimuovere eventuali residui cellulari e detriti derivanti dal trattamento. I campioni ottenuti sono stati successivamente conservati alle appropriate condizioni fino al momento dell'analisi immunoenzimatica.

La quantificazione delle citochine infiammatorie è stata effettuata utilizzando kit ELISA commerciali specifici per IFN-γ (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA; Cat. No. RAB0222-1KT), IL-1α (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA; Cat. No. RAB0269-1KT), IL-10 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA; Cat. No. RAB0244-1KT), IL-8 (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA; Ref. BMS204-3INST) e IL-6 (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA; Ref. 88-7066-88), seguendo le istruzioni fornite dai rispettivi produttori.

Il metodo ELISA impiegato si basa sul legame altamente specifico tra antigene e anticorpo. Le piastre utilizzate nel saggio risultavano pre-rivestite con anticorpi monoclonali specifici per ciascuna citochina analizzata. In ciascun pozzetto sono stati dispensati gli standard a concentrazione nota e i campioni di surnatante cellulare. Durante la fase di incubazione, le citochine presenti nei campioni si sono legate agli anticorpi immobilizzati sulla superficie della piastra. Successivamente, sono stati effettuati ripetuti lavaggi per rimuovere il materiale non legato. È stato quindi aggiunto un anticorpo di rilevazione specifico per il rispettivo analita, coniugato a un enzima in grado di catalizzare la reazione cromogenica successiva. Dopo un'ulteriore fase di incubazione e i relativi lavaggi, è stata aggiunta la soluzione substrato contenente tetrametilbenzidina (TMB). L'interazione tra l'enzima coniugato e il substrato ha determinato lo sviluppo di una colorazione proporzionale alla concentrazione della citochina presente nel campione.

La reazione enzimatica è stata bloccata mediante aggiunta della soluzione stop, determinando il viraggio cromatico finale del campione. L'assorbanza è stata quindi misurata mediante lettore di micropiastre alla lunghezza d'onda di 450 nm. Le concentrazioni delle citochine analizzate sono state determinate attraverso la costruzione di curve standard ottenute utilizzando concentrazioni note degli analiti forniti nei kit commerciali.

I risultati ottenuti sono stati espressi come media ± SEM. L'analisi statistica è stata effettuata mediante one-way ANOVA seguita da test post hoc di Bonferroni, considerando statisticamente significativi valori di $p < 0,05$.

4.2.7 VALUTAZIONE STATISTICA

L'analisi statistica dei dati ottenuti è stata effettuata utilizzando il software GraphPad Prism (GraphPad Software, San Diego, CA, USA). I risultati sono stati espressi come media ± SEM. Le differenze tra i gruppi sperimentali sono state valutate mediante one-way ANOVA seguita da test post hoc di Bonferroni per confronti multipli. Il livello di significatività statistica è stato fissato a $p < 0,05$. Tutti gli esperimenti sono stati eseguiti almeno in duplicato, utilizzando il numero di replicati specificato nei rispettivi paragrafi metodologici e nelle figure relative ai risultati sperimentali.

4.3 STUDIO IN VIVO

Lo studio in vivo è stato condotto al fine di valutare gli effetti dell'esposizione al DEP a livello sistemico, con particolare attenzione alle alterazioni istologiche, infiammatorie e apoptotiche a carico di fegato e rene. L'impiego del modello murino ha consentito di analizzare la risposta biologica in un contesto fisiologico integrato, nel quale i processi di biotrasformazione, distribuzione ed eliminazione del composto contribuiscono alla definizione del profilo tossicologico complessivo.

4.3.1 ANIMALI E CONDIZIONI SPERIMENTALI

Nel presente studio sono stati impiegati 16 topi CD1 maschi, di età compresa tra 3 e 6 mesi e con peso corporeo compreso tra 25 e 30 g, forniti da Envigo (Milano, Italia). Tutte le procedure sperimentali sono state autorizzate dall'OPBA (Animal Care Review Board) dell'Università degli Studi di Messina e sono state condotte nel rispetto della normativa italiana vigente in materia di sperimentazione animale (D.Lgs. 26/2014), della legislazione dell'Unione Europea (Direttiva 2010/63/UE) e delle raccomandazioni ARRIVE per la corretta conduzione e rendicontazione degli studi preclinici.

Gli animali sono stati mantenuti in gabbie di acciaio inossidabile all'interno di una stanza termoregolata, con temperatura controllata di 22 ± 1 °C e ciclo luce/buio di 12 ore/12 ore. Prima dell'inizio delle procedure sperimentali, i topi sono stati sottoposti a un periodo di acclimatazione di una settimana, al fine di consentire l'adattamento alle condizioni ambientali dello stabulario. Durante l'intero periodo sperimentale, gli animali hanno avuto accesso ad libitum ad acqua e mangime standard per roditori.

4.3.2 ESPOSIZIONE A DIETIL FTALATO

L'esposizione al Dietil Ftalato, comunemente indicato come Dietil Ftalato (DEP), è stata effettuata mediante somministrazione orale del composto alla concentrazione di 2 µg/mL. Il DEP è stato preparato in soluzione acquosa/veicolo idoneo alla somministrazione orale, secondo le condizioni sperimentali previste per il trattamento.

Gli animali appartenenti al gruppo trattato hanno ricevuto il DEP per via orale una volta al giorno per 7 giorni consecutivi, mentre gli animali del gruppo controllo hanno ricevuto un volume equivalente di veicolo, in assenza del composto. Durante l'intero periodo di esposizione, gli animali sono stati mantenuti nelle condizioni sperimentali precedentemente descritte, al fine di garantire uniformità ambientale e ridurre possibili fattori confondenti.

Al termine del periodo di trattamento, gli animali sono stati sacrificati e i tessuti epatici e renali sono stati prelevati per le successive analisi morfologiche, istologiche e molecolari, con l'obiettivo di valutare i possibili effetti del DEP a livello dell'asse epato-renale.

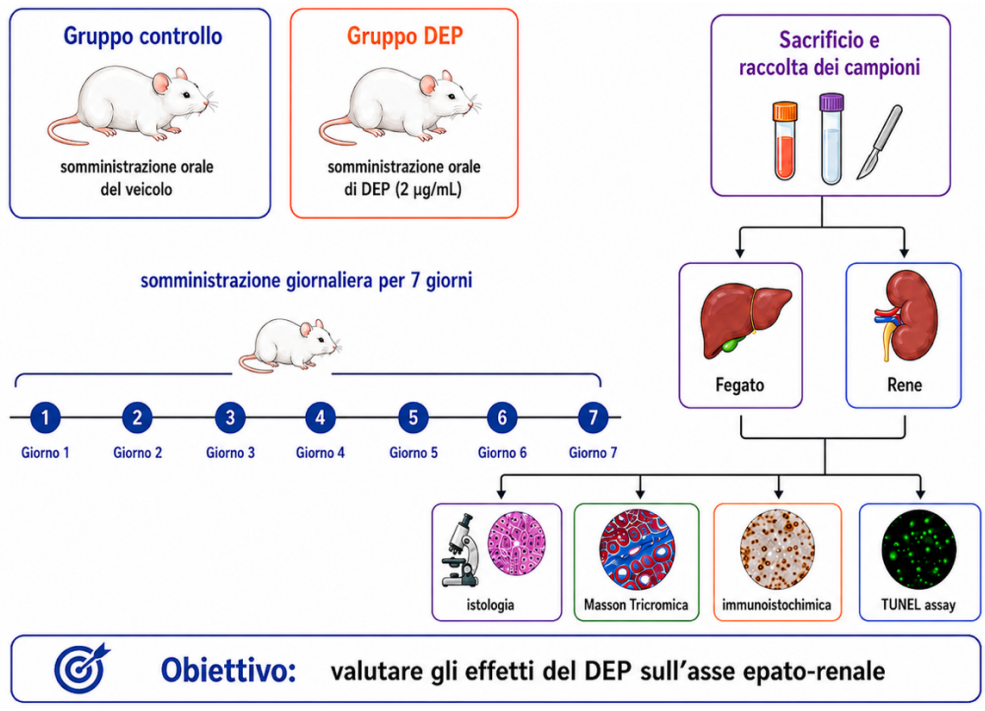


Figura 11 Schema sperimentale dell'esposizione a Dietil Ftalato (DEP). Gli animali sono stati suddivisi in gruppo controllo e gruppo DEP, trattati rispettivamente con veicolo o DEP per via orale alla concentrazione di 2 µg/mL per 7 giorni. Al termine del trattamento, fegato e rene sono stati raccolti e analizzati mediante istologia, colorazione tricromica di Masson, immunoistochimica e TUNEL assay.

4.3.3 GRUPPI SPERIMENTALI

Gli animali sono stati randomizzati e assegnati ai seguenti gruppi sperimentali, ciascuno costituito da 8 animali (n = 8):

1. Gruppo Sham: i topi non sono stati esposti al DEP e sono stati utilizzati come gruppo di riferimento per la valutazione delle condizioni basali.
2. Gruppo veicolo: i topi hanno ricevuto una singola somministrazione orale di soluzione salina, utilizzata come veicolo.
3. Gruppo DEP: i topi hanno ricevuto una singola somministrazione orale di Dietil Ftalato (DEP) alla dose di 2 µg/mL, preparato in soluzione salina.

Gli animali sono stati sacrificati 7 giorni dopo la somministrazione, e i tessuti epatici e renali sono stati raccolti per successive analisi istologiche, istochimiche, immunoistochimiche e per la valutazione dell'apoptosi. In seguito alla valutazione preliminare dei dati, non sono state evidenziate differenze significative tra gli animali Sham e quelli trattati con il solo veicolo. Pertanto, ai fini della presentazione e interpretazione dei risultati, il gruppo Sham è stato utilizzato come controllo di riferimento e confrontato con il gruppo trattato con DEP.

4.3.4 RACCOLTA E PREPARAZIONE DEI CAMPIONI

Al termine del periodo sperimentale, gli animali sono stati sacrificati 7 giorni dopo la somministrazione del trattamento. Successivamente, sono stati prelevati il fegato ed entrambi i reni, che sono stati accuratamente isolati e preparati per le successive analisi morfologiche e istopatologiche.

I campioni tissutali sono stati fissati a temperatura ambiente in una soluzione di formaldeide tamponata al 10% in soluzione salina tamponata con fosfato, al fine di preservarne l'architettura morfologica. Dopo fissazione, i tessuti sono stati disidratati mediante passaggi in etanolo a concentrazione crescente e successivamente inclusi in paraffina secondo le procedure istologiche standard.

Dai blocchetti in paraffina sono state ottenute sezioni tissutali dello spessore di 5 µm mediante microtomo. Le sezioni così ottenute sono state utilizzate per l'esame istologico, la colorazione Tricromica di Masson, le analisi immunoistochimiche e il TUNEL assay.

4.3.5 ANALISI MORFOLOGICA E ISTOPATOLOGICA DEI TESSUTI EPATICI E RENALI

Per la valutazione morfologica generale, le sezioni di fegato e rene dello spessore di 5 μm sono state sottoposte a colorazione con ematossilina ed eosina (Bio-Optica, Milano, Italia). Prima della colorazione, le sezioni incluse in paraffina sono state deparaffinate in xilene e reidratate mediante passaggi in etanolo a concentrazione decrescente fino ad acqua distillata. Le sezioni sono state quindi colorate con ematossilina, al fine di evidenziare le strutture nucleari, e successivamente con eosina, per la valutazione del citoplasma e della matrice extracellulare. Dopo disidratazione, diafanizzazione e montaggio con mezzo appropriato, i preparati sono stati osservati mediante microscopia ottica.

L'analisi istologica è stata condotta al fine di valutare eventuali alterazioni morfologiche indotte dall'esposizione al DEP. A livello epatico, sono state considerate modificazioni dell'architettura lobulare, alterazioni degli epatociti, congestione vascolare, infiltrato infiammatorio, degenerazione cellulare e presenza di vacuolizzazione citoplasmatica. A livello renale, sono state valutate alterazioni glomerulari e tubulari, danno dell'epitelio tubulare, congestione, infiltrato infiammatorio e modificazioni dell'organizzazione tissutale.

Score	***Descrizione istopatologica***
0	Assenza di alterazioni istopatologiche evidenti; architettura epatica conservata, assenza di edema, necrosi e infiltrato infiammatorio.
1	Alterazioni minime; lieve disorganizzazione del parenchima epatico e/o presenza di infiltrato infiammatorio molto lieve e focale.
2	Alterazioni lievi-moderate; presenza di edema lieve, moderata disorganizzazione del parenchima e infiltrato infiammatorio focale.
3	Alterazioni moderate; edema evidente, disorganizzazione del parenchima, infiltrato infiammatorio multifocale e iniziali aree di necrosi.
4	Alterazioni marcate; edema diffuso, estesa disorganizzazione dell'architettura epatica, infiltrato infiammatorio evidente e aree di necrosi ben rappresentate.
5	Alterazioni severe; marcata compromissione dell'architettura epatica, edema diffuso, infiltrato infiammatorio esteso e necrosi ampia/multifocale.

Tabella 4. Sistema di scoring istopatologico epatico modificato. *La tabella riporta il sistema di valutazione semiquantitativa del danno epatico, espresso su una scala da 0 a 5 in base alla severità delle alterazioni istopatologiche osservate, inclusi edema, necrosi e infiltrato infiammatorio.*

La valutazione semiquantitativa del danno istologico è stata effettuata mediante attribuzione di uno score istopatologico, al fine di confrontare in maniera standardizzata le alterazioni osservate nei diversi gruppi sperimentali. Per ciascun campione sono stati analizzati più campi microscopici rappresentativi, selezionati in modo casuale, e il danno tissutale è stato valutato sulla base della severità e dell'estensione delle alterazioni morfologiche.

Lo score istologico è stato espresso secondo una scala semiquantitativa da 0 a 4, dove 0 indicava assenza di alterazioni evidenti, 1 alterazioni lievi, 2 alterazioni moderate, 3 alterazioni marcate e 4 alterazioni severe. I valori ottenuti sono stati successivamente utilizzati per l'analisi statistica comparativa tra i gruppi sperimentali.

4.3.6 VALUTAZIONE DELLA FIBROSI MEDIANTE COLORAZIONE TRICROMICA DI MASSON

La colorazione Tricromica di Masson è stata eseguita sulle sezioni di fegato e rene al fine di valutare la deposizione di collagene e la presenza di eventuali alterazioni fibrotiche indotte dall'esposizione al Dietil Ftalato. Tale colorazione consente di distinguere le componenti connettivali dalla componente cellulare del tessuto, rendendo possibile l'identificazione delle aree caratterizzate da incremento della matrice extracellulare.

Le sezioni tissutali dello spessore di 5 μm, precedentemente incluse in paraffina, sono state deparaffinate in xilene e reidratate mediante passaggi in etanolo a concentrazione decrescente fino ad acqua distillata. Successivamente, i preparati sono stati sottoposti a colorazione Tricromica di Masson (Bio-Optica, Milano, Italia. Cod. 04-010802), secondo le indicazioni del produttore. Al termine della procedura, le sezioni sono state disidratate, diafanizzate e montate con mezzo appropriato.

L'analisi è stata condotta mediante microscopia ottica, valutando la distribuzione e l'intensità della colorazione del collagene nei tessuti epatici e renali. A livello epatico, particolare attenzione è stata rivolta alla presenza di deposizione collagenica negli spazi portali, nelle aree periportali, perisinusoidali e peri-centrali, nonché alla possibile formazione di setti fibrotici. A livello renale, sono state considerate eventuali alterazioni fibrotiche a carico dell'interstizio, delle aree peritubulari e delle strutture glomerulari.

Per il fegato, la valutazione della fibrosi è stata effettuata mediante score di Ishak, secondo una scala semiquantitativa da 0 a 6, che consente di classificare la progressione della fibrosi in base all'estensione della deposizione collagenica e alla presenza di setti fibrotici. Lo score è stato attribuito analizzando campi microscopici rappresentativi per ciascun campione [273].

Per il rene, la deposizione di collagene è stata valutata mediante analisi morfologica semiquantitativa, considerando l'intensità della colorazione e l'estensione delle aree positive nel compartimento interstiziale, peritubulare e glomerulare. La valutazione è stata condotta confrontando i campioni del gruppo DEP con quelli del gruppo controllo, al fine di evidenziare eventuali incrementi della componente fibrotica associati al trattamento.

I risultati ottenuti mediante colorazione Tricromica di Masson sono stati utilizzati per integrare la valutazione morfologica generale e per identificare eventuali modificazioni della matrice extracellulare associate all'esposizione al DEP.

Score	***Descrizione istopatologica***
0	Assenza di fibrosi
1	Espansione fibrosa di alcune aree portali, con o senza brevi setti fibrosi
2	Espansione fibrosa delle aree portali, con o senza brevi setti fibrosi
3	Espansione fibrosa della maggior parte delle aree portali con occasionali ponti fibrosi porto-portali
4	Espansione fibrosa delle aree portali con marcati ponti fibrosi porto-portali e porto-centrali
5	Fibrosi a ponte marcata con occasionali noduli, compatibile con cirrosi incompleta
6	Cirrosi probabile o definita

Tabella 5. Valutazione istopatologica della fibrosi epatica. *La fibrosi epatica è stata valutata mediante scoring istopatologico secondo una scala da 0 a 6, in cui 0 indica assenza di fibrosi e 6 indica cirrosi probabile o definita. I punteggi intermedi descrivono una progressiva espansione fibrosa delle aree portali, la presenza di setti fibrosi e lo sviluppo di ponti fibrosi porto-portali e porto-centrali, fino alla comparsa di noduli compatibili con cirrosi incompleta.*

4.3.7 ANALISI IMMUNOISTOCHIMICA

Le analisi immunoistochimiche sono state eseguite su sezioni di fegato e rene incluse in paraffina, al fine di valutare l'espressione di marker associati ad apoptosi e risposta infiammatoria in seguito all'esposizione al DEP.

Le sezioni tissutali dello spessore di 5 μm sono state deparaffinate in xilene e reidratate mediante passaggi in etanolo a concentrazione decrescente fino ad acqua distillata. Successivamente, le sezioni sono state sottoposte alla procedura immunoistochimica secondo protocolli standard.

Al fine di valutare l'attivazione dei pathways apoptotici e infiammatori, le sezioni sono state incubate con anticorpi diretti contro BAX e Bcl-2 (Proteintech; 1:20), utilizzati come marker dell'equilibrio apoptotico cellulare, e con anticorpi anti-IL-1β e anti-Caspase-3 (Proteintech; 1:100), impiegati rispettivamente come indicatori della risposta infiammatoria e dell'attivazione apoptotica.

Le sezioni tissutali dello spessore di 5 μm sono state deparaffinate in xilene e reidratate mediante passaggi in etanolo a concentrazione decrescente fino ad acqua distillata. Successivamente, le sezioni sono state sottoposte alla procedura immunoistochimica secondo protocolli standard.

Al fine di valutare l'attivazione dei pathways apoptotici e infiammatori, le sezioni sono state incubate con anticorpi diretti contro BAX e Bcl-2 (Proteintech; 1:20), utilizzati come marker dell'equilibrio apoptotico cellulare, e con anticorpi anti-IL-1β e anti-Caspase-3 (Proteintech; 1:100), impiegati rispettivamente come indicatori della risposta infiammatoria e dell'attivazione apoptotica.

4.3.8 VALUTAZIONE DELL'APOPTOSI MEDIANTE TUNEL ASSAY

L'apoptosi cellulare nei tessuti epatici e renali è stata valutata mediante TUNEL assay (*Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling*), tecnica utilizzata per identificare la frammentazione del DNA associata ai processi apoptotici.

Le analisi sono state eseguite su sezioni tissutali incluse in paraffina dello spessore di 5 μm. Le sezioni sono state deparaffinate in xilene e reidratate mediante passaggi in etanolo a concentrazione decrescente fino ad acqua distillata. Successivamente, i campioni sono stati sottoposti alla procedura TUNEL utilizzando il kit In Situ Cell Death Detection Kit, TMR red (Roche, REF 12156792910), secondo le istruzioni del produttore.

La metodica si basa sull'incorporazione di nucleotidi marcati fluorescentemente nelle estremità del DNA frammentato mediante l'enzima terminal deossinucleotidil transferasi (TdT), consentendo l'identificazione delle cellule apoptotiche. La positività al TUNEL è stata visualizzata mediante microscopia a fluorescenza, evidenziando le cellule caratterizzate da frammentazione nucleare del DNA.

L'analisi è stata condotta confrontando i tessuti appartenenti ai diversi gruppi sperimentali, al fine di valutare eventuali incrementi dell'apoptosi associati all'esposizione al Dietil Ftalato. La quantificazione del segnale fluorescente è stata effettuata mediante analisi di immagini digitali su campi microscopici rappresentativi.

4.3.9 VALUTAZIONE STATISTICA

L'elaborazione statistica dei dati ottenuti dallo studio in vivo è stata eseguita mediante il software GraphPad Prism (GraphPad Software, San Diego, CA, USA). I dati sono stati espressi come media ± SEM e rappresentano almeno tre esperimenti condotti in giorni differenti, al fine di garantirne la riproducibilità. N indica il numero di animali utilizzati negli esperimenti in vivo. Per il calcolo della numerosità campionaria degli studi in vivo è stato utilizzato il software G*Power 3.1 (Die Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf, Düsseldorf, Germania).

L'analisi statistica è stata effettuata mediante test appropriati in funzione della distribuzione e della natura dei dati; i test specifici impiegati per ciascun confronto sono riportati nelle relative sezioni dei risultati. Le differenze tra i gruppi sono state considerate statisticamente significative per valori di $p < 0,05$.

CAPITOLO 5:

RISULTATI

5.1 RISULTATI DEGLI STUDI IN VITRO

La seconda parte dei risultati riguarda la valutazione degli effetti del DEP in modelli cellulari in vitro. L'utilizzo di cellule HepG2 e HEK-293 consente di approfondire, in condizioni sperimentali controllate, la risposta di due compartimenti cellulari rappresentativi rispettivamente del tessuto epatico e renale. Questa impostazione permette di integrare le osservazioni ottenute negli studi in vivo con un'analisi più mirata dei principali eventi cellulari associati all'esposizione al composto.

Le cellule sono state esposte a differenti concentrazioni di DEP e analizzate mediante saggi finalizzati a valutare la vitalità cellulare, la produzione intracellulare di specie reattive dell'ossigeno e la risposta infiammatoria.

5.1.1 VALUTAZIONE DEGLI EFFETTI DEL DEP SULLE CELLULE HEPG2

Nelle cellule HepG2, l'esposizione al DEP viene valutata considerando parametri cellulari associati alla citotossicità, allo stress ossidativo e alla modulazione della risposta infiammatoria. Questo modello cellulare, di origine epatica, permette di analizzare in vitro alcune risposte riconducibili al compartimento epatico, con particolare attenzione alla sensibilità delle cellule al trattamento e alle alterazioni funzionali indotte dal composto.

I risultati relativi alle cellule HepG2 sono presentati seguendo una progressione che parte dalla valutazione della vitalità cellulare, prosegue con l'analisi della produzione di ROS e si completa con la quantificazione dei marker infiammatori rilasciati nel surnatante cellulare.

5.1.1.1 EFFETTI DEL DEP SULLA VITALITÀ CELLULARE DELLE CELLULE HEPG2

La vitalità cellulare delle cellule HepG2 è stata valutata mediante saggio MTT dopo esposizione a concentrazioni crescenti di DEP comprese tra 4,5 µM e 900 µM, per 24 h e 48 h. L'analisi è stata condotta con l'obiettivo di definire il profilo citotossico del composto nel modello cellulare epatico e di individuare la concentrazione in grado di ridurre del 50% la vitalità cellulare rispetto al controllo.

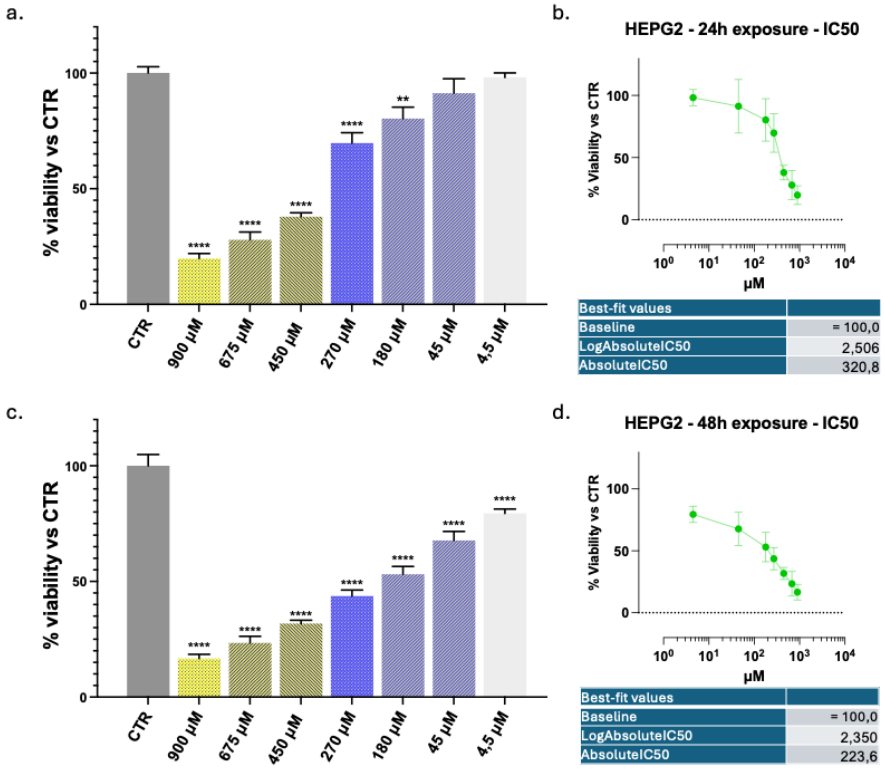


Figura 12. Effetto del DEP sulla vitalità cellulare delle cellule HepG2. *La vitalità cellulare è stata valutata mediante saggio MTT dopo trattamento con concentrazioni crescenti di DEP, comprese tra 4,5 µM e 900 µM, per 24 h e 48 h. (a) Vitalità cellulare dopo 24 h di esposizione al DEP; (b) curva dose-risposta e calcolo dell'IC50 dopo 24 h di esposizione; (c) vitalità cellulare dopo 48 h di esposizione al DEP; (d) curva dose-risposta e calcolo dell'IC50 dopo 48 h di esposizione. I dati sono espressi come media ± SEM. L'esperimento è stato eseguito in duplicato, con 12 pozzetti analizzati per ciascuna condizione. L'analisi statistica è stata effettuata mediante one-way ANOVA seguita da test post hoc di Bonferroni. L'IC50 calcolata è pari a 320 µM a 24 h e 233 µM a 48 h.*

Il trattamento con DEP determina una riduzione della vitalità cellulare nelle HepG2, con un andamento dipendente dalla concentrazione (Fig. 12 a, c). Alle concentrazioni più basse, comprese tra 4,5 µM e 45 µM, la risposta metabolica cellulare appare maggiormente conservata, indicando una limitata compromissione della vitalità. Al contrario, l'esposizione a concentrazioni intermedie e alte, in particolare a partire da 180 µM fino a 900 µM, si associa a

una progressiva riduzione del segnale MTT, suggerendo una diminuzione dell'attività metabolica cellulare e una maggiore compromissione della vitalità (Fig. 12 a, c).

L'andamento dose-risposta risulta evidente a entrambi i tempi di esposizione, ma l'effetto citotossico appare più marcato dopo 48 h. Questo dato indica che la risposta delle cellule HepG2 al DEP non dipende esclusivamente dalla concentrazione del composto, ma anche dalla durata dell'esposizione. Il prolungamento del trattamento determina infatti uno spostamento della curva verso una maggiore tossicità, con riduzione della vitalità cellulare anche a concentrazioni inferiori rispetto a quanto osservato dopo 24 h (Fig. 12 a, c).

Il calcolo dell'IC50 conferma quantitativamente questo andamento. Dopo 24 h di esposizione, l'IC50 risulta pari a 320 µM (Fig. 12 b), mentre dopo 48 h si riduce a 233 µM (Fig. 12 d). La diminuzione dell'IC50 al tempo più lungo evidenzia un aumento della sensibilità delle cellule HepG2 al DEP in seguito a esposizione prolungata, indicando che una concentrazione inferiore del composto è sufficiente per ottenere una riduzione del 50% della vitalità cellulare.

Nel complesso, i risultati mostrano che il DEP esercita un effetto citotossico sulle cellule HepG2 con andamento dose- e tempo-dipendente. La progressiva riduzione della vitalità cellulare e la diminuzione dell'IC50 tra 24 h e 48 h indicano una marcata sensibilità del modello epatico in vitro all'esposizione al DEP, suggerendo una compromissione della funzionalità metabolica cellulare già a concentrazioni intermedie del composto.

5.1.1.2 VALUTAZIONE DELLA PRODUZIONE INTRACELLULARE DI ROS NELLE CELLULE HEPG2

La produzione intracellulare di specie reattive dell'ossigeno nelle cellule HepG2 è stata valutata mediante sonda fluorescente DCFH-DA, utilizzando concentrazioni di DEP selezionate sulla base dei risultati di citotossicità ottenuti mediante saggio MTT. In particolare, le cellule sono state esposte a 0,3 µM, 320 µM e 640 µM, corrispondenti rispettivamente a una concentrazione molto bassa, al valore di IC50 calcolato a 24 h e a una concentrazione pari al doppio dell'IC50.

Le immagini acquisite mediante microscopia a fluorescenza mostrano una variazione del segnale DCF in funzione della concentrazione di DEP e del tempo di esposizione (Fig. 13 e Fig. 14). Nei campioni trattati con 640 µM, il segnale fluorescente appare più evidente nelle fasi precoci del trattamento, indicando una rapida induzione della produzione intracellulare di ROS (Fig. 13). Alla concentrazione di 320 µM, invece, l'aumento del segnale risulta più graduale e diventa maggiormente evidente nei tempi più avanzati di esposizione (Fig. 14).

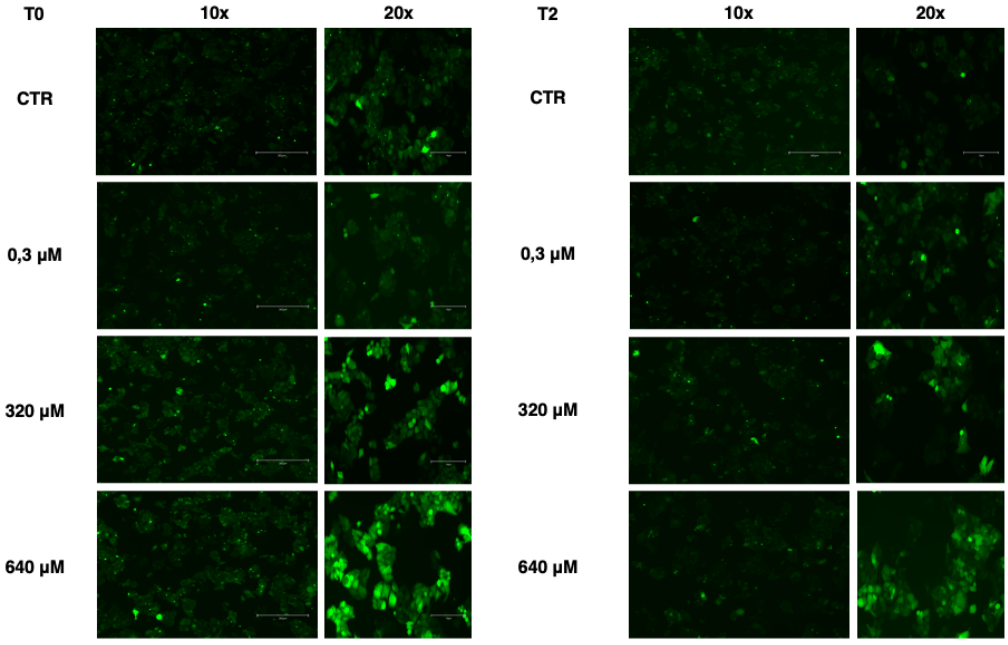


Figura 13. Produzione intracellulare di ROS nelle cellule HepG2 ai tempi precoci di esposizione. *Le immagini rappresentative mostrano il segnale fluorescente DCF nelle cellule HepG2 esposte a DEP alle concentrazioni di 0,3 µM, 320 µM e 640 µM dopo 2 h e 4 h di trattamento. Le immagini sono state acquisite a 10× e 20×. L'aumento dell'intensità fluorescente, in particolare alla concentrazione di 640 µM, indica una risposta ossidativa precoce nelle cellule trattate.*

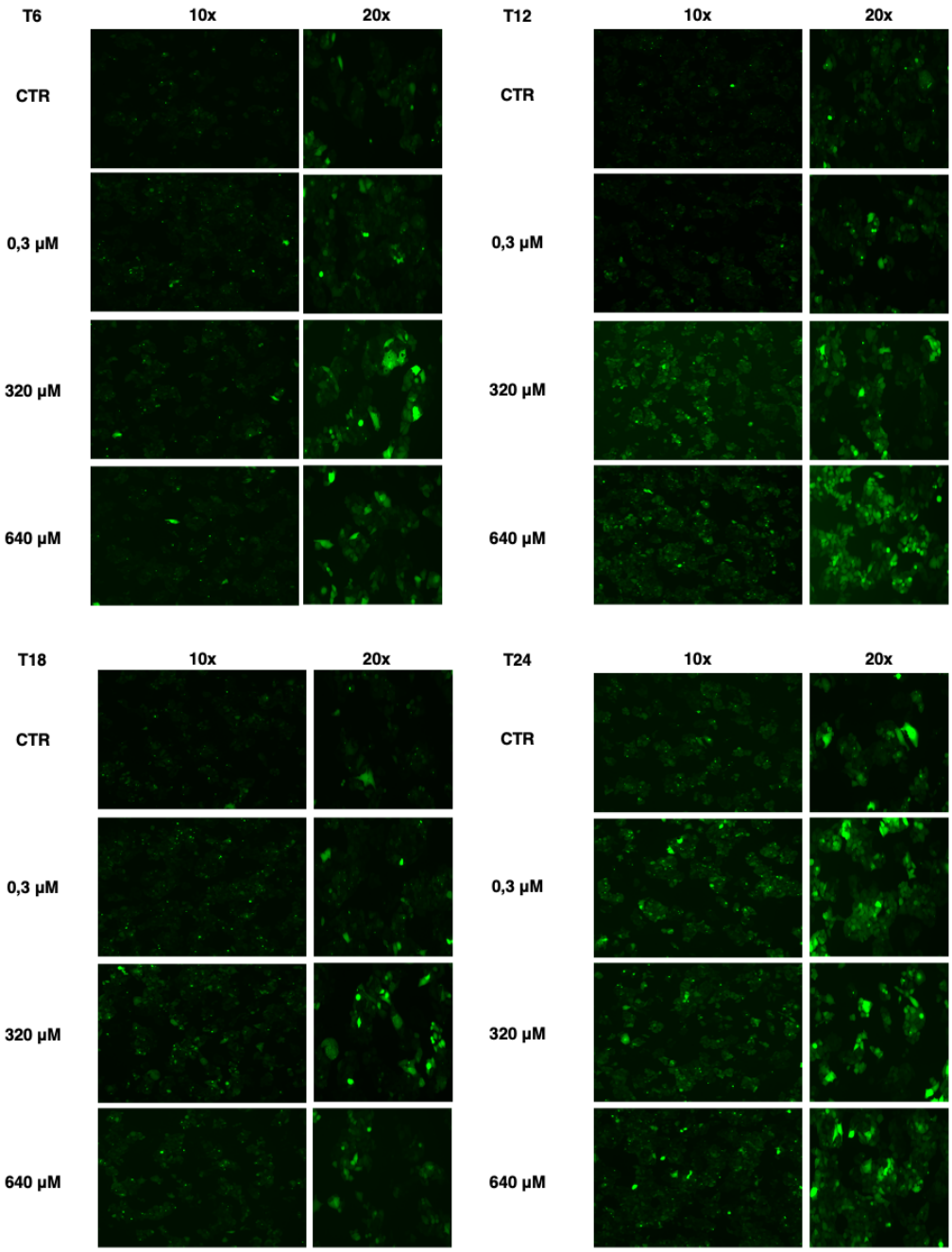


Figura 14. Produzione intracellulare di ROS nelle cellule HepG2 ai tempi successivi di esposizione. Le immagini rappresentative mostrano il segnale fluorescente DCF nelle cellule HepG2 esposte a DEP alle concentrazioni di 0,3 µM, 320 µM e 640 µM ai tempi successivi del trattamento. Le immagini sono state acquisite a 10× e 20×. Il segnale fluorescente mostra un andamento variabile in funzione della concentrazione e del tempo di esposizione, con maggiore evidenza della produzione di ROS nelle cellule trattate con 320 µM e 640 µM rispetto al controllo.

Nei campioni esposti a 0,3 µM, la fluorescenza non mostra variazioni rilevanti rispetto al controllo, suggerendo che questa concentrazione non sia sufficiente a indurre una marcata alterazione dello stato redox cellulare nelle condizioni sperimentali analizzate (Fig. 13 e Fig. 14). Nel complesso, l'osservazione microscopica evidenzia che il DEP induce un aumento della

produzione intracellulare di ROS nelle cellule HepG2 soprattutto alle concentrazioni più elevate, con un andamento dipendente sia dalla dose sia dal tempo di esposizione.

L'incremento del segnale DCF osservato mediante microscopia a fluorescenza indica quindi una risposta ossidativa del modello epatico in vitro al trattamento con DEP. Tale evidenza qualitativa viene successivamente approfondita mediante analisi citofluorimetrica, al fine di quantificare la fluorescenza media e definire con maggiore precisione l'andamento temporale della produzione di ROS.

5.1.1.3 ANALISI CITOFLUORIMETRICA DELLA PRODUZIONE DI ROS NELLE CELLULE HEPG2

La produzione intracellulare di ROS nelle cellule HepG2 è stata ulteriormente analizzata mediante citofluorimetria a flusso, al fine di ottenere una quantificazione del segnale fluorescente generato dalla sonda DCFH-DA. Questa valutazione permette di passare dalla sola osservazione morfologica del segnale in microscopia a una misura più oggettiva dell'intensità di fluorescenza associata allo stato ossidativo cellulare.

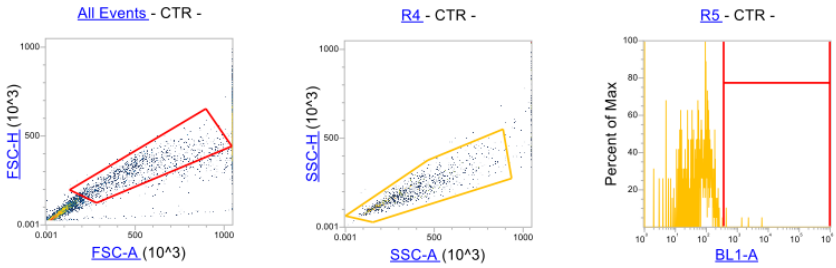


Figura 15. Strategia di gating per l'analisi citofluorimetrica dei ROS nelle cellule HepG2. *La strategia di gating è stata impostata sul controllo negativo per selezionare la popolazione cellulare da includere nell'analisi della fluorescenza DCFH-DA.* ***(a)*** *Selezione degli eventi cellulari con esclusione di detriti e particelle non cellulari.* ***(b)*** *Esclusione dei doppietti e selezione degli eventi singoli.* ***(c)*** *Identificazione della popolazione di cellule vive utilizzata per la quantificazione della fluorescenza media.*

Per garantire una corretta acquisizione degli eventi cellulari, l'analisi è stata preceduta dalla definizione della strategia di gating sul controllo negativo. In primo luogo, la popolazione cellulare è stata selezionata escludendo detriti e particelle di piccole dimensioni, così da delimitare gli eventi compatibili con cellule integre (Fig. 15 a). Successivamente, sono stati rimossi gli aggregati cellulari e i doppietti, mantenendo nell'analisi solo gli eventi singoli (Fig. 15 b). Infine, è stata identificata la popolazione di cellule vive, utilizzata come riferimento per la misurazione della fluorescenza media della sonda DCFH-DA (Fig. 15 c).

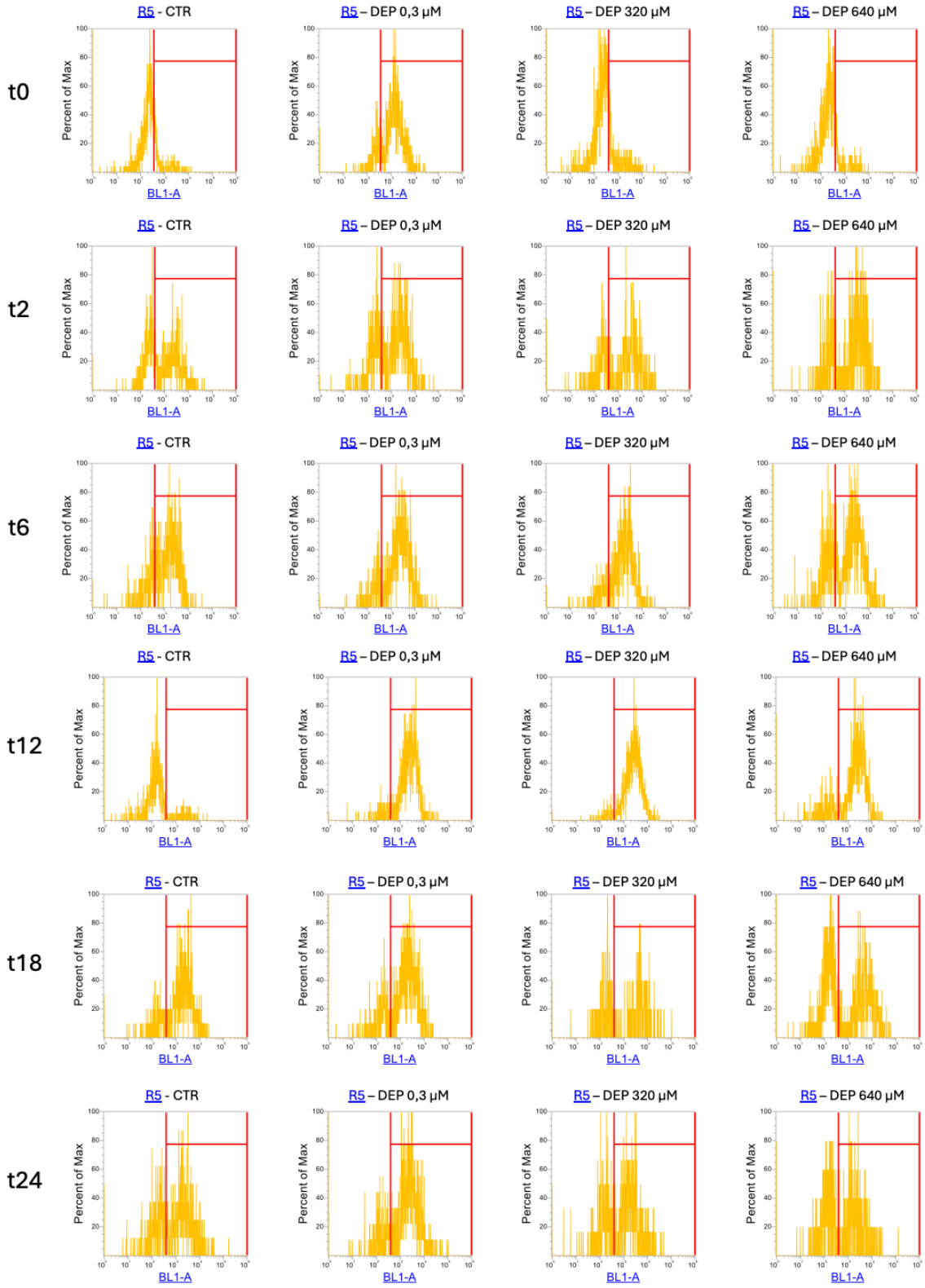


Figura 16. Profili FACS della fluorescenza DCF nelle cellule HepG2 trattate con DEP. *I pannelli mostrano la distribuzione del segnale fluorescente associato alla sonda DCFH-DA nelle cellule HepG2 esposte a 0,3 µM, 320 µM e 640 µM di DEP ai diversi tempi sperimentali. I profili citofluorimetrici evidenziano le variazioni del segnale DCF in relazione alla concentrazione del composto e alla durata del trattamento.*

I profili citofluorimetrici mostrano una diversa distribuzione del segnale fluorescente nelle cellule esposte a DEP rispetto al controllo, confermando la modulazione della produzione di ROS osservata nelle immagini al microscopio (Fig. 13-14). La quantificazione della fluorescenza media evidenzia un andamento strettamente legato sia alla concentrazione di DEP sia alla durata dell'esposizione (Fig. 16). In particolare, il trattamento con 640 µM induce un aumento rapido del segnale, con un massimo rilevabile a 6 h. Nei tempi successivi, la fluorescenza tende a diminuire, suggerendo che la risposta ossidativa iniziale possa essere seguita da una riduzione del numero di cellule vitali o metabolicamente attive nelle condizioni di maggiore stress.

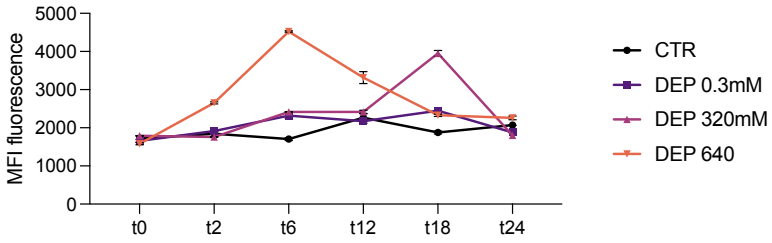


Figura 17. Quantificazione della produzione di ROS nelle cellule HepG2 esposte a DEP. Il grafico mostra l'andamento della fluorescenza media misurata mediante analisi FACS nelle cellule HepG2 trattate con DEP. Il trattamento con 640 µM induce un picco di ROS a 6 h, seguito da una riduzione del segnale nei tempi successivi. Alla concentrazione di 320 µM il massimo incremento si osserva a 18 h, mentre il trattamento con 0,3 µM non determina variazioni rilevanti rispetto al controllo.

Alla concentrazione di 320 µM, corrispondente all'IC50 calcolata a 24 h, la risposta appare più graduale. In questo caso, il segnale aumenta progressivamente e raggiunge il valore massimo a 18 h, indicando una cinetica più lenta rispetto alla concentrazione più elevata (Fig. 17). Questo comportamento suggerisce che, a una dose intermedia, le cellule HepG2 vadano incontro a un accumulo progressivo di stress ossidativo prima del raggiungimento del picco di fluorescenza. Diversamente, il trattamento con 0,3 µM non determina variazioni rilevanti della fluorescenza rispetto al controllo nei tempi analizzati (Fig. 17). Questo risultato indica che la concentrazione più bassa non produce una perturbazione significativa dello stato redox intracellulare, almeno nelle condizioni sperimentali considerate.

Nel complesso, l'analisi citofluorimetrica mostra che il DEP promuove la produzione di ROS nelle cellule HepG2 secondo una cinetica dipendente dalla concentrazione. La risposta è precoce e più intensa a 640 µM, più tardiva a 320 µM e sostanzialmente assente a 0,3 µM. Questi risultati confermano il coinvolgimento dello stress ossidativo nella risposta delle cellule HepG2 al DEP, soprattutto a concentrazioni prossime o superiori al valore di IC50.

5.1.1.4 VALUTAZIONE DELLA RISPOSTA INFIAMMATORIA NELLE CELLULE HEPG2 MEDIANTE ELISA

La risposta infiammatoria delle cellule HepG2 esposte a DEP è stata valutata mediante dosaggio ELISA dei marker rilasciati nel surnatante cellulare. In particolare, sono stati analizzati IL-6, IL-1α, IL-8, IFN-γ e IL-10, con l'obiettivo di caratterizzare la modulazione del profilo citochinico in seguito al trattamento e di valutare se l'esposizione al composto fosse associata all'attivazione di una risposta infiammatoria nel modello epatico in vitro. Per ciascun analita, la quantificazione è stata effettuata mediante curva standard, riportata nella parte superiore dei rispettivi pannelli, mentre i grafici a barre mostrano le concentrazioni misurate nei surnatanti cellulari.

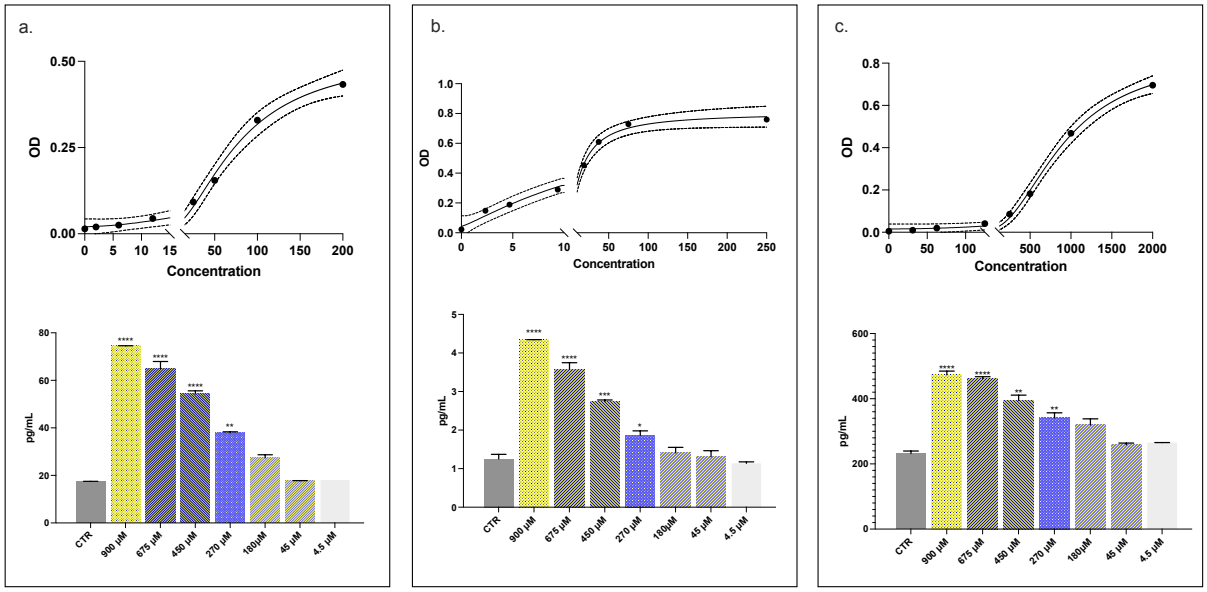


Figura 18. Quantificazione delle citochine pro-infiammatorie nel surnatante delle cellule HepG2 esposte a DEP. *I pannelli mostrano le curve standard ELISA e la quantificazione dei livelli di citochine pro-infiammatorie rilasciate nel surnatante cellulare dopo esposizione a DEP.* ***(a)*** *IL-6;* ***(b)*** *IL-1α;* ***(c)*** *IL-8. I dati sono espressi in pg/mL. L'aumento dei livelli di IL-6, IL-1α e IL-8 alle concentrazioni più elevate di DEP indica una modulazione pro-infiammatoria del profilo citochinico nelle cellule HepG2. I dati sono espressi come media* ± SEM. *L'esperimento è stato eseguito in duplicato, con 12 pozzetti analizzati per ciascuna condizione. L'analisi statistica è stata effettuata mediante one-way ANOVA seguita da test post hoc di Bonferroni.*

L'analisi delle citochine pro-infiammatorie evidenzia una marcata modulazione del profilo infiammatorio nelle cellule HepG2 trattate con DEP. I livelli di IL-6 risultano aumentati nei campioni esposti alle concentrazioni più elevate del composto, con il valore maggiore osservato a 900 µM. Tale incremento si riduce progressivamente al diminuire della concentrazione di DEP, mostrando un andamento compatibile con una risposta dose-dipendente. Le

concentrazioni intermedie mantengono livelli di IL-6 superiori al controllo, mentre le concentrazioni più basse mostrano valori più vicini alla condizione basale (Fig. 18 a). Questo andamento suggerisce che l'esposizione al DEP sia in grado di stimolare il rilascio di IL-6, soprattutto in condizioni di maggiore stress cellulare.

Un profilo analogo viene osservato per IL-1α, i cui livelli aumentano in maniera evidente nei campioni trattati con le concentrazioni più alte di DEP. In particolare, 900 μM, 675 μM e 450 μM determinano un incremento della citochina rispetto al controllo, mentre alle concentrazioni inferiori il segnale tende progressivamente a ridursi (Fig. 18 b). Considerando il ruolo di IL-1α come mediatore associato al danno cellulare e all'attivazione di risposte infiammatorie locali, l'aumento osservato nei gruppi maggiormente esposti suggerisce una condizione di attivazione infiammatoria correlata all'intensità del trattamento.

Anche IL-8 mostra un incremento nei surnatanti delle cellule HepG2 esposte a DEP, con valori più elevati alle concentrazioni maggiori e una riduzione graduale verso le concentrazioni più basse (Fig. 18 c). L'aumento di IL-8, insieme all'incremento di IL-6 e IL-1α, contribuisce a delineare un profilo pro-infiammatorio nei campioni trattati. Tale risposta risulta particolarmente evidente nei gruppi esposti alle concentrazioni più elevate, indicando che la compromissione cellulare indotta dal DEP si associa a un aumento del rilascio di mediatori infiammatori nel surnatante.

Nel loro insieme, IL-6, IL-1α e IL-8 mostrano un andamento coerente, caratterizzato da livelli più elevati nei campioni trattati con concentrazioni alte di DEP e da una progressiva riduzione alle concentrazioni inferiori. Questo pattern suggerisce che la risposta infiammatoria delle HepG2 sia strettamente collegata all'intensità dell'esposizione. Inoltre, tali risultati si integrano con quanto osservato nei paragrafi precedenti, nei quali il DEP determina una riduzione della vitalità cellulare e un incremento della produzione intracellulare di ROS. L'aumento delle citochine pro-infiammatorie può quindi essere interpretato come parte di una risposta cellulare associata allo stress indotto dal composto.

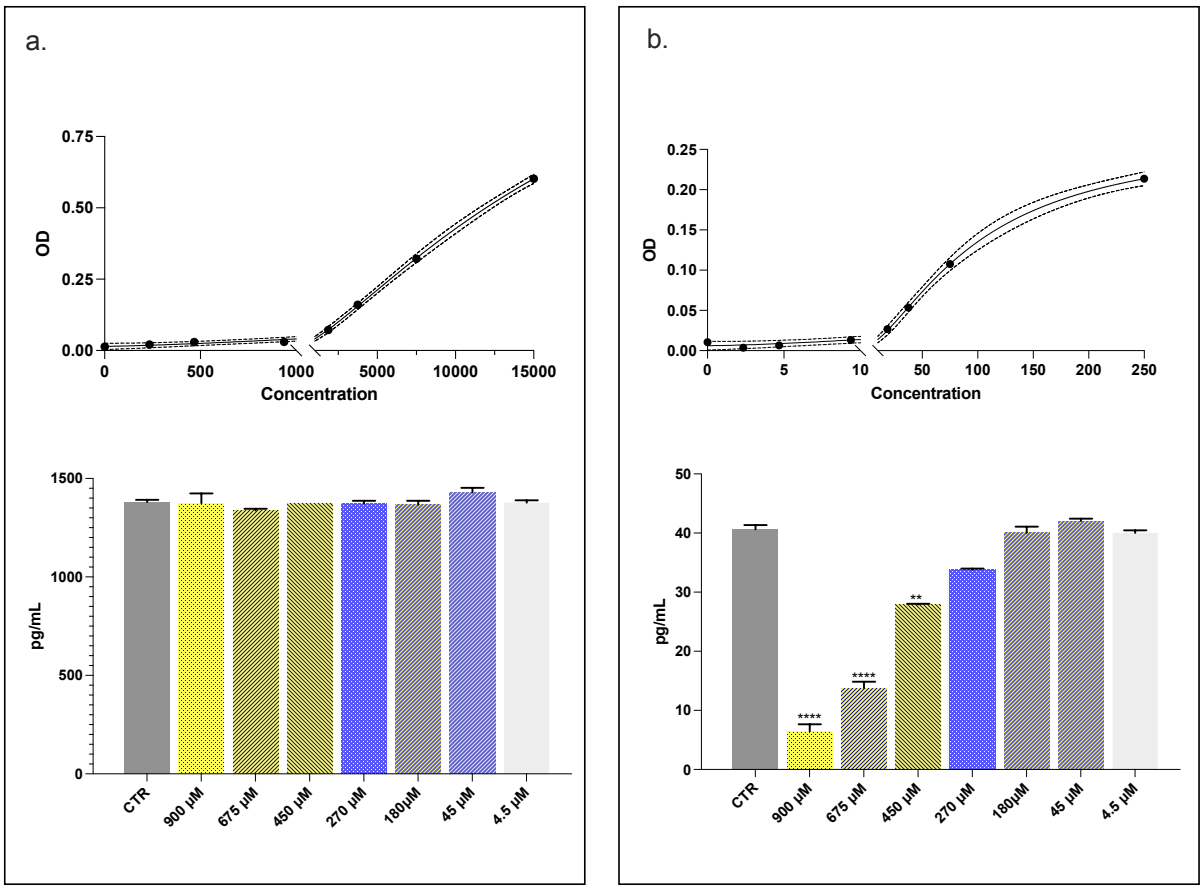


Figura 19. Quantificazione di IFN-γ e IL-10 nel surnatante delle cellule HepG2 esposte a DEP. *I pannelli mostrano le curve standard ELISA e la quantificazione dei livelli di IFN-γ e IL-10 rilasciati nel surnatante cellulare dopo esposizione a DEP.* ***(a)*** *IFN-γ;* ***(b)*** *IL-10. I dati sono espressi in pg/mL. IFN-γ non mostra variazioni rilevanti tra controllo e gruppi trattati, mentre IL-10 risulta ridotta alle concentrazioni più elevate di DEP. I dati sono espressi come media ± SEM. L'esperimento è stato eseguito in duplicato, con 12 pozzetti analizzati per ciascuna condizione. L'analisi statistica è stata effettuata mediante one-way ANOVA seguita da test post hoc di Bonferroni.*

Per quanto riguarda IFN-γ, i livelli misurati nel surnatante non mostrano variazioni rilevanti tra il gruppo controllo e i gruppi trattati con DEP (Fig. 19 a). I valori rimangono complessivamente stabili nelle diverse condizioni sperimentali, senza un chiaro andamento dose-dipendente. Questo risultato suggerisce che, nel modello HepG2 e nelle condizioni sperimentali analizzate, l'esposizione al DEP non determini una modulazione significativa di IFN-γ. Pertanto, la risposta infiammatoria osservata sembra essere principalmente associata all'aumento di IL-6, IL-1α e IL-8, piuttosto che a una variazione di questo specifico marker.

Un comportamento differente viene osservato per IL-10, marker associato alla componente regolatoria e anti-infiammatoria della risposta cellulare. Nei campioni trattati con le concentrazioni più elevate di DEP, in particolare 900 µM e 675 µM, i livelli di IL-10 risultano

marcatamente ridotti rispetto al controllo (Fig. 19 b). Alle concentrazioni intermedie e basse, invece, il segnale tende progressivamente ad aumentare, avvicinandosi ai valori osservati nella condizione di controllo. Questo andamento suggerisce che, in presenza di un'esposizione più intensa al DEP, la componente regolatoria rappresentata da IL-10 possa risultare compromessa o insufficiente a controbilanciare l'attivazione pro-infiammatoria.

La riduzione di IL-10 alle concentrazioni più elevate, associata all'aumento concomitante di IL-6, IL-1α e IL-8, evidenzia uno sbilanciamento del profilo citochinico verso una condizione prevalentemente pro-infiammatoria. Tale squilibrio appare particolarmente evidente nei gruppi sottoposti alle concentrazioni più alte di DEP, nei quali si osservano anche i maggiori effetti citotossici e ossidativi. Questo dato rafforza l'idea che la risposta infiammatoria non rappresenti un evento isolato, ma si inserisca in un quadro più ampio di stress cellulare, caratterizzato da ridotta vitalità, aumento dei ROS e alterazione del rilascio di mediatori solubili.

Nel complesso, i risultati ottenuti mediante ELISA indicano che il DEP modula il profilo citochinico delle cellule HepG2 in maniera dipendente dalla concentrazione. L'esposizione alle dosi più elevate determina un aumento dei principali marker pro-infiammatori, quali IL-6, IL-1α e IL-8, mentre IFN-γ non mostra variazioni evidenti. Parallelamente, la riduzione di IL-10 suggerisce una diminuzione della componente regolatoria della risposta. Questi risultati indicano che, nel modello epatico in vitro, la citotossicità e lo stress ossidativo indotti dal DEP si associano a una risposta infiammatoria caratterizzata da uno spostamento del profilo citochinico verso una condizione pro-infiammatoria.

5.1.2 VALUTAZIONE DEGLI EFFETTI DEL DEP SULLE CELLULE HEK-293

Nelle cellule HEK-293, l'esposizione al DEP viene valutata considerando parametri cellulari associati alla citotossicità, allo stress ossidativo e alla modulazione della risposta infiammatoria. Questo modello cellulare, di origine renale, consente di analizzare in vitro alcune risposte riconducibili al compartimento renale, con particolare attenzione alla sensibilità delle cellule al trattamento e alle alterazioni funzionali indotte dal composto.

I risultati relativi alle cellule HEK-293 sono presentati seguendo una progressione che parte dalla valutazione della vitalità cellulare, prosegue con l'analisi della produzione di ROS mediante microscopia a fluorescenza e citofluorimetria, e si completa con la quantificazione dei marker infiammatori rilasciati nel surnatante cellulare.

5.1.2.1 Effetti del DEP sulla vitalità cellulare delle cellule HEK-293

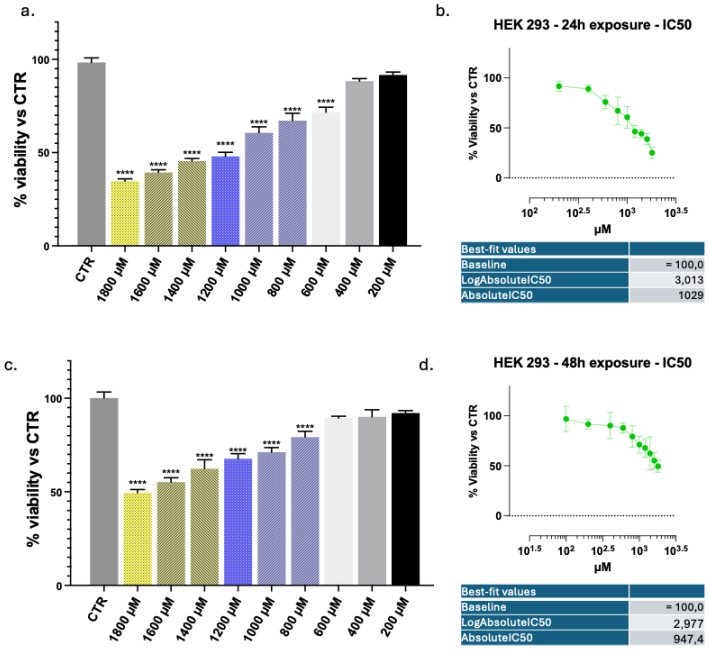


Figura 20. Effetto del DEP sulla vitalità cellulare delle cellule HEK. *La vitalità cellulare è stata valutata mediante saggio MTT dopo trattamento con concentrazioni crescenti di DEP, comprese tra 200 µM e 1800 µM, per 24 h e 48 h. (a) Vitalità cellulare dopo 24 h di esposizione al DEP; (b) curva dose-risposta e calcolo dell'IC50 dopo 24 h di esposizione; (c) vitalità cellulare dopo 48 h di esposizione al DEP; (d) curva dose-risposta e calcolo dell'IC50 dopo 48 h di esposizione. I dati sono espressi come media ± SEM. L'esperimento è stato eseguito in duplicato, con 12 pozzetti analizzati per ciascuna condizione. L'analisi statistica è stata effettuata mediante one-way ANOVA seguita da test post hoc di Bonferroni. L'IC50 calcolata è pari a 1029 µM a 24 h e 947 µM a 48 h.*

La vitalità cellulare delle cellule HEK è stata valutata mediante saggio MTT dopo esposizione a concentrazioni crescenti di DEP, comprese tra 200 µM e 1800 µM, per 24 h e 48 h. L'analisi è stata condotta al fine di determinare l'effetto citotossico del composto sul modello cellulare renale e di identificare la concentrazione in grado di ridurre del 50% la vitalità cellulare rispetto al controllo.

I risultati mostrano una riduzione dose-dipendente della vitalità cellulare in seguito al trattamento con DEP (Fig. 20 a,c). Alle concentrazioni più basse, la vitalità delle cellule HEK risulta maggiormente conservata, mentre l'aumento della concentrazione del composto determina una progressiva riduzione della risposta metabolica cellulare. Questo andamento evidenzia un effetto citotossico crescente del DEP, coerente con una compromissione della vitalità cellulare proporzionale alla dose di esposizione.

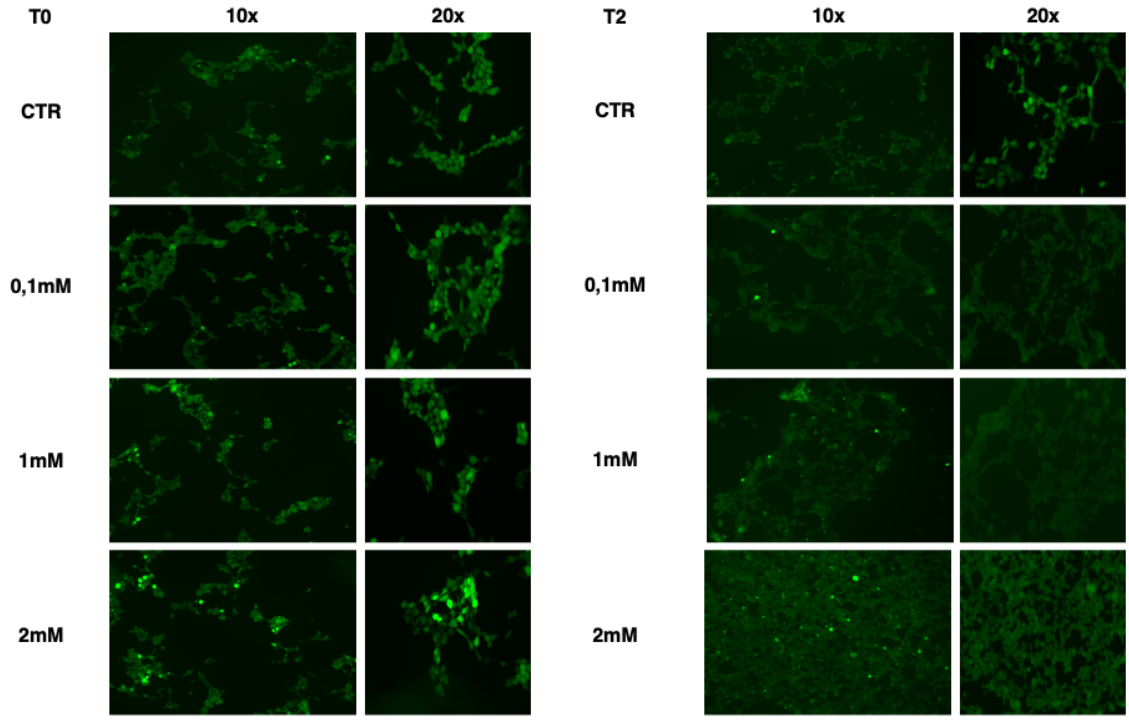
Il confronto tra i due tempi sperimentali mostra inoltre una maggiore sensibilità delle cellule al trattamento prolungato. L'IC50 calcolata risulta pari a 1029 µM dopo 24 h di esposizione e a 947 µM dopo 48 h, indicando che l'estensione del tempo di trattamento determina una riduzione della concentrazione necessaria per ottenere il 50% di inibizione della vitalità cellulare. Questo dato suggerisce un effetto citotossico non solo dose-dipendente, ma anche influenzato dalla durata dell'esposizione (Fig. 20 b,d).

Nel complesso, i risultati indicano che il DEP riduce la vitalità delle cellule HEK in maniera dose-dipendente, con un effetto più marcato dopo 48 h di trattamento. La diminuzione dell'IC50 nel tempo supporta l'ipotesi che l'esposizione prolungata al composto aumenti la vulnerabilità delle cellule renali agli effetti citotossici del DEP.

5.1.2.2 VALUTAZIONE DELLA PRODUZIONE INTRACELLULARE DI ROS NELLE CELLULE HEK-293

La produzione intracellulare di specie reattive dell'ossigeno nelle cellule HEK-293 è stata valutata mediante sonda fluorescente DCFH-DA, al fine di osservare le variazioni dello stato ossidativo cellulare in seguito all'esposizione al DEP. Le cellule sono state trattate con differenti concentrazioni di DEP, sulla base dei risultati dell' IC50, e analizzate ai diversi tempi sperimentali mediante microscopia a fluorescenza per determinare il picco di produzione di ROS.

Le immagini acquisite mostrano un aumento del segnale fluorescente DCF nelle cellule esposte a DEP rispetto ai controlli (Fig. 21). Tale segnale non appare uniforme tra le diverse condizioni sperimentali, ma varia in funzione della concentrazione del composto e della durata dell'esposizione. L'incremento della fluorescenza risulta particolarmente evidente nelle condizioni associate alle concentrazioni più elevate, suggerendo una maggiore alterazione dello stato redox cellulare nei campioni trattati (Fig. 21).



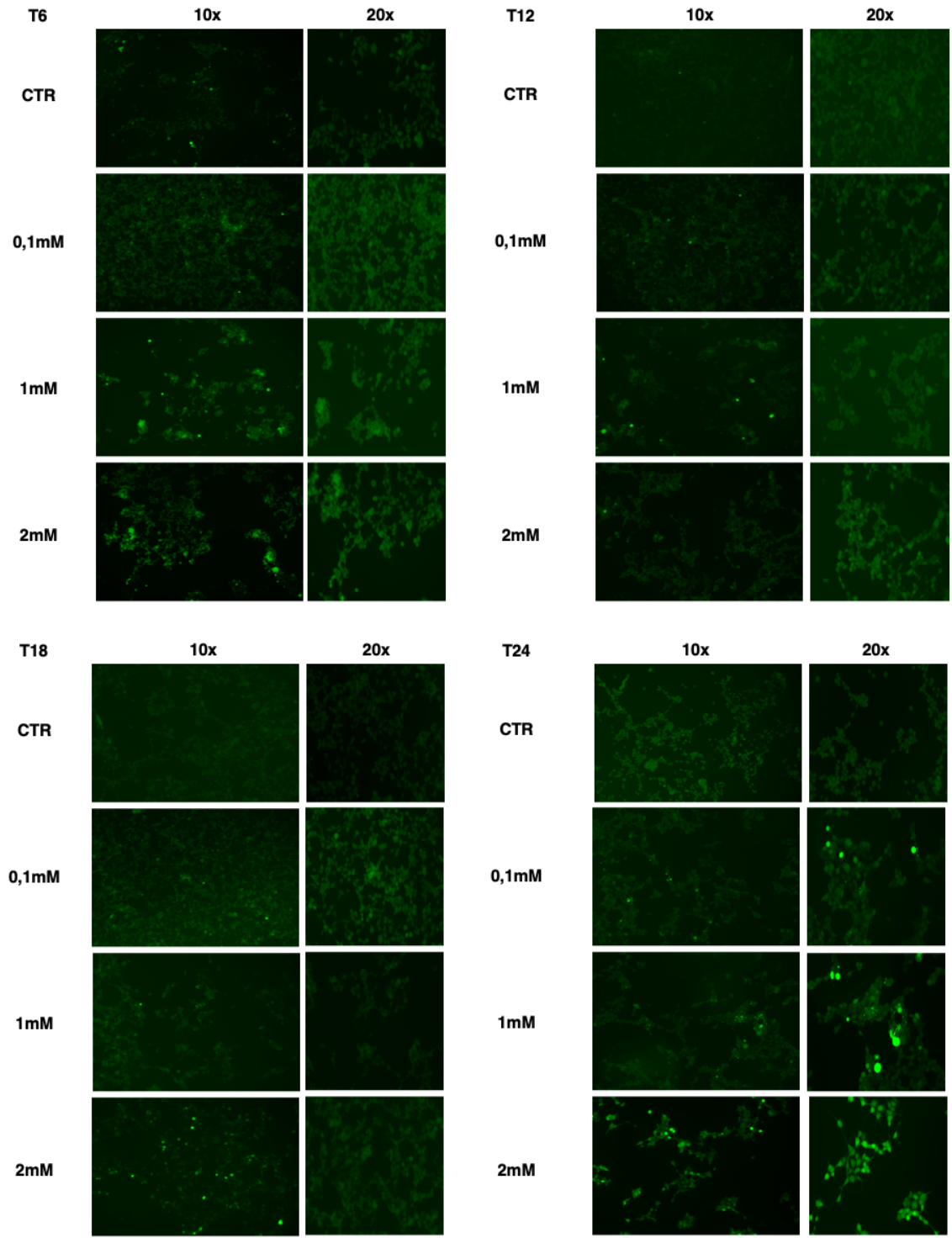


Figura 21. Produzione intracellulare di ROS nelle cellule HEK-293 osservata mediante microscopia a fluorescenza. *Le immagini rappresentative mostrano il segnale fluorescente DCF nelle cellule HEK-293 esposte a DEP alle diverse concentrazioni e ai differenti tempi sperimentali. Le immagini sono state acquisite a 10× e 20×. L'aumento dell'intensità fluorescente nei campioni trattati indica una maggiore produzione intracellulare di ROS rispetto al controllo.*

L’osservazione microscopica consente quindi di evidenziare qualitativamente la presenza di una risposta ossidativa nelle cellule HEK-293 trattate con DEP. L’aumento del segnale DCF rappresenta una prima indicazione dell’accumulo intracellulare di ROS e costituisce la base per la successiva quantificazione mediante analisi citofluorimetrica.

5.1.2.3 ANALISI CITOFLUORIMETRICA DELLA PRODUZIONE DI ROS NELLE CELLULE HEK-293

L'analisi citofluorimetrica è stata eseguita per quantificare la produzione intracellulare di ROS nelle cellule HEK-293 trattate con DEP, misurando la fluorescenza media associata alla sonda DCFH-DA. Prima della quantificazione, è stata definita una strategia di gating sul controllo negativo, al fine di selezionare in modo accurato la popolazione cellulare da includere nell'analisi.

Inizialmente, il gate è stato impostato per escludere detriti cellulari e particelle non cellulari sulla base delle caratteristiche di dispersione cellulare (Fig. 22 a). Successivamente, è stato applicato un secondo gate per eliminare i doppietti e selezionare esclusivamente gli eventi singoli (Fig. 22 b). Infine, è stato definito il gate relativo alla popolazione di cellule vive, utilizzato come riferimento per l'analisi della fluorescenza media associata alla produzione di ROS (Fig. 22 c).

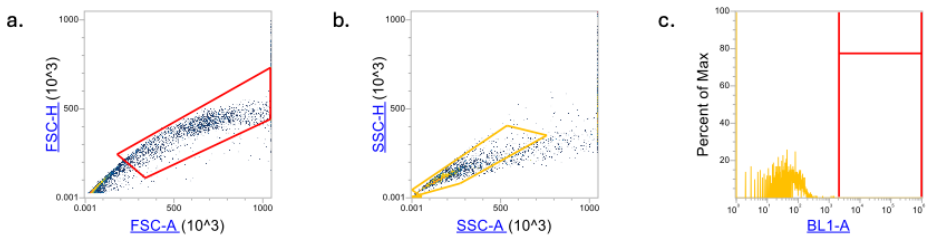


Figura 22. Strategia di gating utilizzata per l'analisi citofluorimetrica dei ROS nelle cellule HEK-293.
La strategia di gating è stata definita sul controllo negativo prima della quantificazione della fluorescenza associata alla sonda DCFH-DA. (a) Gate utilizzato per escludere detriti cellulari e particelle non cellulari. (b) Gate utilizzato per eliminare i doppietti e selezionare gli eventi singoli. (c) Definizione del gate relativo alla popolazione di cellule vive utilizzata per la successiva analisi della fluorescenza media.

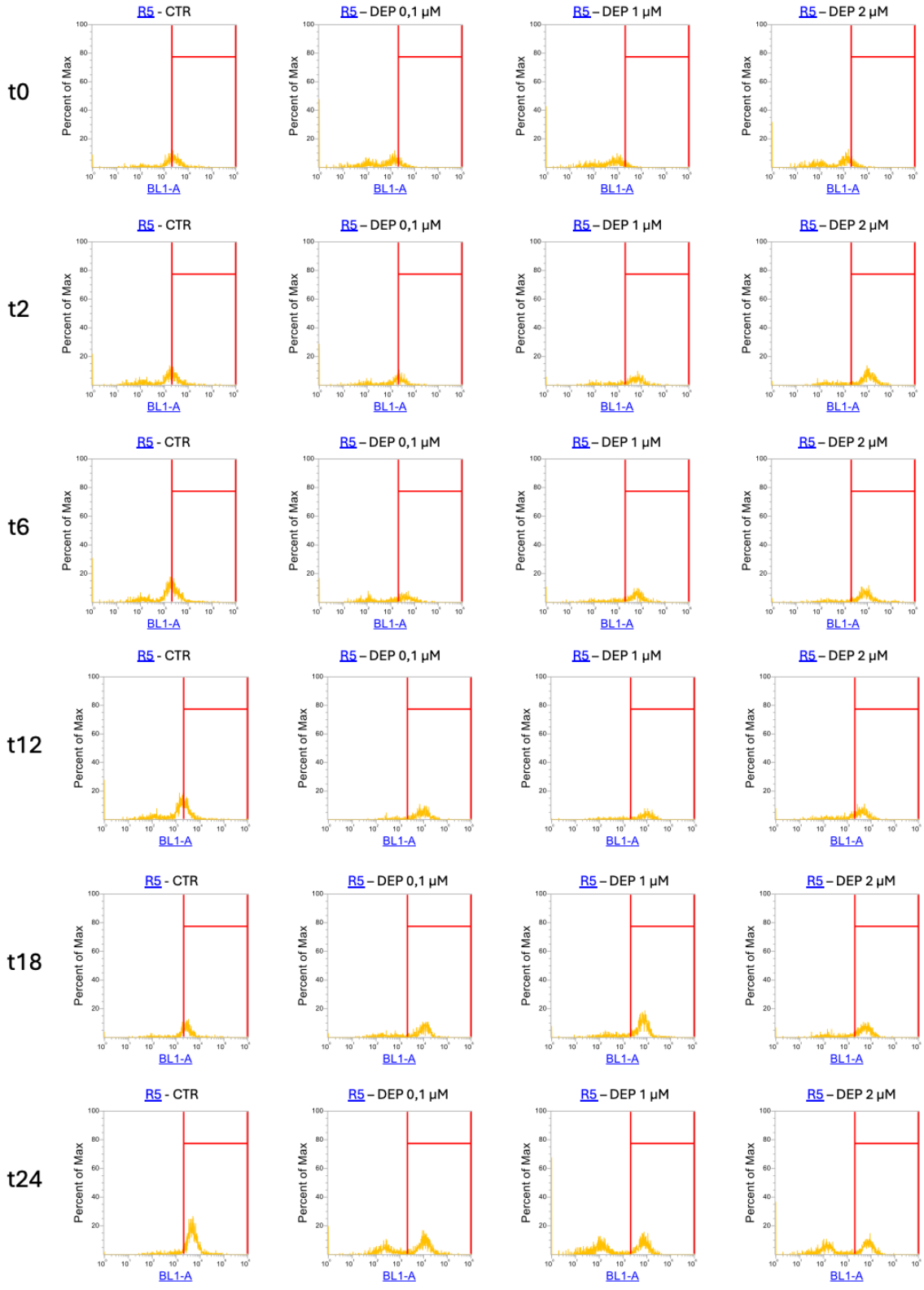


Figura 23. Profili citofluorimetrici della produzione di ROS nelle cellule HEK-293. *I pannelli mostrano i profili FACS relativi alla fluorescenza media della sonda DCFH-DA nelle cellule HEK-293 esposte a DEP alle diverse concentrazioni e ai differenti tempi sperimentali. L'analisi citofluorimetrica consente di quantificare la variazione del segnale fluorescente associato alla produzione intracellulare di ROS.*

I profili citofluorimetrici mostrano una variazione della fluorescenza media nelle cellule trattate con DEP rispetto al controllo, confermando quanto osservato mediante microscopia a fluorescenza (Fig. 21). L'analisi quantitativa evidenzia un andamento dipendente sia dalla concentrazione del composto sia dal tempo di esposizione (Fig. 23). Nelle cellule trattate con DEP 2 mM si osserva un picco precoce della produzione di ROS dopo 2 h, seguito da una progressiva riduzione del segnale nei tempi successivi (Fig. 24). Questo andamento può essere interpretato in relazione alla marcata compromissione della vitalità cellulare alle concentrazioni più elevate, per cui la riduzione della fluorescenza nei tempi tardivi può riflettere una perdita di cellule metabolicamente attive.

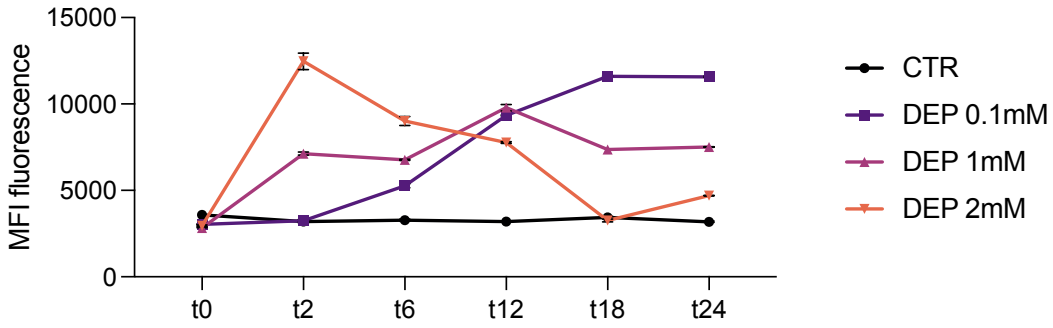


Figura 24. Andamento temporale della produzione di ROS nelle cellule HEK-293 esposte a DEP. *Il grafico riporta la fluorescenza media ottenuta dall'analisi FACS nelle cellule HEK-293 trattate con DEP. Alla concentrazione di 2 mM si osserva un picco precoce della produzione di ROS dopo 2 h, seguito da una progressiva riduzione del segnale. Alla concentrazione di 1 mM il picco di ROS si osserva intorno alle 12 h, mentre a 0,1 mM si rileva un incremento graduale della fluorescenza nel tempo senza un picco definito.*

Alla concentrazione di 1 mM, l'aumento della fluorescenza presenta un andamento più tardivo, con un picco osservabile intorno alle 12 h di esposizione (Fig. 24). Questo suggerisce una risposta ossidativa progressiva, meno immediata rispetto a quella osservata alla concentrazione più alta. Alla concentrazione di 0,1 mM, invece, non si evidenzia un picco netto, ma si osserva un incremento graduale del segnale fluorescente nel tempo, indicativo di una modulazione più lenta e meno intensa dello stato redox intracellulare (Fig. 23).

Nel complesso, l'analisi FACS conferma che il DEP induce un aumento della produzione intracellulare di ROS nelle cellule HEK-293. Il pattern osservato evidenzia una risposta concentrazione- e tempo-dipendente, caratterizzata da un picco precoce a 2 mM, un picco intermedio a 1 mM e un incremento progressivo a 0,1 mM. Questi risultati indicano che lo stress ossidativo rappresenta un evento cellulare rilevante nella risposta delle HEK-293 all'esposizione al DEP.

5.1.2.4 VALUTAZIONE DELLA RISPOSTA INFIAMMATORIA NELLE CELLULE HEK-293 MEDIANTE ELISA

La modulazione della risposta infiammatoria nelle cellule HEK-293 esposte a DEP è stata valutata mediante dosaggio ELISA dei mediatori rilasciati nel surnatante cellulare. Sono stati analizzati IL-6, IL-1α, IL-8, IFN-γ e IL-10, con l'obiettivo di definire il profilo citochinico del modello renale in vitro in seguito al trattamento. Per ciascuna citochina, la quantificazione è stata ottenuta mediante curva standard, riportata nella porzione superiore dei rispettivi pannelli, mentre i grafici a barre mostrano i livelli rilevati nei surnatanti cellulari.

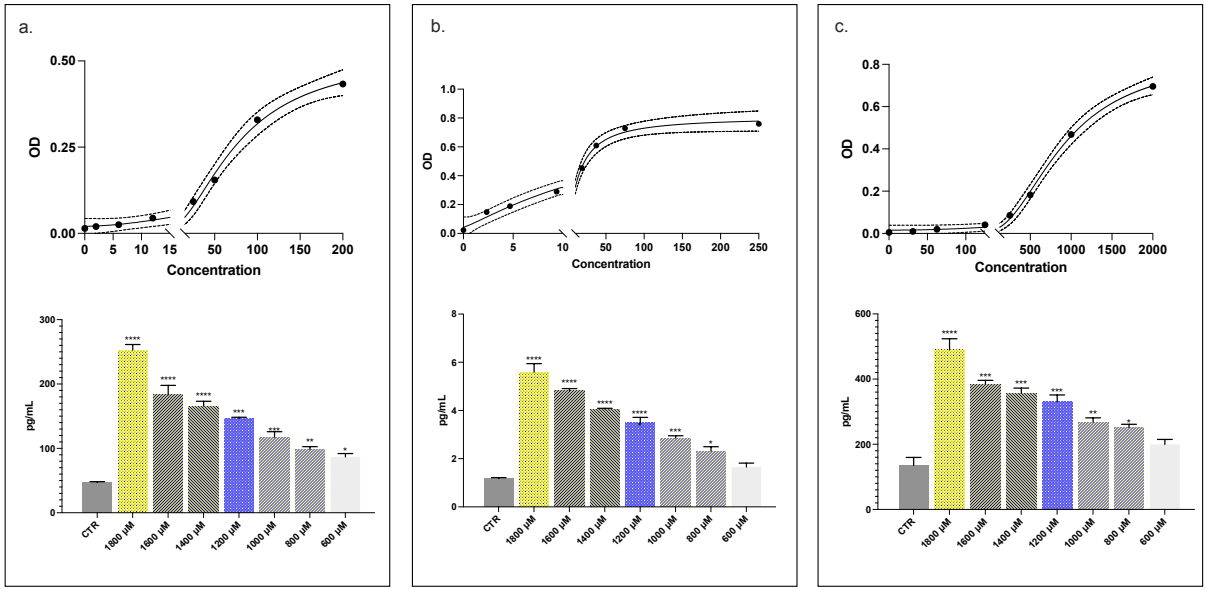


Figura 25. Quantificazione delle citochine pro-infiammatorie nel surnatante delle cellule HEK-293 esposte a DEP. *I pannelli mostrano le curve standard ELISA e la quantificazione dei livelli di citochine pro-infiammatorie rilasciate nel surnatante cellulare dopo esposizione a DEP.* ***(a)*** *IL-6;* ***(b)*** *IL-1α;* ***(c)*** *IL-8. I dati sono espressi in pg/mL. L'aumento dei livelli di IL-6, IL-1α e IL-8 alle concentrazioni più elevate di DEP indica l'attivazione di una risposta pro-infiammatoria nelle cellule HEK-293. I dati sono espressi come media ± SEM. L'esperimento è stato eseguito in duplicato, con 12 pozzetti analizzati per ciascuna condizione. L'analisi statistica è stata effettuata mediante one-way ANOVA seguita da test post hoc di Bonferroni.*

I risultati relativi alle citochine pro-infiammatorie evidenziano una risposta marcata delle cellule HEK-293 all'esposizione al DEP. I livelli di IL-6 risultano aumentati in modo evidente nei campioni trattati, con il valore più elevato osservato alla concentrazione di 1800 µM. La concentrazione della citochina diminuisce progressivamente al ridursi della dose di DEP, pur mantenendosi superiore al controllo anche alle concentrazioni intermedie e più basse analizzate

(Fig. 25 a). Questo andamento suggerisce che il DEP sia in grado di stimolare il rilascio di IL-6 nel modello renale, con una risposta proporzionale all'intensità dell'esposizione.

Un comportamento simile si osserva per IL-1α. Anche in questo caso, il trattamento con DEP determina un incremento dei livelli della citochina rispetto al controllo, particolarmente evidente alle concentrazioni più elevate. I valori più alti si osservano nei campioni esposti a 1800 µM e 1600 µM, seguiti da una riduzione progressiva alle concentrazioni inferiori (Fig. 25 b). Tale profilo indica una chiara attivazione di segnali pro-infiammatori nelle cellule HEK-293, coerente con una risposta cellulare al danno indotto dal composto.

Anche IL-8 mostra un aumento significativo nei campioni trattati con DEP, con una risposta più pronunciata alle concentrazioni maggiori e una graduale riduzione del segnale al diminuire della dose (Fig. 25 c). I livelli elevati di IL-8 nei gruppi maggiormente esposti suggeriscono l'attivazione di una risposta infiammatoria associata allo stress cellulare. Nel loro insieme, l'aumento di IL-6, IL-1α e IL-8 indica che il trattamento con DEP promuove nelle HEK-293 un profilo prevalentemente pro-infiammatorio, particolarmente evidente alle concentrazioni più alte.

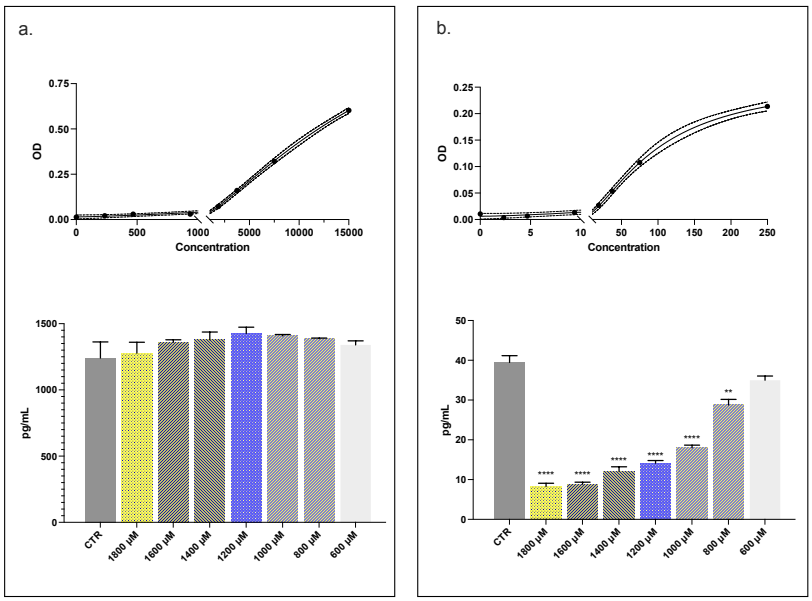


Figura 26. Quantificazione di IFN-γ e IL-10 nel surnatante delle cellule HEK-293 esposte a DEP. *I pannelli mostrano le curve standard ELISA e la quantificazione dei livelli di IFN-γ e IL-10 rilasciati nel surnatante cellulare dopo esposizione a DEP.* ***(a)*** *IFN-γ;* ***(b)*** *IL-10. I dati sono espressi in pg/mL. IFN-γ non mostra variazioni rilevanti tra controllo e gruppi trattati, mentre IL-10 risulta ridotta alle concentrazioni più elevate di DEP. I dati sono espressi come media ± SEM. L'esperimento è stato eseguito in duplicato, con 12 pozzetti analizzati per ciascuna condizione. L'analisi statistica è stata effettuata mediante one-way ANOVA seguita da test post hoc di Bonferroni.*

L'analisi di IFN-γ mostra invece un andamento differente rispetto alle altre citochine pro-infiammatorie. I livelli rilevati nel surnatante appaiono complessivamente stabili tra controllo e gruppi trattati, senza variazioni rilevanti o un chiaro andamento dose-dipendente (Fig. 26 a). Questo dato suggerisce che, nelle condizioni sperimentali analizzate, IFN-γ non rappresenti il principale mediatore coinvolto nella risposta delle cellule HEK-293 al DEP.

Per quanto riguarda IL-10, si osserva una riduzione marcata nei campioni esposti alle concentrazioni più elevate di DEP, in particolare a 1800 μM e 1600 μM, rispetto al controllo (Fig. 26 b). Alle concentrazioni più basse, i livelli di IL-10 tendono progressivamente ad aumentare, avvicinandosi ai valori basali. Questo andamento suggerisce che l'esposizione alle dosi più elevate del composto possa compromettere la componente regolatoria o anti-infiammatoria della risposta cellulare, favorendo uno sbilanciamento verso un profilo infiammatorio.

La combinazione tra aumento di IL-6, IL-1α e IL-8 e riduzione di IL-10 evidenzia uno squilibrio del profilo citochinico nelle cellule HEK-293 trattate con DEP. Tale risposta appare particolarmente evidente alle concentrazioni più elevate, che sono anche quelle associate a una maggiore compromissione della vitalità cellulare e a una più intensa produzione di ROS. Questi risultati indicano che, nel modello renale in vitro, l'esposizione al DEP non determina esclusivamente un effetto citotossico e ossidativo, ma si associa anche a una significativa modulazione del microambiente infiammatorio cellulare.

Nel complesso, i dati ottenuti mediante ELISA mostrano che il DEP induce nelle cellule HEK-293 una risposta infiammatoria caratterizzata dall'aumento dose-dipendente di IL-6, IL-1α e IL-8, dall'assenza di variazioni evidenti di IFN-γ e dalla riduzione di IL-10 alle concentrazioni più alte. Questo profilo suggerisce uno spostamento della risposta cellulare verso una condizione pro-infiammatoria, coerente con il quadro di stress ossidativo e citotossicità osservato nei saggi precedenti.

5.2 RISULTATI DEGLI STUDI IN VIVO

L'indagine in vivo è stata condotta con l'obiettivo di valutare se l'esposizione al DEP fosse in grado di indurre alterazioni tissutali rilevabili a livello epatico e renale. La scelta di analizzare questi due organi deriva dal loro ruolo centrale nei processi di metabolismo, detossificazione ed eliminazione degli xenobiotici, che li rende particolarmente suscettibili agli effetti biologici di composti chimici ambientali.

I risultati ottenuti sono stati organizzati separatamente per tessuto, distinguendo il compartimento epatico da quello renale, al fine di descrivere in modo più chiaro le eventuali modificazioni indotte dal trattamento. Per ciascun organo sono state considerate le principali alterazioni istopatologiche, la presenza di fibrosi, l'attivazione di processi apoptotici e l'espressione di marker associati al danno cellulare e alla risposta infiammatoria.

5.2.1 VALUTAZIONE DEGLI EFFETTI DEL DEP SUL TESSUTO EPATICO

Nel tessuto epatico, l'esposizione al DEP è stata valutata considerando le modificazioni strutturali e cellulari osservabili nei campioni trattati rispetto ai controlli. L'analisi è stata orientata a identificare eventuali segni di danno epatocellulare, alterazioni dell'organizzazione del parenchima, modificazioni del compartimento stromale e attivazione di processi compatibili con sofferenza cellulare.

5.2.1.1 ANALISI ISTOPATOLOGICA DEL FEGATO MEDIANTE COLORAZIONE EMATOSSILINA/EOSINA

'analisi istopatologica del tessuto epatico mediante colorazione Ematossilina/Eosina ha consentito di valutare l'organizzazione morfologica generale del parenchima e di identificare eventuali alterazioni strutturali associate all'esposizione al DEP. Nei campioni appartenenti al gruppo controllo, il fegato mostrava un'architettura istologica conservata, caratterizzata da cordoni epatocitari regolarmente disposti, sinusoidi ben riconoscibili e distribuzione omogenea delle cellule epatiche. Non sono state osservate alterazioni evidenti dell'organizzazione lobulare né segni marcati di danno cellulare o infiltrazione infiammatoria (Fig. 27 a,b).

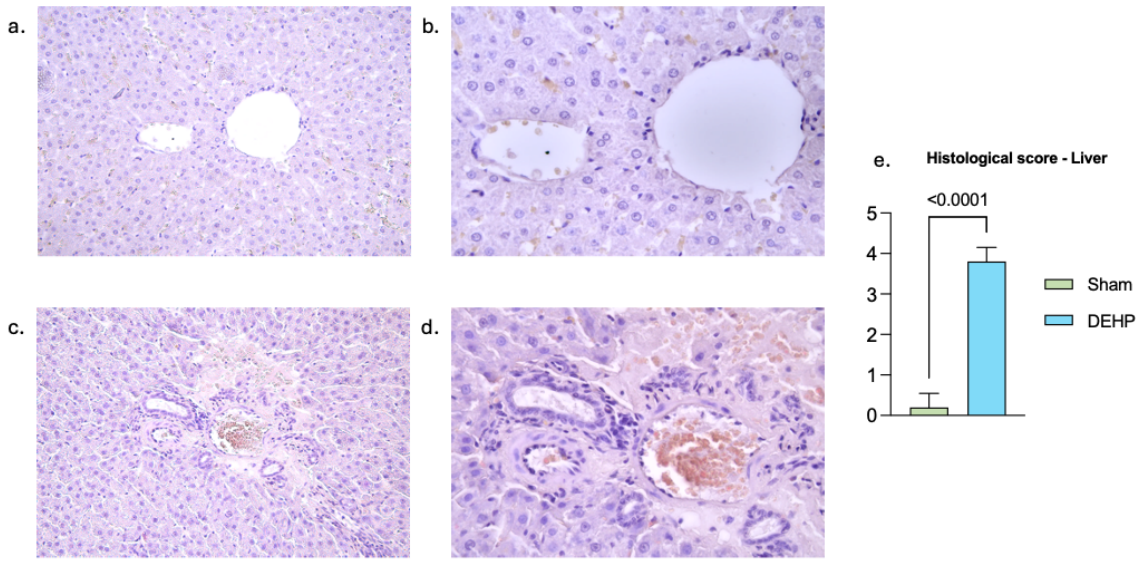


Figura 27. Alterazioni istopatologiche del tessuto epatico valutate mediante colorazione Ematossilina/Eosina. *Le immagini rappresentative mostrano l'organizzazione del parenchima epatico nei gruppi Sham e DEP.* ***(a)*** *Sezione epatica del gruppo Sham osservata a 10×;* ***(b)*** *sezione epatica del gruppo Sham osservata a 20×;* ***(c)*** *sezione epatica del gruppo DEP osservata a 10×;* ***(d)*** *sezione epatica del gruppo DEP osservata a 20×. Nei campioni trattati con DEP si osservano alterazioni dell'architettura epatica, caratterizzate da disorganizzazione del parenchima, edema, aree di necrosi e infiltrato infiammatorio.* ***(e)*** *Quantificazione dello score istopatologico dell'infiammazione valutato secondo il sistema NAS. L'infiammazione è stata classificata su una scala da 0 a 5. I dati sono espressi come media ± SEM (n = 10 per gruppo). L'analisi statistica è stata effettuata mediante Student's t-test unpaired.*

Nei campioni trattati con DEP, invece, le immagini istologiche hanno evidenziato una compromissione dell'organizzazione del parenchima epatico. In particolare, è stata osservata una perdita della normale disposizione degli epatociti, associata ad alterazioni della struttura lobulare e a una maggiore disomogeneità tissutale rispetto al gruppo controllo. Tali modificazioni risultavano accompagnate dalla presenza di edema, aree di necrosi e infiltrato infiammatorio, indicando un quadro istopatologico compatibile con danno epatocellulare. La presenza di edema suggerisce un'alterazione dell'equilibrio tissutale e della normale architettura del parenchima, mentre le aree necrotiche indicano una compromissione più avanzata dell'integrità cellulare. L'infiltrato infiammatorio osservato nei campioni trattati rappresenta inoltre un ulteriore elemento indicativo dell'attivazione di una risposta tissutale al danno indotto dal composto (Fig. 27 c,d).

A supporto dell'osservazione morfologica, è stata effettuata una valutazione semiquantitativa dell'infiammazione epatica mediante sistema di scoring istopatologico basato sul NAS score. L'infiammazione è stata classificata su una scala da 0 a 5, consentendo di confrontare quantitativamente il grado di infiltrazione infiammatoria tra gruppo controllo e gruppo trattato. Il grafico mostra un incremento dello score infiammatorio nei campioni esposti a DEP, confermando quanto osservato nelle sezioni istologiche e indicando una maggiore risposta infiammatoria a livello epatico in seguito al trattamento (Fig. 27 e).

Nel loro insieme, questi reperti indicano che il trattamento con DEP induce alterazioni istopatologiche evidenti nel tessuto epatico, caratterizzate da disorganizzazione parenchimale, danno cellulare e componente infiammatoria.

5.2.1.2 VALUTAZIONE DELLA FIBROSI EPATICA MEDIANTE COLORAZIONE TRICROMICA DI MASSON

La colorazione Tricromica di Masson è stata utilizzata per valutare la deposizione di collagene e l'eventuale presenza di alterazioni fibrotiche nel tessuto epatico. Questa metodica consente di evidenziare le fibre collagene e di distinguere il compartimento connettivale dal parenchima epatico, permettendo quindi di apprezzare eventuali processi di rimodellamento della matrice extracellulare associati al danno tissutale.

Nei campioni appartenenti al gruppo Sham (Fig. 28 a,b), il tessuto epatico mostrava una deposizione collagenica limitata e regolarmente distribuita, prevalentemente localizzata in corrispondenza delle strutture vascolari e delle aree periportali. L'organizzazione del parenchima appariva conservata, senza evidenza di espansione fibrotica significativa o di alterazioni marcate del compartimento stromale. Questo quadro risulta compatibile con una normale architettura epatica, in cui la componente collagenica è confinata alle strutture di supporto fisiologiche.

Nei campioni trattati con DEP (Fig. 28 c,d), invece, è stato osservato un incremento della positività alla Tricromica di Masson, indicativo di una maggiore deposizione di collagene rispetto al gruppo Sham. Tale aumento appariva associato a una più evidente espansione del compartimento connettivale e a modificazioni dell'organizzazione del parenchima epatico. La maggiore presenza di fibre collagene suggerisce l'attivazione di processi di rimodellamento della matrice extracellulare, verosimilmente in risposta al danno tissutale osservato nelle sezioni colorate con Ematossilina/Eosina.

La valutazione semiquantitativa della fibrosi è stata effettuata mediante Ishak score, che consente di classificare il grado di fibrosi epatica su una scala da 0 a 6. Il grafico mostra un aumento dello score fibrotico nei campioni trattati con DEP rispetto al gruppo Sham, confermando quantitativamente l'incremento della deposizione collagenica osservato nelle immagini istologiche. Questo dato supporta l'ipotesi che l'esposizione al DEP sia associata non solo a un danno epatocellulare di tipo infiammatorio e necrotico, ma anche a una risposta tissutale caratterizzata da rimodellamento stromale.

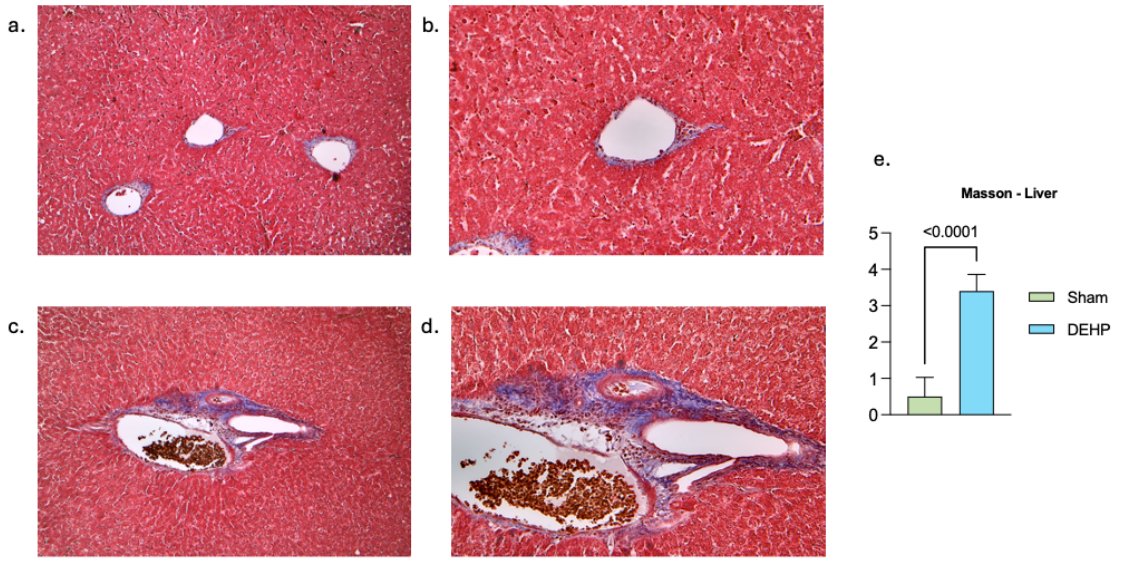


Figura 28. Valutazione della fibrosi epatica mediante colorazione Tricromica di Masson. *Le immagini rappresentative mostrano la deposizione di collagene nel tessuto epatico dei gruppi Sham e DEP.* ***(a)*** *Sezione epatica del gruppo Sham osservata a 10×;* ***(b)*** *sezione epatica del gruppo Sham osservata a 20×;* ***(c)*** *sezione epatica del gruppo DEP osservata a 10×;* ***(d)*** *sezione epatica del gruppo DEP osservata a 20×. Nei campioni trattati con DEP si osserva un aumento della positività alla Tricromica di Masson, indicativo di maggiore deposizione collagenica.* ***(e)****Quantificazione dello score istopatologico della fibrosi valutato secondo il sistema Ishak. La fibrosi è stata classificata su una scala da 0 a 6. I dati sono espressi come media ± SEM (n = 10 per gruppo). L'analisi statistica è stata effettuata mediante Unpaired Student's t-test.*

Nel complesso, i risultati ottenuti mediante Tricromica di Masson indicano che il trattamento con DEP determina un incremento della deposizione collagenica nel tessuto epatico. Tale alterazione, insieme all'aumento dello score di Ishak, suggerisce l'instaurarsi di un processo fibrotico o pre-fibrotico, caratterizzato da espansione della matrice extracellulare e modificazione dell'architettura stromale del parenchima epatico.

5.2.1.3 VALUTAZIONE DELL'APOPTOSI EPATICA MEDIANTE TUNEL ASSAY

La valutazione dell'apoptosi nel tessuto epatico è stata effettuata mediante TUNEL assay, metodica utilizzata per evidenziare la frammentazione del DNA, uno degli eventi caratteristici dei processi apoptotici. L'analisi ha permesso di approfondire il danno cellulare osservato nelle sezioni epatiche, fornendo informazioni più specifiche sull'eventuale attivazione di meccanismi di morte cellulare programmata in seguito all'esposizione al DEP.

Nei campioni appartenenti al gruppo Sham, il segnale TUNEL risultava assente o limitato a rare cellule positive, indicando una bassa presenza di cellule apoptotiche in condizioni basali. Il parenchima epatico mostrava una distribuzione cellulare complessivamente regolare, senza evidenza di un'estesa positività nucleare riconducibile a frammentazione del DNA (Fig. 29 a,b).

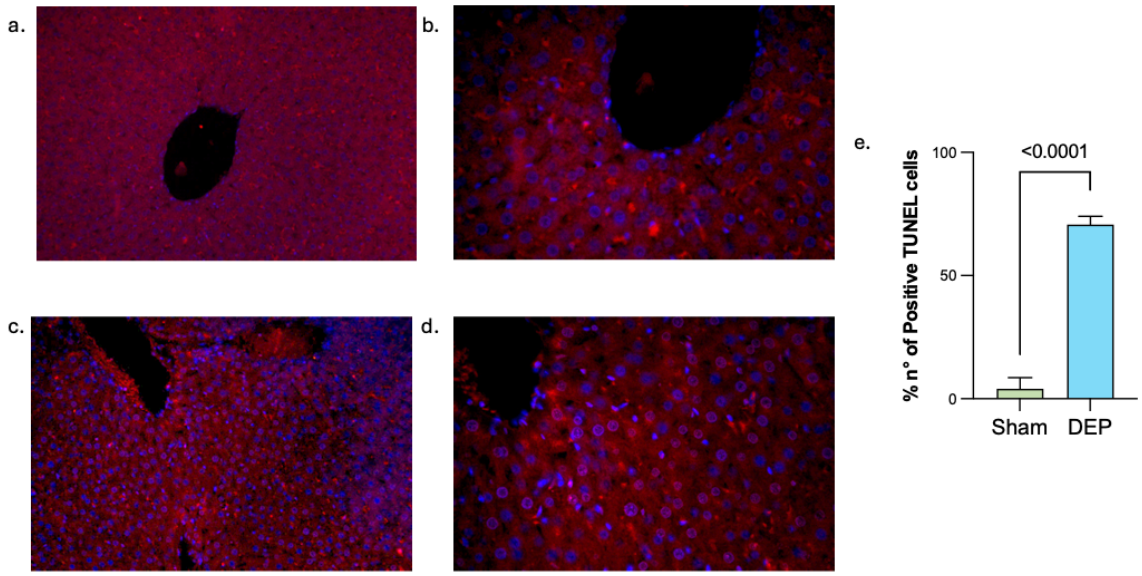


Figura 29. Valutazione dell'apoptosi epatica mediante TUNEL assay. *Le immagini rappresentative mostrano il segnale TUNEL nel tessuto epatico dei gruppi Sham e DEP osservato mediante microscopia a fluorescenza.* ***(a)*** *Fegato Sham osservato a 10×;* ***(b)*** *fegato Sham osservato a 20×;* ***(c)*** *fegato DEP osservato a 10×;* ***(d)*** *fegato DEP osservato a 20×. Nei campioni trattati con DEP si osserva un incremento delle cellule TUNEL-positive rispetto al gruppo Sham, indicativo di una maggiore frammentazione del DNA e di un'aumentata attivazione dei processi apoptotici nel tessuto epatico;* ***(e)*** *numero di cellule positive per high-power field. I dati sono espressi come media ± SEM (n = 5 per gruppo). L'analisi statistica è stata effettuata mediante Unpaired Student's t-test.*

Nei campioni trattati con DEP, invece, è stato osservato un incremento della positività TUNEL rispetto al gruppo Sham. Le cellule TUNEL-positive risultavano maggiormente rappresentate nel parenchima epatico, suggerendo un aumento della frammentazione del DNA e una più marcata attivazione dei processi apoptotici. Questo incremento appare coerente con il quadro istopatologico precedentemente descritto, caratterizzato da disorganizzazione del parenchima, edema, aree di necrosi e infiltrato infiammatorio (Fig. 29 c,d).

L'aumento del segnale TUNEL nei campioni esposti a DEP indica che il danno epatico indotto dal trattamento non si limita ad alterazioni morfologiche generali, ma coinvolge anche meccanismi cellulari associati alla perdita di vitalità e all'attivazione della morte programmata. La presenza di cellule apoptotiche nel tessuto trattato rappresenta quindi un ulteriore indicatore della compromissione dell'omeostasi epatica in seguito all'esposizione al composto.

Nel complesso, il TUNEL assay ha evidenziato un aumento dell'apoptosi epatica nei campioni trattati con DEP rispetto al gruppo Sham. Questi risultati indicano che l'esposizione al DEP è associata all'attivazione di processi apoptotici nel tessuto epatico, contribuendo al quadro complessivo di danno cellulare osservato nei campioni trattati.

5.2.1.4 ANALISI IMMUNOISTOCHIMICA NEL TESSUTO EPATICO

L'analisi immunoistochimica è stata utilizzata per approfondire i meccanismi cellulari associati al danno epatico osservato nei campioni trattati con DEP. Dopo la valutazione morfologica mediante Ematossilina/Eosina, la stima della deposizione collagenica mediante Tricromica di Masson e l'identificazione delle cellule apoptotiche mediante TUNEL assay, l'indagine immunoistochimica ha permesso di analizzare l'espressione di specifici marker coinvolti nella regolazione della morte cellulare e della risposta infiammatoria.

I marker analizzati sono stati suddivisi in due gruppi principali. Il primo comprende BAX e Bcl-2, utilizzati per valutare il bilanciamento tra segnali pro-apoptotici e anti-apoptotici nel tessuto epatico. Il secondo gruppo comprende NLRP3, Caspase-3 e IL-1β, considerati per esplorare il possibile coinvolgimento del pathway dell'inflammasoma e dei processi infiammatori associati al danno cellulare.

5.2.1.4.1 VALUTAZIONE DEI MARKER APOPTOTICI BAX E BCL-2

L'analisi immunoistochimica di BAX e Bcl-2 è stata eseguita al fine di valutare il coinvolgimento della via apoptotica mitocondriale nel danno epatico indotto dall'esposizione al DEP. I due marker rappresentano regolatori chiave dell'apoptosi cellulare e svolgono funzioni biologicamente antagoniste: BAX promuove la permeabilizzazione della membrana mitocondriale esterna e l'attivazione della cascata apoptotica, mentre Bcl-2 esercita un effetto citoprotettivo, preservando l'integrità mitocondriale e contrastando la morte cellulare programmata.

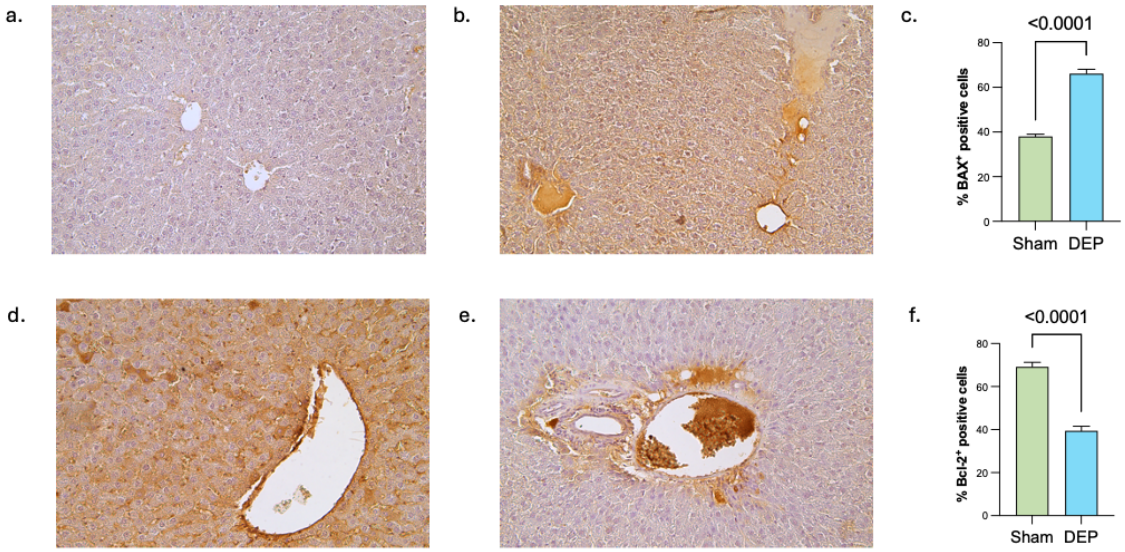


Figura 30. Espressione immunoistochimica di BAX e Bcl-2 nel tessuto epatico. *Le immagini rappresentative mostrano l'espressione dei marker apoptotici BAX e Bcl-2 nel fegato dei gruppi Sham e DEP.* ***(a)*** *Espressione di BAX nel fegato Sham;* ***(b)*** *espressione di BAX nel fegato DEP;* ***(c)*** *analisi densitometrica dell'espressione di BAX.* ***(d)*** *Espressione di Bcl-2 nel fegato Sham;* ***(e)*** *espressione di Bcl-2 nel fegato DEP;* ***(f)*** *analisi densitometrica dell'espressione di Bcl-2. I dati densitometrici sono espressi come media ± SEM. L'aumento di BAX e la riduzione di Bcl-2 nei campioni DEP indicano uno sbilanciamento verso l'attivazione dei processi apoptotici nel tessuto epatico.*

Nei campioni appartenenti al gruppo Sham, l'espressione di BAX risulta debole e limitata a poche cellule disperse nel parenchima epatico (Fig. 30 a). Al contrario, nei campioni del gruppo DEP si osserva un incremento evidente della positività immunoistochimica, caratterizzato da una maggiore diffusione della marcatura nel tessuto epatico trattato (Fig. 30 b). L'analisi densitometrica conferma tale osservazione, evidenziando un aumento significativo dell'espressione di BAX rispetto ai controlli (Fig. 30 c). Questo dato suggerisce l'attivazione

di meccanismi molecolari associati alla progressione dell'apoptosi in seguito all'esposizione al composto.

Un andamento opposto viene osservato per Bcl-2. Nei campioni Sham, la marcatura immunoistochimica appare più intensa e diffusamente distribuita, compatibilmente con una condizione fisiologica caratterizzata dal mantenimento dell'omeostasi cellulare (Fig. 30 d). Nei campioni trattati con DEP, invece, l'espressione di Bcl-2 risulta ridotta (Fig. 30 e), come confermato dall'analisi densitometrica (Fig. 30 f). La diminuzione di questo marker anti-apoptotico indica una compromissione dei meccanismi cellulari di sopravvivenza e protezione nei confronti dello stress indotto dal trattamento.

Nel complesso, l'aumento dell'espressione di BAX associato alla concomitante riduzione di Bcl-2 evidenzia uno sbilanciamento dell'equilibrio apoptotico verso un fenotipo pro-apoptotico nel tessuto epatico esposto al DEP. Tale profilo molecolare risulta coerente con i dati ottenuti mediante TUNEL assay, che mostrano un incremento delle cellule apoptotiche nei campioni trattati rispetto ai controlli. Questi risultati supportano l'ipotesi che il DEP promuova l'attivazione della via apoptotica mitocondriale, contribuendo ai processi di danno cellulare osservati nel fegato.

5.2.1.4.2 VALUTAZIONE DEL PATHWAY DELL'INFLAMMASOMA

L'analisi immunoistochimica di NLRP3, Caspase-3 e IL-1β è stata condotta per valutare il coinvolgimento del pathway dell'inflammasoma nel danno epatico associato all'esposizione al DEP. L'inflammasoma NLRP3 rappresenta una piattaforma multiproteica attivata in risposta a segnali di stress cellulare e danno tissutale; la sua attivazione favorisce il reclutamento e l'attivazione di caspasi, con conseguente maturazione e rilascio di citochine pro-infiammatorie, tra cui IL-1β. In questo contesto, l'espressione combinata di NLRP3, Caspase-3 e IL-1β consente di valutare la possibile attivazione di una risposta infiammatoria caspasi-dipendente nel tessuto epatico trattato.

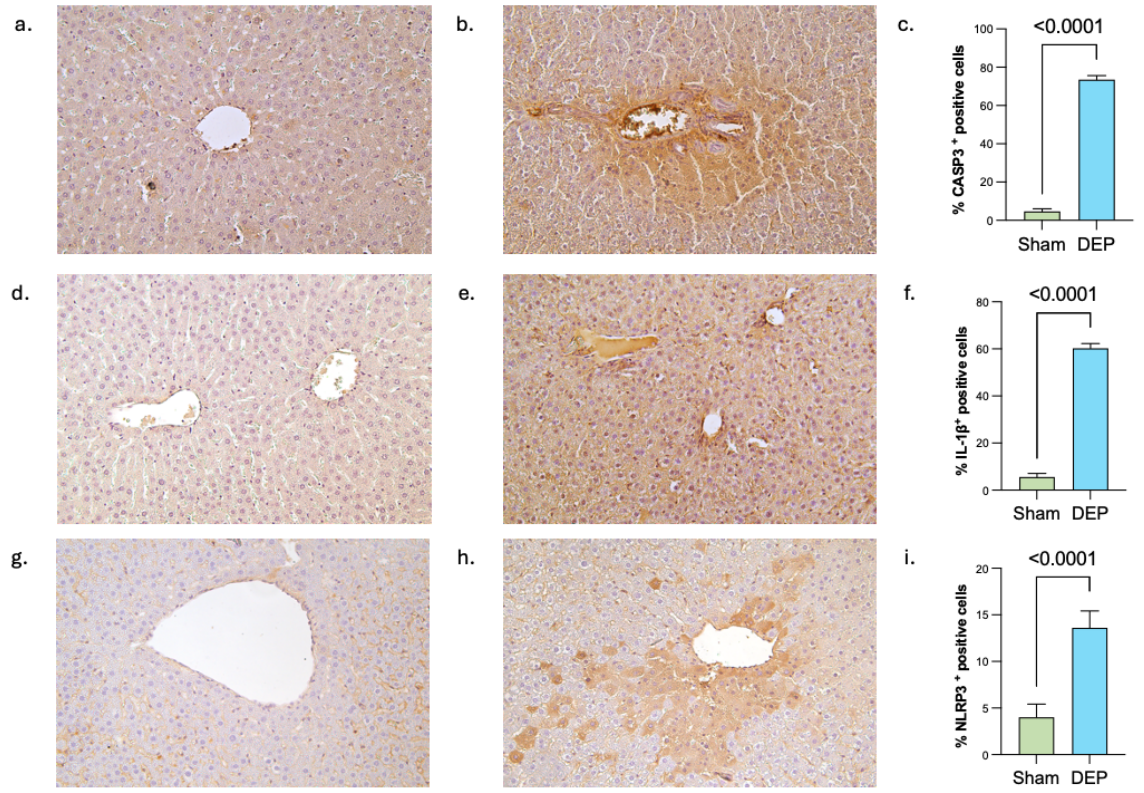


Figura 31. Espressione immunoistochimica dei marker del pathway NLRP3/Caspase-3/IL-1β nel tessuto epatico. *Le immagini rappresentative mostrano l'espressione dei marker associati al pathway dell'inflammasoma nel fegato dei gruppi Sham e DEP.* ***(a)*** *Espressione di Caspase-3 nel fegato Sham;* ***(b)*** *espressione di Caspase-3 nel fegato DEP;* ***(c)****quantificazione della percentuale di cellule Caspase-3-positive.* ***(d)*** *Espressione di IL-1β nel fegato Sham;* ***(e)*** *espressione di IL-1β nel fegato DEP;* ***(f)*** *quantificazione della percentuale di cellule IL-1β-positive.* ***(g)*** *Espressione di NLRP3 nel fegato Sham;* ***(h)*** *espressione di NLRP3 nel fegato DEP;* ***(i)*** *quantificazione della percentuale di cellule NLRP3-positive. I dati sono espressi come percentuale di cellule positive. L'analisi statistica mostra un incremento significativo dei marker nel gruppo DEP rispetto al gruppo Sham ($p < 0,0001$).*

Nel gruppo Sham, l'espressione dei marker analizzati appare complessivamente contenuta. La positività per NLRP3 risulta debole e limitata a poche cellule del parenchima epatico, suggerendo una bassa attivazione basale dell'asse inflammasomiale (Fig. 31 g). In modo coerente, anche Caspase-3 e IL-1β mostrano una marcatura limitata nei controlli, indicando l'assenza di una risposta infiammatoria o apoptotica marcata in condizioni basali (Fig. 31 a, d).

Nei campioni trattati con DEP, invece, si osserva un incremento evidente della positività per NLRP3, Caspase-3 e IL-1β. L'aumento di NLRP3 suggerisce l'attivazione del complesso inflammasomiale in risposta al danno indotto dal composto (Fig. 31 h). Tale incremento si associa a una maggiore espressione di Caspase-3, indicativa dell'attivazione di processi caspasi-dipendenti nel tessuto epatico (Fig. 31 b), e a un aumento di IL-1β, coerente con l'amplificazione della risposta pro-infiammatoria downstream dell'attivazione inflammasomiale (Fig. 31 e).

La quantificazione della percentuale di cellule positive conferma le osservazioni istologiche. Nei campioni DEP si rileva un incremento significativo delle cellule positive per Caspase-3, IL-1β e NLRP3 rispetto al gruppo Sham ($p < 0,0001$; Fig. 23 c, f, i). L'aumento coordinato di questi marker suggerisce che l'esposizione al DEP promuova l'attivazione del pathway NLRP3/caspasi/IL-1β nel tessuto epatico, contribuendo alla risposta infiammatoria osservata nei campioni trattati.

Nel complesso, questi risultati indicano che il DEP induce nel fegato l'attivazione di una risposta compatibile con il coinvolgimento dell'inflammasoma NLRP3. L'aumento di NLRP3, associato alla maggiore positività per Caspase-3 e IL-1β, suggerisce l'attivazione di un asse infiammatorio caspasi-dipendente, che si integra con il quadro di danno epatico già evidenziato dalle analisi istologiche, dal TUNEL assay e dalla valutazione dei marker apoptotici BAX/Bcl-2.

5.2.2 VALUTAZIONE DEGLI EFFETTI DEL DEP SUL TESSUTO RENALE

L'analisi del tessuto renale è stata condotta per valutare se l'esposizione al DEP fosse associata a modificazioni strutturali a carico del parenchima renale. Considerando il ruolo del rene nei processi di filtrazione, escrezione e mantenimento dell'omeostasi idro-elettrolitica, particolare attenzione è stata rivolta all'integrità dei tubuli renali e all'organizzazione generale della componente glomerulare e interstiziale.

Nei campioni renali, la valutazione istologica ha permesso di osservare eventuali alterazioni della morfologia tubulare, della cellularità interstiziale e dell'architettura complessiva del tessuto. Inoltre, l'analisi della deposizione collagenica e dei processi apoptotici ha consentito di approfondire la possibile presenza di rimodellamento tissutale e sofferenza cellulare associati al trattamento.

5.2.2.1 ANALISI ISTOPATOLOGICA DEL RENE MEDIANTE COLORAZIONE EMATOSSILINA/EOSINA

L'analisi istopatologica del tessuto renale mediante colorazione Ematossilina/Eosina consente di valutare l'organizzazione generale del parenchima renale e di identificare eventuali alterazioni morfologiche associate all'esposizione al DEP. L'osservazione si concentra principalmente sull'integrità dei tubuli renali, sulla morfologia glomerulare e sulla componente interstiziale, al fine di evidenziare possibili segni di danno tissutale.

Nei campioni appartenenti al gruppo Sham, il tessuto renale mostra un'architettura complessivamente conservata. I glomeruli appaiono regolarmente organizzati, con spazi capsulari riconoscibili, mentre i tubuli renali presentano un profilo morfologico ben definito, con epitelio tubulare conservato e lume chiaramente distinguibile. Non si osservano alterazioni marcate dell'interstizio né segni significativi di edema, necrosi o infiltrazione infiammatoria (Fig. 32 a, b).

Nei campioni trattati con DEP, invece, si osservano alterazioni morfologiche più evidenti a carico del compartimento tubulare e interstiziale. In particolare, il tessuto renale mostra segni di sofferenza tubulare, caratterizzati da modificazioni dell'epitelio, perdita parziale della normale organizzazione dei tubuli e irregolarità del lume. Tali alterazioni si associano alla presenza di edema interstiziale, aree di danno cellulare e infiltrato infiammatorio, suggerendo

una compromissione dell'integrità del parenchima renale in seguito all'esposizione al composto (Fig. 32 c, d).

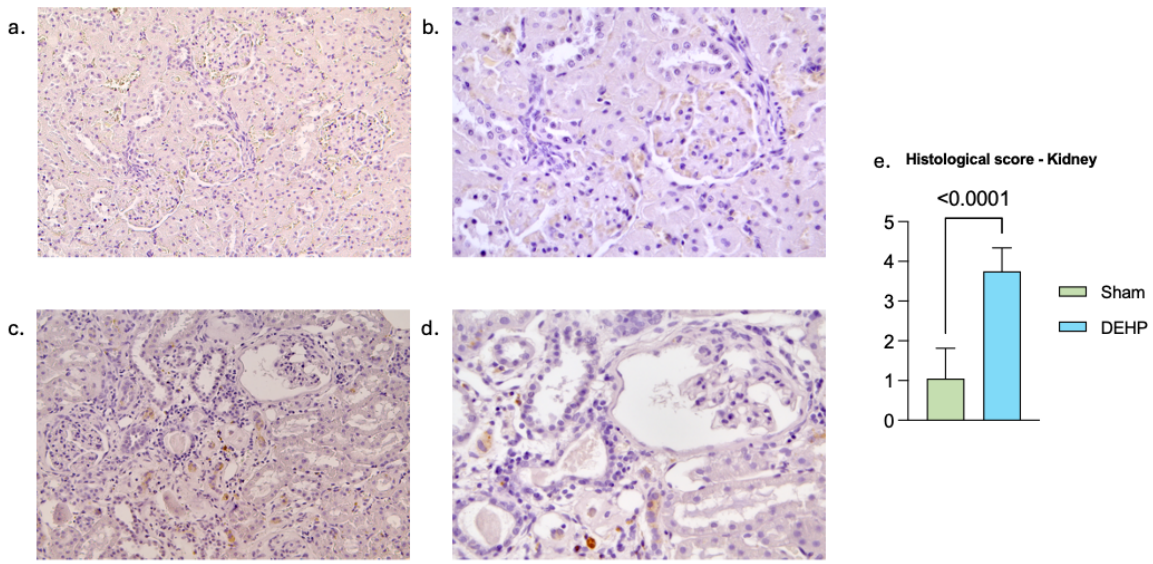


Figura 32. Alterazioni istopatologiche del tessuto renale valutate mediante colorazione Ematossilina/Eosina. *Le immagini rappresentative mostrano l'organizzazione del parenchima renale nei gruppi Sham e DEP.* ***(a)*** *Rene Sham osservato a 10×;* ***(b)*** *rene Sham osservato a 20×;* ***(c)*** *rene DEP osservato a 10×;* ***(d)*** *rene DEP osservato a 20×. Nei campioni trattati con DEP si osservano alterazioni morfologiche a carico del compartimento tubulare e interstiziale, caratterizzate da irregolarità dell'epitelio tubulare, alterazione del lume, edema interstiziale e infiltrato infiammatorio.* ***(e)****Quantificazione dello score istopatologico del danno renale. I dati sono espressi come media ± SEM (n = 10 per gruppo). L'analisi statistica è stata effettuata mediante Student's Unpaired t-test.*

A supporto dell'osservazione morfologica, il danno renale è stato valutato mediante uno score istopatologico semiquantitativo (Fig. 32 e). Il grafico mostra un incremento dello score nei campioni trattati con DEP rispetto al gruppo Sham, confermando la maggiore severità delle alterazioni osservate nelle sezioni colorate con Ematossilina/Eosina. Tale aumento riflette principalmente la presenza di danno tubulare, edema interstiziale e infiltrazione infiammatoria, elementi che indicano una risposta tissutale al trattamento.

Nel complesso, i risultati istologici e semiquantitativi indicano che l'esposizione al DEP induce alterazioni strutturali nel tessuto renale, caratterizzate prevalentemente da compromissione del compartimento tubulare, modificazioni interstiziali e componente infiammatoria.

5.2.2.2 VALUTAZIONE DELLA FIBROSI RENALE MEDIANTE COLORAZIONE TRICROMICA DI MASSON

La colorazione Tricromica di Masson viene impiegata per mettere in evidenza la componente collagenica del tessuto e consente, nel rene, di valutare eventuali modificazioni a carico dell'interstizio. In questo contesto, l'osservazione delle sezioni renali permette di distinguere un'eventuale deposizione anomala di matrice extracellulare dalle normali strutture di supporto del parenchima.

Nel gruppo Sham, la colorazione mostra un quadro compatibile con una normale organizzazione renale. La componente collagenica appare scarsamente rappresentata e confinata alle aree fisiologicamente ricche di tessuto connettivo, senza evidenza di ispessimento interstiziale o accumulo di matrice tra i tubuli. I profili tubulari risultano ben conservati e separati da spazi interstiziali sottili e regolari. Nel gruppo DEP, al contrario, si osserva una maggiore evidenza della componente collagenica, soprattutto negli spazi compresi tra le strutture tubulari. Il tessuto presenta aree di espansione interstiziale, con incremento della colorazione compatibile con accumulo di matrice extracellulare. Questo aspetto si accompagna a una minore regolarità della disposizione tubulare e a un'alterazione del normale aspetto compatto del parenchima renale.

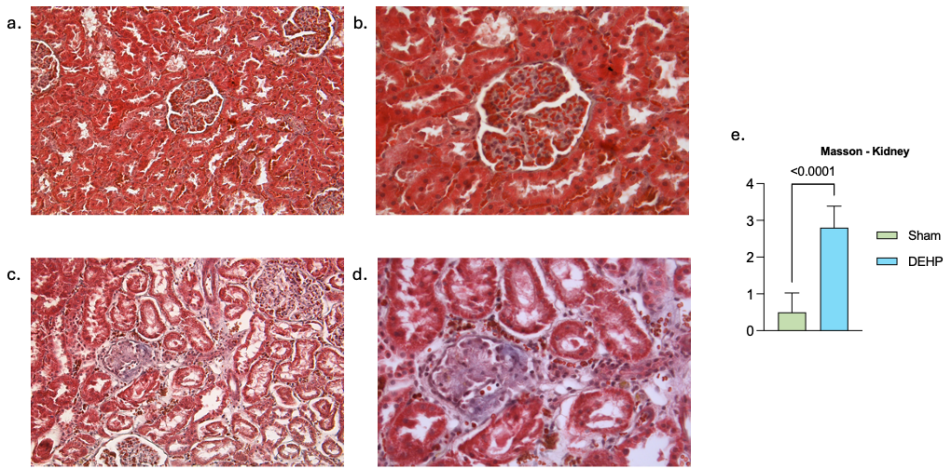


Figura 33. Valutazione del rimodellamento tubulo-interstiziale mediante colorazione Tricromica. *Le immagini rappresentative mostrano la deposizione di collagene nel tessuto renale dei gruppi Sham e DEP.* ***(a)*** *Rene Sham osservato a 10×;* ***(b)*** *rene Sham osservato a 20×;* ***(c)*** *rene DEP osservato a 10×;* ***(d)*** *rene DEP osservato a 20×. Nei campioni trattati con DEP si osserva un aumento della deposizione collagenica nelle aree interstiziali e peritubulari.* ***(e)****Quantificazione dello score istopatologico del rimodellamento/fibrosi renale. I dati sono espressi come media ± SEM (n = 10 per gruppo). L'analisi statistica è stata effettuata mediante Student's t-test non appaiato.*

La quantificazione mediante score istopatologico conferma il dato morfologico. Il grafico evidenzia un aumento dello score nel gruppo DEP rispetto al gruppo Sham, indicando una maggiore entità delle alterazioni stromali nei campioni trattati. Tale incremento riflette la presenza di deposizione collagenica più marcata e di rimodellamento degli spazi interstiziali.

Nel complesso, la colorazione Tricromica di Masson mostra che l'esposizione al DEP si associa a un aumento della componente collagenica nel tessuto renale. Il pattern osservato interessa prevalentemente il compartimento tubulo-interstiziale e suggerisce una modificazione dell'assetto stromale renale in seguito al trattamento.

5.2.2.3 VALUTAZIONE DELL'APOPTOSI RENALE MEDIANTE TUNEL ASSAY

Il TUNEL assay consente di evidenziare la frammentazione del DNA e viene utilizzato per individuare cellule interessate da processi apoptotici. Nel tessuto renale, questa valutazione permette di approfondire il danno cellulare osservato nelle sezioni istologiche, con particolare attenzione al compartimento tubulare, che rappresenta una delle componenti maggiormente sensibili agli effetti degli xenobiotici.

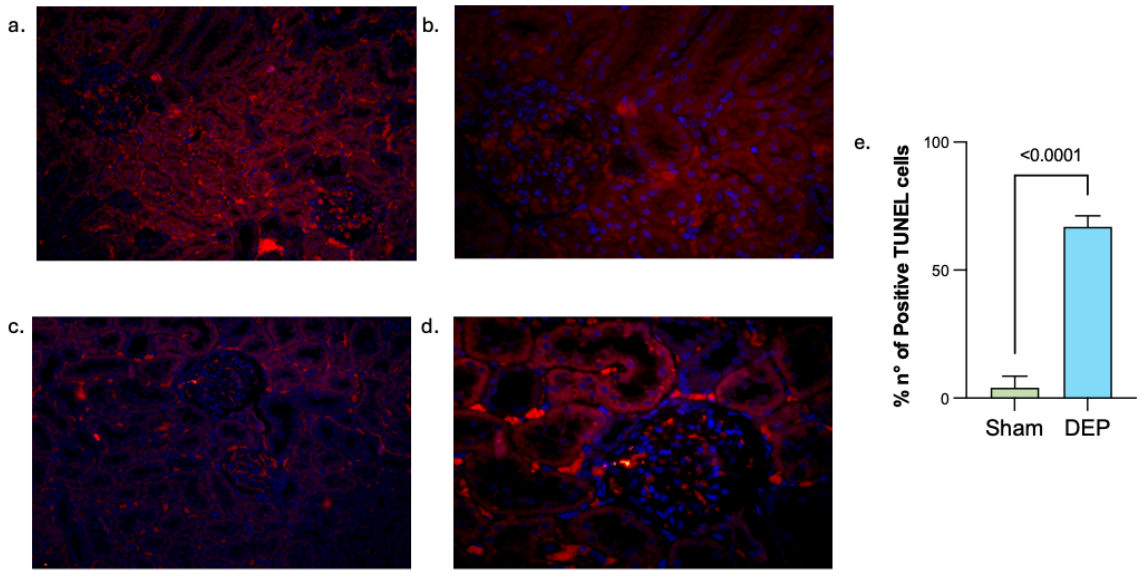


Figura 34. Valutazione dell'apoptosi renale mediante TUNEL assay. *Le immagini rappresentative mostrano il segnale TUNEL nel tessuto renale dei gruppi Sham e DEP osservato mediante microscopia a fluorescenza.* ***(a)*** *Rene Sham osservato a 10×;* ***(b)*** *rene Sham osservato a 20×;* ***(c)*** *rene DEP osservato a 10×;* ***(d)*** *rene DEP osservato a 20×. Nei campioni trattati con DEP si osserva un incremento delle cellule TUNEL-positive rispetto al gruppo Sham, indicativo di una maggiore frammentazione del DNA e di un'aumentata apoptosi nel tessuto renale;* ***(e)*** *numero di cellule positive per high-power field. I dati sono espressi come media ± SEM (n = 5 per gruppo). L'analisi statistica è stata effettuata mediante Unpaired Student's t-test.*

Nel gruppo Sham, il segnale TUNEL appare assente o limitato a rare cellule positive, in accordo con una condizione di omeostasi tissutale. I tubuli renali mantengono un'organizzazione regolare e non si osserva una distribuzione diffusa di nuclei positivi, suggerendo una bassa presenza di eventi apoptotici in condizioni basali.

Nel gruppo DEP, invece, si osserva un aumento della positività TUNEL, con una maggiore presenza di cellule positive nel parenchima renale. Il segnale risulta particolarmente evidente

in aree compatibili con il compartimento tubulare, suggerendo che l'esposizione al DEP si associa a un incremento della frammentazione del DNA nelle cellule epiteliali renali. Questo dato si integra con le alterazioni osservate mediante Ematossilina/Eosina, tra cui irregolarità tubulari, edema interstiziale e infiltrato infiammatorio.

L'aumento delle cellule TUNEL-positive nei campioni trattati indica che il danno renale associato al DEP coinvolge anche meccanismi di morte cellulare programmata. Tale evidenza rafforza l'interpretazione del compartimento tubulare come uno dei principali bersagli del danno, suggerendo una compromissione della vitalità cellulare nelle aree maggiormente alterate dal trattamento.

Nel complesso, il TUNEL assay mostra un incremento dell'apoptosi nel tessuto renale dei campioni DEP rispetto al gruppo Sham. Questi risultati indicano che l'esposizione al DEP è associata a una maggiore attivazione di processi apoptotici nel parenchima renale, contribuendo al quadro di danno tubulo-interstiziale osservato nei campioni trattati.

5.2.2.4 ANALISI IMMUNOISTOCHIMICA NEL TESSUTO RENALE

5.2.2.4.1 VALUTAZIONE DEI MARKER APOPTOTICI BAX E BCL-2

Nel tessuto renale, l'analisi immunoistochimica di BAX e Bcl-2 permette di valutare se le alterazioni osservate a livello tubulo-interstiziale siano associate a una modulazione dei meccanismi di sopravvivenza e morte cellulare. In questo contesto, l'attenzione è rivolta principalmente al compartimento tubulare, poiché le cellule epiteliali tubulari rappresentano una popolazione particolarmente sensibile agli stress tossicologici e metabolici.

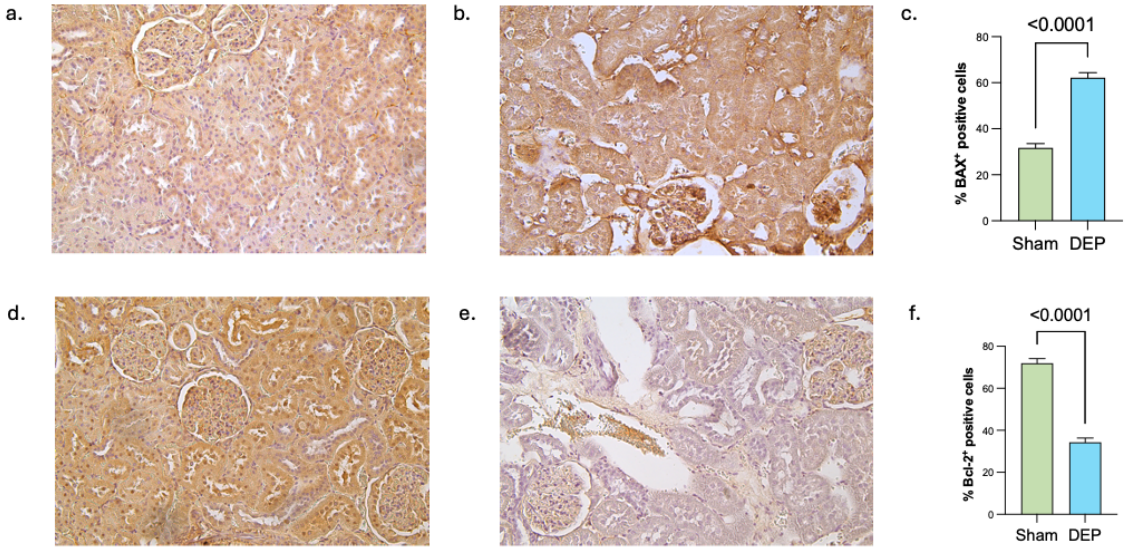


Figura 35. Espressione immunoistochimica di BAX e Bcl-2 nel tessuto renale. *Le immagini rappresentative mostrano l'espressione dei marker apoptotici BAX e Bcl-2 nel rene dei gruppi Sham e DEP.* ***(a)*** *Espressione di BAX nel rene Sham;* ***(b)*** *espressione di BAX nel rene DEP;* ***(c)*** *analisi densitometrica dell'espressione di BAX.* ***(d)*** *Espressione di Bcl-2 nel rene Sham;* ***(e)*** *espressione di Bcl-2 nel rene DEP;* ***(f)*** *analisi densitometrica dell'espressione di Bcl-2. I dati densitometrici sono espressi come media ± SEM. L'aumento di BAX e la riduzione di Bcl-2 nei campioni DEP indicano uno sbilanciamento verso l'attivazione dei processi apoptotici nel tessuto renale.*

Nel gruppo Sham, la marcatura per BAX appare poco rappresentata e distribuita in modo limitato nel parenchima renale (Fig. 35 a). Nei campioni trattati con DEP, invece, si osserva una maggiore positività per BAX, localizzata prevalentemente nelle aree tubulari (Fig. 35 b). L'analisi densitometrica conferma l'incremento dell'espressione di BAX nel gruppo DEP rispetto al gruppo Sham (Fig. 35 c), suggerendo che l'esposizione al composto favorisca una risposta pro-apoptotica a carico delle cellule epiteliali renali.

L'espressione di Bcl-2 mostra un andamento opposto. Nei campioni Sham, la positività per Bcl-2 risulta più evidente, indicando il mantenimento di segnali cellulari associati alla

sopravvivenza e alla protezione dell'epitelio tubulare (Fig. 35 d). Nei campioni DEP, la marcatura appare ridotta (Fig. 35 e), come confermato dall'analisi densitometrica (Fig. 35 f), suggerendo un indebolimento dei meccanismi anti-apoptotici in seguito al trattamento. Tale riduzione può contribuire a rendere le cellule tubulari maggiormente suscettibili alla progressione del danno.

La combinazione tra maggiore espressione di BAX e ridotta espressione di Bcl-2 indica uno spostamento dell'equilibrio cellulare verso una condizione pro-apoptotica. Questo profilo si inserisce nel quadro di danno renale già evidenziato dalle analisi precedenti, caratterizzato da alterazioni tubulari, edema interstiziale, infiltrato infiammatorio e aumento delle cellule TUNEL-positive.

Nel complesso, i risultati immunoistochimici suggeriscono che il DEP interferisce con i meccanismi di omeostasi cellulare del tessuto renale, favorendo una risposta apoptotica localizzata soprattutto nel compartimento tubulare. Tale evidenza contribuisce a definire il danno renale indotto dal trattamento come un processo che coinvolge non solo alterazioni morfologiche, ma anche modificazioni dell'equilibrio tra segnali di sopravvivenza e morte cellulare.

5.2.2.4.2 VALUTAZIONE DEL PATHWAY DELL'INFLAMMASOMA

L'analisi immunoistochimica del pathway NLRP3/Caspase-3/IL-1β è stata eseguita nel tessuto renale per valutare il possibile coinvolgimento dell'inflammasoma nella risposta al danno indotto dal DEP. Nel rene, l'attivazione di vie infiammatorie intracellulari assume particolare rilevanza poiché può contribuire alla compromissione del compartimento tubulo-interstiziale, favorendo l'amplificazione del danno cellulare e la progressione della risposta infiammatoria locale. NLRP3 rappresenta uno dei principali sensori intracellulari associati all'attivazione dell'inflammasoma, mentre l'attivazione caspasi-dipendente partecipa alla propagazione dei segnali di morte cellulare e alla maturazione di mediatori pro-infiammatori, tra cui IL-1β.

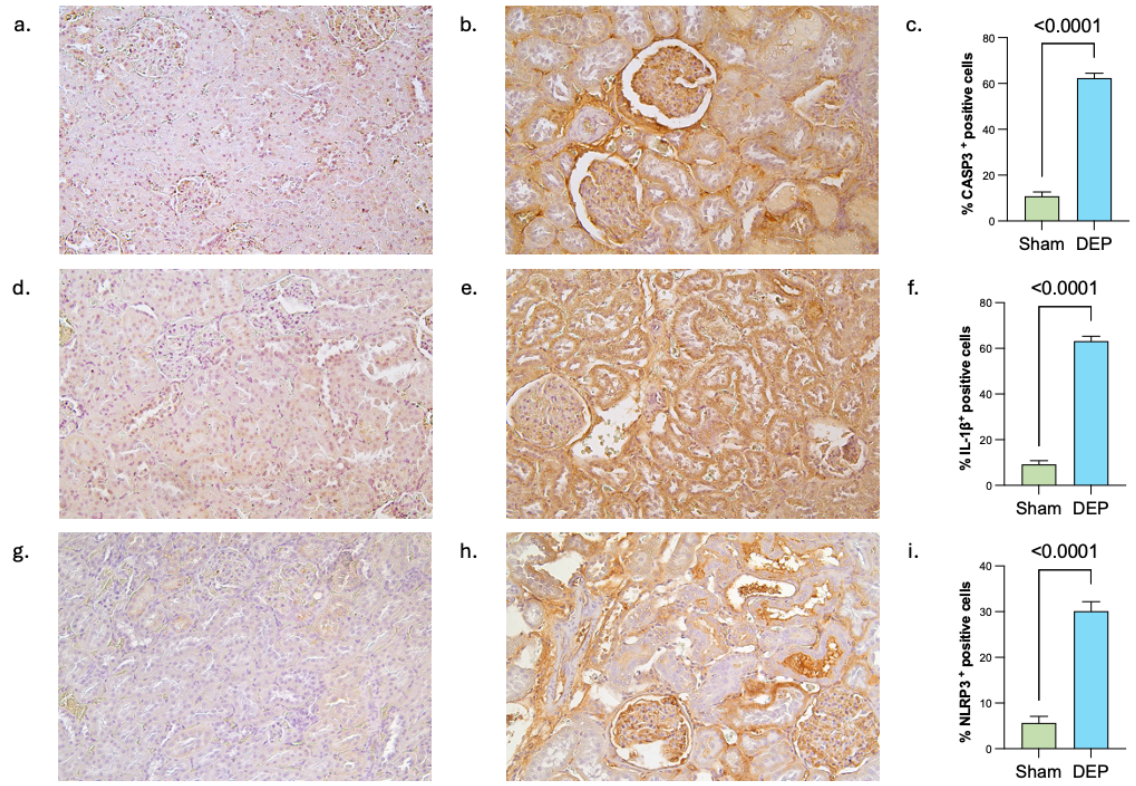


Figura 36. Espressione immunoistochimica dei marker del pathway NLRP3/Caspase-3/IL-1β nel tessuto renale. *Le immagini rappresentative mostrano l'espressione dei marker associati al pathway inflammasomiale e ai processi caspasi-dipendenti nel rene dei gruppi Sham e DEP.* ***(a)*** *Espressione di Caspase-3 nel rene Sham;* ***(b)*** *espressione di Caspase-3 nel rene DEP;* ***(c)*** *quantificazione della percentuale di cellule Caspase-3-positive.* ***(d)*** *Espressione di IL-1β nel rene Sham;* ***(e)*** *espressione di IL-1β nel rene DEP;* ***(f)*** *quantificazione della percentuale di cellule IL-1β-positive.* ***(g)****Espressione di NLRP3 nel rene Sham;* ***(h)*** *espressione di NLRP3 nel rene DEP;* ***(i)*** *quantificazione della percentuale di cellule NLRP3-positive. I dati sono espressi come percentuale di cellule positive. L'analisi statistica mostra un incremento significativo dei marker nel gruppo DEP rispetto al gruppo Sham ($p < 0,0001$).*

Nei campioni appartenenti al gruppo Sham, la marcatura immunoistochimica per i marker analizzati appare complessivamente contenuta, con una positività debole e poco estesa nel parenchima renale. La bassa espressione di Caspase-3 nei controlli indica una limitata attivazione basale dei processi caspasi-dipendenti, coerentemente con la conservazione dell'architettura tubulare osservata nelle sezioni istologiche (Fig. 36 a). Analogamente, IL-1β e NLRP3 mostrano una positività ridotta, suggerendo l'assenza di una marcata attivazione inflammasomiale nel tessuto renale non trattato (Fig. 36 d, g).

Nel gruppo DEP si osserva invece un netto incremento della positività immunoistochimica, con una distribuzione più evidente del segnale soprattutto a livello delle strutture tubulari e delle aree tubulo-interstiziali. L'aumento di Caspase-3 indica una maggiore attivazione di processi di morte cellulare caspasi-dipendenti nel tessuto renale trattato (Fig. 36 b). Questo dato si inserisce in modo coerente nel quadro già evidenziato dal TUNEL assay, in cui il rene esposto a DEP mostra un incremento delle cellule apoptotiche, suggerendo che il compartimento tubulare rappresenti una sede particolarmente coinvolta nella risposta al trattamento.

Parallelamente, l'incremento di IL-1β nei campioni DEP evidenzia l'attivazione di una componente pro-infiammatoria locale (Fig. 36 e). La maggiore espressione di questa citochina, associata all'aumento di NLRP3, suggerisce che il danno renale indotto dal DEP non sia limitato alla perdita di integrità cellulare, ma includa anche l'attivazione di un pathway infiammatorio intracellulare. In particolare, la maggiore positività per NLRP3 nei campioni trattati indica una possibile attivazione del complesso inflammasomiale nel parenchima renale, verosimilmente in risposta allo stress cellulare e alle alterazioni tubulo-interstiziali osservate nelle analisi precedenti (Fig. 36 h).

La valutazione quantitativa conferma le differenze osservate nelle immagini immunoistochimiche. Nei campioni DEP si rileva un aumento significativo della percentuale di cellule positive per Caspase-3, IL-1β e NLRP3 rispetto al gruppo Sham ($p < 0,0001$; Fig. 36 c, f, i). L'incremento coordinato di questi marker suggerisce l'attivazione dell'asse NLRP3/caspasi/IL-1β nel tessuto renale esposto al DEP. Tale profilo risulta particolarmente rilevante perché collega la risposta infiammatoria alla componente di morte cellulare, fornendo un'interpretazione più completa del danno osservato a livello tubulo-interstiziale.

Nel complesso, questi risultati indicano che l'esposizione al DEP promuove nel tessuto renale una risposta caratterizzata dall'attivazione del pathway NLRP3/Caspase-3/IL-1β. L'aumento di NLRP3 e IL-1β evidenzia il coinvolgimento di una componente inflammasomiale e pro-infiammatoria, mentre la maggiore espressione di Caspase-3 suggerisce la concomitante attivazione di processi caspasi-dipendenti di morte cellulare. Questo pattern integra le alterazioni osservate mediante Ematossilina/Eosina, Tricromica di Masson e TUNEL assay, indicando che il danno renale indotto dal DEP coinvolge alterazioni strutturali, rimodellamento tubulo-interstiziale, apoptosi e attivazione infiammatoria.

CAPITOLO 6:

DISCUSSIONE

Il presente studio si inserisce nel contesto della valutazione tossicologica degli interferenti endocrini emergenti, con particolare attenzione al Dietil Ftalato (DEP), un ftalato a catena corta ampiamente utilizzato in prodotti di consumo e frequentemente associato a scenari di esposizione ambientale e umana. Sebbene il DEP sia generalmente considerato meno persistente rispetto ad altri ftalati ad alto peso molecolare, la sua ampia diffusione, la possibilità di esposizione ripetuta e la presenza in matrici ambientali e biologiche rendono necessario un approfondimento dei suoi effetti cellulari e tissutali. In questo senso, la valutazione del DEP non può essere limitata alla sola tossicità acuta, ma deve considerare anche la possibilità che esposizioni apparentemente moderate possano indurre alterazioni funzionali, infiammatorie e molecolari nei tessuti bersaglio.

L'interesse verso il DEP deriva inoltre dalla sua appartenenza alla più ampia classe degli interferenti endocrini, composti in grado di perturbare l'omeostasi biologica attraverso meccanismi non sempre riconducibili a un modello tossicologico lineare e tradizionale. Gli EDCs possono infatti agire mediante interazioni con vie endocrine, metaboliche, redox e infiammatorie, generando effetti che dipendono non solo dalla dose, ma anche dal tempo di esposizione, dal tessuto coinvolto, dallo stato fisiologico dell'organismo e dalla capacità dei sistemi cellulari di adattarsi allo stress. Questa complessità rende particolarmente importante l'utilizzo di approcci sperimentali integrati, capaci di combinare informazioni morfologiche, cellulari e molecolari.

In questa prospettiva, il lavoro è stato impostato sulla valutazione dell'asse epato-renale, considerando il fegato e il rene come organi chiave nella gestione degli xenobiotici. Il fegato rappresenta il principale compartimento deputato alla biotrasformazione dei composti esogeni, attraverso reazioni metaboliche che possono determinarne inattivazione, eliminazione o, in alcuni casi, formazione di metaboliti biologicamente attivi. Il rene, invece, partecipa in modo essenziale all'escrezione dei composti e dei loro metaboliti, risultando particolarmente esposto a sostanze filtrate, concentrate o eliminate attraverso il compartimento tubulare. La valutazione parallela di questi due organi consente quindi di interpretare il DEP non come un agente tossico

diretto verso un singolo tessuto, ma come un composto capace di interferire con un sistema funzionale integrato coinvolto nella detossificazione e nell'eliminazione.

L'approccio sperimentale adottato ha permesso di integrare dati ottenuti in vitro e in vivo. Il modello in vivo ha consentito di osservare l'impatto del DEP in un contesto tissutale complesso, nel quale interagiscono architettura d'organo, cellule parenchimali, compartimento stromale, microambiente infiammatorio e processi di rimodellamento. Parallelamente, i modelli cellulari HepG2 e HEK-293 hanno permesso di analizzare in modo più controllato eventi cellulari specifici, quali la riduzione della vitalità, la produzione di specie reattive dell'ossigeno e il rilascio di citochine nel surnatante. Questa integrazione rappresenta un punto di forza dello studio, poiché consente di collegare le alterazioni istologiche osservate nei tessuti a processi cellulari potenzialmente responsabili della loro insorgenza.

Nel complesso, i risultati ottenuti indicano che il DEP è in grado di indurre un quadro di danno biologico articolato, caratterizzato dalla convergenza di alterazioni morfologiche, stress ossidativo, risposta infiammatoria, attivazione dell'inflammasoma e morte cellulare. Tale quadro suggerisce che il DEP non agisca attraverso un singolo meccanismo isolato, ma promuova una sequenza di eventi interconnessi. La riduzione della vitalità cellulare osservata nei modelli in vitro, l'aumento dei ROS, la modulazione del profilo citochinico, l'apoptosi tissutale e l'attivazione del pathway NLRP3/Caspase-3/IL-1β possono essere interpretati come componenti di una risposta integrata allo stress indotto dal composto.

Nel modello in vivo, il fegato e il rene sono stati scelti come principali organi bersaglio in virtù del loro ruolo nei processi di metabolismo, biotrasformazione, detossificazione ed eliminazione degli xenobiotici. Il fegato rappresenta uno dei principali siti di metabolismo di numerosi contaminanti ambientali, inclusi gli ftalati, mentre il rene è essenziale per l'escrezione dei metaboliti e per il mantenimento dell'omeostasi sistemica. La valutazione combinata di questi due organi ha quindi permesso di esaminare il DEP in una prospettiva più ampia, coerente con il concetto di tossicità sistemica e con l'importanza dell'asse epato-renale nella risposta agli interferenti endocrini.

A livello epatico, l'analisi istopatologica mediante Ematossilina/Eosina ha evidenziato alterazioni strutturali significative nei campioni trattati con DEP. La perdita della normale organizzazione del parenchima, associata alla presenza di edema, aree di necrosi e infiltrato infiammatorio, indica una compromissione dell'integrità tissutale. Questi reperti suggeriscono

che il DEP sia in grado di indurre un danno epatocellulare riconoscibile sul piano morfologico, caratterizzato non solo da alterazioni dell'architettura del tessuto, ma anche dall'attivazione di una componente infiammatoria locale. L'aumento dello score istopatologico dell'infiammazione conferma quantitativamente l'osservazione microscopica e rafforza l'interpretazione di una risposta epatica al trattamento.

La presenza di necrosi e infiltrato infiammatorio è particolarmente rilevante, poiché suggerisce che il danno indotto dal DEP non sia limitato a una lieve alterazione reversibile del parenchima, ma possa coinvolgere fenomeni più avanzati di sofferenza cellulare. L'edema osservato nelle sezioni epatiche può essere interpretato come un segno di alterazione della permeabilità tissutale e dell'equilibrio idrico locale, mentre l'infiltrato infiammatorio indica il reclutamento o l'attivazione di cellule coinvolte nella risposta al danno. Nel complesso, questi dati collocano il DEP tra i composti in grado di generare una risposta epatica multifattoriale, in cui il danno strutturale e l'infiammazione appaiono strettamente associati.

La colorazione Tricromica di Masson ha ulteriormente approfondito il quadro di danno epatico, evidenziando un aumento della deposizione collagenica nei campioni trattati. L'incremento dello score di Ishak indica che l'esposizione al DEP è associata a un rimodellamento della matrice extracellulare e a un iniziale processo fibrotico o pre-fibrotico. Questo risultato è coerente con l'idea che il danno epatico persistente o ripetuto possa attivare meccanismi di riparazione tissutale, i quali, se non adeguatamente risolti, possono evolvere verso accumulo di collagene e alterazione dell'architettura stromale.

La fibrosi rappresenta infatti una risposta adattativa e al tempo stesso patologica al danno cronico. Sebbene nel presente studio il trattamento sia stato valutato in una finestra sperimentale definita, l'aumento della componente collagenica suggerisce che il DEP possa attivare precocemente meccanismi di rimodellamento tissutale. Tale dato assume particolare importanza se considerato insieme alle alterazioni osservate con Ematossilina/Eosina: edema, necrosi e infiltrato infiammatorio possono costituire segnali iniziali in grado di favorire l'attivazione di cellule stromali e la deposizione di matrice extracellulare. In questa prospettiva, la fibrosi epatica osservata non rappresenta un fenomeno indipendente, ma si inserisce in un continuum di danno, infiammazione e rimodellamento.

Un ulteriore elemento chiave nella caratterizzazione del danno epatico è rappresentato dall'aumento dell'apoptosi, evidenziato mediante TUNEL assay. Nei campioni trattati con

DEP è stato osservato un incremento delle cellule TUNEL-positive rispetto al gruppo Sham, indicando una maggiore frammentazione del DNA e quindi un'aumentata attivazione dei processi di morte cellulare programmata. Questo risultato consente di distinguere una componente specifica del danno cellulare, suggerendo che l'esposizione al DEP non si limiti a indurre alterazioni morfologiche generali, ma attivi meccanismi molecolari riconducibili all'apoptosi.

L'analisi immunoistochimica dei marker BAX e Bcl-2 ha fornito un ulteriore supporto a questa interpretazione. Nei campioni epatici trattati con DEP, l'aumento di BAX, associato alla riduzione di Bcl-2, indica uno sbilanciamento dell'equilibrio apoptotico verso un fenotipo pro-apoptotico. BAX è coinvolto nella permeabilizzazione della membrana mitocondriale e nell'attivazione della cascata apoptotica, mentre Bcl-2 svolge un ruolo protettivo, preservando l'integrità mitocondriale e contrastando la morte cellulare programmata. La combinazione tra incremento di BAX e riduzione di Bcl-2 suggerisce quindi un coinvolgimento della via apoptotica mitocondriale nel danno epatico indotto dal DEP.

Questo dato è particolarmente coerente con i risultati del TUNEL assay. L'aumento delle cellule apoptotiche e lo sbilanciamento BAX/Bcl-2 convergono infatti verso la stessa interpretazione biologica: il DEP promuove una condizione di stress cellulare sufficiente ad attivare meccanismi di morte programmata nel tessuto epatico. Tale processo può contribuire alla perdita dell'integrità parenchimale osservata istologicamente e, allo stesso tempo, alimentare la risposta infiammatoria locale attraverso il rilascio di segnali associati al danno cellulare.

Un elemento centrale del presente studio è rappresentato dall'attivazione del pathway NLRP3/Caspase-3/IL-1β nel tessuto epatico. L'aumento immunoistochimico di NLRP3 nei campioni trattati con DEP suggerisce il coinvolgimento dell'inflammasoma, una piattaforma multiproteica sensibile a segnali di stress cellulare, danno tissutale e alterazioni dell'omeostasi intracellulare. L'incremento concomitante di IL-1β indica inoltre l'attivazione di una risposta pro-infiammatoria downstream, coerente con il ruolo di questa citochina come mediatore chiave della risposta infiammatoria associata all'inflammasoma.

La presenza di una maggiore espressione di Caspase-3 contribuisce a collegare la risposta infiammatoria con la componente di morte cellulare. Sebbene Caspase-3 sia classicamente associata alla fase esecutiva dell'apoptosi, il suo aumento nel contesto di una maggiore

espressione di NLRP3 e IL-1β suggerisce che nel tessuto epatico trattato con DEP coesistano processi infiammatori e apoptotici. In questo senso, il danno epatico non può essere interpretato esclusivamente come apoptosi o esclusivamente come infiammazione, ma piuttosto come un'interazione tra pathways di stress cellulare, attivazione inflammasomiale e morte cellulare caspasi-dipendente.

Nel complesso, i risultati epatici indicano che il DEP induce un quadro di danno caratterizzato da alterazione istologica, fibrosi, apoptosi e attivazione dell'inflammasoma. Questi processi appaiono biologicamente interconnessi. Lo stress cellulare può favorire l'attivazione dell'inflammasoma NLRP3; l'attivazione inflammasomiale può amplificare la risposta infiammatoria attraverso IL-1β; l'infiammazione può contribuire alla progressione del danno tissutale e al rimodellamento stromale; infine, l'apoptosi può rappresentare sia una conseguenza dello stress cellulare sia un ulteriore fattore in grado di alimentare la risposta locale al danno.

Anche il rene mostra un quadro di alterazione rilevante in seguito all'esposizione al DEP. L'analisi istopatologica mediante Ematossilina/Eosina ha evidenziato modificazioni soprattutto a carico del compartimento tubulare e interstiziale. Nei campioni trattati si osservano irregolarità tubulari, alterazioni dell'epitelio, edema interstiziale e infiltrato infiammatorio. Questi reperti suggeriscono che il compartimento tubulare rappresenti una sede particolarmente sensibile agli effetti del DEP, coerentemente con il ruolo del rene nell'eliminazione di xenobiotici e metaboliti.

La vulnerabilità del tubulo renale può essere interpretata alla luce della sua funzione fisiologica. Le cellule tubulari sono coinvolte in processi di trasporto, riassorbimento, secrezione e concentrazione di sostanze, e sono quindi esposte a carichi elevati di composti potenzialmente tossici. L'alterazione dell'epitelio tubulare osservata nei campioni DEP può indicare una compromissione della funzione cellulare e dell'integrità strutturale del nefrone. La presenza di edema e infiltrato infiammatorio suggerisce inoltre che il danno tubulare si accompagni a una risposta interstiziale, configurando un quadro di sofferenza tubulo-interstiziale.

La colorazione Tricromica di Masson nel rene ha mostrato un aumento della componente collagenica nelle aree interstiziali e peritubulari. Questo risultato è particolarmente significativo perché, nel contesto renale, l'accumulo di matrice extracellulare nello spazio tubulo-interstiziale rappresenta uno dei principali indicatori di rimodellamento patologico. A

differenza del fegato, in cui l'attenzione è rivolta prevalentemente all'architettura lobulare e alla fibrosi periportale o parenchimale, nel rene il dato più rilevante è l'espansione degli spazi intertubulari e la modificazione del microambiente stromale circostante i tubuli.

L'aumento della deposizione collagenica nel tessuto renale trattato con DEP suggerisce quindi l'attivazione di processi di rimodellamento tubulo-interstiziale. Questo fenomeno può rappresentare una risposta al danno epiteliale e all'infiammazione locale. La presenza di alterazioni tubulari, edema e infiltrato infiammatorio può infatti favorire l'attivazione di vie fibrogeniche e la deposizione di matrice extracellulare. In tal senso, il rimodellamento osservato mediante Tricromica di Masson non costituisce un evento separato, ma si integra con il quadro istopatologico generale del rene.

Il TUNEL assay ha evidenziato un aumento delle cellule apoptotiche anche nel tessuto renale trattato con DEP. Questo dato indica che la compromissione osservata a livello istologico coinvolge meccanismi di morte cellulare programmata. La distribuzione del segnale TUNEL, prevalentemente associata al compartimento tubulare, rafforza l'ipotesi che le cellule epiteliali tubulari rappresentino un bersaglio rilevante del danno indotto dal DEP. L'aumento dell'apoptosi tubulare può contribuire alla perdita dell'integrità dell'epitelio, all'alterazione del lume tubulare e alla progressione del danno interstiziale.

Analogamente a quanto osservato nel fegato, anche nel rene l'analisi immunoistochimica di BAX e Bcl-2 ha evidenziato uno sbilanciamento verso un profilo pro-apoptotico. L'aumento di BAX e la riduzione di Bcl-2 nei campioni trattati indicano che il DEP interferisce con i meccanismi di omeostasi cellulare del tessuto renale, favorendo l'attivazione della via apoptotica mitocondriale. Tuttavia, nel rene tale alterazione assume una specifica rilevanza tubulare, poiché la perdita di cellule epiteliali può compromettere la struttura e la funzione del compartimento tubulo-interstiziale.

L'analisi del pathway NLRP3/Caspase-3/IL-1β nel rene ha ulteriormente chiarito il coinvolgimento della componente infiammatoria. L'aumento di NLRP3 nei campioni DEP suggerisce che il danno renale sia associato all'attivazione di segnali intracellulari compatibili con il coinvolgimento dell'inflammasoma. L'incremento di IL-1β indica una risposta pro-infiammatoria locale, mentre la maggiore positività per Caspase-3 conferma la concomitante attivazione di processi di morte cellulare caspasi-dipendenti.

Nel tessuto renale, l'attivazione dell'asse NLRP3/caspasi/IL-1β può avere implicazioni particolarmente importanti. L'inflammasoma è sensibile a segnali di danno cellulare, stress ossidativo e alterazioni dell'omeostasi intracellulare, tutti eventi plausibilmente associati alla tossicità da DEP. L'attivazione di questo pathway può amplificare la risposta infiammatoria nel microambiente tubulo-interstiziale, contribuendo alla progressione del danno e al rimodellamento della matrice extracellulare. Pertanto, l'aumento coordinato di NLRP3, Caspase-3 e IL-1β fornisce un collegamento biologico tra alterazioni tubulari, apoptosi e infiammazione.

L'insieme dei risultati in vivo suggerisce quindi che il DEP eserciti effetti tossicologici su entrambi gli organi analizzati, ma con caratteristiche tissutali specifiche. Nel fegato, il danno si manifesta principalmente attraverso alterazione dell'architettura parenchimale, necrosi, infiltrato infiammatorio, deposizione collagenica e attivazione apoptotica/inflammasomiale. Nel rene, invece, il quadro appare maggiormente centrato sul compartimento tubulo-interstiziale, con danno tubulare, edema, infiltrazione infiammatoria, rimodellamento interstiziale e apoptosi delle cellule epiteliali. Questa distinzione è importante perché indica che il DEP può attivare meccanismi cellulari comuni, ma con manifestazioni morfologiche differenti a seconda del tessuto bersaglio.

I risultati in vitro confermano e approfondiscono quanto osservato nei tessuti. Nelle cellule HepG2, utilizzate come modello epatico, il DEP determina una riduzione della vitalità cellulare con andamento dose- e tempo-dipendente. L'IC50 calcolata a 24 h è pari a 320 μM, mentre a 48 h si riduce a 233 μM, indicando una maggiore tossicità in seguito a esposizione prolungata. Questo dato suggerisce che le cellule epatiche siano sensibili al DEP anche a concentrazioni inferiori rispetto a quelle necessarie per indurre effetti comparabili nelle cellule HEK-293.

La maggiore sensibilità delle HepG2 può essere interpretata in relazione alla natura epatica del modello cellulare. Le cellule epatiche sono metabolicamente coinvolte nella risposta agli xenobiotici e possono quindi essere particolarmente suscettibili a composti in grado di interferire con l'omeostasi redox e con la funzione mitocondriale. La riduzione della vitalità osservata mediante MTT indica una compromissione dell'attività metabolica cellulare, che può rappresentare una conseguenza diretta dello stress indotto dal DEP.

La valutazione della produzione intracellulare di ROS nelle HepG2 ha evidenziato un aumento del segnale DCF alle concentrazioni più elevate, con un andamento dipendente dalla dose e dal

tempo. In particolare, la concentrazione di 640 µM induce un picco precoce di ROS a 6 h, seguito da una riduzione del segnale nei tempi successivi, mentre la concentrazione di 320 µM mostra un picco più tardivo a 18 h. La concentrazione più bassa, pari a 0,3 µM, non determina variazioni rilevanti rispetto al controllo.

Questo andamento suggerisce che la risposta ossidativa delle HepG2 al DEP sia modulata dall'intensità dell'esposizione. A concentrazioni elevate, il danno ossidativo sembra instaurarsi rapidamente, ma la successiva riduzione del segnale può riflettere una perdita di cellule vitali o metabolicamente attive. A concentrazioni intermedie, invece, la produzione di ROS appare più graduale, raggiungendo il massimo dopo un tempo di esposizione più lungo. Questo dato è coerente con l'idea che lo stress ossidativo preceda o accompagni la compromissione della vitalità cellulare.

L'analisi ELISA nelle HepG2 ha mostrato una modulazione significativa del profilo citochinico. I livelli di IL-6, IL-1α e IL-8 aumentano alle concentrazioni più elevate di DEP, indicando l'attivazione di una risposta pro-infiammatoria. IFN-γ non mostra variazioni rilevanti, mentre IL-10 risulta ridotta nei gruppi maggiormente esposti. Questo profilo suggerisce uno sbilanciamento verso una condizione pro-infiammatoria, caratterizzata dall'aumento di mediatori associati allo stress e al danno cellulare e dalla riduzione della componente regolatoria rappresentata da IL-10.

Il collegamento tra ROS e citochine è particolarmente rilevante. L'aumento dello stress ossidativo può infatti favorire l'attivazione di vie di segnalazione infiammatoria e contribuire al rilascio di mediatori pro-infiammatori. Nelle HepG2, l'aumento di IL-6, IL-1α e IL-8 alle concentrazioni più elevate si integra con la riduzione della vitalità e con l'aumento della produzione di ROS, suggerendo che il DEP promuova una risposta cellulare complessa in cui citotossicità, stress ossidativo e infiammazione sono strettamente connessi.

Nelle cellule HEK-293, utilizzate come modello renale in vitro, il DEP induce anch'esso una riduzione dose- e tempo-dipendente della vitalità cellulare. Tuttavia, i valori di IC50 risultano più elevati rispetto alle HepG2, pari a 1029 µM a 24 h e 947 µM a 48 h. Questo dato indica che le HEK-293 richiedono concentrazioni più alte di DEP per raggiungere una riduzione del 50% della vitalità, suggerendo una diversa sensibilità del modello renale rispetto a quello epatico.

Nonostante questa apparente maggiore resistenza in termini di vitalità, le HEK-293 mostrano comunque una risposta ossidativa evidente. La produzione di ROS aumenta in funzione della dose e del tempo. Alla concentrazione di 2 mM si osserva un picco precoce a 2 h, seguito da una riduzione del segnale, probabilmente legata alla perdita di cellule vitali alle concentrazioni più alte. A 1 mM il picco è più tardivo, intorno alle 12 h, mentre a 0,1 mM si osserva un incremento progressivo nel tempo senza un picco netto. Questo andamento evidenzia una cinetica di risposta diversa rispetto alle HepG2, ma conferma il ruolo dello stress ossidativo come evento comune nella risposta al DEP.

Anche nelle HEK-293 il profilo citochinico risulta alterato. I livelli di IL-6, IL-1α e IL-8 aumentano in modo evidente alle concentrazioni più elevate, con una progressiva riduzione alle dosi inferiori. IFN-γ rimane sostanzialmente stabile, mentre IL-10 diminuisce nei campioni trattati con le concentrazioni più alte. Questo pattern è coerente con quello osservato nelle HepG2, pur manifestandosi in un range di concentrazioni più elevato. Le HEK-293 mostrano quindi una risposta pro-infiammatoria al DEP, associata a stress ossidativo e riduzione della vitalità.

Il confronto tra i due modelli cellulari fornisce indicazioni importanti. Le HepG2 risultano più sensibili al DEP in termini di IC50, suggerendo una maggiore vulnerabilità del modello epatico alla citotossicità del composto. Le HEK-293, invece, pur richiedendo concentrazioni più elevate per mostrare una riduzione marcata della vitalità, sviluppano comunque una risposta ossidativa e infiammatoria evidente. Questa differenza può riflettere caratteristiche intrinseche dei due modelli cellulari, incluse differenze metaboliche, capacità antiossidante, risposta allo stress e modalità di gestione degli xenobiotici.

L'integrazione complessiva dei risultati permette di proporre un modello interpretativo nel quale il DEP induce inizialmente una perturbazione dell'omeostasi cellulare, con incremento della produzione di ROS e alterazione della funzione metabolica. Lo stress ossidativo, una volta instaurato, può contribuire alla compromissione della vitalità cellulare, alla modulazione del rilascio di citochine e all'attivazione di vie infiammatorie intracellulari. In particolare, l'aumento di IL-6, IL-1α e IL-8 nei modelli cellulari, associato alla riduzione di IL-10 alle concentrazioni più elevate, suggerisce uno spostamento del microambiente cellulare verso una condizione pro-infiammatoria, nella quale la componente regolatoria appare insufficiente a controbilanciare la risposta al danno.

Nel tessuto epatico e renale, questo squilibrio si traduce in alterazioni morfologiche e molecolari più complesse. Nel fegato, il danno si manifesta attraverso disorganizzazione del parenchima, edema, necrosi, infiltrato infiammatorio, deposizione collagenica, aumento dell'apoptosi e attivazione dell'asse NLRP3/Caspase-3/IL-1β. Nel rene, il quadro appare maggiormente focalizzato sul compartimento tubulo-interstiziale, con alterazioni tubulari, edema, infiltrazione infiammatoria, rimodellamento interstiziale, apoptosi e attivazione inflammasomiale. Queste differenze riflettono la specificità biologica dei due organi: il fegato risponde come principale sede di metabolismo e biotrasformazione, mentre il rene manifesta una vulnerabilità legata soprattutto al compartimento tubulare e ai processi di eliminazione.

Un aspetto centrale è il possibile ruolo dello stress ossidativo come evento di collegamento tra citotossicità, infiammazione e apoptosi. Nei modelli in vitro, l'aumento dei ROS precede o accompagna la riduzione della vitalità cellulare, con cinetiche diverse nelle HepG2 e nelle HEK-293. Nelle HepG2, la risposta ossidativa appare evidente a concentrazioni prossime o superiori all'IC50, con un picco precoce alla concentrazione più elevata e un picco più tardivo alla concentrazione intermedia. Nelle HEK-293, invece, la produzione di ROS mostra un andamento concentrazione- e tempo-dipendente, con picco precoce alla dose più alta e risposta più progressiva alle concentrazioni inferiori. Questi dati suggeriscono che la produzione di ROS rappresenti una risposta dinamica al DEP, modulata dalla sensibilità specifica del modello cellulare e dalla durata dell'esposizione.

L'attivazione del pathway NLRP3/Caspase-3/IL-1β osservata nei tessuti può essere interpretata in relazione a questo contesto redox. L'inflammasoma NLRP3 è infatti sensibile a segnali cellulari associati a stress, danno e alterazione dell'omeostasi intracellulare. L'aumento di NLRP3 e IL-1β nei tessuti trattati suggerisce che l'esposizione al DEP possa promuovere l'attivazione di una risposta inflammasomiale, contribuendo all'amplificazione dell'infiammazione locale. Parallelamente, l'aumento di Caspase-3, insieme allo sbilanciamento BAX/Bcl-2 e alla positività TUNEL, indica che la risposta al DEP coinvolge anche meccanismi di morte cellulare programmata. L'associazione tra inflammasoma e apoptosi suggerisce quindi un danno multifattoriale, in cui infiammazione e morte cellulare non rappresentano fenomeni separati, ma processi biologicamente interdipendenti.

Alla luce di questi dati, una possibile interpretazione è che il DEP agisca come un fattore di stress capace di indurre una progressiva perdita di equilibrio cellulare. In condizioni di esposizione più contenuta, le cellule possono attivare meccanismi adattativi finalizzati al

mantenimento dell'omeostasi. Tuttavia, all'aumentare della concentrazione o della durata dell'esposizione, tali meccanismi possono diventare insufficienti, determinando accumulo di ROS, riduzione della vitalità, aumento di mediatori pro-infiammatori e attivazione di vie apoptotiche. Nei tessuti, questa sequenza può manifestarsi come danno morfologico, infiltrazione infiammatoria, rimodellamento della matrice extracellulare e attivazione dell'inflammasoma.

Un primo limite dello studio riguarda la valutazione del pathway NLRP3/Caspase-3/IL-1β. L'analisi immunoistochimica consente di localizzare e quantificare l'espressione dei marker nei tessuti, fornendo informazioni importanti sulla distribuzione del segnale e sul coinvolgimento delle diverse aree tissutali. Tuttavia, questa metodica non permette da sola di dimostrare in modo definitivo l'attivazione funzionale del complesso inflammasomiale. Per confermare ulteriormente questo dato, sarebbero utili analisi complementari quali Western blot, qPCR, dosaggio delle forme mature di IL-1β o valutazione di caspasi specifiche associate all'inflammasoma.

Un secondo limite riguarda la relazione causale tra stress ossidativo, infiammazione e morte cellulare. I dati ottenuti mostrano una forte associazione tra aumento dei ROS, riduzione della vitalità cellulare, modulazione delle citochine, apoptosi e attivazione dei marker inflammasomiali. Tuttavia, lo studio non consente di stabilire con certezza se lo stress ossidativo rappresenti l'evento iniziale responsabile dell'attivazione infiammatoria e apoptotica, oppure se questi processi si sviluppino in parallelo come conseguenze dello stesso stimolo tossico. Studi funzionali basati sull'utilizzo di antiossidanti, scavenger dei ROS, inibitori dell'inflammasoma o modulatori dell'apoptosi sarebbero necessari per definire meglio la sequenza degli eventi.

Un'ulteriore limitazione è rappresentata dall'utilizzo di linee cellulari immortalizzate. HepG2 e HEK-293 sono modelli utili per studiare risposte cellulari in condizioni controllate, ma non riproducono completamente la complessità metabolica, strutturale e immunologica del fegato e del rene in vivo. Pertanto, i risultati ottenuti in vitro devono essere interpretati come supporto meccanicistico ai dati tissutali, piuttosto che come rappresentazione completa della risposta d'organo. L'impiego di colture primarie, co-colture, sferoidi tridimensionali o modelli organ-on-chip potrebbe aumentare la rilevanza fisiologica delle osservazioni.

Va inoltre considerato che il presente studio si concentra su endpoint specifici, quali vitalità cellulare, produzione di ROS, rilascio di citochine, apoptosi, rimodellamento tissutale e attivazione dell'inflammasoma. Il DEP potrebbe tuttavia interferire anche con ulteriori pathways biologici, tra cui metabolismo lipidico, funzione mitocondriale, autofagia, stress del reticolo endoplasmatico, vie di detossificazione e segnalazione endocrina. L'analisi di questi aspetti potrebbe fornire una comprensione più completa della tossicità del composto.

Sulla base dei risultati ottenuti, diverse strategie sperimentali potrebbero essere adottate per approfondire i meccanismi alla base della tossicità del DEP. Una prima direzione riguarda l'impiego di antiossidanti o scavenger dei ROS, al fine di verificare se la riduzione dello stress ossidativo sia in grado di attenuare la citotossicità, il rilascio di citochine e l'attivazione dell'inflammasoma. Questo approccio consentirebbe di chiarire se i ROS rappresentino un evento causale nella risposta al DEP o se costituiscano principalmente un indicatore associato al danno cellulare.

Una seconda strategia potrebbe prevedere l'utilizzo di inibitori specifici del pathway NLRP3 o di componenti caspasi-dipendenti, per valutare se il blocco dell'inflammasoma riduca l'espressione di IL-1β e limiti il danno tissutale. Questo permetterebbe di distinguere il contributo dell'infiammazione inflammasomiale rispetto alla componente apoptotica classica e di chiarire il peso relativo dei diversi pathways nella progressione del danno epato-renale.

Ulteriori approfondimenti potrebbero riguardare la valutazione dei sistemi antiossidanti endogeni, quali superossido dismutasi, catalasi, glutatione e glutatione perossidasi, al fine di comprendere se l'aumento dei ROS osservato sia accompagnato da una ridotta capacità difensiva cellulare. Inoltre, l'analisi di marker di danno mitocondriale, stress del reticolo endoplasmatico e perossidazione lipidica potrebbe contribuire a definire con maggiore dettaglio le vie intracellulari attraverso cui il DEP compromette l'omeostasi cellulare.

Un'altra prospettiva riguarda l'estensione dello studio a condizioni di esposizione più vicine agli scenari ambientali e umani. Sebbene i modelli sperimentali utilizzati permettano di definire con chiarezza la risposta biologica al DEP, ulteriori studi potrebbero valutare esposizioni croniche a basse dosi, trattamenti ripetuti e combinazioni con altri contaminanti ambientali. Questo aspetto è particolarmente rilevante nel contesto degli interferenti endocrini, poiché l'esposizione reale raramente avviene nei confronti di un singolo composto isolato, ma più

spesso riguarda miscele complesse di sostanze chimiche presenti nell'ambiente, negli alimenti o nei prodotti di consumo.

Le prospettive future dovrebbero inoltre considerare la tossicologia delle miscele, che rappresenta una delle principali sfide nello studio degli interferenti endocrini. Il DEP potrebbe interagire con altri ftalati, plasticizzanti, pesticidi, PFAS o contaminanti emergenti, generando effetti additivi, sinergici o antagonisti difficili da prevedere sulla base dello studio del singolo composto. In questa prospettiva, l'analisi combinata di più interferenti endocrini potrebbe fornire informazioni più aderenti alla complessità dell'esposizione reale e contribuire a definire meglio il rischio tossicologico associato all'ambiente chimico contemporaneo.

Un ulteriore sviluppo potrebbe essere rappresentato dall'utilizzo di modelli cellulari avanzati, come co-colture, sferoidi tridimensionali, organoidi epatici e renali o sistemi microfluidici organ-on-chip. Questi modelli potrebbero consentire una valutazione più fisiologicamente rilevante dell'interazione tra metabolismo epatico, eliminazione renale, infiammazione e risposta allo stress. In particolare, un sistema integrato fegato-rene potrebbe permettere di studiare non solo l'effetto diretto del DEP, ma anche il contributo dei suoi metaboliti e la comunicazione funzionale tra i due compartimenti.

In termini applicativi, i risultati di questo studio contribuiscono a rafforzare l'idea che anche ftalati considerati meno persistenti o meno studiati rispetto ad altri composti della stessa classe possano determinare effetti biologici rilevanti. L'identificazione di stress ossidativo, infiammazione, apoptosi e attivazione dell'inflammasoma come eventi associati all'esposizione al DEP suggerisce la necessità di includere endpoint molecolari e cellulari sensibili nella valutazione tossicologica degli interferenti endocrini. Questo aspetto è particolarmente importante per la caratterizzazione del rischio in scenari di esposizione cronica, a basse dosi o in presenza di miscele.

In conclusione, il presente studio mostra che l'esposizione al DEP è associata a un danno epato-renale complesso, sostenuto dall'interazione tra stress ossidativo, risposta infiammatoria, attivazione del pathway NLRP3/Caspase-3/IL-1β e apoptosi. I dati in vivo evidenziano alterazioni strutturali e molecolari nei tessuti epatico e renale, mentre i risultati in vitro confermano la capacità del DEP di compromettere la vitalità cellulare, aumentare la produzione di ROS e modulare il rilascio di citochine in modelli cellulari rappresentativi dei due compartimenti. L'integrazione di questi risultati supporta un modello in cui il DEP altera

l’omeostasi cellulare e tissutale attraverso meccanismi convergenti, con manifestazioni specifiche nel fegato e nel rene. Le prospettive future dovranno chiarire i rapporti causali tra stress ossidativo, inflammasoma e apoptosi, valutare l’impatto di esposizioni croniche e miscele ambientali, e sviluppare modelli sperimentali più complessi in grado di riprodurre con maggiore fedeltà la risposta epato-renale agli interferenti endocrini emergenti.

INDICE DELLE FIGURE

Figura 1	Meccanismi generali di interferenza endocrina indotti dagli EDCs
Figura 2	Principali vie di esposizione umana agli EDCs in una prospettiva One Health
Figura 3	Stress ossidativo e danno cellulare indotti dagli interferenti endocrini
Figura 4	Attivazione dell'inflammasoma NLRP3 nella risposta a stress cellulare e danno tissutale
Figura 5	Asse fegato–rene nella tossicità da interferenti endocrini
Figura 6	Meccanismi molecolari d'azione dei ftalati
Figura 7	Struttura chimica del Dietil Ftalato (DEP)
Figura 8	Dietil Ftalato: esposizione, metabolismo ed effetti biologici
Figura 9	Morfologia delle cellule HepG2 in condizioni basali
Figura 10	Morfologia delle cellule HEK-293 in condizioni basali
Figura 11	Schema sperimentale dell'esposizione a Dietil Ftalato (DEP)
Figura 12	Effetto del DEP sulla vitalità cellulare delle cellule HepG2
Figura 13	Produzione intracellulare di ROS nelle cellule HepG2 ai tempi precoci di esposizione
Figura 14	Produzione intracellulare di ROS nelle cellule HepG2 ai tempi successivi di esposizione
Figura 15	Strategia di gating per l'analisi citofluorimetrica dei ROS nelle cellule HepG2
Figura 16	Profili FACS della fluorescenza DCF nelle cellule HepG2 trattate con DEP
Figura 17	Quantificazione della produzione di ROS nelle cellule HepG2 esposte a DEP
Figura 18	Quantificazione delle citochine pro-infiammatorie nel surnatante delle cellule HepG2 esposte a DEP
Figura 19	Quantificazione di IFN-γ e IL-10 nel surnatante delle cellule HepG2 esposte a DEP
Figura 20	Effetto del DEP sulla vitalità cellulare delle cellule HEK-293
Figura 21	Produzione intracellulare di ROS nelle cellule HEK-293 osservata mediante microscopia a fluorescenza
Figura 22	Strategia di gating utilizzata per l'analisi citofluorimetrica dei ROS nelle cellule HEK-293
Figura 23	Profili citofluorimetrici della produzione di ROS nelle cellule HEK-293
Figura 24	Andamento temporale della produzione di ROS nelle cellule HEK-293 esposte a DEP
Figura 25	Quantificazione delle citochine pro-infiammatorie nel surnatante delle cellule HEK-293 esposte a DEP
Figura 26	Quantificazione di IFN-γ e IL-10 nel surnatante delle cellule HEK-293 esposte a DEP
Figura 27	Alterazioni istopatologiche del tessuto epatico valutate mediante colorazione Ematossilina/Eosina
Figura 28	Valutazione della fibrosi epatica mediante colorazione Tricromica di Masson
Figura 29	Valutazione dell'apoptosi epatica mediante TUNEL assay
Figura 30	Espressione immunoistochimica di BAX e Bcl-2 nel tessuto epatico
Figura 31	Espressione immunoistochimica dei marker del pathway NLRP3/Caspase-3/IL-1β nel tessuto epatico
Figura 32	Alterazioni istopatologiche del tessuto renale valutate mediante colorazione Ematossilina/Eosina
Figura 33	Valutazione del rimodellamento tubulo-interstiziale mediante colorazione Tricromica
Figura 34	Valutazione dell'apoptosi renale mediante TUNEL assay
Figura 35	Espressione immunoistochimica di BAX e Bcl-2 nel tessuto renale
Figura 36	Espressione immunoistochimica dei marker del pathway NLRP3/Caspase-3/IL-1β nel tessuto renale

BIBLIOGRAFIA

1. Arihilam, N.H. and E. Arihilam, *Impact and control of anthropogenic pollution on the ecosystem–A review.* Journal of Bioscience and Biotechnology Discovery, 2019. **4**(3): p. 54–59.
2. Vandenberg, L.N., et al., *Hormones and endocrine-disrupting chemicals: low-dose effects and nonmonotonic dose responses*. Endocrine reviews, 2012. **33**(3): p. 378–455.
3. Genuis, S.J. and E. Kyrillos, *The chemical disruption of human metabolism*. Toxicology Mechanisms and Methods, 2017. **27**(7): p. 477–500.
4. Kabir, E.R., M.S. Rahman, and I. Rahman, *A review on endocrine disruptors and their possible impacts on human health*. Environmental toxicology and pharmacology, 2015. **40**(1): p. 241–258.
5. Knight, J., *Endocrine system 1: overview of the endocrine system and hormones.* Nursing Times, 2021. **117**(5): p. 38–42.
6. Ahsan, A., et al., *Physiology of endocrine system and related metabolic disorders*, in *Endocrine Disrupting Chemicals-induced Metabolic Disorders and Treatment Strategies*. 2020, Springer. p. 3–41.
7. Hiller-Sturmhöfel, S. and A. Bartke, *The endocrine system: an overview.* Alcohol health and research world, 1998. **22**(3): p. 153.
8. Barouki, R., X. Coumoul, and E. Blanc, *Communication Disruption in the Nervous System*, in *Toxicology of Biological Communication: Lessons from Endocrine Disruptors and the Exposome*. 2025, Springer. p. 31–43.
9. De Coster, S. and N. Van Larebeke, *Endocrine‐disrupting chemicals: associated disorders and mechanisms of action*. Journal of environmental and public health, 2012. **2012**(1): p. 713696.
10. Yilmaz, B., et al., *Endocrine disrupting chemicals: exposure, effects on human health, mechanism of action, models for testing and strategies for prevention*. Reviews in endocrine and metabolic disorders, 2020. **21**(1): p. 127–147.
11. Lichtensteiger, W., et al., *Converging effects of three different endocrine disrupters on sox and pou gene expression in developing rat hippocampus:*

Possible role of microRNA in sex differences. Frontiers in Genetics, 2021. **12**: p. 718796.

12. Reinen, J. and N. Vermeulen, *Biotransformation of endocrine disrupting compounds by selected phase I and phase II enzymes–formation of estrogenic and chemically reactive metabolites by cytochromes P450 and sulfotransferases*. Current medicinal chemistry, 2015. **22**(4): p. 500–527.
13. Foulds, C.E., et al., *Endocrine-disrupting chemicals and fatty liver disease*. Nature Reviews Endocrinology, 2017. **13**(8): p. 445–457.
14. Lagarde, F., et al., *Non-monotonic dose-response relationships and endocrine disruptors: a qualitative method of assessment*. Environmental Health, 2015. **14**(1): p. 13.
15. Burggren, W.W. and C.A. Mueller, *Developmental critical windows and sensitive periods as three-dimensional constructs in time and space*. Physiological and Biochemical Zoology, 2015. **88**(2): p. 91–102.
16. Vafopoulou, X. and C. Steel, *Circadian organization of the endocrine system*. Insect Development. Elsevier, Oxford, 2009: p. 395–458.
17. Gore, A.C., *Developmental programming and endocrine disruptor effects on reproductive neuroendocrine systems*. Frontiers in neuroendocrinology, 2008. **29**(3): p. 358–374.
18. Plunk, E.C. and S.M. Richards, *Epigenetic modifications due to environment, ageing, nutrition, and endocrine disrupting chemicals and their effects on the endocrine system*. International Journal of Endocrinology, 2020. **2020**(1): p. 9251980.
19. Porte, C., et al., *Endocrine disruptors in marine organisms: approaches and perspectives*. Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology, 2006. **143**(3): p. 303–315.
20. Wuttke, W., H. Jarry, and D. Seidlova-Wuttke, *Definition, classification and mechanism of action of endocrine disrupting chemicals*. Hormones, 2010. **9**(1): p. 9–15.
21. Kahn, L.G., et al., *Endocrine-disrupting chemicals: implications for human health*. The lancet Diabetes & endocrinology, 2020. **8**(8): p. 703–718.

22. Darbre, P.D., *The history of endocrine-disrupting chemicals*. Current Opinion in Endocrine and Metabolic Research, 2019. **7**: p. 26–33.
23. Kościelecka, K., et al., *Endocrine effect of some mycotoxins on humans: a clinical review of the ways to mitigate the action of mycotoxins*. Toxins, 2023. **15**(9): p. 515.
24. Encarnação, T., et al., *Endocrine disrupting chemicals: Impact on human health, wildlife and the environment*. Science progress, 2019. **102**(1): p. 3–42.
25. Pironti, C., et al., *Endocrine-disrupting compounds: An overview on their occurrence in the aquatic environment and human exposure*. Water, 2021. **13**(10): p. 1347.
26. Pariatamby, A. and Y.L. Kee, *Persistent organic pollutants management and remediation*. Procedia Environmental Sciences, 2016. **31**: p. 842–848.
27. Kulp, K. and K. Lorenz, *I. Physicochemical Properties'*. Cereal chem, 1981. **58**(1): p. 46–48.
28. Geyer, H.J., et al., *Bioaccumulation and occurrence of endocrine-disrupting chemicals (EDCs), persistent organic pollutants (POPs), and other organic compounds in fish and other organisms including humans*, in *Bioaccumulation–new aspects and developments*. 2001, Springer. p. 1–166.
29. Jackson, E., et al., *Adipose tissue as a site of toxin accumulation*. Comprehensive Physiology, 2017. **7**(4): p. 1085–1135.
30. Gupta, A., *Toxicokinetics, pharmacokinetics, and absorption, distribution, metabolism, and excretion*, in *Information Resources in Toxicology*. 2020, Elsevier. p. 483–488.
31. Correia, M.A., *Drug biotransformation*. Basic & clinical pharmacology, 2018. **53**.
32. Chen, X., et al., *Toxicity and estrogenic endocrine disrupting activity of phthalates and their mixtures*. International journal of environmental research and public health, 2014. **11**(3): p. 3156–3168.
33. Riviere, J.E., *Absorption, distribution, metabolism, and elimination*. Veterinary pharmacology and therapeutics, 2009. **9**.
34. Isensee, A.R., *Bioaccumulation and food chain accumulation*, in *Environmental Chemistry of Herbicides*. 2024, CRC Press. p. 187–197.

35. Boethling, R., et al., *Environmental persistence of organic pollutants: guidance for development and review of POP risk profiles.* Integr Environ Assess Manag, 2009. **5**(4): p. 539–56.
36. BANSAL, O., *Persistent organic compounds: A review.* ADVANCES IN IMAGE AND VIDEO PROCESSING Учредители: Scholar Publishing, 2020. **8**(3).
37. Kiyama, R., *Endocrine disruptor actions through receptor crosstalk*. Environmental Biotechnology, 2016. **12**(1): p. 1–16.
38. Cano, R., et al., *Role of endocrine-disrupting chemicals in the pathogenesis of non-alcoholic fatty liver disease: a comprehensive review.* International journal of molecular sciences, 2021. **22**(9): p. 4807.
39. Kortenkamp, A., *Ten years of mixing cocktails: a review of combination effects of endocrine-disrupting chemicals*. Environmental health perspectives, 2007. **115**(Suppl 1): p. 98.
40. Martin, O., et al., *Ten years of research on synergisms and antagonisms in chemical mixtures: A systematic review and quantitative reappraisal of mixture studies*. Environment international, 2021. **146**: p. 106206.
41. Hernández, A.F. and A.M. Tsatsakis, *Human exposure to chemical mixtures: Challenges for the integration of toxicology with epidemiology data in risk assessment*. Food and Chemical Toxicology, 2017. **103**: p. 188–193.
42. Gough, A., et al., *Biologically relevant heterogeneity: metrics and practical insights*. Slas Discovery: Advancing Life Sciences R&D, 2017. **22**(3): p. 213–237.
43. Campbell, C.G., et al., *Biologically directed environmental monitoring, fate, and transport of estrogenic endocrine disrupting compounds in water: a review.* Chemosphere, 2006. **65**(8): p. 1265–1280.
44. Chaturvedi, M., et al., *Endocrine disrupting chemicals (EDCs): chemical fate, distribution, analytical methods and promising remediation strategies–a critical review.* Environmental Technology Reviews, 2023. **12**(1): p. 286–315.
45. Bertram, M.G., et al., *Endocrine-disrupting chemicals*. Current Biology, 2022. **32**(13): p. R727–R730.
46. Wang, L.-C., et al., *The sorption of persistent organic pollutants in microplastics from the coastal environment*. Journal of Hazardous Materials, 2021. **420**: p. 126658.

47. Komesli, O.T., et al., *Occurrence, fate and removal of endocrine disrupting compounds (EDCs) in Turkish wastewater treatment plants*. Chemical Engineering Journal, 2015. **277**: p. 202–208.
48. Windsor, F.M., S.J. Ormerod, and C.R. Tyler, *Endocrine disruption in aquatic systems: Up‐scaling research to address ecological consequences*. Biological Reviews, 2018. **93**(1): p. 626–641.
49. Lamastra, L., N.A. Suciu, and M. Trevisan, *Sewage sludge for sustainable agriculture: contaminants' contents and potential use as fertilizer*. Chemical and Biological Technologies in Agriculture, 2018. **5**(1): p. 1–6.
50. Masinga, P., et al., *Emerging organic contaminants in the soil–plant-receptor continuum: transport, fate, health risks, and removal mechanisms*. Environmental Monitoring and Assessment, 2024. **196**(4): p. 367.
51. Scheringer, M., *Long‐range transport of organic chemicals in the environment*. Environmental Toxicology and Chemistry, 2009. **28**(4): p. 677–690.
52. Harrison, R.M., *Airborne particulate matter*. Philosophical Transactions of the Royal Society A: Mathematical, Physical and Engineering Sciences, 2020. **378**(2183).
53. Yang, L., et al., *Contributions of abiotic and biotic processes to the aerobic removal of phenolic endocrine-disrupting chemicals in a simulated estuarine aquatic environment*. Environmental Science & Technology, 2016. **50**(8): p. 4324–4334.
54. Pickering, A.D. and J.P. Sumpter, *Peer Reviewed: Comprehending endocrine disruptors in aquatic environments*. Environmental science & technology, 2003. **37**(17): p. 331A–336A.
55. Landrum, P.F. and S.W. Fisher, *Influence of lipids on the bioaccumulation and trophic transfer of organic contaminants in aquatic organisms*, in *Lipids in freshwater ecosystems*. 1999, Springer. p. 203–234.
56. Suedel, B., et al., *Trophic transfer and biomagnification potential of contaminants in aquatic ecosystems*. Reviews of environmental contamination and toxicology, 1994: p. 21–89.

57. Spacie, A., L. McCarty, and G. Rand, *Bioaccumulation and bioavailability in multiphase systems*, in *Fundamentals of aquatic toxicology*. 2020, CRC Press. p. 493–521.
58. Chmiel, T., et al., *The impact of lipophilicity on environmental processes, drug delivery and bioavailability of food components*. Microchemical Journal, 2019. **146**: p. 393–406.
59. Taylor, T., *Redrawing the boundary between organism and environment*. Proceedings of Artificial Life IX, 2004: p. 268–273.
60. Zhao, W., P. Li, and B. Yang, *New insight into the spatiotemporal distribution and ecological risk assessment of endocrine-disrupting chemicals in the Minjiang and Tuojiang rivers: Perspective of watershed landscape patterns*. Environmental Science: Processes & Impacts, 2024. **26**(8): p. 1360–1372.
61. Sijm, D.T., et al., *Transport, accumulation and transformation processes*, in *Risk assessment of chemicals: an introduction*. 2007, Springer. p. 73–158.
62. Yang, M., M.S. Park, and H.S. Lee, *Endocrine disrupting chemicals: human exposure and health risks*. Journal of Environmental Science and Health Part C, 2006. **24**(2): p. 183–224.
63. Wade, M.G., et al., *Effects of subchronic exposure to a complex mixture of persistent contaminants in male rats: systemic, immune, and reproductive effects*. Toxicological sciences, 2002. **67**(1): p. 131–143.
64. Zhang, Z., S. Wang, and L. Li, *Emerging investigator series: the role of chemical properties in human exposure to environmental chemicals*. Environmental Science: Processes & Impacts, 2021. **23**(12): p. 1839–1862.
65. Ali, H. and E. Khan, *Trophic transfer, bioaccumulation, and biomagnification of non-essential hazardous heavy metals and metalloids in food chains/webs—Concepts and implications for wildlife and human health*. Human and Ecological Risk Assessment: An International Journal, 2019. **25**(6): p. 1353–1376.
66. Sheehan, W.J., et al., *Environmental food exposure: what is the risk of clinical reactivity from cross-contact and what is the risk of sensitization*. The Journal of Allergy and Clinical Immunology: In Practice, 2018. **6**(6): p. 1825–1832.

67. Ageel, H.K., S. Harrad, and M.A.-E. Abdallah, *Occurrence, human exposure, and risk of microplastics in the indoor environment*. Environmental Science: Processes & Impacts, 2022. **24**(1): p. 17–31.
68. Shi, S. and B. Zhao, *Modeled exposure assessment via inhalation and dermal pathways to airborne semivolatile organic compounds (SVOCs) in residences*. Environmental science & technology, 2014. **48**(10): p. 5691–5699.
69. Yamamoto, H., et al., *Effects of physical− chemical characteristics on the sorption of selected endocrine disruptors by dissolved organic matter surrogates*. Environmental science & technology, 2003. **37**(12): p. 2646–2657.
70. Kwon, J.H., H.M. Liljestrand, and L.E. Katz, *Partitioning of moderately hydrophobic endocrine disruptors between water and synthetic membrane vesicles*. Environmental Toxicology and Chemistry, 2006. **25**(8): p. 1984–1992.
71. Erguc, E.I., et al., *The role of biotransformation in the activity of endocrine disruptors*. Current Drug Metabolism, 2021. **22**(8): p. 628–644.
72. Xu, C., C.Y.-T. Li, and A.-N.T. Kong, *Induction of phase I, II and III drug metabolism/transport by xenobiotics*. Archives of pharmacal research, 2005. **28**(3): p. 249–268.
73. Dekant, W., *The role of biotransformation and bioactivation in toxicity*. Molecular, Clinical and Environmental Toxicology: Volume 1: Molecular Toxicology, 2009: p. 57–86.
74. Delfosse, V., et al., *A structural perspective on nuclear receptors as targets of environmental compounds*. Acta Pharmacologica Sinica, 2015. **36**(1): p. 88–101.
75. Kennedy, M., *Hormonal regulation of hepatic drug‐metabolizing enzyme activity during adolescence*. Clinical Pharmacology & Therapeutics, 2008. **84**(6): p. 662–673.
76. Guarnotta, V., et al., *Impact of chemical endocrine disruptors and hormone modulators on the endocrine system*. International journal of molecular sciences, 2022. **23**(10): p. 5710.
77. King, R.S., *Biotransformations in drug metabolism*. 2009, John Wiley & Sons, Inc.: New Jersey. p. 17–40.

78. Aubert, N., T. Ameller, and J.-J. Legrand, *Systemic exposure to parabens: pharmacokinetics, tissue distribution, excretion balance and plasma metabolites of [14C]-methyl-, propyl-and butylparaben in rats after oral, topical or subcutaneous administration*. Food and Chemical Toxicology, 2012. **50**(3-4): p. 445–454.
79. Milne, M., *Tubular reabsorption and secretion*. Chemical pathology in relation to clinical medicine, 1964: p. 515.
80. Chen, C.-Y., et al., *Long-term impacts of endocrine-disrupting chemicals exposure on kidney function: A community-based cohort study*. Environmental Toxicology and Pharmacology, 2024. **106**: p. 104379.
81. Scarano, W.R., et al., *Cell junctions in the prostate: an overview about the effects of Endocrine Disrupting Chemicals (EDCS) in different experimental models*. Reproductive Toxicology, 2018. **81**: p. 147–154.
82. Spurgeon, D.J., et al., *Systems toxicology approaches for understanding the joint effects of environmental chemical mixtures*. Science of the total environment, 2010. **408**(18): p. 3725–3734.
83. Molinari, F., et al., *Ecotoxicological Insights From Ex Vivo Exposure of Whole Blood to PFOS and Glyphosate: Oxidative Stress and Immune Disruption*. Environmental Toxicology, 2026.
84. Little, A.G. and F. Seebacher, *Endocrine responses to environmental variation*. Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences, 2024. **379**(1898).
85. Maranho, L., et al., *In situ evaluation of wastewater discharges and the bioavailability of contaminants to marine biota*. Science of the Total Environment, 2015. **538**: p. 876–887.
86. O'Connor, P. and J. Feely, *Clinical pharmacokinetics and endocrine disorders: therapeutic implications*. Clinical pharmacokinetics, 1987. **13**(6): p. 345–364.
87. Martin, O.V., et al., *Human health and endocrine disruption: a simple multicriteria framework for the qualitative assessment of end point–specific risks in a context of scientific uncertainty.* Toxicological Sciences, 2007. **98**(2): p. 332–347.
88. Killen, S.S., et al., *Environmental stressors alter relationships between physiology and behaviour*. Trends in Ecology & Evolution, 2013. **28**(11): p. 651–658.

89. Combarnous, Y. and T.M.D. Nguyen, *Comparative overview of the mechanisms of action of hormones and endocrine disruptor compounds*. Toxics, 2019. **7**(1): p. 5.
90. Balaguer, P., V. Delfosse, and W. Bourguet, *Mechanisms of endocrine disruption through nuclear receptors and related pathways*. Current Opinion in Endocrine and Metabolic Research, 2019. **7**: p. 1–8.
91. Vinggaard, A.M., et al., *Screening of 397 chemicals and development of a quantitative structure– activity relationship model for androgen receptor antagonism*. Chemical research in toxicology, 2008. **21**(4): p. 813–823.
92. Toporova, L. and P. Balaguer, *Nuclear receptors are the major targets of endocrine disrupting chemicals*. Molecular and Cellular Endocrinology, 2020. **502**: p. 110665.
93. Yang, O., et al., *Endocrine-disrupting chemicals: review of toxicological mechanisms using molecular pathway analysis*. Journal of cancer prevention, 2015. **20**(1): p. 12.
94. Sanderson, J.T., et al., *Induction and inhibition of aromatase (CYP19) activity by various classes of pesticides in H295R human adrenocortical carcinoma cells*. Toxicology and applied pharmacology, 2002. **182**(1): p. 44–54.
95. Alsen, M., et al., *Endocrine disrupting chemicals and thyroid cancer: an overview*. Toxics, 2021. **9**(1): p. 14.
96. Sheikh, I.A., et al., *Endocrine disruption: computational perspectives on human sex hormone-binding globulin and phthalate plasticizers*. PloS one, 2016. **11**(3): p. e0151444.
97. Meulenberg, E.P., *A new test to identify endocrine disruptors using sex hormone‐binding globulins from human serum*. European journal of lipid science and technology, 2002. **104**(2): p. 131–136.
98. Hampl, R., J. Kubátová, and L. Stárka, *Steroids and endocrine disruptors—History, recent state of art and open questions*. The Journal of steroid biochemistry and molecular biology, 2016. **155**: p. 217–223.
99. Moral, R., et al., *Effect of prenatal exposure to the endocrine disruptor bisphenol A on mammary gland morphology and gene expression signature*. Journal of Endocrinology, 2008. **196**(1): p. 101.

100. Greathouse, K.L. and C.L. Walker, *Mechanisms of endocrine disruption*. Environmental Impacts on Reproductive Health Fertility; Woodruff, TJ, Janssen, SJ, Guillette, LJ, Giudice, LC, Eds, 2010: p. 72–91.
101. Conrad, M., et al., *Modeling the hypothalamus–pituitary–adrenal system: homeostasis by interacting positive and negative feedback*. Journal of biological physics, 2009. **35**(2): p. 149–162.
102. Shi, Z., S. Xiao, and Q. Zhang, *Interference with systemic negative feedback as a potential mechanism for nonmonotonic dose-responses of endocrine-disrupting chemicals*. Toxicological Sciences, 2025. **206**(2): p. 354–372.
103. Rhee, J.-S., et al., *Cloning of circadian rhythmic pathway genes and perturbation of oscillation patterns in endocrine disrupting chemicals (EDCs)-exposed mangrove killifish Kryptolebias marmoratus*. Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology, 2014. **164**: p. 11–20.
104. Schoeters, G., et al., *Endocrine disruptors and abnormalities of pubertal development*. Basic & clinical pharmacology & toxicology, 2008. **102**(2): p. 168–175.
105. Nadal, A., et al., *Endocrine-disrupting chemicals and the regulation of energy balance*. Nature Reviews Endocrinology, 2017. **13**(9): p. 536–546.
106. Swedenborg, E., et al., *Endocrine disruptive chemicals: mechanisms of action and involvement in metabolic disorders*. Journal of molecular endocrinology, 2009. **43**(1): p. 1–10.
107. Kopp, R., et al., *Exposure to endocrine disrupting chemicals perturbs lipid metabolism and circadian rhythms*. Journal of Environmental Sciences, 2017. **62**: p. 133–137.
108. Casals-Casas, C., J.N. Feige, and B. Desvergne, *Interference of pollutants with PPARs: endocrine disruption meets metabolism*. International Journal of Obesity, 2008. **32**(6): p. S53–S61.
109. Heindel, J.J., R. Newbold, and T.T. Schug, *Endocrine disruptors and obesity*. Nature Reviews Endocrinology, 2015. **11**(11): p. 653–661.
110. Vanni, R., et al., *Endocrine disruptors and the induction of insulin resistance*. Current diabetes reviews, 2021. **17**(7): p. 51–64.

111. Martínez-Pinna, J., et al., *Endocrine disruptors in plastics alter β-cell physiology and increase the risk of diabetes mellitus*. American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism, 2023. **324**(6): p. E488–E505.
112. Lin, J.-Y. and R.-X. Yin, *Exposure to endocrine-disrupting chemicals and type 2 diabetes mellitus in later life*. Exposure and Health, 2023. **15**(1): p. 199–229.
113. Koliaki, C. and M. Roden, *Hepatic energy metabolism in human diabetes mellitus, obesity and non-alcoholic fatty liver disease*. Molecular and Cellular Endocrinology, 2013. **379**(1-2): p. 35–42.
114. Kuczkowski, A. and P.T. Brinkkoetter, *Metabolism and homeostasis in the kidney: metabolic regulation through insulin signaling in the kidney*. Cell and tissue research, 2017. **369**(1): p. 199–210.
115. Blantz, R.C., et al., *Regulation of kidney function and metabolism: a question of supply and demand*. Transactions of the American Clinical and Climatological Association, 2007. **118**: p. 23.
116. Singh, R.D., et al., *Developmental exposure to endocrine disrupting chemicals and its impact on cardio-metabolic-renal health*. Frontiers in Toxicology, 2021. **3**: p. 663372.
117. Zhang, X., et al., *The relationship between typical environmental endocrine disruptors and kidney disease*. Toxics, 2022. **11**(1): p. 32.
118. Maradonna, F. and O. Carnevali, *Lipid metabolism alteration by endocrine disruptors in animal models: an overview*. Frontiers in endocrinology, 2018. **9**: p. 654.
119. Liang, X., et al., *Di-2-ethylhexyl phthalate disrupts hepatic lipid metabolism in obese mice by activating the LXR/SREBP-1c and PPAR-α signaling pathways*. Science of The Total Environment, 2024. **914**: p. 169919.
120. Linţa, A.V., et al., *Liver and pancreatic toxicity of endocrine-disruptive chemicals: focus on mitochondrial dysfunction and oxidative stress*. International journal of molecular sciences, 2024. **25**(13): p. 7420.
121. Casals-Casas, C. and B. Desvergne, *Endocrine disruptors: from endocrine to metabolic disruption*. Annual review of physiology, 2011. **73**(1): p. 135–162.
122. Ahn, C. and E.-B. Jeung, *Endocrine-disrupting chemicals and disease endpoints*. International journal of molecular sciences, 2023. **24**(6): p. 5342.

123. Sytar, O., et al., *Heavy metal-induced oxidative damage, defense reactions, and detoxification mechanisms in plants*. Acta physiologiae plantarum, 2013. **35**(4): p. 985–999.

124. Ji, L., et al., *Molecular mechanism of alternative P450-catalyzed metabolism of environmental phenolic endocrine-disrupting chemicals*. Environmental Science & Technology, 2018. **52**(7): p. 4422–4431.

125. Marroqui, L., et al., *Mitochondria as target of endocrine-disrupting chemicals: implications for type 2 diabetes*. Journal of Endocrinology, 2018. **239**(2): p. R27–R45.

126. Ning, B., et al., *Degradation of endocrine disrupting chemicals by ozone/AOPs*. Ozone: Science and Engineering, 2007. **29**(3): p. 153–176.

127. Le Maire, A., W. Bourguet, and P. Balaguer, *A structural view of nuclear hormone receptor: endocrine disruptor interactions*. Cellular and molecular life sciences, 2010. **67**(8): p. 1219–1237.

128. Kim, H.G., et al., *Estrogenic endocrine-disrupting chemicals modulate the production of inflammatory mediators and cell viability of lipopolysaccharide-stimulated macrophages*. Inflammation, 2015. **38**(2): p. 595–605.

129. Aguilar, T.A.F., B.C.H. Navarro, and J.A.M. Pérez, *Endogenous antioxidants: a review of their role in oxidative stress*. 2016: IntechOpen.

130. Quilaqueo, N. and J.V. Villegas, *Endocrine disruptor chemicals. A review of their effects on male reproduction and antioxidants as a strategy to counter it*. Andrologia, 2022. **54**(2): p. e14302.

131. Schwabe, R.F. and D.A. Brenner, *Mechanisms of liver injury. I. TNF-α-induced liver injury: role of IKK, JNK, and ROS pathways*. American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology, 2006. **290**(4): p. G583–G589.

132. Vidali, M., et al., *Interplay between oxidative stress and hepatic steatosis in the progression of chronic hepatitis C*. Journal of hepatology, 2008. **48**(3): p. 399–406.

133. Kovacic, P. and C. Edwards, *Integrated approach to the mechanisms of thyroid toxins: electron transfer, reactive oxygen species, oxidative stress, cell signaling, receptors, and antioxidants*. Journal of Receptors and Signal Transduction, 2010. **30**(3): p. 133–142.

134. Liu, Z., et al., *The associations between endocrine disrupting chemicals and marker of inflammation and immune responses: A systematic review and meta-analysis*. Ecotoxicology and Environmental Safety, 2022. **234**: p. 113382.
135. Sherwood, E.R. and T. Toliver-Kinsky, *Mechanisms of the inflammatory response*. Best practice & research Clinical anaesthesiology, 2004. **18**(3): p. 385–405.
136. Saltiel, A.R. and J.M. Olefsky, *Inflammatory mechanisms linking obesity and metabolic disease*. The Journal of clinical investigation, 2017. **127**(1): p. 1–4.
137. Lu, S., et al., *Gestational exposure to bisphenol AF causes endocrine disorder of corpus luteum by altering ovarian SIRT-1/Nrf2/NF-kB expressions and macrophage proangiogenic function in mice*. Biochemical Pharmacology, 2024. **220**: p. 115954.
138. Sevastre-Berghian, A.C., et al., *Neurotoxicity of bisphenol A and the impact of melatonin administration on oxidative stress, ERK/NF-kB signaling pathway, and behavior in rats*. Neurotoxicity Research, 2022. **40**(6): p. 1882–1894.
139. Nakamura, K. and H. Kariyazono, *Influence of endocrine-disrupting chemicals on the immune system*. Journal of Health Science, 2010. **56**(4): p. 361–373.
140. Bansal, A., J. Henao-Mejia, and R.A. Simmons, *Immune system: an emerging player in mediating effects of endocrine disruptors on metabolic health*. Endocrinology, 2018. **159**(1): p. 32–45.
141. Molinari, F., et al., *Environmental factors influence goat immune response to PFOS and glyphosate: Difference between grazing and stall-feeding*. Environmental Toxicology and Pharmacology, 2025. **117**: p. 104754.
142. Dixon, L.J., et al., *Kupffer cells in the liver*. Comprehensive Physiology, 2013. **3**(2): p. 785–797.
143. Ohnishi, T., et al., *Effects of possible endocrine disruptors on MyD88-independent TLR4 signaling*. FEMS Immunology & Medical Microbiology, 2008. **52**(2): p. 293–295.
144. Anders, H.-J., *Toll-like receptors and danger signaling in kidney injury*. Journal of the American Society of Nephrology, 2010. **21**(8): p. 1270–1274.
145. Yamashita, U., T. Sugiura, and E. Kuroda, *Effect of endocrine disrupters on immune responses in vitro*. Journal of UOEH, 2002. **24**(1): p. 1–10.

146. Dietert, R.R., *Misregulated inflammation as an outcome of early-life exposure to endocrine-disrupting chemicals*. Reviews on Environmental Health, 2012. **27**.

147. Alavian‐Ghavanini, A. and J. Rüegg, *Understanding epigenetic effects of endocrine disrupting chemicals: from mechanisms to novel test methods*. Basic & clinical pharmacology & toxicology, 2018. **122**(1): p. 38–45.

148. Sales, L.B., et al., *Effects of endocrine disrupting chemicals on in vitro global DNA methylation and adipocyte differentiation*. Toxicology in vitro, 2013. **27**(6): p. 1634–1643.

149. Lövkvist, C., et al., *DNA methylation in human epigenomes depends on local topology of CpG sites*. Nucleic acids research, 2016. **44**(11): p. 5123–5132.

150. Dykes, I.M. and C. Emanueli, *Transcriptional and post-transcriptional gene regulation by long non-coding RNA*. Genomics, proteomics & bioinformatics, 2017. **15**(3): p. 177–186.

151. Kirkley, A.G. and R.M. Sargis, *Environmental endocrine disruption of energy metabolism and cardiovascular risk*. Current diabetes reports, 2014. **14**(6): p. 494.

152. Ajoolabady, A., et al., *Epigenetic modification in alcohol‐related liver diseases*. Medicinal Research Reviews, 2022. **42**(4): p. 1463–1491.

153. Liu, Z., et al., *Epigenetic modification in diabetic kidney disease*. Frontiers in Endocrinology, 2023. **14**: p. 1133970.

154. Akanbi, C.A., et al., *Endocrine-disrupting chemicals (EDCs) and epigenetic regulation in embryonic development: Mechanisms, impacts, and emerging trends*. Toxicology Reports, 2025. **14**: p. 101885.

155. Kelley, N., et al., *The NLRP3 Inflammasome: An Overview of Mechanisms of Activation and Regulation*. Int J Mol Sci, 2019. **20**(13).

156. Paik, S., et al., *An update on the regulatory mechanisms of NLRP3 inflammasome activation*. Cellular & Molecular Immunology, 2021. **18**(5): p. 1141–1160.

157. Blevins, H.M., et al., *The NLRP3 Inflammasome Pathway: A Review of Mechanisms and Inhibitors for the Treatment of Inflammatory Diseases*. Front Aging Neurosci, 2022. **14**: p. 879021.

158. Yabal, M., et al., *Stressing out the mitochondria: Mechanistic insights into NLRP3 inflammasome activation*. Journal of leukocyte biology, 2019. **105**(2): p. 377–399.

159. Bauernfeind, F.G., et al., *Cutting edge: NF-kappaB activating pattern recognition and cytokine receptors license NLRP3 inflammasome activation by regulating NLRP3 expression*. J Immunol, 2009. **183**(2): p. 787–91.
160. Ferguson, K.K., R. Loch-Caruso, and J.D. Meeker, *Exploration of oxidative stress and inflammatory marker in relation to urinary phthalate metabolites: NHANES 1999-2006*. Environ Sci Technol, 2012. **46**(1): p. 477–85.
161. Prajapati, H. and R.J. Verma, *Dietil Ftalato Causes Oxidative Stress: An in Vitro Study*. Iranian Journal of Toxicology, 2014. **8**(24): p. 1011–1016.
162. Wei, S., et al., *NLRP3 Inflammasome: A Promising Therapeutic Target for Drug-Induced Toxicity*. Front Cell Dev Biol, 2021. **9**: p. 634607.
163. Wei, Y., et al., *Nephrotoxicity of Phthalates: A Review Based on Epidemiological and Toxicological Evidence*. Toxics, 2025. **13**(11).
164. Macherey, A.-C. and P.M. Dansette, *Biotransformations leading to toxic metabolites: chemical aspect*, in *The practice of medicinal chemistry*. 2008, Elsevier. p. 674–696.
165. Spry, L.A., et al., *Renal metabolic/excretory coupling*. American Journal of Physiology-Renal Physiology, 1988. **254**(1): p. F145–F152.
166. Blaschke, T.F. and P.C. Rubin, *Hepatic first-pass metabolism in liver disease*. Clinical pharmacokinetics, 1979. **4**(6): p. 423–432.
167. Skandalakis, J.E., et al., *Hepatic surgical anatomy*. Surgical Clinics, 2004. **84**(2): p. 413–435.
168. Arii, S. and M. Imamura, *Physiological role of sinusoidal endothelial cells and Kupffer cells and their implication in the pathogenesis of liver injury*. Journal of Hepato-Biliary-Pancreatic Surgery, 2000. **7**(1): p. 40–48.
169. Galetin, A. and J.B. Houston, *Intestinal and hepatic metabolic activity of five cytochrome P450 enzymes: impact on prediction of first-pass metabolism*. The Journal of pharmacology and experimental therapeutics, 2006. **318**(3): p. 1220–1229.
170. Veith, A. and B. Moorthy, *Role of cytochrome P450s in the generation and metabolism of reactive oxygen species*. Current opinion in toxicology, 2018. **7**: p. 44–51.

171. Iyer, K.R. and M.W. Sinz, *Characterization of Phase I and Phase II hepatic drug metabolism activities in a panel of human liver preparations*. Chemico-biological interactions, 1999. **118**(2): p. 151–169.
172. Janesick, A. and B. Blumberg, *Endocrine disrupting chemicals and the developmental programming of adipogenesis and obesity.* Birth Defects Research Part C: Embryo Today: Reviews, 2011. **93**(1): p. 34–50.
173. Derghal, A., et al., *An Emerging Role of micro-RNA in the Effect of the Endocrine Disruptors*. Frontiers in neuroscience, 2016. **10**: p. 318.
174. Preuss, H.G., *Basics of renal anatomy and physiology.* Clinics in laboratory medicine, 1993. **13**(1): p. 1–11.
175. Soltoff, S.P. and L.J. Mandel, *Active ion transport in the renal proximal tubule. I. Transport and metabolic studies*. The Journal of general physiology, 1984. **84**(4): p. 601–622.
176. He, K., et al., *Environmental endocrine disruptor-induced mitochondrial dysfunction: a potential mechanism underlying diabetes and its complications*. Frontiers in endocrinology, 2024. **15**: p. 1422752.
177. Ozbek, E., *Induction of oxidative stress in kidney.* International journal of nephrology, 2012. **2012**(1): p. 465897.
178. Terlouw, S.A., R. Masereeuw, and F.G. Russel, *Modulatory effects of hormones, drugs, and toxic events on renal organic anion transport*. Biochemical pharmacology, 2003. **65**(9): p. 1393–1405.
179. Gabrys, P., *The critical role of oxalate in the liver-kidney axis and its effect on glucose metabolism*. 2024, Dissertation, Dortmund, Technische Universität, 2024.
180. Lindamood, C., *Xenobiotic biotransformation*, in *Hepatotoxicology*. 2020, CRC Press. p. 139–180.
181. Barnett, L.M.A. and B.S. Cummings. *Cellular and molecular mechanisms of kidney toxicity*. in *Seminars in nephrology*. 2019. Elsevier.
182. Hagenbuch, B., *Drug uptake systems in liver and kidney: a historic perspective.* Clinical Pharmacology & Therapeutics, 2010. **87**(1): p. 39–47.
183. Dixon, J., et al., *Xenobiotic metabolism: the effect of acute kidney injury on non-renal drug clearance and hepatic drug metabolism*. International journal of molecular sciences, 2014. **15**(2): p. 2538–2553.

184. Matyas, C., et al., *Interplay of cardiovascular mediators, oxidative stress and inflammation in liver disease and its complications*. Nature Reviews Cardiology, 2021. **18**(2): p. 117–135.
185. Baud, L. and R. Ardaillou, *Reactive oxygen species: production and role in the kidney*. American Journal of Physiology-Renal Physiology, 1986. **251**(5): p. F765–F776.
186. Shahidehnia, M., *Epigenetic effects of endocrine disrupting chemicals*. J Environ Anal Toxicol, 2016. **6**(4): p. 381.
187. Bellanti, F., et al., *Redox imbalance in inflammation: the interplay of oxidative and reductive stress*. Antioxidants, 2025. **14**(6): p. 656.
188. Buhler, D.R. and D.E. Williams, *The role of biotransformation in the toxicity of chemicals*. Aquatic Toxicology, 1988. **11**(1-2): p. 19–28.
189. Pillon Barcelos, R., et al., *Oxidative stress and inflammation: liver responses and adaptations to acute and regular exercise*. Free radical research, 2017. **51**(2): p. 222–236.
190. Radke, E.G., et al., *Phthalate exposure and metabolic effects: a systematic review of the human epidemiological evidence*. Environment international, 2019. **132**: p. 104768.
191. Isaac, R.A.A., et al., *Human endocrine disruption: an updated review of toxicological insights into parabens and phthalates*. Toxicology and Environmental Health Sciences, 2025. **17**(3): p. 335–348.
192. Godwin, A.D., *24 - Plasticizers*, in *Applied Plastics Engineering Handbook (Second Edition)*, M. Kutz, Editor. 2017, William Andrew Publishing. p. 533–553.
193. Api, A., *Toxicological profile of Dietil Ftalato: a vehicle for fragrance and cosmetic ingredients*. Food and Chemical Toxicology, 2001. **39**(2): p. 97–108.
194. Poopal, R., et al., *Potential effects of low molecular weight phthalate esters (C16H22O4 and C12H14O4) on the freshwater fish Cyprinus carpio*. Toxicology research, 2017. **6**(4): p. 505–520.
195. Staples, C.A., et al., *The environmental fate of phthalate esters: a literature review*. Chemosphere, 1997. **35**(4): p. 667–749.

196. Daniels, P.H., *A brief overview of theories of PVC plasticization and methods used to evaluate PVC ‐ plasticizer interaction*. Journal of vinyl and additive technology, 2009. **15**(4): p. 219–223.
197. Kudzin, M.H., et al., *Risks associated with the presence of polyvinyl chloride in the environment and methods for its disposal and utilization*. Materials, 2023. **17**(1): p. 173.
198. Mathieu-Denoncourt, J., et al., *Influence of lipophilicity on the toxicity of bisphenol A and phthalates to aquatic organisms*. Bulletin of environmental contamination and toxicology, 2016. **97**(1): p. 4–10.
199. Jeong, S.-H., et al., *Toxicokinetic studies of di-isobutyl phthalate focusing on the exploration of gender differences in rats*. Chemosphere, 2022. **286**: p. 131706.
200. Kida, M. and P. Koszelnik, *Investigation of the presence and possible migration from microplastics of phthalic acid esters and polycyclic aromatic hydrocarbons*. Journal of Polymers and the Environment, 2021. **29**(2): p. 599–611.
201. Tumu, K., K. Vorst, and G. Curtzwiler, *Endocrine modulating chemicals in food packaging: A review of phthalates and bisphenols*. Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety, 2023. **22**(2): p. 1337–1359.
202. Ugoeze, K., et al., *Environmental and public health impacts of plastic wastes due to healthcare and food products packages: A Review*. Journal of Environmental Science and Public Health, 2021. **5**(1): p. 1–31.
203. Koo, H.J. and B.M. Lee, *Estimated exposure to phthalates in cosmetics and risk assessment*. Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A, 2004. **67**(23-24): p. 1901–1914.
204. Zhou, X., et al., *The gas/particle partitioning behavior of phthalate esters in indoor environment: Effects of temperature and humidity*. Environmental research, 2021. **194**: p. 110681.
205. Gani, K.M. and A.A. Kazmi, *Phthalate contamination in aquatic environment: A critical review of the process factors that influence their removal in conventional and advanced wastewater treatment*. Critical Reviews in Environmental Science and Technology, 2016. **46**(17): p. 1402–1439.

206. Xu, W., et al., *Dibutyl phthalate alters the metabolic pathways of microbes in black soils*. Scientific Reports, 2018. **8**(1): p. 2605.
207. Rahman, S.U., et al., *Pb uptake, accumulation, and translocation in plants: Plant physiological, biochemical, and molecular response: A review*. Heliyon, 2024. **10**(6).
208. Pullagurala, V.L.R., et al., *Plant uptake and translocation of contaminants of emerging concern in soil*. Science of the Total Environment, 2018. **636**: p. 1585–1596.
209. Zhang, C., F. Yao, and H.-q. CHANG, *Uptake and translocation of organic pollutants in plants: A review*. Journal of integrative agriculture, 2017. **16**(8): p. 1659–1668.
210. Latini, G., *Monitoring phthalate exposure in humans*. Clinica chimica acta, 2005. **361**(1-2): p. 20–29.
211. Sun, J., X. Wu, and J. Gan, *Uptake and metabolism of phthalate esters by edible plants*. Environmental Science & Technology, 2015. **49**(14): p. 8471–8478.
212. Dang, H., et al., *Long-term inhalation exposure: a model for phthalate accumulation in the respiratory tract*. Ecotoxicology and Environmental Safety, 2024. **286**: p. 117207.
213. Hu, M., et al., *Physiologically-based toxicokinetic modeling of human dermal exposure to Dietil Ftalato: Application to health risk assessment*. Chemosphere, 2022. **307**: p. 135931.
214. Qadeer, A., et al., *Global environmental and toxicological data of emerging plasticizers: current knowledge, regrettable substitution dilemma, green solution and future perspectives*. Green Chemistry, 2024. **26**(10): p. 5635–5683.
215. Zhang, H., et al., *Accumulation and transport of phthalic acid esters in the soil-plant system of agricultural fields with different years of film mulching*. Sustainability, 2023. **15**(21): p. 15589.
216. Li, Y., et al., *Assessing the risk of phthalate ester (PAE) contamination in soils and crops irrigated with treated sewage effluent*. Water, 2018. **10**(8): p. 999.
217. Niu, L., et al., *Status of phthalate esters contamination in agricultural soils across China and associated health risks*. Environmental pollution, 2014. **195**: p. 16–23.

218. Ramanayaka, S., et al., *Role of soil organic matter on the retention and mobility of common plastic additives, Di (2-ethylhexyl) phthalate, bisphenol A and benzophenone, in soil*. Environmental Research, 2023. **236**: p. 116725.
219. Cheng, Z., et al., *Insights into mechanisms involved in the uptake, translocation, and metabolism of phthalate esters in Chinese cabbage (Brassica rapa var. chinensis)*. Science of the Total Environment, 2021. **768**: p. 144945.
220. Shen, G.-M., Z.-W. Chen, and Y.-L. Wang, *Distribution of di-(2-ethylhexyl) phthalate in leaf cuticular waxes and leaf tissues of plants*. Acta Physiologiae Plantarum, 2022. **44**(2): p. 18.
221. Pacyga, D.C., S. Sathyanarayana, and R.S. Strakovsky, *Dietary predictors of phthalate and bisphenol exposures in pregnant women*. Advances in Nutrition, 2019. **10**(5): p. 803–815.
222. Gao, M., et al., *Responses of bacterial communities in wheat rhizospheres in different soils to di-n-butyl and di (2-ethylhexyl) phthalate contamination*. Geoderma, 2020. **362**: p. 114126.
223. Kumari, A., et al., *Assessment of toxicological effects of di-n-butyl phthalate to a cereal crop (Hordeum vulgare L.)*. Journal of Advanced Agricultural Technologies Vol, 2019. **6**(1).
224. Kumari, A. and R. Kaur, *A review on morpho-physiological traits of plants under phthalates stress and insights into their uptake and translocation*. Plant Growth Regulation, 2020. **91**(3): p. 327–347.
225. Wang, Y., et al., *Identifying the contributions of root and foliage gaseous/particle uptakes to indoor plants for phthalates, OPFRs and PAHs*. Science of The Total Environment, 2023. **883**: p. 163644.
226. Wang, X., et al., *Atmospheric phthalate pollution in plastic agricultural greenhouses in Shaanxi Province, China*. Environmental Pollution, 2021. **269**: p. 116096.
227. Zeng, L.-J., et al., *Prevalent phthalates in air-soil-vegetable systems of plastic greenhouses in a subtropical city and health risk assessments*. Science of the Total Environment, 2020. **743**: p. 140755.
228. Serrano, S.E., et al., *Phthalates and diet: a review of the food monitoring and epidemiology data*. Environmental Health, 2014. **13**(1): p. 43.

229. Domínguez-Romero, E. and M. Scheringer, *A review of phthalate pharmacokinetics in human and rat: what factors drive phthalate distribution and partitioning?* Drug metabolism reviews, 2019. **51**(3): p. 314–329.

230. Varshavsky, J.R., et al., *Dietary sources of cumulative phthalates exposure among the US general population in NHANES 2005–2014*. Environment international, 2018. **115**: p. 417–429.

231. Yen, T.-H., D.-T. Lin-Tan, and J.-L. Lin, *Food safety involving ingestion of foods and beverages prepared with phthalate-plasticizer-containing clouding agents*. Journal of the Formosan Medical Association, 2011. **110**(11): p. 671–684.

232. Kim, Y.M., S. Harrad, and R.M. Harrison, *Levels and sources of personal inhalation exposure to volatile organic compounds*. Environmental science & technology, 2002. **36**(24): p. 5405–5410.

233. Carstens, L., et al., *Biotransformation of phthalate plasticizers and bisphenol A by marine-derived, freshwater, and terrestrial fungi*. Frontiers in Microbiology, 2020. **11**: p. 317.

234. Barr, D.B., et al., *Assessing human exposure to phthalates using monoesters and their oxidized metabolites as biomarker*. Environmental health perspectives, 2003. **111**(9): p. 1148.

235. Xing, H., et al., *Interaction between phthalate ester and rice plants: novel transformation pathways and metabolic-network perturbations*. Environmental Science & Technology, 2023. **57**(24): p. 8870–8882.

236. Li, G., et al., *Integrated metabolomics and transcriptomics reveal di (2-ethylhexyl) phthalate-induced mitochondrial dysfunction and glucose metabolism disorder through oxidative stress in rat liver*. Ecotoxicology and environmental safety, 2021. **228**: p. 112988.

237. Seth, P.K., *Hepatic effects of phthalate esters*. Environmental Health Perspectives, 1982. **45**: p. 27.

238. Zhou, S., et al., *Drug bioactivation covalent binding to target proteins and toxicity relevance*. Drug metabolism reviews, 2005. **37**(1): p. 41–213.

239. Suchy-Dicey, A.M., et al., *Tubular secretion in CKD*. Journal of the American Society of Nephrology, 2016. **27**(7): p. 2148–2155.

240. Fontecha-Barriuso, M., et al., *Tubular mitochondrial dysfunction, oxidative stress, and progression of chronic kidney disease*. Antioxidants, 2022. **11**(7): p. 1356.
241. Mankidy, R., et al., *Biological impact of phthalates*. Toxicology letters, 2013. **217**(1): p. 50–58.
242. Liu, B., et al., *Comparison of phthalate esters (PAEs) in freshwater and marine food webs: Occurrence, bioaccumulation, and trophodynamics*. Journal of hazardous materials, 2024. **466**: p. 133534.
243. Merida, D.M., et al., *Phthalate exposure and the metabolic syndrome: A systematic review and meta-analysis*. Environmental Pollution, 2023. **333**: p. 121957.
244. Sanderson, J.T., *The steroid hormone biosynthesis pathway as a target for endocrine-disrupting chemicals*. Toxicological sciences, 2006. **94**(1): p. 3–21.
245. Begum, T.F. and D. Carpenter, *Health effects associated with phthalate activity on nuclear receptors*. Reviews on Environmental Health, 2022. **37**(4): p. 567–583.
246. Hernandez, J., L. Mota, and W. Baldwin, *Activation of CAR and PXR by dietary, environmental and occupational chemicals alters drug metabolism, intermediary metabolism, and cell proliferation*. Current pharmacogenomics and personalized medicine, 2009. **7**(2): p. 81–105.
247. Song, P., et al., *Phthalate induced oxidative stress and DNA damage in earthworms (Eisenia fetida)*. Environment international, 2019. **129**: p. 10–17.
248. Liu, Y., G. Fiskum, and D. Schubert, *Generation of reactive oxygen species by the mitochondrial electron transport chain*. Journal of neurochemistry, 2002. **80**(5): p. 780–787.
249. Ding, W.-J., et al., *Di (2-ethylhexyl) phthalate mediates oxidative stress and activates p38MAPK/NF-kB to exacerbate diabetes-induced kidney injury in vitro and in vivo models*. Toxicology research, 2023. **12**(2): p. 332–343.
250. Singh, S. and S.S.-L. Li, *Epigenetic effects of environmental chemicals bisphenol A and phthalates*. International journal of molecular sciences, 2012. **13**(8): p. 10143–10153.
251. Barse, A., et al., *Endocrine disruption and metabolic changes following exposure of Cyprinus carpio to Dietil Ftalato*. Pesticide biochemistry and physiology, 2007. **88**(1): p. 36–42.

252. Lovekamp-Swan, T. and B.J. Davis, *Mechanisms of phthalate ester toxicity in the female reproductive system*. Environmental health perspectives, 2003. **111**(2): p. 139.

253. Li, L., et al., *DEHP and DBP, common phthalates, induce glucose metabolism disorders in rats via oxidative damage of PI3K/Akt/GLUT4 signaling*. Environmental Pollution, 2024. **341**: p. 122948.

254. Xu, P., et al., *Mitochondrial dysfunction mediated by thioredoxin-interacting protein: A crucial determinant in di (2-ethylhexyl) phthalate-induced liver failure*. Ecotoxicology and Environmental Safety, 2024. **272**: p. 116103.

255. Huang, S.-T., et al., *Phthalate exposure increases oxidative stress, early renal injury, and the risk of calcium urolithiasis: A case-control study*. Ecotoxicology and environmental safety, 2024. **287**: p. 117322.

256. Hansen, J.F., et al., *Influence of phthalates on cytokine production in monocytes and macrophages: a systematic review of experimental trials*. PloS one, 2015. **10**(3): p. e0120083.

257. Lucaccioni, L., et al., *Perinatal exposure to phthalates: from endocrine to neurodevelopment effects*. International journal of molecular sciences, 2021. **22**(8): p. 4063.

258. Watkins, D.J., et al., *Phthalate and bisphenol A exposure during in utero windows of susceptibility in relation to reproductive hormones and pubertal development in girls*. Environmental research, 2017. **159**: p. 143–151.

259. Wittassek, M. and J. Angerer, *Phthalates: metabolism and exposure*. International journal of andrology, 2008. **31**(2): p. 131–138.

260. Overgaard, L.E., et al., *Children with atopic dermatitis and frequent emollient use have increased urinary levels of low‐molecular‐weight phthalate metabolites and parabens*. Allergy, 2017. **72**(11): p. 1768–1777.

261. Net, S., et al., *Occurrence, fate, behavior and ecotoxicological state of phthalates in different environmental matrices*. Environmental science & technology, 2015. **49**(7): p. 4019–4035.

262. Daniel, J., *Toxicity and metabolism of phthalate esters*. Clinical Toxicology, 1978. **13**(2): p. 257–268.

263. Sohn, J., et al., *Alteration of sex hormone levels and steroidogenic pathway by several low molecular weight phthalates and their metabolites in male zebrafish (Danio rerio) and/or human adrenal cell (H295R) line*. Journal of hazardous materials, 2016. **320**: p. 45–54.

264. Jeong, S.-H., et al., *Simultaneous determination of Dietil Ftalato and its major metabolite, monoethyl phthalate, in rat plasma, urine, and various tissues collected from a toxicokinetic study by ultrahigh performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry*. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 2019. **173**: p. 108–119.

265. Salazar-Beltrán, D., et al., *Determination of phthalate acid esters plasticizers in polyethylene terephthalate bottles and its correlation with some physicochemical properties*. Polymer Testing, 2018. **68**: p. 87–94.

266. Jeong, S.-H., et al., *Risk assessment for humans using physiologically based pharmacokinetic model of Dietil Ftalato and its major metabolite, monoethyl phthalate*. Archives of Toxicology, 2020. **94**(7): p. 2377–2400.

267. Gu, J.-D. and Y. Wang, *Microbial transformation of phthalate esters: diversity of hydrolytic esterases*. Environmental Contamination-Health Risks, Bioavailability and Bioremediation. CRC Press, Boca Raton, Florida, 2013: p. 313–345.

268. Silva, M.J., et al., *Oxidative metabolites of diisononyl phthalate as biomarker for human exposure assessment*. Environmental health perspectives, 2006. **114**(8): p. 1158.

269. Kaiser, L., et al., *Lineage-selective disturbance of early human hematopoietic progenitor cell differentiation by the commonly used plasticizer Di-2-ethylhexyl phthalate via reactive oxygen species: fatty acid oxidation makes the difference*. Cells, 2021. **10**(10): p. 2703.

270. Nishioka, J., et al., *Di-(2-ethylhexyl) phthalate induces production of inflammatory molecules in human macrophages*. Inflammation Research, 2012. **61**(1): p. 69–78.

271. Gao, H.-T., et al., *Effects of six priority controlled phthalate esters with long-term low-dose integrated exposure on male reproductive toxicity in rats*. Food and Chemical Toxicology, 2017. **101**: p. 94–104.

272. Eveillard, A., et al., *Identification of potential mechanisms of toxicity after di-(2-ethylhexyl)-phthalate (DEHP) adult exposure in the liver using a systems biology approach*. Toxicology and applied pharmacology, 2009. **236**(3): p. 282–292.

273. Di Paola, R., et al., *S-Acetyl-Glutathione Attenuates Carbon Tetrachloride-Induced Liver Injury by Modulating Oxidative Imbalance and Inflammation*. International Journal of Molecular Sciences, 2022. **23**(8): p. 4429.