

Abstract

Organochlorine pesticides affect cellular metabolism with effects on the onset of various metabolic diseases. Mitochondria are the main organelle involved in reactive oxygen species (ROS) production and could be involved in the adaptive response of tissular/organ to stress induced by environmental pollutants. In the present PhD thesis, it was evaluated the effects of dichlorodiphenylethylene (DDE) on the biochemical pathways involved in the onset of toxicant-associated steatohepatitis (TASH), and in the alteration of energy metabolism and thermogenesis in brown adipose tissue (BAT) in an *in vivo* experimental animal model. It was also evaluated the influence that a dietary antioxidant compound, such as hydroxytyrosol (Hty), may play against the damage induced by DDE in an *in vitro* hepatic cell model. The aim of this PhD thesis was therefore to evaluate the effects of DDE on cellular metabolism both *in vivo* and *in vitro* and of Hty *in vitro* on cellular metabolism. To this end, two experimental designs were used: 1) a first experimental design was conducted on an *in vivo* experimental model represented by male Wistar rats, treated with DDE for 4 weeks, to analyze the effects of DDE on cellular metabolism, with particular attention to mitochondrial function and oxidative stress in liver and BAT. . DDE effects on mitochondrial function and apoptosis markers were also assessed in other tissues, such as cardiac and skeletal muscle, to have a more general analysis on DDE effect on different tissues and 2) a second experimental design was conducted on an *in vitro* cell model, represented by liver cancer cells (Hepg2), to evaluate the protective effects of the antioxidant compound Hty, a polyphenol of olive oil, on DDE induced oxidative stress and cell damage.

The main results of the first experimental design confirmed that chronic exposure to DDE induced liver damage as well as alterations in BAT energy metabolism. Indeed, a reduction in mitochondrial function, namely cytochrome oxidase activity (COX), and in uncoupling protein 1 (UCP1) content was observed in total BAT homogenates associated with a decrease in the marker of mitochondrial biogenesis. However, COX specific activity and UCP1 content were increased in isolated BAT mitochondria, suggesting an adaptive response to counteract the impaired mitochondrial biogenesis in total tissue. These findings were associated with an increase in oxidative stress with a stimulation of the mitochondrial SOD2 antioxidant activity. As for hepatic tissue, chronic exposure to DDE induced an increase in ROS levels and SOD2 antioxidant system in both total liver homogenates and isolated mitochondria associated with the decrease in homogenate COX activity and the increase in caspase 3 activity, suggesting a cellular damage induced by mitochondrial dysfunction and ROS production. These finding suggested a key role of oxidative stress and antioxidant defense in response to DDE exposure in different tissues. Moreover, DDE induced impaired mitochondrial activity and apoptosis induction in skeletal muscle but increased mitochondrial activity and decreased in apoptosis induction in cardiac muscle, suggesting a different adaptive response to chronic DDE exposure in different tissues.

Taking into account DDE induced oxidative stress in liver , in the second experimental design the effects of the dietary antioxidant compound Hty were analyzed *in vitro* in liver cells treated with DDE. Cellular viability and morphology, apoptotic marker, lipid peroxidation and antioxidant systems (superoxide dismutase (SOD), Catalase (CAT), and glutathione peroxidase (GPX) activities) were analysed in DDE-treated, Hty- treated or DDE+Hty treated cells. The results showed that DDE impairs hepatic cell viability through oxidative stress

induction without adequate stimulation of antioxidant defense, mainly with high pesticide dose. Noteworthy, the simultaneous exposure to DDE and Hty, counteracts DDE induced cell damage by improving antioxidant defense. In conclusion, the results of the present PhD thesis showed the key role of mitochondrial function and oxidative stress in DDE effects on tissue metabolism *in vivo*, and highlighted the possible role of extra virgin olive oil (EVOO) polyphenols in maintaining liver cell health under conditions of exposure to environmental pollutants *in vitro* providing the basis for further mechanistic studies on this important field of research.

Abstract

I pesticidi organoclorurati agiscono sul metabolismo cellulare con effetti sull'insorgenza di diverse malattie dismetaboliche. I mitocondri sono i principali organuli cellulari coinvolti nella produzione di specie reattive dell'ossigeno (ROS) e potrebbero essere coinvolti nella risposta adattativa dei tessuti/organi allo stress indotto da inquinanti ambientali. Nella presente tesi di dottorato, sono stati valutati gli effetti del diclorodifeniletilene (DDE) sulle vie biochimiche coinvolte nell'insorgenza della steatoepatite indotta da agenti tossici (TASH), e nell'alterazione del metabolismo energetico e della termogenesi nel tessuto adiposo bruno (BAT) in un modello animale sperimentale *in vivo*. È stata inoltre valutata l'influenza che un composto antiossidante alimentare, come l'idrossitirosolo (Hty), può esercitare contro il danno indotto dal DDE in un modello di cellule epatiche *in vitro*. Lo scopo di questa tesi di dottorato è stato quindi quello di valutare gli effetti del DDE sul metabolismo cellulare sia *in vivo* che *in vitro* e dell'Hty sul metabolismo cellulare *in vitro* con contemporanea esposizione al DDE. A tal fine sono stati utilizzati due disegni sperimentali: 1) un primo disegno sperimentale è stato condotto su un modello sperimentale *in vivo* rappresentato da ratti Wistar maschi, trattati con DDE per 4 settimane, per analizzare gli effetti del DDE sul metabolismo cellulare, con particolare attenzione alla funzione mitocondriale e allo stress ossidativo nel fegato e nel BAT. Inoltre sono stati anche analizzati gli effetti del DDE in altri tessuti, quali il muscolo scheletrico e cardiaco, per avere quadro più generale degli effetti del DDE in differenti tessuti e 2) un secondo disegno sperimentale è stato condotto su un modello cellulare *in vitro*, rappresentato da cellule tumorali del fegato (Hepg2), per valutare gli effetti protettivi del composto antiossidante Hty, un polifenolo dell'olio d'oliva, sullo stress ossidativo e sul danno cellulare indotto da DDE. I principali risultati del primo disegno sperimentale hanno confermato che l'esposizione cronica al DDE induce danni al fegato e alterazioni al metabolismo energetico del BAT. Infatti, negli omogenati totali di BAT è stata osservata una riduzione della funzione mitocondriale, in particolare dell'attività della citocromo ossidasi (COX), e del contenuto della proteina disaccoppiante 1 (UCP1), associata a una diminuzione del marcatore della biogenesi mitocondriale. Tuttavia, l'attività specifica della COX e il contenuto di UCP1 sono aumentati nei mitocondri isolati dal BAT, suggerendo una risposta adattativa per contrastare la biogenesi mitocondriale compromessa nel tessuto totale. Questi risultati sono stati associati ad un aumento dello stress ossidativo con una stimolazione dell'attività antiossidante della SOD2 mitocondriale. Per quanto riguarda il tessuto epatico, l'esposizione cronica al DDE ha indotto un aumento dei livelli di ROS e del sistema antiossidante SOD2 sia negli omogenati epatici totali che nei mitocondri isolati, associato alla diminuzione dell'attività della COX dell'omogenato e all'aumento dell'attività della caspasi 3, suggerendo un danno cellulare indotto dal disfunzione mitocondriale e dalla produzione di ROS. Questi risultati hanno suggerito un ruolo chiave dello stress ossidativo e della difesa antiossidante in risposta all'esposizione al DDE in diversi tessuti. Inoltre, il DDE ha indotto un danno dell'attività mitocondriale ed una induzione dell'apoptosi anche nel muscolo scheletrico, mentre invece ha indotto un aumento dell'attività mitocondriale ed una minore induzione dell'apoptosi nel muscolo cardiaco, suggerendo una differente risposta adattativa dei differenti tessuti all'esposizione cronica al DDE. Tenendo conto di tali risultati, nel secondo disegno sperimentale sono stati analizzati gli effetti del composto antiossidante alimentare Hty *in vitro* in cellule epatiche trattate con DDE. La vitalità e la morfologia cellulare, marker apoptotici, perossidazione lipidica e i sistemi antiossidanti (attività di superossido dismutasi (SOD), catalasi (CAT) e glutatione perossidasi

(GPX)) sono stati analizzati in cellule trattate con DDE, Hty o DDE+Hty. I risultati hanno mostrato che il DDE compromette la vitalità delle cellule epatiche attraverso l'induzione dello stress ossidativo senza un'adeguata stimolazione della difesa antiossidante, principalmente con alte dosi del pesticida. D'altra parte l'esposizione simultanea a DDE e Hty, contrasta il danno cellulare indotto da DDE migliorando la difesa antiossidante.

In conclusione, i risultati della presente tesi di dottorato hanno mostrato il ruolo chiave della funzione mitocondriale e dello stress ossidativo negli effetti del DDE sul metabolismo tissutale in vivo e hanno evidenziato il possibile ruolo dei polifenoli presenti nell'olio di oliva, quali l'Hty, nel mantenimento della salute delle cellule epatiche in condizioni di esposizione a inquinanti ambientali in vitro fornendo la base per ulteriori studi meccanicistici su questo importante campo di ricerca.