



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI MESSINA

DIPARTIMENTO DI SCIENZE CHIMICHE, BIOLOGICHE,
FARMACEUTICHE ED AMBIENTALI

CORSO DI DOTTORATO DI RICERCA IN BIOLOGIA APPLICATA E MEDICINA
SPERIMENTALE – XXXVII CICLO
SSD BIOS-11/A (ex BIO/14)

Antimonio e rischi per la salute umana: studio *in vitro* su adipociti e cellule epiteliali intestinali

Tesi di Dottorato di:
Dott.ssa Federica Lina Salamone

Federica Lina Salamone

Tutor:
Chiar.mo Prof. Antonio Speciale

Antonio Speciale

Coordinatore del corso di Dottorato:
Chiar.ma Prof.ssa Emanuela Esposito

Anno Accademico 2023/2024

Indice

<i>Abstract</i>	pag. 1
PARTE COMPILATIVA	pag. 3
1. Effetti tossici dei metalli pesanti sull'epitelio intestinale e sul tessuto adiposo	pag. 4
1.1 Introduzione	pag. 5
1.2 Effetti tossici dei metalli pesanti a livello intestinale	pag. 7
1.2.1 Morfologia e funzioni dell'epitelio intestinale	pag. 7
1.2.2 Ruolo dei metalli pesanti nel danno all'epitelio intestinale	pag. 9
1.2.2a <i>Arsenico</i>	pag. 9
1.2.2b <i>Piombo</i>	pag. 11
1.2.2c <i>Cadmio</i>	pag. 12
1.2.2d <i>Mercurio</i>	pag. 12
1.3 Effetti tossici dei metalli pesanti sul tessuto adiposo	pag. 14
1.3.1 Il tessuto adiposo e la patogenesi dell'obesità	pag. 15
1.3.2 Ruolo dei metalli pesanti nella disfunzione del tessuto adiposo	pag. 17
1.3.2a <i>Arsenico</i>	pag. 17
1.3.2b <i>Piombo</i>	pag. 18
1.3.2c <i>Cadmio</i>	pag. 19
1.3.2d <i>Mercurio</i>	pag. 20
2. Antimonio: diffusione nell'ambiente, esposizione, tossicocinetica e tossicodinamica	pag. 23
2.1 Introduzione	pag. 24
2.2 Caratteristiche chimiche dell'antimonio	pag. 24
2.3 Usi e applicazioni	pag. 25
2.3.1 Ritardante di fiamma nelle plastiche	pag. 26
2.3.2 Impiego nelle batterie al piombo	pag. 27
2.3.3 Impiego nell'industria del PET	pag. 27
2.3.4 Uso farmaceutico	pag. 28
2.4 Contaminazione ambientale da antimonio	pag. 28
2.4.1 Acque superficiali	pag. 29

2.4.2	<i>Acque sotterranee</i>	pag. 29
2.4.3	<i>Acque marine</i>	pag. 30
2.4.4	<i>Antimonio nel suolo</i>	pag. 30
2.4.5	<i>Antimonio nell'atmosfera</i>	pag. 31
2.5	Modalità di esposizione all'antimonio	pag. 32
2.5.1	<i>Esposizione correlata al consumo di cibo</i>	pag. 33
2.5.2	<i>Esposizione correlata al consumo di acqua</i>	pag. 34
2.5.3	<i>Inalazione ed esposizione cutanea da oggetti domestici</i>	pag. 36
2.6	Tossicocinetica	pag. 37
2.6.1	<i>Assorbimento</i>	pag. 37
2.6.2	<i>Distribuzione</i>	pag. 39
2.6.3	<i>Metabolismo</i>	pag. 40
2.6.4	<i>Eliminazione</i>	pag. 40
2.7	Tossicodinamica ed effetti sull'uomo	pag. 41
2.7.1	<i>Interazione dell'antimonio con le biomolecole</i>	pag. 41
2.7.1a	<i>Interazione con gli acidi nucleici</i>	pag. 41
2.7.1b	<i>Interazione con le proteine</i>	pag. 42
2.7.1c	<i>Interazione con gli zuccheri</i>	pag. 43
2.7.1d	<i>Interazione con i lipidi</i>	pag. 43
2.7.1e	<i>Interazione con gli ormoni</i>	pag. 43
2.7.2	<i>Effetti tossici sull'organismo umano</i>	pag. 44
2.7.2a	<i>Effetti sull'apparato respiratorio</i>	pag. 44
2.7.2b	<i>Effetti sul sistema cardiovascolare</i>	pag. 45
2.7.2c	<i>Effetti sulla cavità orale</i>	pag. 45
2.7.2d	<i>Effetti sul tratto gastrointestinale</i>	pag. 45
2.7.2e	<i>Effetti sulla cute</i>	pag. 46
2.7.2f	<i>Cancerogenicità e genotossicità</i>	pag. 46
2.7.2g	<i>Effetti sulla riproduzione e sullo sviluppo</i>	pag. 47
2.8	Limiti e regolamentazione	pag. 48
2.8.1	<i>Limiti per l'antimonio nell'acqua potabile</i>	pag. 48
2.8.1a	<i>World Health Organization (WHO)</i>	pag. 48
2.8.1b	<i>United States Environmental Protection Agency (USEPA)</i>	pag. 48
2.8.2	<i>Limiti per l'antimonio come sostanza a contatto con gli alimenti</i>	pag. 49

2.8.2a	<i>United States Food and Drug Administration (FDA)</i>	pag. 49
2.8.2b	<i>Unione Europea (EU)</i>	pag. 49
2.8.2c	<i>Altre normative</i>	pag. 49
	PARTE SPERIMENTALE	pag. 51
3.1	Introduzione	pag. 52
3.2	Materiali	pag. 55
3.3	Colture cellulari e trattamenti	pag. 55
3.3.1	<i>Modello per la valutazione degli effetti dell'antimonio su adipociti murini 3T3-L1</i>	pag. 55
3.3.2	<i>Modello per la valutazione degli effetti dell'antimonio su cellule epiteliali intestinali Caco-2</i>	pag. 58
3.4	Metodi	pag. 61
3.4.1	<i>Saggio di citotossicità</i>	pag. 61
3.4.2	<i>Colorazione degli adipociti 3T3-L1 con Oil Red O</i>	pag. 61
3.4.3	<i>Misurazione delle specie reattive dell'ossigeno (ROS)</i>	pag. 62
3.4.4	<i>Analisi del processo di espansione mitotica clonale (MCE) in adipociti 3T3-L1</i>	pag. 62
3.4.5	<i>Estrazione delle proteine nucleari e citoplasmatiche</i>	pag. 63
3.4.6	<i>Determinazione del contenuto proteico</i>	pag. 64
3.4.7	<i>Immunoblotting</i>	pag. 64
3.4.8	<i>Valutazione dell'espressione genica</i>	pag. 66
3.4.8a	<i>Estrazione dell'RNA</i>	pag. 66
3.4.8b	<i>Quantificazione dell'RNA</i>	pag. 66
3.4.8c	<i>Sintesi del cDNA</i>	pag. 67
3.4.8d	<i>Real Time PCR</i>	pag. 67
3.4.8e	<i>Elaborazione post-analisi</i>	pag. 71
3.4.9	<i>Analisi statistica</i>	pag. 71
4.	Risultati	pag. 72
4.1	Effetti dell'antimonio su adipociti murini 3T3-L1	pag. 72
4.1.1	<i>Citotossicità dell'antimonio sui pre-adipociti 3T3-L1</i>	pag. 72
4.1.2	<i>Effetti dell'antimonio sui meccanismi molecolari che regolano l'adipogenesi</i>	pag. 73
4.1.3	<i>Effetti dell'antimonio sul processo di espansione mitotica clonale (MCE)</i>	pag. 78

4.1.4	<i>Effetti dell'ICI sulla differenziazione degli adipociti indotta dall'antimonio</i>	pag. 81
4.1.5	<i>Effetti dell'antimonio sull'omeostasi del reticolo endoplasmatico in adipociti murini</i>	pag. 83
4.1.6	<i>Attivazione del pathway infiammatorio di NF-κB in adipociti murini</i>	pag. 86
4.2	Effetti dell'antimonio su cellule epiteliali intestinali Caco-2	pag. 90
4.2.1	<i>Introduzione</i>	pag. 90
4.2.2	<i>Citotossicità dell'antimonio su cellule epiteliali intestinali Caco-2</i>	pag. 91
4.2.3	<i>Attivazione del pathway infiammatorio di NF-κB a livello dell'epitelio intestinale</i>	pag. 93
4.2.4	<i>Attivazione di vie di segnale pro-apoptotiche a livello dell'epitelio intestinale</i>	pag. 95
4.2.5	<i>Effetti dell'antimonio sullo stato redox cellulare</i>	pag. 97
4.2.6	<i>Effetti dell'antimonio sulla funzionalità del RE nell'epitelio intestinale</i>	pag. 98
4.2.7	<i>Conferma del ruolo centrale dello stress del RE nella tossicità dell'antimonio</i>	pag. 103
4.2.8	<i>Effetti protettivi della cianidina-3-O-glucoside nei confronti degli effetti tossici indotti dall'antimonio</i>	pag. 106
5.	Conclusioni	pag. 111
	BIBLIOGRAFIA	pag. 113

Abstract

Heavy metals are largely spread in the environment as a consequence of modern industrialisation. They can cause different chronic toxic effects, such as gastrointestinal and renal dysfunction, nervous system disorders, skin lesions, vascular damage, alterations to the immune system, congenital defects and cancer. In particular, antimony (Sb), a metalloid widely employed in industrial activities, especially as a catalyst in the manufacturing of polyethylene terephthalate (PET), a material largely used for food packaging, water bottles, toys and other household items, has attracted considerable interest in recent years. Humans are potentially exposed to Sb through oral, cutaneous, and inhalation routes. Trivalent Sb [Sb(III)] is the most toxic form in human tissues. Once absorbed into cells, Sb compounds can interact with different molecules, disrupting normal biochemical functions. Of particular concern is that, if subjected to stress conditions, like prolonged storage or exposure to high temperatures, Sb can migrate from the plastic materials into food or beverage in contact with, leading to important health concerns.

In the present study, the effects of very low nanomolar concentrations of Sb(III) were evaluated in 3T3-L1 murine adipocytes and in Caco-2 human epithelial cells during the whole cell differentiation period, mimicking chronic human exposure. Exposure of 3T3-L1 adipocytes to Sb(III) induced lipid accumulation and induction of the master regulators of adipogenesis (C/EBP- β and PPAR- γ), demonstrating the obesogenic activity of this metal. Furthermore, Sb(III) promoted pre-adipocytes proliferation, increasing cells in G2/M phase of the cell cycle while reducing those in G0/G1 phase; this event is also correlated to reduced levels of the cell-cycle inhibitor p21. Moreover, this study demonstrates that Sb(III) can modulate the adipogenesis process through the interaction with the estrogen receptor, since Sb-induced PPAR- γ was reversed by the estrogen receptor antagonist ICI 182,780. Furthermore, Sb(III) exposure activated the pro-inflammatory NF- κ B pathway and disrupted endoplasmic reticulum (ER) homeostasis by increasing reactive oxygen species (ROS) production and upregulating UPR (unfolded protein response) markers, such as XBP-1s, p-eIF2 α , GRP78, and CHOP.

On the other hand, Sb(III) exposure during cell differentiation affected intestinal epithelial barrier in the Caco-2 cells model, activating the pro-inflammatory NF- κ B signaling pathway and apoptotic cell death, with modulation of Bcl-2, Bax and Caspase-3 protein levels. As in adipocytes, also in intestinal epithelial cells Sb(III)

induced oxidative stress, by inducing an increase in intracellular ROS levels, and ER stress, as shown by main UPR markers levels. Additionally, Sb-induced ER stress activated SIRT1 signaling pathway. Treatment with the ER-stress specific inhibitor tauroursodeoxycholic acid (TUDCA) demonstrated the key role of ER stress in Sb-induced damage in Caco-2 cells. Finally, the beneficial effects of cyanidin-3-O-glucoside (C3G) against Sb-induced intestinal injury were evaluated: C3G protected Caco-2 cells against inflammation, apoptosis, and ER stress triggered by Sb(III) exposure during cell differentiation.

In conclusion, this study, for the first time, supports the obesogenic and intestinal epithelial damaging effects of low concentrations of Sb(III), suggesting that it would be recommendable to limit Sb applications in industrial activities to minimise human health hazards.

PARTE COMPILATIVA

1. Effetti tossici dei metalli pesanti sull'epitelio intestinale e sul tessuto adiposo

1.1 Introduzione

Lo sviluppo industriale ha causato negli ultimi anni l'aumento del rilascio di diverse sostanze chimiche nell'ambiente, e tra queste rientrano i metalli pesanti. Il termine "metallo pesante" si riferisce a qualsiasi elemento metallico (metalli e metalloidi) con un'elevata massa atomica e una densità maggiore rispetto a quella dell'acqua. I metalli pesanti, come arsenico, antimonio, bario, cadmio, cobalto, germanio, piombo, nickel, tellurio e vanadio, si trovano in natura nell'ambiente in materiali geologici e rocciosi (Tchounwou et al., 2012). Sono anche chiamati oligoelementi, in quanto di solito sono rilevati in tracce (da pochi ppb fino a <10 ppm) (Tchounwou et al., 2012). La contaminazione ambientale può derivare da fenomeni spontanei come la corrosione dei metalli, la deposizione atmosferica, l'erosione del suolo, la lisciviazione, la risospensione dei sedimenti e l'evaporazione dei metalli da fonti idriche verso il suolo o le acque sotterranee. Anche gli agenti atmosferici e le eruzioni vulcaniche contribuiscono significativamente all'inquinamento da metalli pesanti (He et al., 2005). Negli ultimi decenni, però, l'esposizione dell'uomo ai metalli pesanti è cresciuta notevolmente in seguito all'aumento esponenziale del loro impiego in diversi settori industriali, agricoli, domestici e tecnologici (He et al., 2005), e studi epidemiologici hanno evidenziato che esiste una correlazione tra l'inquinamento da metalli pesanti e alcune manifestazioni patologiche nell'uomo (Tchounwou et al., 2012; Chowdhury et al., 2018). Gli impianti industriali che impiegano questi metalli sono le raffinerie, le strutture che operano la combustione del carbone e del petrolio, le centrali nucleari, le industrie di plastica, tessuti, microelettronica, lavorazione del legno e della carta (Arruti et al., 2010). L'esposizione dell'uomo ai metalli pesanti avviene attraverso l'acqua, l'aria e gli alimenti contaminati, provocando disturbi al sistema nervoso, lesioni alla pelle, danni vascolari, disfunzione del sistema immunitario, difetti alla nascita, cancro e disturbi gastrointestinali (GI) e renali. Data l'elevata contaminazione ambientale, i metalli pesanti si possono infatti ritrovare negli alimenti, se i vegetali o gli animali da cui derivano sono contaminati, oppure per una contaminazione di tipo secondario che si può verificare durante i processi di produzione e conservazione. Alcuni metalli, come cobalto (Co), rame (Cu), cromo (Cr), ferro (Fe), magnesio (Mg), manganese (Mn), molibdeno (Mo), nichel (Ni), selenio (Se) e zinco (Zn), sono nutrienti essenziali per diverse funzioni biochimiche, tanto che un loro apporto insufficiente può provocare l'insorgenza di diversi disordini patologici (Tchounwou et al., 2012). Tra le funzioni fisiologiche dei metalli pesanti

fondamentali in piante e animali ricordiamo il loro ruolo come costituenti di enzimi chiave e di cofattori in diverse reazioni di ossido-riduzione (Tchounwou et al., 2012). Molti altri metalli, come alluminio (Al), antimonio (Sb), arsenico (As), bario (Ba), berillio (Be), bismuto (Bi), cadmio (Cd), gallio (Ga), germanio (Ge), oro (Au), indio (In), piombo (Pb), litio (Li), mercurio (Hg), nichel (Ni), platino (Pt), argento (Ag), stronzio (Sr), tellurio (Te), tallio (Tl), stagno (Sn), titanio (Ti), vanadio (V) e uranio (U), non hanno funzioni biologiche accertate e sono considerati metalli non essenziali. Questi rappresentano però una grave minaccia se raggiungono livelli al di sopra dei limiti tollerati dall'organismo, costituendo oggigiorno motivo di seria preoccupazione per la salute umana. Per alcuni metalli, tra cui Cr e Cu, vi è infatti un intervallo molto ristretto di concentrazioni tra effetti benefici e tossici (Tchounwou et al., 2008). Poiché questi elementi non sono biodegradabili, persistono nell'ambiente per lungo tempo, interferendo con le normali funzioni biologiche con ingenti rischi a lungo termine per l'uomo (Hamdy et al., 2019).

Gli effetti dei metalli pesanti sugli organi bersaglio varia in base alla via di esposizione, alla concentrazione di metallo, alla durata di esposizione e alla specie. Ad esempio, i topi sviluppano adenomi e carcinomi intestinali in seguito ad esposizione cronica ad alte concentrazioni di Cr esavalente presente nell'acqua potabile, ma non i ratti (Thompson et al., 2013). L'esposizione acuta ad alte dosi di metalli pesanti, come mercurio e piombo, può indurre insufficienza renale, coliche addominali e diarrea, mentre l'esposizione cronica a basse concentrazioni può causare disturbi neuropsichiatrici, come affaticamento e ansia, e impatto negativo sulle funzioni cognitive dei bambini (Balali-Mood et al., 2021). Inoltre, elevati livelli di metalli pesanti possono indurre danni al DNA, alle proteine e ai meccanismi di sintesi e riparazione del DNA, come anche produzione di specie reattive dell'ossigeno (ROS), stress ossidativo e inattivazione di importanti enzimi metabolici. A causa del loro alto grado di tossicità, diversi elementi, quali arsenico, cadmio, piombo e mercurio, rientrano tra i metalli di grande importanza per la salute pubblica. Inoltre, l'*U.S. Environmental Protection Agency* (USEPA) e l'Agencia Internazionale per la Ricerca sul Cancro (IARC) hanno classificato questi metalli come certi o probabili cancerogeni per l'uomo sulla base di studi epidemiologici e sperimentali che mostrano un'associazione tra esposizione e incidenza del cancro nell'uomo e negli animali. Tuttavia, ciascun metallo è noto per avere caratteristiche uniche e proprietà fisico-chimiche che influenzano i loro specifici meccanismi di tossicità.

1.2 Effetti tossici dei metalli pesanti a livello intestinale

Recenti studi hanno evidenziato che l'esposizione agli inquinanti ambientali può portare a cambiamenti significativi nella composizione del microbiota intestinale (Breton et al., 2013; Shao e Zhu, 2020), può causare disfunzione della barriera epiteliale intestinale e aumentare l'infiammazione (Mitamura et al., 2021; Lindell et al., 2022). Queste alterazioni possono essere strettamente correlate a gravi disturbi GI, come le malattie infiammatorie intestinali (IBD, *inflammatory bowel disease*) (Martini et al., 2017; Guan, 2019), che comprendono colite ulcerosa e morbo di Crohn. Le IBD, infatti, comportano la compromissione della mucosa intestinale, la disbiosi del microambiente intestinale e l'alterazione della risposta immunitaria (Khor et al., 2011). La diffusione globale delle IBD negli ultimi anni sembra essere correlata ai processi di industrializzazione, ai cambiamenti nella dieta e all'azione di contaminanti ambientali. Tra questi ricordiamo le microplastiche, gli interferenti endocrini, gli erbicidi chimici, gli inquinanti organici persistenti e i metalli pesanti (Bilal et al., 2019; Landrigan et al., 2018). Circa il 60% dei metalli che vengono ingeriti oralmente viene assorbito a livello intestinale. Questi contaminanti possono provocare alterazione dell'omeostasi redox cellulare e danni alla barriera epiteliale intestinale, con conseguente aumento dell'infiammazione e insorgenza di malattie come le IBD (Feng et al., 2018; Assefa e Kohler, 2020; Shao e Zhu, 2020).

1.2.1 Morfologia e funzioni dell'epitelio intestinale

La barriera intestinale consente il passaggio selettivo dei nutrienti e regola l'interazione tra batteri commensali e sistema immunitario, proteggendo l'organismo dalle sostanze potenzialmente tossiche (Ghosh et al., 2021). La barriera è costituita da tre elementi chiave: lo strato di muco, lo strato di cellule epiteliali intestinali e lo strato di cellule del sistema immunitario. Le cellule caliciformi sono responsabili della secrezione delle mucine, glicoproteine che creano uno strato di muco protettivo (Gustafsson et al., 2022); quest'ultimo funge da barriera contro i microrganismi luminali e gli antigeni estranei che giungono nel lume intestinale (Leal et al., 2017). Lo strato di muco funziona, inoltre, come barriera per soluti idrofili, che possono essere così trasportati solo tramite trasportatori specifici (Li et al., 2020). Le mucine e il loro stato di glicosilazione svolgono un importante ruolo nel mantenimento della funzionalità della barriera intestinale; infatti, una loro alterazione può portare a disturbi GI, come le IBD, la sindrome dell'intestino irritabile e formazioni cancerose.

L'epitelio intestinale è poi composto da diversi sottotipi cellulari, come gli enterociti, le cellule di Paneth, le cellule M, le cellule endocrine e le cellule a ciuffo, che insieme sono essenziali per la digestione, l'assorbimento dei nutrienti e la protezione dagli agenti patogeni (Clevers, 2013; Peterson e Artis, 2014; Okumura e Takeda, 2017). Le cellule epiteliali intestinali sono tenute insieme da giunzioni strette (TJ, *tight junctions*), giunzioni aderenti, desmosomi e giunzioni gap, che permettono la comunicazione tra le singole cellule e regolano il trasporto delle molecole in base alla dimensione e alla carica elettrica attraverso lo spazio paracellulare (Van Itallie e Anderson, 2014; Zihni et al., 2016). Alterazioni della permeabilità paracellulare sono responsabili di malattie a livello del tratto GI (Vermette et al., 2018; Vanuytsel et al., 2021).

Gli enterociti, in gran parte cellule epiteliali intestinali, sono cellule polarizzate con microvilli che si espandono sulla superficie luminale. Queste cellule subiscono un fisiologico processo di apoptosi, durante il quale vengono sostituite da cellule staminali provenienti dalle cripte intestinali. Gli enterociti regolano l'assorbimento di acqua e nutrienti e contribuiscono attivamente alla formazione della barriera intestinale, al trasporto molecolare e al processo di digestione (Haber et al., 2017). L'attivazione dello stato di infiammazione può accelerare il turnover e la proliferazione degli enterociti, portando ad apoptosi, alterazione della funzionalità della barriera intestinale e proliferazione batterica.

Le cellule di Paneth sono cellule secretorie situate alla base delle cripte di Lieberkuhn. Sono essenziali per il mantenimento dell'omeostasi immunitaria a livello intestinale e secernono attivamente peptidi antimicrobici, come α -defensine, lisozima e fosfolipasi A2. Una ridotta funzionalità delle cellule di Paneth porta a squilibrio del microbiota intestinale e alterazione dell'integrità della barriera, con rischio di insorgenza di malattie come il morbo di Crohn (Cray et al., 2021).

Le cellule M sono cellule epiteliali presenti nel tessuto linfoide intestinale (GALT, *gut-associated lymphoid tissue*) delle placche di Peyer nell'intestino tenue, nei follicoli linfoidei isolati, nei tessuti linfoidei a livello nasofaringeo (Dillon e Lo, 2019). Sono cellule coinvolte nelle risposte immunitarie, nell'interazione con i microrganismi e nell'immunità adattativa. Durante lo stato di infiammazione cronica, vi è un aumento delle cellule M e del processo apoptotico, che possono portare ad infezione da parte di microrganismi ed infiammazione.

Nell'intestino vi sono anche cellule endocrine che mediano il rilascio di ormoni e citochine e che modulano la risposta immunitaria innata e adattativa. Infatti, le cellule enteroendocrine svolgono un importante ruolo nel sistema chemosensoriale per il microbiota e i suoi metaboliti e mediano diverse funzioni fisiologiche, come l'iperalgia viscerale, la motilità intestinale e la trasmissione sinaptica (Gribble e Reimann, 2016). Le cellule a ciuffo sono invece cellule sentinella chemosensoriali che percepiscono i segnali dall'ambiente e comunicano con le cellule immunitarie a livello intestinale.

Le alterazioni della fisiologia intestinale, che comprendono la degradazione dello strato di muco, la distruzione delle proteine giunzionali, l'aumento della permeabilità intestinale, l'infiammazione e gli squilibri microbici, sono le cause alla base della disfunzione della barriera intestinale e delle irregolarità immunitarie, fenomeni responsabili dello sviluppo di disturbi GI, come le IBD (Di Tommaso et al., 2021).

1.2.2 Ruolo dei metalli pesanti nel danno all'epitelio intestinale

1.2.2a Arsenico

L'arsenico (As) è una sostanza tossica che può essere presente in terreni e acque contaminate (Missimer et al., 2018), come anche in pesci e molluschi (Hughes et al., 2011). Spesso pure le radici di piante e gli ortaggi possono contenere elevati livelli di As (Rai et al., 2019). Circa 225 milioni di persone in oltre 70 paesi nel mondo sono cronicamente esposte all'arsenico (Podgorski e Berg, 2020). La *World Health Organization* (WHO) ha stabilito un limite consentito per l'As nell'acqua potabile pari a 10 µg/L (Rehman et al., 2018); se la concentrazione supera il valore di 50 µg/L, può portare a disfunzione a livello del tratto GI e ad altre alterazioni biologiche (Rehman et al., 2018). L'As è classificato dall'IARC come agente cancerogeno per l'uomo (gruppo I) ed è noto per gli effetti tossici in diversi organi, come fegato, reni, vescica, pelle e sistema nervoso centrale (Banerjee et al., 2011; IARC, 2012; Hong et al., 2014; Hunt et al., 2014; Coryell et al., 2019; Garza-Lombo et al., 2019). L'esposizione continua nel tempo o dosi elevate di As può portare ad accumulo del metallo a livello intestinale (Palma-Lara et al., 2020). Inoltre, è stata dimostrata la correlazione tra esposizione ad As e IBD. Questo metallo induce diversi effetti a livello GI, tra cui irritazione, nausea, dolore, vomito, danni intestinali, provoca infiltrazione di mediatori infiammatori nel fegato, riduce la biodiversità del microbiota intestinale (Zhong et al., 2021; Chiocchetti et al., 2019a) e causa aumento della permeabilità intestinale (Slifer

e Blikslager, 2020; Xie et al., 2019), portando a sintomi come dispepsia, gastroenterite e diarrea cronica (Guha Mazumder e Dasgupta, 2011; Choiniere e Wang, 2016; Chiocchetti et al., 2019a,b; Fernández et al., 2019). Nei roditori, i metaboliti dell'arsenico (ad esempio l'acido monometilarsonico) colpiscono il tratto GI, provocando allargamento della parete intestinale, edemi, emorragie, necrosi e ulcerazioni, nonché un aumento dell'incidenza della metaplasia squamosa delle cellule epiteliali del colon e del retto (Arnold et al., 2003). L'esposizione subcronica all'As ha portato anche alla rottura della struttura epiteliale del colon e danno alla funzione della barriera intestinale (Chiocchetti et al., 2018). Alcune immagini al microscopio elettronico a trasmissione (TEM) di cellule Caco-2 esposte all'arsenico [As(III) \geq 0,075 mg/L; As(V) \geq 0,75 mg/L] per 14 giorni hanno mostrato la rottura dei microvilli, con conseguente aumento del trasporto paracellulare e disfunzione della barriera epiteliale (Chiocchetti et al., 2018). Le forme di As trivalenti inducono il rilascio di citochine pro-infiammatorie, come IL-6, IL-8 e TNF- α , nonché stress ossidativo in cellule epiteliali del colon (Calatayud et al., 2013; Calatayud et al., 2014). L'analisi del microbioma intestinale di individui esposti all'As ha mostrato presenza di batteri patogeni correlata all'aumento di concentrazione al metallo (Brabec et al., 2020; Chen et al., 2021). L'esposizione ad As con valori superiori a 100 ppb ha causato aumento dei geni coinvolti nel metabolismo energetico, nella sintesi di lipopolisaccaride (LPS), nelle risposte allo stress ossidativo e nella riparazione del DNA (Chi et al., 2017). Il microbiota intestinale umano può trasformare biochimicamente i composti contenenti As (arsenicali), portando ad una maggiore biodisponibilità del metallo (Yin et al., 2022). È possibile che il microbiota metabolizzi l'As per produrre arsenicali meno tossici oppure che i metaboliti microbici stessi possano contrastare la tossicità indotta da questo. Ad esempio, è stato dimostrato che il metabolita microbico intestinale urolitina A è in grado di proteggere le cellule epiteliali del colon dall'As, riducendo lo stress ossidativo e incrementando le TJ (Ghosh et al., 2022a,b). Inoltre, l'uso di probiotici come *Bifidobacterium* e *Lactobacillus*, ha influenzato le capacità di trasformazione dell'As, migliorando l'escrezione e la disintossicazione (Liu et al., 2022).

1.2.2b Piombo

Il piombo (Pb) è un metallo pesante molto diffuso negli ecosistemi a causa del suo impiego di lunga data in diverse applicazioni industriali, come benzina e vernici. Da alcuni anni, in diverse aree del mondo l'uso del Pb è stato limitato per ridurre il suo rilascio nell'ambiente e l'esposizione dell'uomo (da Cunha Martins et al., 2015). Nonostante le intossicazioni acute da alte dosi di Pb siano ormai poco frequenti, l'esposizione ambientale a questo metallo costituisce ancora oggi un problema di salute pubblica.

Il Pb non ha alcuna funzione biologica conosciuta, ma piuttosto mostra tossicità a diversi livelli. Negli organismi in via di sviluppo causa danni principalmente sul sistema nervoso centrale (Caito e Aschner, 2017; Virgolini e Aschner, 2021), ma danneggia anche altri sistemi, come quelli renale, cardiovascolare, emopoietico, riproduttivo ed endocrino (Flora et al., 2012; Liu et al., 2021; Yu et al., 2021).

Il Pb riesce ad entrare nell'organismo attraverso l'esposizione alimentare, ovvero cibo (65%) e acqua (20%) (Pratish et al., 2018). L'uomo riesce ad assorbire circa il 10-15% del Pb ingerito con la dieta, mentre i bambini possono assorbire fino al 50% attraverso il tratto GI, il che li rende più suscettibili alla tossicità di questo metallo. Quando si raggiunge un livello superiore a 70 µg/dL si possono verificare gravi conseguenze (Rai et al., 2019). Infatti, il Pb può indurre stress ossidativo e alterazione dell'integrità della membrana intestinale (Zhou et al., 2020a). Diversi studi hanno evidenziato gli effetti avversi del Pb sul tratto GI e sul microbiota intestinale in diverse specie; il metallo, infatti, è in grado di danneggiare l'epitelio intestinale e contribuire all'insorgenza delle IBD (Stojsavljevic et al., 2022). Topi esposti a basse dosi (modello cronico) o ad alte dosi (modello acuto) di Pb hanno mostrato livelli ridotti di MUC2 e di TJ, come ZO-1, claudina-1 e occludina nel colon, ed aumento della permeabilità intestinale, suggerendo il suo impatto negativo sulle funzioni GI (Zhai et al., 2019). Il contatto con Pb durante il periodo dello sviluppo aumenta il rischio di obesità in età adulta, alterando il microbiota intestinale (Wu et al., 2016). Inoltre, è stato dimostrato che l'esposizione al Pb porta a disbiosi intestinale, con conseguente diminuzione di batteri benefici come *Akkermansia muciniphila*, *Faecalibacterium prausnitzii* e *Oscillibacter ruminantium* (Zhai et al., 2017). Tra l'altro, il microbiota intestinale può influenzare significativamente l'assorbimento e l'accumulo di Pb nei tessuti dell'organismo e ciò suggerisce, quindi, che un microbiota intestinale ben regolato può ridurre gli effetti tossici del Pb sull'organismo. Infine, è stato evidenziato che i paesi più industrializzati

sono caratterizzati da maggiori emissioni di Pb, il che è coerente con il fatto che anche le IBD sono generalmente più frequenti nella popolazione di questi paesi.

1.2.2c Cadmio

Il cadmio (Cd) è un inquinante ambientale altamente tossico che viene utilizzato come agente anticorrosivo e si può trovare in natura nei minerali. Il Cd è abbondante in alcuni animali acquatici, come zebrafish e granchi. L'esposizione al Cd nell'uomo è principalmente dovuta al fumo di sigaretta o all'assunzione di cibo e acqua contaminati, attraverso l'assorbimento GI, l'inalazione e il contatto cutaneo (Zhang et al., 2015). È stata riportata una correlazione tra l'esposizione al Cd e diverse malattie come il diabete, la malattia renale cronica, l'osteoporosi, l'obesità, le malattie del fegato, le malattie cardiovascolari ed il cancro (Tellez-Plaza et al., 2012; Tinkov et al., 2017, 2018). L'ingestione di Cd può causare disturbi GI, come diarrea, nausea e dolori addominali, e influenzare in maniera significativa il microbiota intestinale, in particolare diminuendo il numero di *Firmicutes* e di gammaproteobatteri (Zhang et al., 2015). L'esposizione al Cd può aumentare la permeabilità intestinale attraverso diminuzione dell'espressione genica di ZO-1, ZO-2, occludina e claudina-1 a livello del digiuno e del colon (Zhai et al., 2016). I cambiamenti relativi dei valori di resistenza elettrica trans-epiteliale (TEER) dopo esposizione ad alte dosi di Cd (100 e 300 μ M) dimostrano la perdita di integrità del monostrato (Rusanov et al., 2015). Il Cd è in grado di alterare la composizione della mucosa modificando la localizzazione e la distribuzione dei residui di glicani e l'espressione della metallotioneina nelle cellule intestinali (Motta et al., 2022). Inoltre, l'assunzione orale di Cd ha modificato l'attività del sistema immunitario adattativo nei topi, portando ad aumento della permeabilità intestinale, danni ai tessuti intestinali ed infiammazione. Infine, come per altri metalli pesanti tra cui Mn, As e Pb, è stata riportata la presenza di concentrazioni di Cd notevolmente più elevate rispetto al normale nei pazienti con morbo di Crohn (Stojsavljević et al., 2022).

1.2.2d Mercurio

L'uomo può essere esposto al mercurio (Hg) in tre forme distinte: vapore di mercurio elementare, composti inorganici del Hg e composti organici del Hg. In ogni caso, tutti i composti contenenti Hg possono essere potenzialmente tossici per l'uomo, a seconda della dose, della via di esposizione e della durata dell'esposizione (Martins et al.,

2021). La principale forma di esposizione è l'assunzione mediante l'alimentazione e l'assorbimento di Hg a livello GI risulta intorno al 7-15% (Witkowska et al., 2021). Il Hg, infatti, può accumularsi nelle acque reflue non depurate provenienti dalle fabbriche e dagli stabilimenti agricoli, contaminando direttamente i raccolti e i pesci. Il metilmercurio (MeHg) è uno dei principali inquinanti ambientali contenenti Hg, presente soprattutto nei pesci di grossa taglia, come pescespada, tonno e squalo, accumulandosi così nella catena alimentare. È un agente neurotossico, che può causare disfunzione cognitiva e comportamentale nei bambini, mentre nell'adulto può indurre sviluppo di malattie neurodegenerative, come il morbo di Parkinson (Clarkson e Magos, 2006). Il MeHg si lega covalentemente ai residui di glutathione e cisteina delle proteine, provocando alterazione della loro struttura e funzionalità (Pinto et al., 2020). L'esposizione a Hg provoca danni al DNA, induzione di stress ossidativo, disfunzione mitocondriale, aumento della perossidazione lipidica e alterata omeostasi del calcio a livello cellulare. L'avvelenamento da Hg può interessare più organi, in quanto si distribuisce rapidamente attraverso il circolo sistemico, portando anche a morte. Livelli di Hg superiori a 10 µg/L nel sangue o a 20 µg/L nelle urine possono causare lesioni polmonari, danni intestinali, proteinuria, allergie e avvelenamento cronico. È stato dimostrato che il Hg assunto per via orale in maniera subcronica può causare perdita di peso corporeo, lesioni intestinali, cambiamenti nel microbiota intestinale e aggravamento dell'apoptosi nei topi (Zhao et al., 2020).

L'esposizione a questo metallo è anche strettamente correlata alle IBD, all'aumento della permeabilità della barriera intestinale e alla disbiosi microbica. Vazquez et al. (2014) hanno riportato che il Hg, mediante induzione della generazione di ROS e di specie reattive dell'azoto (RNS) e diminuzione del glutathione, ha causato alterazione dell'espressione delle proteine F-actina e ZO-1 in cellule intestinali, determinando un aumento della permeabilità della barriera. In un altro studio, il Hg ha indotto un aumento del volume delle cellule intestinali e della permeabilità della membrana senza alcuna diminuzione della vitalità cellulare; pertanto, può promuovere l'assorbimento di altri metalli tossici a livello del lume intestinale (Aduayom et al., 2005). Ulteriori studi sarebbero necessari per meglio definire gli effetti del Hg e il suo ruolo nel promuovere i disturbi correlati al tratto GI.

1.3 Effetti tossici dei metalli pesanti sul tessuto adiposo

La sindrome metabolica costituisce un importante problema di salute pubblica a causa della sua ingente diffusione a livello mondiale. Le statistiche globali mostrano che un quarto della popolazione adulta sviluppa sindrome metabolica (Saklayen, 2018), caratterizzata da diverse condizioni cliniche, quali obesità addominale, ipertensione, alti livelli di trigliceridi, bassi livelli di colesterolo HDL, alterata glicemia a digiuno (National Institutes of Health, National Heart, Lung, and Blood Institute, 2022). L'obesità è una malattia multifattoriale caratterizzata da eccessivo accumulo di grasso nel tessuto adiposo e da concomitanti alterazioni metaboliche. In particolare, l'aumento della massa grassa è dovuto ad uno squilibrio tra l'assunzione di cibo e il dispendio energetico nell'uomo, quindi consumo di pasti ad alto contenuto calorico, stile di vita sedentario e altri fattori come predisposizione genetica, stress, disturbi nel sonno e alcuni farmaci (Block et al., 2009; Goodarzi et al., 2018). Nel soggetto obeso, il tessuto adiposo rappresenta più del 20% del peso corporeo totale negli uomini e del 25% nelle donne (Skolarczyk et al., 2018). È noto che tale condizione può aumentare il rischio di ictus, di malattie cardiovascolari e di diabete di tipo 2. La percentuale di persone in sovrappeso e obese è in costante crescita, soprattutto tra bambini e adolescenti; tale condizione è solitamente accompagnata da metabolismo anomalo del glucosio, dislipidemie, ipertensione, come anche sindrome dell'ovaio policistico e altri stati infiammatori (Al-Hamad e Raman, 2017). Secondo i dati del *National Health and Nutrition Examination Survey* (NHANES), nel periodo 2017-2018, la prevalenza di malattie metaboliche era circa del 38,3% nella popolazione adulta statunitense (Liang et al., 2021), come simile nello stesso arco temporale era l'incidenza dell'obesità (42,4%) (Hales et al., 2020), condizione che costituisce l'esito predominante della sindrome metabolica. Uno studio condotto su 34.821 soggetti provenienti da diversi paesi europei ha evidenziato un'incidenza del 24,3% (8.468 soggetti) di sindrome metabolica negli uomini e 24,6% nelle donne, con un aumento correlato all'età (Scuteri et al., 2015).

Negli ultimi anni la ricerca si è focalizzata sullo studio dei fattori che possono influenzare il rischio di insorgenza dell'obesità. Tra questi, alcuni inquinanti ambientali sono noti agire da interferenti endocrini e alterare l'omeostasi metabolica a livello del tessuto adiposo. Per tal motivo, queste sostanze vengono anche spesso denominate agenti obesogeni (Trasande e Blumberg, 2018). Gli obesogeni chimici includono, ad esempio, fenoli, idrocarburi policiclici aromatici, ammidi, composti

metallici, esteri, composti alogenati, inquinanti atmosferici e sostanze aromatiche (Egusquiza e Blumberg, 2020). Infatti, diversi studi epidemiologici e sperimentali hanno mostrato la stretta correlazione tra l'esposizione a contaminanti organici persistenti e la patogenesi dell'obesità. Questo fenomeno è dovuto principalmente all'interazione con il processo di adipogenesi, attraverso la modulazione del recettore γ attivato dal proliferatore del perossisoma (PPAR- γ , *peroxisome proliferator-activated receptor gamma*) e dall'espressione della *CCAAT/enhancer-binding protein* (C/EBP). Alcuni agenti obesogeni si comportano come agonisti del recettore PPAR- γ , ma sono anche in grado di danneggiare il DNA e causare la metilazione degli istoni, nonché compromettere la struttura della cromatina (Egusquiza e Blumberg, 2020).

Recentemente, è stata dimostrata la correlazione tra esposizione ai metalli pesanti, come mercurio, cadmio, piombo e arsenico, e insorgenza di obesità e sindromi metaboliche (Lee, 2018; Tinkov et al., 2017; Wang et al., 2019b; Stahr e Su, 2019). Anche un'esposizione a basse concentrazioni, al di sotto dei limiti delle linee guide governative, può costituire un rischio per la salute, soprattutto nelle aree con notevole inquinamento ambientale (Shao et al., 2017). I processi di urbanizzazione e industrializzazione hanno notevolmente incrementato l'inquinamento da metalli pesanti e metalloidi (Li et al., 2022; Pena-Fernandez et al., 2014). Questi metalli, inoltre, sono in grado di bioaccumularsi, aumentando il rischio di insorgenza di malattie croniche e problemi di salute a lungo termine (Rehman et al., 2018; Dos Santos et al., 2016). Tuttavia, i meccanismi alla base degli effetti tossici dei metalli pesanti sull'insorgenza delle sindromi metaboliche e sull'obesità necessitano ancora di ulteriori studi.

1.3.1 Il tessuto adiposo e la patogenesi dell'obesità

Il tessuto adiposo è l'organo deputato al deposito di grasso e alla regolazione del metabolismo energetico nell'organismo. Esso è costituito da diversi tipi cellulari, quali adipociti, pre-adipociti, fibroblasti, cellule immunitarie (macrofagi, mastociti, eosinofili, cellule B, cellule T) e cellule endoteliali vascolari. Il tessuto adiposo viene classificato in base a natura e funzioni in tre tipologie diverse: tessuto adiposo bianco (WAT), tessuto adiposo bruno (BAT) e tessuto adiposo beige o brite. Il WAT è deputato all'immagazzinamento dell'energia sotto forma di lipidi, ma è anche responsabile della produzione endocrina di adipochine. Il BAT è caratterizzato da un maggior numero di mitocondri, ed è in grado di convertire l'energia accumulata in calore grazie al

processo di termogenesi. Infine, il tessuto beige o brite costituisce un sottotipo intermedio tra gli altri due, principalmente coinvolto nella generazione di calore per mantenere la temperatura corporea (Nedergaard e Cannon, 2014). Un'alterazione della fisiologia del tessuto adiposo può comportare l'insorgenza di diversi disturbi metabolici, tra cui il più comune è l'obesità (Trim et al., 2018). Questa condizione è principalmente caratterizzata da elevata massa di WAT, come conseguenza dello squilibrio tra apporto e dispendio energetico. Con un bilancio calorico positivo, l'energia in eccesso viene immagazzinata nel tessuto adiposo sotto forma di depositi lipidici negli adipociti, come risultato del processo di adipogenesi; al contrario, l'aumento del dispendio energetico attiva la mobilitazione dei lipidi immagazzinati attraverso la lipolisi, processo regolato da segnali neuroendocrini (Braun et al., 2018). In base all'equilibrio tra lipogenesi e lipolisi, vi sono cambiamenti nella dimensione degli adipociti e un rimodellamento del tessuto adiposo (Choe et al., 2016). Infatti, in caso di obesità, si verificano ipertrofia (aumento delle dimensioni degli adipociti) e iperplasia (aumento del numero di cellule), con successiva espansione anomala del tessuto adiposo.

L'adipogenesi è il processo di proliferazione e successiva maturazione degli adipociti a partire da pre-adipociti, ed è principalmente regolata dai fattori C/EBP β e PPAR- γ . Un'alterazione del processo di adipogenesi porta ad un profilo metabolico alterato e all'obesità (Vishvanath e Gupta, 2019). Inoltre, poiché il tessuto adiposo funge anche da organo endocrino, la disfunzione degli adipociti provoca una ridotta secrezione di adipochine, con conseguenti alterazioni metaboliche, tra cui infiammazione e stress cellulare (Longo et al., 2019). Ad esempio, la leptina è considerata la principale adipochina prodotta dal tessuto adiposo ed è deputata al controllo del bilancio energetico cellulare, interferendo con i centri ipotalamici dell'appetito e della sazietà. È stato dimostrato che nei soggetti obesi anche la via di segnale della leptina viene compromessa (Pandit et al., 2017). A seguito di determinati segnali, il WAT può modulare l'equilibrio energetico attraverso l'avvio della trasformazione degli adipociti bianchi in beige o brite, responsabili del dispendio energetico mediante il processo di termogenesi e la produzione di calore, che risultano di gran lunga vantaggiosi nell'alleviare la sintomatologia dell'obesità (Sanchez-Gurmaches et al., 2016). Al contrario, la trasformazione degli adipociti da beige a bianchi può aggravare la condizione di obesità (McQueen et al., 2018).

1.3.2 Ruolo dei metalli pesanti nella disfunzione del tessuto adiposo

1.3.2a Arsenico

L'As è considerato un potenziale agente obesogeno, in grado di alterare la morfologia fisiologica del tessuto adiposo, nonostante vi siano pochi dati sull'impatto del metallo sul processo di adipogenesi e sulle funzioni degli adipociti (Ceja-Galicia et al., 2017). Studi *in vivo* hanno mostrato che l'esposizione ad As influenza la massa del WAT in maniera dose-dipendente. Nello specifico, l'assunzione di acqua contenente As (300 µg/L di arsenito di sodio [NaAsO₂]) per 9 settimane in topi maschi C57BL/6J ha prodotto un aumento significativo della massa del WAT, accompagnato da alterata biogenesi e termogenesi attraverso la modulazione di specifici geni regolati da PPAR- α e PPAR- γ , come Slc27a2, Fabp3, Ucp1, Acs15, Scd2 e Cpt1 β (Castriota et al., 2020a). Inoltre, l'esposizione al metallo ha incrementato l'espressione di citochine pro-infiammatorie (Srisuporn et al., 2023). Tuttavia, l'esposizione ad una dose più elevata di As (50 mg/L per 16 settimane) ha ridotto la massa del tessuto adiposo, senza alterare il dispendio energetico del roditore (Carmean et al., 2020). Questo effetto antiobesogeno dell'As potrebbe essere attribuito alla sua attività insulino-sensibilizzante (Carmean et al., 2020). Da qui deriva, quindi, la relazione inversa tra la dose e l'effetto adipogenico dell'As (Shearer et al., 2017). Elevate concentrazioni di As possono influenzare la produzione di adiponectina; ad esempio, bere acqua contenente As(III) (5 e 50 ppm) per 18 settimane ha provocato una significativa riduzione dei livelli sierici di adiponectina in topi maschi C57BL/6 (Song et al., 2017). Tuttavia, l'impatto dell'As sulla produzione di adiponectina sembra essere più dipendente dalla dieta; infatti, i topi maschi nutriti con una dieta a basso o ad alto contenuto di grassi hanno prodotto rispettivamente da una parte diminuzione e dall'altra aumento dei livelli di adiponectina in circolo (Ahangarpour et al., 2018). Diversi studi concordano sulla capacità dell'As di inibire il processo di differenziazione in adipociti delle cellule staminali mesenchimali attraverso soppressione dell'espressione genica di PPAR- γ e C/EBP (α e β) (Yadav et al., 2013). L'inibizione di PPAR- γ si verifica a causa dello stress del reticolo endoplasmatico (RE) indotto dall'As (5-10 µM) su pre-adipociti 3T3-L1, con successiva induzione di CHOP10, noto inibitore dell'attività genica di C/EBP- β e di altri fattori trascrizionali adipogenici (Hou et al., 2013). Anche la modulazione da parte dell'As delle vie SIRT3-FOXO3a, endotelina-1, Ras-MAP-AP-1 e PI3K-Akt può causare alterazione della funzionalità degli adipociti (Renu et al., 2018). L'esposizione ad As ha indotto

ipertrofia del tessuto adiposo retroperitoneale con soppressione dei geni coinvolti nella lipolisi, nell'assorbimento degli acidi grassi, nell'ossidazione e nel trasporto del glicerolo (Calderon-DuPont et al., 2023).

Il ruolo dell'As nella patogenesi del diabete mellito di tipo 2 consiste nella modulazione del metabolismo dei carboidrati, della sensibilità all'insulina in diversi tessuti, della produzione dell'insulina e nell'induzione della disfunzione delle cellule β -pancreatiche (Castriota et al., 2020b). È stato infatti dimostrato che i composti contenenti As alterano significativamente il ciclo di Krebs, le funzioni dei mitocondri e il metabolismo di amminoacidi, carboidrati e fosfolipidi, portando ad inibizione del rilascio di insulina indotta dal glucosio (Dover et al., 2018). Anche il BAT è risultato essere un potenziale bersaglio della tossicità dell'As. Infatti, la somministrazione orale di As(III) (5-10 mg/kg) in topi maschi C57BL/6J ha indotto accumulo di As nel BAT rispetto al WAT, portando al blocco del processo di differenziazione degli adipociti bruni e alla riduzione dell'espressione genica di PPAR- γ e di altri marker specifici degli adipociti bruni (UCP-1 e PGC1), con ulteriore inibizione del processo di autofagia (Bae et al., 2019). Questi risultati mostrano quindi che l'As è in grado di alterare la biogenesi e la formazione degli adipociti beige, riducendo il processo di termogenesi, proprio come avviene nell'obesità (Carmean et al., 2020).

1.3.2b Piombo

Recentemente, l'esposizione al Pb è stata correlata allo sviluppo di sindrome metabolica e obesità. È noto che il Pb si accumuli nel tessuto adiposo umano (Freire et al., 2020), non sono però ancora noti gli effetti diretti dell'esposizione a questo metallo sulla fisiologia degli adipociti. L'esposizione al Pb a vita (200–500 ppm) in topi C57Bl/6 ha causato un aumento significativo del processo di adipogenesi nel midollo osseo, con aumento delle dimensioni e del numero degli adipociti, attraverso incremento dell'espressione genica di PPAR- γ (Beier et al., 2016). Inoltre, uno studio sui fibroblasti 3T3-L1 ha mostrato che l'esposizione al Pb (0-10 μ M) ha stimolato l'accumulo intracellulare dei lipidi e l'espressione di perilipina, tipici eventi dell'adipogenesi; questi effetti sono stati mediati dalla sovra-regolazione di C/EBP- β ed ERK, con successiva attivazione di PPAR- γ (Martini et al., 2018). Concentrazioni di metallo più elevate (al di sopra di 10 μ M) hanno inibito la proliferazione delle cellule 3T3-L1 (Martini et al., 2020), probabilmente a causa dell'effetto citotossico del Pb. Uno studio ha dimostrato che l'esposizione a 200 mg/L di Pb ha provocato nei ratti

un significativo aumento del peso corporeo, dell'obesità viscerale, dei livelli di glucosio nel sangue a digiuno e dell'insulino-resistenza (Wang et al., 2022a). Ulteriori analisi hanno dimostrato che il Pb è in grado di inibire significativamente la via di segnale dell'insulina PI3K/Akt e l'ossidazione degli acidi grassi, accelerando la sintesi degli acidi grassi. Infatti, l'esposizione al Pb è stata correlata anche ad alterazione dell'omeostasi del glucosio. Gli animali esposti al Pb hanno mostrato livelli elevati di trigliceridi epatici e aumento dell'espressione dei geni gluconeogenici fosfoenolpiruvato carbossichinasi (PEPCK) e glucosio-6-fosfatasi (Tyrrell et al., 2017). Inoltre, l'esposizione al Pb può influenzare le vie di segnale delle adipochine, attraverso blocco del recettore 1b dell'adiponectina e della leptina nel cervello di zebrafish (Meyer et al., 2020), segno dell'alterata omeostasi energetica causata dal metallo.

1.3.2c Cadmio

Diversi studi epidemiologici e di laboratorio hanno dimostrato il ruolo dell'esposizione al Cd nello sviluppo di malattie metaboliche, ma non sono ancora chiari i meccanismi molecolari alla base del coinvolgimento di questo metallo nella patogenesi dell'obesità (Tinkov et al., 2017). Il tessuto adiposo funge da deposito per il Cd, sebbene i livelli riportati non siano elevati (42 µg/kg) (Egger et al., 2019). Per tal motivo, il tessuto adiposo può essere considerato un potenziale bersaglio per la tossicità del Cd, influenzandone il funzionamento (Attia et al., 2022). L'esposizione al Cd sembra essere correlata anche a bassi livelli di colesterolo HDL ed elevati di trigliceridi (Lu et al., 2023). I livelli di Cd nel sangue prenatale sono risultati significativamente associati al rischio di obesità pediatrica nei bambini dai 4 ai 5 anni in Carolina del Nord, ciò anche in accordo con esperimenti condotti su zebrafish (Green et al., 2018). L'esposizione a bassi dosaggi di Cd (100 nM di CdCl₂ in acqua potabile) ha dimostrato di incrementare la massa corporea, il processo di adipogenesi e i livelli di leptina in topi maschi C57BL/6J (Ba et al., 2017).

Gli effetti del Cd osservati sul tessuto adiposo possono essere spiegati dal suo impatto sull'adipogenesi, come dimostrato *in vitro*. In particolare, l'esposizione cronica a livelli di Cd variabili tra 0,2 e 2 µM hanno mostrato di aumentare il numero di adipociti nel midollo osseo, attraverso la sovra-regolazione del processo di differenziazione adipocitaria delle cellule staminali mesenchimali, concomitante all'aumento dell'espressione di PPAR-γ (Knani et al., 2019). Tuttavia, sebbene il Cd sia stato

considerato un fattore di rischio per l'obesità (Park et al., 2017a), vi sono ancora oggi dati contraddittori riguardo al suo effetto sul tessuto adiposo. È stata dimostrata una relazione inversa tra Cd nel sangue e obesità negli adulti (NHANES 1999-2014) (Wang e Wei, 2018). Un elevato contenuto di Cd nel tessuto adiposo è associato a livelli elevati di insulina nel sangue e insulino-resistenza, con rischio di sviluppo di diabete mellito di tipo 2, nonostante non alteri il peso corporeo né induca altri sintomi tipici dell'obesità (Echeverría et al., 2019). L'analisi trascrittomico ha dimostrato che l'esposizione al Cd provoca alterazioni significative dei geni coinvolti in molteplici meccanismi, tra cui adipogenesi, metabolismo lipidico, risposta insulinica, rilascio di adipochine e infiammazione (Gasser et al., 2022). È stato dimostrato che la resistenza all'insulina e il diabete osservati nei soggetti esposti a Cd sono dovuti alla capacità del metallo di alterare la cascata di segnale dell'insulina e di indurre sia disfunzione cellulare sia ridotta secrezione di insulina (Buha et al., 2020; Tinkov et al., 2017).

1.3.2d Mercurio

Elevati livelli sierici di Hg sono associati ad aumento significativo della massa del tessuto adiposo viscerale (Park et al., 2017b). Infatti, elevate concentrazioni di Hg sono state ritrovate in soggetti obesi con indice di massa corporea elevato, elevata circonferenza vita, accumulo di tessuto adiposo viscerale, ipertensione, glicemia a digiuno e insulino-resistenza (Moon, 2017). È stato riscontrato che livelli elevati di Hg nel sangue sono correlati a iperlipidemia e aumento degli enzimi epatici sierici, indicando la presenza di malattie epatiche (Lee et al., 2020); in particolare, in questo studio l'esposizione al metallo avveniva attraverso il consumo alimentare di MeHg nel pesce e nei frutti di mare.

Mentre i livelli di Hg nel sangue sono indice dell'esposizione acuta al metallo, le esposizioni a lungo termine sono meglio riflesse dai livelli in capelli o unghie, che crescono e depositano Hg al loro interno (Brockman et al., 2011). È noto da tempo che i bambini e il feto in via di sviluppo corrono un rischio più elevato per la neurotossicità associata all'esposizione al MeHg (Oken et al., 2008). I dati suggeriscono anche che l'esposizione al Hg nei primi anni di vita, sia in nell'utero sia durante l'infanzia, possono influenzare lo sviluppo dell'obesità e della sindrome metabolica in bambini e adolescenti (Smith et al., 2023). In un piccolo studio su 92 coppie madre-bambino (tutti bambini di 6 anni) condotto in Nuova Zelanda, il livello di Hg misurato nei capelli delle madri era correlato al livello di Hg nei capelli dei loro figli, suggerendo

una fonte comune di Hg, cioè una dieta a base di pesce (Karatela et al., 2019). È interessante notare che l'incidenza dell'obesità era significativamente associata a livelli più elevati di Hg nei bambini, ma non nelle madri (Karatela et al., 2019), suggerendo che il Hg è in grado di esercitare un effetto maggiore sullo sviluppo infantile. Il rischio aumenta se la madre è diabetica, in sovrappeso o obesa (Wang et al., 2019a), suggerendo che il Hg potrebbe interagire con altri fattori obesogeni circolanti nel sangue della madre. Al contrario, elevati livelli di folati potrebbero mitigare gli effetti del Hg nel sangue sullo sviluppo di obesità durante l'infanzia (Wang et al., 2019a). In aggiunta, elevate concentrazioni di Hg nel sangue durante il periodo dell'adolescenza sono state associate anche ad aumento dei depositi di grasso sottocutaneo e addominale nella prima età adulta (Betanzos-Robledo et al., 2022). Inoltre, il MeHg aumenta in modo significativo i ROS, portando alla perossidazione lipidica nelle isole pancreatiche e alla diminuzione degli antiossidanti riducenti tiolici e ferrici, mentre stimola le caspasi, portando ad apoptosi (Maqbool et al., 2016). In adipociti 3T3-L1 il MeHg ha aumentato il rilascio di adiponectina e resistina (Chauhan et al., 2019), un ormone rilasciato dagli adipociti che regola i livelli di glucosio nel sangue e l'infiammazione (Tripathi et al., 2020). In un modello di differenziazione degli adipociti 3T3-L1 nel quale MeHg è stato aggiunto continuamente per 8 giorni, questo ha favorito lo sviluppo delle goccioline lipidiche, accumulando più trigliceridi nelle cellule esposte rispetto alle cellule non esposte (Takanezawa et al., 2023), come anche l'espressione dei principali marker di differenziazione degli adipociti maturi. L'intolleranza al glucosio e i bassi livelli di insulina osservati *in vivo* possono essere causati dalla citotossicità del MeHg nelle cellule pancreatiche (Yang et al., 2022). Un recente studio ha dimostrato che l'esposizione al MeHg *in vitro* (0,3, 1,7 o 3,8 mM) per 6 giorni ha aumentato l'accumulo di lipidi in pre-adipociti 3T3-L1 isolati dal tessuto adiposo periviscerale. Inoltre, l'esposizione di adipociti maturi 3T3-L1 al MeHg (100–200 ng/mL) ha comportato un aumento significativo del fattore di crescita dell'endotelio vascolare (VEGF), noto avere un ruolo importante nella patogenesi della sindrome metabolica (Mazidi et al., 2017; Chauhan et al., 2019).

A differenza del MeHg, l'HgCl₂, inorganico, ha dimostrato di avere un'azione anoressizzante in roditori e linee cellulari, portando però ad alterazione dell'espressione dei fattori regolatori dell'adipogenesi, suggerendo una compromissione della funzionalità degli adipociti (Rizzetti et al., 2019). È stato osservato nel tessuto adiposo anche aumento dell'espressione di GRP78, CHOP e

CD11, mostrando il potenziale ruolo dello stress del RE e dei mediatori infiammatori nel danno indotto da Hg sulla fisiologia del tessuto adiposo (Rizzetti et al., 2019). Anche in questo caso vi è un'incongruenza tra la dose di metallo e gli effetti tossici: a concentrazioni più elevate vi è un'inibizione della risposta adipogenica, dovuta alla tossicità e agli effetti pro-ossidanti dell'Hg (Kawakami et al., 2012).

**2. Antimonio: diffusione nell'ambiente,
esposizione, tossicocinetica e
tossicodinamica**

2.1 Introduzione

A seguito dello sviluppo industriale, l'ingente impiego dei metalli pesanti in diversi settori ne ha determinato una maggiore diffusione nel territorio, spesso raggiungendo concentrazioni tossiche per gli organismi viventi (Silva et al., 2017). Uno dei metalli pesanti che negli ultimi anni ha suscitato maggiore interesse è l'antimonio (Sb), dato che il suo impiego è cresciuto in tutto il mondo (He et al., 2012). Inoltre, dato il suo elevato utilizzo e l'insufficiente riciclaggio, le concentrazioni di antimonio nell'ambiente tendono ad aumentare lentamente nel corso del tempo, costituendo una minaccia per la salute (Hu et al., 2021). L'antimonio e i suoi composti, una volta entrati nell'organismo attraverso l'inalazione, l'ingestione o il contatto cutaneo, interagiscono facilmente con i gruppi sulfidrilici delle biomolecole, interferendo con le attività enzimatiche e l'equilibrio ionico delle cellule e provocando alterazioni metaboliche e compromissione della funzionalità di organi vitali (Li et al., 2018a; Yang et al., 2015). Si stima che vengano estratte circa 140.000 tonnellate di antimonio ogni anno destinate a diversi settori industriali (Filella et al., 2002; Shan et al., 2014). Secondo un recente studio, quasi l'80% della produzione di antimonio è oggi concentrata in Cina, Russia e Bolivia (United States Geological Survey, 2021). Nel 2020, la Cina è stato il principale produttore di antimonio a livello mondiale, mentre la Russia si è classificata al secondo posto (Statista, 2021). Nello stesso anno, la produzione mondiale di antimonio è stata stimata in circa 153.000 tonnellate e di queste quasi il 14% veniva impiegato solo dagli Stati Uniti (United States Geological Survey, 2021). Sia l'Unione Europea nel 1976 sia l'USEPA nel 1979 hanno classificato l'antimonio come contaminante che necessita di un controllo prioritario (Bagherifam et al., 2019; Hua et al., 2021). A partire dal 1980, molti paesi hanno adottato pertanto misure di sicurezza per controllare e limitare i livelli di antimonio nell'ambiente.

2.2 Caratteristiche chimiche dell'antimonio

L'antimonio è un composto chimico classificato come semimetallo, in quanto presenta proprietà chimiche intermedie tra metallo e non metallo, e fa parte del gruppo 15 della tavola periodica. Esiste in natura in diversi stati di ossidazione (-V, -III, 0, +III e +V), ma generalmente si trova negli stati +III e +V (Herath et al., 2017), con Sb(III) che risulta più stabile chimicamente rispetto a Sb(V). La forma neutra è l'Sb elementare cristallino bianco. Nella stibina (SbH_3) l'Sb è trivalente negativo, mentre nel suo stato trivalente positivo può esistere come triossido di antimonio (Sb_2O_3), trisolfuro di

antimonio o stibnite (Sb_2S_3), potassio di antimonio tartrato (APT), trifluoruro di antimonio, triioduro di antimonio, acetato di antimonio ed altri. Come Sb(V) si può trovare nel pentafluoruro di antimonio o nel pentacloruro di antimonio (Hazardous Substances Data Bank). Le evidenze indicano che la tossicità dell' Sb(III) nell'uomo è di circa 10 volte superiore a quella della corrispondente forma pentavalente [Sb(V)] (Filella et al., 2020; Verdugo et al., 2017). L'antimonio si presenta anche come impurità in altri metalli preziosi, come i minerali, e viene estratto da questi attraverso il processo di lisciviazione (Celep et al., 2011). Essendo un metallo, l'antimonio non viene alterato dall'umidità dell'aria o dall'acqua, ma se sottoposto ad alte temperature può infiammarsi. Reagisce violentemente con gli alogeni (F, Cl, Br e I) formando trialogenuri.

2.3 Usi e applicazioni

L'antimonio era conosciuto in Cina ed Egitto già nell'antichità, in quanto veniva estratto da altri minerali. I greci e i romani lo utilizzavano soprattutto come unguento per gli occhi nell'ambito della cosmetica e della medicina (Periferakis et al., 2022). Intorno al XVI secolo, l'antimonio veniva invece impiegato per separare l'oro dall'argento, mentre la sua richiesta è aumentata notevolmente durante la Prima e la Seconda Guerra Mondiale. A partire dagli anni '50, l'antimonio viene soprattutto impiegato nell'industria della plastica, dove ancora oggi costituisce oltre il 60% del consumo totale. L'uso diffuso dell'antimonio è dovuto ad alcune sue particolari proprietà: è un materiale duro, fragile, non malleabile, con caratteristiche diverse rispetto ad altri metalli come piombo e ferro, tanto che viene utilizzato in piccole quantità per aumentare la resistenza e la durezza di questi ultimi. Recentemente è aumentato anche il suo utilizzo nell'industria elettronica per la fabbricazione di diodi (Anderson, 2012).

L'antimonio è stato inserito nell'elenco delle cosiddette materie prime critiche, che include i materiali con un crescente interesse economico, con difficoltà di approvvigionamento e con impossibilità di essere sostituiti con altri materiali con proprietà analoghe (Tzamos et al., 2020). Diversi composti contenenti antimonio sono oggi largamente impiegati a livello industriale: l'antimonio triossido (Sb_2O_3), l'antimonio pentossido (Sb_2O_5), l'antimoniato di sodio (NaSbO_3), il trisolfuro di antimonio (Sb_2S_3), il pentasolfuro di antimonio (SbS_5) e il triacetato di antimonio [$\text{Sb}(\text{CH}_3\text{COOH})_3$]. Le principali applicazioni industriali di questi materiali sono

diverse: plastiche ignifughe, componenti delle batterie al piombo, sigillanti per pompe e, in particolar modo, catalizzatori di policondensazione per la produzione del polietilene tereftalato (PET), un materiale termoplastico largamente utilizzato nei tessuti e nei contenitori adibiti alla conservazione e all'imballaggio di alimenti e bevande. Inoltre, il triossido di antimonio (Sb_2O_3) viene spesso aggiunto negli involucri di plastica degli apparecchi elettrici che possono generare calore, proprio per la sua azione sinergizzante di altri additivi ritardanti di fiamma (Dupont et al., 2016). Inoltre, essendo una polvere bianca molto fine, il triossido di antimonio viene talvolta impiegato anche nella pigmentazione di materiali per specifiche applicazioni. L'antimonio viene utilizzato anche come componente di numerosi pigmenti inorganici delle plastiche, come il titanio nichel antimonio giallo, il titanio cromo antimonio giallo, il titanio antimonio manganese marrone e il manganese cromo antimonio marrone. Questi pigmenti risultano infatti molto solidi, durevoli, chimicamente resistenti e termicamente stabili fino a 1000°C . Il loro utilizzo è cresciuto negli ultimi due decenni, soprattutto nelle poliolefine e nell'acrilonitrile-butadiene-stirene, poiché le alternative a base di cadmio o piombo sono state gradualmente debellate per motivi di sicurezza e di inquinamento ambientale.

2.3.1 Ritardante di fiamma nelle plastiche

Nelle plastiche, l'antimonio viene utilizzato come sinergizzante di agenti ritardanti di fiamma alogenati. L'aggiunta di Sb_2O_3 come additivo riduce la quantità di composti alogenati richiesti per avere la stessa potenza come ritardanti di fiamma. L'antimonio produce ossialogenuri volatili (SbO_x) e trialogenuri (SbX_3) di antimonio e favorisce il trasferimento degli atomi di alogeno e antimonio nella fase gassosa, dove fungono da scavenger di radicali liberi ed esplicano il loro effetto di ritardanti di fiamma. Esiste anche la possibilità che l'antimonio presente nella plastica di rifiuti elettronici, una volta decomposta nelle discariche, venga rilasciato nell'ambiente circostante. Questi polimeri, inoltre, possono generare fenantreni bromurati negli inceneritori dei rifiuti urbani o a seguito di incendi accidentali. Infatti, al fine di ridurre e limitare il rilascio di queste sostanze pericolose, è necessario garantire delle adeguate condizioni di pirolisi durante le operazioni di riciclaggio dei rifiuti elettronici contenenti questi ritardanti di fiamma (Grause et al., 2011). L'antimonio come ritardante di fiamma viene impiegato in diversi prodotti, come nei giocattoli, nel rivestimento di seggiolini

per auto e di motori per aerei, in alcuni indumenti per bambini e per i vigili del fuoco (Filella et al., 2020; Hu et al., 2021).

2.3.2 Impiego nelle batterie al piombo

L'antimonio viene utilizzato per realizzare le piastre positive nelle batterie al piombo. Le prime ad essere state prodotte erano costituite circa per il 5-11% da antimonio (Berndt e Nijhawan, 1976), mentre nelle attuali batterie il contenuto di antimonio è stato radicalmente ridotto fino a valori compresi tra lo 0,5 e il 3% in peso (Wang et al., 2018). L'antimonio viene impiegato in quanto fornisce la resistenza meccanica e la colabilità necessarie alle griglie. Inoltre, rende agevole la carica della batteria rispettando buone proprietà cicliche, ma necessita di controlli frequenti per garantire il regolare volume di elettroliti, data la maggior perdita di acqua. Le leghe Pb-Ca-Sn o Pb-Sn sono state impiegate come alternative alle leghe Pb-Sb per superare questa limitazione (Pavlov, 2017).

2.3.3 Impiego nell'industria del PET

L'uso più importante dell'antimonio è come catalizzatore della reazione di policondensazione nella produzione di poliesteri termoplastici, soprattutto polietilene tereftalato (PET). Si utilizzano a tale scopo solitamente ossidi, acetati e glicolati di antimonio. Il processo di policondensazione prevede l'attivazione di gruppi idrossilici terminali grazie alla coordinazione con l'alcoossido di antimonio. La plastica in PET viene utilizzata principalmente nell'industria dell'imballaggio alimentare (per la conservazione degli alimenti o nelle bottiglie per bevande) e per la produzione di fibre tessili. Il PET costituisce il materiale di scelta per queste applicazioni poiché è trasparente e infrangibile, leggero e impermeabile alla CO₂. Viene utilizzato infatti per contenere bevande analcoliche gassate, acqua minerale, oli alimentari, succhi e salse, e diversi alimenti. Il PET viene anche usato per la realizzazione di vassoi per alimenti da cuocere nel forno convenzionale o a microonde, proprio perché fornisce maggiore stabilità termica (Gilbert, 2016). Anche se vi sono ad oggi limitazioni all'uso dell'antimonio, a causa del suo impatto ambientale negativo, si prevede che possa rimanere ancora per anni un componente insostituibile nella produzione industriale del PET. L'applicazione sicuramente più rilevante dell'antimonio è nella plastica in PET delle bottiglie di acqua. Circa 485 miliardi di bottiglie in PET sono state prodotte solo nel 2016 (www.statista.com), numero sicuramente cresciuto negli ultimi anni.

L'antimonio entra a far parte anche della produzione del vetro per la sua azione opacizzante (Turner e Filella, 2020), anche se con valori meno significativi rispetto alle bottiglie in PET.

2.3.4 Uso farmaceutico

L'impiego dell'antimonio nel campo della medicina risale all'antichità, a partire dal XVII secolo in Europa. Nella medicina moderna l'antimonio è stato utilizzato per trattare la tripanosomiasi africana (Haldar et al., 2011) e diverse malattie parassitarie protozoarie, come la leishmaniosi (Frezard et al., 2009). Questi farmaci contenenti antimonio però causano diversi effetti collaterali, come mal di testa, nausea, vomito, diarrea, dolori muscolari e articolari, tosse, sincopi e reazioni anafilattiche. In alcuni studi è stato evidenziato anche la potenziale efficacia dei farmaci contenenti antimonio per il trattamento della sifilide, della malaria e della framboesia tropicale (Periferakis et al., 2022). Recentemente, i complessi ditiocarbammato di antimonio sono stati studiati per la loro potenziale attività antibatterica (Ariza-Roldán et al., 2017) e antifungina (Sharma et al., 2013), oltre ad essere anche considerati potenziali agenti antitumorali (Urgut et al., 2016).

2.4 Contaminazione ambientale da antimonio

Come accennato precedentemente, l'industrializzazione e l'urbanizzazione rappresentano le due principali cause di incremento del contenuto di metalli pesanti nell'ambiente. Il suolo costituisce un importante deposito di sostanze potenzialmente tossiche (Patinha et al., 2018). Le aree minerarie sono particolarmente inquinate da metalli pesanti e solo parte di essi sono attribuibili ai fenomeni geologici ed agli agenti atmosferici. L'antimonio viene rilasciato nel suolo e negli ambienti acquatici da diverse fonti, come l'erosione dei minerali solforati, la lisciviazione dai rifiuti urbani e le attività industriali, tra cui le operazioni metallurgiche e di fusione (Diquattro et al., 2020; Diquattro et al., 2021). Un altro particolare ruolo nell'inquinamento ambientale è svolto dai motori a combustione interna e dall'impiego di combustibili fossili contenenti antimonio (Tian et al., 2011). Sono in corso anche diversi studi finalizzati a valutare i rischi per l'uomo e per l'ambiente derivanti dallo smaltimento dei rifiuti elettronici. Nell'ambiente l'antimonio si ritrova solitamente nelle forme di stibnite (Sb_2S_3) e di triossido di antimonio (Sb_2O_3) (Zhuang et al., 2018).

2.4.1 Acque superficiali

L'antimonio si può ritrovare in diversi luoghi a causa di processi naturali e attività umane. Il metallo viene rilasciato principalmente nelle acque dei fiumi, nelle falde acquifere, nell'aria secca e umida, nei sedimenti e nel particolato sospeso (Ungureanu et al., 2015). La concentrazione del metallo nelle acque superficiali dipende dalla vicinanza alla fonte d'inquinamento, dalla posizione geografica, dalle condizioni fisiche e chimiche. Inoltre, è evidente che l'inquinamento da antimonio è associato all'attività umana; infatti, nell'ambiente acquatico incontaminato i livelli del metallo sono davvero bassi. Negli ultimi anni sono state rilevate diverse specie di antimonio nelle acque, nella forma di Sb(III), Sb(V) e Sb organico (acido monometilantimonico e acido dimetilantimonico) (Long et al., 2020; Li et al., 2018b). L'antimonio nelle acque superficiali esiste principalmente sotto forma di Sb(V), mentre l'Sb(III) prevale in quelle sotterranee e nei sedimenti (Zhu et al., 2010). Campioni di acque superficiali provenienti da 11 diverse regioni, tra cui Nord Europa, Europa meridionale, Germania, Austria, Alaska, Scozia, Irlanda, Canada, Giappone, Svalbard e Finlandia, presentavano valori medi di antimonio tra 0,03 e 0,07 µg/L (Reimann et al., 2010). Le attività minerarie possono influenzare la concentrazione di antimonio nelle acque (Long et al., 2020); ad esempio, l'analisi di campioni di acqua raccolti in un sito minerario di antimonio in Xikuangshan (una delle più importanti miniere di antimonio nel mondo che si trova nello Hunan, nel centro-sud della Cina) ha rilevato concentrazioni di antimonio nell'intervallo di 2,0-6,384 µg/L, livello considerevolmente superiore alla concentrazione media globale del metallo (1 µg/L) (Wang et al., 2011). È inoltre necessario considerare anche l'influenza delle condizioni meteorologiche sulla distribuzione di antimonio nelle acque, in particolare nei siti particolarmente inquinati. Ad esempio, le piogge intense possono aumentare i livelli di antimonio negli oceani attraverso i fiumi ed i sedimenti che derivano dalle zone agricole (Armiento et al., 2017).

2.4.2 Acque sotterranee

Le acque sotterranee sono una delle fonti più importanti di acqua dolce per l'uomo. Tuttavia, a causa della crescente contaminazione da metalli pesanti, l'inquinamento delle acque sotterranee è ad oggi un problema di notevole interesse. L'inquinamento da antimonio delle acque sotterranee può derivare da fonti geologiche, come alterazioni chimiche e biologiche delle materie, lisciviazione o deposizione, oppure da

fonti antropogeniche, come le attività minerarie e industriali o l'uso di pesticidi (Etim, 2017). Solitamente i composti solubili contenenti antimonio tendono ad essere trasportati dall'acqua, mentre le forme meno solubili vengono assorbite dal suolo. In un recente studio sono stati rilevati nelle acque sotterranee livelli di antimonio in un intervallo compreso tra $13,5 \pm 15,0$ e $33,2 \pm 36,8$ $\mu\text{g/L}$ (Etim, 2017). Fatta eccezione delle zone ad alto tasso di inquinamento, i livelli di antimonio nelle acque sotterranee non superano comunque i limiti di sicurezza. Lo studio di Alderton et al. (2014) ha mostrato che i campioni di acque superficiali contenevano più antimonio (in media 2,1 $\mu\text{g/L}$) rispetto ai campioni di acque sotterranee (in media 0,6 $\mu\text{g/L}$).

2.4.3 Acque marine

A causa delle limitazioni tecniche e delle diverse aree oceaniche esistenti, ci sono pochi dati in letteratura sui livelli di antimonio nelle acque marine. L'antimonio è inattivo chimicamente nell'acqua del mare ed i suoi livelli possono mettere in luce le caratteristiche geochimiche della costa (Zhang et al., 2010). La concentrazione media di Sb nelle acque del mare è di circa 0,2 $\mu\text{g/L}$ (Filella et al., 2002).

2.4.4 Antimonio nel suolo

I livelli di antimonio nei sedimenti e nel suolo sono influenzati da diversi fattori, quali le caratteristiche geologiche, le acque sotterranee, la presenza di ceneri vulcaniche e fonti antropogeniche (He et al., 2012). Rispetto ad altri elementi presenti nella crosta terrestre, i livelli di antimonio sono piuttosto bassi, in un intervallo tra 0,2 e 0,3 $\mu\text{g/g}$ (Fort et al., 2016; Hiller et al., 2012). Nelle rocce la concentrazione del metallo varia da 0,2 ad alcuni $\mu\text{g/g}$, mentre nello scisto può raggiungere livelli fino a 300 $\mu\text{g/g}$ (Zhuang et al., 2018). Il limite massimo di antimonio nel suolo consentito dalla WHO è di 36 mg/kg (Tang et al., 2023).

Le principali cause di inquinamento del suolo sono sicuramente le operazioni di tipo minerario e l'impiego industriale degli stessi minerali. Gran parte dell'antimonio rilasciato nell'ambiente può essere assorbito dall'alluminio, dall'ossido di ferro e dall'ossido di manganese. In tal caso, il metallo si ritrova soprattutto nella forma di Sb(V) (Ji et al., 2017). Le zone in cui sorgono delle miniere sono soggette ad una maggiore contaminazione da parte del metallo. Ad esempio, sono state rilevate concentrazioni di antimonio piuttosto alte (4,4 mg/kg) in un terreno minerario abbandonato (Cidu et al., 2014); in Australia i livelli di antimonio arrivavano fino a

39,4 mg/kg entro 300 metri dalla miniera del Nuovo Galles del Sud (Tighe et al., 2005). Poiché questo metallo viene spesso impiegato come materia prima per la produzione di proiettili, costituendo circa il 2-8% (p/p), anche i terreni luogo di sparatorie di guerra, o anche di esercitazioni, possono presentare elevati livelli di antimonio (He et al., 2019). Per esempio, la concentrazione di antimonio nel suolo di un poligono di tiro svizzero era di 13,8 g/kg (Johnson et al., 2005), mentre in un campo di addestramento in Canada raggiungeva i 570 mg/kg (Laporte-Saumure et al., 2011). Un'altra causa di inquinamento del suolo è la sedimentazione di sostanze inquinanti atmosferiche e lo scarico di acque reflue. Inoltre, a causa della combustione della benzina e dell'uso dell'antimonio nella produzione di pneumatici e di guarnizioni dei freni, i livelli di antimonio nei terreni vicino alle autostrade sono risultati molto elevati (Ran, 2011; Hu et al., 2015). Ricordiamo che un'elevata concentrazione di antimonio nel suolo e nei sedimenti può essere tossica per gli ecosistemi e può incidere sulla salute dell'uomo, poiché si accumula nella catena alimentare (Shahid et al., 2019).

2.4.5 Antimonio nell'atmosfera

L'antimonio si trova nell'atmosfera soprattutto sotto forma di particelle: secondo ricerche risalenti al 2010, i livelli di antimonio raggiungevano livelli da diversi ng/m³ a decine di ng/m³ in tutto il mondo (Sundar e Chakravarty, 2010). Anche se non rappresenta il principale inquinante nell'atmosfera, l'estrazione, la fusione e la combustione di materiali fossili hanno contribuito all'accumulo di antimonio a livello atmosferico. Sono state rilasciate nell'atmosfera circa 2.800 tonnellate di antimonio a seguito di operazioni di estrazione mineraria e combustione di materiali fossili (He et al., 2012). Dall'altra parte, ogni anno circa 700 tonnellate di antimonio vengono rilasciate nell'atmosfera dalle eruzioni vulcaniche (Filella et al., 2002). Tuttavia, l'inquinamento da antimonio nell'atmosfera urbana deriva principalmente dai trasporti, dalla combustione della benzina e dell'usura dei freni (Smichowski et al., 2008). Alcuni paesi hanno già istituito delle normative per i quantitativi massimi di antimonio riscontrabili nell'aria. Gli Stati Uniti, ad esempio, hanno istituito un limite di 0,5 mg/m³ (Rakshit et al., 2011).

2.5 Modalità di esposizione all'antimonio

L'incremento dell'impiego dell'antimonio, causato dai processi di industrializzazione e urbanizzazione, ha modificato le modalità ed il grado di diffusione di questo metallo. L'antimonio è stato rilevato nell'uomo, in piante e animali (Feng et al., 2013). L'uomo entra in contatto con l'antimonio attraverso fonti di tipo naturale o di tipo antropogenico, tramite particelle aeree, acqua potabile, cibo e altri prodotti contaminati; l'assunzione può avvenire attraverso la via orale, cutanea e polmonare (Benzile et al., 2011). I livelli di antimonio nel corpo umano possono raggiungere 0,1 µg/g, in ossa, capelli e sangue (Filella et al., 2012; Wu e Chen, 2017). Inoltre, poiché il metallo ha un'elevata capacità di mobilità nel suolo, questo può facilmente depositarsi e accumularsi nelle piante, che sono in grado di assorbirlo tramite i canali delle acquaporine (Feng et al., 2013). Nelle aree non particolarmente inquinate, le concentrazioni di antimonio nelle piante sono comprese tra 0,2 e 50 ng/g, mentre nelle zone inquinate raggiungono valori più elevati (Feng et al., 2013). Alcune specie di piante, come *Achillea ageratum*, *Plantago lanceolata* e *Silene vulgaris*, possono essere utilizzate come indicatori di inquinamento di antimonio del suolo. Ad esempio, nelle vecchie aree minerarie di antimonio in Italia, l'accumulo di antimonio in foglie e fiori di *Achillea* arrivano fino a circa 1.367 mg/kg e 1.105 mg/kg, nelle radici di *Plantago lanceolata* fino a 1.150 mg/kg, negli steli di *Silene vulgaris* fino a 1.164 mg/kg (Baroni et al., 2000).

Sono diversi i composti contenenti antimonio presenti anche in ambiente acquoso (Xi et al., 2014): la forma trivalente è predominante in condizioni riducenti, mentre la forma pentavalente in ambienti ossidanti, come i terreni. La forma di Sb(III), oltre ad essere più tossica, è anche la più diffusa.

Il livello massimo di esposizione all'antimonio consentito nell'uomo, anche detto *total daily intake* (TDI), è di 0,6 µg di antimonio per kg di peso corporeo al giorno (WHO, 2011).

Possiamo distinguere un'esposizione di tipo professionale e una non professionale. La prima riguarda i lavoratori e le persone che vivono in specifiche aree geografiche particolarmente inquinate per via di attività industriali e di estrazione mineraria. Ad esempio, le concentrazioni medie di antimonio nelle acque reflue, nelle polveri di lavorazione e nei rifiuti solidi derivanti dalla lavorazione dell'antimonio nello Xikouangshan (Cina) erano 4,415 mg/L, 2038,5 mg/kg e 1654,462 mg/kg rispettivamente, superando i valori di riferimento pari a 0,005 mg/L nell'acqua e 2,98

mg/kg nel terreno (Zhou et al., 2020b). Per tale motivo, le persone che vivono in queste aree particolarmente inquinate sono maggiormente esposte ad antimonio. L'esposizione di tipo professionale è più difficile da quantificare, in quanto è accompagnata spesso dall'esposizione simultanea a più metalli pesanti, come arsenico e piombo, rendendo difficile distinguere i diversi meccanismi di tossicità. In ogni caso, se i dispositivi di protezione individuali e le norme di sicurezza vengono rispettati correttamente dai lavoratori, il pericolo rimane minimo, a meno di incidenti sul luogo di lavoro. Al contrario, parliamo di esposizione di tipo non professionale per le persone che entrano in contatto con bassi livelli di antimonio, ad esempio attraverso acqua, cibo e rifiuti contaminati. Ricordiamo, infatti, che i metalli e i metalloidi presentano tempi di permanenza nel suolo molto lunghi nel tempo, il che può risultare, a lungo termine, nel raggiungimento di concentrazioni elevate nell'ambiente pur avendone limitato l'impiego da parte dell'uomo.

Inoltre, l'avvelenamento da antimonio può essere suddiviso in due categorie diverse: acuto e cronico. L'avvelenamento acuto si manifesta specialmente nel tratto GI, provocando vomito, disidratazione, dolori muscolari, crampi ed ematuria. Enuresi e tossine, che si accumulano in tal caso nelle urine, sono anche responsabili dell'insorgenza di cirrosi epatica, necrosi muscolare, nefrite e pancreatite (Pierart et al., 2015). Dall'altra parte, l'avvelenamento cronico si manifesta solitamente con alterazioni significative della funzionalità polmonare ed insorgenza di bronchite cronica, enfisema, tubercolosi, aderenze pleuriche e pneumoconiosi, soprattutto per i soggetti esposti professionalmente a basse concentrazioni di antimonio per lunghi periodi di tempo (Pierart et al., 2015). Infatti, l'avvelenamento da antimonio può avere lunghi periodi di incubazione.

2.5.1 Esposizione correlata al consumo di cibo

L'antimonio è stato ritrovato anche negli alimenti. L'esposizione ad antimonio tramite l'alimentazione avviene in primo luogo a partire dalle piante, che lo assorbono dai terreni contaminati. Questo fenomeno è influenzato anche dalla posizione delle piante nella catena alimentare, ovvero se la pianta viene consumata direttamente dall'uomo o se viene consumata prima dagli animali erbivori e poi questi ultimi dall'uomo (He, 2007). Il metallo è stato ritrovato anche in verdure e alimenti come carote, cipolle, pomodori e barbabietole. Solitamente, i frutti di mare non costituiscono fonte di esposizione al metallo, fatta eccezione per le zone costiere particolarmente soggette ad

attività industriali (Garg e Ramakrishna, 2006). Inoltre, un'altra importante fonte di antimonio, che recentemente ha destato maggiore preoccupazione, è costituita dagli imballaggi alimentari. Infatti, come già accennato precedentemente, l'antimonio viene utilizzato come catalizzatore nella produzione della plastica PET impiegata nei contenitori per alimenti e nelle bottiglie per bevande. È noto che il fenomeno di rilascio del metallo dal PET diventa ancora più significativo se il contenitore di plastica viene riscaldato in forno a microonde (Filella, 2020), oppure se contiene succo di agrumi, e quindi acido citrico, che è in grado di preservare lo stato di ossidazione dell'Sb(III) rilasciato.

2.5.2 Esposizione correlata al consumo di acqua

La prima fonte più ovvia di intossicazione da antimonio è l'acqua di rubinetto, anche se gran parte dell'antimonio presente nell'acqua potabile viene eliminato tramite metodi di depurazione dell'acqua, tra cui il più efficiente ed economico è il processo di coagulazione, flocculazione ed assorbimento (Fu e Wang, 2011). Nonostante l'efficacia di queste tecniche, è possibile che permangano sostanze organiche, che possono così essere assunte dall'uomo (Inam et al., 2019). In tal caso, la forma predominante è Sb(V), poiché nei metodi di depurazione vengono solitamente utilizzati agenti ad azione ossidante e l'Sb(III) è meno stabile in soluzione acquosa.

Se da una parte la contaminazione dell'acqua di rubinetto è un evento piuttosto raro, dall'altra parte il rischio risulta di gran lunga maggiore per l'acqua in bottiglia. Infatti, nell'industria della plastica, l'antimonio triossido viene utilizzato come catalizzatore nella produzione del PET; di conseguenza, la plastica di cui sono costituite le bottiglie ne contiene circa 190-300 mg/kg. A causa del processo di lisciviazione, parte dell'antimonio utilizzato nella fase di produzione è in grado di migrare dalla bottiglia in PET verso l'acqua in essa contenuta (Filella, 2020). L'antimonio che migra nell'acqua conservata in bottiglie PET di buona qualità rientra spesso nei limiti stabiliti, soprattutto se il pre-polimero utilizzato nella produzione delle bottiglie è anch'esso di buona qualità. Le principali strategie per ridurre il rilascio di antimonio nelle bevande sono il riutilizzo e l'uso di volumi di liquido maggiori (Tukur et al., 2012). Sono in corso anche diversi studi riguardanti lo sviluppo di nuovi catalizzatori di policondensazione che non contengano antimonio, quali quelli basati su titanio (Ti), alluminio (Al) e diossido di germanio (GeO₂) (Quintana et al., 2011). L'azienda inglese Catalytic Technologies, ad esempio, ha sviluppato un nuovo tipo di

catalizzatore a base di Ti (CTL Ti638UP) per la produzione del PET in sostituzione all'antimonio. Tuttavia, l'introduzione di un nuovo catalizzatore in una produzione industriale così ingente come quella del poliestere richiede del tempo per ottenere ottime prestazioni finali.

Risulta ancora oggi complicato stabilire la correlazione tra le concentrazioni di antimonio ritrovate nell'acqua e le concentrazioni effettivamente presenti nel PET delle bottiglie corrispondenti. La variabilità dei dati può essere spiegata in parte dal fatto che spesso non vi sono controlli idonei e che vi sono dichiarazioni false riguardo la concentrazione di antimonio in origine nell'acqua di fonte o riguardo al reale tempo che intercorre tra l'imbottigliamento e l'utilizzo dell'acqua da parte dell'uomo. Inoltre, entra in gioco anche la diversa qualità dei materiali PET che vengono impiegati, le materie prime o le tecnologie usate per la produzione (Fan et al., 2014). La variabilità della migrazione dell'antimonio potrebbe essere correlata anche al grado di cristallizzazione e all'orientamento del polimero. Infatti, il PET può esistere in uno stato semicristallino o amorfo, dove la sua cristallinità solitamente viene influenzata da sbalzi termici o da altre condizioni di stress subiti. Anche se aggiunto come triossido di antimonio (Sb_2O_3), il metallo è presente come complesso glicolato nel processo di polimerizzazione, poiché l'ossido è solubile nel solvente glicole etilenico. In alcuni campioni di plastica, l'Sb(III) si ossida parzialmente a Sb(V), ma sempre complessato con il glicole. La diffusività dell'antimonio, quindi, varia a seconda che si trovi libero o legato al polimero. Ulteriori studi sarebbero necessari per chiarire i fattori che determinano un diverso rilascio di antimonio dai polimeri in PET. In ogni caso, i livelli di antimonio rilasciato non superano mai i pochi $\mu\text{g/L}$ e rappresentano solo una piccola percentuale dell'antimonio totale presente nella bottiglia in PET, dimostrando quindi una bassa diffusività del metallo a temperatura ambiente. Il discorso cambia se entrano in gioco altri parametri, come il deterioramento del polimero per contatto con l'acqua o l'aumento della temperatura. Infatti, periodo e temperatura di conservazione sono i due principali parametri alla base del fenomeno di migrazione dell'antimonio dalla plastica PET alla bevanda in bottiglia. Uno studio ha già dimostrato che il rilascio di antimonio dalle bottiglie in PET è in grado di superare il limite stabilito dall'USEPA in un periodo temporale di 176-38-12-4,7-2,3-1,3 giorni, quando esposti rispettivamente a temperature di 60, 65, 70, 75, 80 e 85°C (Westerhoff et al., 2008). In generale, aumentando il tempo di conservazione cresce anche il tasso di rilascio di antimonio, come anche con le alte temperature, specialmente quando si raggiungono

livelli intorno ai 60-70°C. Per tale motivo, non è mai consigliabile lasciare le bottiglie in PET in luoghi molto caldi o troppo esposti al calore. Per quanto riguarda i raggi UV, questi non sembrano influire significativamente sul rilascio di antimonio, se non per il calore che ne consegue, rendendo difficile distinguere i due effetti (Tukur et al., 2012). Anche il pH dell'acqua contenuta nelle bottiglie PET non sembra influire sul rilascio di antimonio. Al contrario, vi è ancora un forte dibattito sull'interazione dei sali presenti nella bevanda: in particolar modo, il rilascio di antimonio aumenta con l'aumentare della concentrazione di calcio (Greifenstein et al., 2013), mentre decresce in presenza di elevati livelli di NaCl (Leechart et al., 2015).

Un ulteriore fenomeno che può verificarsi a seguito della migrazione dell'antimonio dal PET è la formazione di prodotti organo-antimonio nelle bevande in bottiglia, come quelle alcoliche (Carneado et al., 2017). Ad esempio, in 12 campioni di bevande alcoliche conservate in bottiglie PET sono state riportate delle concentrazioni di antimonio variabili da 0,4 a 4 ppb, a causa della formazione di un complesso acetaldeide-bisolfito piruvato-antimonio ($C_7H_{14}O_{12}S_2Sb$). Inoltre, è stato anche determinato il contenuto di antimonio in una selezione di differenti succhi confezionati sia in bottiglie PET sia in altri materiali (Hansen e Pergantis, 2006). I succhi sono infatti noti per contenere elevate quantità di acidi organici, come acido citrico, malico e ascorbico, che sono anche molecole complessanti l'Sb(III). Altri studi hanno invece evidenziato che bollire e riscaldare in forno a microonde acqua in bottiglie in PET può incrementare il rischio di migrazione dell'antimonio (Cheng et al., 2010).

2.5.3 Inalazione ed esposizione cutanea da oggetti domestici

Attualmente sono disponibili pochi studi riguardo al rilascio nell'aria dell'antimonio utilizzato come ritardante di fiamma nelle coperture in polivinilcloruro (PVC), ad esempio, in lettini o materassi per bambini. Fonte di preoccupazione è stato il fatto che la contaminazione dei materassi con il fungo aerobico *Scopulariopsis brevicaulis* poteva provocare metilazione del triossido di antimonio e causare il rilascio di gas trimetilantimonio. In realtà, questa ipotesi è stata confermata solo in caso di temperature al di sopra di 80°C (Snedeker, 2014a). Per quanto concerne la via di esposizione cutanea, sono stati rilevati diversi metalli tossici nei giocattoli per bambini, sia realizzati in PET che in PVC. Tuttavia, sarebbero necessarie ulteriori ricerche per valutare se tali giocattoli possano essere fonte di contaminazione cutanea o orale per i bambini. Alcuni test analitici hanno utilizzato condizioni sperimentali

estreme per stimare la migrazione dell'antimonio, non risultando attendibili per valutare il trasferimento del metallo dalle superfici alle mani o alla bocca dei bambini (Kawamura et al., 2006). Inoltre, per quanto concerne l'antimonio usato nei dispositivi elettronici, non sono noti i livelli di esposizione cutanea. Al contrario, l'antimonio usato nei tessuti ignifughi degli indumenti da lavoro non costituisce fonte di esposizione cutanea professionale (de Perio et al., 2010).

2.6 Tossicocinetica

I metalli pesanti influiscono negativamente sulla salute dell'uomo, soprattutto per quanto concerne l'esposizione a lungo termine. Tuttavia, solo una parte dell'antimonio con cui l'uomo entra in contatto viene realmente assorbita dai tessuti umani, determinando l'insorgenza di diverse reazioni avverse (Benzile et al., 2011). Per tal motivo, risulta più rilevante valutare la biodisponibilità dell'inquinante nell'organismo piuttosto che il suo contenuto totale nelle diverse fonti di esposizione (Pelfrène et al., 2017). Si ritiene che la tossicità dell'antimonio sia pari o addirittura superiore a quella di altri metalli pesanti, come l'arsenico; la forma trivalente Sb(III), inoltre, risulta più tossica rispetto alla forma pentavalente Sb(V) (Filella et al., 2020; Verdugo et al., 2017). Nonostante le somiglianze dell'antimonio con l'arsenico, bisogna evidenziare che solo le caratteristiche delle specie trivalenti sono comparabili, mentre le forme pentavalenti di antimonio e arsenico hanno strutture diverse (Allen et al., 2013) e possono quindi avere effetti diversi sull'organismo umano (Tamás, 2016).

2.6.1 Assorbimento

In linea generale, l'antimonio è poco assorbito e il suo assorbimento dipende dal composto chimico iniziale. L'assorbimento medio del metallo a livello respiratorio è intorno al 15%, un valore simile al tasso di assorbimento nel tratto GI. I principali fattori che influenzano questi effetti sono la dimensione delle particelle e la solubilità. Sono stati riscontrati elevati livelli di antimonio nel sangue e nelle urine di lavoratori esposti al metallo in ambienti minerari e industriali, in cui l'assorbimento avviene prevalentemente per via inalatoria (Periferakis et al., 2022). Le concentrazioni di antimonio rilevate nei polmoni di soggetti esposti professionalmente sono proporzionali al contenuto del contaminante nell'aria. Anche le donne incinte che lavoravano nelle fonderie di antimonio presentavano livelli significativi a livello della placenta e nel liquido amniotico.

Le particelle di antimonio che vengono inalate si depositano nel tratto respiratorio e sono soggette a tre fenomeni: trasporto mucociliare bronchiale e tracheale verso il tratto GI, trasporto ai linfonodi toracici e, infine, assorbimento a livello sanguigno e linfatico e trasporto in altri tessuti corporei. Questi processi variano in base alle caratteristiche fisiche dei composti contenenti antimonio, come dimensione delle particelle e solubilità delle molecole. Le particelle con diametro maggiore di 5 μm si depositano nelle vie aeree superiori (regioni extratoraciche e tracheobronchiali) e vengono eliminate dalle vie respiratorie attraverso il trasporto mucociliare verso il tratto GI. Le particelle più piccole si depositano nelle zone polmonari (bronchioli terminali e alveoli) e vengono eliminate principalmente mediante assorbimento, drenaggio linfatico, fagocitosi da parte di macrofagi e flusso mucociliare verso le vie aeree superiori. L'assorbimento polmonare aumenta con la durata dell'esposizione, mentre la velocità di assorbimento nel sangue dipende dalla sua solubilità.

L'assorbimento dell'antimonio a livello GI è compreso tra il 5-15% della quantità totale di antimonio ingerito (Falta et al., 2008), e provoca diversi effetti avversi. I meccanismi di assorbimento GI dell'antimonio possono anche saturarsi. Un confronto delle concentrazioni ematiche 24 ore dopo la somministrazione di 100 o 1.000 mg/kg di triossido di antimonio ha rilevato una differenza solo di 2 volte, anche se c'era una differenza di 10 volte nella dose (Kirkland et al., 2007).

Inoltre, alcuni composti contenenti antimonio possono essere assorbiti attraverso la pelle.

L'antimonio entra nelle cellule attraverso le acquaporine (Mukhopadhyay et al., 2014). In particolare, è stato evidenziato che l'Sb(III) attraversa le membrane biologiche tramite l'acquaporina GlpF nel batterio *Escherichia coli*, lo stesso canale coinvolto nell'ingresso dell'As(III) (Meng et al., 2004). Questa proteina appartiene alla sottofamiglia delle acquagliceroporine e consente l'ingresso all'acqua e a piccoli soluti privi di carica elettrica (Hachez e Chaumont, 2010). È stato dimostrato che la proteina Fps1, appartenente alla stessa sottofamiglia, permette l'ingresso dell'Sb(III) nelle cellule eucariotiche di *Saccharomyces cerevisiae*, suggerendo, quindi, che questa sia la via deputata all'assorbimento dei metallodi nelle cellule eucariotiche (Mukhopadhyay et al., 2014). Studi recenti hanno invece evidenziato che la proteina AQP9 è impiegata nel trasporto dell'antimonio nell'organismo umano (Periferakis et al., 2022). Essendo le acquaporine dei canali bidirezionali, è probabile che consentano il trasporto dell'antimonio anche al di fuori della cellula, agendo quindi come

meccanismo di detossificazione cellulare. Inoltre, sulla base del fatto che il trasportatore GLUT1 e le permeasi esose permettono il trasporto dell'As(III) in alcune cellule non umane, è stato ipotizzato che tali proteine possano essere coinvolte anche nel trasporto dell'Sb(III). Al contrario, la via di ingresso dell'Sb(V) rimane ad oggi ancora poco conosciuta (Tamás, 2016); alcuni ipotizzano che possano essere coinvolti i trasportatori del fosfato, che intervengono anche nel trasporto di As(V) (Maciaszczyk-Dziubinska et al., 2012; Zangi et al., 2012). Sb(III) e Sb(V) possono entrare negli eritrociti umani, passando attraverso specifici canali (Barrera et al., 2016). L'antimonio può infatti accumularsi in queste cellule interagendo con le proteine, come l'emoglobina (Wu et al., 2018). È stato anche suggerito che l'antimonio trivalente formi un complesso stabile con il glutatione, fornendo un possibile meccanismo di trasporto.

2.6.2 Distribuzione

Una volta assorbito, l'antimonio è in grado di distribuirsi nei fluidi e tessuti corporei attraverso il circolo sistemico. Filella e colleghi (2012, 2013a, 2013b) hanno rilevato delle concentrazioni significative di antimonio in diversi tessuti umani, tra cui sangue, capelli, unghie, denti, urina, latte e saliva. Di norma le persone esposte professionalmente al metallo hanno delle concentrazioni di antimonio superiori rispetto a chi non è esposto professionalmente. Ad esempio, il livello medio di antimonio nel sangue di persone che vivono nella città mineraria boliviana di Oruru è di circa 13,55 µg/L (Barbieri et al., 2016), superiore rispetto ai livelli rilevati a seguito di esposizione non professionale al metallo in altri studi, come 1,76 µg/L (da Silva Ferreira et al., 2019), 0,2 µg/L (Iwai-Shimada et al., 2019) e 1,67 µg/L (Wang et al., 2020c).

Ad oggi vi sono ancora poche informazioni riguardo le modalità di distribuzione dei composti dell'antimonio nell'organismo umano. Le concentrazioni più elevate di antimonio si ritrovano nei polmoni (a seguito di esposizione per inalazione), nei globuli rossi, nel fegato, nei reni, nelle ossa, nell'intestino (per esposizione orale), nella milza e nella tiroide. Nel sangue, l'antimonio pentavalente si trova principalmente nel siero, mentre l'antimonio trivalente è stato individuato principalmente nei globuli rossi, nella frazione emoglobinica (Ribeiro et al., 2010).

Esistono pochi dati riguardo invece al trasferimento madre-figlio del metallo. Uno studio condotto su donne incinte in Bolivia ha evidenziato una significativa

correlazione tra i livelli nel sangue materno e i livelli nel cordone ombelicale (Barbieri et al., 2016). Diversi esperimenti in cui alle madri di ratto sono state somministrati 300 mg di Sb(V)/kg/giorno come antimonio di meglumina tramite iniezioni sottocutanee durante la gestazione e/o l'allattamento hanno dimostrato il trasferimento dell'antimonio madre-feto e madre-cucciolo lattante (Coelho et al., 2014).

2.6.3 Metabolismo

Pochi dati sono disponibili sulla conversione *in vivo* dell'antimonio pentavalente in antimonio trivalente. Uno studio ha evidenziato che il glutatione (GSH) è l'agente riducente che permette la riduzione di Sb(V) in Sb(III), con conseguente diminuzione del rapporto glutatione ridotto/glutazione ossidato (GSH/GSSG) (Lopez et al., 2015). Anche gli stessi componenti cellulari potrebbero contribuire alla trasformazione di Sb(V) in Sb(III) (Canto et al., 2019). Negli uomini a cui è stata somministrata Ulamina (un farmaco sperimentale contenente pentacloruro di antimonio e N-metil-glucamina) tramite iniezione intramuscolare, il 23% dell'antimonio pentavalente è stato convertito in antimonio trivalente (Vasquez et al., 2006).

Il processo di metilazione è il meccanismo molecolare più impiegato per eliminare l'antimonio dall'organismo; infatti, sono stati rilevati composti di antimonio metilati nelle urine e nella saliva (Ye et al., 2018). Anche i microorganismi che risiedono a livello intestinale svolgono un importante ruolo nel processo di metilazione dell'antimonio (Diaz-Bone e Van de Wiele, 2010). L'antimonio può interagire in modo covalente con gruppi sulfidrilici e fosfato e avere interazioni di legame reversibili con diversi ligandi endogeni, come le proteine.

2.6.4 Eliminazione

Ad oggi vi sono conoscenze limitate riguardo all'escrezione dell'antimonio in seguito ad inalazione, esposizione orale o cutanea. L'antimonio viene escreto dall'organismo principalmente attraverso le urine e le feci. Parte dell'antimonio eliminato tramite le feci rappresenta l'antimonio non assorbito, che viene espulso dai polmoni attraverso l'attività mucociliare verso il tratto GI. L'antimonio assorbito a livello intestinale viene escreto principalmente nelle urine e nelle feci, ma in misura variabile, a seconda della sua forma chimica. Infatti, l'antimonio pentavalente viene rapidamente eliminato nelle urine, mentre la forma trivalente viene escreta principalmente nelle feci impiegando un tempo maggiore. Le persone esposte ad elevate concentrazioni di antimonio hanno

anche livelli più alti nelle urine. Risultati recenti hanno mostrato diversi tassi di escrezione nelle urine, come 0,08 µg/24 ore in uno studio condotto in Svezia (Barregard et al., 2021) e 0,15 µg/24 ore in uno studio condotto in Cina (Wang et al., 2019c). Vi sono anche sostanze chimiche che possono aumentare il processo di escrezione dell'antimonio nelle urine, come l'acido dimercaptosuccinico, usato spesso per il trattamento del disturbo dello spettro autistico (Hunter et al., 2021). In ogni caso, ad oggi vi sono ancora poche informazioni riguardo ai processi metabolici e di eliminazione dell'antimonio dall'organismo umano.

2.7 Tossicodinamica ed effetti sull'uomo

2.7.1 Interazione dell'antimonio con le biomolecole

L'antimonio può legarsi alle biomolecole nell'organismo e formare dei complessi molecolari che possono influire negativamente sui processi fisiologici di cellule e tessuti, aumentando l'insorgenza di condizioni patologiche nell'uomo. Le biomolecole sono infatti indispensabili per il mantenimento dell'omeostasi dell'organismo. Pertanto, studiare le interazioni del metallo con le molecole biologiche risulta essenziale per comprenderne i meccanismi alla base degli effetti tossici. Inoltre, effetti antagonisti o sinergici che sorgono dall'interazione dell'antimonio con altre molecole possono influenzare ulteriormente le funzioni cellulari.

2.7.1a Interazione con gli acidi nucleici

Gli acidi nucleici svolgono un ruolo fondamentale nella regolazione dei processi biologici dell'organismo. Diverse specie di antimonio sono in grado di legarsi a questi e di modificarne la struttura e le funzioni. La forma trivalente dell'antimonio è considerata potenzialmente cancerogena nell'uomo (Tamás, 2016). A tal proposito, è stato evidenziato che esiste una correlazione diretta tra l'inalazione di triossido di antimonio (Sb_2O_3) nei lavoratori esposti al metallo e danni inflitti al DNA (El Shanawany et al., 2017). L'antimonio è infatti responsabile di mutazioni cromosomiche, di alterazione dell'espressione genica e dei meccanismi di riparazione del DNA e di variazione nell'espressione dei miRNA (Boreiko e Rossman, 2020; Litwin et al., 2021). I ditiocarbammati di Sb(III) si legano alle coppie di basi del DNA, intercalandosi tra loro (Hayat et al., 2021). Diversi benzoati ferrocenil organoantimonici(V) si legano al DNA in diversi siti (Asghar et al., 2012). Il tricloruro di antimonio ($SbCl_3$) è in grado di ridurre significativamente i livelli di 5-

idrossimetilcitosina, 5-formilcitosina e 5-carbossilcitosina, molecole che svolgono ruoli fondamentali nella regolazione dell'espressione genica (Xiong et al., 2017).

2.7.1b Interazione con le proteine

I composti contenenti antimonio si legano ai gruppi tiolici delle biomolecole, formando tioantimoniati, e interagiscono con diverse proteine; tra i diversi effetti, sono infatti in grado di ridurre i livelli di GSH intracellulari, un meccanismo già osservato nella tossicità dell'arsenico.

L'antimonio può formare dei complessi ed alterare la capacità delle cellule di sintetizzare le proteine. Infatti, Sb(V) può legarsi a gruppi amminici, carbossilici e idrossilici, influenzando la sintesi delle catene peptidiche (Sun et al., 2014), oppure può interagire con i peptidi e formare complessi Sb-peptidi che possono modificare ulteriormente i processi di sintesi e *folding* delle proteine (Gu et al., 2020). È stato dimostrato che Sb(III) interagisce con il dominio *zinc finger* della proteina XPA (xeroderma pigmentoso gruppo A), provocando il rilascio dose-dipendente di zinco dal peptide, che indirettamente induce genotossicità inibendo i processi di riparazione degli acidi nucleici (Grosskopf et al., 2010).

L'antimonio può legarsi alle proteine attraverso diversi siti di legame. L'albumina sierica, il principale trasportatore degli acidi grassi e regolatore dei processi osmotici, possiede diversi siti di legame per SbCl₃, per il piroantimoniato di potassio e per il tartrato potassico di antimonio (Song et al., 2013). L'antimonio trivalente ha una maggiore tendenza a formare aggregati con l'albumina sierica rispetto a Sb(V): questo fenomeno potrebbe parzialmente spiegare la differente tossicità delle specie di antimonio *in vivo* (Verdugo et al., 2017). Dall'altra parte, l'antimonio pentavalente interagisce con i gruppi SH delle proteine delle membrane degli eritrociti, contribuendo all'ingresso del metallo nelle cellule (Barrera et al., 2016). Dunque, l'antimonio è in grado di interagire con le proteine cellulari, influenzandone la sintesi, l'espressione e le funzioni, e provocando alterazioni genotossiche e disturbi a livello endocrino.

L'antimonio è anche in grado di formare dei complessi con proteine enzimatiche cellulari. Ad esempio, può legarsi al residuo di selenolo nel sito attivo dell'enzima, fondamentale nella reazione di riduzione della nicotinammide adenina dinucleotide fosfato (NADPH) (Parrilha et al., 2014). L'antimonio, inoltre, è in grado di legarsi al gruppo tiolico deprotonato del residuo di cisteina, unico sito di legame del metallo con

il GSH (Sun et al., 2000). L'antimonio riesce a promuovere o inibire la fosforilazione di alcune chinasi proteiche, come la *Transforming growth factor (TGF)- β -activated kinase 1* e la proteina chinasi B (Akt) (Zhang et al., 2021). Pertanto, può regolare i processi cellulari portando ad aumento o diminuzione delle attività enzimatiche. L'antimonio influenza negativamente anche l'espressione della glutatione perossidasi, diminuendo i livelli di GSH libero e rendendo le cellule più suscettibili allo stress ossidativo. Come l'arsenico, anche l'antimonio è un inibitore diretto della piruvato deidrogenasi, un enzima regolatore dell'ossidazione del glucosio; infatti, l'esposizione al metallo induce calo dei livelli di ATP e attivazione della glicolisi anaerobica, responsabile della riduzione della produzione di ATP. Inoltre, in presenze di antimonio, l'attività degli enzimi antiossidanti può incrementarsi, a causa della produzione di ROS (Gu et al., 2020).

2.7.1c Interazione con gli zuccheri

Gli zuccheri sono componenti strutturali delle cellule, forniscono l'energia necessaria per i processi biochimici e formano altre importanti biomolecole. L'antimonio interferisce anche con il metabolismo degli zuccheri (Zhang et al., 2013), infatti, inibisce la gluconeogenesi (Lai et al., 2022) e promuove la via dei pentoso-fosfato (Xiaojian et al., 2015). Inoltre, l'antimonio può entrare nelle cellule grazie ai polisaccaridi extracellulari (Zhang et al., 2013).

2.7.1d Interazione con i lipidi

I lipidi sono essenziali per il mantenimento dell'omeostasi del corpo umano, ma ci sono pochi studi riguardo all'interazione con l'antimonio. Tale metallo può promuovere lo sviluppo di malattie metaboliche tramite alterazione del metabolismo lipidico. Ad esempio, l'esposizione all'antimonio induce attivazione del processo di perossidazione lipidica come meccanismo di autoprotezione cellulare (Li et al., 2021; Wu et al., 2019; Xia et al., 2021). L'alterazione del metabolismo lipidico causato dal metallo può essere anche responsabile di un'azione potenzialmente cancerogena.

2.7.1e Interazione con gli ormoni

Gli ormoni sono fondamentali nella regolazione dei meccanismi di crescita, sviluppo, metabolismo e riproduzione. Diversi studi hanno evidenziato che l'antimonio è in grado di alterare i livelli ormonali fisiologici (Ibrahim et al., 2014), ad esempio

attivando la fosforilazione dei recettori degli androgeni (Zhang et al., 2018). Studi hanno riportato concentrazioni di ormoni tiroidei inversamente correlati ai livelli di antimonio a livello ematico e urinario (Guo et al., 2018; Margetaki et al., 2021).

2.7.2 Effetti tossici sull'organismo umano

2.7.2a Effetti sull'apparato respiratorio

Il polmone è l'organo bersaglio principale della tossicità dell'antimonio nel tratto respiratorio ed è possibile osservare effetti sia acuti che cronici, anche se esistono ancora oggi dati incompleti riguardo alla tossicità dell'antimonio sul sistema respiratorio. L'esposizione prolungata a Sb_2O_3 è stata associata ad alterazioni della funzionalità polmonare (monitorata tramite spirometria) oppure a danni morfologici a livello polmonare, diagnosticati mediante analisi a raggi X (pneumoconiosi), probabilmente come conseguenza di stati di infiammazione cronica e fibrosi (McCallum, 2005). Negli animali da laboratorio, gli effetti polmonari includono l'accumulo di particelle di antimonio nei polmoni, l'aumento dei macrofagi alveolari/intra-alveolari, la diminuzione dei tempi di clearance polmonare, l'infiammazione interstiziale cronica e la fibrosi interstiziale (NTP, 2016). Le malformazioni polmonari osservate in seguito ad esposizione professionale ad alti livelli di antimonio presentano delle analogie qualitative con i cambiamenti istopatologici prodotti dall'inalazione di Sb_2O_3 nei roditori (NTP, 2017). Tuttavia, mentre i danni polmonari indotti dall'antimonio nei roditori sono progressivi e possono produrre effetti significativi sulla diminuzione della funzionalità polmonare, gli effetti sull'uomo tendono ad essere più innocui, portando a lesioni fibrotiche senza uno sviluppo progressivo (Hoet, 2009). Ciò potrebbe indicare che l'uomo è meno sensibile agli effetti infiammatori del metallo e che ci sono comunque delle differenze nella farmacocinetica e nella morfologia delle vie aeree rispetto ai roditori.

Altri effetti respiratori osservati in alcuni studi includono la metaplasia squamosa dell'epiglottide e l'iperplasia dell'epitelio respiratorio nasale (NTP, 2016). Alcuni studi epidemiologici hanno infatti evidenziato l'incidenza dei tumori nei lavoratori esposti all'antimonio; tuttavia, è difficile stabilire con certezza la correlazione tra composti dell'antimonio e aumento di cancro polmonare a causa della co-esposizione con altri agenti cancerogeni, come l'arsenico e il cadmio (Boreiko et al., 2020).

2.7.2b Effetti sul sistema cardiovascolare

L'esposizione ad antimonio è particolarmente pericolosa per le cellule del miocardio, poiché può provocare tossicità a livello del tessuto connettivo e fibroso del cuore, anche a bassi dosaggi. I danni a livello cardiaco possono essere diagnosticati anche a partire da elettrocardiogrammi anomali, soprattutto quando i soggetti sono esposti a composti contenenti antimonio per un tempo piuttosto prolungato. È stato evidenziato che il metallo è in grado di indurre stress ossidativo nelle cellule del miocardio, aumentando l'incidenza di morte cellulare (Periferakis et al., 2022). Questo fenomeno è causato probabilmente dal calo dei livelli di GSH cellulari e di ATP e dall'interazione del metallo con l'attività di alcuni enzimi.

2.7.2c Effetti sulla cavità orale

L'antimonio può essere rilevato a livello della cavità orale, in quanto utilizzato insieme ad altri metalli, come nichel, bario, arsenico, stronzio, negli impianti dentali di diversi produttori (Eke et al., 2018). Pertanto, il rilascio prolungato nel tempo di antimonio da questi materiali può rappresentare un'esposizione cronica con importanti effetti tossici. La presenza di antimonio nel cavo orale può indurre alterazioni della composizione del microbioma salivare, causando problemi alla salute orale. Elevati livelli di antimonio hanno causato aumento di *Lactobacillus* e *Granulicatella*, responsabili dello sviluppo di carie dentali (Lif Holgerson et al., 2015; Caufield et al., 2015). Al contrario, l'uso di sigarette elettroniche non comporta un aumento delle concentrazioni del metallo nell'organismo (Wiener et al., 2020).

2.7.2d Effetti sul tratto gastrointestinale

Storicamente l'antimonio è noto per le sue proprietà emetiche. È stato osservato che l'esposizione prolungata e ripetuta al tricloruro di antimonio (SbCl_3), al trisolfuro di antimonio (Sb_2S_3) o all'ossido di antimonio (Sb_2O_3) possono causare dolore addominale, diarrea, vomito e ulcere (Sundar et al., 2010). Sono stati studiati gli effetti tossici GI in soggetti trattati con antimonio per iniezione intramuscolare, oppure in cani esposti oralmente ad elevate concentrazioni del metallo; tra gli effetti ricordiamo vomito, irritazioni infiammazioni croniche, ulcere e modifiche istologiche del tratto GI (Toxicological Profile for Antimony and Compounds, 2019).

Ad oggi, comunque, gli studi sugli animali condotti per prevedere gli effetti del metallo sull'uomo presentano diversi limiti, tra cui la difficoltà di mimare le concentrazioni e

le condizioni reali di esposizione ed il fatto che coesistono diversi fattori endogeni che possono influenzare l'assorbimento e la tolleranza all'antimonio.

2.7.2e Effetti sulla cute

Le prime ricerche sugli effetti dell'antimonio sulla cute sono state condotte su lavoratori delle fonderie e delle miniere. La manifestazione più nota è detta a "macchie di antimonio", ovvero irritazioni cutanee associate all'esposizione cutanea al metallo. Queste lesioni, dal punto di vista istologico, sono caratterizzate da necrosi e infiammazione acuta a livello dei dotti delle ghiandole sudoripare e presentano spesso eczemi simili a quelli che compaiono nel caso del vaiolo; si manifestano in più parti del corpo, ad eccezione di piedi, mani e viso.

2.7.2f Cancerogenicità e genotossicità

Livelli elevati di antimonio nell'organismo possono aumentare il rischio di cancro. L'IARC ha pubblicato una valutazione del rischio cancerogeno del triossido di antimonio (Sb_2O_3) nel 1989. In un primo momento, i test sul rischio di cancro sugli animali sono stati effettuati prendendo in considerazione la via inalatoria, proprio perché questa era la tipologia di esposizione più diffusa nei lavoratori durante l'estrazione e la fusione mineraria del metallo. Sb_2O_3 è stato classificato come cancerogeno del gruppo 2B secondo l'IARC (possibile cancerogeno per l'uomo), a causa della possibilità di indurre tumori polmonari in ratti da laboratorio esposti al metallo per inalazione. Diversi test biologici di inalazione di Sb_2O_3 su topi sono stati eseguiti dal Programma Nazionale di Tossicologia (NTP) (HCN, 2011). I primi studi sul rischio di cancro nell'uomo sono stati condotti considerando soggetti esposti professionalmente all'antimonio. Ne risultò un'associazione positiva tra rischio e durata di esposizione, sebbene risultasse difficile da valutare poiché era possibile anche una co-esposizione con l'arsenico (De Boeck et al., 2003).

Lo stress ossidativo indotto dall'antimonio trivalente può in parte spiegare gli effetti genotossici su cellule di mammifero (Cavallo et al., 2002), mentre altri ritengono che il principale fattore responsabile sia la capacità di alterare i meccanismi di riparazione del DNA (Grosskopf et al., 2010). La mutagenicità dell'antimonio allo stato elementare, con purezza del 99%, è stata dimostrata in ceppi di *Salmonella*, che sono risultati positivi ai test di mutazioni cromosomiche (Asakura et al., 2009); al contrario, per l'antimonio pentavalente ancora mancano prove sui danni al DNA in linee cellulari

di mammiferi (De Boeck et al., 2003). A differenza dei test *in vitro*, la maggior parte dei test *in vivo* sui roditori non hanno evidenziato risultati positivi sulla genotossicità dell'antimonio. Infatti, il triossido di antimonio non ha indotto mutazioni cromosomiche nel midollo osseo dei ratti (Kirkland et al., 2007), supportando la teoria che le forme di antimonio trivalente non sembrano essere mutagene nelle cellule batteriche o sui roditori, mentre vi è solo qualche evidenza di genotossicità in linee cellulari di mammifero (De Boeck et al., 2003). Più recentemente, il Programma nazionale di tossicologia degli Stati Uniti (US-NTP) ha confermato la cancerogenicità dell' Sb_2O_3 basandosi su modelli sperimentali umani e su indagini meccanicistiche (NTP, 2018).

Alcuni dati relativi alle valutazioni sanitarie rivelano che un elevato tasso di antimonio nel plasma può aumentare il rischio di cancro al seno e di cancro alla prostata (Kotsopoulos et al., 2012). Infine, è stato riscontrato un aumento del rischio di cancro colon-rettale in zone vicino a fonti di inquinamento industriale e quindi a contaminanti ambientali, tra cui l'antimonio (Garcia-Perez et al., 2020).

2.7.2g Effetti sulla riproduzione e sullo sviluppo

La ricerca sugli effetti dell'antimonio sulla riproduzione umana è ad oggi limitata. Recenti studi hanno mostrato che l'antimonio presente come contaminante ambientale è associato significativamente alla diminuzione della concentrazione di spermatozoi nell'uomo (Huang et al., 2019). Nelle donne in gravidanza, l'antimonio sembra aumentare il rischio di diabete mellito gestazionale (Zhang et al., 2019), alterando l'omeostasi glicemica (Zhang et al., 2020), e di ipertensione (Vigeh et al., 2011). L'antimonio è in grado di trasferirsi dalla madre al figlio durante la gravidanza o l'allattamento (Astolfi et al., 2018); inoltre, uno studio ha mostrato livelli del metallo nel sangue del cordone ombelicale superiori ($0,39 \mu\text{g/L}$) rispetto a quelli del sangue materno ($0,2 \mu\text{g/L}$) (Iwai-Shimada et al., 2019). Inoltre, Wang et al. (2020a) hanno riportato un aumento del rischio di aborto spontaneo in seguito all'esposizione a diversi metalli, incluso l'antimonio. Anche se il contatto con il metallo è inevitabile per il feto, in realtà i rischi per la salute rimangono relativamente bassi. Le concentrazioni di cromo e arsenico nel sangue sono associati spesso a preeclampsia, uno stato anomalo durante la gravidanza caratterizzato da ipertensione, ritenzione di liquidi e albuminuria, ma l'antimonio ha dimostrato di non avere nessun effetto sul rischio di tale condizione (Wang et al., 2020b).

Per quanto riguarda i bambini, l'esposizione ad antimonio presenta bassi rischi per la salute. Inizialmente era stato ipotizzato che il metallo fosse uno dei principali fattori responsabili della sindrome della morte improvvisa del lattante (SIDS, *Sudden Infant Death Syndrome*), senza sufficienti prove a dimostrazione di questa teoria (Cullen et al., 2000). Elevati livelli sono stati però associati a disturbi di deficit dell'attenzione o iperattività nei bambini (Lee et al., 2018). Alcuni studi hanno evidenziato che le persone che presentano livelli urinari di antimonio più elevati della norma soffrono maggiormente di disturbi del sonno e apnee notturne (Scinicariello et al., 2017). La concentrazione di antimonio nel sangue del cordone ombelicale risulta essere inversamente proporzionale al peso del neonato alla nascita (Cabrera-Rodriguez et al., 2018), senza però produrre effetti significativi sulla crescita del bambino o sullo sviluppo neurologico infantile (Shao et al., 2017; Ruiz-Castell et al., 2012).

2.8 Limiti e regolamentazione

2.8.1 Limiti per l'antimonio nell'acqua potabile

2.8.1a World Health Organization (WHO)

Una linea guida sull'antimonio per l'acqua potabile è stata stabilita dalla WHO nel 2003 (WHO, 2003). A causa della mancanza di prove sugli effetti genotossici e cancerogeni dell'antimonio per via orale, i valori limite stabiliti sulla base di *No Observed Adverse Effect Level* (NOAEL) erano di 6 mg/kg di peso corporeo al giorno, sulla base di uno studio subcronico di 90 giorni sull'acqua potabile nei ratti. La dose giornaliera tollerabile (TDI) è di 6 µg/kg di peso corporeo. Basandosi sul presupposto che un uomo di peso corporeo medio di 60 kg che beve 2 L di acqua al giorno possa assumere il 10% della TDI dell'antimonio con questa modalità, nel 2011 la WHO ha stabilito per l'antimonio il limite di 0,02 mg/L nell'acqua potabile (WHO, 2011).

2.8.1b United States Environmental Protection Agency (USEPA)

L'USEPA ha stabilito un livello massimo di contaminazione (MCL) di 0,006 mg/L di antimonio per l'acqua potabile (USEPA, 2009). In questo documento sono state elencate altre fonti di contaminazione, come ritardanti di fiamma, ceramiche, saldature, componenti elettronici e scarichi dalle raffinerie di petrolio. Il rilascio di antimonio dalla degradazione della plastica di prodotti domestici ed alimentari non sono stati in questo caso inclusi come fonte di contaminazione dell'acqua potabile.

2.8.2 Limiti per l'antimonio come sostanza a contatto con gli alimenti

2.8.2a United States Food and Drug Administration (FDA)

L'FDA ha inserito l'ossido di antimonio (n. CAS 1327-33-9, n. doc. 5093) nel database della *List of Indirect Additives Used in Food Contact Substances* (LIAUFCS) (FDA, 2011). L'FDA ha stabilito la dose giornaliera stimata cumulativa (CEDI, *Cumulative Estimated Daily Intake*) del triossido di antimonio da composti a contatto con gli alimenti pari a 0,0001 mg/kg di peso corporeo al giorno (FDA, 2012). Altri derivati dell'antimonio sono stati approvati come coloranti per polimeri e gomme utilizzati nella realizzazione di imballaggi alimentari.

2.8.2b Unione Europea (EU)

L'Autorità europea per la sicurezza alimentare (EFSA) ha fissato dei limiti di migrazione specifica (SML, *Specific Migration Limit*) per le sostanze che migrano dal packaging agli alimenti o alle bevande. Il comitato scientifico dell'EFSA, per quanto concerne gli additivi alimentari, gli aromi, i materiali a contatto con gli alimenti, ha stabilito dei limiti per il triossido di antimonio nel cibo nel 2004 (EFSA, 2004). L'antimonio viene utilizzato come catalizzatore nella produzione del PET e di altri materiali plastici a contatto con gli alimenti con una percentuale massima di 0,035% (350 mg di antimonio/kg di plastica). L'SML stabilito dall'EFSA per il triossido di antimonio (0,04 mg di antimonio/kg di alimento) si applica agli alimenti e ai liquidi confezionati in materiale PET, tra cui anche le bevande gassate, i succhi e l'aceto. Il limite di migrazione è basato sulla TDI dell'antimonio per l'acqua potabile (0,006 mg di antimonio/kg di peso corporeo per persona al giorno o 0,36 mg di antimonio per persona al giorno), supponendo che il 10% della TDI possa essere assunto dall'uomo a partire dai composti a contatto con gli alimenti. È stato però osservato che questo limite può essere facilmente superato se l'imballaggio in PET è esposto a temperature molto elevate, in quanto in tali condizioni può aumentare il tasso di migrazione dell'antimonio dall'oggetto all'alimento.

2.8.2c Altre normative

Si prevede che queste attuali normative debbano essere sottoposte a nuova revisione, al fine di valutare il rischio ecologico per gli organismi che vivono nell'acqua e nel suolo. Ad esempio, è necessario tener conto dell'esposizione al triossido di antimonio quando utilizzato come sinergizzante dei ritardanti di fiamma alogenati (USEPA,

2012). L'uso del triossido di antimonio come catalizzatore nella produzione della plastica PET a contatto con gli alimenti è regolato da alcune agenzie, come la FDA, ma non dall'USEPA. Consideriamo, inoltre, che il contenuto di antimonio in una tipica bottiglia di plastica PET è di circa 213 ± 35 mg/kg; quindi, bere il contenuto di una bottiglia d'acqua da 0,5 L può determinare una concentrazione finale di antimonio pari a 376 ppb, superiore alla MCL (Limite Massimo del Contaminante) di 6 ppb stabilito dall'USEPA (Westerhoff et al., 2008). Anche la degradazione della plastica PET nelle discariche potrebbe fungere da fonte di triossido di antimonio o di altri composti nelle acque superficiali. Per tal motivo, è necessario che le future normative facciano delle considerazioni più approfondite riguardo alle diverse fonti di antimonio, tra cui la degradazione della plastica PET, in quanto ciò può significativamente influire sugli effetti del metallo nell'ambiente circostante e nell'uomo.

PARTE SPERIMENTALE

3.1 Introduzione

I metalli pesanti, tra i quali antimonio, piombo, arsenico, cadmio e mercurio, sono ampiamente diffusi nell'ambiente, non solo a causa di fenomeni naturali, ma soprattutto come conseguenza della moderna industrializzazione. Inoltre, i metalli pesanti sono persistenti nell'ambiente, quindi soggetti a fenomeni di bioaccumulo, e possono costituire un serio pericolo per la salute se raggiungono livelli al di sopra dei limiti consentiti dal nostro organismo (Costa, 2019; Gazwi et al., 2020); pertanto, la contaminazione dell'ecosistema desta oggi grande preoccupazione. I metalli pesanti si possono ritrovare anche negli alimenti a seguito della contaminazione delle materie prime impiegate, oppure possono essere rilasciati dai materiali industriali durante le fasi di produzione e conservazione, entrando direttamente in contatto con l'organismo umano. Sono noti numerosi effetti tossici acuti e cronici su diversi organi, come disfunzione GI e renale, disturbi al sistema nervoso, lesioni cutanee, danni vascolari, alterazioni del sistema immunitario, difetti congeniti e cancro. Tra l'altro, mentre l'esposizione ad alte concentrazioni può indurre gravi complicazioni, quella cronica a bassi livelli potrebbe essere ancora più pericolosa, poiché più difficile da prevenire e poiché può essere soggetta a fenomeni di accumulo (Pierart et al., 2015).

Tra i vari metalli pesanti, l'antimonio (Sb) negli ultimi anni ha suscitato un notevole interesse (He et al., 2012; Nishad e Bhaskarapillai, 2021; Filella et al., 2020). L'antimonio è un metalloide senza alcuna funzione biologica nell'uomo e la forma trivalente Sb(III) è nota per essere la più tossica *in vivo* (Filella et al., 2020). Nonostante l'Unione Europea (EU) nel 1976 abbia già classificato l'antimonio come contaminante che necessita di un controllo prioritario, oggi viene ancora largamente impiegato nelle attività industriali. È un materiale duro, fragile e non malleabile, con proprietà che lo rendono insostituibile con altri metalli con minore impatto ambientale. Le principali applicazioni industriali dei composti contenenti antimonio sono come agenti ignifughi, opacizzanti nel vetro, componenti delle batterie al piombo, involucri plastici degli apparecchi elettronici e, in particolar modo, come catalizzatori di policondensazione per la produzione del polietilentereftalato (PET), un materiale termoplastico utilizzato nelle forme di imballaggio alimentare e nelle bottiglie di plastica per acqua e bevande, e del poliestere (Xu et al., 2021; Filella et al., 2020). La reale problematica risiede nel fatto che l'antimonio utilizzato come additivo nella produzione della plastica non è chimicamente legato al polimero, pertanto, se soggetto a condizioni di stress, come alte temperature o lunghi periodi di

conservazione, può essere rilasciato e migrare nell'alimento o bevanda con cui si trova in contatto. Pertanto, l'uomo è potenzialmente esposto all'antimonio attraverso la via orale, a causa dell'ingestione di cibi o bevande inquinati, la via cutanea e inalatoria, specialmente se il metallo viene utilizzato come agente ritardante di fiamma (Filella et al., 2020). Gli effetti dell'antimonio sulla salute non sono ben chiari e le conoscenze sui meccanismi molecolari di tossicità sull'organismo umano sono ancora poche.

Una volta introdotto nell'organismo, l'antimonio riesce ad attraversare le membrane cellulari mediante le acquagliceroproteine o i trasportatori cellulari per i metalloidi, e interagisce con le biomolecole, tra cui acidi nucleici, proteine e lipidi, alterandone le funzioni biologiche (Lai et al., 2022). L'EFSA ha stabilito per il triossido di antimonio (Sb_2O_3), utilizzato come additivo nei materiali a contatto con gli alimenti, una restrizione di 0,04 mg/kg di alimento (EFSA 2004). Tale regolamentazione si basa sulla *Tolerable Daily Intake* (TDI) di 0,006 mg di Sb/kg di peso corporeo/giorno. Tuttavia, non è possibile stabilire un valore per il contenuto di antimonio nel sangue di individui sani non esposti professionalmente, anche a causa dei limiti di rilevabilità delle metodiche utilizzate (Filella et al., 2013b).

Recentemente sono stati condotti diversi studi riguardo alla capacità dei metalli pesanti di interferire con le attività del sistema endocrino, noto per svolgere funzioni essenziali nel bilancio energetico, nel metabolismo cellulare e nella distribuzione del grasso corporeo (Darbre, 2017). Questi composti, denominati interferenti endocrini ambientali, possono interagire con i recettori ormonali ed indurre molteplici effetti avversi nell'uomo, come cancro, disturbi a livello del sistema riproduttivo, deficit cognitivi e malattie di tipo metabolico, tra cui l'obesità (La Merrill et al., 2020). In particolare, studi epidemiologici e sperimentali hanno dimostrato che l'esposizione ad alcuni interferenti endocrini può contribuire significativamente allo sviluppo dell'obesità; tali sostanze vengono infatti denominate "agenti obesogeni" (Trasande e Blumberg, 2018). Questi modulano il processo di adipogenesi, alterando la crescita e la funzionalità degli adipociti, favoriscono l'accumulo lipidico intracellulare, provocando aumento del peso corporeo, e modificano il senso dell'appetito e della sazietà (Darbre, 2017). A livello molecolare, infatti, gli agenti obesogeni agiscono sul processo di differenziazione degli adipociti, attraverso la modulazione dell'espressione di PPAR- γ e di C/EBP- β , interagiscono con i recettori degli estrogeni e inducono alterazione dei meccanismi fisiologici cellulari, causando danno all'omeostasi metabolica del tessuto adiposo. Inoltre, l'accumulo eccessivo di grasso

negli adipociti può provocare alterazione delle funzioni del reticolo endoplasmatico (RE) e accumulo di proteine mal sintetizzate, determinando uno stato di squilibrio metabolico, detto stress del RE, e conseguente attivazione delle vie di risposta UPR (*unfolded protein response*). Questa condizione è poi strettamente correlata alla produzione di citochine pro-infiammatorie (Menikdiwela et al., 2019; Sanchez et al., 2019) e di ROS intracellulari (Zeeshan et al., 2016).

Pertanto, sulla base di queste conoscenze, scopo della prima parte di questa tesi è stato quello di analizzare l'effetto di basse concentrazioni di Sb(III), nell'ordine della nanomolarità, sulla promozione dell'adipogenesi in un modello di adipociti murini 3T3-L1 esposti cronicamente al metallo per tutto il processo di differenziazione cellulare. Allo scopo di studiare i meccanismi molecolari coinvolti, sono stati presi in esame i principali marker della differenziazione adipocitaria, delle risposte UPR e dell'infiammazione. Inoltre, il ruolo dell'antimonio come interferente endocrino è stato confermato dall'impiego in questo modello sperimentale di un antagonista specifico del recettore degli estrogeni, l'ICI 182,780 (ICI), osservando la modulazione del fattore adipogenico PPAR- γ (Molonia, et al., 2023b).

Nella seconda parte del mio lavoro di tesi mi sono soffermata sugli effetti *in vitro* causati dall'esposizione cronica a Sb(III) nell'epitelio intestinale, dato che una delle principali vie di esposizione è quella orale e che la parete intestinale è deputata all'assorbimento selettivo delle sostanze presenti nel lume intestinale (Ghosh et al., 2021). Diversi studi epidemiologici hanno mostrato come negli ultimi anni l'aumento dell'esposizione agli inquinanti ambientali, come i metalli pesanti, ha comportato una maggiore incidenza di disturbi GI, tra cui le malattie infiammatorie intestinali (IBD) (Guan, 2019); tale correlazione è dovuta al fatto che questi composti sono in grado di interagire con le molecole biologiche a livello intestinale, causando disfunzione della barriera, alterazione dell'omeostasi redox cellulare e sviluppo di uno stato di infiammazione cronica (Ghosh et al., 2024).

È stato scelto, per questa parte dello studio, un modello di cellule epiteliali intestinali Caco-2 esposte cronicamente all'antimonio durante tutto il processo di differenziazione, al fine di approfondire ulteriormente i meccanismi molecolari di tossicità dell'antimonio sull'organismo umano.

Infine, dato il crescente interesse negli ultimi anni nei confronti di molecole di origine naturale che possano costituire validi approcci terapeutici complementari per migliorare la salute dell'uomo, specialmente se introdotte attraverso la dieta,

nell'ultima parte di questo studio è stata valutato l'effetto citoprotettivo della cianidina-3-*O*-glucoside (C3G), molecola dotata di importanti proprietà antiossidanti e antiinfiammatorie, nei confronti del danno cellulare indotto dall'Sb(III) sulle cellule epiteliali intestinali Caco-2.

3.2 Materiali

Per i nostri esperimenti abbiamo utilizzato il cloruro di antimonio(III) [Sb(III)] (SbCl_3) (codice #10025-91-9-100MG) acquistato da Merk Life Science (Milano, Italia). Il dimetilsolfossido (DMSO), l'isopropanolo e l'etanolo sono stati forniti, nel grado di purezza più elevato, da Carlo Erba Reagent (Milano, Italia). Le membrane di polivinilidenefluoruro Hybond-P PVDF e il latte in polvere privo di acidi grassi sono stati acquistati da Amersham Biosciences, (Milano, Italia). Il Clarity Max ECL Substrat è stato fornito da Bio-Rad (Hercules, USA). Il kit E.Z.N.A. Total RNA Kit I è stato ottenuto da OMEGA bio-tek (VWR, Radnor, Pennsylvania, USA). Tutti gli altri reagenti, qualora non espressamente specificato, sono stati acquistati da Merk Life Science (Milano, Italia).

3.3 Colture cellulari e trattamenti

3.3.1 Modello per la valutazione degli effetti dell'antimonio su adipociti murini 3T3-L1

In questo modello sperimentale abbiamo utilizzato la linea cellulare di pre-adipociti murini 3T3-L1, una linea originariamente sviluppata mediante espansione clonale da cellule murine 3T3 Swiss. Le cellule 3T3-L1 sono state scelte per questo studio in quanto costituiscono la linea cellulare più comunemente impiegata per studiare *in vitro* i meccanismi molecolari alla base del processo di adipogenesi e per valutare gli effetti di xenobiotici sulla funzionalità del tessuto adiposo. Queste cellule, infatti, hanno inizialmente una morfologia tipica dei fibroblasti, ma sono in grado di differenziare in adipociti murini grazie al trattamento con agenti stimolanti la differenziazione, sviluppando i depositi lipidici intracellulari caratteristici del tessuto adiposo ed esprimendo specifici fattori di trascrizione. Un vantaggio dell'impiego di questa linea cellulare è sicuramente la facilità di coltura e il basso costo rispetto alle colture cellulari primarie.

I pre-adipociti 3T3-L1 sono stati acquistati dall'American Tissue Culture Collection (ATCC) (Manassas, VA, USA), mantenuti a 37°C in incubatore con atmosfera umidificata, contenente il 95% di umidità e il 5% di CO₂, e coltivati in Dulbecco's modified eagle's medium (DMEM), supplementato con siero fetale di vitello (NBCS) al 10%, L-glutamina 4 mM, penicillina/streptomicina 100 U/ml e tampone HEPES 25 mM, rinnovando il medium ogni 2-3 giorni.

In esperimenti preliminari condotti per valutare la citotossicità dell'Sb(III), le cellule 3T3-L1 sono state seminate in piastra da 24 pozzetti con una densità di $2,5 \times 10^4$ cellule/pozzetto, incubate per 24 ore e poi esposte a diverse concentrazioni di Sb(III) (dalla 0,05 alla 25 nM) per altre 48 ore. L'SbCl₃ è stato sempre solubilizzato subito prima dell'esperimento in DMSO. La concentrazione finale di DMSO nel medium durante i trattamenti è sempre stata mantenuta $\leq 0,1\%$ (v/v). Le cellule trattate con il solo veicolo (DMSO 0,1% v/v) sono state usate come controllo (CTR).

Per i successivi esperimenti, le cellule 3T3-L1 sono state fatte differenziare. I pre-adipociti sono stati seminati ad una densità di $1,3 \times 10^4$ cellule/cm² in piastra da 12 pozzetti. Per la prima settimana di crescita fino al raggiungimento della confluenza le cellule sono state mantenute in terreno di coltura DMEM contenente NBCS al 10%, L-glutamina 4 mM, penicillina/streptomicina 100 U/ml e tampone HEPES 25 mM. In seguito, per convertire i pre-adipociti 3T3-L1 dal loro fenotipo di fibroblasti a quello di adipociti maturi, dopo l'arresto della crescita le cellule sono state coltivate per 10 giorni in DMEM supplementato con siero fetale bovino (FBS) al 10%, penicillina/streptomicina 100 U/ml, L-glutamina 4 mM e tampone HEPES 25 mM. In particolare, durante i primi 4 di questi dieci giorni al medium base sono stati aggiunti gli induttori della differenziazione (per ottenere quello che chiameremo medium MDI), ovvero 3-isobutil-1-metilxantina (IBMX) 0,5 mM, desametasone (Desa) 1 µM e insulina (Ins) 1 µg/ml. Durante i seguenti 3 giorni al medium base è stato addizionato solo 1 µg/ml di insulina e, infine, negli ultimi 3 giorni del processo è stato usato medium base senza alcun induttore, fino al totale differenziamento in adipociti maturi (figura 1). Durante il processo di differenziazione, si osserva un evidente cambio della morfologia delle 3T3-L1: nel corso dei giorni le cellule cominciano a crescere in numero e dimensioni e a sviluppare numerosi accumuli lipidici citoplasmatici. Le cellule sono state utilizzate sempre entro il 20° passaggio, poiché l'efficienza di differenziazione diminuisce con un numero di passaggi più elevato.

Per questo studio, le cellule 3T3-L1 sono state esposte durante i 10 giorni di differenziazione a Sb(III) a tre diverse concentrazioni (0,05, 0,5 e 5 nM) (figura 1). Le concentrazioni di Sb(III) selezionate per il presente studio sono state scelte sulla base dei risultati delle preliminari valutazioni di citotossicità (figura 4). Anche in questo caso, SbCl₃ è stato sempre solubilizzato poco prima dell'uso in DMSO e aggiunto alle cellule ad ogni cambio medium (2-3 giorni). La concentrazione finale di DMSO nel terreno di coltura è sempre stata mantenuta ≤ 0,1% (v/v). Le cellule trattate con il solo veicolo (DMSO 0,1% v/v) sono state usate come controllo (CTR). Al termine del periodo di esposizione, le cellule sono state immediatamente processate o conservate a -20°C fino alle successive analisi.

In alcuni esperimenti, per studiare il ruolo del recettore degli estrogeni (EsR) nel meccanismo d'azione dell'Sb(III) a livello del tessuto adiposo, sono stati impiegati l'estradiolo (E₂) e un antagonista specifico dell'EsR, l'ICI 182,780 (ICI). In una prima fase, per valutare la responsività all'estradiolo, le cellule 3T3-L1 sono state esposte a E₂ alla concentrazione 1 nM, in presenza o meno di ICI 10 nM, durante tutto il periodo di differenziazione adipocitaria (10 giorni). In seguito, al fine di studiare la capacità dell'antimonio di alterare il processo di adipogenesi agendo da interferente endocrino tramite interazione con EsR, le cellule sono state coltivate durante i 10 giorni di in presenza di Sb(III) e ICI (10 nM). Le cellule trattate con il solo veicolo (DMSO 0,1% v/v) sono state usate come controllo (CTR).

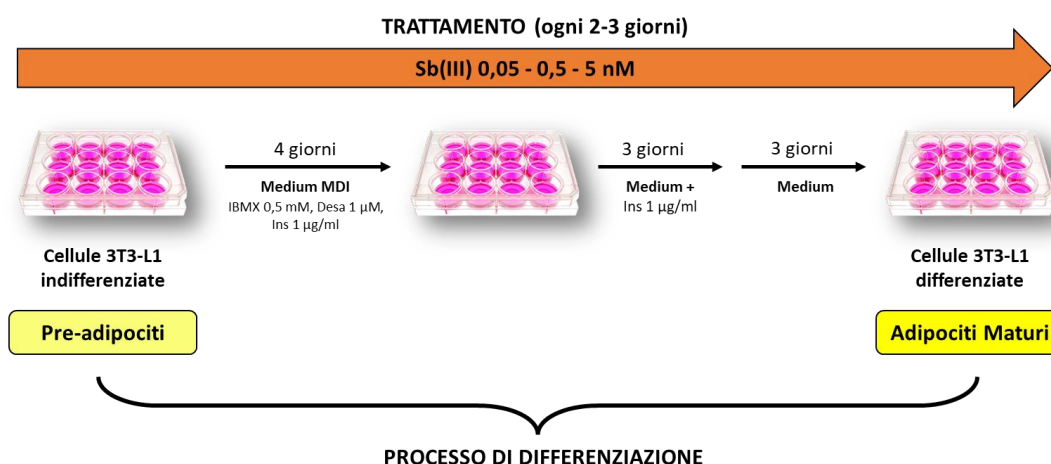


Figura 1. Rappresentazione schematica del modello sperimentale con adipociti 3T3-L1. Le cellule sono state esposte durante tutto il processo di differenziazione (10 giorni) a Sb(III) alle concentrazioni 0,05, 0,5 e 5 nM. L'Sb(III) è stato addizionato ad ogni cambio medium (ogni 2-3 giorni).

3.3.2 Modello per la valutazione degli effetti dell'antimonio su cellule epiteliali intestinali Caco-2

Le cellule Caco-2, derivanti da adenocarcinoma colon-rettale umano, sono state acquistate dall'ATCC. Queste cellule, di origine cancerosa, una volta raggiunta la confluenza, sono in grado di differenziare spontaneamente in cellule epiteliali intestinali, esprimendo le caratteristiche morfologiche e funzionali tipiche degli enterociti dell'intestino tenue umano. Infatti, le cellule Caco-2 crescendo formano un monostrato polarizzato, con la presenza di una porzione apicale, ricca di microvilli e di giunzioni strette (TJ, *tight junctions*) tra cellule adiacenti. Proprio per queste loro proprietà, le cellule Caco-2 costituiscono un valido modello *in vitro* di barriera intestinale (Lea, 2015).

Le cellule sono state coltivate in DMEM supplementato con FBS al 10%, L-glutamina 4 mM, amminoacidi non essenziali 1%, penicillina/streptomicina 100 U/ml. Le cellule sono state mantenute in coltura a 37°C in atmosfera umidificata con il 5% di CO₂ ed il medium è stato rinnovato ogni 2-3 giorni. Per creare un modello *in vitro* più rappresentativo possibile delle condizioni fisiologiche intestinali, le cellule Caco-2 sono state coltivate su supporti permeabili, detti insert, che permettono di ottenere un monostrato di cellule polarizzate e differenziate, in cui si possono distinguere un compartimento apicale (AP), che rappresenta il lume intestinale, ed un compartimento basolaterale (BL), che mima il circolo sanguigno (figura 2).

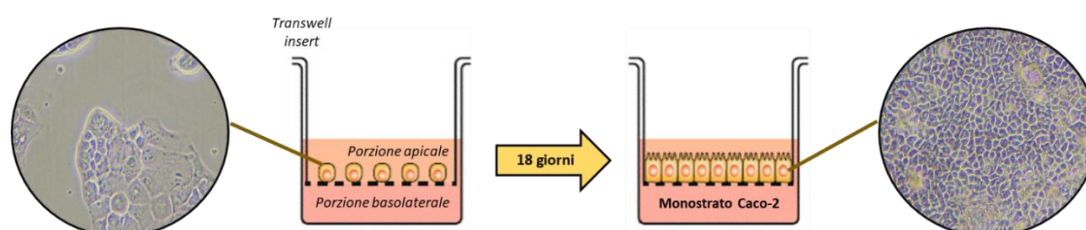


Figura 2. Processo di differenziazione (18 giorni) delle cellule epiteliali intestinali Caco-2 su supporto insert.

Pertanto, i monostrati di Caco-2 sono stati preparati seminando le cellule ad una densità di 4×10^4 cellule per cm^2 sulla porzione superiore di insert con filtri in policarbonato posizionati su piastra da 12 pozzetti (dimensione dei pori degli insert 0,4 μm , Greiner Bio-One, Italia). Le cellule sono state quindi esposte a Sb(III) a quattro differenti concentrazioni (0,5, 5, 50 e 100 nM) - concentrazioni scelte dopo averne

valutato l'assenza di un effetto citotossico (figura 17) - dal giorno della semina fino alla fine del processo di differenziazione (18 giorni) (figura 3) (Ferrari et al., 2016; Ferrari et al., 2017). SbCl_3 è stato sempre solubilizzato subito prima dell'esperimento in DMSO e aggiunto ad ogni cambio medium (ogni 2-3 giorni) solo nella porzione apicale degli insert, per mimare la via di esposizione orale. La concentrazione finale di DMSO nel medium durante i trattamenti è sempre stata mantenuta $\leq 0,1\%$ (v/v). Le cellule trattate con il solo veicolo (DMSO 0,1% v/v) sono state usate come controllo (CTR). L'integrità dei monostrati è stata valutata mediante misurazione della resistenza elettrica trans-epiteliale (TEER) tramite Millicell-ERS Voltometer (Millipore, MA, USA).

Allo scopo di dimostrare la stretta correlazione tra i diversi effetti tossici dell'antimonio osservati e lo stress del RE, alcuni esperimenti sono stati condotti in presenza di un inibitore specifico dello stress del RE, l'acido tauroursodeossicolico (TUDCA). Tale composto, solubilizzato in DMEM poco prima dell'utilizzo, è stato aggiunto al compartimento apicale degli insert ad ogni cambio medium (ogni 2-3 giorni), a partire dal raggiungimento della confluenza e fino al termine del processo di differenziazione (concentrazione finale 500 μM). In particolare, le cellule sono state esposte solo a Sb(III), alla concentrazione rappresentativa 50 nM, fino al raggiungimento della confluenza, mentre successivamente, fino al completamento del processo di differenziazione, sono state trattate anche con il TUDCA, aggiunto anch'esso solo nella porzione apicale dell'insert. Le cellule trattate con il solo veicolo (DMSO 0,1% v/v) sono state usate come controllo (CTR).

Infine, abbiamo valutato gli effetti benefici di una sostanza di elevato interesse nutraceutico, la cianidina-3-*O*-glucoside (C3G). La C3G è stata sempre solubilizzata, poco prima dell'esperimento, in DMSO ($\leq 0,1\%$ v/v) e utilizzata immediatamente. Le cellule Caco-2 sono state esposte a Sb(III) durante l'intero processo di differenziazione (18 giorni) e trattate con C3G (20 μM) nella porzione apicale degli insert dal raggiungimento della confluenza fino alla fine dell'esperimento (18° giorno). Anche la C3G è stata aggiunta ad ogni cambio medium (ogni 2-3 giorni). La concentrazione di C3G è stata scelta sulla base di precedenti esperimenti condotti su questa linea cellulare (Ferrari et al., 2016). Le cellule trattate con il solo veicolo (DMSO 0,1% v/v) sono state usate come controllo (CTR).

Alla fine degli esperimenti, le cellule sono state processate e i campioni conservati a -20°C per le successive analisi.

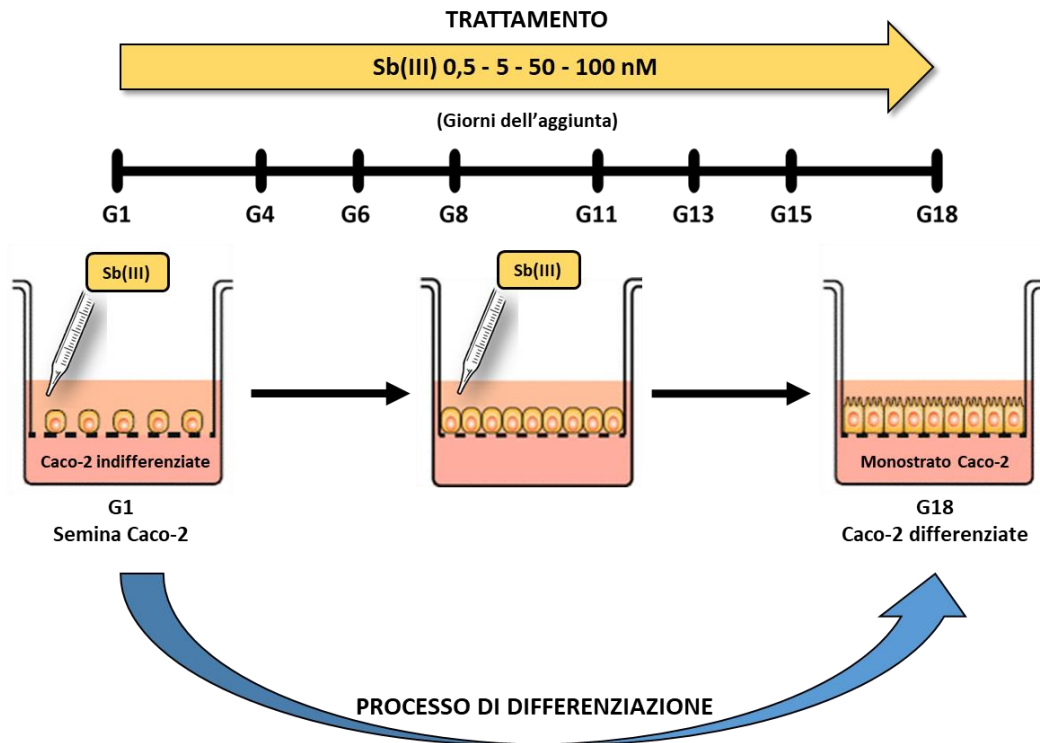


Figura 3. Rappresentazione schematica del modello sperimentale su cellule epiteliali intestinali Caco-2. Le cellule sono state esposte ad Sb(III) (0,5, 5, 50 e 100 nM) durante l'intero processo di differenziazione cellulare (18 giorni), aggiunto nella porzione apicale degli insert ad ogni cambio medium (ogni 2-3 giorni).

3.4 Metodi

3.4.1 Saggio di citotossicità

Per valutare la citotossicità dell'Sb(III) è stato utilizzato il saggio della sulforodamina B (SRB). La sulforodamina B, un colorante aminoxantenico di colore rosa brillante contenente due gruppi solfonici, in ambiente acido si lega stechiometricamente ai residui basici delle proteine cellulari, mentre in ambiente basico si dissocia da queste. Dunque, la quantità di colorante rilasciato risulta direttamente proporzionale al quantitativo di cellule (Molonia et al., 2022). In particolare, al termine del periodo di incubazione con Sb(III), le cellule sono state lavate con Dulbecco's phosphate buffered saline (DPBS) e fissate sul pozzetto con una soluzione di acido tricloroacetico (TCA) al 10% (v/v) per 1 ora a 4°C. Successivamente, le cellule sono state lavate con acqua distillata per rimuovere i residui di acido, asciugate all'aria e poi incubate con SRB (0,4% p/v in acido acetico 1%) per 30 minuti al buio a temperatura ambiente. In seguito, sono stati effettuati dei lavaggi con una soluzione di acido acetico all'1%, per rimuovere i residui di SRB non legata. Il colorante legatosi alle cellule è stato poi solubilizzato in Tris-base 10 mM. Infine, l'assorbanza è stata misurata a 565 nm mediante spettrofotometro (GloMax® Discover System-TM397). I dati sono stati espressi come percentuale di vitalità cellulare rispetto alle cellule controllo.

3.4.2 Colorazione degli adipociti 3T3-L1 con Oil Red O

L'effetto dell'esposizione ad Sb(III) sull'accumulo dei lipidi intracellulari nelle cellule 3T3-L1 è stato valutato mediante colorazione con Oil Red O, come descritto precedentemente da Muscarà et al. (2019). Tale tecnica permette di valutare e quantificare la differenziazione degli adipociti e i trigliceridi accumulati: l'entità della colorazione è infatti proporzionale al grado di differenziazione cellulare. Alla fine del processo di differenziazione dei pre-adipociti in adipociti maturi, le cellule sono state lavate con DPBS e fissate sul pozzetto con una soluzione di formalina al 10% per 1 ora a temperatura ambiente, poi lavate con isopropanolo al 60%. In seguito, le cellule sono state trattate con il colorante Oil Red O (0,3% p/v in isopropanolo al 60%) per 10 minuti in agitazione. Al termine del periodo di incubazione, la soluzione è stata rimossa e le cellule, dopo essere state lavate con DPBS per eliminare il colorante non legatosi, sono state osservate al microscopio invertito e fotografate utilizzando un ingrandimento 40x, in modo da valutare la dimensione e il numero degli adipociti

maturi e la formazione delle goccioline lipidiche. Infine, il colorante Oil Red O trattenuto dalle cellule è stato eluito tramite isopropanolo al 100%; i depositi lipidici cellulari sono stati così rilevati mediante analisi spettrofotometrica (GloMax® Discover System-TM397) alla lunghezza d'onda di 490 nm. I risultati sono stati espressi come rapporto di incremento rispetto alle cellule controllo.

3.4.3 Misurazione delle specie reattive dell'ossigeno (ROS)

La valutazione dei livelli intracellulari di ROS è stata effettuata mediante una sonda fluorescente sensibile all'ossidazione, la dicloro-diidro-fluoresceina diacetato (DCFH-DA), come precedentemente descritto da Bashllari et al. (2023). Infatti, questa molecola, una volta entrata all'interno della cellula e in presenza di ROS, viene idrolizzata e diossidata, formando la dicloro-fluoresceina (DCF), una molecola fluorescente. Al termine dei trattamenti precedentemente descritti, le cellule sono state lavate con DPBS senza calcio e magnesio e trattate con DCFH-DA 50 μ M per 30 minuti al buio a 37°C. Al termine del periodo di incubazione, la sonda è stata rimossa e sono stati effettuati dei lavaggi con DPBS per eliminarne i residui. L'intensità di fluorescenza è stata quindi misurata mediante fluorimetro (FLUOstar Omega Plate Reader, BMG LABtech, Ortenberg, Germania) alle seguenti lunghezze d'onda: eccitazione 485 nm; emissione 530 nm. Il saggio è stato effettuato in triplicato. L'intensità di fluorescenza risulta direttamente proporzionale alla concentrazione di ROS intracellulari. I livelli di ROS sono stati espressi come intensità di fluorescenza relativa della DCFH-DA, rapportata ai mg di proteine di ciascun campione, e riportati come percentuale rispetto al controllo.

3.4.4 Analisi del processo di espansione mitotica clonale (MCE) in adipociti 3T3-L1

Una volta indotta la differenziazione in adipociti maturi, le cellule 3T3-L1 rientrano in modo sincrono nel ciclo cellulare e la proliferazione cellulare viene ripresa con avvio del processo di espansione mitotica clonale (MCE) (Lazar et al., 2018). Questo è un fenomeno che si manifesta nella fase iniziale del processo di differenziazione dei pre-adipociti e, per tale motivo, proliferazione e ciclo cellulare sono stati analizzati al quarto giorno di differenziazione (al termine della fase di induzione). Una volta raggiunta la confluenza, è stato indotto il processo di differenziazione dei pre-adipociti 3T3-L1 tramite aggiunta del medium MDI in presenza di Sb(III) (0,05, 0,5 e 5 nM) per 4 giorni.

Per prima cosa, per verificare l'effetto dell'antimonio sulla proliferazione cellulare, è stata effettuata la conta cellulare mediante il colorante Eritrosina B. La soluzione di Eritrosina B è stata preparata in DPBS alla concentrazione 0,1% p/v, secondo le istruzioni del produttore (Sigma Aldrich). Dopo aver rimosso le cellule dalla piastra utilizzando Tripsina-EDTA, la conta cellulare è stata eseguita utilizzando un emocitometro, un vetrino portaoggetti per microscopio appositamente progettato per effettuare questo tipo di operazione. Un volume di 20 μ l di colorante è stato addizionato a 20 μ l di campione cellulare e, utilizzando un microscopio ottico, è stata effettuata la conta delle cellule vive, che presentavano solo i margini colorati, mentre le cellule morte apparivano interamente colorate. Dopo aver effettuato la conta delle cellule in tutti i quadrati dell'emocitometro, il numero medio di ciascun campione è stato moltiplicato per il fattore di diluizione applicato e per 10^4 per ottenere il numero di cellule per ml di sospensione cellulare. I risultati sono stati poi espressi come percentuale (%) di cellule rispetto alle cellule controllo.

La valutazione della distribuzione del ciclo cellulare delle cellule 3T3-L1 è stata invece condotta mediante colorazione del DNA con BD Cycletest™ Plus DNA Kit, secondo lo studio di Allegra e colleghi (2018). Le cellule sono state fissate con etanolo al 70% freddo per tutta la notte, poi i nuclei sono stati raccolti e trattati con il kit BD Cycletest™ Plus DNA. La fluorescenza è stata misurata tramite citometria a flusso (FACScan II, Becton Dickinson San Jose, CA, USA). Per ogni campione sono state acquisite almeno 30.000 cellule. I dati sono stati analizzati tramite il software Modfit 3. La distribuzione delle cellule nelle fasi G0/G1, S e G2/M è stata determinata tramite gli istogrammi del contenuto di DNA.

3.4.5 Estrazione delle proteine nucleari e citoplasmatiche

A seguito degli opportuni trattamenti, è stata effettuata l'estrazione delle proteine nucleari e citoplasmatiche. Dopo lavaggio con DPBS senza calcio e magnesio, le cellule sono state staccate dalla piastra con tripsina-EDTA e incubate in un buffer ipotonico (HEPES 10 mM pH 7,9, MgCl₂ 1,5 mM, KCl 10 mM e glicerolo al 5%) contenente inibitori delle proteasi (aprotinina 2 μ g/mL, benzamidina 1 mM, leupeptina 2 μ g/mL, 5 mM NaF) e ditiotreitolo (DTT) 1 mM. I campioni sono stati posti in ghiaccio per 15 min e lisati con Igepal 0,6% (v/v) per 3 min a 4°C. Dopo centrifugazione a 13.000 rpm per 1 min a 4°C, il surnatante contenente le proteine citoplasmatiche è stato raccolto in nuove provette, mentre i rimanenti nuclei sono stati

incubati per 30 minuti a 4°C in un buffer ipertonico (HEPES 20 mM pH 7,9, MgCl₂ 1 mM, NaCl 400 mM, EGTA 1 mM, EDTA 0,1 mM, glicerolo al 10%), contenente inibitori delle proteasi (aprotinina 2 µg/mL, benzamidina 1 mM, leupeptina 2 µg/mL, 5 mM NaF) e DTT 1 mM. Infine, dopo centrifugazione a 13.000 rpm per 15 min a 4°C, il surnatante contenente la frazione proteica nucleare è stato raccolto in apposite provette. I lisati proteici sono stati poi conservati a -20°C fino alle successive analisi.

3.4.6 Determinazione del contenuto proteico

La determinazione del contenuto proteico è stata effettuata mediante saggio colorimetrico di Bradford (Bradford, 1976). L'albumina sierica bovina (BSA) è stata usata come standard di riferimento. Il saggio prevede l'impiego del colorante Coomassie Brilliant Blue, il quale, quando si lega all'arginina o ai residui amminoacidici idrofobici presenti nelle proteine, cambia picco di assorbimento, mostrando un viraggio di colorazione. In particolare, quando il colorante si trova nella sua forma cationica, non legata, è di colore verde-rosso, mentre quando è in forma anionica, quindi legato, vira al blu con un picco di assorbimento a 595 nm. L'aumento dell'assorbanza, registrata mediante spettrofotometro UV-Vis, è proporzionale alla quantità di proteine presenti nei campioni. I risultati sono stati determinati utilizzando una retta di calibrazione e come standard di riferimento l'albumina sierica bovina (BSA).

3.4.7 Immunoblotting

Per le analisi di immunoblotting, 10 µg di lisato nucleare o 30 µg di lisato citoplasmatico per campione sono stati denaturati in 4x SDS-PAGE sample buffer [260 mM Tris-HCl pH 8, 40% (v/v) di glicerolo, 9,2% (p/v) di SDS, 0,04% di blu di bromofenolo, 10% (v/v) di 2-mercaptoetanolo come agente riducente]. I campioni sono stati denaturati a 95°C per 5 minuti e sottoposti a separazione elettroforetica su gel a diverse concentrazioni di acrilamide/bisacrilamide, in base al peso molecolare delle proteine rilevate: in particolare, è stato impiegato un gel con acrilamide/bisacrilamide al 12% per l'analisi delle proteine p21, Bcl-2, Bax e Caspasi-3, mentre con concentrazione al 10% per tutte le altre proteine analizzate. In seguito, le proteine separate sono state trasferite su membrana PVDF (polivinilidenefluoruro) (Hybond-P PVDF, Amersham Bioscience). Per verificare il corretto trasferimento delle proteine, la membrana è stata poi colorata con una soluzione di Ponceau S (0,1% p/v

di Ponceau S in acido acetico al 5%). I lavaggi sono stati effettuati con TBS-T (10 mM Tris, 100 mM NaCl, 0,1% Tween-20). I siti di legame residui della membrana sono stati bloccati tramite incubazione con latte in polvere scremato al 5% (p/v) per 1 ora a temperatura ambiente. Le membrane sono state poi incubate per tutta la notte ed in agitazione a 4°C con gli anticorpi primari specifici:

- rabbit anti-NF- κ B p65 monoclonal antibody (Cell Signaling Technology) (1:1000);
- rabbit anti-Phospho-eIF2 α (Ser51) monoclonal antibody (Cell Signaling Technology) (1:500);
- rabbit anti-eIF2 α (D7D3) monoclonal antibody (Cell Signaling Technology) (1:1000);
- rabbit anti-XBP-1s monoclonal antibody (Cell Signaling Technology) (1:500);
- rabbit anti-Phospho-IKK α/β (Ser176/180) monoclonal antibody (Cell Signaling Technology) (1:1000);
- rabbit anti-IKK β monoclonal antibody (Cell Signaling Technology) (1:1000);
- rabbit anti-Bax monoclonal antibody (Cell Signaling Technology) (1:1000);
- rabbit anti-Bcl2 polyclonal antibody (Sigma-Aldrich) (1:1000);
- mouse anti-Caspasi-3 monoclonal antibody (Santa Cruz Biotechnology) (1:500);
- rabbit anti C/EBP- β (LAP) polyclonal antibody (Cell Signaling Technology) (1:1000);
- mouse anti-PPAR- γ monoclonal antibody (Santa Cruz Biotechnology) (1:1500);
- mouse anti-Cox-2 monoclonal antibody (Santa Cruz Biotechnology) (1:200);
- rabbit anti-p21 Waf1/Cip1 monoclonal antibody (Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX, USA) (1:500)
- rabbit anti-Phospho-Akt monoclonal antibody (Ser 473) (Cell Signaling Technology) (1:1000);
- mouse anti-PI3-kinase p85 α monoclonal antibody (Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX, USA) (1:500);
- rabbit anti- β -Actin monoclonal antibody (Cell Signaling Technology) (1:6000);
- rabbit anti-Lamin-B monoclonal antibody (Cell Signaling Technology) (1:1500).

In seguito, le membrane sono state lavate con TBS-T per eliminare i residui di anticorpo primario non legato, e poi sono state incubate per 2 ore in agitazione a 4°C con gli anticorpi secondari coniugati a perossidasi: anti-rabbit Ig (Cell Signaling Technology) (1:6000) o anti-mouse Ig (Cell Signaling Technology) (1:6000). Le bande sono state visualizzate mediante l'utilizzo di un sistema di rivelazione per chemiluminescenza (Clarity Max ECL, Bio-Rad, Hercules, USA): le membrane sono state incubate per 5 minuti con il reattivo, che è in grado, in presenza della perossidasi coniugata all'anticorpo secondario, di convertirsi in un substrato chemiluminescente. In tal modo, le bande sono state visualizzate esponendo le membrane a lastre fotosensibili o tramite l'impiego di ChemiDoc Imaging System (Bio-Rad, Hercules, CA, USA). L'omogeneità del caricamento dei campioni proteici è stata confermata dalla colorazione con Ponceau S e dall'analisi delle proteine housekeeping β -actina per le proteine citoplasmatiche e Lamin-b per quelle nucleari. L'analisi quantitativa è stata effettuata mediante densitometria usando software ImageJ (Mehlem et al., 2013) e Image Lab (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) ed i dati ottenuti sono stati analizzati mediante Microsoft Excel.

3.4.8 Valutazione dell'espressione genica

3.4.8a Estrazione dell'RNA

L'estrazione dell'RNA è stata effettuata mediante il kit E.Z.N.A. Total RNA Kit I (OMEGA bio-tek VWR), seguendo le istruzioni del produttore. Alla fine degli esperimenti, le cellule sono state lisate con 350 μ l di TRK Lysis Buffer, contenente il 2% di 2-mercaptoetanololo. In seguito, i campioni sono stati trattati con 350 μ l di etanolo al 70% in acqua DNase-RNase-free e omogenizzati in siringa con aghi G21. L'mRNA di ciascun campione è stato separato dagli altri componenti cellulari mediante colonnine provviste di una membrana impaccata di cellulosa contenente catene di oligo(dT), che permette di isolare solamente l'mRNA maturo dei campioni. Dopo ripetuti lavaggi e centrifugazioni, l'mRNA intrappolato nella membrana delle colonnine è stato eluito in 40 μ l di acqua DNase-RNase-free.

3.4.8b Quantificazione dell'RNA

A seguito dell'estrazione, è stata eseguita la quantificazione dell'RNA mediante Quant-iT RNA assay kit e fluorimetro QUBIT (Invitrogen, Milano, Italia), seguendo le istruzioni del produttore. Infatti, la procedura prevede l'utilizzo di uno specifico

colorante che lega l'RNA ed emette un segnale di fluorescenza proporzionale alla quantità di RNA presente nel campione. I livelli di RNA sono stati determinati tramite l'uso di una curva standard fornita dal produttore.

3.4.8c Sintesi del cDNA

Per valutare l'espressione dei geni target nei nostri esperimenti, è stato sintetizzato il filamento di cDNA corrispondente a ciascun campione di RNA, mediante retro-trascrizione. Questa è stata eseguita impiegando una trascrittasi inversa M-MLV (Moloney Murine Leukemia Virus), una DNA polimerasi in grado di sintetizzare un filamento di DNA complementare a partire da un mRNA stampo. Seguendo le istruzioni del produttore (Merk Life Science, Milano, Italia), nella prima fase i campioni, contenenti 1 µl di deossinucleotidi trifosfato dNTP mix 10 mM, 1 µl Oligo(dT)₂₃ 70 µM, campione di mRNA, H₂O DNase-RNase-free (volume totale 10 µl), sono stati sottoposti a riscaldamento a 70°C per 10 minuti al fine di permettere il legame dei primer Oligo(dT). A seguito del raffreddamento, sono stati aggiunti i restanti componenti per la retro-trascrizione (2 µl di M-MLV Buffer 10X, 1 µl di M-MLV, 0,5 µl RNase inhibitor 40 U/µl, H₂O nuclease-free) fino al volume finale di 20 µl, ed i campioni sono stati incubati a 37°C per 50 minuti (fase di allungamento). Infine, sono stati sottoposti ad ulteriore incubazione a 85°C per 10 minuti per inattivare la trascrittasi inversa M-MLV. Il cDNA ottenuto è stato congelato a -20°C fino al momento delle analisi.

3.4.8d Real Time PCR

La valutazione dell'espressione genica a partire dal cDNA sintetizzato è stata effettuata mediante qPCR Real-Time (Applied Biosystems 7300 Real-Time PGR System, GA, USA), con chimica SYBR green (SYBR green JumpStart Taq Ready Mix-Sigma). Questa rappresenta una tecnica quantitativa in grado di misurare in tempo reale la quantità di cDNA amplificato grazie alla sonda fluorescente SYBR Green che emette un'intensità di fluorescenza direttamente proporzionale alla quantità di DNA a doppio-filamento neosintetizzato. Ogni campione di cDNA (1 µl) è stato amplificato mediante l'utilizzo di coppie di primer specifiche per i geni analizzati (Tabella 1 e 2). In dettaglio, in provetta sono stati aggiunti i seguenti reattivi: SYBR Green JumpStar Taq Ready Mix, Forward e Reverse primer 0,2 µM, 1 µl di cDNA. Un campione con funzione di controllo (NTC, No Template Control), contenente tutti i reattivi eccetto il

cDNA, è stato utilizzato nell'analisi in modo da verificare l'eventuale contaminazione dei reattivi. Tutte le reazioni di PCR sono state effettuate in triplicato. Nel dettaglio, dopo un ciclo di 2 minuti a 94°C, necessario per attivare la TAQ polimerasi, sono stati effettuati 40 cicli di amplificazione, di cui ognuno prevedeva:

- denaturazione a 94°C per 15 sec, annealing ed estensione a 60°C per 1 min per le seguenti coppie di primer: 18S rRNA murino, IL-6 umano e murino, IL-8 umano e murino, COX-2 umano, MCP-1 murino.
- denaturazione a 95°C per 15 sec, annealing a 57°C per 1 min ed estensione a 72°C per 1 min per la seguente coppia di primer: SIRT1 umano.
- denaturazione a 94°C per 15 sec, annealing a 60°C per 30 sec ed estensione a 72°C per 1 min per le seguenti coppie di primer: CHOP umano, GRP78 umano, ATF4 umano.
- denaturazione a 95°C per 45 sec, annealing ed estensione a 60°C per 1 min per le seguenti coppie di primer: FASN murino, FABP4 murino.
- denaturazione a 94°C per 15 sec, annealing a 55°C per 30 sec ed estensione a 72°C per 1 min per le seguenti coppie di primer: SREBP-1 murino, CHOP murino, GRP78 murino.
- denaturazione a 94°C per 15 sec, annealing a 63°C per 30 sec ed estensione a 72°C per 1 min per la seguente coppia di primer: TNF- α murino.
- denaturazione a 94°C per 15 sec, annealing a 68°C per 30 sec ed estensione a 72°C per 1 min per la seguente coppia di primer: GAPGH umano.

In seguito, è stato effettuato uno step di dissociazione per escludere la presenza di altri amplificati aspecifici e per determinare la Temperatura di melting (T_m), caratteristica per ogni prodotto amplificato d'interesse. La T_m corrisponde alla temperatura alla quale il 50% del DNA è denaturato e dipende dalla quantità di basi di G e C presenti. La T_m è stata infine confrontata con quella calcolata utilizzando il programma DNA Star (Madison, WI, USA).

		Primer	Lunghezza amplificato	Tm amplificato	Rif.
18S rRNA murino	<i>Forward</i>	5'-GTA ACC CGT TGA ACC CCA TT-3'	151 bp	84-84,7°C	Molonia et al., 2020
	<i>Reverse</i>	5'-CCA TCC AAT CGG TAG TAG CG-3'			
IL-6 murino	<i>Forward</i>	5'-GAT GGA TGC TAC CAA ACT GGA T-3'	85 bp	77,5-78,4°C	Molonia et al., 2022
	<i>Reverse</i>	5'-CCA GGT AGC TAT GGT ACT CCA GA-3'			
IL-8 murino	<i>Forward</i>	5'-GCA CTT GGG AAG TTA ACG CA-3'	96 bp	80-80,3°C	Liu et al., 2020
	<i>Reverse</i>	5'-GCA CAG TGT CCC TAT AGC CC-3'			
TNF-α murino	<i>Forward</i>	5'-AAG CCT GTA GCC CAC GTC GTA-3'	122 bp	87,2-87,9°C	Molonia et al., 2023b
	<i>Reverse</i>	5'-GGC ACC ACT AGT TGG TTG TCT TTG -3'			
FASN murino	<i>Forward</i>	5'-GGA GGT GGT GAT AGC CGG TAT-3'	140 bp	84,2-84,9°C	Zhang et al., 2016
	<i>Reverse</i>	5'-TGG GTA ATC CAT AGA GCC CAG-3'			
FABP4 murino	<i>Forward</i>	5'-AAG GTG AAG AGC ATC ATA ACC CT -3'	133 bp	83,6-83,9°C	Zhang et al., 2016
	<i>Reverse</i>	5'-TCA CGC CTT TCA TAA CAC ATT CC-3'			
SREBP-1 murino	<i>Forward</i>	5'-TGG CTT GGT GAT GCT ATG TT-3'	257 bp	86,2-86,8°C	Ning et al., 2017
	<i>Reverse</i>	5'-TAA GGG GTT GGG AGT AGA GG-3'			
MCP-1 murino	<i>Forward</i>	5'-GGC TCA GCC AGA TGC AGT TAA-3'	76 bp	81,2-81,8°C	Asano et al., 2014
	<i>Reverse</i>	5'-CCT ACT CAT TGG GAT CAT CTT GCT-3'			
CHOP murino	<i>Forward</i>	5'-CGG AAC CTG AGG AGA GAG TG-3'	201 bp	86,8-87,2°C	Asano et al., 2014
	<i>Reverse</i>	5'-TAT AGG TGC CCC CAA TTT CA-3'			
GRP78 murino	<i>Forward</i>	5'-GGA TGC GGA CAT TGA AGA CT-3'	200 bp	85,5-82°C	Asano et al., 2014
	<i>Reverse</i>	5'-TCC CAA CGA AAG TTC CTG AG-3'			

Tabella 1. Sequenze dei primer utilizzati nelle qPCR per i geni murini.

		Primer	Lunghezza amplificato	Tm amplificato	Rif.
GAPDH umano	<i>Forward</i>	5'-GGC TCT CCA GAA CAT CAT CCC TGC-3'	269 bp	86,5-88,5°C	Speciale et al., 2010
	<i>Reverse</i>	5'-GGG TGT CGC TGT TGA AGT CAG AGG-3'			
IL-6 umano	<i>Forward</i>	5'- ACTCACCTCTTCAGA ACGAATTG-3'	149 bp	81,9-83,2°C	Primer Bank ID: 224831235c 1 Wang e Seed, 2003
	<i>Reverse</i>	5'- CCATCTTTGGAAGGT TCAGGTTG-3'			
IL-8 umano	<i>Forward</i>	5'-ACT GAG AGT GAT TGA GAG TGG AC-3'	112 bp	82,1-82,4°C	Ferrari et al., 2017
	<i>Reverse</i>	5'-AAC CCT CTG CAC CCA GTT TTC-3'			
COX-2 umano	<i>Forward</i>	5'- ATGCTGACTATGGCT ACAAAAGC-3'	90 bp	80,8-81,4°C	Primer Bank ID: 223941909c 3 Wang e Seed, 2003
	<i>Reverse</i>	5'- TCGGGCAATCATCAG GCAC-3'			
GRP78 umano	<i>Forward</i>	5'- TCCTATGTCGCCTTC ACTCC-3'	229 bp	87,2-88,3°C	Xiang et al., 2020
	<i>Reverse</i>	5'- ATGTCTTTGTTTGCCC ACCT-3'			
ATF4 umano	<i>Forward</i>	5'- GAAGGAGATAGGAA GCCAGA-3'	201 bp	85-85,4°C	Xiang et al., 2020
	<i>Reverse</i>	5'- GCAGACCCACAGAG AACACC-3'			
CHOP umano	<i>Forward</i>	5'- CTTCTCTGGCTTGGC TGACT-3'	150 bp	85,8-86,4°C	Xiang et al., 2020
	<i>Reverse</i>	5'- TCTGTTTCCGTTTCCT GGTT-3'			
SIRT1 umano	<i>Forward</i>	5'-CTT CAG GTC AAG GGA TGG TAT-3'	233 bp	81-81,3°C	Zhang et al., 2008
	<i>Reverse</i>	5'-GCG TGT CTA TGT TCT GGG TAT-3'			

Tabella 2. Sequenze dei primer utilizzati nelle qPCR per i geni umani.

3.4.8e Elaborazione post-analisi

I risultati sono stati elaborati con il software SDS 1.3.1 (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) ed espressi come threshold cycle (Ct), che corrisponde al ciclo della reazione di amplificazione in cui il segnale di fluorescenza rilevato supera il valore soglia (threshold). Questo valore è inversamente proporzionale alla quantità di gene presente all'inizio della reazione. Inoltre, è stata calcolata la differenza (ΔCt) tra i Ct del gene target di ciascun campione e il Ct di un gene di riferimento (18S rRNA o GAPDH), per normalizzare i dati rispetto alla quantità di template iniziale utilizzato. I valori di Ct dei campioni sono stati poi confrontati con quelli di un campione usato come controllo (cellule non trattate) ed i risultati sono stati espressi come rapporto d'incremento dell'espressione di un gene target in seguito al trattamento, utilizzando la formula di Schmittgen e Livak (2008): $2^{-\Delta\Delta Ct}$.

3.4.9 Analisi statistica

Tutti gli esperimenti sono stati condotti in triplicato e ripetuti tre volte. I risultati sono stati espressi come media \pm deviazione standard (DS) di tre esperimenti indipendenti e sono stati analizzati statisticamente mediante test ANOVA a una-via o a due-vie, seguito da Tukey's HSD, utilizzando il software statistico ezANOVA (<https://people.cas.sc.edu/rorden/ezanova/index.html>). Le differenze tra i gruppi e i trattamenti sono state considerate significative per $p < 0,05$.

4. Risultati

4.1 Effetti dell'antimonio su adipociti murini 3T3-L1

4.1.1 Citotossicità dell'antimonio sui pre-adipociti 3T3-L1

In una fase preliminare è stata valutata la citotossicità dell'Sb(III) sui pre-adipociti 3T3-L1 in modo da impiegare negli esperimenti successivi concentrazioni non citotossiche. Le cellule sono state seminate e dopo 24 ore di incubazione sono state trattate con un ampio range di concentrazioni di Sb(III) (da 0,05 a 25 nM) per 48 ore. La vitalità cellulare è stata valutata tramite il saggio della Sulforodamina B (SRB). I risultati mostrano che l'Sb(III) ha indotto una morte cellulare significativa a partire dalla concentrazione 12,5 nM, raggiungendo valori di vitalità cellulare inferiori al 90% (figura 4). Pertanto, per i successivi esperimenti sono state utilizzate le concentrazioni non citotossiche di Sb(III) 0,05, 0,5 e 5 nM. Dato che l'Sb è stato rilevato a concentrazioni molto basse nel sangue umano, tra 0,15 e 13,55 ng/ml (Lai et al., 2022), le concentrazioni di antimonio usate in questo studio mimano le quantità effettivamente raggiungibili nel circolo sistemico nell'uomo.

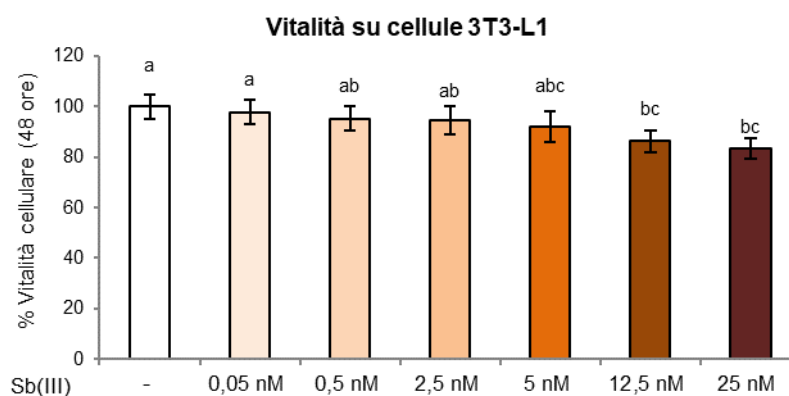


Figura 4. Vitalità cellulare su pre-adipociti 3T3-L1. La citotossicità è stata valutata tramite saggio SRB su pre-adipociti 3T3-L1 esposti a differenti concentrazioni di Sb(III) (da 0,05 a 25 nM) per 48 ore. Le cellule controllo sono state trattate con il solo veicolo (DMSO 0,1%). I risultati sono espressi come percentuale (%) rispetto al controllo e riportati come media \pm DS di tre diversi esperimenti. I valori con la stessa lettera non sono significativamente diversi tra loro ($p > 0,05$).

4.1.2 Effetti dell'antimonio sui meccanismi molecolari che regolano l'adipogenesi

L'obesità rappresenta una particolare condizione patologica caratterizzata dalla presenza di grasso in eccesso nel tessuto adiposo e squilibrio energetico a livello sistemico. Alterazioni metaboliche consistenti a livello del tessuto adiposo possono, infatti, indurre aumento del numero (iperplasia) e della dimensione (ipertrofia) degli adipociti, come anche accumulo di lipidi intracellulari ed induzione del processo di differenziamento dei pre-adipociti in adipociti maturi (adipogenesi) (Tandon et al., 2018). Quest'ultimo meccanismo coinvolge una complessa rete di fattori di trascrizione che agiscono attraverso due fasi. Nella prima fase si osserva l'attivazione della *CCAAT/enhancer-binding protein* β (C/EBP- β), che attiva il differenziamento dei pre-adipociti inducendo i fattori di trascrizione adipogenici della seconda fase, ossia il recettore γ attivato dal proliferatore del perossisoma (PPAR- γ , *peroxisome proliferator-activated receptor gamma*) e la proteina C/EBP- α , che sono in grado di promuovere direttamente l'espressione di geni coinvolti nel processo di trasformazione nel fenotipo adipocitario. Tra questi ritroviamo, ad esempio, *Fatty acid-binding protein 4* (Fabp4/aP2), *Fatty acid synthase* (FASN), *Sterol regulatory element-binding protein 1* (SREBP-1), *Lipoprotein lipase* (LPL) e *adiponectin* (AdipoQ), che determinano l'acquisizione delle caratteristiche morfologiche e biochimiche tipiche degli adipociti maturi (Ali et al., 2013; Ghaben e Scherer, 2019; Siersbæk et al., 2010; De sà et al., 2011).

Sulla base di queste considerazioni, gli effetti dell'Sb(III) sul processo di adipogenesi sono stati valutati esponendo i pre-adipociti 3T3-L1 al metallo durante l'intero processo di differenziazione cellulare (10 giorni) e analizzando poi l'accumulo lipidico intracellulare. Attraverso la tecnica di colorazione istologica Oil Red O, è stato dimostrato che l'esposizione a Sb(III) ha indotto un significativo aumento dose-dipendente della dimensione e del numero dei depositi lipidici rispetto alle cellule differenziate non trattate (CTR) (figura 5), indice dell'aumentato grado di differenziazione degli adipociti esposti al metallo.

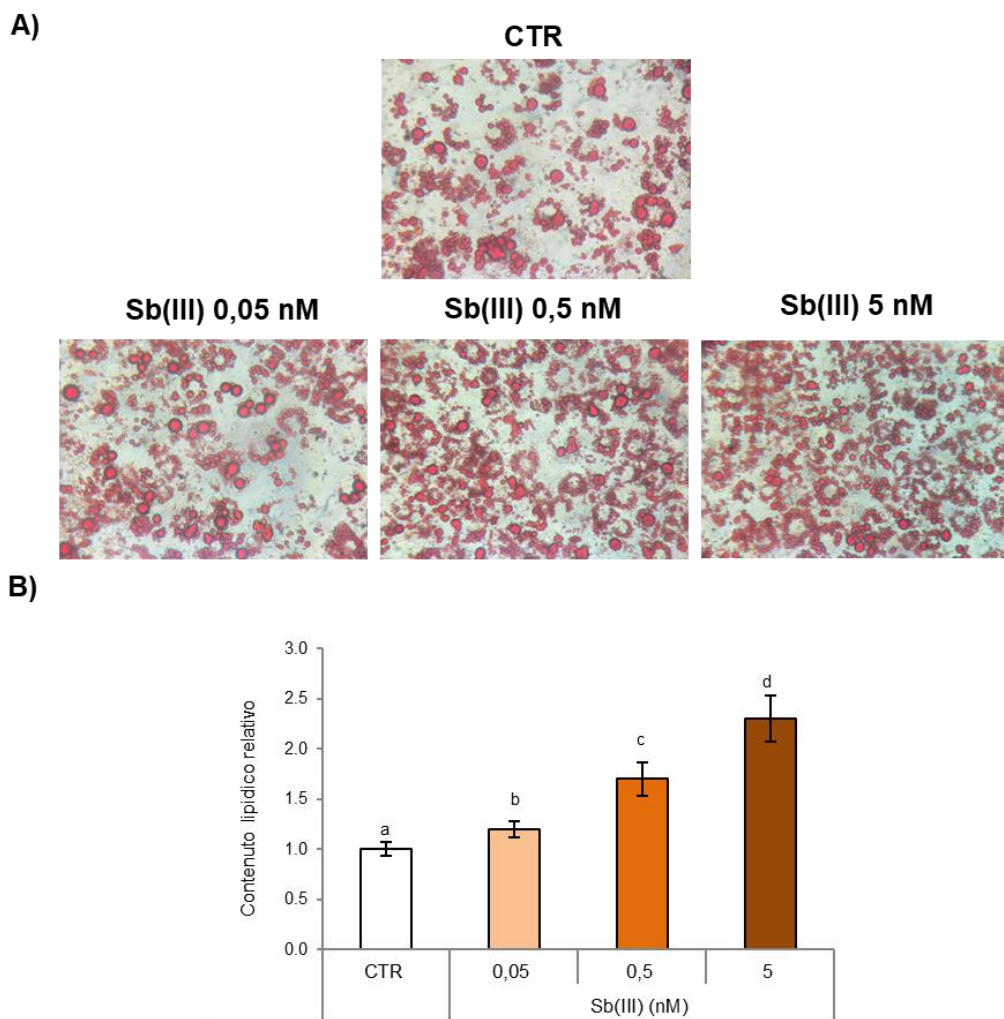


Figura 5. Colorazione con Oil Red O. Le cellule 3T3-L1 sono state esposte a Sb(III) (0,05, 0,5 e 5 nM) per tutto il periodo di differenziazione (10 giorni). Le cellule esposte al solo veicolo (DMSO 0,1%) sono state usate come controllo (CTR). (A) Immagini rappresentative di tre esperimenti indipendenti della colorazione con Oil Red O effettuate con microscopio (ingrandimento 40x). (B) I depositi lipidici sono stati quantificati mediante analisi spettrofotometrica ed i risultati sono espressi come contenuto relativo rispetto alle cellule CTR. I dati sono riportati come media \pm DS di tre esperimenti indipendenti. I valori con la stessa lettera non sono significativamente diversi tra loro ($p > 0,05$).

Inoltre, al fine di chiarire i meccanismi molecolari coinvolti nell'effetto obesogeno dell'antimonio, è stata valutata l'espressione di fattori trascrizionali chiave del processo di adipogenesi.

Come detto in precedenza, infatti, la differenziazione dei pre-adipociti comporta l'attivazione sequenziale di diversi fattori di trascrizione che determinano acquisizione delle caratteristiche morfologiche e biochimiche tipiche degli adipociti maturi (Ali et al., 2013). A tale scopo, per valutare il meccanismo attraverso il quale l'Sb(III) è in grado di incentivare l'accumulo dei lipidi intracellulari, sono stati valutati, mediante tecnica Western Blot, i livelli di espressione di C/EBP- β dopo i primi 4 giorni di differenziazione e quelli di PPAR- γ alla fine dell'intero processo. I livelli di C/EBP- β sono stati valutati in una fase precedente in quanto si tratta di un importante fattore di trascrizione, essenziale per l'espressione dei fattori trascrizionali tardivi, espresso nella fase iniziale dell'adipogenesi; PPAR- γ , invece, è il principale modulatore del processo di adipogenesi, in quanto, una volta attivato, forma un eterodimero con il recettore retinoide X e, legandosi a specifiche sequenze di DNA, determina l'aumento dei lipidi intracellulari, modula la secrezione di numerosi fattori trascrizionali coinvolti nell'adipogenesi e regola la sensibilità all'insulina (Rodriguez-Cuenca et al., 2012). I risultati ottenuti confermano che l'Sb(III) è in grado di indurre un significativo aumento dose-dipendente dei livelli di C/EBP- β e PPAR- γ , espressi rispettivamente nella fase precoce e nella fase tardiva del processo di adipogenesi (figura 6, A e B). Da notare che gli effetti sono stati osservati già a partire dalla concentrazione più bassa di Sb(III) testata (0,05 nM).

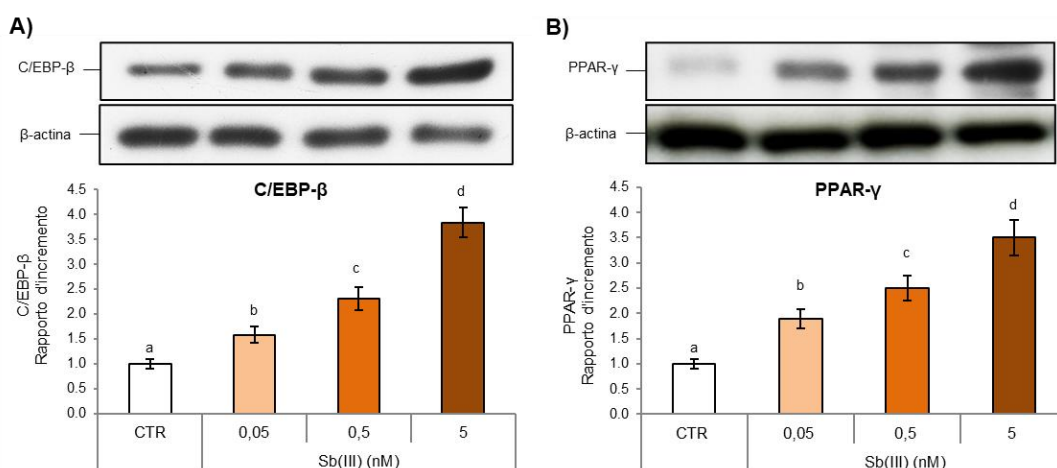


Figura 6. Livelli dei marker pro-adipogenici. Le cellule 3T3-L1 sono state esposte a Sb(III) (0,05, 0,5 e 5 nM) per tutto il periodo di differenziazione (10 giorni). Le cellule esposte al solo veicolo (DMSO 0,1%) sono state usate come controllo (CTR). I valori di C/EBP- β (A) sono stati valutati dopo i primi 4 giorni di differenziazione, mentre i livelli di PPAR- γ (B) alla fine dell'intero processo di differenziazione. I risultati sono stati normalizzati per i corrispondenti valori di β -actina e riportati come rapporto d'incremento rispetto alle cellule controllo (CTR). Tutti i dati sono riportati come media \pm DS di tre esperimenti indipendenti. I valori con la stessa lettera non sono significativamente diversi tra loro ($p > 0,05$).

Come ulteriore conferma dell'effetto pro-adipogenico dell'Sb(III), alla fine del processo di differenziazione cellulare, abbiamo esaminato i livelli di espressione genica di FASN, FABP4 e SREBP-1. L'espressione di tali geni, regolati da PPAR- γ , risulta, infatti, essenziale a livello del tessuto adiposo proprio perché coinvolti nel processo di trasporto, biosintesi e metabolismo degli acidi grassi durante l'adipogenesi. Anche in questo caso, il trattamento con Sb(III) ha indotto un aumento dose-dipendente dell'espressione di questi geni target rispetto alle cellule controllo già a partire dalla concentrazione 0,05 nM (figura 7), supportando ancora la teoria che questo metallo agisca come agente obesogeno, modulando le vie molecolari di C/EBP- β e PPAR- γ .

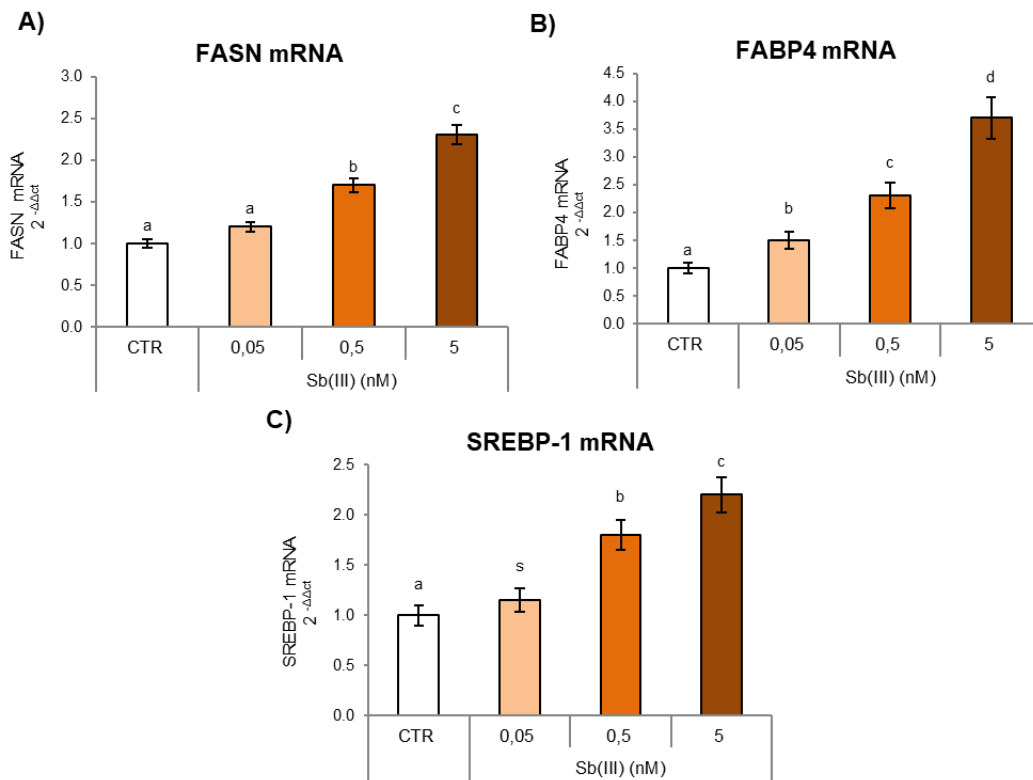


Figura 7. Espressione genica di FASN, FABP4 e SREBP-1. Le cellule 3T3-L1 sono state esposte a Sb(III) (0,05, 0,5 e 5 nM) per tutto il periodo di differenziazione (10 giorni). Le cellule esposte al solo veicolo (DMSO 0,1%) sono state usate come controllo (CTR). I livelli di espressione genica di (A) FASN, (B) FABP4 e (C) SREBP-1 sono stati espressi come $2^{-\Delta\Delta Ct}$ e normalizzati rispetto alle cellule CTR. Il 18S rRNA è stato usato come gene housekeeping. Tutti i risultati sono riportati come media \pm DS di tre esperimenti indipendenti. I valori con la stessa lettera non sono significativamente diversi tra loro ($p > 0,05$).

4.1.3 Effetti dell'antimonio sul processo di espansione mitotica clonale (MCE)

Successivamente, al fine di approfondire ulteriormente i meccanismi molecolari alla base dell'effetto osservato, abbiamo valutato l'azione dell'Sb(III) sulle fasi iniziali del processo di adipogenesi, prendendo in esame il processo di espansione mitotica clonale (MCE). Un requisito essenziale nell'induzione del processo di adipogenesi, infatti, è rappresentato da tale fase, durante la quale gli adipociti in differenziamento, a seguito di opportuna stimolazione ormonale, escono dalla fase di quiescenza iniziale per rientrare nel ciclo cellulare, per ulteriori due cicli di divisione prima dell'espressione dei principali fattori adipogenici che determinano la totale differenziazione in adipociti maturi (Kuri-Harcuch et al., 2019). Essendo questo un processo che si manifesta nella fase iniziale della differenziazione dei pre-adipociti, proliferazione e ciclo cellulare sono stati analizzati al quarto giorno di differenziazione, ovvero al termine della fase di induzione. Pertanto, i pre-adipociti 3T3-L1 sono stati trattati per quattro giorni con il mix di induttori dell'adipogenesi (medium MDI – insulina 1 µg/ml, IBMX 0,5 mM e desametasone 1 µM) in presenza di Sb(III) a diverse concentrazioni, e processati alla fine della fase di induzione adipogenica.

Inizialmente è stato preso in esame l'effetto dell'Sb(III) sulla proliferazione cellulare (figura 8 A), ed i risultati ottenuti hanno mostrato come l'esposizione all'Sb(III) abbia indotto, in maniera dose-dipendente, un significativo aumento della proliferazione cellulare a partire dalla concentrazione più bassa testata (0,05 nM). Tutto ciò a conferma, dunque, di come il trattamento con l'Sb(III) abbia aumentato la capacità dei pre-adipociti di rientrare nel ciclo cellulare, con conseguente induzione della MCE.

Successivamente, al fine di indagare ulteriormente sul meccanismo osservato, abbiamo analizzato, tramite citometria a flusso, la progressione del ciclo cellulare a seguito del trattamento con Sb(III). I dati ottenuti, riportati in figura 8 B, mostrano come il trattamento con Sb(III) abbia alterato la distribuzione del ciclo cellulare tra le diverse fasi (G0/G1, G2/M e S). Nello specifico è stato riscontrato che l'esposizione all'Sb(III), in maniera dose dipendente, ha aumentato la percentuale di cellule nella fase di crescita G2/M rispetto alla fase di quiescenza G0/G1 (figura 8 C). Questi dati suggeriscono, dunque, come l'effetto pro-adipogenico dell'Sb(III) sia dovuto alla capacità di tale metallo di indurre i meccanismi alla base della MCE, favorendo la progressione del ciclo cellulare in fase G2/M.

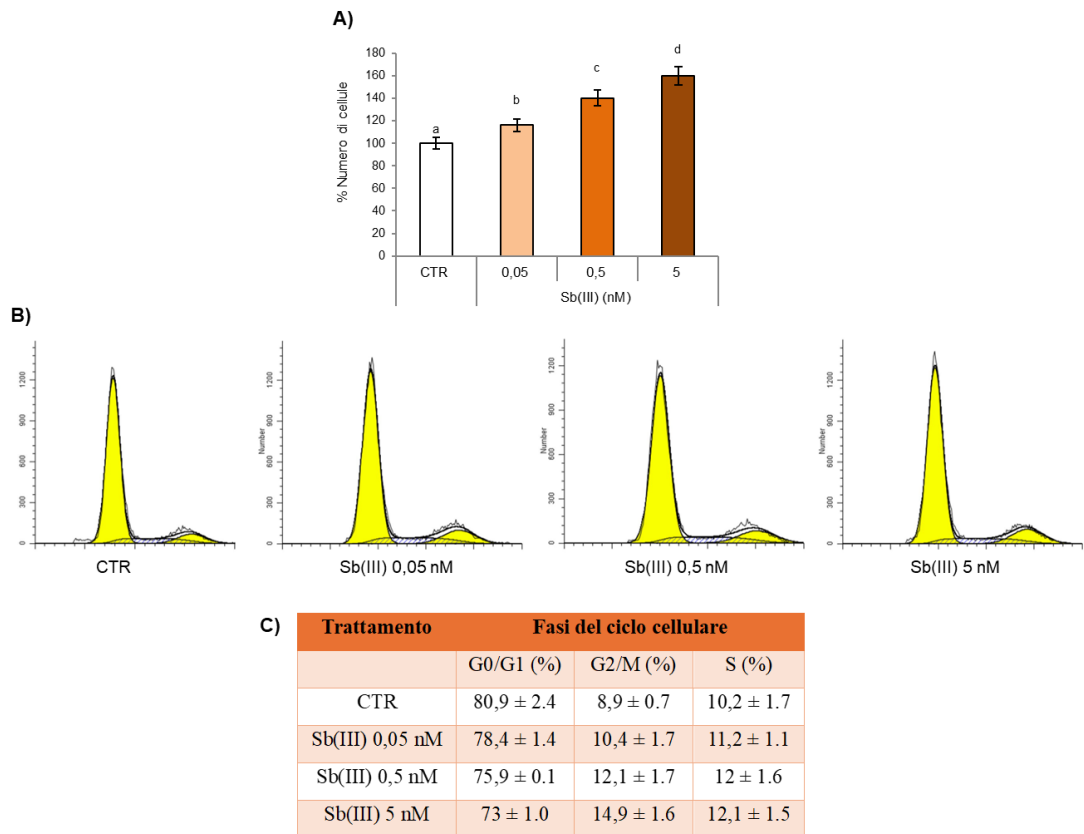


Figura 8. Induzione dell'espansione mitotica clonale. Le cellule 3T3-L1 sono state trattate con medium di differenziazione (MDI) contenente Sb(III) (0,05, 0,5 e 5 nM) dal giorno 0 al giorno 4 di differenziazione, ovvero durante la fase di induzione. Le cellule coltivate con medium MDI contenente il solo veicolo (DMSO 0,1%) sono state usate come controllo (CTR). (A) Effetto sul numero di cellule: la conta cellulare è stata effettuata al giorno 4 con Eritrosina B mediante emocitometro. I valori sono riportati come media \pm DS di tre esperimenti indipendenti e normalizzati rispetto al CTR. (B, C) Effetto sull'arresto del ciclo cellulare: il numero di cellule nelle fasi G0/G1, G2/M e S al giorno 4 di differenziazione è stato determinato grazie agli istogrammi del contenuto di DNA ed è stato espresso come media in percentuale (%) del numero totale di cellule \pm DS di tre esperimenti indipendenti. I valori con la stessa lettera non sono significativamente diversi tra loro ($p > 0,05$).

In seguito, ad ulteriore conferma del meccanismo osservato, è stata valutata l'espressione del noto inibitore del ciclo cellulare p21. Tale fattore, infatti, svolge un ruolo chiave nella regolazione del ciclo cellulare e nella promozione della differenziazione negli adipociti, contribuendo alla loro maturazione e alla funzionalità

metabolica (Chang e Kim, 2019). Il fattore p21 inibisce, infatti, la progressione del ciclo cellulare negli adipociti bloccando l'attività delle chinasi ciclina-dipendenti (CDK), che sono necessarie per la transizione tra le fasi del ciclo cellulare. Tale effetto è particolarmente importante durante la differenziazione degli adipociti, poiché il blocco del ciclo cellulare è necessario affinché le cellule possano maturare in adipociti (Wang et al., 2022b).

I risultati ottenuti hanno mostrato chiaramente come l'esposizione a Sb(III), a partire dalla concentrazione più bassa testata, abbia determinato una significativa diminuzione dose-dipendente di p21 rispetto alle cellule CTR (figura 9), confermando, dunque, come l'esposizione a tale metallo acceleri il processo di proliferazione nelle cellule 3T3-L1 durante il processo di adipogenesi, inducendo la fase G2/M del ciclo cellulare, e che questo effetto è associato alla riduzione dell'inibitore del ciclo cellulare p21.

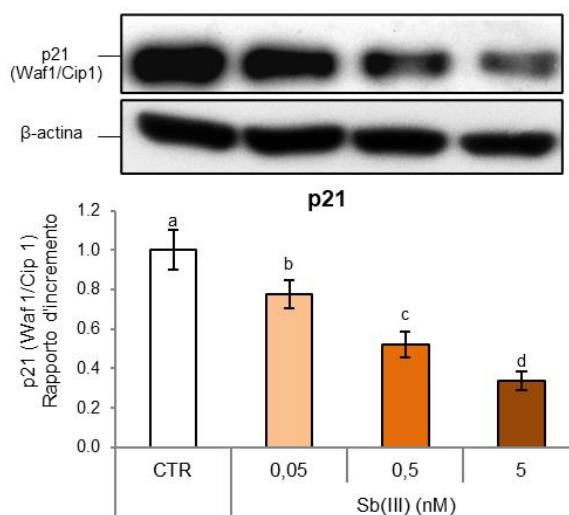


Figura 9. Livelli di p21 (Waf1/Cip1). Le cellule 3T3-L1 sono state trattate con medium di differenziazione (MDI) contenente Sb(III) (0,05, 0,5 e 5 nM) dal giorno 0 al giorno 4 di differenziazione, ovvero durante la fase di induzione. Le cellule coltivate con medium MDI contenente il solo veicolo (DMSO 0,1%) sono state usate come controllo (CTR). I livelli proteici di p21 (Waf1/Cip1) sono espressi come rapporto d'incremento rispetto alle cellule CTR e normalizzati con i valori corrispondenti di β -actina e riportati come media \pm DS di tre esperimenti indipendenti. I valori con la stessa lettera non sono significativamente diversi tra loro ($p > 0,05$).

4.1.4 Effetti dell'ICI sulla differenziazione degli adipociti indotta dall'antimonio

È ampiamente risaputo come gli estrogeni svolgano un ruolo essenziale nella regolazione del metabolismo del tessuto adiposo, influenzando la distribuzione del grasso corporeo, il metabolismo lipidico e la sensibilità insulinica (Ortiz-Huidobro et al., 2021). A seguito, infatti, dell'interazione con i recettori degli estrogeni ER α e ER β , ampiamente espressi nelle cellule adipose, gli estrogeni influenzano la differenziazione degli adipociti facilitando l'accumulo dei lipidi, modificando la concentrazione di mediatori infiammatori ed aumentando l'espressione di marcatori tipici degli adipociti maturi (Cooke e Naaz, 2004; Bracht et al., 2020). Pertanto, la comprensione dei meccanismi attraverso cui gli estrogeni influenzano il tessuto adiposo è fondamentale per il trattamento di disordini metabolici legati all'obesità e alla disfunzione del tessuto adiposo.

Diversi studi hanno evidenziato come l'antimonio sia in grado di alterare l'omeostasi metabolica tramite interazione con il recettore degli estrogeni (EsR), già a partire da concentrazioni al di sotto di 1 μ M, agendo quindi da interferente endocrino (Choe et al., 2003). Pertanto, allo scopo di cercare di chiarire i meccanismi alla base degli effetti dell'antimonio fin qui osservati, siamo andati a valutare la sua capacità di interferire con tale meccanismo regolatorio.

Inizialmente, per validare il nostro modello sperimentale, abbiamo testato la responsività degli adipociti 3T3-L1 all'estradiolo (E₂), il principale estrogeno presente nell'organismo, nonché l'effetto di un antagonista specifico del EsR, l'ICI 182,780 (ICI), andando in particolare a valutarne gli effetti sulla modulazione di PPAR- γ , in quanto principale fattore di trascrizione coinvolto nella regolazione del metabolismo lipidico e della differenziazione adipocitaria, ed in quanto, come descritto prima (figura 6 B), l'Sb(III) è in grado di indurre un significativo aumento dose-dipendente dei suoi livelli. Inoltre, diversi studi hanno dimostrato come E₂ possa agire da modulatore di PPAR- γ , influenzando la trascrizione dei geni target associati alla lipogenesi e alla differenziazione adipocitaria (Pedersen et al., 2004; Foryst-Ludwig e Kintscher, 2010; Cooke e Naaz, 2004).

Le cellule 3T3-L1, dunque, sono state esposte a E₂ alla concentrazione 1 nM, in presenza o meno di ICI 10 nM, durante tutto il periodo di differenziazione adipocitaria (10 giorni). I risultati ottenuti hanno dimostrato come l'esposizione a E₂ abbia determinato un considerevole aumento dei livelli di PPAR- γ rispetto al controllo e

come, invece, il co-trattamento con ICI sia stato in grado di determinare riduzione di tale marker a livelli paragonabili alle cellule controllo non trattate in figura 10.

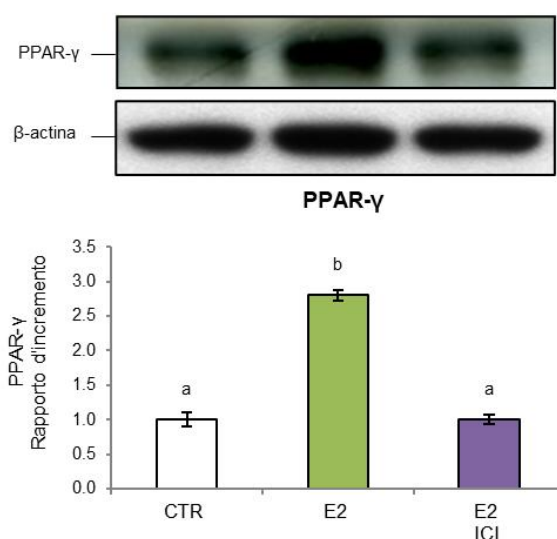


Figura 10. Effetto dell'estradiolo (E₂) e dell'antagonista dell'EsR (ICI) sull'attivazione di PPAR-γ. Le cellule 3T3-L1 sono state esposte a E₂ 1 nM in presenza o meno di ICI 10 nM per tutto il processo di differenziazione (10 giorni). Le cellule esposte al solo veicolo (DMSO 0,1%) sono state usate come controllo (CTR). I risultati sono riportati come rapporto d'incremento rispetto alle cellule CTR. I valori proteici di PPAR-γ sono stati normalizzati rispetto ai valori corrispondenti di β-actina. Tutti i dati sono espressi come media ± DS di tre esperimenti indipendenti. I valori con la stessa lettera non sono significativamente diversi tra loro ($p > 0,05$).

Una volta dimostrata l'utilità di questo modello per i nostri scopi, abbiamo quindi preso in esame il potenziale ruolo del EsR nell'induzione del processo di adipogenesi da parte dell'Sb(III). Le cellule 3T3-L1 sono state trattate con Sb(III) e ICI 10 nM durante tutto il periodo di differenziazione (10 giorni) e alla fine sono stati valutati i livelli proteici PPAR-γ. I risultati ottenuti hanno dimostrato come il trattamento con ICI, durante tutta la differenziazione adipogenica, abbia prevenuto gli effetti dell'Sb(III) sull'attivazione di PPAR-γ ripristinando i livelli proteici simili ai valori delle cellule CTR (figura 11). In conclusione, questi risultati suggeriscono come l'Sb(III) sia in grado di indurre il processo di differenziazione delle cellule 3T3-L1 in adipociti maturi attraverso un meccanismo basato sul EsR. Tuttavia, è ovvio che tali

dati necessitano di ulteriori conferme utilizzando saggi specifici capaci di studiare il targeting diretto o indiretto di EsR.

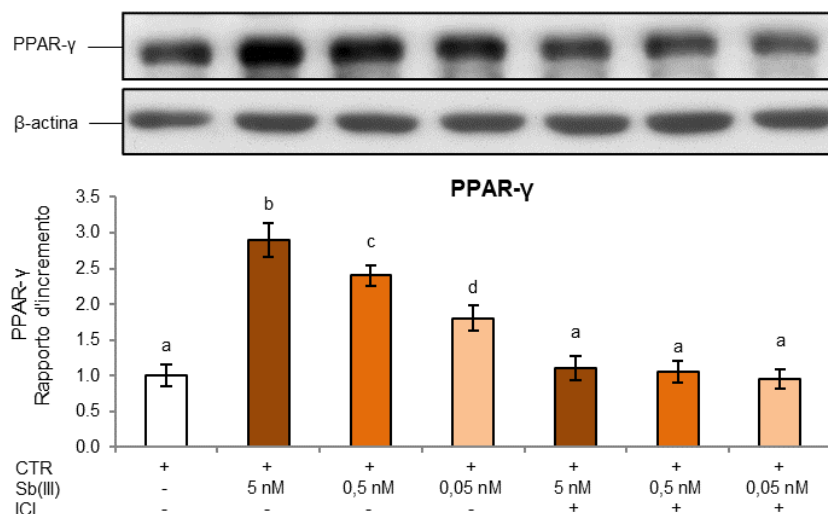


Figura 11. Effetto dell'antagonista dell'EsR ICI sull'attivazione di PPAR- γ indotta da Sb(III). Le cellule 3T3-L1 sono state esposte a Sb(III) (0,05, 0,5 e 5 nM) per tutto il processo di differenziazione (10 giorni). Le cellule esposte al solo veicolo (DMSO 0,1%) sono state usate come controllo (CTR). I risultati sono riportati come rapporto d'incremento rispetto alle cellule CTR. I valori proteici di PPAR- γ sono stati normalizzati rispetto ai valori corrispondenti di β -actina. Tutti i dati sono riportati come media \pm DS di tre esperimenti indipendenti. I valori con la stessa lettera non sono significativamente diversi tra loro ($p > 0,05$).

4.1.5 Effetti dell'antimonio sull'omeostasi del reticolo endoplasmatico in adipociti murini

Il reticolo endoplasmatico (RE) è l'organulo deputato alla biosintesi dei lipidi, all'accumulo degli ioni Ca^{2+} e alle modifiche post-traduzionali delle proteine nel tessuto adiposo. In particolari situazioni, come in caso di aumento dei lipidi intracellulari (obesità), di ipossia, di alterazioni delle vie di segnale infiammatorie o esposizione a fattori di stress esterni, le funzioni del RE possono essere compromesse e determinare in tal modo uno stato di squilibrio metabolico, chiamato stress del RE. Questa condizione attiva a sua volta a cascata i meccanismi di segnale detti, nel complesso, UPR (*unfolded protein response*), con l'obiettivo di ripristinare l'integrità e la funzionalità del RE, in particolare PERK (*PRK-like ER kinase*), IRE1 (*inositol*

requiring enzyme 1) e ATF6 (activating transcription factor 6), tutte inattive allo stato basale. Studi recenti hanno rivelato che lo stress del RE è strettamente correlato alle condizioni di obesità e infiammazione, tanto da essere considerato un indicatore della progressione di questa condizione patologica (Mahameed et al., 2020). Inoltre, il RE funge da regolatore chiave dell'omeostasi sistemica metabolica e una sua alterazione può costituire una delle principali cause di infiammazione cronica (Li et al., 2018). Al fine di valutare gli effetti dell'Sb(III) sulla funzionalità del RE, sono stati presi in esame i principali marker attivati a cascata dalle vie UPR, come la forma attiva dell'*eukaryotic initiation factor-2 α* (p-eIF2 α) e la forma spliced della *X-box binding protein 1* (XBP-1s). Come mostrato nella figura 12, nel nostro modello sperimentale il trattamento con Sb(III) durante il processo di differenziazione dei pre-adipociti ha causato un aumento dose-dipendente dei livelli di XBP-1s, fattore in grado di stimolare la trascrizione di geni correlati alle risposte UPR e deputati alla sintesi dei lipidi, all'insulino-resistenza e all'infiammazione (Wu et al., 2015). Inoltre, in maniera analoga, l'Sb(III) ha incrementato i livelli di p-eIF2 α , proteina responsabile della riduzione della sintesi proteica e della correzione delle proteine mal ripiegate accumulate nel lume del RE in condizioni di stress (Amen et al., 2019).

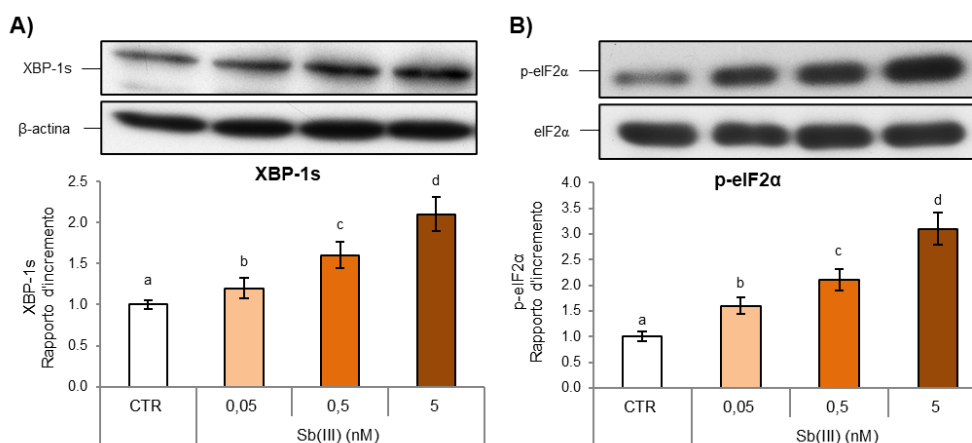


Figura 12. Effetto dell'antimonio sui livelli di XBP-1s e p-eIF2 α . Le cellule 3T3-L1 sono state esposte a Sb(III) (0,05, 0,5 e 5 nM) per tutto il processo di differenziazione (10 giorni). Le cellule esposte al solo veicolo (DMSO 0,1%) sono state usate come controllo (CTR). I livelli delle proteine XBP-1s (A) e p-eIF2 α (B) sono riportati come rapporto d'incremento rispetto alle cellule CTR. I livelli di β -actina e di eIF2 α sono stati usati per la normalizzazione. I risultati sono riportati come media \pm DS di tre esperimenti indipendenti. I valori con la stessa lettera non sono significativamente diversi tra loro ($p > 0,05$).

Per approfondire ulteriormente lo studio dei meccanismi con cui l'Sb(III) altera l'omeostasi del RE, sono state valutate le risposte UPR anche a livello trascrizionale. Il fattore XBP-1s può stimolare l'espressione del gene GRP78 (*glucose-regulated protein 78*), che codifica per una proteina chaperone coinvolta nel *folding* delle proteine (Amen et al., 2019). Dall'altra parte, p-eIF2 α induce l'espressione genica di CHOP (*CCAAT/enhancer-binding protein homologous protein*), un fattore coinvolto nella risposta cellulare apoptotica (Vestuto et al., 2022). Come riportato in figura 13, l'esposizione delle cellule 3T3-L1 all'Sb(III) ha provocato aumento dose-dipendente dell'espressione genica di GRP78 e CHOP, già a partire dalla concentrazione 0,05 nM, confermando il danno al RE e la conseguente attivazione dei meccanismi di riparazione UPR causati dall'esposizione a concentrazioni molto basse di Sb(III).

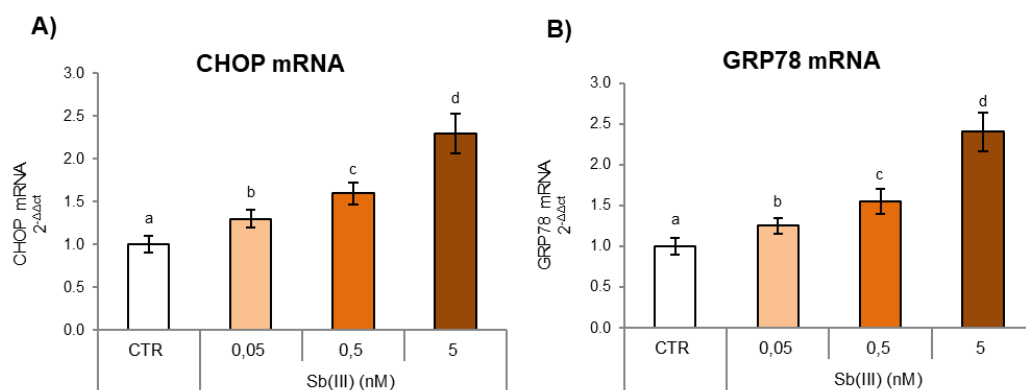


Figura 13. Attivazione dei geni UPR in risposta allo stress del RE. Le cellule 3T3-L1 sono state esposte a Sb(III) (0,05, 0,5 e 5 nM) per tutto il processo di differenziazione (10 giorni). Le cellule esposte al solo veicolo (DMSO 0,1%) sono state usate come controllo (CTR). I valori di mRNA di CHOP (A) e GRP78 (B) sono stati espressi come $2^{-\Delta\Delta C_t}$. Il 18S rRNA è stato usato come gene housekeeping. Tutti i dati sono riportati come media \pm DS di tre esperimenti indipendenti. I valori con la stessa lettera non sono significativamente diversi tra loro ($p > 0,05$).

Infine, poiché è noto che lo stress del RE e lo stress ossidativo sono due fenomeni strettamente correlati e dato che l'attivazione prolungata delle risposte UPR può alterare lo stato redox cellulare (Almanza et al., 2019), ci siamo soffermati sui livelli intracellulari di ROS. I risultati ottenuti hanno evidenziato un incremento

dell'accumulo intracellulare di ROS in seguito al trattamento con Sb(III) rispetto alle cellule CTR, osservato già a partire dalla concentrazione più bassa testata (figura 14).

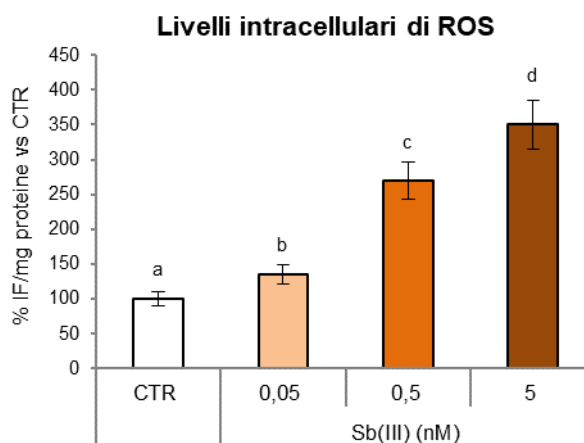


Figura 14. Alterazione dello stato redox cellulare. Le cellule 3T3-L1 sono state esposte a Sb(III) (0,05, 0,5 e 5 nM) per tutto il processo di differenziazione (10 giorni). Le cellule esposte al solo veicolo (DMSO 0,1%) sono state usate come controllo (CTR). I livelli intracellulari di ROS sono stati espressi come percentuale di intensità di fluorescenza (IF)/mg di proteine rispetto al CTR e riportati come media \pm DS di tre esperimenti indipendenti. I valori con la stessa lettera non sono significativamente diversi tra loro ($p > 0,05$).

4.1.6 Attivazione del pathway infiammatorio di NF- κ B in adipociti murini

L'iperplasia e l'ipertrofia degli adipociti, caratteristiche dell'obesità e associate al processo di adipogenesi modulato da C/EBP- β e PPAR- γ , sono due fenomeni che possono indurre l'iniziazione del processo di infiammazione nel tessuto adiposo, con rilascio di numerose adipochine pro-infiammatorie. Inoltre, sia lo stress del RE sia l'accumulo intracellulare di ROS sono strettamente correlati alle vie di segnale infiammatorie (Kawasaki et al., 2012). D'altronde, l'attivazione del pathway infiammatorio di NF- κ B è cruciale per la progressione di malattie croniche, tra cui l'obesità.

La cascata di NF- κ B ha inizio con la stimolazione del fattore IKK (*inhibitor of κ B kinase*), che a sua volta promuove la degradazione di I κ B (*kb-inhibitor*) e la traslocazione della subunità p65 di NF- κ B dal citoplasma al nucleo, dove interagisce

con diverse sequenze del DNA e regola la trascrizione di geni bersaglio con attività pro-infiammatorie. Come riportato nella figura 15, l'Sb(III) ha determinato, a partire dalla concentrazione più bassa testata (0,05 nM), un aumento dose-dipendente dei livelli nucleari di p65 rispetto alle cellule CTR, nonché un incremento della fosforilazione (attivazione) di IKK (pIKK) con un analogo andamento, effetti indice di attivazione dell'innesco della cascata infiammatoria.

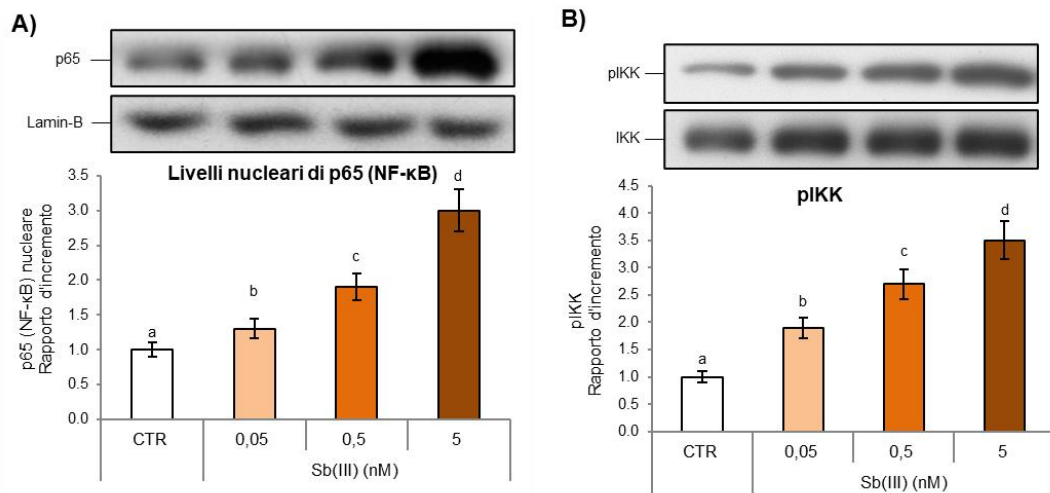


Figura 15. Attivazione del pathway di NF-κB. Le cellule 3T3-L1 sono state esposte a Sb(III) (0,05, 0,5 e 5 nM) per tutto il processo di differenziazione (10 giorni). Le cellule esposte al solo veicolo (DMSO 0,1%) sono state usate come controllo (CTR). Livelli delle proteine p65 (NF-κB) a livello nucleare (A) e pIKK a livello citoplasmatico (B). I risultati sono stati espressi come rapporto d'incremento rispetto alle cellule CTR. Lamin-B e IKK sono state usate come proteine di riferimento. Tutti i risultati sono riportati come media \pm DS di tre esperimenti indipendenti. I valori con la stessa lettera non sono significativamente diversi tra loro ($p > 0,05$).

Per confermare ulteriormente la modulazione del pathway di NF- κ B da parte dell'antimonio, è stata valutata l'attività a livello trascrizionale. I risultati hanno mostrato che l'esposizione ad Sb(III) ha promosso l'espressione genica di MCP-1, IL-6, IL-8 e TNF- α , citochine rilasciate a seguito dell'attivazione di NF- κ B che esercitano importanti effetti sull'omeostasi del glucosio, sulla regolazione dell'assunzione del cibo e sulle risposte infiammatorie nel tessuto adiposo (figura 16 A) (Tilg e Moschen, 2006). In particolare, MCP-1, una volta rilasciato nel tessuto adiposo, agisce da fattore chemiotattico per i monociti ed è in grado di indurre insulino-resistenza in diverse condizioni patologiche, come l'obesità (Kanda et al., 2006). IL-6, IL-8 e TNF- α sono invece citochine pro-infiammatorie, che promuovono il dispendio energetico, l'insulino-resistenza e regolano il metabolismo lipidico (Wang e He, 2018). Infine, il trattamento con Sb(III) durante il processo di differenziazione degli adipociti 3T3-L1 ha determinato un incremento dei livelli della proteina COX-2, isoforma inducibile rilasciata nel citoplasma durante lo stato infiammatorio, con lo scopo di ristabilire l'omeostasi cellulare (figura 16 B). Tutti i dati confermano dunque che concentrazioni nanomolari di Sb(III) sono in grado di attivare il processo infiammatorio attraverso il pathway di NF- κ B, esplicando importanti effetti citotossici sugli adipociti murini 3T3-L1.

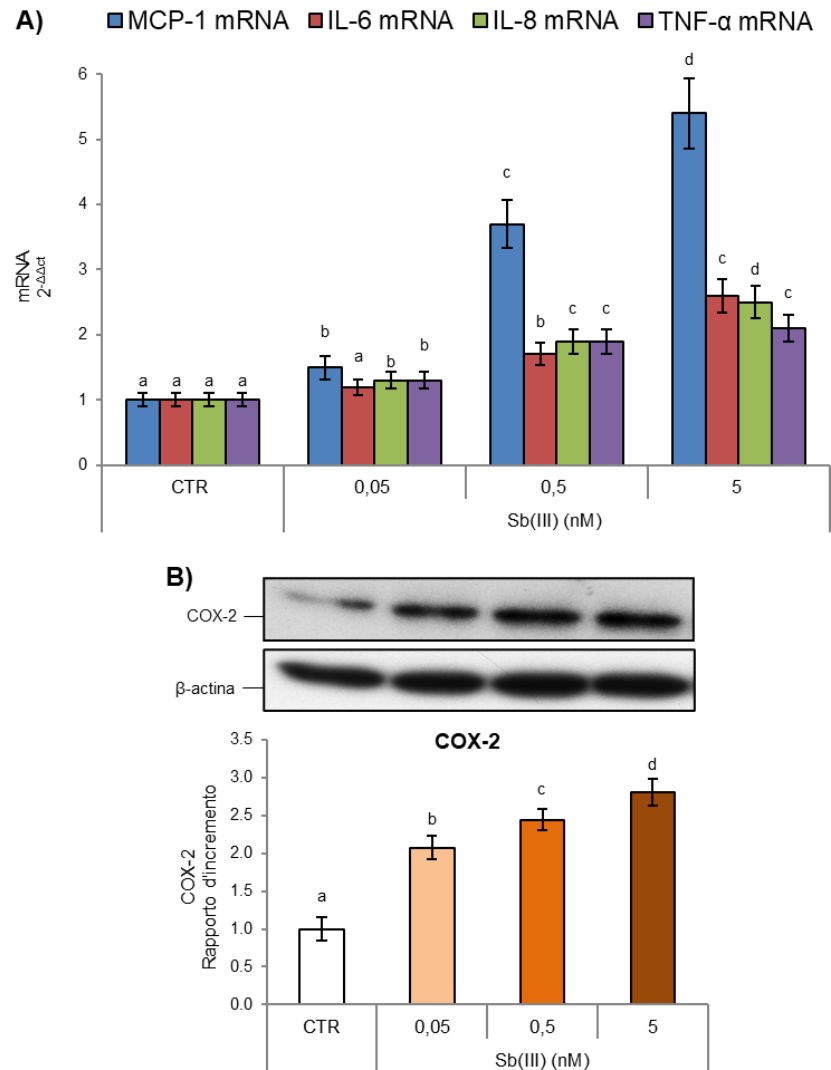


Figura 16. Modulazione del pathway infiammatorio a livello trascrizionale. Le cellule 3T3-L1 sono state esposte a Sb(III) (0,05, 0,5 e 5 nM) per tutto il processo di differenziazione (10 giorni). Le cellule esposte al solo veicolo (DMSO 0,1%) sono state usate come controllo (CTR). (A) L'espressione genica di MCP-1, IL-6, IL-8 e TNF- α è stata espressa come $2^{-\Delta\Delta C_t}$ e normalizzata rispetto alle cellule CTR. Il 18S rRNA è stato usato come gene housekeeping. (B) I livelli di COX-2 sono stati espressi come rapporto d'incremento rispetto alle cellule CTR. La proteina β -actina è stata usata per la normalizzazione. Tutti i dati sono riportati come media \pm DS di tre esperimenti indipendenti. Relativamente ai singoli geni e alla proteina, i valori con la stessa lettera non sono significativamente diversi tra loro ($p > 0,05$).

4.2 Effetti dell'antimonio su cellule epiteliali intestinali Caco-2

4.2.1 Introduzione

A seguito dei risultati ottenuti su adipociti 3T3-L1, ci siamo soffermati sugli effetti dell'Sb(III) sull'epitelio intestinale. Nonostante le caratteristiche eterogenee e le limitazioni derivanti dalla sua origine tumorale, attualmente la linea cellulare Caco-2 è considerata il modello *in vitro* più utilizzato di epitelio intestinale umano e costituisce una valida alternativa agli studi condotti *in vivo*, seppur con le ovvie limitazioni insite nei modelli *in vitro*. Questi modelli sperimentali hanno infatti il vantaggio di essere più rapidi, meno costosi, con minore richiesta di manodopera e restrizioni etiche. Le cellule Caco-2, seminate su specifici supporti costituiti da una membrana semipermeabile (insert), sono in grado di mimare l'epitelio intestinale e le funzioni biologiche ad esso correlate, come l'interazione e l'assorbimento selettivo delle sostanze che entrano in contatto con il lume intestinale. Queste cellule, infatti, riescono a crescere sul supporto e creare un monostrato di enterociti maturi altamente polarizzati, caratterizzati dalla presenza di giunzioni strette e di microvilli sulla loro superficie superiore; in tal modo, il dominio apicale delle cellule è rivolto verso il compartimento superiore corrispondente al lume intestinale, mentre il dominio basolaterale è rivolto verso il compartimento inferiore che mima il circolo ematico. Pertanto, questo modello risulta molto utile per lo studio di xenobiotici assunti oralmente con la dieta, che arrivano al lume intestinale e che possono alterare in maniera importante i meccanismi fisiologici umani. È inoltre noto che un danno alla barriera epiteliale intestinale può rendere le cellule più suscettibili agli effetti tossici di sostanze presenti nel lume, come bile, enzimi proteolitici, secrezioni pancreatiche e batteri intestinali, che riescono ad accedere così alla mucosa e indurre uno stato infiammatorio cronico, attraverso l'infiltrazione di neutrofili ed alterazione dell'omeostasi redox cellulare (Han et al., 2020).

Come descritto precedentemente, l'antimonio è un metallo pesante presente specialmente come contaminante in cibo e bevande a causa del suo impiego nella fase di produzione del PET, principale costituente delle forme di packaging ad oggi più in uso (Snedeker, 2014b). Proprio per questa sua applicazione, l'uomo è potenzialmente esposto quotidianamente all'antimonio, seppur a concentrazioni molto basse, poiché questo può migrare dal packaging all'alimento ed essere ingerito per via orale in maniera accidentale (Filella et al., 2020).

Obiettivo della seconda parte della tesi è stato quindi quello di studiare gli effetti dell'Sb(III) su cellule intestinali, al fine di chiarire i meccanismi molecolari di interazione e tossicità del metallo.

Pertanto, a tale scopo, le cellule epiteliali intestinali Caco-2 sono state esposte a concentrazioni di Sb(III) molto basse, nell'ordine della nanomolarità, durante tutto il processo di differenziazione cellulare, mimando la potenziale esposizione e assunzione orale dell'uomo continua e prolungata nel tempo.

Infine, una volta individuati i meccanismi molecolari alla base degli effetti tossici dell'antimonio sull'epitelio intestinale, visto anche l'attuale forte interesse verso sostanze di origine naturale con attività benefiche contro diversi disturbi patologici, abbiamo testato gli effetti protettivi della cianidina-3-*O*-glucoside (C3G), una delle antocianine più diffuse in campo vegetale, in questo modello sperimentale. La scelta, in particolare, è ricaduta su questa antocianina in quanto è stato dimostrato che questa molecola possiede importanti proprietà antiossidanti e antiinfiammatorie. Studi condotti in precedenza dal mio gruppo di ricerca hanno dimostrato gli effetti protettivi della C3G sia in cellule endoteliali sia in cellule epiteliali intestinali Caco-2, in particolare modulando i pathway molecolari di NF- κ B e Nrf2 (Speciale et al. 2010; Speciale et al., 2013; Ferrari et al., 2016; Ferrari et al., 2017). Abbiamo inoltre dimostrato che il trattamento con C3G è in grado di bloccare il processo di adipogenesi in adipociti murini 3T3-L1, tramite regolazione dei principali marker di differenziazione adipocitaria, modulazione del processo di espansione mitotica clonale e induzione del pathway di termogenesi nel tessuto adiposo (Molonia et al., 2023a).

4.2.2 Citotossicità dell'antimonio su cellule epiteliali intestinali Caco-2

In una fase preliminare, è stata valutata la citotossicità dell'Sb(III) sulle cellule epiteliali intestinali Caco-2, in modo da selezionare, per i successivi esperimenti, concentrazioni di antimonio che non alterassero la vitalità cellulare nel nostro modello sperimentale. Le cellule sono state esposte all'Sb(III) alle concentrazioni 0,5, 5, 50 e 100 nM dal giorno della semina fino alla fine del processo di differenziazione cellulare (18 giorni). La vitalità è stata valutata alla fine dell'esperimento tramite il saggio della Sulforodamina B (SRB). I risultati ottenuti hanno evidenziato che l'esposizione ad Sb(III) non ha causato variazioni significative di vitalità cellulare alle concentrazioni testate rispetto alle cellule CTR (figura 17).

Rispetto ai dati di citotossicità ottenuti sulle cellule 3T3-L1 (figura 4) osserviamo, però, delle sostanziali differenze, in quanto nei pre-adipociti l'Sb(III) ha mostrato una citotossicità significativa già a partire dalla concentrazione 12,5 nM. Le cellule Caco-2 si sono pertanto dimostrate più resistenti alla tossicità di questo metallo.

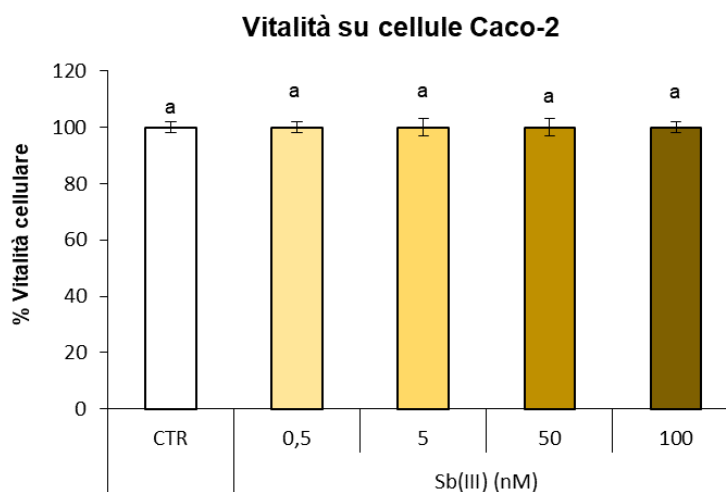


Figura 17. Vitalità cellulare su cellule Caco-2. La citotossicità è stata valutata tramite saggio SRB su cellule epiteliali intestinali Caco-2 esposte a differenti concentrazioni di Sb(III) (0,5, 5, 50 e 100 nM) durante tutto il processo di differenziazione (18 giorni). Le cellule trattate con il solo veicolo (DMSO 0,1%) sono state usate come controllo (CTR). I risultati sono espressi come percentuale (%) di vitalità rispetto al controllo e riportati come media \pm DS di tre diversi esperimenti. I valori con la stessa lettera non sono significativamente diversi tra loro ($p > 0,05$).

4.2.3 Attivazione del pathway infiammatorio di NF- κ B a livello dell'epitelio intestinale

È noto che l'esposizione a composti contenenti antimonio, che vengono assorbiti specialmente a livello del tratto respiratorio e intestinale, può condurre ad uno stato infiammatorio sistemico, con rilascio di numerose citochine pro-infiammatorie (Canto et al., 2019). Inoltre, il contatto con il metallo può provocare alterazioni al sistema immunitario, insorgenza di malattie croniche e determinare rischi notevoli per la salute umana (Wang et al., 2024). Pertanto, allo scopo di valutare l'effetto dell'Sb(III) sul processo infiammatorio nelle cellule epiteliali intestinali Caco-2, abbiamo preso in esame i fattori chiave del pathway di NF- κ B. L'esposizione all'Sb(III) ha causato un aumento della fosforilazione della proteina IKK (pIKK) (figura 18 A). Questo evento è responsabile della fosforilazione delle proteine inibitorie I κ B con liberazione della subunità p65 di NF- κ B e sua successiva traslocazione dal citoplasma al nucleo. Abbiamo infatti osservato un aumento significativo e dose-dipendente dei livelli nucleari della subunità p65 nelle cellule Caco-2 esposte ad Sb(III) (figura 18 B).

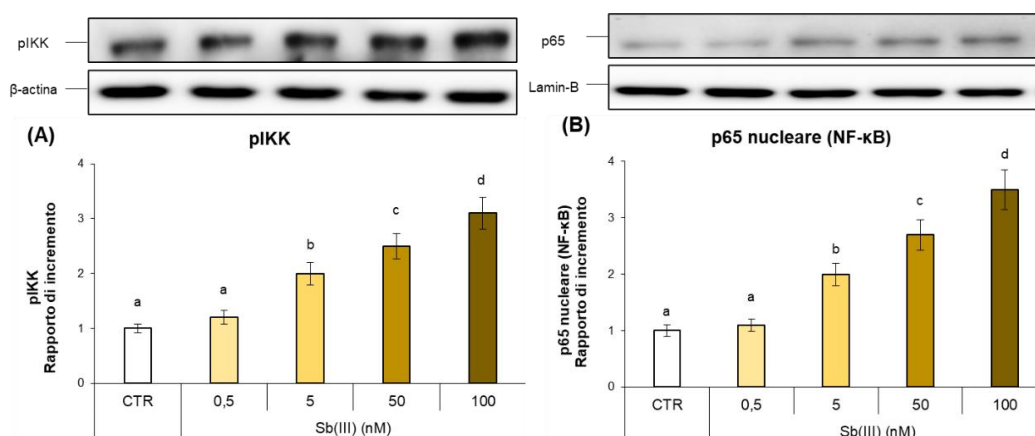


Figura 18. Attivazione del pathway pro-infiammatorio di NF- κ B. Le cellule Caco-2 sono state esposte ad Sb(III) (0,5, 5, 50 e 100 nM) durante tutto il processo di differenziazione cellulare (18 giorni). Le cellule trattate con il solo veicolo (DMSO 0,1%) sono state usate come controllo (CTR). (A) I livelli di pIKK sono stati normalizzati rispetto ai corrispondenti valori di β -actina. (B) I livelli nucleari di p65 (NF- κ B) sono stati normalizzati verso i valori della Lamin-B corrispondenti. Tutti i risultati sono riportati come rapporto di incremento rispetto al CTR ed espressi come media \pm DS di tre esperimenti indipendenti. I valori con la stessa lettera non sono significativamente diversi tra loro ($p > 0,05$).

Una volta attivata la cascata infiammatoria, a seguito dell'esposizione ad Sb(III), a livello nucleare NF- κ B attiva la trascrizione genica di importanti citochine pro-infiammatorie, tra cui IL-6, IL-8 e COX-2 (figura 19), che possono a loro volta stimolare l'attivazione delle cellule immunitarie e indurre uno stato di infiammazione intestinale (Macedo et al., 2023).

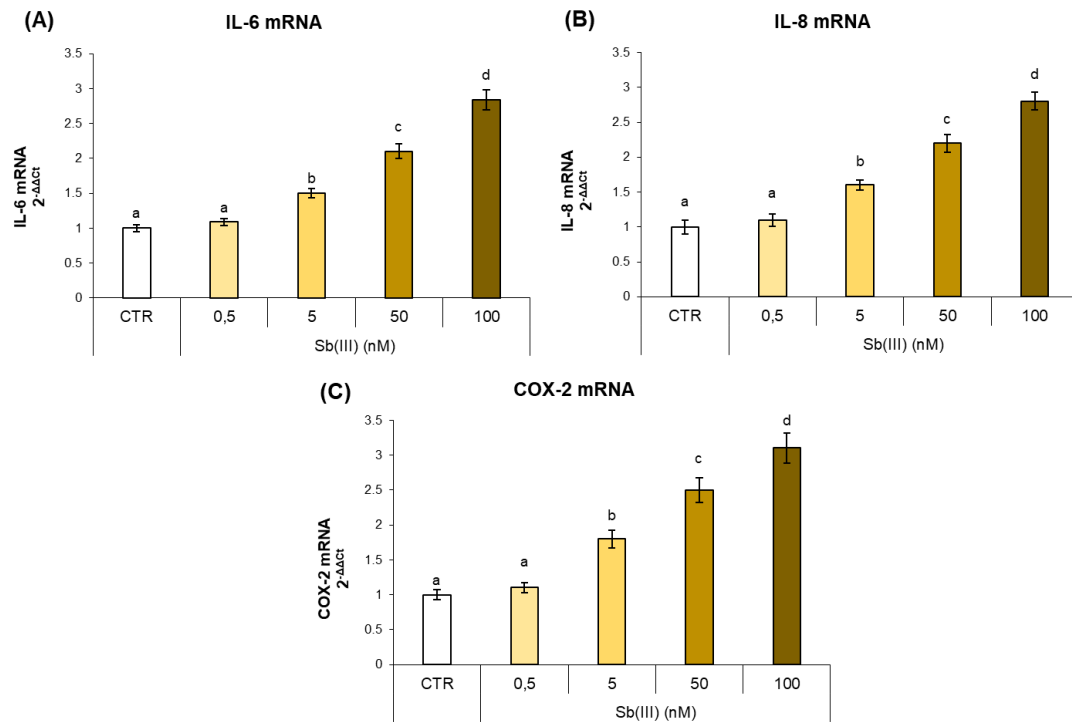


Figura 19. Espressione di geni pro-infiammatori. Le cellule Caco-2 sono state esposte ad Sb(III) (0,5, 5, 50 e 100 nM) durante tutto il processo di differenziazione cellulare (18 giorni). Le cellule trattate con il solo veicolo (DMSO 0,1%) sono state usate come controllo (CTR). I dati di espressione genica di (A) IL-6, (B) IL-8, (C) COX-2 sono espressi come $2^{-\Delta\Delta C_t}$. GAPDH è stato usato come gene housekeeping. Tutti i dati sono riportati come media \pm DS di tre esperimenti indipendenti. I valori con la stessa lettera non sono significativamente diversi tra loro ($p > 0,05$).

Infine, l'attivazione del pathway di NF- κ B è stata ulteriormente confermata dall'aumento dei livelli citoplasmatici della proteina COX-2, un enzima inducibile espresso durante i processi infiammatori (figura 20). Tutti i risultati ottenuti confermano che l'esposizione ad Sb(III) durante il processo di differenziazione delle cellule epiteliali intestinali Caco-2 ha indotto in maniera significativa l'attivazione della risposta infiammatoria, attraverso il pathway molecolare di NF- κ B.

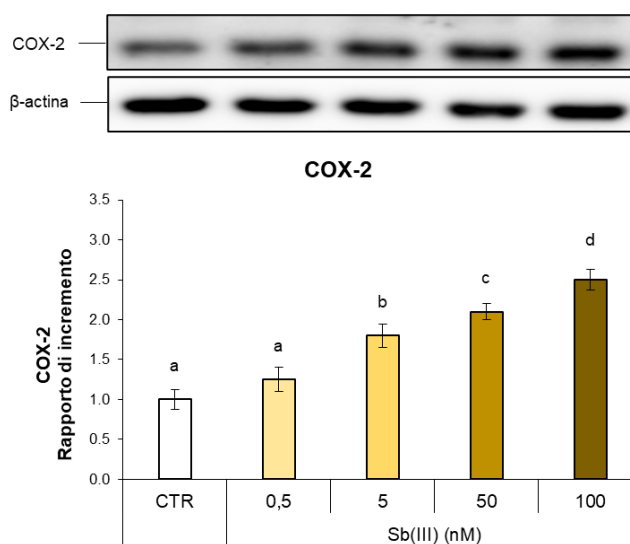


Figura 20. Livelli della proteina COX-2. Le cellule Caco-2 sono state esposte ad Sb(III) (0,5, 5, 50 e 100 nM) durante tutto il processo di differenziazione cellulare (18 giorni). Le cellule trattate con il solo veicolo (DMSO 0,1%) sono state usate come controllo (CTR). I livelli della proteina COX-2 sono stati normalizzati verso i corrispondenti valori di β -actina. Tutti i risultati sono espressi come rapporto di incremento rispetto al CTR e riportati come media \pm DS di tre esperimenti indipendenti. I valori con la stessa lettera non sono significativamente diversi tra loro ($p > 0,05$).

4.2.4 Attivazione di vie di segnale pro-apoptiche a livello dell'epitelio intestinale

La morte cellulare programmata per apoptosi è un processo altamente conservato e fondamentale per il corretto sviluppo delle funzioni cellulari, per i meccanismi di difesa e per il mantenimento dell'omeostasi dei tessuti (Seervi e Xue, 2015). Diversi studi hanno dimostrato che livelli elevati di antimonio possono indurre stress ossidativo, alterazione del metabolismo cellulare e morte cellulare per apoptosi (Mann et al., 2006; Jiang et al., 2016). La cascata apoptotica è regolata da diversi membri

della famiglia di proteine Bcl-2; in particolare, le proteine anti-apoptotiche, tra cui Bcl-2, Mcl-1 e Bcl-xL, sono deputate al mantenimento dell'integrità della membrana mitocondriale esterna, mentre le proteine pro-apoptiche *BH3-only* si occupano dell'attivazione di Bax e Bak, provocando la formazione di pori mitocondriali e il rilascio del citocromo *c* nel citoplasma (Iurlaro e Muñoz-Pinedo, 2016). Pertanto, il rapporto tra i livelli proteici di Bcl-2 e di Bax è stato valutato attraverso analisi Western Blot. Le cellule Caco-2 esposte ad Sb(III) durante il processo di differenziazione hanno mostrato un aumento dei livelli della proteina pro-apoptotica Bax e una diminuzione della proteina anti-apoptotica Bcl-2, determinando una riduzione dose-dipendente del rapporto Bcl-2/Bax (figura 21 A). Questi risultati sono stati ulteriormente confermati dalla valutazione delle concentrazioni citoplasmatiche della proteina Caspasi-3, la caspasi esecutrice necessaria per la sintesi delle desossiribonucleasi deputate alla frammentazione del DNA cellulare e alla formazione dei corpi apoptotici. Dunque, i risultati hanno confermato la capacità dell'Sb(III) di avviare il processo mitocondriale di apoptosi attraverso l'attivazione della Caspasi-3 (figura 21 B).

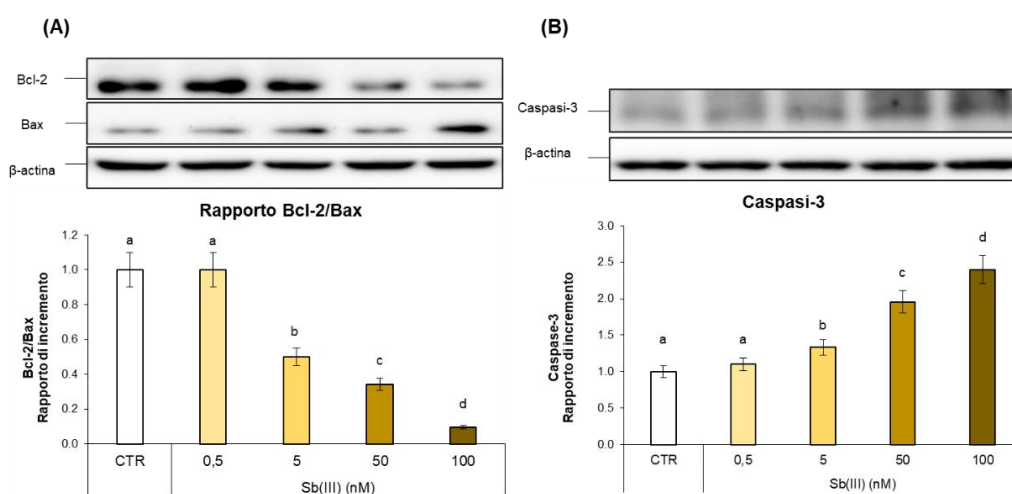


Figura 21. Attivazione di vie di segnale pro-apoptiche. Le cellule Caco-2 sono state esposte ad Sb(III) (0,5, 5, 50 e 100 nM) durante tutto il processo di differenziazione cellulare (18 giorni). Le cellule trattate con il solo veicolo (DMSO 0,1%) sono state usate come controllo (CTR). (A) Rapporto Bcl-2/Bax. (B) Livelli della proteina Caspasi-3. L'intensità delle proteine è stata normalizzata verso i corrispondenti valori di β -actina. I risultati sono riportati come rapporto di incremento rispetto al CTR ed espressi come media \pm DS di tre esperimenti indipendenti. I valori con la stessa lettera non sono significativamente diversi tra loro ($p > 0,05$).

4.2.5 Effetti dell'antimonio sullo stato redox cellulare

Gli effetti tossici dei metalli pesanti sono principalmente attribuiti all'aumento della produzione delle specie reattive dell'ossigeno (ROS), come l'anione superossido (O_2^-), il perossido di idrogeno (H_2O_2) ed i radicali ossidrilici ($\cdot OH$). Se i meccanismi di difesa cellulari non sono sufficienti per ripristinare l'omeostasi redox, lo squilibrio che si instaura tra produzione e smaltimento dei ROS intracellulari può indurre stress ossidativo (Wang et al., 2022c). Inoltre, è noto che l'accumulo eccessivo di ROS può indurre ad attivazione del processo infiammatorio di NF- κ B, con aumento della traslocazione nucleare della subunità p65 e rilascio delle citochine pro-infiammatorie, causando l'insorgenza di diverse malattie croniche (Hussain et al., 2016). Data questa stretta correlazione tra stress ossidativo e infiammazione, per valutare se l'attivazione del processo infiammatorio da parte dell'Sb(III) sia dovuto ad alterazione dell'equilibrio redox cellulare, abbiamo preso in esame i livelli intracellulari di ROS (figura 22). L'esposizione all'Sb(III) durante il processo di differenziazione delle cellule Caco-2 ha incrementato la produzione di ROS intracellulari rispetto alle cellule CTR, in maniera dose-dipendente. Questa alterazione suggerisce quindi che lo stress ossidativo possa essere considerato un meccanismo chiave di tossicità dell'antimonio sulla barriera epiteliale intestinale.

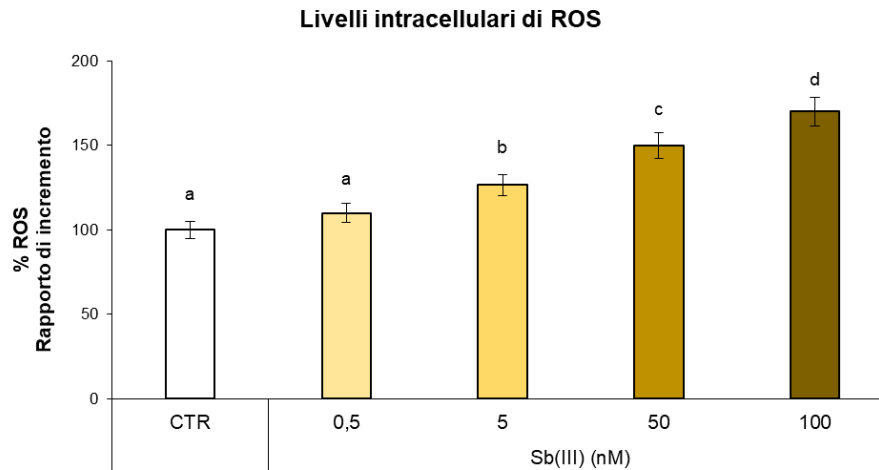


Figura 22. Danno allo stato redox intracellulare. Le cellule Caco-2 sono state esposte ad Sb(III) (0,5, 5, 50 e 100 nM) durante tutto il processo di differenziazione cellulare (18 giorni). Le cellule trattate con il solo veicolo (DMSO 0,1%) sono state usate come controllo (CTR). I livelli di ROS intracellulari sono riportati come % di intensità di fluorescenza della DCFH-DA rapportata ai mg di proteine e normalizzati rispetto al CTR. I risultati sono espressi come media \pm DS di tre esperimenti indipendenti. I valori con la stessa lettera non sono significativamente diversi tra loro ($p > 0,05$).

4.2.6 Effetti dell'antimonio sulla funzionalità del RE nell'epitelio intestinale

Come già descritto nel paragrafo 4.1.5, il reticolo endoplasmatico (RE) è un organello cellulare coinvolto nella sintesi, nel ripiegamento e nelle modifiche post-traduzionali delle proteine, nell'immagazzinamento degli ioni Ca^{2+} e nella sintesi dei fosfolipidi e del colesterolo (Iurlaro e Muñoz-Pinedo, 2016; Verfaillie et al., 2013). Diversi stimoli, come stress ossidativo, tossine, ipossia e carenza di nutrienti (Hu et al., 2024), possono interferire con le normali funzioni del RE, provocando l'accumulo di proteine mal ripiegate o non ripiegate, con conseguente induzione di stress. Questa condizione, a sua volta, attiva le vie di segnale UPR con lo scopo di ristabilire l'omeostasi del RE e garantire le normali funzioni cellulari, tra queste PERK, IRE1 e ATF6. Le risposte UPR hanno la funzione di ridurre la sintesi proteica, ripristinare le modifiche post-traduzionali grazie all'azione delle chaperonine e avviare il processo di degradazione delle proteine associate al RE (ERAD) (Hetx, 2012). Fattori esogeni o endogeni capaci di alterare il RE possono compromettere la funzione della barriera intestinale e attivare le risposte infiammatorie nell'ospite (Ma et al., 2017). Inoltre, è stato osservato che lo

stress ossidativo e lo stress del RE sono due fenomeni strettamente correlati, in quanto l'uno può gravare sull'altro e viceversa (Ong e Logue, 2023). Allo scopo di studiare il meccanismo d'azione alla base degli effetti tossici dell'antimonio sull'epitelio intestinale fin qui osservati, abbiamo preso in esame i principali marker delle vie UPR. Quando vi è una condizione di stress del RE, IRE1 attivato rimuove un introne da XBP-1 (XBP-1u) e forma la forma matura e funzionale di XBP-1 (XBP-1s); questo fattore, a sua volta, entra nel nucleo e induce la trascrizione di diversi geni coinvolti nei meccanismi di ripiegamento, secrezione e maturazione delle proteine, nella sintesi dei fosfolipidi, nella biogenesi del RE e dell'apparato del Golgi, nell'equilibrio redox e nella risposta infiammatoria (Liu et al., 2009; Cawley et al., 2011).

Nel nostro studio, l'esposizione ad Sb(III) durante il processo di differenziazione delle cellule Caco-2 ha incrementato in maniera dose-dipendente i livelli della proteina XBP-1s, dimostrando il coinvolgimento della via IRE1 nell'attivazione dello stress del RE (figura 23 A).

Dall'altra parte, l'Sb(III) ha indotto anche aumento della fosforilazione del fattore eIF2 α (p-eIF2 α) (figura 23 B), un componente del complesso di traduzione proteica, che, una volta attivato, porta a diminuzione della sintesi proteica e allevia l'accumulo delle proteine mal ripiegate nel lume del RE (Han et al., 2013).

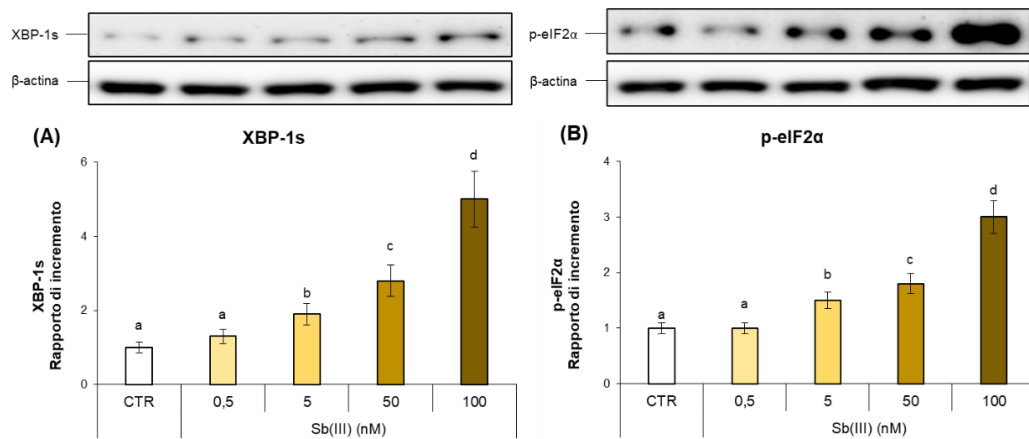


Figura 23. Attivazione delle risposte UPR. Le cellule Caco-2 sono state esposte ad Sb(III) (0,5, 5, 50 e 100 nM) durante tutto il processo di differenziazione cellulare (18 giorni). Le cellule trattate con il solo veicolo (DMSO 0,1%) sono state usate come controllo (CTR). I livelli di XBP-1s (A) e p-eIF2α (B) sono stati normalizzati per i corrispondenti valori di β-actina. I risultati sono riportati come rapporto di incremento rispetto al CTR ed espressi come media ± DS di tre esperimenti indipendenti. I valori con la stessa lettera non sono significativamente diversi tra loro ($p > 0,05$).

Per confermare ulteriormente l'attivazione di questa via molecolare, abbiamo analizzato l'espressione di diversi geni attivati a valle nelle vie di segnale UPR. GRP78 è una chaperonina multifunzionale, attivata da XBP-1s, ATF4 e ATF6, impiegata nella traslocazione dei polipeptidi appena formati, nel ripiegamento e nell'assemblaggio delle proteine, nell'individuazione delle proteine mal sintetizzate e nel mantenimento dell'omeostasi del calcio (Gardner et al., 2013). Inoltre, la fosforilazione di eIF2α aumenta selettivamente l'espressione di ATF4, un fattore trascrizionale deputato alle modifiche post-traduzionali delle proteine, alla risposta cellulare allo stress ossidativo, ai processi di apoptosi e autofagia indotti dallo stress del RE (Han et al., 2013; B'Chir et al., 2013). L'esposizione a Sb(III) ha provocato un aumento dell'espressione genica di GRP78 e ATF4, dimostrando ancora una volta l'attivazione delle risposte UPR (figura 24, A e B).

Infine, ci siamo focalizzati sui livelli di espressione genica del fattore trascrizionale CHOP, un gene bersaglio attivato dai fattori ATF4, ATF6 e XBP-1s, che ha il ruolo di interrompere i segnali cellulari pro-sopravvivenza e stimolare al contrario la morte cellulare per apoptosi (Li et al., 2014), soprattutto in situazioni di stress del RE irrisolto o prolungato. I risultati ottenuti confermano che le cellule Caco-2 esposte ad Sb(III)

sono andate incontro ad una sovra-espressione del gene CHOP rispetto alle cellule CTR, come mostrato nella figura 24 C.

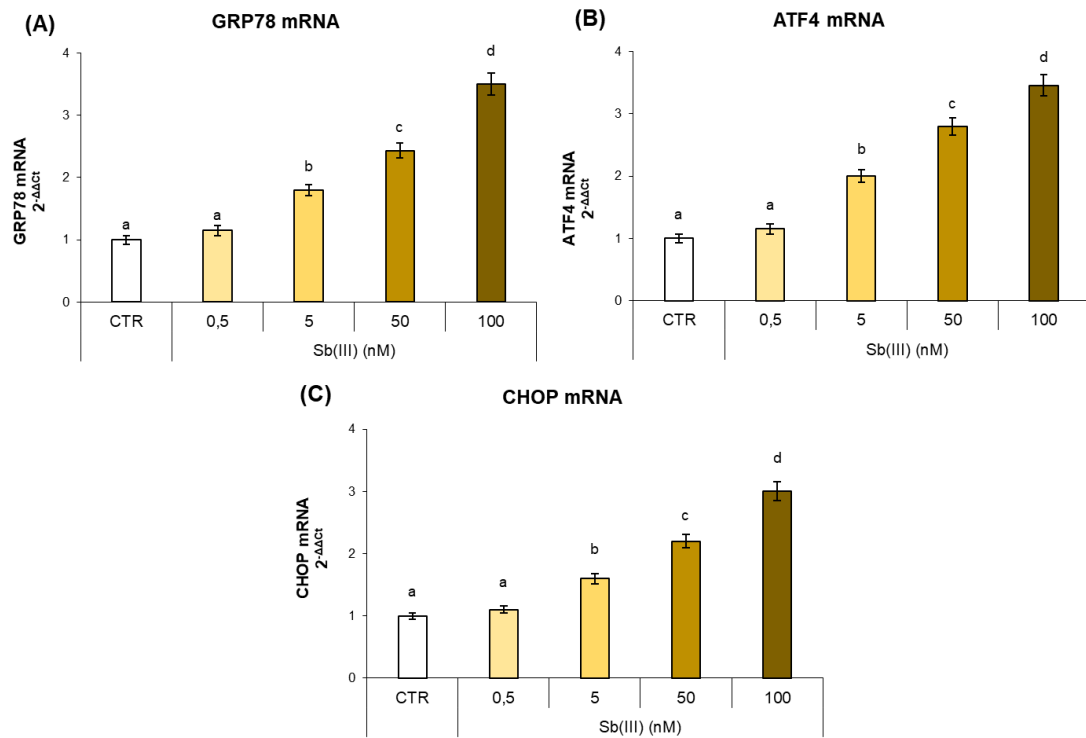


Figura 24. Attivazione delle vie UPR a livello trascrizionale. Le cellule Caco-2 sono state esposte ad Sb(III) (0,5, 5, 50 e 100 nM) durante tutto il processo di differenziazione cellulare (18 giorni). Le cellule trattate con il solo veicolo (DMSO 0,1%) sono state usate come controllo (CTR). I livelli di espressione genica sono espressi come $2^{-\Delta\Delta C_t}$. Il GAPDH è stato usato come gene housekeeping. Tutti i dati sono riportati come media \pm DS di tre esperimenti indipendenti. I valori con la stessa lettera non sono significativamente diversi tra loro ($p > 0,05$).

Inoltre, come riportato da Koga e coll. (2015), lo stress del RE è anche in grado di attivare il pathway di SIRT1 (*silent information regulator transcript-1*). Quest'ultimo è noto come un importante regolatore dello stress del RE, coinvolto in diverse vie di segnale cellulari. In particolare, SIRT1 modula nel nucleo il silenziamento e l'espressione genica, controlla la morte cellulare per apoptosi, regola il metabolismo glicolipidico e riduce lo stress ossidativo e l'infiammazione (Lin et al., 2016; Tang, 2016). In verità, SIRT1 è conosciuto come un regolatore negativo della risposta allo stress del RE, in quanto inibisce le attività trascrizionali di XBP-1 e p-eIF2 α e induce l'apoptosi, ma l'impatto dello stress del RE sull'espressione di SIRT1 non è ancora ben chiaro. Tuttavia, come anticipato, lo stress del RE inibisce il pathway PI3K-Akt portando, a valle, all'attivazione della via trascrizionale di SIRT1, dimostrando pertanto una diretta correlazione tra stress del RE e SIRT1 (Koga et al., 2015). Inoltre, SIRT1 è noto per stimolare l'autofagia indotta dallo stress del RE attraverso l'attivazione del pathway eEF2K/eE2 o tramite la deacetilazione dei fattori ATG5, ATG7 e LC3 (Pires Da Silva et al., 2020).

Ad ulteriore conferma della capacità dell'antimonio di indurre stress del RE, come mostrato in figura 25, abbiamo osservato come l'esposizione all'Sb(III) abbia ridotto i livelli proteici di PI3K e Akt rispetto alle cellule CTR, con un conseguente aumento dose-dipendente dei livelli di espressione genica di SIRT1. Pertanto, i dati ottenuti concordano tutti sulla capacità dell'antimonio di indurre stress del RE e, di conseguenza, molteplici vie UPR ed il pathway di SIRT1 (figura 25 D),

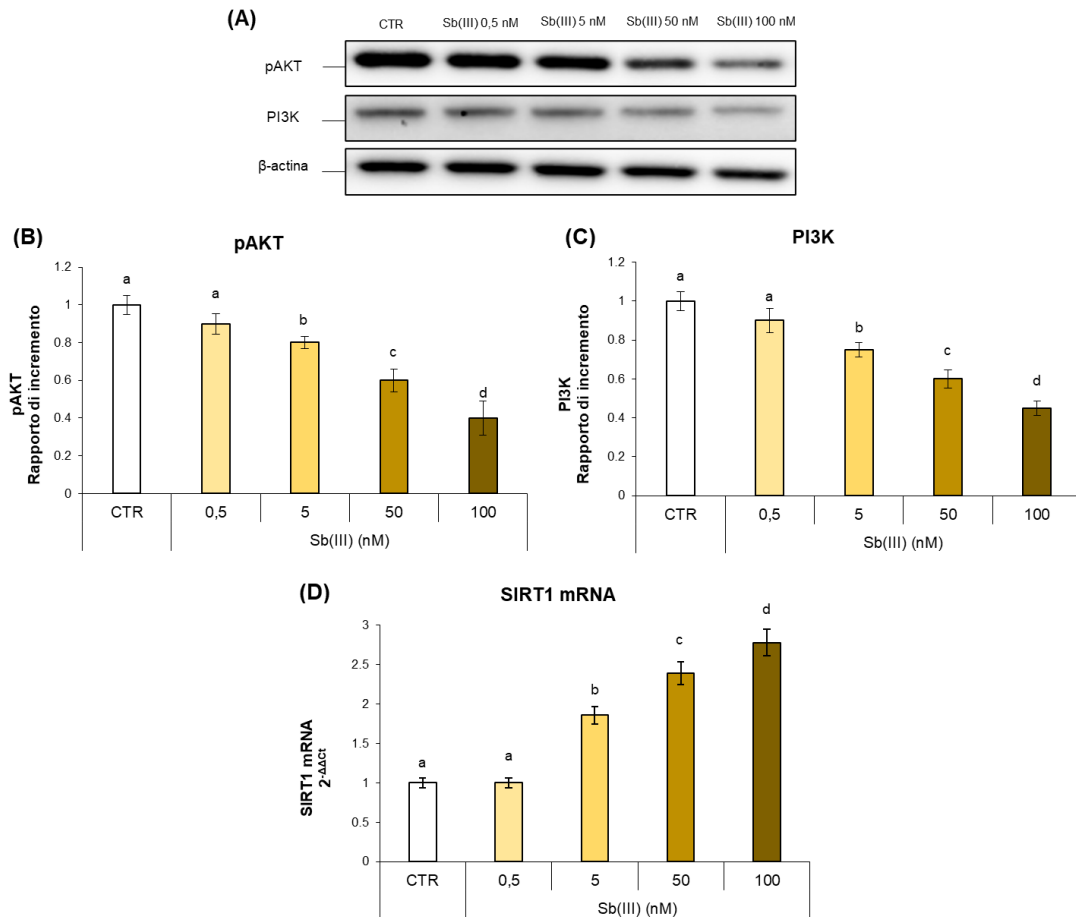


Figura 25. Effetto dell'antimonio sulla via di segnale PI3K-Akt e sull'espressione genica di SIRT1. Le cellule Caco-2 sono state esposte ad Sb(III) (0,5, 5, 50 e 100 nM) durante tutto il processo di differenziazione cellulare (18 giorni). Le cellule trattate con il solo veicolo (DMSO 0,1%) sono state usate come controllo (CTR). (A, B, C) I livelli proteici di pAKT e PI3K sono stati normalizzati per i corrispondenti valori di β-actina. I dati sono riportati come rapporto di incremento rispetto al CTR. (D) I valori di SIRT1 sono espressi come $2^{-\Delta\Delta C_t}$ e il GAPDH è stato usato come gene housekeeping. Tutti i dati sono riportati come media \pm DS di tre esperimenti indipendenti. I valori con la stessa lettera non sono significativamente diversi tra loro ($p > 0,05$).

4.2.7 Conferma del ruolo centrale dello stress del RE nella tossicità dell'antimonio

Il mantenimento dell'omeostasi del RE è essenziale per garantire le regolari funzioni cellulari: una sua alterazione può determinare uno stato di squilibrio che si estende in altri processi molecolari fisiologici. Recenti studi si sono focalizzati sulla relazione tra le risposte UPR e l'infiammazione (Eugene et al., 2020). In condizioni di stress del RE, IRE1 induce la fosforilazione di IKK e JNK, modulando i processi infiammatori

e apoptotici (Chipurupalli et al., 2021). XBP-1s promuove il rilascio di TNF- α e IL-6, che a loro volta stimolano la cascata di NF- κ B (Martinon et al., 2013; Kim et al., 2018; Kim et al., 2011). L'attivazione di PERK blocca la traduzione eucariotica e promuove l'infiammazione inibendo I κ B. Anche ATF4 contribuisce all'attivazione della cascata di NF- κ B, stimolando il rilascio di numerose citochine pro-infiammatorie, come IL-6, IL-8 e RANTES (*regulated on activation, normal T cell expressed and secreted*) (Eugene et al., 2020).

Basandoci su queste evidenze, abbiamo ipotizzato che l'induzione dello stress del RE possa rappresentare il fenomeno responsabile dell'attivazione del processo infiammatorio e del rilascio delle citochine pro-infiammatorie attraverso il pathway di NF- κ B, come precedentemente osservato. Per dimostrare ciò, abbiamo utilizzato un inibitore selettivo dello stress del RE, l'acido tauroursodeossicolico (TUDCA). Questo derivato degli acidi biliari funge da chaperone molecolare endogeno ed è in grado di alleviare lo stress del RE e stabilizzare gli effetti delle risposte UPR (Kusaczuk, 2019). In particolare, il TUDCA agisce regolando il trasferimento delle proteine danneggiate e migliorando la capacità di ripiegamento mediante attivazione del fattore ATF6 (Omura et al., 2013). Pertanto, le cellule Caco-2 sono state esposte durante l'intero processo di differenziazione cellulare all'Sb(III) alla concentrazione 50 nM, scelta come concentrazione rappresentativa degli effetti indotti dal metallo. In aggiunta, a partire dal raggiungimento della confluenza cellulare e fino alla fine del processo di differenziazione, le cellule sono state esposte all'Sb(III) in presenza dell'inibitore specifico TUDCA, alla concentrazione di 500 μ M, entrambi aggiunti al medium di coltura ogni 2-3 giorni. I risultati ottenuti hanno evidenziato che il trattamento con TUDCA ha portato ad una riduzione significativa dei livelli di espressione genica di IL-6 e COX-2, evidenziando come l'inibizione specifica dello stress del RE, dimostrata dalla diminuzione dei livelli di espressione genica dei marker delle vie UPR, GRP78, CHOP e SIRT1, abbia determinato anche blocco della risposta infiammatoria normalmente indotta dall'Sb(III) (figura 26). Le cellule trattate con solo TUDCA non hanno mostrato variazioni significative dei geni analizzati rispetto alle cellule CTR.

I risultati ottenuti dimostrano quindi che lo stress del RE rappresenta il meccanismo d'azione chiave alla base della tossicità dell'Sb(III) sull'epitelio intestinale, e in conseguenza del quale si attivano a cascata altri importanti meccanismi di tossicità indotti da questo metallo.

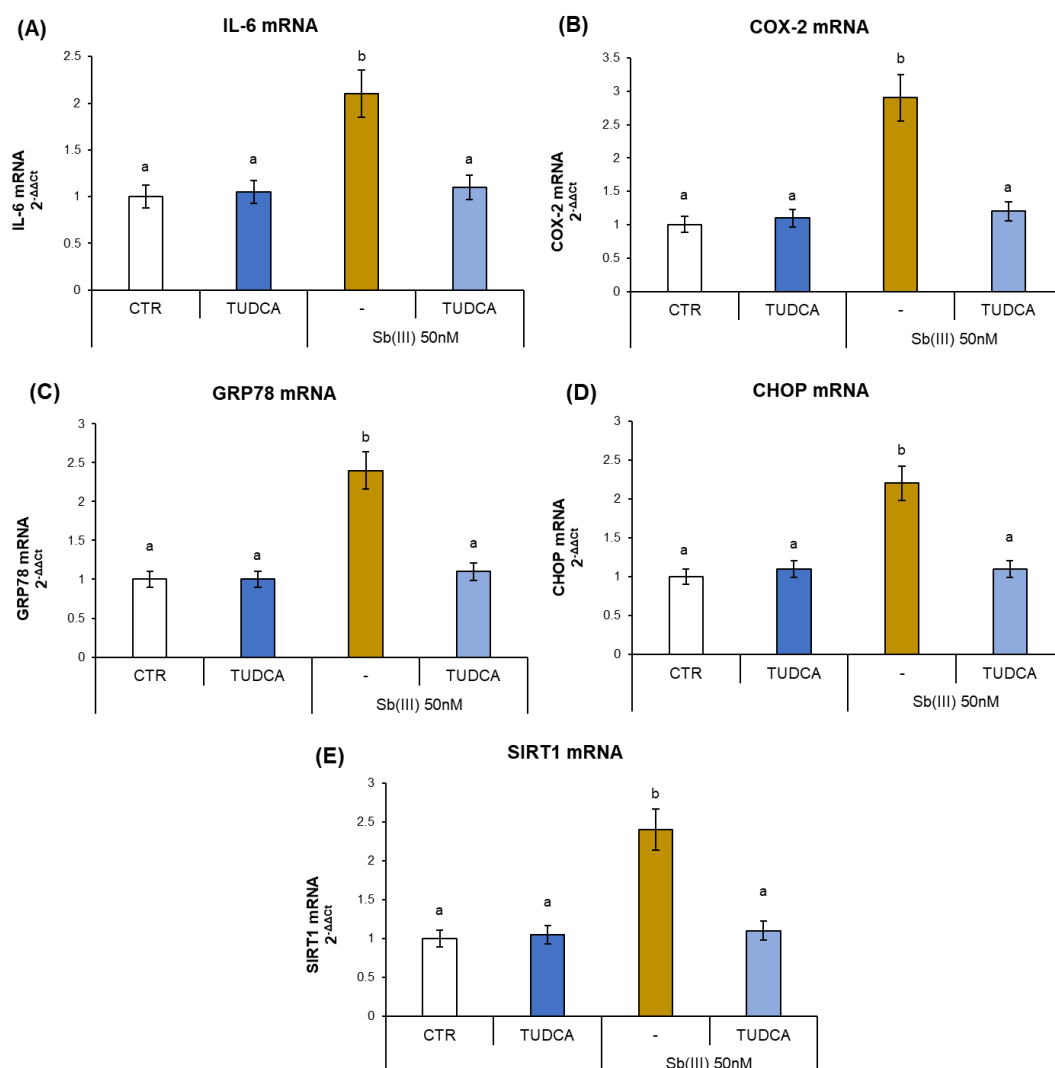


Figura 26. Blocco della risposta infiammatoria e dello stress del RE da parte del TUDCA. Le cellule Caco-2 sono state esposte ad Sb(III) alla concentrazione 50 nM durante il processo di differenziazione e con TUDCA (500 μ M) a partire dal raggiungimento della confluenza e fino alla fine dell'esperimento (18° giorno). Le cellule trattate con il solo veicolo (DMSO 0,1%) sono state usate come controllo (CTR). I dati di espressione genica di (A) IL-6, (B) COX-2, (C) GRP78, (D) CHOP e (E) SIRT1 sono espressi come $2^{-\Delta\Delta Ct}$. GAPDH è stato usato come gene housekeeping. Tutti i dati sono riportati come media \pm DS di tre esperimenti indipendenti. I valori con la stessa lettera non sono significativamente diversi tra loro ($p > 0,05$).

4.2.8 Effetti protettivi della cianidina-3-O-glucoside nei confronti degli effetti tossici indotti dall'antimonio

Lo studio di sostanze di origine naturale che possano prevenire gli effetti tossici di xenobiotici con cui l'uomo viene accidentalmente in contatto, nonché proteggere da diverse condizioni patologiche, come malattie infiammatorie croniche, cardiovascolari e cancro, è sempre molto alto. Tra queste sostanze particolare interesse è rivolto alle antocianine, una classe di flavonoidi ampiamente distribuita nella dieta mediterranea; si tratta di pigmenti idrosolubili responsabili del colore blu, viola e rosso di molte piante, fiori e frutti, come frutti di bosco, uva, melanzane e cavolo rosso (Khoo et al., 2017). Si stima che l'assunzione media giornaliera di antocianine sia nell'intervallo da diversi milligrammi a centinaia di milligrammi; ad esempio, in Europa i valori di ingestione giornalieri variano da 19,8 mg nei Paesi Bassi a 64,8 mg in Italia, mentre negli Stati Uniti, in Australia e nei paesi asiatici, l'assunzione giornaliera è pari a 12,5, 24,2 e 37 mg per individuo (Gonçalves et al., 2021). Oltre al loro potere colorante, le antocianine sono studiate per le loro attività antiossidanti, antinfiammatorie, anticancro, antimicrobiche, antiobesità e di prevenzione contro le malattie cardiache, i rischi di diabete e disturbi cognitivi (Pojer et al., 2013; Speciale et al., 2014), così come nella prevenzione dell'infiammazione intestinale e nel mantenimento della sua integrità e funzionalità (Speciale et al., 2024). Proprio per queste caratteristiche benefiche per la salute dell'uomo, il consumo di alimenti contenenti antocianine è altamente raccomandato (Khoo et al., 2017).

Una delle antocianine più studiate è la cianidina-3-O-glucoside (C3G), la quale presenta numerosi vantaggi, tra cui la cospicua distribuzione negli alimenti e la buona biodisponibilità nell'uomo (Khoo et al., 2017). Il gruppo di ricerca presso cui ho condotto lo studio presentato in questa tesi ha già in precedenza studiato gli effetti *in vitro* della C3G dimostrandone l'attività antinfiammatoria sia in cellule endoteliali sia in cellule epiteliali intestinali Caco-2 esposte alla citochina pro-infiammatoria TNF- α (Speciale et al., 2010; Speciale et al., 2013; Ferrari et al., 2016; Ferrari et al., 2017). Gli effetti citoprotettivi della C3G nei confronti del danno intestinale si basano sia sulla capacità di questa antocianina di modulare l'espressione e l'attività di sistemi antiossidanti intracellulari, come l'enzima superossido dismutasi (SOD) e il glutatione (Tan et al., 2019), sia di sopprimere i sistemi cellulari pro-ossidanti, come gli enzimi inducibili COX-2 e iNOS (*nitric oxide synthase*), e di ridurre la produzione di radicali liberi, come ROS e RNS (Serra et al., 2013). In particolare, questa attività della C3G

è legata alla sua capacità di attivare il pathway di Nrf2, un importante fattore trascrizionale in grado di regolare l'espressione di geni antiossidanti e detossificanti, e di inibire la risposta infiammatoria (Speciale et al., 2024). Vari studi hanno anche evidenziato la capacità della C3G di inibire la morte cellulare per apoptosi esercitando un effetto protettivo proprio attraverso l'inibizione di stress ossidativo e stress del RE in diversi modelli sperimentali (Peng et al., 2022; Sukprasansap et al., 2020).

Viste tali proprietà della C3G e avendo dimostrato l'importanza che lo stress del RE svolge nei meccanismi di tossicità dell'antimonio sull'epitelio intestinale, abbiamo scelto di valutare l'effetto protettivo di questa antocianina in questo modello sperimentale di esposizione delle Caco-2 all'Sb(III). Le cellule epiteliali intestinali Caco-2 sono state esposte durante il processo di differenziazione cellulare ad Sb(III) alle concentrazioni 5 e 50 nM, rappresentative degli effetti tossici del metallo prima evidenziati. A partire dal raggiungimento della confluenza e fino alla fine dell'esperimento (18° giorno), in maniera concomitante con l'esposizione ad Sb(III) le cellule sono state trattate con C3G alla concentrazione 20 µM, scelta sulla base di precedenti esperimenti condotti su questa linea cellulare (Ferrari et al., 2016). In particolare, sia Sb(III) che C3G sono stati entrambi aggiunti al medium di coltura apicale ogni 2-3 giorni, ovvero ad ogni cambio.

A seguito dei trattamenti, sono stati presi in esame i principali marker di infiammazione, apoptosi e stress del RE. In prima analisi, abbiamo osservato che il trattamento con C3G è stato in grado di ridurre in maniera dose-dipendente i livelli nucleari di p65 (NF-κB) e l'espressione genica della citochina pro-infiammatoria IL-6 e dell'enzima COX-2 rispetto alle cellule esposte a solo Sb(III) (figura 27), dimostrando l'effetto protettivo di questa antocianina nei confronti dell'infiammazione indotta dall'antimonio.

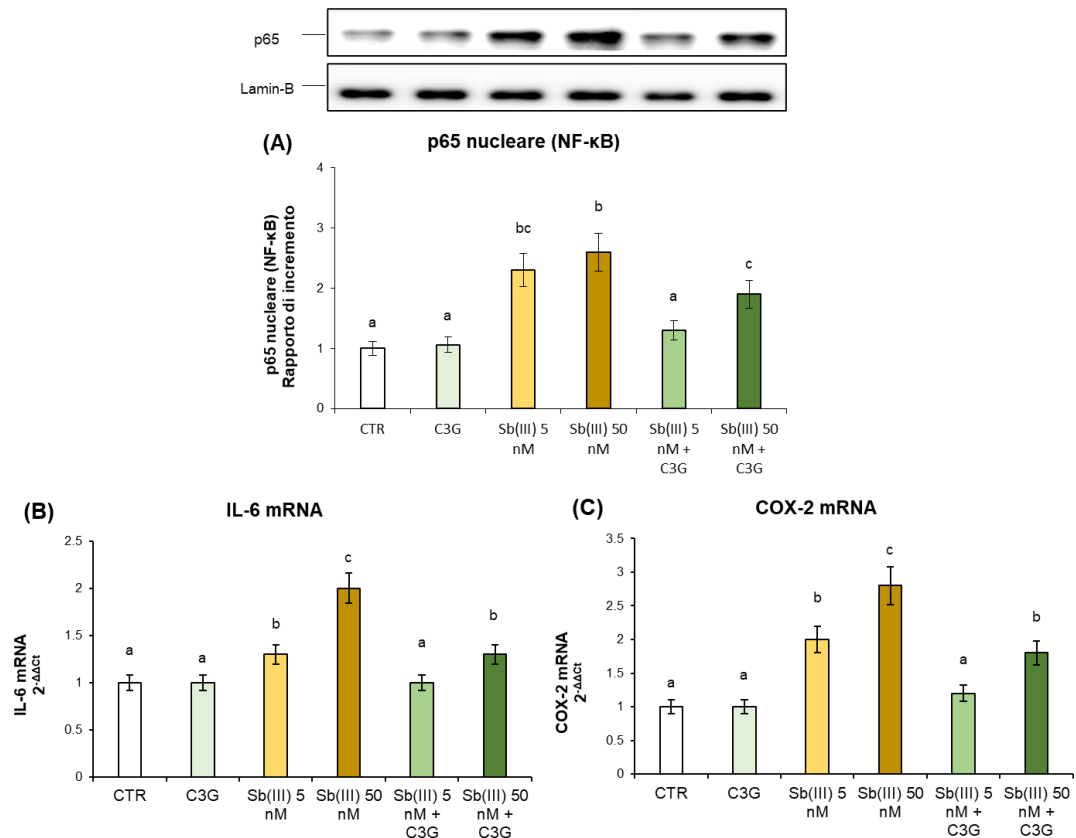


Figura 27. Effetto protettivo della C3G nei confronti dell'infiammazione indotta dall'antimonio. Le cellule Caco-2 sono state esposte ad Sb(III) (5 e 50 nM) durante tutto il processo di differenziazione cellulare (18 giorni) e trattate con C3G (20 μ M) dal giorno della confluenza fino alla fine dell'esperimento. Le cellule trattate con il solo veicolo (DMSO 0,1%) sono state usate come controllo (CTR). (A) I livelli nucleari di p65 (NF- κ B) sono stati normalizzati verso i valori della Lamin-B corrispondente. I dati sono riportati come rapporto di incremento rispetto al CTR. (B, C) I valori di IL-6 e COX-2 sono espressi come $2^{-\Delta\Delta Ct}$ e il GAPDH è stato usato come gene housekeeping. Tutti i dati sono riportati come media \pm DS di tre esperimenti indipendenti. I valori con la stessa lettera non sono significativamente diversi tra loro ($p > 0,05$).

In seguito, abbiamo preso in esame i livelli citoplasmatici della Caspasi-3, quale marker di attivazione della cascata apoptotica. Anche in questo caso, il trattamento con C3G ha causato diminuzione della Caspasi-3, dimostrando un importante effetto protettivo dell'antocianina contro l'attivazione del processo apoptotico indotto dall'Sb(III) (figura 28).

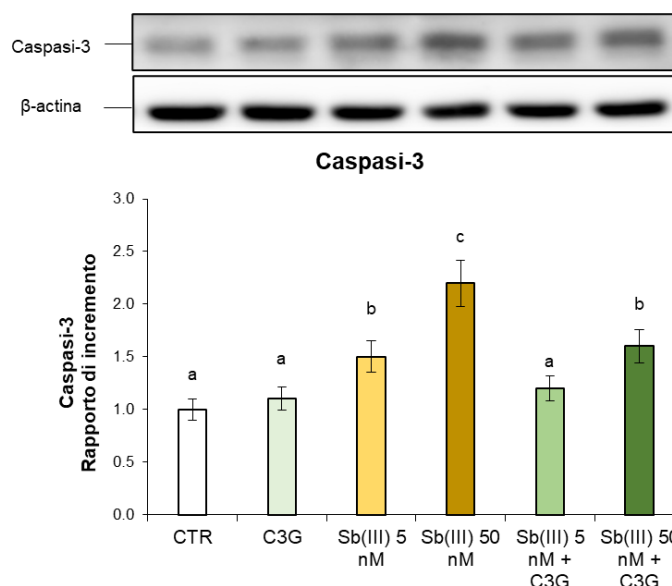


Figura 28. Effetto protettivo della C3G nei confronti dell'apoptosi indotta dall'antimonio. Le cellule Caco-2 sono state esposte ad Sb(III) (5 e 50 nM) durante tutto il processo di differenziazione cellulare (18 giorni) e trattate con C3G (20 μ M) dal giorno della confluenza fino alla fine dell'esperimento. Le cellule trattate con il solo veicolo (DMSO 0,1%) sono state usate come controllo (CTR). L'intensità della proteina Caspasi-3 è stata normalizzata verso i corrispondenti valori di β -actina. I risultati sono riportati come rapporto di incremento rispetto al CTR ed espressi come media \pm DS di tre esperimenti indipendenti. I valori con la stessa lettera non sono significativamente diversi tra loro ($p > 0,05$).

Infine, allo scopo di confermare ulteriormente il ruolo centrale svolto dallo stress del RE nella tossicità dell'antimonio e di dimostrare che gli effetti benefici della C3G nei confronti di infiammazione e apoptosi indotti da questo metallo siano correlati alla capacità di questa antocianina di proteggere da questo stress, abbiamo osservato l'effetto di questo trattamento sulle principali vie di risposta UPR, attivate appunto dallo stress del RE. Il trattamento con la C3G ha determinato, rispetto alle cellule esposte solo all'Sb(III), riduzione significativa e dose-dipendente dell'attivazione

della proteina eIF2 α (p-eIF2 α) e dell'espressione genica di GRP78 e CHOP (figura 29). In tutte le analisi condotte, il trattamento con sola C3G non ha indotto nessuna variazione significativa dei marker analizzati.

Pertanto, tutti questi risultati concordano nel considerare la C3G una valida sostanza di origine naturale, con potenziali effetti citoprotettivi nei confronti degli effetti tossici inflitti da basse concentrazioni di Sb(III) sull'epitelio intestinale, attività probabilmente correlata alla sua capacità di modulare la risposta adattativa cellulare (Speciale et al., 2024; Frountzas et., 2023).

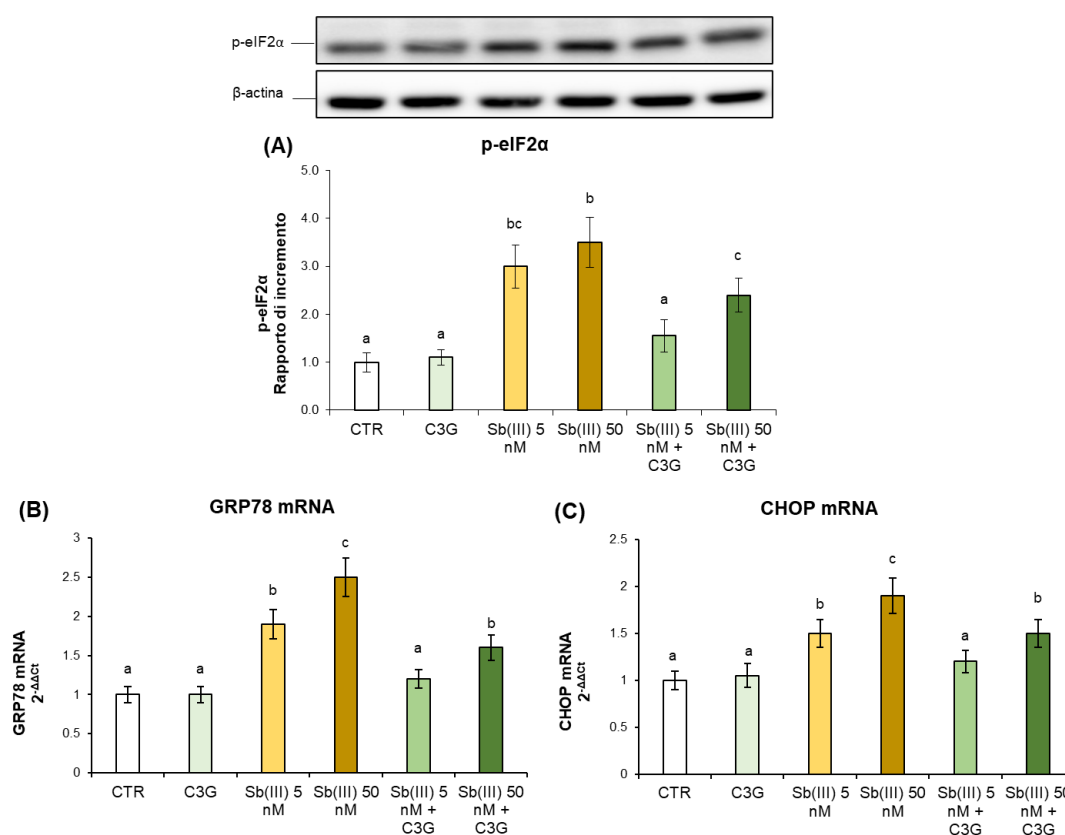


Figura 29. Effetto della C3G sulle vie di segnale UPR. Le cellule Caco-2 sono state esposte ad Sb(III) (5 e 50 nM) durante tutto il processo di differenziazione cellulare (18 giorni) e trattate con C3G (20 μ M) dal giorno della confluenza fino alla fine dell'esperimento. Le cellule trattate con il solo veicolo (DMSO 0,1%) sono state usate come controllo (CTR). (A) I livelli p-eIF2 α sono stati normalizzati per i corrispondenti valori di β -actina. I dati sono riportati come rapporto di incremento rispetto al CTR. (B, C) I valori di GRP78 e CHOP sono espressi come $2^{-\Delta\Delta Ct}$ e il GAPDH è stato usato come gene housekeeping. Tutti i dati sono riportati come media \pm DS di tre esperimenti indipendenti. I valori con la stessa lettera non sono significativamente diversi tra loro ($p > 0,05$).

5. Conclusioni

Scopo di questo studio è stato quello di valutare gli effetti tossici di concentrazioni nanomolari di Sb(III), utilizzando un modello di adipociti murini 3T3-L1 per valutarne l'effetto obesogeno e un modello di cellule epiteliali intestinali umane Caco-2 per valutare il danno a livello dell'epitelio intestinale. L'esposizione continua all'antimonio durante il processo di differenziazione in entrambi i modelli cellulari è stata scelta per valutare gli effetti cronici del metallo sull'uomo.

In una prima fase, i risultati ottenuti sugli adipociti 3T3-L1 hanno dimostrato il ruolo dell'Sb(III) come agente obesogeno, in quanto è stato in grado di incrementare l'accumulo lipidico cellulare attraverso la regolazione dei principali marker del processo di adipogenesi, tra cui C/EBP- β e PPAR- γ . Inoltre, l'esposizione all'Sb(III) ha stimolato la proliferazione dei pre-adipociti, inducendo la fase G2/M del ciclo cellulare a discapito della fase di quiescenza G0/G1, con riduzione dell'inibitore del ciclo cellulare p21. L'effetto obesogeno dell'Sb(III) è stato attribuito alla sua attività di interferente endocrino, con un meccanismo dipendente dal recettore degli estrogeni. Infine, l'esposizione all'Sb(III) ha causato negli adipociti 3T3-L1 stress ossidativo, alterazione della funzionalità del RE con conseguente stimolazione delle risposte UPR e attivazione del pathway infiammatorio di NF- κ B.

Dopo aver delineato il profilo di tossicità dell'antimonio sugli adipociti 3T3-L1, ci siamo soffermati sull'azione del metallo sull'epitelio intestinale. Bisogna infatti ricordare che prima di raggiungere il tessuto adiposo, l'antimonio ingerito deve essere assorbito a livello intestinale; dunque, la barriera intestinale rappresenta il primo organo a contatto con gli xenobiotici ed è soggetto maggiormente alla loro tossicità. Inoltre, la via di esposizione orale risulta essere sicuramente la più difficile da prevedere e da controllare, soprattutto per quanto concerne gli effetti a lungo termine. I dati ottenuti sulle cellule epiteliali intestinali Caco-2 hanno evidenziato che l'Sb(III) ha indotto uno stato infiammatorio, mediante attivazione del pathway di NF- κ B, e la morte cellulare per apoptosi, con modulazione delle proteine Bcl-2, Bax e Caspasi-3. Inoltre, abbiamo dimostrato che uno dei principali meccanismi di tossicità dell'Sb(III) sull'epitelio intestinale è rappresentato dalla stress ossidativo. Tutti questi eventi fin qui citati sono correlati all'insorgenza nelle cellule Caco-2 di stress del RE e conseguente attivazione delle vie di riparazione UPR, necessarie per ripristinare la funzionalità del reticolo. Infatti, mediante l'utilizzo di un inibitore specifico dello

stress del RE (TUDCA), abbiamo dimostrato il ruolo chiave dell'induzione dello stress del RE nei meccanismi di tossicità dell'antimonio.

Infine, nell'ultima parte di questo lavoro di tesi, sono state testate le proprietà benefiche di una sostanza di origine naturale ampiamente diffusa in natura e nella dieta alimentare, la C3G. Nelle cellule Caco-2 esposte ad Sb(III) l'antocianina è stata in grado di bloccare l'attivazione del pathway infiammatorio, del processo di apoptosi e delle vie di segnale UPR, ponendo le basi per un suo potenziale utilizzo come agente protettivo in grado di contrastare efficacemente gli effetti tossici del metallo.

In conclusione, i risultati di questa tesi evidenziano la capacità dell'antimonio di alterare le normali funzioni cellulari, sia a livello del tessuto adiposo, sia a livello dell'epitelio intestinale. Pertanto, considerando che tutti questi effetti sono stati osservati a concentrazioni di Sb(III) nell'ordine della nanomolarità, al di sotto dei livelli consentiti dalle attuali normative, e vista anche la possibile concomitante esposizione ad altri contaminanti ambientali i cui effetti tossici potrebbero andare a sommarsi con quelli dell'antimonio, si pone l'accento sulla necessità di rivedere questi limiti al fine di ridurre il più possibile l'esposizione e i rischi per la salute.

BIBLIOGRAFIA

- Aduayom, I., Denizeau, F., & Jumarie, C. (2005). Multiple effects of mercury on cell volume regulation, plasma membrane permeability, and thiol content in the human intestinal cell line Caco-2. *Cell biology and Toxicology*, 21, 163-179.
- Ahangarpour, A., Alboghobeish, S., Orooan, A. A., Zeidooni, L., Samimi, A., & Afshari, G. (2018). Effects of combined exposure to chronic high-fat diet and arsenic on thyroid function and lipid profile in male mouse. *Biological trace element research*, 182, 37-48.
- Alderton, D. H., Serafimovski, T., Burns, L., & Tasev, G. (2014). Distribution and mobility of arsenic and antimony at mine sites in FYR Macedonia. *Carpathian Journal of Earth and Environmental Sciences*, 9(1), 43-56.
- Al-Hamad, D., & Raman, V. (2017). Metabolic syndrome in children and adolescents. *Translational pediatrics*, 6(4), 397.
- Ali, A. T., Hochfeld, W. E., Myburgh, R., & Pepper, M. S. (2013). Adipocyte and adipogenesis. *European journal of cell biology*, 92(6-7), 229-236.
- Allegra, A., Speciale, A., Molonia, M. S., Guglielmo, L., Musolino, C., Ferlazzo, G., ... & Cimino, F. (2018). Curcumin ameliorates the in vitro efficacy of carfilzomib in human multiple myeloma U266 cells targeting p53 and NF- κ B pathways. *Toxicology in vitro*, 47, 186-194.
- Allen, J. P., Carey, J. J., Walsh, A., Scanlon, D. O., & Watson, G. W. (2013). Electronic structures of antimony oxides. *The Journal of Physical Chemistry C*, 117(28), 14759-14769.
- Almanza, A., Carlesso, A., Chintia, C., Creedican, S., Doultinos, D., Leuzzi, B., ... & Samali, A. (2019). Endoplasmic reticulum stress signalling—from basic mechanisms to clinical applications. *The FEBS journal*, 286(2), 241-278.
- Amen, O. M., Sarker, S. D., Ghildyal, R., & Arya, A. (2019). Endoplasmic reticulum stress activates unfolded protein response signaling and mediates inflammation, obesity, and cardiac dysfunction: therapeutic and molecular approach. *Frontiers in pharmacology*, 10, 977.
- Anderson, C. G. (2012). The metallurgy of antimony. *Geochemistry*, 72, 3-8.
- Ariza-Roldán, A. O., López-Cardoso, E. M., Rosas-Valdez, M. E., Roman-Bravo, P. P., Vargas-Pineda, D. G., Cea-Olivares, R., ... & Jancik, V. (2017). Synthesis, characterization, antimicrobial and theoretical studies of the first main group tris (ephedrinedithiocarbamate) complexes of As (III), Sb (III), Bi (III), Ga (III) and In (III). *Polyhedron*, 134, 221-229.
- Armiento, G., Nardi, E., Lucci, F., De Cassan, M., Della Ventura, G., Santini, C., ... & Cremisini, C. (2017). Antimony and arsenic distribution in a catchment affected by past mining activities: influence of extreme weather events. *Rendiconti Lincei*, 28, 303-315.
- Arnold, L. L., Eldan, M., Van Gemert, M., Capen, C. C., & Cohen, S. M. (2003). Chronic studies evaluating the carcinogenicity of monomethylarsonic acid in rats and mice. *Toxicology*, 190(3), 197-219.

- Arruti, A., Fernández-Olmo, I., & Irabien, Á. (2010). Evaluation of the contribution of local sources to trace metals levels in urban PM_{2.5} and PM₁₀ in the Cantabria region (Northern Spain). *Journal of environmental monitoring*, 12(7), 1451-1458.
- Asakura, K., Satoh, H., Chiba, M., Okamoto, M., Serizawa, K., Nakano, M., & Omae, K. (2009). Genotoxicity studies of heavy metals: lead, bismuth, indium, silver and antimony. *Journal of Occupational Health*, 51(6), 498-512.
- Asano, H., Kanamori, Y., Higurashi, S., Nara, T., Kato, K., Matsui, T., & Funaba, M. (2014). Induction of beige-like adipocytes in 3T3-L1 cells. *Journal of Veterinary Medical Science*, 76(1), 57-64.
- Asghar, F., Badshah, A., Shah, A., Rauf, M. K., Ali, M. I., Tahir, M. N., ... & Qureshi, R. (2012). Synthesis, characterization and DNA binding studies of organoantimony (V) ferrocenyl benzoates. *Journal of Organometallic Chemistry*, 717, 1-8.
- Assefa, S., & Köhler, G. (2020). Intestinal microbiome and metal toxicity. *Current opinion in toxicology*, 19, 21-27.
- Astolfi, M. L., Marconi, E., Protano, C., Vitali, M., Schiavi, E., Mastromarino, P., & Canepari, S. (2018). Optimization and validation of a fast digestion method for the determination of major and trace elements in breast milk by ICP-MS. *Analytica chimica acta*, 1040, 49-62.
- Attia, S. M., Varadharajan, K., Shanmugakonar, M., Das, S. C., & Al-Naemi, H. A. (2022). Cadmium: An emerging role in adipose tissue dysfunction. *Exposure and Health*, 14(1), 171-183.
- B'chir, W., Maurin, A. C., Carraro, V., Averous, J., Jousse, C., Muranishi, Y., ... & Bruhat, A. (2013). The eIF2 α /ATF4 pathway is essential for stress-induced autophagy gene expression. *Nucleic acids research*, 41(16), 7683-7699.
- Ba, Q., Li, M., Chen, P., Huang, C., Duan, X., Lu, L., ... & Wang, H. (2017). Sex-dependent effects of cadmium exposure in early life on gut microbiota and fat accumulation in mice. *Environmental health perspectives*, 125(3), 437-446.
- Bae, J., Jang, Y., Kim, H., Mahato, K., Schaecher, C., Kim, I. M., ... & Ro, S. H. (2019). Arsenite exposure suppresses adipogenesis, mitochondrial biogenesis and thermogenesis via autophagy inhibition in brown adipose tissue. *Scientific reports*, 9(1), 14464.
- Bagherifam, S., Brown, T. C., Fellows, C. M., & Naidu, R. (2019). Derivation methods of soils, water and sediments toxicity guidelines: a brief review with a focus on antimony. *Journal of Geochemical Exploration*, 205, 106348.
- Balali-Mood, M., Naseri, K., Tahergorabi, Z., Khazdair, M. R., & Sadeghi, M. (2021). Toxic mechanisms of five heavy metals: mercury, lead, chromium, cadmium, and arsenic. *Frontiers in pharmacology*, 12, 643972.
- Banerjee, M., Bhattacharjee, P., & Giri, A. K. (2011). Arsenic-induced cancers: a review with special reference to gene, environment and their interaction. *Genes and environment*, 33(4), 128-140.
- Barbieri, F. L., Gardon, J., Ruiz-Castell, M., Paco V, P., Muckelbauer, R., Casiot, C., ... & Keil, T. (2016). Toxic trace elements in maternal and cord blood and social

- determinants in a Bolivian mining city. *International journal of environmental health research*, 26(2), 158-174.
- Baroni, F., Boscagli, A., Protano, G., & Riccobono, F. (2000). Antimony accumulation in *Achillea ageratum*, *Plantago lanceolata* and *Silene vulgaris* growing in an old Sb-mining area. *Environmental Pollution*, 109(2), 347-352.
 - Barregard, L., Ellingsen, D. G., Berlinger, B., Weinbruch, S., Harari, F., & Sallsten, G. (2021). Normal variability of 22 elements in 24-hour urine samples—results from a biobank from healthy non-smoking adults. *International journal of hygiene and environmental health*, 233, 113693.
 - Barrera, C., López, S., Aguilar, L., Mercado, L., Bravo, M., & Quiroz, W. (2016). Pentavalent antimony uptake pathway through erythrocyte membranes: molecular and atomic fluorescence approaches. *Analytical and bioanalytical chemistry*, 408, 2937-2944.
 - Bashllari, R., Molonia, M. S., Muscarà, C., Speciale, A., Wilde, P. J., Saija, A., & Cimino, F. (2023). Cyanidin-3-O-glucoside protects intestinal epithelial cells from palmitate-induced lipotoxicity. *Archives of Physiology and Biochemistry*, 129(2), 379-386.
 - Beier, E. E., Holz, J. D., Sheu, T. J., & Puzas, J. E. (2016). Elevated lifetime lead exposure impedes osteoclast activity and produces an increase in bone mass in adolescent mice. *Toxicological sciences*, 149(2), 277-288.
 - Belzile, N., Chen, Y. W., & Filella, M. (2011). Human exposure to antimony: I. Sources and intake. *Critical reviews in environmental science and technology*, 41(14), 1309-1373.
 - Berndt, D., & Nijhawan, S. C. (1976). Lead-acid batteries with low antimony alloys. *Journal of Power Sources*, 1(1), 3-15.
 - Betanzos-Robledo, L., Téllez-Rojo, M. M., Lamadrid-Figueroa, H., Roldan-Valadez, E., Peterson, K. E., Jansen, E. C., ... & Cantoral, A. (2022). Differential fat accumulation in early adulthood according to adolescent-BMI and heavy metal exposure. *New Directions for Child and Adolescent Development*, 2022(181-182), 37-51.
 - Bilal, M., Adeel, M., Rasheed, T., Zhao, Y., & Iqbal, H. M. (2019). Emerging contaminants of high concern and their enzyme-assisted biodegradation—a review. *Environment international*, 124, 336-353.
 - Block, J. P., He, Y., Zaslavsky, A. M., Ding, L., & Ayanian, J. Z. (2009). Psychosocial stress and change in weight among US adults. *American journal of epidemiology*, 170(2), 181-192.
 - Boreiko, C. J., & Rossman, T. G. (2020). Antimony and its compounds: Health impacts related to pulmonary toxicity, cancer, and genotoxicity. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 403, 115156.
 - Brabec, J. L., Wright, J., Ly, T., Wong, H. T., McClimans, C. J., Tokarev, V., ... & Sherchan, S. P. (2020). Arsenic disturbs the gut microbiome of individuals in a disadvantaged community in Nepal. *Heliyon*, 6(1).

- Bracht, J. R., Vieira-Potter, V. J., De Souza Santos, R., Öz, O. K., Palmer, B. F., & Clegg, D. J. (2020). The role of estrogens in the adipose tissue milieu. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1461(1), 127-143.
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical biochemistry*, 72(1-2), 248-254.
- Braun, K., Oeckl, J., Westermeier, J., Li, Y., & Klingenspor, M. (2018). Non-adrenergic control of lipolysis and thermogenesis in adipose tissues. *Journal of Experimental Biology*, 221(Suppl_1), jeb165381.
- Breton, J., Massart, S., Vandamme, P., De Brandt, E., Pot, B., & Folligné, B. (2013). Ecotoxicology inside the gut: impact of heavy metals on the mouse microbiome. *BMC Pharmacology and Toxicology*, 14, 1-11.
- Brockman, J. D., Raymond, L. J., Ralston, C. R., Robertson, J. D., Bodkin, N., Sharp, N., & Ralston, N. V. (2011). The nail as a noninvasive indicator of methylmercury exposures and mercury/selenium molar ratios in brain, kidney, and livers of Long-Evans rats. *Biological trace element research*, 144, 812-820.
- Buha, A., Đukić-Ćosić, D., Ćurčić, M., Bulat, Z., Antonijević, B., Moulis, J. M., ... & Wallace, D. (2020). Emerging links between cadmium exposure and insulin resistance: human, animal, and cell study data. *Toxics*, 8(3), 63.
- Cabrera-Rodríguez, R., Luzardo, O. P., González-Antuña, A., Boada, L. D., Almeida-González, M., Camacho, M., ... & Henríquez-Hernández, L. A. (2018). Occurrence of 44 elements in human cord blood and their association with growth indicators in newborns. *Environment international*, 116, 43-51.
- Caito, S., & Aschner, M. (2017). Developmental neurotoxicity of lead. *Neurotoxicity of metals*, 3-12.
- Calatayud, M., Devesa, V., & Vélez, D. (2013). Differential toxicity and gene expression in Caco-2 cells exposed to arsenic species. *Toxicology Letters*, 218(1), 70-80.
- Calatayud, M., Gimeno-Alcañiz, J. V., Vélez, D., & Devesa, V. (2014). Trivalent arsenic species induce changes in expression and levels of proinflammatory cytokines in intestinal epithelial cells. *Toxicology letters*, 224(1), 40-46.
- Calderón-DuPont, D., Romero-Córdoba, S. L., Tello, J. K., Espinosa, A., Guerrero, B., Contreras, A. V., ... & Díaz-Villaseñor, A. (2023). Impaired white adipose tissue fatty acid metabolism in mice fed a high-fat diet worsened by arsenic exposure, primarily affecting retroperitoneal adipose tissue. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 468, 116428.
- Canto, N., Mercado, L., & Quiroz, W. (2019). Reactivity of antimony (V) and its effect on the pro-inflammatory response in the RAW 264.7 monocyte/macrophage cell line. *Environmental Chemistry*, 17(2), 173-181.
- Cantoni, O., Zito, E., Guidarelli, A., Fiorani, M., & Ghezzi, P. (2022). Mitochondrial ROS, ER stress, and Nrf2 crosstalk in the regulation of mitochondrial apoptosis induced by arsenite. *Antioxidants*, 11(5), 1034.

- Carmean, C. M., Kirkley, A. G., Landeche, M., Ye, H., Chellan, B., Aldirawi, H., ... & Sargis, R. M. (2020). Arsenic exposure decreases adiposity during high-fat feeding. *Obesity*, 28(5), 932-941.
- Carneado, S., López-Sánchez, J. F., Sahuquillo, A., Klontzas, E., Froudakis, G. E., & Pergantis, S. A. (2017). Antimony speciation in spirits stored in PET bottles: identification of a novel antimony complex. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 32(6), 1109-1118.
- Castriota, F., Rieswijk, L., Dahlberg, S., La Merrill, M. A., Steinmaus, C., Smith, M. T., & Wang, J. C. (2020b). A state-of-the-science review of arsenic's effects on glucose homeostasis in experimental models. *Environmental Health Perspectives*, 128(1), 016001.
- Castriota, F., Zushin, P. J. H., Sanchez, S. S., Phillips, R. V., Hubbard, A., Stahl, A., ... & La Merrill, M. A. (2020a). Chronic arsenic exposure impairs adaptive thermogenesis in male C57BL/6J mice. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*, 318(5), E667-E677.
- Caufield, P. W., Schön, C. N., Saraithong, P., Li, Y., & Argimón, S. (2015). Oral lactobacilli and dental caries: a model for niche adaptation in humans. *Journal of dental research*, 94(9_suppl), 110S-118S.
- Cavallo, D., Iavicoli, I., Setini, A., Marinaccio, A., Perniconi, B., Carelli, G., & Iavicoli, S. (2002). Genotoxic risk and oxidative DNA damage in workers exposed to antimony trioxide. *Environmental and molecular mutagenesis*, 40(3), 184-189.
- Cawley, K., Deegan, S., Samali, A., & Gupta, S. (2011). Assays for detecting the unfolded protein response. In *Methods in enzymology* (Vol. 490, pp. 31-51). Academic Press.
- CEC (1998) Council Directive 98/83/EC of November 1998 on the quality of water intended for human consumption, L330/32. *Official Journal of the European Communities*.
- Ceja-Galicia, Z. A., Daniel, A., Salazar, A. M., Pánico, P., Ostrosky-Wegman, P., & Diaz-Villasenor, A. (2017). Effects of arsenic on adipocyte metabolism: Is arsenic an obesogen?. *Molecular and cellular endocrinology*, 452, 25-32.
- Celep, O., Alp, İ., & Deveci, H. (2011). Improved gold and silver extraction from a refractory antimony ore by pretreatment with alkaline sulphide leach. *Hydrometallurgy*, 105(3-4), 234-239.
- Chang, E., & Kim, C. Y. (2019). Natural products and obesity: a focus on the regulation of mitotic clonal expansion during adipogenesis. *Molecules*, 24(6), 1157.
- Chapa-Martínez, C. A., Hinojosa-Reyes, L., Hernández-Ramírez, A., Ruiz-Ruiz, E., Maya-Treviño, L., & Guzmán-Mar, J. L. (2016). An evaluation of the migration of antimony from polyethylene terephthalate (PET) plastic used for bottled drinking water. *Science of the total Environment*, 565, 511-518.
- Chauhan, S., Dunlap, K., & Duffy, L. K. (2019). Effects of methylmercury and theaflavin digallate on adipokines in mature 3T3-L1 adipocytes. *International journal of molecular sciences*, 20(11), 2755.

- Chen, F., Luo, Y., Li, C., Wang, J., Chen, L., Zhong, X., ... & Guo, L. (2021). Subchronic low-dose arsenic in rice exposure induces gut microbiome perturbations in mice. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 227, 112934.
- Chi, L., Bian, X., Gao, B., Tu, P., Ru, H., & Lu, K. (2017). The effects of an environmentally relevant level of arsenic on the gut microbiome and its functional metagenome. *Toxicological Sciences*, 160(2), 193-204.
- Chiocchetti, G. M., Domene, A., Kühl, A. A., Zúñiga, M., Vélez, D., Devesa, V., & Monedero, V. (2019a). In vivo evaluation of the effect of arsenite on the intestinal epithelium and associated microbiota in mice. *Archives of Toxicology*, 93, 2127-2139.
- Chiocchetti, G. M., Vélez, D., & Devesa, V. (2018). Effect of subchronic exposure to inorganic arsenic on the structure and function of the intestinal epithelium. *Toxicology letters*, 286, 80-88.
- Chiocchetti, G. M., Vélez, D., & Devesa, V. (2019b). Inorganic arsenic causes intestinal barrier disruption. *Metallomics*, 11(8), 1411-1418.
- Chipurupalli, S., Samavedam, U., & Robinson, N. (2021). Crosstalk between ER stress, autophagy and inflammation. *Frontiers in Medicine*, 8, 758311.
- Choe, S. S., Huh, J. Y., Hwang, I. J., Kim, J. I., & Kim, J. B. (2016). Adipose tissue remodeling: its role in energy metabolism and metabolic disorders. *Frontiers in endocrinology*, 7, 30.
- Choe, S. Y., Kim, S. J., Kim, H. G., Lee, J. H., Choi, Y., Lee, H., & Kim, Y. (2003). Evaluation of estrogenicity of major heavy metals. *Science of the total environment*, 312(1-3), 15-21.
- Choiniere, J., & Wang, L. (2016). Exposure to inorganic arsenic can lead to gut microbe perturbations and hepatocellular carcinoma. *Acta Pharmaceutica Sinica B*, 6(5), 426-429.
- Chowdhury, R., Ramond, A., O’Keeffe, L. M., Shahzad, S., Kunutsor, S. K., Muka, T., ... & Di Angelantonio, E. (2018). Environmental toxic metal contaminants and risk of cardiovascular disease: systematic review and meta-analysis. *bmj*, 362.
- Cidu, R., Biddau, R., Dore, E., Vacca, A., & Marini, L. (2014). Antimony in the soil–water–plant system at the Su Suergiu abandoned mine (Sardinia, Italy): Strategies to mitigate contamination. *Science of the Total Environment*, 497, 319-331.
- Clarkson, T. W., & Magos, L. (2006). The toxicology of mercury and its chemical compounds. *Critical reviews in toxicology*, 36(8), 609-662.
- Clevers, H. (2013). The intestinal crypt, a prototype stem cell compartment. *Cell*, 154(2), 274-284.
- Coelho, D. R., De-Carvalho, R. R., Rocha, R. C., Saint’Pierre, T. D., & Paumgartten, F. J. (2014). Effects of in utero and lactational exposure to SbV on rat neurobehavioral development and fertility. *Reproductive Toxicology*, 50, 98-107.
- Cooke, P. S., & Naaz, A. (2004). Role of estrogens in adipocyte development and function. *Experimental biology and medicine*, 229(11), 1127-1135.

- Coryell, M., Roggenbeck, B. A., & Walk, S. T. (2019). The human gut microbiome's influence on arsenic toxicity. *Current pharmacology reports*, 5, 491-504.
- Costa, M. (2019). Review of arsenic toxicity, speciation and polyadenylation of canonical histones. *Toxicology and applied pharmacology*, 375, 1-4.
- Cox, J. N., Rahman, M. A., Bao, S., Liu, M., Wheeler, S. E., & Knoell, D. L. (2016). Cadmium attenuates the macrophage response to LPS through inhibition of the NF- κ B pathway. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology*, 311(4), L754-L765.
- Cray, P., Sheahan, B. J., & Dekaney, C. M. (2021). Secretory sorcery: paneth cell control of intestinal repair and homeostasis. *Cellular and Molecular Gastroenterology and Hepatology*, 12(4), 1239-1250.
- Cullen, A., Kiberd, B., Devaney, D., Gillan, J., Kelehan, P., Matthews, T. G., ... & Thornton, L. (2000). Concentrations of antimony in infants dying from SIDS and infants dying from other causes. *Archives of disease in childhood*, 82(3), 244-247.
- da Cunha Martins Jr, A., Mazzaron Barcelos, G. R., Jacob Ferreira, A. L. B., De Souza, M. F., de Syllos Cólus, I. M., Greggi Antunes, L. M., ... & Barbosa Jr, F. (2015). Effects of lead exposure and genetic polymorphisms on ALAD and GPx activities in Brazilian battery workers. *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A*, 78(16), 1073-1081.
- da Silva Ferreira, A. P. S., Pereira, E. C., Salles, F. J., da Silva, F. F., Batista, B. L., Handakas, E., & Olympio, K. P. K. (2019). Home-based and informal work exposes the families to high levels of potentially toxic elements. *Chemosphere*, 218, 319-327.
- Darbre, P. D. (2017). Endocrine disruptors and obesity. *Current obesity reports*, 6, 18-27.
- De Boeck, M., Kirsch-Volders, M., & Lison, D. (2003). Cobalt and antimony: genotoxicity and carcinogenicity. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 533(1-2), 135-152.
- de Perio, M. A., Durgam, S., Caldwell, K. L., & Eisenberg, J. (2010). A health hazard evaluation of antimony exposure in fire fighters. *Journal of occupational and environmental medicine*, 52(1), 81-84.
- de Sá, P. M., Richard, A. J., Hang, H., & Stephens, J. M. (2011). Transcriptional regulation of adipogenesis. *Comprehensive Physiology*, 7(2), 635-674.
- Di Tommaso, N., Gasbarrini, A., & Ponziani, F. R. (2021). Intestinal barrier in human health and disease. *International journal of environmental research and public health*, 18(23), 12836.
- Diaz-Bone, R. A., & Van de Wiele, T. (2010). Biotransformation of metal (loid) s by intestinal microorganisms. *Pure and Applied Chemistry*, 82(2), 409-427.
- Dillon, A., & Lo, D. D. (2019). M cells: intelligent engineering of mucosal immune surveillance. *Frontiers in immunology*, 10, 1499.
- Diquattro, S., Castaldi, P., Ritch, S., Juhasz, A. L., Brunetti, G., Scheckel, K. G., ... & Lombi, E. (2021). Insights into the fate of antimony (Sb) in contaminated

- soils: Ageing influence on Sb mobility, bioavailability, bioaccessibility and speciation. *Science of The Total Environment*, 770, 145354.
- Diquattro, S., Garau, G., Mangia, N. P., Drigo, B., Lombi, E., Vasileiadis, S., & Castaldi, P. (2020). Mobility and potential bioavailability of antimony in contaminated soils: Short-term impact on microbial community and soil biochemical functioning. *Ecotoxicology and environmental safety*, 196, 110576.
 - Dos Santos, A. A., Hort, M. A., Culbreth, M., López-Granero, C., Farina, M., Rocha, J. B., & Aschner, M. (2016). Methylmercury and brain development: A review of recent literature. *Journal of trace elements in medicine and biology*, 38, 99-107.
 - Dover, E. N., Beck, R., Huang, M. C., Douillet, C., Wang, Z., Klett, E. L., & Stýblo, M. (2018). Arsenite and methylarsonite inhibit mitochondrial metabolism and glucose-stimulated insulin secretion in INS-1 832/13 β cells. *Archives of toxicology*, 92(2), 693-704.
 - Dupont, D., Arnout, S., Jones, P. T., & Binnemans, K. (2016). Antimony recovery from end-of-life products and industrial process residues: a critical review. *Journal of Sustainable Metallurgy*, 2(1), 79-103.
 - Echeverría, R., Vrhovnik, P., Salcedo-Bellido, I., Iribarne-Durán, L. M., Fiket, Ž., Dolenc, M., ... & Arrebola, J. P. (2019). Levels and determinants of adipose tissue cadmium concentrations in an adult cohort from Southern Spain. *Science of the total environment*, 670, 1028-1036.
 - Egger, A. E., Grabmann, G., Gollmann-Tepeköylü, C., Pechriggl, E. J., Artner, C., Türkcan, A., ... & Bernhard, D. (2019). Chemical imaging and assessment of cadmium distribution in the human body. *Metallomics*, 11(12), 2010-2019.
 - Egusquiza, R. J., & Blumberg, B. (2020). Environmental obesogens and their impact on susceptibility to obesity: new mechanisms and chemicals. *Endocrinology*, 161(3).
 - Eke, C., Er, K., Segebade, C., & Boztosun, I. (2018). Study of filling material of dental composites: an analytical approach using radio-activation. *Radiochimica Acta*, 106(1), 69-77.
 - El Shanawany, S., Foda, N., Hashad, D. I., Salama, N., & Sobh, Z. (2017). The potential DNA toxic changes among workers exposed to antimony trioxide. *Environmental Science and Pollution Research*, 24, 12455-12461.
 - Etim, E. U. (2017). Occurrence and distribution of arsenic, antimony and selenium in shallow groundwater systems of Ibadan Metropolis, Southwestern Nigerian. *Journal of Health and Pollution*, 7(13), 32-41.
 - Eugene, S. P., Reddy, V. S., & Trinath, J. (2020). Endoplasmic reticulum stress and intestinal inflammation: a perilous union. *Frontiers in Immunology*, 11, 543022.
 - European Commission, Commission Regulation (EU) No 10/2011 of 14 January 2011 on plastic materials and articles intended to come into contact with food, Official Journal of the European Union L 12/1, 2011
 - European Communities, ECB. European Union Risk Assessment Report. Diantimony trioxide. DRAFT. CAS No: 1309-64-4. EINECS No: 215-175-0. RISK ASSESSMENT Sweden, 2008.

- European Food Safety Authority (EFSA) (2004) Opinion of the Scientific Panel on food additives, flavourings, processing aids and materials in contact with food (AFC) on a request from the Commission related to a 2nd list of substances for food contact materials. *EFSA J* 24:1–13
- Falta, T., Limbeck, A., Koellensperger, G., & Hann, S. (2008). Bioaccessibility of selected trace metals in urban PM 2.5 and PM 10 samples: a model study. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 390, 1149-1157.
- Fan, Y. Y., Zheng, J. L., Ren, J. H., Luo, J., Cui, X. Y., & Ma, L. Q. (2014). Effects of storage temperature and duration on release of antimony and bisphenol A from polyethylene terephthalate drinking water bottles of China. *Environmental Pollution*, 192, 113-120.
- Feng, P., Ye, Z., Kakade, A., Virk, A. K., Li, X., & Liu, P. (2018). A review on gut remediation of selected environmental contaminants: possible roles of probiotics and gut microbiota. *Nutrients*, 11(1), 22.
- Feng, R., Wei, C., Tu, S., Ding, Y., Wang, R., & Guo, J. (2013). The uptake and detoxification of antimony by plants: a review. *Environmental and experimental botany*, 96, 28-34.
- Fernández, N. F., Boullosa, P. E., Rodríguez, A. G., & Prada, J. I. R. (2019). A rare cause of gastric injury: arsenic intake. *Official journal of the American College of Gastroenterology| ACG*, 114(8), 1193.
- Ferrari, D., Cimino, F., Fratantonio, D., Molonia, M. S., Bashllari, R., Busà, R., ... & Speciale, A. (2017). Cyanidin-3-O-glucoside modulates the in vitro inflammatory crosstalk between intestinal epithelial and endothelial cells. *Mediators of inflammation*, 2017(1), 3454023.
- Ferrari, D., Speciale, A., Cristani, M., Fratantonio, D., Molonia, M. S., Ranaldi, G., ... & Cimino, F. (2016). Cyanidin-3-O-glucoside inhibits NF- κ B signalling in intestinal epithelial cells exposed to TNF- α and exerts protective effects via Nrf2 pathway activation. *Toxicology Letters*, 264, 51-58.
- Filella, M. (2020). Antimony and PET bottles: Checking facts. *Chemosphere*, 261, 127732.
- Filella, M., Belzile, N., & Chen, Y. W. (2002). Antimony in the environment: a review focused on natural waters: I. Occurrence. *Earth-science reviews*, 57(1-2), 125-176.
- Filella, M., Belzile, N., & Chen, Y. W. (2012). Human exposure to antimony. II. Contents in some human tissues often used in biomonitoring (hair, nails, teeth). *Critical reviews in environmental science and technology*, 42(10), 1058-1115.
- Filella, M., Belzile, N., & Chen, Y. W. (2013a). Human exposure to antimony. III. Contents in some human excreted biofluids (urine, milk, saliva). *Critical reviews in environmental science and technology*, 43(2), 162-214.
- Filella, M., Belzile, N., & Chen, Y. W. (2013b). Human exposure to antimony. IV. Contents in human blood. *Critical reviews in environmental science and technology*, 43(19), 2071-2105.
- Filella, M., Hennebert, P., Okkenhaug, G., & Turner, A. (2020). Occurrence and fate of antimony in plastics. *Journal of hazardous materials*, 390, 121764.

- Flora, G., Gupta, D., & Tiwari, A. (2012). Toxicity of lead: a review with recent updates. *Interdisciplinary toxicology*, 5(2), 47-58.
- Food and Drug Administration (FDA) (2011) List of indirect additives used in food contact substances; Doc. No. 5093, antimony oxide. U.S. Food and Drug Administration.
- Food and Drug Administration (FDA) (2012) Cumulated Estimated Daily Intake, antimony trioxide. U.S. Food and Drug Administration.
- Fort, M., Grimalt, J. O., Querol, X., Casas, M., & Sunyer, J. (2016). Evaluation of atmospheric inputs as possible sources of antimony in pregnant women from urban areas. *Science of the Total Environment*, 544, 391-399.
- Foryst-Ludwig, A., & Kintscher, U. (2010). Metabolic impact of estrogen signalling through ERalpha and ERbeta. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology*, 122(1-3), 74-81.
- Freire, C., Vrhovnik, P., Fiket, Ž., Salcedo-Bellido, I., Echeverría, R., Martín-Olmedo, P., ... & Arrebola, J. P. (2020). Adipose tissue concentrations of arsenic, nickel, lead, tin, and titanium in adults from GraMo cohort in Southern Spain: An exploratory study. *Science of the total environment*, 719, 137458.
- Frézard, F., Demicheli, C., & Ribeiro, R. R. (2009). Pentavalent antimonials: new perspectives for old drugs. *Molecules*, 14(7), 2317-2336.
- Frountzas, M., Karanikki, E., Toutouza, O., Sotirakis, D., Schizas, D., Theofilis, P., ... & Toutouzas, K. G. (2023). Exploring the Impact of Cyanidin-3-Glucoside on Inflammatory Bowel Diseases: Investigating New Mechanisms for Emerging Interventions. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(11), 9399.
- Fu, F., & Wang, Q. (2011). Removal of heavy metal ions from wastewaters: a review. *Journal of environmental management*, 92(3), 407-418.
- García-Pérez, J., de Larrea-Baz, N. F., Lope, V., Molina, A. J., O'Callaghan-Gordo, C., Alonso, M. H., ... & Pollán, M. (2020). Residential proximity to industrial pollution sources and colorectal cancer risk: A multicase-control study (MCC-Spain). *Environment international*, 144, 106055.
- Gardner, B. M., Pincus, D., Gotthardt, K., Gallagher, C. M., & Walter, P. (2013). Endoplasmic reticulum stress sensing in the unfolded protein response. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 5(3), a013169.
- Garg, A. N., & Ramakrishna, V. V. S. (2006). Fish as an indicator of aquatic environment: Multielemental neutron activation analysis of nutrient and pollutant elements in fish from Indian coastal areas. *Toxicological & Environmental Chemistry*, 88(1), 125-140.
- Garza-Lombó, C., Pappa, A., Panayiotidis, M. I., Gonsebatt, M. E., & Franco, R. (2019). Arsenic-induced neurotoxicity: a mechanistic appraisal. *JBIC Journal of Biological Inorganic Chemistry*, 24, 1305-1316.
- Gasser, M., Lenglet, S., Bararpour, N., Sajic, T., Wiskott, K., Augsburger, M., ... & Thomas, A. (2022). Cadmium acute exposure induces metabolic and transcriptomic perturbations in human mature adipocytes. *Toxicology*, 470, 153153.

- Gazwi, H. S., Yassien, E. E., & Hassan, H. M. (2020). Mitigation of lead neurotoxicity by the ethanolic extract of Laurus leaf in rats. *Ecotoxicology and environmental safety*, 192, 110297.
- Ghaben, A. L., & Scherer, P. E. (2019). Adipogenesis and metabolic health. *Nature reviews Molecular cell biology*, 20(4), 242-258.
- Ghosh, S., Banerjee, M., Bodduluri, H., & Jala, V. R. (2022a). Microbial metabolite mitigates arsenic induced oxidative stress, inflammation, and barrier dysfunction in gut epithelia. *The FASEB Journal*, 36.
- Ghosh, S., Banerjee, M., Haribabu, B., & Jala, V. R. (2022b). Urolithin A attenuates arsenic-induced gut barrier dysfunction. *Archives of toxicology*, 96(4), 987-1007.
- Ghosh, S., Nukavarapu, S. P., & Jala, V. R. (2024). Effects of heavy metals on gut barrier integrity and gut microbiota. *Microbiota and Host*, 2(1).
- Ghosh, S., Whitley, C. S., Haribabu, B., & Jala, V. R. (2021). Regulation of intestinal barrier function by microbial metabolites. *Cellular and molecular gastroenterology and hepatology*, 11(5), 1463-1482.
- Gilbert, M. (Ed.). (2016). *Brydson's plastics materials*. William Andrew.
- Gonçalves, A. C., Nunes, A. R., Falcão, A., Alves, G., & Silva, L. R. (2021). Dietary effects of anthocyanins in human health: A comprehensive review. *Pharmaceuticals*, 14(7), 690.
- Goodarzi, M. O. (2018). Genetics of obesity: what genetic association studies have taught us about the biology of obesity and its complications. *The lancet Diabetes & endocrinology*, 6(3), 223-236.
- Grause, G., Karakita, D., Ishibashi, J., Kameda, T., Bhaskar, T., & Yoshioka, T. (2011). TG-MS investigation of brominated products from the degradation of brominated flame retardants in high-impact polystyrene. *Chemosphere*, 85(3), 368-373.
- Green, A. J., Hoyo, C., Mattingly, C. J., Luo, Y., Tzeng, J. Y., Murphy, S. K., ... & Planchart, A. (2018). Cadmium exposure increases the risk of juvenile obesity: a human and zebrafish comparative study. *International Journal of Obesity*, 42(7), 1285-1295.
- Greifenstein, M., White, D. W., Stubner, A., Hout, J., & Whelton, A. J. (2013). Impact of temperature and storage duration on the chemical and odor quality of military packaged water in polyethylene terephthalate bottles. *Science of the total environment*, 456, 376-383.
- Gribble, F. M., & Reimann, F. (2016). Enteroendocrine cells: chemosensors in the intestinal epithelium. *Annual review of physiology*, 78(1), 277-299.
- Grosskopf, C., Schwerdtle, T., Mullenders, L. H., & Hartwig, A. (2010). Antimony impairs nucleotide excision repair: XPA and XPE as potential molecular targets. *Chemical research in toxicology*, 23(7), 1175-1183.
- Gu, J., Yao, J., Duran, R., & Sunahara, G. (2020). Comprehensive genomic and proteomic profiling reveal *Acinetobacter johnsonii* JH7 responses to Sb (III) toxicity. *Science of The Total Environment*, 748, 141174.
- Guan, Q. (2019). A comprehensive review and update on the pathogenesis of inflammatory bowel disease. *Journal of immunology research*, 2019(1), 7247238.

- Guha Mazumder, D., & Dasgupta, U. B. (2011). Chronic arsenic toxicity: studies in West Bengal, India. *The Kaohsiung journal of medical sciences*, 27(9), 360–370.
- Guo, J., Lv, N., Tang, J., Zhang, X., Peng, L., Du, X., ... & Chen, G. (2018). Associations of blood metal exposure with thyroid hormones in Chinese pregnant women: a cross-sectional study. *Environment International*, 121, 1185-1192.
- Gustafsson, J. K., & Johansson, M. E. (2022). The role of goblet cells and mucus in intestinal homeostasis. *Nature reviews Gastroenterology & hepatology*, 19(12), 785-803.
- Haber, A. L., Biton, M., Rogel, N., Herbst, R. H., Shekhar, K., Smillie, C., ... & Regev, A. (2017). A single-cell survey of the small intestinal epithelium. *Nature*, 551(7680), 333-339.
- Hachez, C., & Chaumont, F. (2010). Aquaporins: a family of highly regulated multifunctional channels. *MIPs and their Role in the Exchange of Metalloids*, 1-17.
- Haldar, A. K., Sen, P., & Roy, S. (2011). Use of antimony in the treatment of leishmaniasis: current status and future directions. *Molecular biology international*, 2011(1), 571242.
- Hales, C.M.; Carroll, M.D.; Fryar, C.D.; Ogden, C.L. Prevalence of Obesity and Severe Obesity among Adults: United States, 2017–2018. *NCHS Data Brief 2020*, 1–8.
- Hallenborg, P., Petersen, R. K., Feddersen, S., Sundekilde, U., Hansen, J. B., Blagoev, B., ... & Kristiansen, K. (2014). PPAR γ ligand production is tightly linked to clonal expansion during initiation of adipocyte differentiation [S]. *Journal of lipid research*, 55(12), 2491-2500.
- Hamdy, A., Mostafa, M. K., & Nasr, M. (2019). Techno-economic estimation of electroplating wastewater treatment using zero-valent iron nanoparticles: batch optimization, continuous feed, and scaling up studies. *Environmental Science and Pollution Research*, 26, 25372-25385.
- Hamdy, S. M., Shaban, A. M., Aziz, Y. S. A., Mahmoud, A. M., Moemen, L. A. A., Ibrahim, W. M., & Gad, N. S. (2018). Ameliorative role of jania rubens alga against toxicity of heavy metal polluted water in male rats. *Policy*, 2(2), 38-46.
- Han, J., Back, S. H., Hur, J., Lin, Y. H., Gildersleeve, R., Shan, J., ... & Kaufman, R. J. (2013). ER-stress-induced transcriptional regulation increases protein synthesis leading to cell death. *Nature cell biology*, 15(5), 481-490.
- Han, Y. M., Park, J. M., Her, S., Kim, M. S., Park, Y. J., & Hahm, K. B. (2020). Revaprazan prevented indomethacin-induced intestinal damages by enhancing tight junction related mechanisms. *Biochemical Pharmacology*, 182, 114290.
- Hansen, H. R., & Pergantis, S. A. (2006). Detection of antimony species in citrus juices and drinking water stored in PET containers. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 21(8), 731-733.
- Hayat, F., Shah, S. N. A., ur Rehman, Z., & Belanger-Gariepy, F. (2021). Antimony (III) dithiocarbamates: Crystal structures, supramolecular aggregations, DNA binding, antioxidant and antileishmanial activities. *Polyhedron*, 194, 114909.

- Hazardous Substances Data Bank. Available online: <https://toxnet.nlm.nih.gov/cgi-bin/sis/htmlgen?HSDB>
- He, M. (2007). Distribution and phytoavailability of antimony at an antimony mining and smelting area, Hunan, China. *Environmental Geochemistry and Health*, 29(3), 209-219.
- He, M. C., Ji, H. B., Zhao, C. Y., Xie, J., Wu, X. M., & Li, Z. F. (2002). Preliminary studies of heavy metal pollution in soil and plant near antimony mine area. *J Beijing Normal University (Nat Sci)*, 38, 417-420.
- He, M., Wang, N., Long, X., Zhang, C., Ma, C., Zhong, Q., ... & Shan, J. (2019). Antimony speciation in the environment: Recent advances in understanding the biogeochemical processes and ecological effects. *Journal of environmental sciences*, 75, 14-39.
- He, M., Wang, X., Wu, F., & Fu, Z. (2012). Antimony pollution in China. *Science of the total environment*, 421, 41-50.
- He, Z. L., Yang, X. E., & Stoffella, P. J. (2005). Trace elements in agroecosystems and impacts on the environment. *Journal of Trace elements in Medicine and Biology*, 19(2-3), 125-140.
- Herath, I., Vithanage, M., & Bundschuh, J. (2017). Antimony as a global dilemma: Geochemistry, mobility, fate and transport. *Environmental pollution*, 223, 545-559.
- Hetz, C. (2012). The unfolded protein response: controlling cell fate decisions under ER stress and beyond. *Nature reviews Molecular cell biology*, 13(2), 89-102.
- Hiller, E., Lalinská, B., Chovan, M., Jurkovič, E., Klimko, T., Jankulár, M., ... & Ondrejková, I. (2012). Arsenic and antimony contamination of waters, stream sediments and soils in the vicinity of abandoned antimony mines in the Western Carpathians, Slovakia. *Applied Geochemistry*, 27(3), 598-614.
- Hoet, P., 2009. Management of the Health Risks Related to Chronic Exposure to ATO in Production Workers. Unniversitie Catholique de Louvain, Bruissels, Belgium (A report to the International Antimony Association).
- Hong, Y. S., Song, K. H., & Chung, J. Y. (2014). Health effects of chronic arsenic exposure. *Journal of preventive medicine and public health*, 47(5), 245.
- Hou, Y., Xue, P., Woods, C. G., Wang, X., Fu, J., Yarborough, K., ... & Pi, J. (2013). Association between arsenic suppression of adipogenesis and induction of CHOP10 via the endoplasmic reticulum stress response. *Environmental health perspectives*, 121(2), 237-243.
- Hu, H., Xu, W., Li, Y., Wang, Z., Wang, S., Liu, Y., ... & Yang, Q. (2024). SIRT1 regulates endoplasmic reticulum stress-related organ damage. *Acta Histochemica*, 126(1), 152134.
- Hu, L., Fu, J., Wang, S., Xiang, Y., & Pan, X. (2021). Microplastics generated under simulated fire scenarios: characteristics, antimony leaching, and toxicity. *Environmental Pollution*, 269, 115905.
- Hu, X., He, M., & Li, S. (2015). Antimony leaching release from brake pads: effect of pH, temperature and organic acids. *Journal of Environmental Sciences*, 29, 11-17.

- Hua, L., Wu, C., Zhang, H., Cao, L., Wei, T., & Guo, J. (2021). Biochar-induced changes in soil microbial affect species of antimony in contaminated soils. *Chemosphere*, 263, 127795.
- Huang, X., Zhang, B., Wu, L., Zhou, Y., Li, Y., Mao, X., ... & Liu, Y. (2019). Association of exposure to ambient fine particulate matter constituents with semen quality among men attending a fertility center in China. *Environmental science & technology*, 53(10), 5957-5965.
- Hughes, M. F., Beck, B. D., Chen, Y., Lewis, A. S., & Thomas, D. J. (2011). Arsenic exposure and toxicology: a historical perspective. *Toxicological sciences*, 123(2), 305-332.
- Hunt, K. M., Srivastava, R. K., Elmets, C. A., & Athar, M. (2014). The mechanistic basis of arsenicosis: pathogenesis of skin cancer. *Cancer letters*, 354(2), 211-219.
- Hunter, A. R., Temperley, D., & Trail, I. A. (2021). Capitate shortening osteotomy and vascularized bone grafting for Kienböck's disease in ulnar positive or neutral wrists. *The Journal of hand surgery, European volume*, 46(6), 581–586.
- Hussain, T., Tan, B., Yin, Y., Blachier, F., Tossou, M. C., & Rahu, N. (2016). Oxidative stress and inflammation: what polyphenols can do for us?. *Oxidative medicine and cellular longevity*, 2016(1), 7432797.
- IARC 2012. Special report: policy, A review of Human Carcinogens—part C: metals, arsenic, Dusts, and Fibres IARC Monogr Eval Carcinog Risks Hum 100 11–465.
- Ibrahim, O. B., Mohamed, M. A., & Refat, M. S. (2014). Study the chemical composition and biological outcomes resulting from the interaction of the hormone adrenaline with heavy elements: Infrared, Raman, electronic, 1H NMR, XRD and SEM studies. *Journal of Molecular Structure*, 1056, 13-24.
- Inam, M. A., Khan, R., Park, D. R., Khan, S., Uddin, A., & Yeom, I. T. (2019). Complexation of antimony with natural organic matter: Performance evaluation during coagulation-flocculation process. *International journal of environmental research and public health*, 16(7), 1092.
- Iurlaro, R., & Muñoz-Pinedo, C. (2016). Cell death induced by endoplasmic reticulum stress. *The FEBS journal*, 283(14), 2640-2652.
- Iwai-Shimada, M., Kameo, S., Nakai, K., Yaginuma-Sakurai, K., Tatsuta, N., Kurokawa, N., ... & Satoh, H. (2019). Exposure profile of mercury, lead, cadmium, arsenic, antimony, copper, selenium and zinc in maternal blood, cord blood and placenta: the Tohoku Study of Child Development in Japan. *Environmental health and preventive medicine*, 24, 1-11.
- Ji, Y., Sarret, G., Schulin, R., & Tandy, S. (2017). Fate and chemical speciation of antimony (Sb) during uptake, translocation and storage by rye grass using XANES spectroscopy. *Environmental Pollution*, 231, 1322-1329.
- Jiang, X., An, Z., Lu, C., Chen, Y., Du, E., Qi, S., ... & Xu, Y. (2016). The protective role of Nrf2-Gadd45b against antimony-induced oxidative stress and apoptosis in HEK293 cells. *Toxicology Letters*, 256, 11-18.

- Johansson, M. E., Sjövall, H., & Hansson, G. C. (2013). The gastrointestinal mucus system in health and disease. *Nature reviews Gastroenterology & hepatology*, 10(6), 352-361.
- Johnson, C. A., Moench, H., Wersin, P., Kugler, P., & Wenger, C. (2005). Solubility of antimony and other elements in samples taken from shooting ranges. *Journal of environmental quality*, 34(1), 248-254.
- Kanda, H., Tateya, S., Tamori, Y., Kotani, K., Hiasa, K. I., Kitazawa, R., ... & Kasuga, M. (2006). MCP-1 contributes to macrophage infiltration into adipose tissue, insulin resistance, and hepatic steatosis in obesity. *The Journal of clinical investigation*, 116(6), 1494-1505.
- Karatela, S., Ward, N., & Paterson, J. (2019). Mercury exposure in mother-children pairs in a seafood eating population: Body burden and related factors. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 16(12), 2238.
- Kawakami, T., Hanao, N., Nishiyama, K., Kadota, Y., Inoue, M., Sato, M., & Suzuki, S. (2012). Differential effects of cobalt and mercury on lipid metabolism in the white adipose tissue of high-fat diet-induced obesity mice. *Toxicology and applied pharmacology*, 258(1), 32-42.
- Kawamura, Y., Kawasaki, C., Mine, S., Mutsuga, M., & Tanamoto, K. (2006). Contents of eight harmful elements in baby toys and their migration tests. *Shokuhin eiseigaku zasshi. Journal of the Food Hygienic Society of Japan*, 47(2), 51-57.
- Kawasaki, N., Asada, R., Saito, A., Kanemoto, S., & Imaizumi, K. (2012). Obesity-induced endoplasmic reticulum stress causes chronic inflammation in adipose tissue. *Scientific reports*, 2(1), 799.
- Khoo, H. E., Azlan, A., Tang, S. T., & Lim, S. M. (2017). Anthocyanidins and anthocyanins: Colored pigments as food, pharmaceutical ingredients, and the potential health benefits. *Food & nutrition research*.
- Khor, B., Gardet, A., & Xavier, R. J. (2011). Genetics and pathogenesis of inflammatory bowel disease. *Nature*, 474(7351), 307-317.
- Kim, J. Y., Morgan, M., Kim, D. G., Lee, J. Y., Bai, L., Lin, Y., ... & Kim, Y. S. (2011). TNF α -induced noncanonical NF- κ B activation is attenuated by RIP1 through stabilization of TRAF2. *Journal of cell science*, 124(4), 647-656.
- Kim, S., Joe, Y., Surh, Y. J., & Chung, H. T. (2018). Differential regulation of toll-like receptor-mediated cytokine production by unfolded protein response. *Oxidative medicine and cellular longevity*, 2018(1), 9827312.
- Kim, Y. S., & Ho, S. B. (2010). Intestinal goblet cells and mucins in health and disease: recent insights and progress. *Current gastroenterology reports*, 12, 319-330.
- Kirkland, D., Whitwell, J., Deyo, J., & Serex, T. (2007). Failure of antimony trioxide to induce micronuclei or chromosomal aberrations in rat bone-marrow after sub-chronic oral dosing. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 627(2), 119-128.
- Knani, L., Bartolini, D., Kechiche, S., Tortoioli, C., Murdolo, G., Moretti, M., ... & Galli, F. (2019). Melatonin prevents cadmium-induced bone damage: first

- evidence on an improved osteogenic/adipogenic differentiation balance of mesenchymal stem cells as underlying mechanism. *Journal of Pineal Research*, 67(3), e12597.
- Koga, T., Suico, M. A., Shimasaki, S., Watanabe, E., Kai, Y., Koyama, K., ... & Kai, H. (2015). Endoplasmic reticulum (ER) stress induces sirtuin 1 (SIRT1) expression via the PI3K-Akt-GSK3 β signaling pathway and promotes hepatocellular injury. *Journal of Biological Chemistry*, 290(51), 30366-30374.
 - Kotsopoulos, J., Sukiennicki, G., Muszyńska, M., Gackowski, D., Kałkowski, K., Durda, K., ... & Lubinski, J. (2012). Plasma micronutrients, trace elements, and breast cancer in BRCA1 mutation carriers: an exploratory study. *Cancer Causes & Control*, 23, 1065-1074.
 - Kuri-Harcuch, W., Velez-delValle, C., Vazquez-Sandoval, A., Hernández-Mosqueira, C., & Fernandez-Sanchez, V. (2019). A cellular perspective of adipogenesis transcriptional regulation. *Journal of cellular physiology*, 234(2), 1111-1129.
 - Kusaczuk, M. (2019). Tauroursodeoxycholate—bile acid with chaperoning activity: molecular and cellular effects and therapeutic perspectives. *Cells*, 8(12), 1471.
 - La Merrill, M. A., Vandenberg, L. N., Smith, M. T., Goodson, W., Browne, P., Patisaul, H. B., ... & Zoeller, R. T. (2020). Consensus on the key characteristics of endocrine-disrupting chemicals as a basis for hazard identification. *Nature Reviews Endocrinology*, 16(1), 45-57.
 - Lai, Z., He, M., Lin, C., Ouyang, W., & Liu, X. (2022). Interactions of antimony with biomolecules and its effects on human health. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 233, 113317.
 - Landrigan, P. J., Fuller, R., Acosta, N. J., Adeyi, O., Arnold, R., Baldé, A. B., ... & Zhong, M. (2018). The Lancet Commission on pollution and health. *The lancet*, 391(10119), 462-512.
 - Laporte-Saumure, M., Martel, R., & Mercier, G. (2011). Characterization and metal availability of copper, lead, antimony and zinc contamination at four Canadian small arms firing ranges. *Environmental technology*, 32(7), 767-781.
 - Lazar, A. D., Dinescu, S., & Costache, M. (2018). Adipose tissue engineering and adipogenesis—A review. *Rev. Biol. Biomed. Sci*, 1, 17-26.
 - Lea, T. (2015). Caco-2 cell line. *The Impact of Food Bioactives on Health: in vitro and ex vivo models*, 103-111.
 - Leal, J., Smyth, H. D., & Ghosh, D. (2017). Physicochemical properties of mucus and their impact on transmucosal drug delivery. *International journal of pharmaceutics*, 532(1), 555-572.
 - Lee, K. (2018). Blood mercury concentration in relation to metabolic and weight phenotypes using the KNHANES 2011–2013 data. *International archives of occupational and environmental health*, 91, 185-193.
 - Lee, M. J., Chou, M. C., Chou, W. J., Huang, C. W., Kuo, H. C., Lee, S. Y., & Wang, L. J. (2018). Heavy metals' effect on susceptibility to attention-

- deficit/hyperactivity disorder: implication of lead, cadmium, and antimony. *International journal of environmental research and public health*, 15(6), 1221.
- Lee, S., Cho, S. R., Jeong, I., Park, J. B., Shin, M. Y., Kim, S., & Kim, J. H. (2020). Mercury exposure and associations with hyperlipidemia and elevated liver enzymes: A nationwide cross-sectional survey. *Toxics*, 8(3), 47.
 - Leechart, P., Inthorn, D., & Thiravetyan, P. (2015). Effect of NaCl on antimony and phthalate compounds leached from PET bottles. *Water Science and Technology: Water Supply*, 15(4), 766-772.
 - Li, F. J., Yang, H. W., Ayyamperumal, R., & Liu, Y. (2022). Pollution, sources, and human health risk assessment of heavy metals in urban areas around industrialization and urbanization-Northwest China. *Chemosphere*, 308, 136396.
 - Li, J., Yu, H., Wu, X., Shen, L., Liu, Y., Qiu, G., ... & Yu, R. (2018b). Novel hyper antimony-oxidizing bacteria isolated from contaminated mine soils in China. *Geomicrobiology journal*, 35(8), 713-720.
 - Li, J., Zhai, J., Gu, L., Su, Y., Gong, L., Yang, Y., & Chang, C. (2021). Hen egg yolk in food industry-A review of emerging functional modifications and applications. *Trends in Food Science & Technology*, 115, 12-21.
 - Li, J., Zheng, B., He, Y., Zhou, Y., Chen, X., Ruan, S., ... & Tang, L. (2018a). Antimony contamination, consequences and removal techniques: A review. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 156, 125-134.
 - Li, N., Wang, X. M., Jiang, L. J., Zhang, M., Li, N., Wei, Z. Z., ... & Zhao, Y. J. (2016). Effects of endoplasmic reticulum stress on the expression of inflammatory cytokines in patients with ulcerative colitis. *World journal of gastroenterology*, 22(7), 2357.
 - Li, X., Liu, L., Cao, Z., Li, W., Li, H., Lu, C., ... & Liu, Y. (2020). Gut microbiota as an “invisible organ” that modulates the function of drugs. *Biomedicine & pharmacotherapy*, 121, 109653.
 - Li, Y., Guo, Y., Tang, J., Jiang, J., & Chen, Z. (2014). New insights into the roles of CHOP-induced apoptosis in ER stress. *Acta Biochim Biophys Sin*, 46(8), 629-640.
 - Liang, X. P., Or, C. Y., Tsoi, M. F., Cheung, C. L., & Cheung, B. M. Y. (2021). Division of Clinical Pharmacology and Therapeutics D of M The University of Hong Kong, Hong Kong. Prevalence of metabolic syndrome in the United States National Health and Nutrition Examination Survey (nhanes) 2011–2018. *Eur Heart J*, 42(Supplement_1), ehab724-2420.
 - Lif Holgerson, P., Öhman, C., Rönnlund, A., & Johansson, I. (2015). Maturation of Oral Microbiota in Children with or without Dental Caries. *PloS one*, 10(5), e0128534.
 - Lin, R., Yan, D., Zhang, Y., Liao, X., Gong, G., Hu, J., ... & Cai, W. (2016). Common variants in SIRT1 and human longevity in a Chinese population. *BMC Medical Genetics*, 17, 1-7.
 - Lindell, A. E., Zimmermann-Kogadeeva, M., & Patil, K. R. (2022). Multimodal interactions of drugs, natural compounds and pollutants with the gut microbiota. *Nature Reviews Microbiology*, 20(7), 431-443.

- Litwin, I., Mucha, S., Pilarczyk, E., Wysocki, R., & Maciaszczyk-Dziubinska, E. (2021). Complex mechanisms of antimony genotoxicity in budding yeast involves replication and topoisomerase I-associated DNA lesions, telomere dysfunction and inhibition of DNA repair. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(9), 4510.
- Liu, C., Wang, J., Wei, Y., Zhang, W., Geng, M., Yuan, Y., ... & Huang, K. (2020). Fat-specific knockout of *Mecp2* upregulates *Slpi* to reduce obesity by enhancing browning. *Diabetes*, 69(1), 35-47.
- Liu, W., Feng, H., Zheng, S., Xu, S., Massey, I. Y., Zhang, C., ... & Yang, F. (2021). Pb toxicity on gut physiology and microbiota. *Frontiers in Physiology*, 12, 574913.
- Liu, X., Wang, J., Deng, H., Zhong, X., Li, C., Luo, Y., ... & Guo, L. (2022). In situ analysis of variations of arsenicals, microbiome and transcriptome profiles along murine intestinal tract. *Journal of Hazardous Materials*, 427, 127899.
- Liu, Y., Adachi, M., Zhao, S., Hareyama, M., Koong, A. C., Luo, D., ... & Shinomura, Y. (2009). Preventing oxidative stress: a new role for XBP1. *Cell Death & Differentiation*, 16(6), 847-857.
- Long, X., Wang, X., Guo, X., & He, M. (2020). A review of removal technology for antimony in aqueous solution. *Journal of Environmental Sciences*, 90, 189-204.
- Longo, M., Zatterale, F., Naderi, J., Parrillo, L., Formisano, P., Raciti, G. A., ... & Miele, C. (2019). Adipose tissue dysfunction as determinant of obesity-associated metabolic complications. *International journal of molecular sciences*, 20(9), 2358.
- López, S., Aguilar, L., Mercado, L., Bravo, M., & Quiroz, W. (2015). Sb (V) reactivity with human blood components: redox effects. *PLoS One*, 10(1), e0114796.
- Lu, L., Li, Y., Chen, C., Zhang, Y., Guo, W., Zhang, S., & Kahe, K. (2023). Associations of cadmium exposure with risk of metabolic syndrome and its individual components: A meta-analysis. *Journal of exposure science & environmental epidemiology*, 33(6), 846-854.
- Ma, X., Dai, Z., Sun, K., Zhang, Y., Chen, J., Yang, Y., ... & Wu, Z. (2017). Intestinal epithelial cell endoplasmic reticulum stress and inflammatory bowel disease pathogenesis: an update review. *Frontiers in immunology*, 8, 1271.
- Macedo, M. H., Dias Neto, M., Pastrana, L., Gonçalves, C., & Xavier, M. (2023). Recent Advances in Cell-Based In Vitro Models to Recreate Human Intestinal Inflammation. *Advanced Science*, 10(31), 2301391.
- Maciaszczyk-Dziubinska, E., Wawrzycka, D., & Wysocki, R. (2012). Arsenic and antimony transporters in eukaryotes. *International journal of molecular sciences*, 13(3), 3527-3548.
- Mahameed, M., Boukeileh, S., Obiedat, A., Darawshi, O., Dipta, P., Rimon, A., ... & Tirosh, B. (2020). Pharmacological induction of selective endoplasmic reticulum retention as a strategy for cancer therapy. *Nature communications*, 11(1), 1304.
- Mann, K. K., Davison, K., Colombo, M., Colosimo, A. L., Diaz, Z., Padovani, A. M., ... & Miller Jr, W. H. (2006). Antimony trioxide-induced apoptosis is dependent on SEK1/JNK signaling. *Toxicology letters*, 160(2), 158-170.

- Maqbool, F., Bahadar, H., Niaz, K., Baeri, M., Rahimifard, M., Navaei-Nigjeh, M., ... & Abdollahi, M. (2016). Effects of methyl mercury on the activity and gene expression of mouse Langerhans islets and glucose metabolism. *Food and Chemical Toxicology*, 93, 119-128.
- Margetaki, K., Vafeiadi, M., Kampouri, M., Roumeliotaki, T., Karakosta, P., Daraki, V., ... & Chatzi, L. (2021). Associations of exposure to cadmium, antimony, lead and their mixture with gestational thyroid homeostasis. *Environmental Pollution*, 289, 117905.
- Martini, C. N., Gabrielli, M., Bonifacino, G., Codesido, M. M., & Vila, M. D. C. (2018). Lead enhancement of 3T3-L1 fibroblasts differentiation to adipocytes involves ERK, C/EBP β and PPAR γ activation. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 437, 37-44.
- Martini, C. N., Sosa, F. N., Fuchs, J., & Vila, M. D. C. (2020). Effect of lead on proliferation, oxidative stress and genotoxic damage of 3T3-L1 fibroblasts. *Toxicology Research*, 9(3), 158-163.
- Martini, E., Krug, S. M., Siegmund, B., Neurath, M. F., & Becker, C. (2017). Mend your fences: the epithelial barrier and its relationship with mucosal immunity in inflammatory bowel disease. *Cellular and molecular gastroenterology and hepatology*, 4(1), 33-46.
- Martinon, F., Chen, X., Lee, A. H., & Glimcher, L. H. (2010). TLR activation of the transcription factor XBP1 regulates innate immune responses in macrophages. *Nature immunology*, 11(5), 411-418.
- Martins, A. C., Ke, T., Bowman, A. B., & Aschner, M. (2021). New insights on mechanisms underlying methylmercury-induced and manganese-induced neurotoxicity. *Current opinion in toxicology*, 25, 30-35.
- Mazidi, M., Rezaie, P., Kengne, A. P., Stathopoulou, M. G., Azimi-Nezhad, M., & Siest, S. (2017). VEGF, the underlying factor for metabolic syndrome; fact or fiction?. *Diabetes & Metabolic Syndrome: Clinical Research & Reviews*, 11, S61-S64.
- McCallum, R. I. (2005). Occupational exposure to antimony compounds. *Journal of Environmental Monitoring*, 7(12), 1245-1250.
- McQueen, A. E., Koliwad, S. K., & Wang, J. C. (2018). Fighting obesity by targeting factors regulating beige adipocytes. *Current Opinion in Clinical Nutrition & Metabolic Care*, 21(6), 437-443.
- Mehlem, A., Hagberg, C. E., Muhl, L., Eriksson, U., & Falkevall, A. (2013). Imaging of neutral lipids by oil red O for analyzing the metabolic status in health and disease. *Nature protocols*, 8(6), 1149-1154.
- Meng, Y. L., Liu, Z., & Rosen, B. P. (2004). As (III) and Sb (III) uptake by GlpF and efflux by ArsB in Escherichia coli. *Journal of Biological Chemistry*, 279(18), 18334-18341.
- Menikdiwela, K. R., Ramalingam, L., Allen, L., Scoggin, S., Kalupahana, N. S., & Moustaid-Moussa, N. (2019). Angiotensin II increases endoplasmic reticulum stress in adipose tissue and adipocytes. *Scientific reports*, 9(1), 8481.

- Meyer, D. N., Crofts, E. J., Akemann, C., Gurdziel, K., Farr, R., Baker, B. B., ... & Baker, T. R. (2020). Developmental exposure to Pb²⁺ induces transgenerational changes to zebrafish brain transcriptome. *Chemosphere*, 244, 125527.
- Missimer, T. M., Teaf, C. M., Beeson, W. T., Maliva, R. G., Wooschlager, J., & Covert, D. J. (2018). Natural background and anthropogenic arsenic enrichment in Florida soils, surface water, and groundwater: a review with a discussion on public health risk. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 15(10), 2278.
- Mitamura, Y., Ogulur, I., Pat, Y., Rinaldi, A. O., Ardicli, O., Cevhertas, L., ... & Akdis, C. A. (2021). Dysregulation of the epithelial barrier by environmental and other exogenous factors. *Contact Dermatitis*, 85(6), 615-626.
- Molonia, M. S., Muscarà, C., Speciale, A., Salamone, F. L., Costa, G., Vento, G., ... & Cimino, F. (2023b). Low concentrations of antimony impair adipogenesis and endoplasmic reticulum homeostasis during 3T3-L1 cells differentiation. *Food and Chemical Toxicology*, 181, 114107.
- Molonia, M. S., Muscarà, C., Speciale, A., Salamone, F. L., Toscano, G., Saija, A., & Cimino, F. (2022). The p-phthalates terephthalic acid and dimethyl terephthalate used in the manufacture of PET induce in vitro adipocytes dysfunction by altering adipogenesis and thermogenesis mechanisms. *Molecules*, 27(21), 7645.
- Molonia, M. S., Occhiuto, C., Muscarà, C., Speciale, A., Bashllari, R., Villarroya, F., ... & Cristani, M. (2020). Cyanidin-3-O-glucoside restores insulin signaling and reduces inflammation in hypertrophic adipocytes. *Archives of biochemistry and biophysics*, 691, 108488.
- Molonia, M. S., Salamone, F. L., Muscarà, C., Costa, G., Vento, G., Saija, A., ... & Cimino, F. (2023a). Regulation of mitotic clonal expansion and thermogenic pathway are involved in the antiadipogenic effects of cyanidin-3-O-glucoside. *Frontiers in Pharmacology*, 14, 1225586.
- Moon S. S. (2017). Association between Blood Mercury Level and Visceral Adiposity in Adults. *Diabetes & metabolism journal*, 41(2), 96–98.
- Motta, C. M., Califano, E., Scudiero, R., Avallone, B., Fogliano, C., De Bonis, S., ... & Simoniello, P. (2022). Effects of cadmium exposure on gut villi in *Danio rerio*. *International journal of molecular sciences*, 23(4), 1927.
- Mukhopadhyay, R., Bhattacharjee, H., & Rosen, B. P. (2014). Aquaglyceroporins: generalized metalloid channels. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*, 1840(5), 1583-1591.
- Muscarà, C., Molonia, M. S., Speciale, A., Bashllari, R., Cimino, F., Occhiuto, C., ... & Cristani, M. (2019). Anthocyanins ameliorate palmitate-induced inflammation and insulin resistance in 3T3-L1 adipocytes. *Phytotherapy research*, 33(7), 1888-1897.
- National Institutes of Health, National Heart, Lung, and Blood Institute. 2022. <https://www.nhlbi.nih.gov/health/metabolic-syndrome>
- Nedergaard, J., & Cannon, B. (2014). The browning of white adipose tissue: some burning issues. *Cell metabolism*, 20(3), 396-407.

- Niedzielski, P., Siepak, J., & Siepak, M. (2001). Total content of arsenic, antimony and selenium in groundwater samples from western Poland. *Polish Journal of Environmental Studies*, 10(5), 347-350.
- Ning, C., Li, G., You, L., Ma, Y., Jin, L., Ma, J., ... & Liu, H. (2017). MiR-185 inhibits 3T3-L1 cell differentiation by targeting SREBP-1. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*, 81(9), 1747-1754.
- Nishad, P. A., & Bhaskarapillai, A. (2021). Antimony, a pollutant of emerging concern: A review on industrial sources and remediation technologies. *Chemosphere*, 277, 130252.
- NTP, 2017. NTP report 2-year inhalation carcinogenicity studies antimony trioxide in rats and mice. In: National Toxicology Program of the United States, NTP TR 590.
- NTP, Report on Carcinogens Monograph on Antimony Trioxide October, Office of the Report on Carcinogens, National Toxicology Program, National Institute of Environmental Health Sciences, National Institutes of Health, Research Triangle Park, US, 2018.
- NTP. 2016. NTP technical report on the toxicology and carcinogenesis studies of antimony trioxide (CAS NO. 1309-64-4) in Wistar Han [CrI:WI (Han)] rats and B6C3F1/N mice. National Toxicology Program. NTP TR 590.
- Oken, E., Radesky, J. S., Wright, R. O., Bellinger, D. C., Amarasiriwardena, C. J., Kleinman, K. P., ... & Gillman, M. W. (2008). Maternal fish intake during pregnancy, blood mercury levels, and child cognition at age 3 years in a US cohort. *American journal of epidemiology*, 167(10), 1171-1181.
- Okumura, R., & Takeda, K. (2017). Roles of intestinal epithelial cells in the maintenance of gut homeostasis. *Experimental & molecular medicine*, 49(5), e338-e338.
- Omura, T., Asari, M., Yamamoto, J., Oka, K., Hoshina, C., Maseda, C., ... & Shimizu, K. (2013). Sodium tauroursodeoxycholate prevents paraquat-induced cell death by suppressing endoplasmic reticulum stress responses in human lung epithelial A549 cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 432(4), 689-694.
- Ong, G., & Logue, S. E. (2023). Unfolding the interactions between endoplasmic reticulum stress and oxidative stress. *Antioxidants*, 12(5), 981.
- Ortiz-Huidobro, R. I., Velasco, M., Larqué, C., Escalona, R., & Hiriart, M. (2021). Molecular insulin actions are sexually dimorphic in lipid metabolism. *Frontiers in Endocrinology*, 12, 690484.
- Palma-Lara, I., Martínez-Castillo, M., Quintana-Pérez, J. C., Arellano-Mendoza, M. G., Tamay-Cach, F., Valenzuela-Limón, O. L., ... & Hernández-Zavala, A. (2020). Arsenic exposure: A public health problem leading to several cancers. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 110, 104539.
- Pandit, R., Beerens, S., & Adan, R. A. (2017). Role of leptin in energy expenditure: the hypothalamic perspective. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 312(6), R938-R947.

- Park, J. S., Ha, K. H., He, K., & Kim, D. J. (2017b). Association between blood mercury level and visceral adiposity in adults. *Diabetes & metabolism journal*, 41(2), 113-120.
- Park, S. S., Skaar, D. A., Jirtle, R. L., & Hoyo, C. (2017a). Epigenetics, obesity and early-life cadmium or lead exposure. *Epigenomics*, 9(1), 57-75.
- Parrilha, G. L., Ferraz, K. S., Lessa, J. A., de Oliveira, K. N., Rodrigues, B. L., Ramos, J. P., ... & Beraldo, H. (2014). Metal complexes with 2-acetylpyridine-N (4)-orthochlorophenylthiosemicarbazone: Cytotoxicity and effect on the enzymatic activity of thioredoxin reductase and glutathione reductase. *European journal of medicinal chemistry*, 84, 537-544.
- Patinha, C., Armienta, A., Argyraki, A., & Durães, N. (2018). Inorganic pollutants in soils. In *Soil Pollution* (pp. 127-159). Academic Press.
- Pavlov, D. (2011). Lead alloys and grids. Grid design principles. *Lead-Acid Batteries: Science and Technology*, 149-221.
- Pedersen, S. B., Kristensen, K., Hermann, P. A., Katzenellenbogen, J. A., & Richelsen, B. (2004). Estrogen controls lipolysis by up-regulating α 2A-adrenergic receptors directly in human adipose tissue through the estrogen receptor α . Implications for the female fat distribution. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 89(4), 1869-1878.
- Pelfrêne, A., Cave, M. R., Wragg, J., & Douay, F. (2017). In vitro investigations of human bioaccessibility from reference materials using simulated lung fluids. *International journal of environmental research and public health*, 14(2), 112.
- Peña-Fernández, A., González-Muñoz, M. J., & Lobo-Bedmar, M. D. C. (2014). Establishing the importance of human health risk assessment for metals and metalloids in urban environments. *Environment international*, 72, 176-185.
- Peng, W., Wu, Y., Peng, Z., Qi, W., Liu, T., Yang, B., ... & Wang, Y. (2022). Cyanidin-3-glucoside improves the barrier function of retinal pigment epithelium cells by attenuating endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis. *Food Research International*, 157, 111313.
- Periferakis, A., Caruntu, A., Periferakis, A. T., Scheau, A. E., Badarau, I. A., Caruntu, C., & Scheau, C. (2022). Availability, toxicology and medical significance of antimony. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 19(8), 4669.
- Peterson, L. W., & Artis, D. (2014). Intestinal epithelial cells: regulators of barrier function and immune homeostasis. *Nature reviews immunology*, 14(3), 141-153.
- Pierart, A., Shahid, M., Séjalon-Delmas, N., & Dumat, C. (2015). Antimony bioavailability: knowledge and research perspectives for sustainable agricultures. *Journal of hazardous materials*, 289, 219-234.
- Pinto, D. V., Raposo, R. S., Matos, G. A., Alvarez-Leite, J. I., Malva, J. O., & Oriá, R. B. (2020). Methylmercury interactions with gut microbiota and potential modulation of neurogenic niches in the brain. *Frontiers in Neuroscience*, 14, 576543.

- Pires Da Silva, J., Monceaux, K., Guilbert, A., Gressette, M., Piquereau, J., Novotova, M., ... & Lemaire, C. (2020). SIRT1 protects the heart from ER stress-induced injury by promoting eEF2K/eEF2-dependent autophagy. *Cells*, 9(2), 426.
- Podgorski, J., & Berg, M. (2020). Global threat of arsenic in groundwater. *Science*, 368(6493), 845-850.
- Pojer, E., Mattivi, F., Johnson, D., & Stockley, C. S. (2013). The case for anthocyanin consumption to promote human health: a review. *Comprehensive reviews in food science and food safety*, 12(5), 483-508.
- Pratush, A., Kumar, A., & Hu, Z. (2018). Adverse effect of heavy metals (As, Pb, Hg, and Cr) on health and their bioremediation strategies: a review. *International Microbiology*, 21, 97-106.
- Quintana, R., de Ilarduya, A. M., Alla, A., & Muñoz-Guerra, S. (2011). Polyterephthalates made from Ethylene glycol, 1, 4-cyclohexanedimethanol, and isosorbide. *Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry*, 49(10), 2252-2260.
- Rai, P. K., Lee, S. S., Zhang, M., Tsang, Y. F., & Kim, K. H. (2019). Heavy metals in food crops: Health risks, fate, mechanisms, and management. *Environment international*, 125, 365-385.
- Rakshit, S., Sarkar, D., Punamiya, P., & Datta, R. (2011). Antimony sorption at gibbsite–water interface. *Chemosphere*, 84(4), 480-483.
- Ran, P. (2011). Research progress on present situation and countermeasure of antimony pollution in water and soil environment. *Soil and Environmental Sciences*.
- Rehman, K., Fatima, F., Waheed, I., & Akash, M. S. H. (2018). Prevalence of exposure of heavy metals and their impact on health consequences. *Journal of cellular biochemistry*, 119(1), 157-184.
- Reimann, C., Matschullat, J., Birke, M., & Salminen, R. (2010). Antimony in the environment: lessons from geochemical mapping. *Applied Geochemistry*, 25(2), 175-198.
- Renu, K., Madhyastha, H., Madhyastha, R., Maruyama, M., Arunachlam, S., & Abilash, V. G. (2018). Role of arsenic exposure in adipose tissue dysfunction and its possible implication in diabetes pathophysiology. *Toxicology letters*, 284, 86-95.
- Ribeiro, R. R., Ferreira, W. A., Martins, P. S., Neto, R. L., Rocha, O. G., Le Moyec, L., ... & Frézard, F. (2010). Prolonged absorption of antimony (V) by the oral route from non-inclusion meglumine antimoniate– β -cyclodextrin conjugates. *Biopharmaceutics & Drug Disposition*, 31(2-3), 109-119.
- Rizzetti, D. A., Corrales, P., Piagette, J. T., Uranga-Ocio, J. A., Medina-Gomez, G., Peçanha, F. M., ... & Wiggers, G. A. (2019). Chronic mercury at low doses impairs white adipose tissue plasticity. *Toxicology*, 418, 41-50.
- Rodriguez-Cuenca, S., Carobbio, S., Velagapudi, V. R., Barbarroja, N., Moreno-Navarrete, J. M., Tinahones, F. J., ... & Vidal-Puig, A. (2012). Peroxisome proliferator-activated receptor γ -dependent regulation of lipolytic nodes and metabolic flexibility. *Molecular and cellular biology*, 32(8), 1555-1565.

- Ruiz-Castell, M., Paco, P., Barbieri, F. L., Duprey, J. L., Forns, J., Carsin, A. E., ... & Gardon, J. (2012). Child neurodevelopment in a Bolivian mining city. *Environmental Research*, 112, 147-154.
- Rusanov, A. L., Smirnova, A. V., Poromov, A. A., Fomicheva, K. A., Luzgina, N. G., & Majouga, A. G. (2015). Effects of cadmium chloride on the functional state of human intestinal cells. *Toxicology in Vitro*, 29(5), 1006-1011.
- Saklayen, M. G. (2018). The global epidemic of the metabolic syndrome. *Current hypertension reports*, 20(2), 1-8.
- Salminen, R., Batista, M. J., Bidovec, M., Demetriades, A., DE VIVO, B., De Vos, W., & Lima, A. (2005). FOREGS geochemical Atlas of Europe. Part 1. Background information, methodology and maps. Geological Survey of Finland.
- Sánchez de Medina, F., Romero-Calvo, I., Mascaraque, C., & Martínez-Augustín, O. (2014). Intestinal inflammation and mucosal barrier function. *Inflammatory bowel diseases*, 20(12), 2394-2404.
- Sanchez, C. L., Sims, S. G., Nowery, J. D., & Meares, G. P. (2019). Endoplasmic reticulum stress differentially modulates the IL-6 family of cytokines in murine astrocytes and macrophages. *Scientific reports*, 9(1), 14931.
- Sanchez-Gurmaches, J., Hung, C. M., & Guertin, D. A. (2016). Emerging complexities in adipocyte origins and identity. *Trends in cell biology*, 26(5), 313-326.
- Sarcinelli, C., Dragic, H., Piecyk, M., Barbet, V., Duret, C., Barthelaix, A., ... & Manié, S. N. (2020). ATF4-dependent NRF2 transcriptional regulation promotes antioxidant protection during endoplasmic reticulum stress. *Cancers*, 12(3), 569.
- Schmittgen, T. D., & Livak, K. J. (2008). Analyzing real-time PCR data by the comparative CT method. *Nature protocols*, 3(6), 1101-1108.
- Scinicariello, F., Buser, M. C., Feroe, A. G., & Attanasio, R. (2017). Antimony and sleep-related disorders: NHANES 2005–2008. *Environmental research*, 156, 247-252.
- Scuteri, A., Laurent, S., Cucca, F., Cockcroft, J., Cunha, P. G., Mañas, L. R., ... & Metabolic Syndrome and Arteries Research (MARE) Consortium. (2015). Metabolic syndrome across Europe: different clusters of risk factors. *European journal of preventive cardiology*, 22(4), 486-491.
- Seervi, M., & Xue, D. (2015). Mitochondrial cell death pathways in *Caenorhabditis elegans*. *Current topics in developmental biology*, 114, 43-65.
- Serra, D., Paixão, J., Nunes, C., Dinis, T. C., & Almeida, L. M. (2013). Cyanidin-3-glucoside suppresses cytokine-induced inflammatory response in human intestinal cells: comparison with 5-aminosalicylic acid. *PloS one*, 8(9), e73001.
- Shah, S. A., Khan, M., Jo, M. H., Jo, M. G., Amin, F. U., & Kim, M. O. (2017). Melatonin stimulates the SIRT 1/Nrf2 signaling pathway counteracting lipopolysaccharide (LPS)-induced oxidative stress to rescue postnatal rat brain. *CNS neuroscience & therapeutics*, 23(1), 33-44.
- Shahid, M., Khalid, S., Dumat, C., Pierart, A., & Niazi, N. K. (2019). Biogeochemistry of antimony in soil-plant system: Ecotoxicology and human health. *Applied Geochemistry*, 106, 45-59.

- Shan, C., Ma, Z., & Tong, M. (2014). Efficient removal of trace antimony (III) through adsorption by hematite modified magnetic nanoparticles. *Journal of hazardous materials*, 268, 229-236.
- Shao, M., & Zhu, Y. (2020). Long-term metal exposure changes gut microbiota of residents surrounding a mining and smelting area. *Scientific reports*, 10(1), 4453.
- Shao, W., Liu, Q., He, X., Liu, H., Gu, A., & Jiang, Z. (2017). Association between level of urinary trace heavy metals and obesity among children aged 6–19 years: NHANES 1999–2011. *Environmental Science and Pollution Research*, 24, 11573-11581.
- Sharma, D. K., Singh, Y., & Sharma, J. (2013). Monophenylantimony (III) derivatives of cyclic dithiocarbamates; synthesis, spectroscopic characterization, and antimicrobial study. *Phosphorus, Sulfur, and Silicon and the Related Elements*, 188(9), 1194-1204.
- Shearer, J. J., Figueiredo Neto, M., Umbaugh, C. S., & Figueiredo, M. L. (2017). In vivo exposure to inorganic arsenic alters differentiation-specific gene expression of adipose-derived mesenchymal stem/stromal cells in C57BL/6J mouse model. *Toxicological Sciences*, 157(1), 172-182.
- Siersbæk, R., Nielsen, R., & Mandrup, S. (2010). PPAR γ in adipocyte differentiation and metabolism—novel insights from genome-wide studies. *FEBS letters*, 584(15), 3242-3249.
- Silva, S., Silva, P., Oliveira, H., Gaivão, I., Matos, M., Pinto-Carnide, O., & Santos, C. (2017). Pb low doses induced genotoxicity in *Lactuca sativa* plants. *Plant Physiology and Biochemistry*, 112, 109-116.
- Skolarczyk, J., Pekar, J., Labadz, D., & Skorzynska-Dziduszko, K. (2018). Role of heavy metals in the development of obesity: A review of research. *Journal of Elementology*, 23(4).
- Slifer, Z. M., & Blikslager, A. T. (2020). The integral role of tight junction proteins in the repair of injured intestinal epithelium. *International journal of molecular sciences*, 21(3), 972.
- Smichowski, P. (2008). Antimony in the environment as a global pollutant: a review on analytical methodologies for its determination in atmospheric aerosols. *Talanta*, 75(1), 2-14.
- Smith, A. R., Lin, P. I. D., Rifas-Shiman, S. L., Wright, R. O., Coull, B., Hivert, M. F., ... & Cardenas, A. (2023). Associations of Prenatal First Trimester Essential and Nonessential Metal Mixtures with Body Size and Adiposity in Childhood. *Epidemiology*, 34(1), 80-89.
- Snedeker S. M. (2014a) *Toxicants in Food Packaging and Household Plastics, Molecular and Integrative Toxicology*, Springer-Verlag London
- Snedeker, S. M. (2014b). Antimony in food contact materials and household plastics: Uses, exposure, and health risk considerations. *Toxicants in Food Packaging and Household Plastics: Exposure and Health Risks to Consumers*, 205-230.

- Song, W., Zhang, D., Pan, X., & Lee, D. J. (2013). Complexation of HSA with different forms of antimony (Sb): an application of fluorescence spectroscopy. *Journal of luminescence*, 136, 80-85.
- Song, X., Li, Y., Liu, J., Ji, X., Zhao, L., & Wei, Y. (2017). Changes in serum adiponectin in mice chronically exposed to inorganic arsenic in drinking water. *Biological Trace Element Research*, 179, 140-147.
- Speciale, A., Anwar, S., Canali, R., Chirafisi, J., Saija, A., Virgili, F., & Cimino, F. (2013). Cyanidin-3-O-glucoside counters the response to TNF- α of endothelial cells by activating Nrf2 pathway. *Molecular nutrition & food research*, 57(11), 1979-1987.
- Speciale, A., Anwar, S., Ricciardi, E., Chirafisi, J., Saija, A., & Cimino, F. (2011). Cellular adaptive response to glutathione depletion modulates endothelial dysfunction triggered by TNF- α . *Toxicology letters*, 207(3), 291-297.
- Speciale, A., Canali, R., Chirafisi, J., Saija, A., Virgili, F., & Cimino, F. (2010). Cyanidin-3-O-glucoside protection against TNF- α -induced endothelial dysfunction: involvement of nuclear factor- κ B signaling. *Journal of agricultural and food chemistry*, 58(22), 12048-12054.
- Speciale, A., Cimino, F., Saija, A., Canali, R., & Virgili, F. (2014). Bioavailability and molecular activities of anthocyanins as modulators of endothelial function. *Genes & nutrition*, 9, 1-19.
- Speciale, A., Molonia, M. S., Muscarà, C., Cristani, M., Salamone, F. L., Saija, A., & Cimino, F. (2024). An overview on the cellular mechanisms of anthocyanins in maintaining intestinal integrity and function. *Fitoterapia*, 105953.
- Srisuporn, P., Navasumrit, P., Ngaotepprutaram, T., Chaisatra, K., Hunsonti, P., & Ruchirawat, M. (2023). Arsenic exposure alters the expression of genes related to metabolic diseases in differentiated adipocytes and in newborns and children. *International journal of hygiene and environmental health*, 250, 114124.
- Stahr, S., & Su, J. (2019). Positive association between salivary arsenic concentration and obesity in a pilot study of women living in rural communities in the United States. *Environmental Epidemiology*, 3, 381.
- Statista, 2021. <https://www.statista.com/statistics/264958/antimony-production/>
- Stephens, M., & von der Weid, P. Y. (2020). Lipopolysaccharides modulate intestinal epithelial permeability and inflammation in a species-specific manner. *Gut microbes*, 11(3), 421-432.
- Stojšavljević, A., Sokić-Milutinović, A., Rovčanin, B., Tončev, L., & Manojlović, D. (2022). Profiling of circulatory elements reveals alteration of essential and toxic trace metals in Crohn's disease. *Biological Trace Element Research*, 200(6), 2572-2580.
- Sukprasansap, M., Chanvorachote, P., & Tencomnao, T. (2020). Cyanidin-3-glucoside activates Nrf2-antioxidant response element and protects against glutamate-induced oxidative and endoplasmic reticulum stress in HT22 hippocampal neuronal cells. *BMC complementary medicine and therapies*, 20, 1-12.

- Sun, F., Yan, Y., Liao, H., Bai, Y., Xing, B., & Wu, F. (2014). Biosorption of antimony (V) by freshwater cyanobacteria *Microcystis* from Lake Taihu, China: effects of pH and competitive ions. *Environmental Science and Pollution Research*, 21, 5836-5848.
- Sun, H., Yan, S. C., & Cheng, W. S. (2000). Interaction of antimony tartrate with the tripeptide glutathione: Implication for its mode of action. *European Journal of Biochemistry*, 267(17), 5450-5457.
- Sundar, S., & Chakravarty, J. (2010). Antimony toxicity. *International journal of environmental research and public health*, 7(12), 4267-4277.
- Takanezawa, Y., Kashiwano, Y., Nakamura, R., Ohshiro, Y., Uraguchi, S., & Kiyono, M. (2023). Methylmercury drives lipid droplet formation and adipokine expression during the late stages of adipocyte differentiation in 3T3-L1 cells. *Toxicology*, 486, 153446.
- Tamás, M. J. (2016). Cellular and molecular mechanisms of antimony transport, toxicity and resistance. *Environmental Chemistry*, 13(6), 955-962.
- Tan, J., Li, Y., Hou, D. X., & Wu, S. (2019). The effects and mechanisms of cyanidin-3-glucoside and its phenolic metabolites in maintaining intestinal integrity. *Antioxidants*, 8(10), 479.
- Tandon, P., Wafer, R., & Minchin, J. E. (2018). Adipose morphology and metabolic disease. *Journal of Experimental Biology*, 221(Suppl_1), jeb164970.
- Tang, B. L. (2016). Sirt1 and the mitochondria. *Molecules and cells*, 39(2), 87-95.
- Tang, H., Hassan, M. U., Nawaz, M., Yang, W., Liu, Y., & Yang, B. (2023). A review on sources of soil antimony pollution and recent progress on remediation of antimony polluted soils. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 266, 115583.
- Tao, X., Sun, X., Xu, L., Yin, L., Han, X., Qi, Y., ... & Peng, J. (2016). Total flavonoids from *Rosa laevigata* Michx fruit ameliorates hepatic ischemia/reperfusion injury through inhibition of oxidative stress and inflammation in rats. *Nutrients*, 8(7), 418.
- Tchounwou P, Newsome C, Williams J, Glass K (2008) Copper-induced cytotoxicity and transcriptional activation of stress genes in human liver carcinoma cells. *Metal Ions Biol Med* 10:285–290
- Tchounwou, P. B., Yedjou, C. G., Patlolla, A. K., & Sutton, D. J. (2012). Heavy metal toxicity and the environment. *Molecular, clinical and environmental toxicology: volume 3: environmental toxicology*, 133-164.
- Tellez-Plaza, M., Navas-Acien, A., Menke, A., Crainiceanu, C. M., Pastor-Barriuso, R., & Guallar, E. (2012). Cadmium exposure and all-cause and cardiovascular mortality in the US general population. *Environmental health perspectives*, 120(7), 1017-1022.
- Thompson, C. M., Proctor, D. M., Suh, M., Haws, L. C., Kirman, C. R., & Harris, M. A. (2013). Assessment of the mode of action underlying development of rodent small intestinal tumors following oral exposure to hexavalent chromium and relevance to humans. *Critical reviews in toxicology*, 43(3), 244-274.

- Tian, H. Z., Zhao, D., He, M. C., Wang, Y., & Cheng, K. (2011). Temporal and spatial distribution of atmospheric antimony emission inventories from coal combustion in China. *Environmental Pollution*, 159(6), 1613-1619.
- Tighe, M., Ashley, P., Lockwood, P., & Wilson, S. (2005). Soil, water, and pasture enrichment of antimony and arsenic within a coastal floodplain system. *Science of the Total Environment*, 347(1-3), 175-186.
- Tilg, H., & Moschen, A. R. (2006). Adipocytokines: mediators linking adipose tissue, inflammation and immunity. *Nature reviews immunology*, 6(10), 772-783.
- Tinkov, A. A., Filippini, T., Ajsuvakova, O. P., Aaseth, J., Gluhcheva, Y. G., Ivanova, J. M., ... & Skalny, A. V. (2017). The role of cadmium in obesity and diabetes. *Science of the Total Environment*, 601, 741-755.
- Tinkov, A. A., Gritsenko, V. A., Skalnaya, M. G., Cherkasov, S. V., Aaseth, J., & Skalny, A. V. (2018). Gut as a target for cadmium toxicity. *Environmental Pollution*, 235, 429-434.
- Toxicological Profile for Antimony and Compounds. Atlanta (GA): Agency for Toxic Substances and Disease Registry (US); 2019 Oct. CHAPTER 1, RELEVANCE TO PUBLIC HEALTH
- Trasande, L., & Blumberg, B. (2018). Endocrine disruptors as obesogens. *Pediatric Obesity: Etiology, Pathogenesis and Treatment*, 243-253.
- Trim, W., Thompson, D., & Turner, J. E. (2018). Adipose Tissue Dysfunction. In *Encyclopedia of Behavioral Medicine* (pp. 1-5). Springer.
- Tripathi, D., Kant, S., Pandey, S., & Ehtesham, N. Z. (2020). Resistin in metabolism, inflammation, and disease. *The FEBS journal*, 287(15), 3141-3149.
- Trost, L. B., & Bailin, P. L. (2011). History of Mohs surgery. *Dermatologic clinics*, 29(2), 135.
- Tukur, A., Sharp, L., Stern, B., Tizaoui, C., & Benkreira, H. (2012). PET bottle use patterns and antimony migration into bottled water and soft drinks: the case of British and Nigerian bottles. *Journal of Environmental Monitoring*, 14(4), 1236-1246.
- Turner, A., & Filella, M. (2020). Antimony in paints and enamels of everyday items. *Science of The Total Environment*, 713, 136588.
- Tyrrell, J. B., Hafida, S., Stemmer, P., Adhami, A., & Leff, T. (2017). Lead (Pb) exposure promotes diabetes in obese rodents. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*, 39, 221-226.
- Tzamos, E., Gamaletsos, P. N., Grieco, G., Bussolesi, M., Xenidis, A., Zouboulis, A., ... & Godelitsas, A. (2020). New insights into the mineralogy and geochemistry of Sb Ores from Greece. *Minerals*, 10(3), 236.
- U.S. Environmental Protection Agency (USEPA) (2009) National primary drinking water regulations, EPA 816-F-09-004. United States Environmental Protection Agency. <http://water.epa.gov/drink/contaminants/index.cfm>.
- U.S. Environmental Protection Agency (USEPA) (2012) TSCA workplan chemical risk assessment antimony trioxide CASRN: 1309-64-4 (Draft). United States Environmental Protection Agency, Office of Chemical Safety and Pollution Prevention, December 2012.

- Ungureanu, G., Santos, S., Boaventura, R., & Botelho, C. (2015). Arsenic and antimony in water and wastewater: Overview of removal techniques with special reference to latest advances in adsorption. *Journal of environmental management*, 151, 326-342.
- United States Geological Survey (USGS), 2021. <https://pubs.usgs.gov/periodicals/mcs2021/mcs2021-antimony.pdf>.
- Urgut, O. S., Ozturk, I. I., Banti, C. N., Kourkoumelis, N., Manoli, M., Tasiopoulos, A. J., & Hadjikakou, S. K. (2016). New antimony (III) halide complexes with dithiocarbamate ligands derived from thiuram degradation: The effect of the molecule's close contacts on in vitro cytotoxic activity. *Materials Science and Engineering: C*, 58, 396-408.
- Van Itallie, C. M., & Anderson, J. M. (2014, December). Architecture of tight junctions and principles of molecular composition. In *Seminars in cell & developmental biology* (Vol. 36, pp. 157-165). Academic Press.
- Vanuytsel, T., Tack, J., & Farre, R. (2021). The role of intestinal permeability in gastrointestinal disorders and current methods of evaluation. *Frontiers in Nutrition*, 8, 717925.
- Vásquez, L., Dagert, J. V. S., Scorza, J. V., Vicuña-Fernández, N., de Peña, Y. P., López, S., ... & Pérez, B. (2006). Pharmacokinetics of experimental pentavalent antimony after intramuscular administration in adult volunteers. *Current therapeutic research*, 67(3), 193-203.
- Vázquez, M., Vélez, D., & Devesa, V. (2014). In vitro evaluation of inorganic mercury and methylmercury effects on the intestinal epithelium permeability. *Food and chemical toxicology*, 74, 349-359.
- Verdugo, M., Ruiz Encinar, J., Costa-Fernández, J. M., Menendez-Miranda, M., Bouzas-Ramos, D., Bravo, M., & Quiroz, W. (2017). Study of conformational changes and protein aggregation of bovine serum albumin in presence of Sb (III) and Sb (V). *PLoS One*, 12(2), e0170869.
- Verfaillie, T., Garg, A. D., & Agostinis, P. (2013). Targeting ER stress induced apoptosis and inflammation in cancer. *Cancer letters*, 332(2), 249-264.
- Vermette, D., Hu, P., Canarie, M. F., Funaro, M., Glover, J., & Pierce, R. W. (2018). Tight junction structure, function, and assessment in the critically ill: a systematic review. *Intensive care medicine experimental*, 6, 1-18.
- Vestuto, V., Di Sarno, V., Musella, S., Di Dona, G., Moltedo, O., Gomez-Monterrey, I. M., ... & Ciaglia, T. (2022). New frontiers on ER stress modulation: are TRP channels the leading actors?. *International journal of molecular sciences*, 24(1), 185.
- Vige, M., Yunesian, M., Matsukawa, T., Shamsipour, M., Jeddi, M. Z., Rastkari, N., ... & Yokoyama, K. (2021). Prenatal blood levels of some toxic metals and the risk of spontaneous abortion. *Journal of Environmental Health Science and Engineering*, 19, 357-363.
- Virgolini, M. B., & Aschner, M. (2021). Molecular mechanisms of lead neurotoxicity. In *Advances in neurotoxicology* (Vol. 5, pp. 159-213). Academic Press.

- Vishvanath, L., & Gupta, R. K. (2019). Contribution of adipogenesis to healthy adipose tissue expansion in obesity. *The Journal of clinical investigation*, 129(10), 4022-4031.
- Volis, M. J. (2021). *Dermatology Technique: Mohs Micrographic Surgery*. Mako: NSU Undergraduate Student Journal, 2021(1), 3.
- Wallace, T. C. (2011). Anthocyanins in cardiovascular disease. *Advances in nutrition*, 2(1), 1-7.
- Wang, C., Yuan, Z., Li, J., Liu, Y., Li, R., & Li, S. (2022c). Acute effects of antimony exposure on adult zebrafish (*Danio rerio*): from an oxidative stress and intestinal microbiota perspective. *Fish & Shellfish Immunology*, 123, 1-9.
- Wang, G., DiBari, J., Bind, E., Steffens, A. M., Mukherjee, J., Azuine, R. E., ... & Wang, X. (2019b). Association between maternal exposure to lead, maternal folate status, and intergenerational risk of childhood overweight and obesity. *JAMA Network open*, 2(10), e1912343-e1912343.
- Wang, G., DiBari, J., Bind, E., Steffens, A. M., Mukherjee, J., Bartell, T. R., ... & Wang, X. (2019a). In utero exposure to mercury and childhood overweight or obesity: counteracting effect of maternal folate status. *BMC medicine*, 17, 1-10.
- Wang, L., Wang, B., Gasek, N. S., Zhou, Y., Cohn, R. L., Martin, D. E., ... & Xu, M. (2022b). Targeting p21Cip1 highly expressing cells in adipose tissue alleviates insulin resistance in obesity. *Cell metabolism*, 34(1), 75-89.
- Wang, N., Sheng, Z., Zhou, S., Jiang, F., & Zhang, Z. (2022a). Chronic lead exposure exacerbates hepatic glucolipid metabolism disorder and gut microbiota dysbiosis in high-fat-diet mice. *Food and Chemical Toxicology*, 170, 113451.
- Wang, Q., & Wei, S. (2018). Cadmium affects blood pressure and negatively interacts with obesity: findings from NHANES 1999–2014. *Science of the Total Environment*, 643, 270-276.
- Wang, R., Zhang, L., Chen, Y., Zhang, S., Zhuang, T., Wang, L., ... & Liu, S. (2020a). Elevated non-essential metals and the disordered metabolism of essential metals are associated to abnormal pregnancy with spontaneous abortion. *Environment International*, 144, 106061.
- Wang, T., & He, C. (2018). Pro-inflammatory cytokines: The link between obesity and osteoarthritis. *Cytokine & growth factor reviews*, 44, 38-50.
- Wang, X., & Seed, B. (2003). A PCR primer bank for quantitative gene expression analysis. *Nucleic acids research*, 31(24), e154-e154.
- Wang, X., He, M., Xi, J., & Lu, X. (2011). Antimony distribution and mobility in rivers around the world's largest antimony mine of Xikuangshan, Hunan Province, China. *Microchemical Journal*, 97(1), 4-11.
- Wang, Y. Y., Ji, H. Y., Lu, H. H., Liu, Y. X., Yang, R. Q., He, L. L., & Yang, S. M. (2018). Simultaneous removal of Sb (III) and Cd (II) in water by adsorption onto a MnFe₂O₄-biochar nanocomposite. *RSC advances*, 8(6), 3264-3273.
- Wang, Y., Guo, H., Lyu, X., Zhang, L., Zeren, Y., Zou, S., & Ling, Z. (2019c). Photochemical evolution of continental air masses and their influence on ozone formation over the South China Sea. *Science of the total environment*, 673, 424-434.

- Wang, Y., Wang, K., Han, T., Zhang, P., Chen, X., Wu, W., ... & Zhang, Y. (2020c). Exposure to multiple metals and prevalence for preeclampsia in Taiyuan, China. *Environment International*, 145, 106098.
- Wang, Y., Wang, K., Han, T., Zhang, P., Chen, X., Wu, W., ... & Zhang, Y. (2020b). Exposure to multiple metals and prevalence for preeclampsia in Taiyuan, China. *Environment International*, 145, 106098.
- Wang, Y., Wang, Y., Li, R., Ni, B., Chen, R., Huang, Y., ... & Liu, H. (2024). Low-grade systemic inflammation links heavy metal exposures to mortality: A multi-metal inflammatory index approach. *Science of The Total Environment*, 947, 174537.
- Westerhoff, P., Prapaipong, P., Shock, E., & Hillaireau, A. (2008). Antimony leaching from polyethylene terephthalate (PET) plastic used for bottled drinking water. *Water Research*, 42(3), 551-556.
- WHO. 1996. Trace elements in human nutrition and health. <http://www.who.int/nutrition/publications/micronutrients/9241561734/en/>.
- Wiener, R. C., & Bhandari, R. (2020). Association of electronic cigarette use with lead, cadmium, barium, and antimony body burden: NHANES 2015-2016. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*, 62, 126602.
- Witkowska, D., Słowik, J., & Chilicka, K. (2021). Heavy metals and human health: Possible exposure pathways and the competition for protein binding sites. *Molecules*, 26(19), 6060.
- World Health Organization (WHO) (2003) Antimony in drinking-water, Background document for development of WHO guidelines for drinking-water quality, WHO/SDE/WSH/03.04/74. World Health Organization.
- World Health Organization (WHO) (2011) Guidelines for drinking-water quality, 4th edn, Chapter 12, Chemical fact sheets, Section 12.1 Chemical contaminants in drinking-water, antimony. World Health Organization.
- Wu, C. C., & Chen, Y. C. (2017). Assessment of industrial antimony exposure and immunologic function for workers in Taiwan. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 14(7), 689.
- Wu, C., Li, F., Xu, H., Zeng, W., Yu, R., Wu, X., ... & Li, J. (2019). The potential role of brassinosteroids (BRs) in alleviating antimony (Sb) stress in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiology and Biochemistry*, 141, 51-59.
- Wu, J., Wen, X. W., Faulk, C., Boehnke, K., Zhang, H., Dolinoy, D. C., & Xi, C. (2016). Perinatal lead exposure alters gut microbiota composition and results in sex-specific bodyweight increases in adult mice. *Toxicological Sciences*, 151(2), 324-333.
- Wu, R., Zhang, Q. H., Lu, Y. J., Ren, K., & Yi, G. H. (2015). Involvement of the IRE1 α -XBP1 pathway and XBP1s-dependent transcriptional reprogramming in metabolic diseases. *DNA and cell biology*, 34(1), 6-18.
- Wu, Z., Cheng, J., Guo, X., Ding, C., Jin, X., Ren, Q., ... & Zhao, W. (2018). The processes and mechanism of antimony sequestered by red blood cells and its metabolic conjugation with hemoglobin in rats. *Toxicology*, 408, 46-53.

- Xi, J., He, M., & Wang, P. (2014). Adsorption of antimony on sediments from typical water systems in China: a comparison of Sb (III) and Sb (V) pattern. *Soil and Sediment Contamination: An International Journal*, 23(1), 37-48.
- Xia, S., Zhu, X., Yan, Y., Zhang, T., Chen, G., Lei, D., & Wang, G. (2021). Developmental neurotoxicity of antimony (Sb) in the early life stages of zebrafish. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 218, 112308.
- Xiang, H., Su, W., Wu, X., Chen, W., Cong, W., Yang, S., ... & Chen, B. (2020). Exosomes derived from human urine-derived stem cells inhibit intervertebral disc degeneration by ameliorating endoplasmic reticulum stress. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2020(1), 6697577.
- Xiaojian, L., Xingkang, J., Ming, G., Yousheng, K., Dongliang, P., Ningchen, L., & Sijin, L. (2015). Non-toxic Dose of Antimony Exposure Could Enhance the Intracellular Energy Metabolism and Promote Prostate Cancer Progression. *Asian Journal of Ecotoxicology*, (6), 129-135.
- Xie, S. Z., Liu, B., Ye, H. Y., Li, Q. M., Pan, L. H., Zha, X. Q., ... & Luo, J. P. (2019). Dendrobium huoshanense polysaccharide regionally regulates intestinal mucosal barrier function and intestinal microbiota in mice. *Carbohydrate polymers*, 206, 149-162.
- Xiong, J., Liu, X., Cheng, Q. Y., Xiao, S., Xia, L. X., Yuan, B. F., & Feng, Y. Q. (2017). Heavy metals induce decline of derivatives of 5-methylcytosine in both DNA and RNA of stem cells. *ACS chemical biology*, 12(6), 1636-1643
- Xu, S., Zhou, P., Li, H., Juhasz, A., & Cui, X. (2021). Leaching and in vivo bioavailability of antimony in PET bottled beverages. *Environmental Science & Technology*, 55(22), 15227-15235.
- Yadav, S., Anbalagan, M., Shi, Y., Wang, F., & Wang, H. (2013). Arsenic inhibits the adipogenic differentiation of mesenchymal stem cells by down-regulating peroxisome proliferator-activated receptor gamma and CCAAT enhancer-binding proteins. *Toxicology in Vitro*, 27(1), 211-219.
- Yang, C. Y., Liu, S. H., Su, C. C., Fang, K. M., Yang, T. Y., Liu, J. M., ... & Huang, C. F. (2022). Methylmercury induces mitochondria-and endoplasmic reticulum stress-dependent pancreatic β -cell apoptosis via an oxidative stress-mediated JNK signaling pathway. *International journal of molecular sciences*, 23(5), 2858.
- Yang, X., Shi, Z., & Liu, L. (2015). Adsorption of Sb (III) from aqueous solution by QFGO particles in batch and fixed-bed systems. *Chemical Engineering Journal*, 260, 444-453.
- Ye, L., Qiu, S., Li, X., Jiang, Y., & Jing, C. (2018). Antimony exposure and speciation in human biomarkers near an active mining area in Hunan, China. *Science of the Total Environment*, 640, 1-8.
- Yin, N., Cai, X., Wang, P., Feng, R., Du, H., Fu, Y., ... & Cui, Y. (2022). Predictive capabilities of in vitro colon bioaccessibility for estimating in vivo relative bioavailability of arsenic from contaminated soils: Arsenic speciation and gut microbiota considerations. *Science of the Total Environment*, 818, 151804.

- Yu, L., Yu, Y., Xiao, Y., Tian, F., Narbad, A., Zhai, Q., & Chen, W. (2021). Lead-induced gut injuries and the dietary protective strategies: A review. *Journal of Functional Foods*, 83, 104528.
- Zangi, R., & Filella, M. (2012). Transport routes of metalloids into and out of the cell: a review of the current knowledge. *Chemico-Biological Interactions*, 197(1), 47-57.
- Zeeshan, H. M. A., Lee, G. H., Kim, H. R., & Chae, H. J. (2016). Endoplasmic reticulum stress and associated ROS. *International journal of molecular sciences*, 17(3), 327.
- Zhai, Q., Li, T., Yu, L., Xiao, Y., Feng, S., Wu, J., ... & Chen, W. (2017). Effects of subchronic oral toxic metal exposure on the intestinal microbiota of mice. *Science bulletin*, 62(12), 831-840.
- Zhai, Q., Tian, F., Zhao, J., Zhang, H., Narbad, A., & Chen, W. (2016). Oral administration of probiotics inhibits absorption of the heavy metal cadmium by protecting the intestinal barrier. *Applied and environmental microbiology*, 82(14), 4429-4440.
- Zhai, Q., Wang, J., Cen, S., Zhao, J., Zhang, H., Tian, F., & Chen, W. (2019). Modulation of the gut microbiota by a galactooligosaccharide protects against heavy metal lead accumulation in mice. *Food & Function*, 10(6), 3768-3781.
- Zhang, C., Li, P., Wen, Y., Feng, G., Liu, Y., Zhang, Y., ... & Zhang, Z. (2018). The promotion on cell growth of androgen-dependent prostate cancer by antimony via mimicking androgen activity. *Toxicology letters*, 288, 136-142.
- Zhang, D., Lee, D. J., & Pan, X. (2013). Desorption of Hg (II) and Sb (V) on extracellular polymeric substances: Effects of pH, EDTA, Ca (II) and temperature shocks. *Bioresource technology*, 128, 711-715.
- Zhang, D., Pan, X., & Mu, G. (2010). Antimony pollution in water and soil and its ecotoxicological effects on plants and microorganisms. *Chin. J. Appl. Environ. Biol*, 23, 891-894.
- Zhang, G., Wang, X., Zhang, X., Li, Q., Xu, S., Huang, L., ... & Yang, N. (2019). Antimony in urine during early pregnancy correlates with increased risk of gestational diabetes mellitus: a prospective cohort study. *Environment international*, 123, 164-170.
- Zhang, Q. J., Wang, Z., Chen, H. Z., Zhou, S., Zheng, W., Liu, G., ... & Liang, C. C. (2008). Endothelium-specific overexpression of class III deacetylase SIRT1 decreases atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice. *Cardiovascular research*, 80(2), 191-199.
- Zhang, Q., Li, X., Liu, X., Dong, M., Xiao, J., Wang, J., ... & Zhang, B. (2020). Association between maternal antimony exposure and risk of gestational diabetes mellitus: a birth cohort study. *Chemosphere*, 246, 125732.
- Zhang, S., Jin, Y., Zeng, Z., Liu, Z., & Fu, Z. (2015). Subchronic exposure of mice to cadmium perturbs their hepatic energy metabolism and gut microbiome. *Chemical research in toxicology*, 28(10), 2000-2009.

- Zhang, T., Zheng, Y. D., Man, J. I. A. O., Ye, Z. H. I., Xu, S. Y., Zhu, P. Y., ... & Wu, Q. Y. (2021). Nuclear factor- κ B signaling mediates antimony-induced astrocyte activation. *Biomedical and Environmental Sciences*, 34(1), 29-39.
- Zhang, Y., Yu, H., Gao, P., Chen, J., Yu, C., Zong, C., ... & Wang, X. (2016). The effect of growth hormone on lipid accumulation or maturation in adipocytes. *Cellular Physiology and Biochemistry*, 39(6), 2135-2148.
- Zhao, Y., Su, J. Q., Ye, J., Rensing, C., Tardif, S., Zhu, Y. G., & Brandt, K. K. (2019). AsChip: A High-Throughput qPCR Chip for Comprehensive Profiling of Genes Linked to Microbial Cycling of Arsenic. *Environmental science & technology*, 53(2), 798–807.
- Zhao, Y., Zhou, C., Wu, C., Guo, X., Hu, G., Wu, Q., ... & Liu, P. (2020). Subchronic oral mercury caused intestinal injury and changed gut microbiota in mice. *Science of the Total Environment*, 721, 137639.
- Zhong, G., Wan, F., Lan, J., Jiang, X., Wu, S., Pan, J., ... & Hu, L. (2021). Arsenic exposure induces intestinal barrier damage and consequent activation of gut-liver axis leading to inflammation and pyroptosis of liver in ducks. *Science of the Total Environment*, 788, 147780.
- Zhou S, Deng R, Hursthouse A. (2020b) Risk Assessment of Potentially Toxic Elements Pollution from Mineral Processing Steps at Xikuangshan Antimony Plant, Hunan, China. *Processes*.
- Zhou, F., Yin, G., Gao, Y., Ouyang, L., Liu, S., Jia, Q., ... & Fan, G. (2020a). Insights into cognitive deficits caused by low-dose toxic heavy metal mixtures and their remediation through a postnatal enriched environment in rats. *Journal of hazardous materials*, 388, 122081.
- Zhu, J., Guo, J. Y., Wang, L. Y., Pan, X. L., Fu, Z. Y., Liao, H. Q., & Wu, F. C. (2010). Overview on research on environmentally geochemical characteristics of antimony. *Earth and Environment*, 38(1), 109.
- Zhuang, W., Lai, X., Wang, Q., Liu, Y., Chen, Q., & Liu, C. (2018). Distribution characteristics, sources and ecological risk of antimony in the surface sediments of Changjiang Estuary and the adjacent sea, East China. *Marine pollution bulletin*, 137, 474-480.
- Zihni, C., Mills, C., Matter, K., & Balda, M. S. (2016). Tight junctions: from simple barriers to multifunctional molecular gates. *Nature reviews Molecular cell biology*, 17(9), 564-580.
- Zwick, R. K., Guerrero-Juarez, C. F., Horsley, V., & Plikus, M. V. (2018). Anatomical, physiological, and functional diversity of adipose tissue. *Cell metabolism*, 27(1), 68-83.