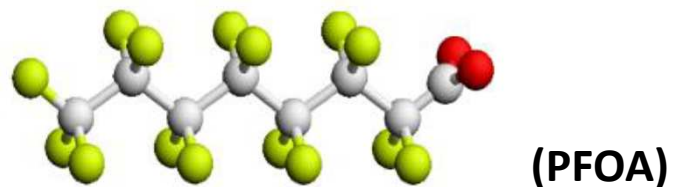




Cancerogenesi dei PFAS negli animali da laboratorio: rilevanza per la valutazione del rischio nell'uomo

Riccardo Crebelli

Dipartimento Ambiente e Salute. Istituto Superiore di Sanità, Roma



attivazione PPAR α
induzione di stress ossidativo
alterazione dei livelli ormonali
della risposta infiammatoria
della risposta immunitaria



alterazioni endocrine e dello sviluppo
tossicità epatica e renale
immunotossicità
tumori in vari siti



alterazioni di fegato e tiroide
ipercolesterolemia
diminuita risposta vaccinale
ipertensione in gravidanza

Tossicità dei PFAS – valori di riferimento (NOAEL)

PFOA	→	tossicità per lo sviluppo: < 1 mg/kg (topo) epatotossicità: 0,3 – 1 mg/kg (topo) immunotossicità: 1-30 mg/kg (topo)
PFOS	→	immunotossicità: 0,1 mg/kg (topo) epatotossicità: 0,5 – 1,25 mg/kg (topo e ratto)
PFBA	→	epatotossicità: 6 mg/kg (ratto) tossicità per lo sviluppo: 35 mg/kg (topo)
PFHxA	→	epatotossicità: 50 mg/kg (ratto)

EFSA Supporting Publication 2014:EN-572

Cancerogenicità sperimentale dei PFAS

PFOA

ratto ♂ : adenomi epatocellulari (2/80 vs 10/76), tumori al pancreas esocrino (*acinar cells*, 0/80 vs 7/76) e testicolo (*Leydig cells* adenoma, 0/50, 2/50, 7/50); promozione della cancerogenesi epatica (0/7 vs 4/12)

PFOS

ratto ♂: adenomi epatocellulari (6/60 vs 0/60);

ratto ♀ : adenomi e carcinomi epatocellulari combinati (7/60 vs 0/60)

PPAR α e tumori epatici da PFOA – possibile *Mode of Action*

eventi chiave (*key events*)

1. attivazione del recettore PPAR α
2. upregulation dell'espressione di specifici set di geni
(proliferazione perossisomi, metabolismo lipidico, ciclo cellulare)
3. proliferazione cellulare
4. selettiva espansione clonale di foci preneoplastici
5. neoplasia epatica

PPAR α e tumori epatici da PFOA – possibile *Mode of Action*

- *pros*: consistenza temporale e in dose risposta tra key events ed effetto finale
- *cons*: alcuni degli effetti sono indotti da PFOA anche in topi knockout per PPAR α , suggerendo il coinvolgimento di altri pathways (p. es via CAR, PXR e estrogen receptors)
- **rilevanza per l'uomo**: probabilmente limitata per la minore affinità del PFOA per il PPAR α umano, ma complessivamente «*human relevance of the liver findings in rodents cannot be excluded*» (IARC 2016)

PFOA e adenomi delle cellule di Leydig: possibili MOA

pathway 1

attivazione di PPAR α nel fegato → aumentata attività aromatasica → aumento estradiolo → aumentata espressione di TGF α (*Transforming Growth Factor α*) → proliferazione selettiva delle LC → aumentata incidenza di tumori

pathway 2

inibizione della produzione di testosterone (inibizione di enzimi della biosintesi del testosterone) → aumentati livelli di ormone luteinizzante → stimolazione compensativa delle LC per la sintesi di testosterone → neoplasia

PFOA e adenomi delle cellule di Leydig:

- *cons*: entrambi gli ipotetici pathways che portano a tumori nelle cellule di Leydig comprendono *key events* solo postulati e/o non adeguatamente supportati dai dati sperimentali
- **rilevanza per l'uomo**: complessivamente la rilevanza dei tumori nelle cellule di Leydig per la stima del rischio cancerogeno per l'uomo non è chiarita, ma non può essere esclusa

PFOA e tumori del pancreas (PATC, *pancreatic acinar cells tumors*): ipotetico MoA

Key events:

1. attivazione di PPAR nel fegato
2. diminuito flusso di bile
3. colestasi
4. aumentati livelli di CCK (cholecystokinin)
5. aumentata proliferazione di acinar cells
6. aumentata incidenza di PACT


PFOA e tumori del pancreas (PATC, *pancreatic acinar cells tumors*): ipotetico MoA

- *cons*: i *key events* (colestasi, *upregulation* di CCK) non sono riprodotti con altri potenti attivatori di PPAR
- **rilevanza per l'uomo**: l'espressione dei recettori di CCK è bassa nell'uomo; i *key events* (colestasi, *alti livelli di CCK*) non sono osservati in soggetti umani esposti a PFOA; la rilevanza per l'uomo dei PATC nel ratto non è chiarita perchè il MoA non è sufficientemente definito

Rilevanza degli effetti cancerogeni del PFOA nell'animale per l'uomo - conclusioni

- Non rilevante (fegato e pancreas) o inconclusiva (cellule di Leydig) (*Klaunig et al., 2012*) *Mode of Action analysis of perfluorooctanoic acid (PFOA) tumorigenicity and Human Relevance. Reproductive Toxicology 33 (2012) 410–8*
- “l'evidenza che i meccanismi associati con la cancerogenesi del PFOA [nell'animale] siano rilevanti per l'uomo è moderata” (*IARC, 2016*)

Cancerogenesi dei PFAS – quale MoA?

- I meccanismi proposti per spiegare gli effetti cancerogeni del PFOA nel ratto sono solo parzialmente delucidati, e di dubbia rilevanza per l'uomo
- È possibile escludere che la genotossicità abbia un ruolo nella cancerogenesi del PFOA?
- I PFAS sono non genotossici in vitro e in vivo  “*there is strong evidence that direct genotoxicity is not a mechanism of PFOA carcinogenicity*” (IARC, 2016)

Meccanismo indiretto di genotossicità dei PFAS: induzione di stress ossidativo

“PFOA alone will not lead to ROS production because of its metabolic stability, but ROS production may result from metabolic perturbation by PFOA” (IARC, 2016)

Possibili meccanismi per la formazione di ROS da PFOA/PFAS:

- Diminuita capacità antiossidante (modulazione dell'espressione genica di geni rilevanti per la protezione dal danno ossidativo)
- Disfunzione dell'attività mitocondriale

Evidenze di danno ossidativo indotto da PFAS

- Aumentati livelli intracellulari di ROS (cellule HepG2)
- Formazione di basi ossidate (8-idrossideossiguanosina, 8OHdG) in vitro (PFOA, cellule HepG2) e in vivo (PFNA, in zebrafish; PFOA, nel fegato di topo e ratto)
- *“overall, the role of PFOA-related oxidative stress in carcinogenicity remains unclear” (IARC, 2016)*

Accordo di collaborazione ISS – Regione Veneto

UO2 (Reparto di Tossicologia Genetica)

- Valutazione degli effetti genotossici indotti in vivo dallo stress ossidativo prodotto dalla esposizione prolungata a PFAS
- Individuazione di biomarcatori di stress ossidativo applicabili nel biomonitoraggio

Disegno sperimentale



Controlli negativi	Trattati	Controlli positivi
Acqua	PFOA 0,1/ 1/5 mg/kg b.w. PFBA 5 mg/kg b.w.	MMS 40 mg./kg b.w

5 settimane

T0, T24, T45 sacrificio 48h

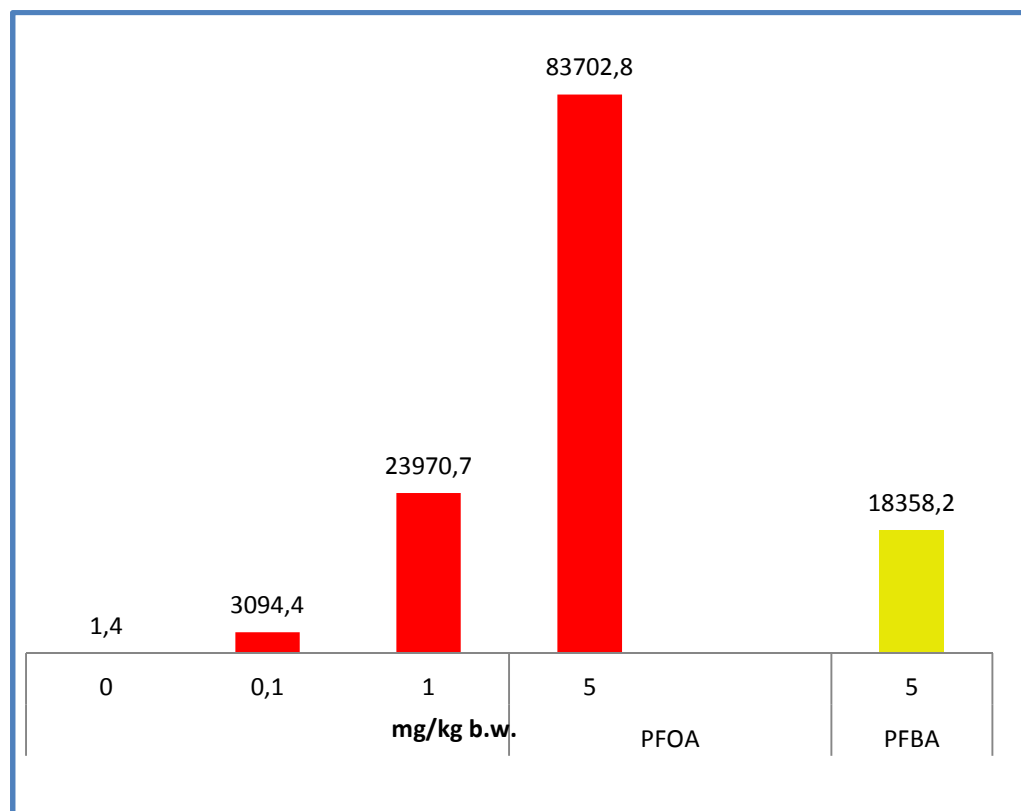


Campioni
fegato, milza, testicoli, epididimo, sangue, siero

Analisi

Livelli sierici PFAS, peso organi, tossicità epatica, danno al DNA, attivazione della risposta al danno al DNA, funzionalità mitocondriale, espressione genica, profilo metabolico

Livelli di PFAS nel siero dopo 5 settimane (ng/g)



fattore bioconcentrazione

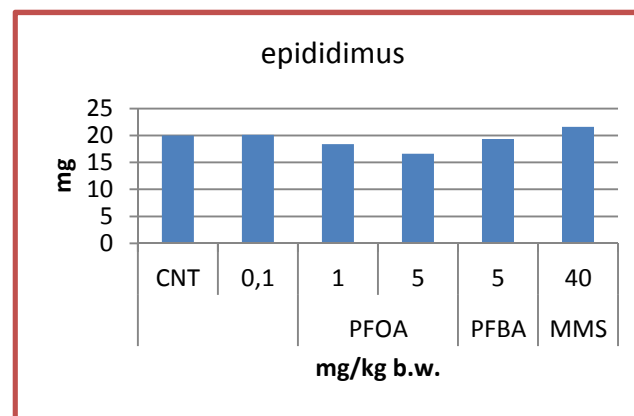
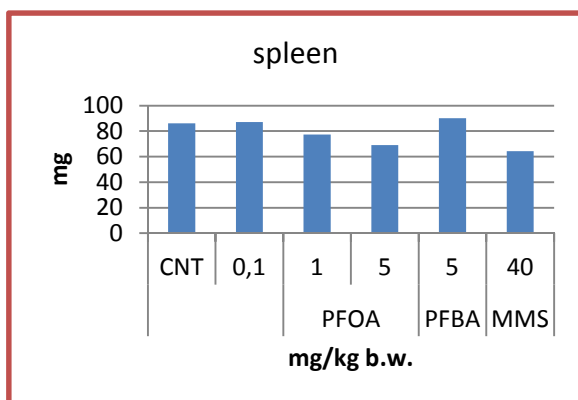
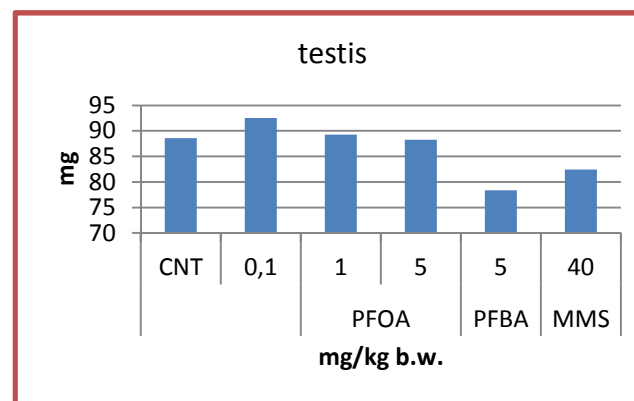
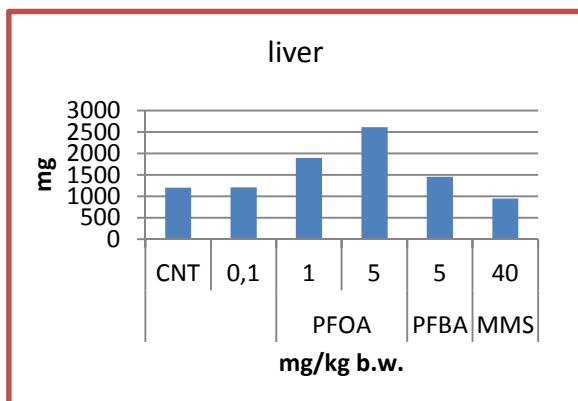
5x

4,4x

2,9x

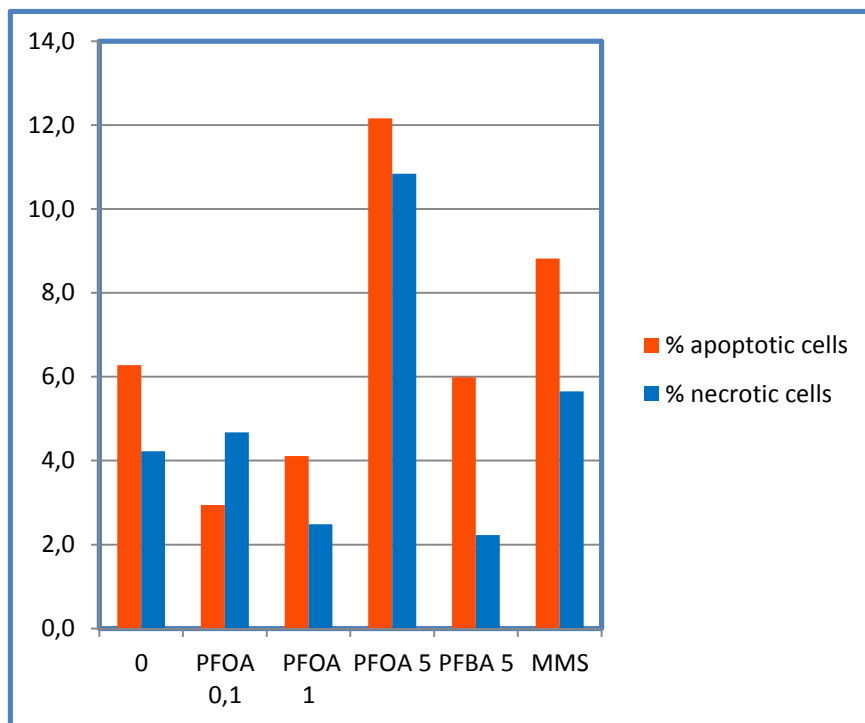
0,6x

Peso degli organi

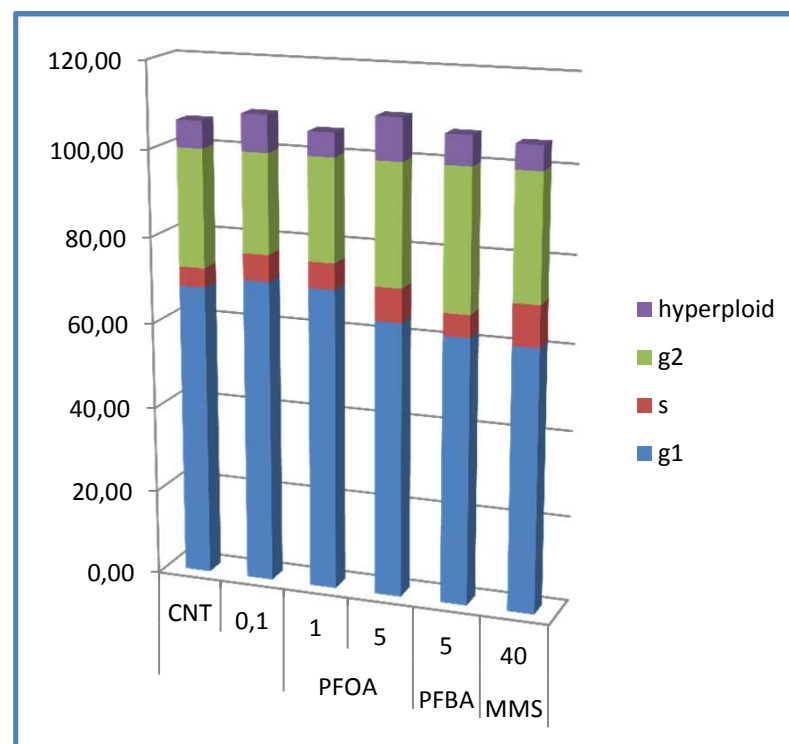


Effetti sulle cellule epatiche

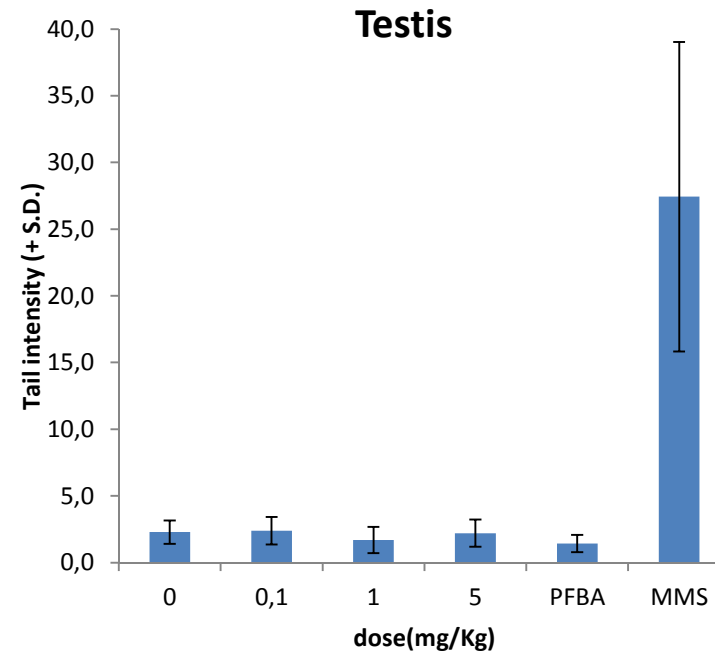
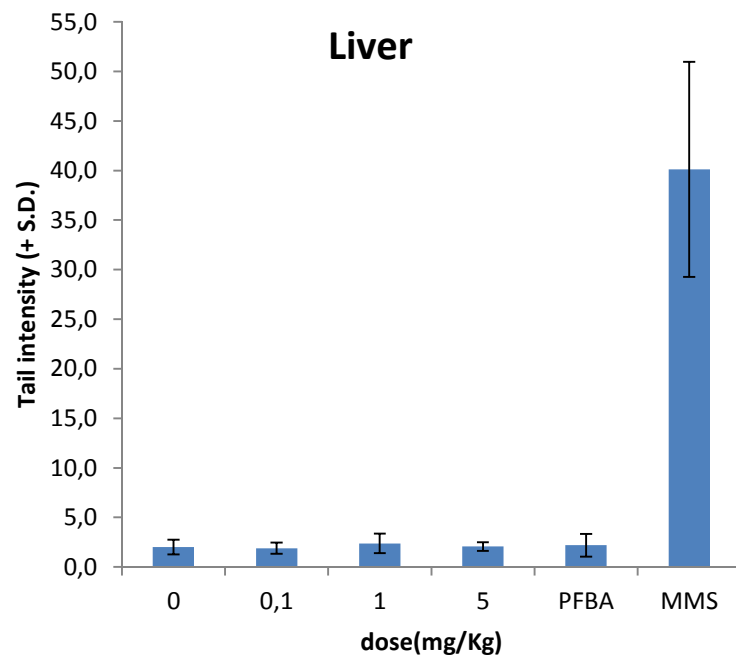
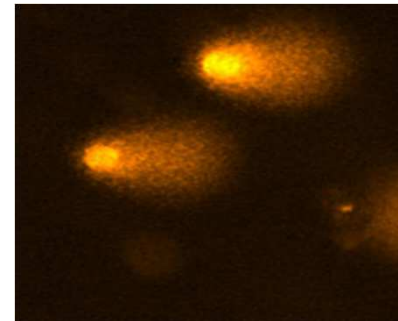
Apoptosi e necrosi



Proliferazione cellulare

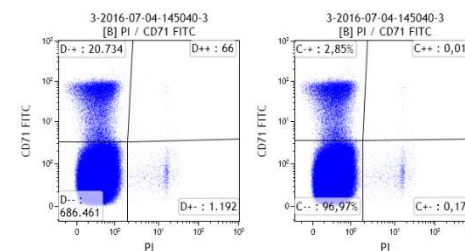
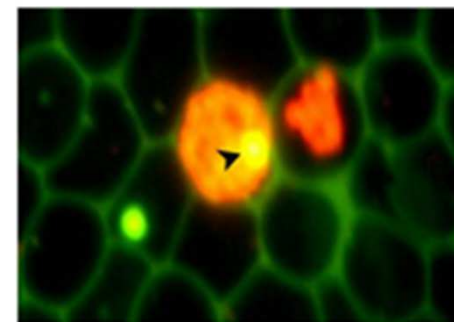
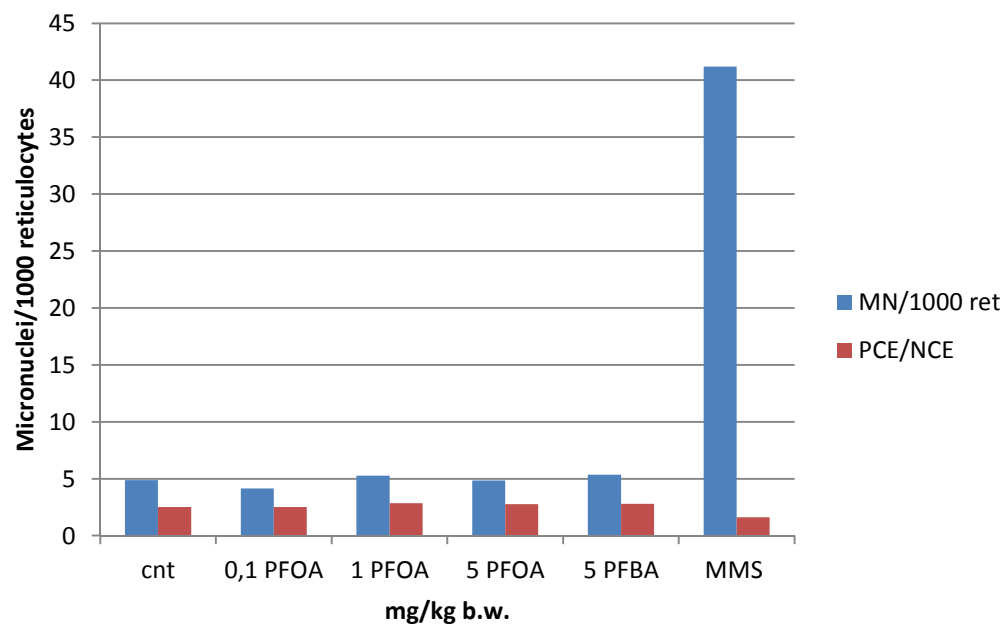


Danno al DNA: Comet assay

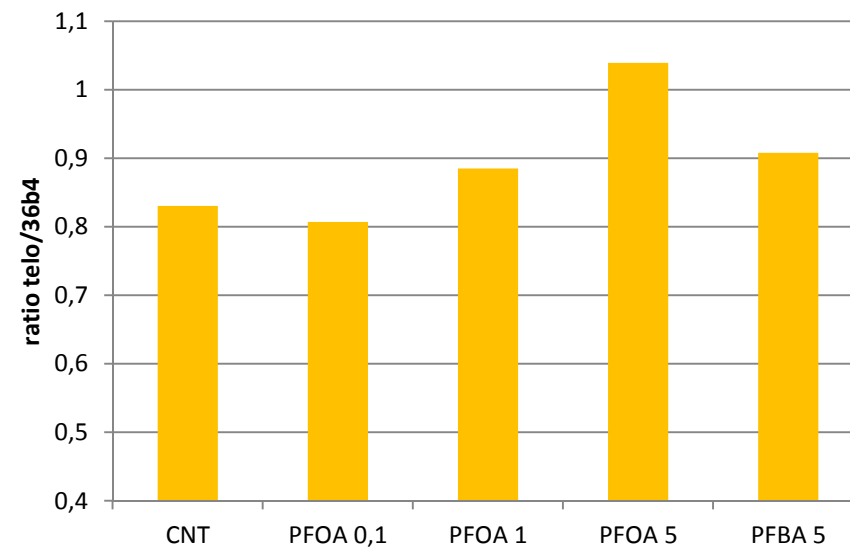
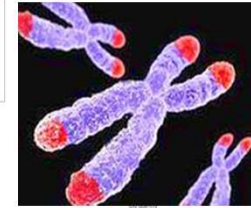
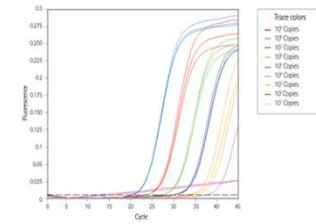


Danno cromosomico: test del micronucleo

reticolociti



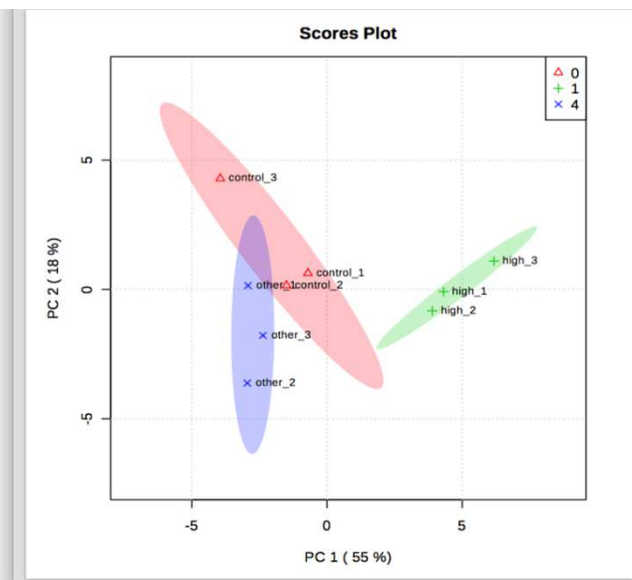
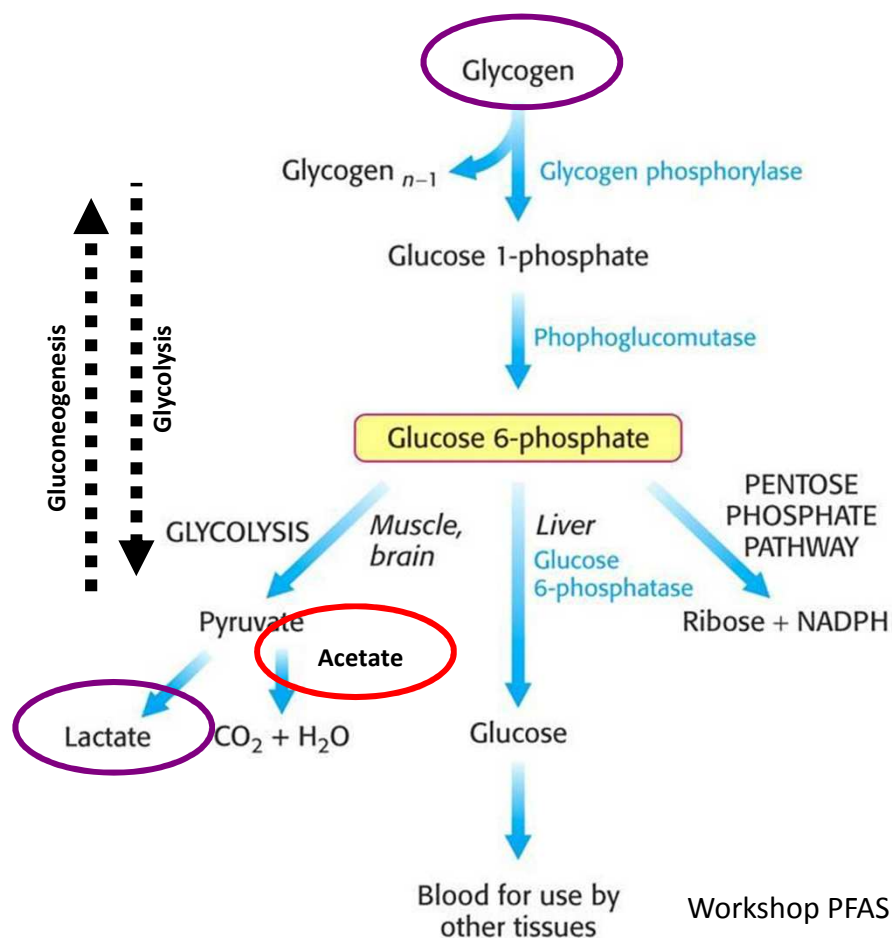
Telomere length



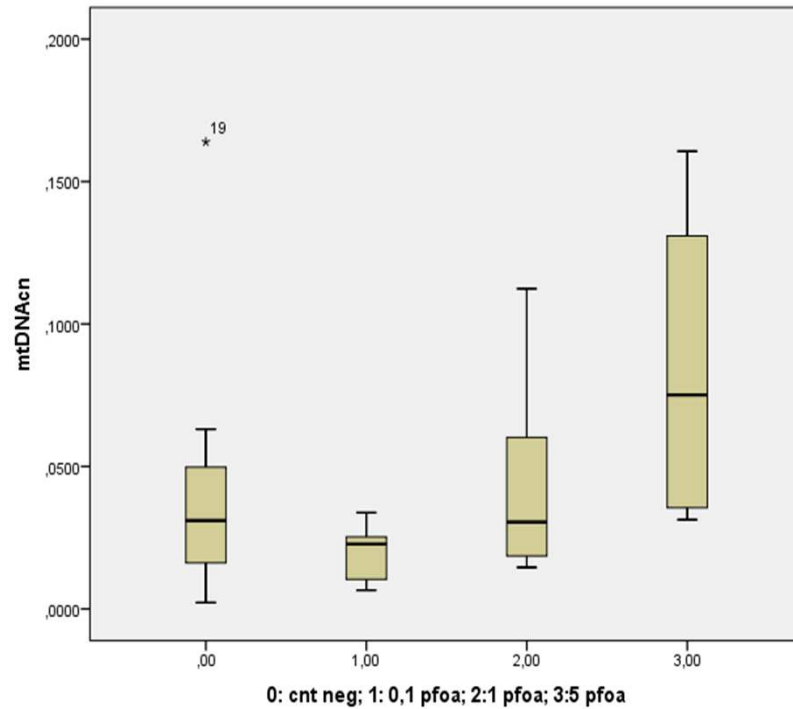
RT-PCR (ratio telo/36B4)	Southern (kb)
0,82	2
1,02	6
1,05	10

Metabolomica

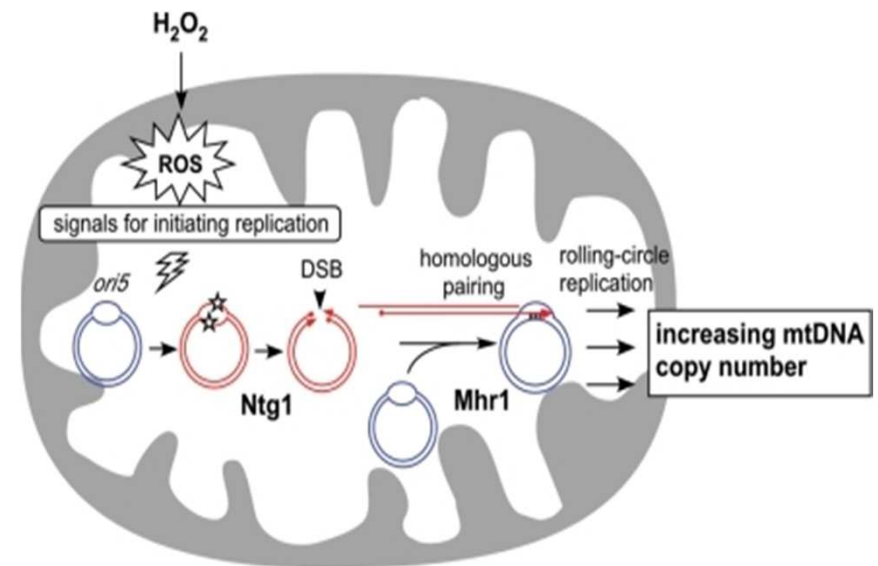
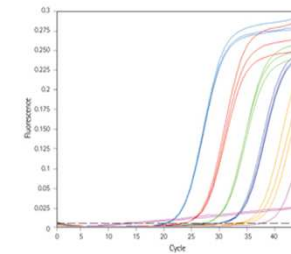
Il profilo metabolico in topi trattati con 5 mg/kg PFOA mostra una drammatica riduzione del glicogeno e del glucosio e un aumento di acetato che indica una alterazione nel metabolismo del glucosio e un deficit nella funzionalità mitocondriale, con inibizione della gluconeogenesi e aumento della glicolisi.



Funzionalità dei mitocondri



mtDNA copy number



I mitocondri bersaglio dei PFAS: possibile MoA

PFAS



Depolarizzazione della membrana mitocondriale



Disaccoppiamento della fosforilazione ossidativa



Aumentata produzione di specie reattive dell'ossigeno



Stimolazione della biogenesi mitocondriale

REVIEW

Mitochondria as a Target of Environmental Toxicants

Joel N. Meyer,^{*,‡} Maxwell C. K. Leung,^{*} John P. Rooney,^{*} Ataman Sandoel,[†] Michael O. Hengartner,[†] Glen E. Kisby,[‡]
and Amanda S. Bess^{*}

^{*}Nicholas School of the Environment, Duke University, Durham, North Carolina; [†]Institute of Molecular Life Sciences, University of Zurich,
Zurich, Switzerland; and [‡]Department of Basic Medical Sciences, Western University of Health Sciences, Lebanon, Oregon

Increased Mitochondrial DNA Copy Number in Occupations Associated with Low-Dose Benzene Exposure

Michele Carugno,¹ Angela Cecilia Pesatori,^{1,2} Laura Dioni,¹ Mirjam Hoxha,¹ Valentina Bollati,¹ Benedetta Albetti,¹
Hyang-Min Byun,³ Matteo Bonzini,⁴ Silvia Fustinoni,² Pierluigi Cocco,⁵ Giannina Satta,⁵ Mariagrazia Zucca,⁵
Domenico Franco Merlo,⁶ Massimo Cipolla,⁶ Pier Alberto Bertazzi,^{1,2} and Andrea Baccarelli³

Environ Health Perspect 120:210–215 (2012).

Airborne particulate matter and mitochondrial damage: a cross-sectional study

Lifang Hou^{1,2*}, Zhong-Zheng Zhu^{3,4}, Xiao Zhang¹, Francesco Nordio^{3,5}, Matteo Bonzini⁶, Joel Schwartz⁷,
Mirjam Hoxha³, Laura Dioni³, Barbara Marinelli³, Valeria Pegoraro³, Pietro Apostoli⁸, Pier Alberto Bertazzi³,
Andrea Baccarelli^{3,7}

Hou et al. *Environmental Health* 2010, 9:48

J Appl Toxicol. 2015 September ; 35(9): 976–991. doi:10.1002/jat.3182.

Integrating mitochondriomics in children's environmental health

Kelly J. Brunst^{a,*}, Andrea A. Baccarelli^b, and Rosalind J. Wright^{a,c}

^aKravis Children's Hospital, Department of Pediatrics, Icahn School of Medicine at Mount Sinai, One Gustave L. Levy Place, New York, NY 10029, USA

^bDepartment of Environmental Health, Laboratory of Environmental Epigenetics, Exposure Epidemiology and Risk Program, Harvard T. H. Chan School of Public Health, 677 Huntington Avenue, Boston, MA 02115, USA

^cMindich Child Health and Development Institute, Icahn School of Medicine at Mount Sinai, 1428 Madison Avenue, New York, NY 10029, USA

Conclusioni

- I mitocondri sono un importante bersaglio di contaminanti ambientali. Nell'uomo un aumentato numero di copie di *mtDNA* è associato alla esposizione ad inquinanti ambientali
- Nel nostro studio l'esposizione a PFOA attraverso l'acqua da bere ha indotto nel topo un aumento nel numero di copie di DNA mitocondriale (*mtDNA*), che indica una stimolazione compensativa della biogenesi mitocondriale, probabilmente secondario alla overproduzione di ROS

Conclusioni

- Ulteriore lavoro sperimentale è in corso per chiarire il meccanismo sottostante l'effetto dei PFAS sulla funzionalità mitocondriale, e per valutare la possibile applicazione del *mtDNA* *cn* come biomarcatore di effetto precoce nel biomonitoraggio umano della esposizione a PFAS

Istituto Superiore di Sanità



L.Conti
E. De Felip
G.De Luca
E. Dellatte
E.Iorio
P.Leopardi
F.Marcon
E.Siniscalchi
R.Crebelli



ENEA Casaccia



Sezione di Tossicologia e Scienze Biomediche

E.Cordelli
P.Eleuteri
G. Lori
P.Villani

Accordo di collaborazione ISS – Regione Veneto su
“Supporto tecnico scientifico, analitico e consultivo per
l’Analisi di rischio correlato alla contaminazione da PFAS di
matrici ambientali e filiera idro-potabile in talune circostanze
territoriali, e potenziale trasferimento di PFAS alla filiera
alimentare e allo studio di biomonitoraggio.”