

Aggiornamento sul profilo tossicologico dei PFAS

Emanuela Testai

Emma Di Consiglio, Riccardo Crebelli

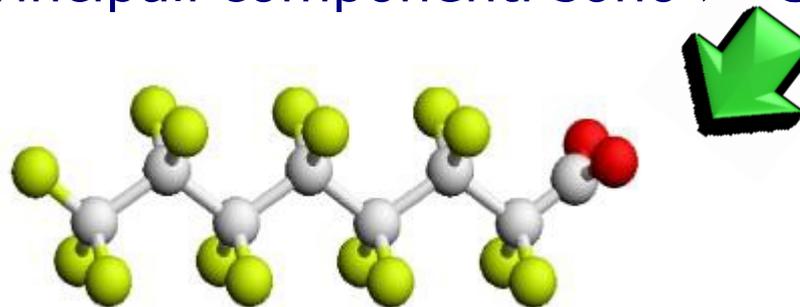
**Istituto Superiore di Sanità
Department of Environment and Primary Prevention
Rome-Italy
*emanuela.testai@iss.it***





Il rapporto con l'ambiente è una delle determinanti fondamentali dello stato di salute della popolazione umana.

L'ambiente può influire sulla salute agendo attraverso la circolazione di **contaminanti chimici** : i protagonisti di questa giornata sono le sostanze perfluoroalchiliche o **PFAS** di cui i principali componenti sono **PFOS** e **PFOA**

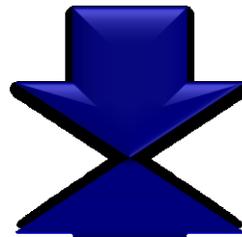


Catena alchilica (4-16 atomi di C) completamente fluorurata e da un gruppo idrofilo.

Acido perfluorooctanoico (PFOA): Usato nel campo dei refrigeranti, tensioattivi e polimeri, farmaci, ritardanti di fiamma, lubrificanti, adesivi, cosmetici ed insetticidi intermedio e come coadiuvante nella sintesi di fluoropolimeri (es: politetrafluoroetilene- PTFE o "Teflon", componente del "Goretex").

Acido perfluorooctansolfonico (PFOS): intermedio chimico nella preparazione di polimeri fluorurati, tensioattivo nelle schiume ignifughe.

- ✓ vasto campo di impiego e **diffusione**
- ✓ **elevata stabilità** – scarsa biodegradabilità, resistenza alle alte temperature, inerzia chimica



Marcata **persistenza nell'ambiente** (contaminanti ubiquitari nel suolo, aria, sedimenti, polveri, biota ed ambienti idrici)

A differenza di altri POP, PFAS sono **idro-solubili** e diffusamente presenti nell'ambiente idrico.

Per caratteristiche chimico-fisiche e cinetiche i PFAS sono: **vP, vB and T** (vale a dire **molto persistenti, molto bioaccumulabili e tossici**).

Il **potenziale di bioaccumulo** è funzione del livello di esposizione e difficilmente può essere ricondotto ad un singolo valore di BAF (*bioaccumulation factor*).

I dati relativi alla proporzionalità tra body-burden ed età sono contrastanti.

Il potenziale di bioaccumulo dei PFAS non è correlato alla ripartizione nella frazione lipidica tissutale e nel tessuto adiposo, ma a

✓ **rapido assorbimento orale**

✓ un **legame rilevante alle proteine** nel plasma e nel fegato, assenza di reazione di biotrasformazione

✓ **eliminazione lenta con riassorbimento a livello renale.**

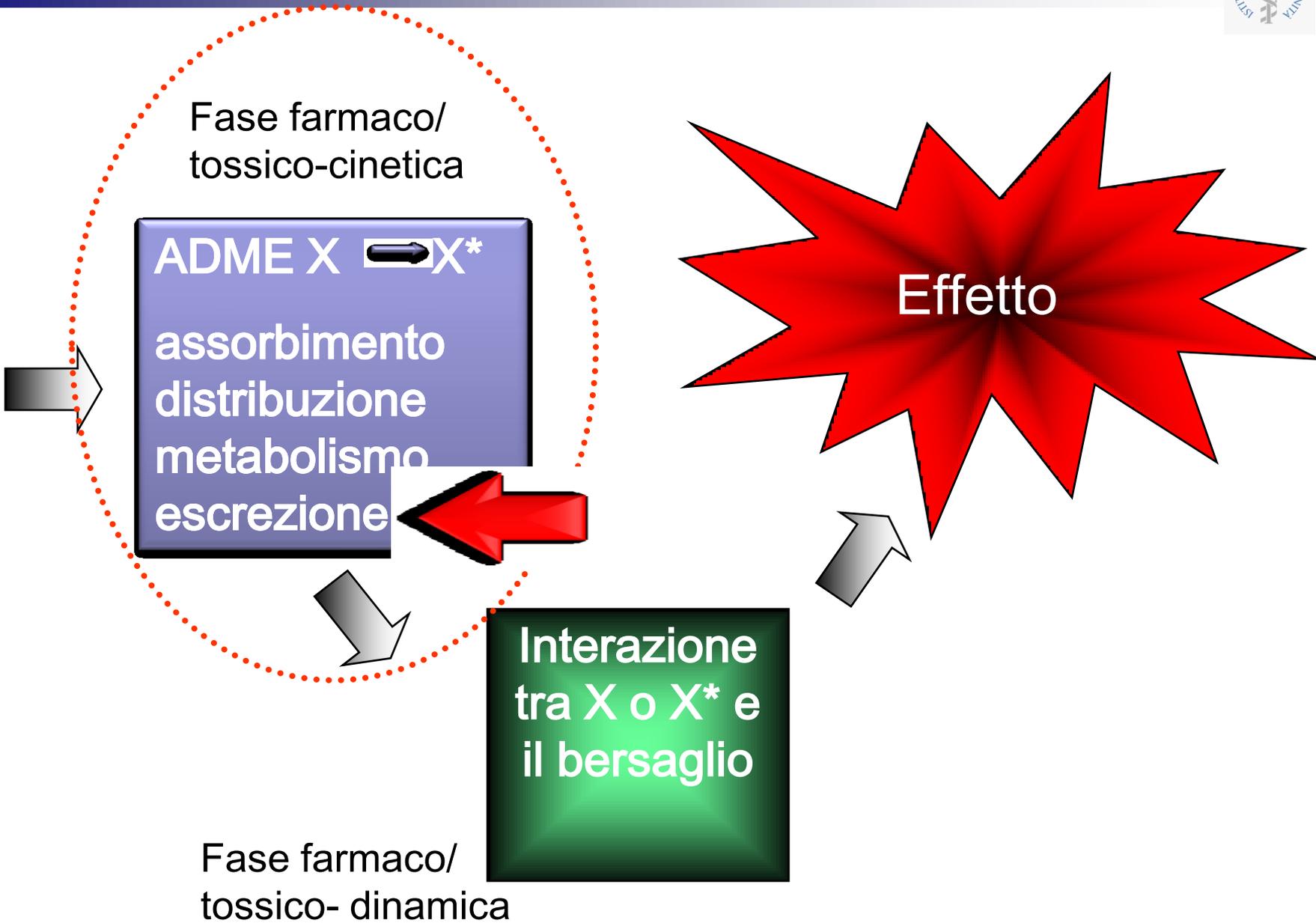
Sono disponibili **studi epidemiologici** in aree in cui l'esposizione è particolarmente elevata: le relazioni causa-effetto e dose-risposta non sono state ancora dimostrate.

Sono disponibili numerosi **studi tossicologici** (subcronici, cronici, di cancerogenesi e di tossicità dello sviluppo e riproduttiva) su diverse specie animali di entrambi i sessi

L'estrapolazione dei dati sperimentali su modelli animali all'uomo è particolarmente difficoltosa :

- ✓ alcuni **meccanismi d'azione** legati alla tossicità dei PFAS negli animali sono specie-specifici ('non rilevanza' per la specie umana accertata o ancora in discussione)
- ✓ significative **differenze tossicocinetiche** osservate tra le specie

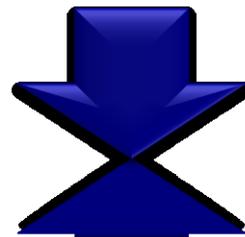
E
s
p
o
s
i
z
i
o
n
e



Tossicocinetica di PFOA e PFOS

- ✓ rapido assorbimento orale *simile in tutte le specie*
 - ✓ assenza di metabolismo *simile in tutte le specie*
 - ✓ alto legame a proteine plasmatiche, accumulo in fegato, reni, plasma *simile in tutte le specie*
- escrezione urinaria **specie specifica** e nel ratto anche **nesso-specifica**

I PFAS sono substrati dei **trasportatori anionici organici (OAT e OATP)** che regolano il riassorbimento attivo a livello renale: sono sotto controllo ormonale e mostrano diversi livelli di espressione tra le specie e i sessi.



Differenze nella emivita dei PFAS tra le specie = differenze di dose interna di esposizione

P
F
O
A

ratto femmina $t_{1/2}$ PFOA = **3 ore**

ratto maschio $t_{1/2}$ = **5 giorni**



topo $t_{1/2}$ = **17-19 giorni**



uomo $t_{1/2}$ = **3.8 anni (media); 1.5–13.5 anni(range).**



Ratto M $t_{1/2}$ PFOS = **43 giorni**



Cynomolgus $t_{1/2}$ = **2.3 anni**



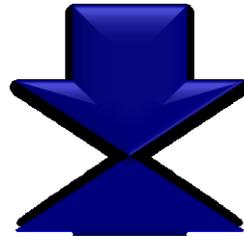
uomo $t_{1/2}$ = **5.4 anni**

P
F
O
S

Studi di tossicità riproduttiva condotti su ratti femmine sono poco rappresentativi per l'estrapolazione all'uomo.

Confronti a dosi diverse di trattamento e in diverse specie dovrebbero essere valutati sulla base della dose interna (*livelli plasmatici*) e non di quella esterna (trattamento/esposizione).

Alle **basse dosi** di esposizione (comparabili alla esposizione ambientale e attraverso la dieta) la **cinetica è lineare**



I livelli nel siero sono proporzionali alla dose di esposizione

A **dosi alte** (esposizione occupazionale) si perde la linearità e i livelli plasmatici non aumentano proporzionalmente alla dose, a causa della **saturazione degli OAT/OATP** responsabili della escrezione e riassorbimento a livello renale

- Genotossicità:** non genotossico.
- P** **Tossicità acuta:** LD₅₀ > 200 mg/kg pc
- F** **Tossicità (sub)cronica:** fegato (**NOAEL 0,06** mg/kg/g-ratto).
- O** **Cancerogenesi:** ratto ♂ adenomi epatocellulari, tumori al pancreas esocrino (*acinar cells*) e testicolo (*Leydig cells*).
- A** **Tossicità riproduttiva/dello sviluppo:** effetti avversi sullo sviluppo del feto (NOAEL < 1 mg/kg pc al giorno).

- Genotossicità:** non genotossico.
- P** **Tossicità acuta:** LD₅₀ > 100 mg/kg pc
- F** **Tossicità (sub)cronica:** fegato (NOAEL 0,4 mg/kg/g-ratto), metabolismo lipidico, ormoni tiroidei (**NOAEL 0,03** mg/kg al giorno in *Cynomolgus*)
- S** **Cancerogenesi:** ratto ♂ adenomi e carcinomi epatocellulari.
- Tossicità riproduttiva e dello sviluppo:** tossicità fetale/neonatale a dosi ≤ tossicità materna (NOAEL 0,1 mg/kg/giorno).

Per entrambi **studi occupazionali sull'uomo** : alterati parametri biochimici (funzionalità epatica, ↑colesterolo, ↑ trigliceridi, ormoni tiroidei); evidenze non conclusive o negative per cancerogenesi

Cancerogenesi dei PFAS

L'azione cancerogena è legata a meccanismi **non genotossici con soglia**

Ratto e topo : tumori in fegato, cellule di Leyding e pancreas.

Fegato: meccanismo mediato dall'attivazione del recettore nucleare PPAR α e conseguente proliferazione dei perossisomi. E' noto che questo meccanismo non è rilevante per l'uomo (espressione del recettore e grado di attivazione molto limitate nel fegato umano)

Cellule di Leydig: tumori biologicamente non rilevanti (incidenze confrontabili con quelle dei controlli storici)

Pancreas: si ipotizza un meccanismo mediato dal PPAR α

L'aumento di incidenza di tumori negli animali da PFOS o PFOA si verifica solo a dosi più alte di quelle che causano gli **effetti tossici non-neoplastici**, utilizzati per definire i valori di riferimento.

Effetto critico = rilevante e indotto dalla dose più bassa

Valore di partenza (*Point of Departure, PoD*):

1. **NOAEL** o No Observed Adverse Effect Level = la dose più alta alla quale non si osservano effetti
2. **BMDL10** vale a dire il valore corrispondente al limite inferiore dell'intervallo di confidenza del 95% della Benchmark Dose, definita come la dose in grado di causare il 10% dell'effetto critico.

Fattori di incertezza (UF) per coprire differenze di specie (10) e differenze intraspecifiche (10), qualità del dato, gravità degli effetti...

$$\text{TDI} = \frac{\text{NOAEL o BMDL}}{\text{UF}}$$

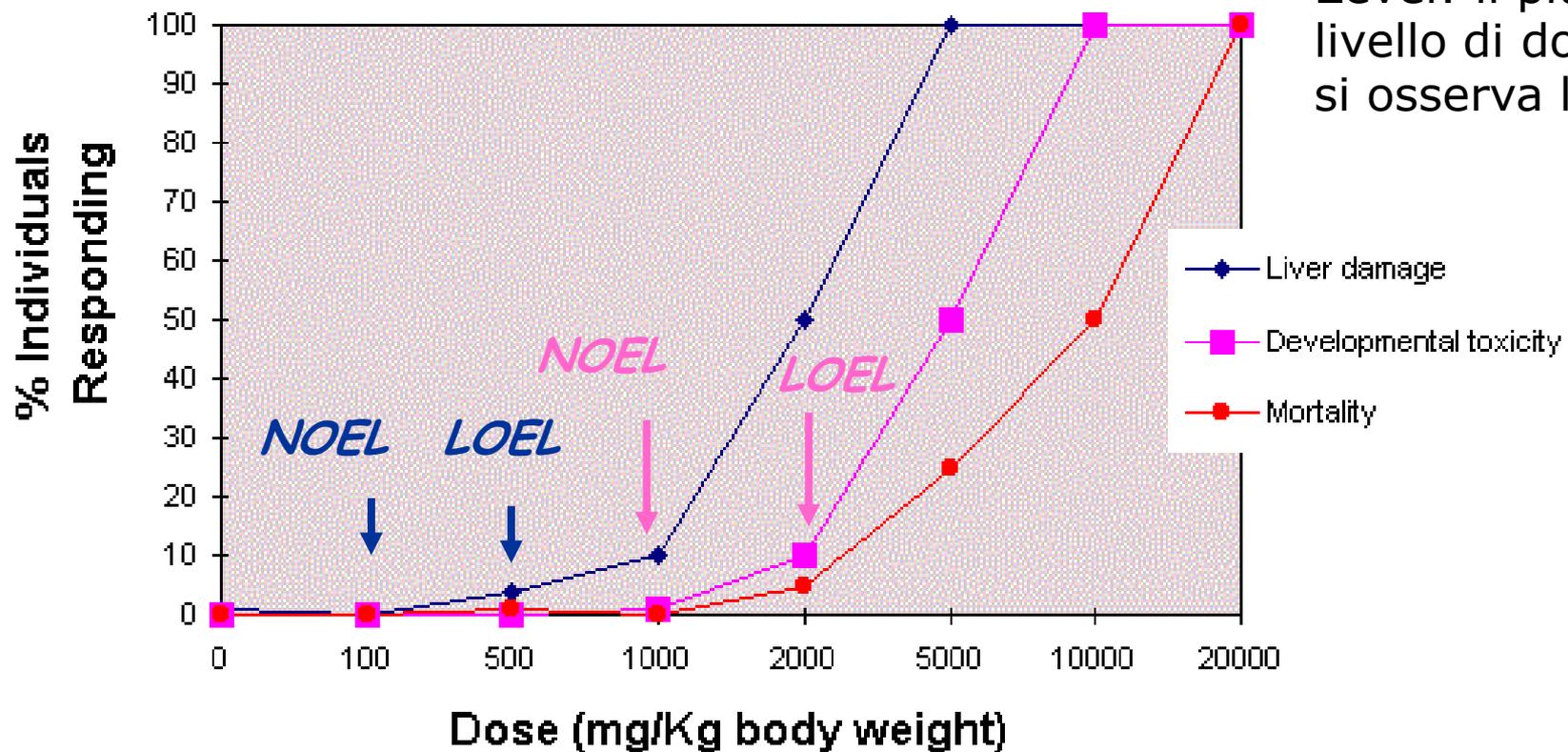
ADI = TDI = DNEL_{cronico} (derived no effect level)

Le curve dose-risposta variano con l'effetto tossico osservato
⇒ anche le dosi soglia variano.

NO(A)EL - **No** Observed **E**ffect **L**evel: il più alto livello di dose a cui non si osservano effetti.

LO(A)EL - **L**owest **O**bserved **A**dverse **E**ffect **L**evel: il più basso livello di dose a cui si osserva l'effetto

Dose/Response Curve for Non-Carcinogen



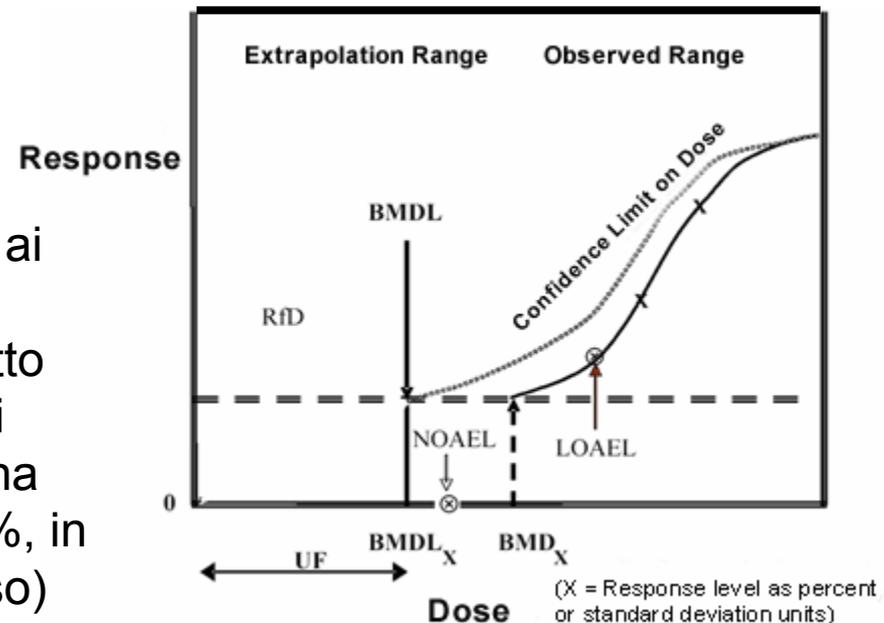
La Benchmark Dose

1. Si elabora la curva dose risposta in base ai dati ai dati sperimentali.
2. Si estrapola la dose associata ad un effetto in una determinata percentuale di animali (es: 1, 5 o 10%) o ad un effetto pari ad una % dell'effetto massimo (es: 0.1, 1, 5, 10%, in dipendenza della gravità dell'effetto stesso) = **BMD** o **Benchmark dose**

3. Si calcola l'intervallo di confidenza della BMD : il limite inferiore dell'intervallo di confidenza è la **BMDL** ed è il **PoD (Point of Departure)** che di solito si utilizza per la valutazione.
4. La BMDL viene divisa per gli AF ritenuti necessari (come per il NOAEL)

Vantaggi rispetto al NOAEL:

- ✓ Minore dipendenza dal disegno sperimentale
- ✓ Si utilizza l'intera curva dose risposta (tenendo conto anche della pendenza)
- ✓ Si include una misura della variabilità (biologica e sperimentale)





Definizione TDI di PFOA



Effetto critico: aumento del peso del fegato nel ratto (effetto precoce seguito da alterazioni biochimiche e istopatologiche)

PoD: BMDL₁₀: 0,3-0,7 mg/kg pc/die (utilizzato valore più basso)

UF: 200 (100x *default* inter-intraspecie; 2xcinetica dose interna);

TDI: 0,3 mg/kg : 200 = **1,5 µg/kg pc/die**

US EPA (EPA, 2009):

PoD = BMDL10 pari a 0.46 mg/kg pc/giorno, derivata da uno studio di tossicità riproduttiva nel topo con aumento del peso del fegato nelle madri al termine della gravidanza



Definizione di TDI per PFOS



Effetto critico: alterazioni ormonali e biochimiche nel macaco *Cynomolgus monkey* (livelli ridotti di lipoproteine HDL nel plasma, ormoni tiroidei in studio di tossicità subcronica);

PoD: NOAEL= 0,03 mg/kg pc/die

UF: 200 (100x *default* inter-intraspecie; 2x durata dello studio);

TDI: $0,03 \text{ mg/kg} : 200 = 150 \text{ ng/kg pc/die}$

EPA ha utilizzato lo stesso PoD

	PFOA	PFOS
EFSA (TDI)	1.5 µg/kg pc/giorno	150 ng/kg pc/giorno
US EPA (TDI)	0.2 µg/kg pc/giorno	80 ng/kg pc/giorno

PoD sostanzialmente gli stessi  TDI proposte da EFSA e EPA diverse

EFSA ha applicato per entrambi i composti un *assessment factor* di 200.

EPA ha applicato per entrambi i PFAS un *extrapolation factor* per le differenze cinetiche, estrapolato dal rapporto tra emivita nell'uomo e nell'animale, pari a 81 per il PFOA e 13 per il PFOS

Il Comitato di Tossicologia (COT-2009) inglese ha criticato l'approccio EPA (troppe assunzioni non supportate da dati-base non solida) e supportato l'approccio EFSA

Nuovi dati successivi ai pareri *EFSA* (2008) ed *EPA* (2009)

Studi sulla **tossicità dello sviluppo del PFOA** nel topo con esposizioni nel periodo pre- e perinatale (PFOA come interferente endocrino?) a **dosi minori** di quelle utilizzate da EFSA ed EPA come *Point of Departure*

1° gruppo:

Studi (incluso uno **studio a 3 generazioni**- *Macon et al, 2011*) con trattamenti *in utero* +lattazione in topi CD-1

effetti sullo **sviluppo della ghiandola mammaria** (*White et al, 2007 e 2009; Macon et al, 2011; White et al, 2011; Dixon et al, 2012*), e apparato riproduttore

Gli autori degli studi sono tutti dello stesso gruppo di ricerca

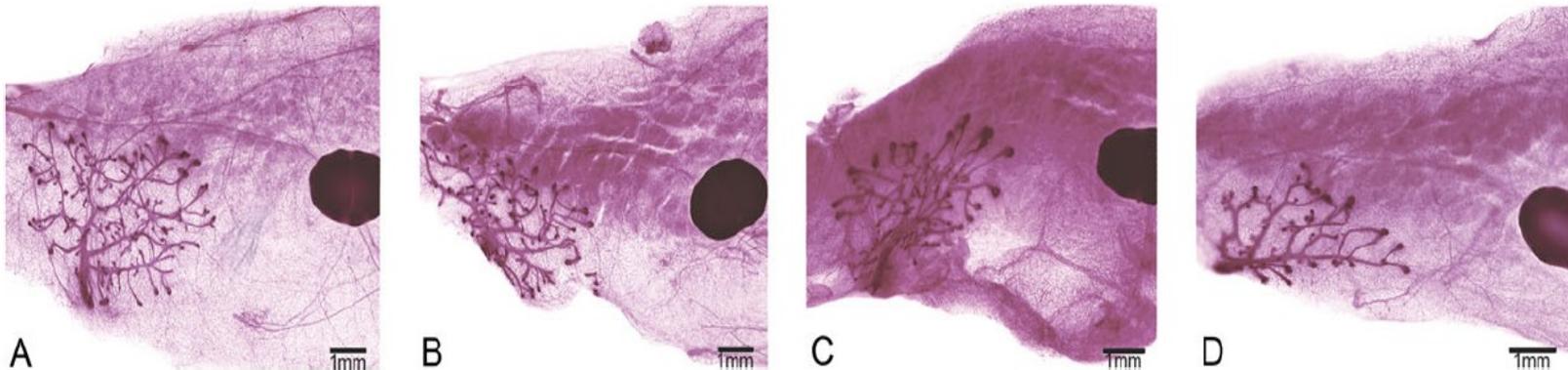
Macon et al (2011)

- ✓ trattamento per l'intera gestazione di tipo CD-1 con 0.3, 1.0, 3.0 mg/kg pc/giorno
- ✓ trattamento solo nella parte finale della gestazione con 0.01, 0.1, 1 mg/kg pc/giorno.
- ✓ inibizione dello sviluppo della ghiandola mammaria anche alla dose più bassa di PFOA saggiata (0.01 mg/kg pc/giorno). **Nessuna dose-dipendenza.**
- ✓ Non è possibile identificare un *NOAEL*

Dixon et al (2012)

- ✓ simile disegno sperimentale su topi CD-1
- ✓ differenze tra controlli e trattati per effetti di PFOA su utero, cervice e vagina definite '**minimali**' dagli Autori e **non correlate alle dosi**
- ✓ Altro effetto osservato in questi studi: **aumento** transiente (e quindi reversibile) del **peso del fegato**, con *NOAEL* = 0.1 mg/kg pc, compatibile con i PoD considerati da EFSA e EPA.

- ✓ Questi studi di tossicità per lo sviluppo presentano alcuni **problemi metodologici** nel disegno sperimentale e nell'**analisi statistica** dei risultati, che ne **limitano la validità**.
- ✓ Non è chiara la **rilevanza biologica** e il **significato tossicologico** degli effetti osservati **per l'uomo**,
- ✓ Non è chiara la **plausibilità** dell'ipotetico meccanismo responsabile dell'effetto di basse dosi di PFOA nei topi CD-1.
- ✓ I topi CD-1 mostrano una **suscettibilità elevata** agli effetti di PFOA.



I risultati riportati negli studi su topi CD-1 non sono **mai stati replicati** in studi condotti su **altri ceppi di topo**

Yang et al 2009; Zhao et al, 2012: topi Balb/c e C57Bl/6 immaturi: non si osservano effetti sullo sviluppo della **ghiandola mammaria** fino alla dose di **1 mg/kg pc**.

L'effetto del PFOA sullo sviluppo della ghiandola mammaria è totalmente soppresso in topi knock-out per i recettori PPAR- α , anche a dosi elevate (5 e 7.5 mg/kg pc), indicando che **l'effetto è mediato dai recettori PPAR- α \Rightarrow scarsa rilevanza per l'uomo**

Gli effetti del PFOA sulla ghiandola mammaria sono antagonizzati dalla co-somministrazione di estradiolo e progesterone. Ciò suggerisce che gli **effetti** del PFOA sulla ghiandola mammaria siano **secondari alla inibizione a livello ovarico della biosintesi ormonale**, indotta da **alte dosi di PFOA**.

Studi epidemiologici

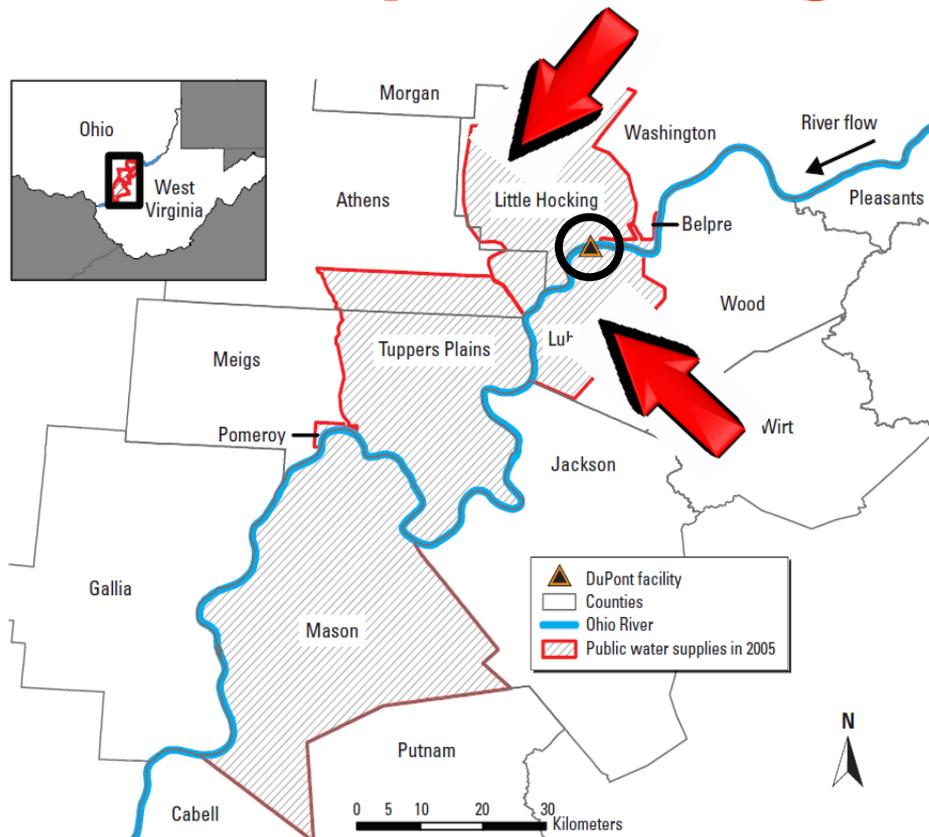


Figure 1. Study area of 13 counties encompassing six contaminated water districts.

La popolazione del Progetto Salute C8 è una **comunità della Mid-Ohio Valley** (USA) fortemente esposta a PFOA attraverso l'acqua potabile contaminata, ma non solo....(esposizione occupazionale e consumo di prodotti locali con la dieta)

Livelli di PFOA nel siero della popolazione USA :4-5 ng/mL

Livelli di PFOA nel siero della popolazione C8 : 83 ng/mL
(mediana= 28.2).

TABLE 3. PFOA Levels in Drinking Water and Serum in Communities in Ohio and West Virginia

water district	PFOA levels reported by water district ($\mu\text{g/L}$) (32)	median serum PFOA level ($\mu\text{g/L}$) (33)
Little Hocking, OH	1.7–4.3	224
Lubeck, WV	0.4–3.9	70
Tuppers Plains, OH	0.25–0.37	35
City of Belpre, OH	0.08–0.13	37
Mason County, WV	0.06–0.1	12
Village of Pomeroy, OH	0.06–0.07	12

Variabili rilevanti: **residenza** attuale/pregressa nei distretti idrici contaminati; **occupazione** attuale (mediana, 147.8) e pregressa nell'industria chimica.

Il livello serico di PFOA è più alto per gli **uomini**, tra coloro che consumano **verdure locali**, tra i **più giovani e i più anziani**

I vari studi hanno prodotto prodotto una **valutazione di “probabilità di associazione”** (non ancora relazione causa effetto) tra esposizione al PFOA attraverso le acque potabili ed effetti sulla salute nella comunità del Mid-Ohio

Esclusa l'associazione per una serie di patologie, e possibilità di un rischio aumentato per:

- ✓ ipercolesterolemia e ipertensione nella gravidanza
- ✓ patologie tiroidee
- ✓ colite ulcerosa
- ✓ tumori del testicolo e del rene (nei professionalmente esposti).

...our results suggest that higher PFOA serum levels may be associated with increased cancer...

... findings must be interpreted with caution...

Riassumendo....

Effetti cancerogeni dei PFAS osservati nei roditori hanno scarsa rilevanza per l'uomo e dipendono da meccanismi di tipo non genotossico (presenza di una **soglia**). I tumori si osservano a dosi superiori a quelle a cui compaiono gli effetti non neoplastici (epatomegalia ed alterazioni di parametri ematici) utilizzati come *PoD* dalle valutazioni EFSA ed EPA, e quindi non possono essere considerati effetti critici per il *risk assessment*.

Tossicità per lo sviluppo (PFOA):

1. Esposizione peripuberale di topi Balb/c e C57Bl/6 \Rightarrow effetti sulla funzionalità/sviluppo di ovaie e ghiandola mammaria a **dosi > 1 mg/kg**, con meccanismo indiretto (sopra il PoD)
2. Esposizione nel periodo pre- e perinatale di topi CD-1 \Rightarrow inibizione dello sviluppo della ghiandola mammaria e obesità, con un possibile **LOAEL di 0.01 mg/kg pc/giorno**.

- ✓ Interpretazione problematica della **significatività** e **rilevanza biologica** degli effetti osservati nel topo CD-1 per una eventuale patologia umana.
- ✓ Le spiccate **differenze tossicocinetiche** interspecifiche invitano alla prudenza nella interpretazione dei risultati degli studi di tossicologia sperimentale nella definizione del rischio per l'uomo posto dai PFAS
- ✓ I risultati di tali studi non rappresentano un *PoD* **adeguatamente robusto** per la caratterizzazione del pericolo e la definizione di dosi tollerabili per l'uomo.

I **dati epidemiologici** non permettono al momento di derivare valori di riferimento e si riferiscono a popolazioni esposte a dosi molto alte.

Conclusioni

Sulla base delle conoscenze attuali il TDI proposto dall'EFSA costituisce un riferimento pragmaticamente utile e scientificamente valido

Superamento della TDI

Permanente: potrebbe rappresentare un rischio significativo (dipende dai livelli di superamento e dai fattori di incertezza nel calcolo della TDI-che è comunque generalmente calcolata con approccio conservativo) ed è opportuno intervenire sulla fonte per ridurre l'esposizione.

Sporadico: non rappresenta necessariamente un rischio significativo ; necessità del giudizio di un esperto tossicologo, eventuali interventi sulla fonte.

La continua produzione di nuove evidenze scientifiche suggerisce l'opportunità di una periodica rivalutazione della tossicità dei PFAS

Guardando al futuro....

Studi su animali indicano che le differenze cinetiche sono dovute a differenze nell'escrezione/riassorbimento.

Il polimorfismo* degli OAT/OATP nella specie umana può dar conto delle differenze interindividuali: range stimato di emivita **1.5–13.5 anni** (scarse informazioni relative ai PFAS)

Possibile studiare la presenza dei polimorfismi con studi di genotipizzazione della popolazione

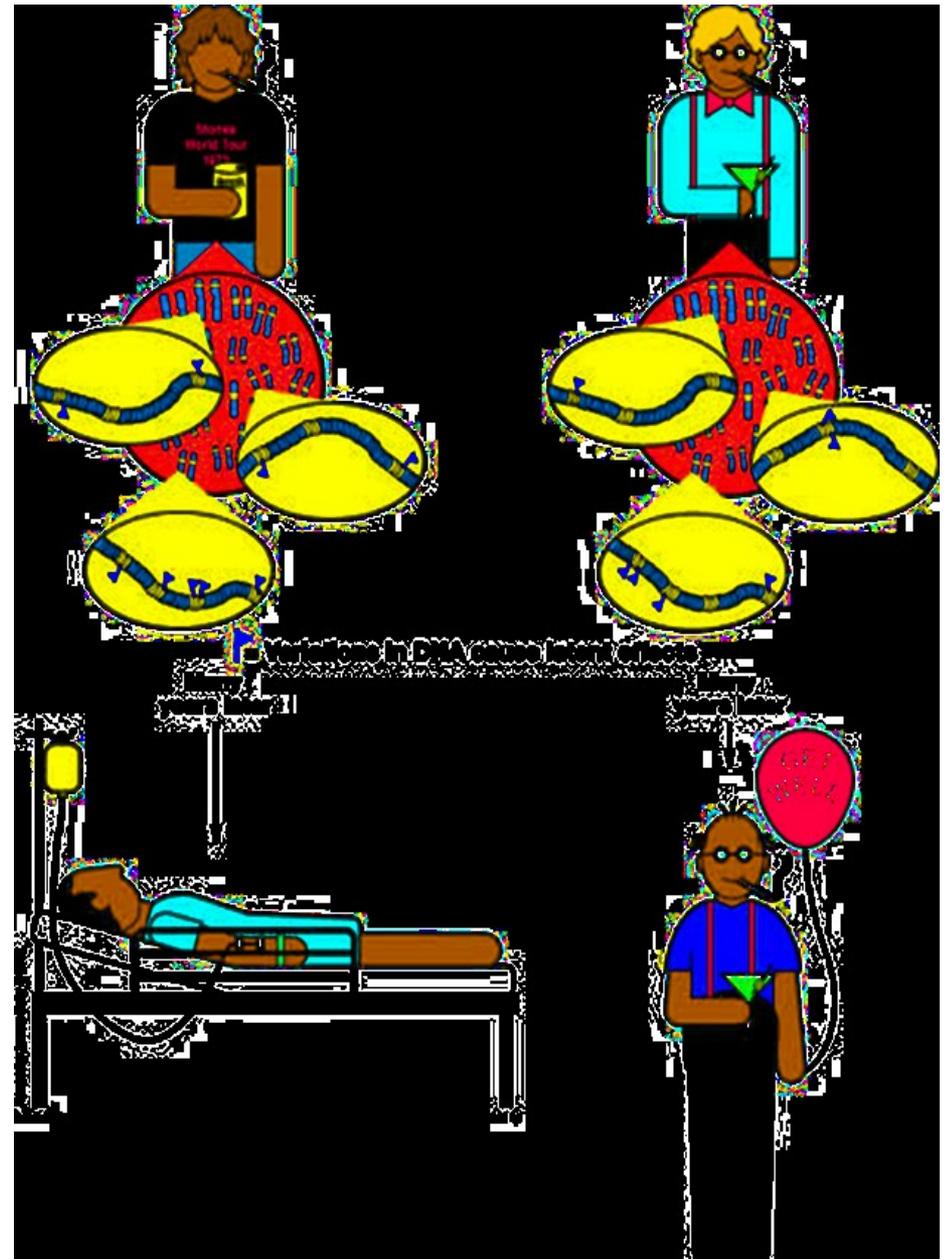
- 1) Saranno identificati opportuni biomarcatori di suscettibilità
- 2) Differenze individuali significative nei livelli di PFOS/PFOA identificati nello studio di biomonitoraggio (dr. De Felip) o '*outliers*' potranno essere verificate per tali biomarcatori in modo da escludere/considerare altre fonti di esposizione ignote.

Questo configura uno **studio di interazione gene-ambiente.**

* è un carattere ereditabile stabile con frequenza nella popolazione > 1%

Interazione gene-ambiente

- Studi molecolari indicano che esiste una **variabilità** genetica **individuale** che conferisce una diversa suscettibilità alle malattie.
- Un individuo può essere a maggior rischio per caratteristiche genetiche
- Nella maggioranza dei casi le differenze sono relative alla **cinetica** della sostanza che ne determina la **dose interna**



Grazie!