

SALUTE E SOSTANZE PERFLUOROALCHILICHE

LA VALUTAZIONE DEL RISCHIO PER LA SALUTE UMANA DELLA CONTAMINAZIONE DA PFAS DEL VENETO È STATA ESEGUITA TRAMITE DUE STUDI SPERIMENTALI. LO STUDIO IN SILICO HA EFFICACEMENTE PREDETTO LE CONCENTRAZIONI SIERICHE DI PFAS, MENTRE LO STUDIO IN VITRO HA INDAGATO GLI EFFETTI POTENZIALI SULLA SALUTE UMANA.

Per sostanze perfluoroalchiliche (Pfas) si intende una classe di sostanze aventi catene carboniose, più o meno lunghe, totalmente fluorurate, che garantiscono ai Pfas un'elevata capacità tensioattiva, alta stabilità termica, chimica e biochimica, motivo per cui sono stati utilizzati massivamente dalle industrie per produrre oggetti da cucina, tessuti, contenitori per alimenti e schiume antincendio. Questo ampio utilizzo, unito alla loro capacità bioaccumulante e persistente, ha portato alla contaminazione di tutte le matrici ambientali facendo entrare i Pfas nella catena alimentare. La contaminazione da Pfas è *widespread* e l'esposizione all'uomo è multipla e cronica, con principale via di contaminazione il consumo di acqua potabile e pesce.

La letteratura mostra un quadro non armonico, ma l'Efsa ha individuato alcuni effetti avversi principali derivati dall'esposizione a Pfos (acido perfluorottano sulfonico) e Pfoa (acido perfluorottanoico) tramite ingestione, in modelli animali e sull'uomo, meritevoli di ulteriori approfondimenti: il diminuito peso alla nascita, l'aumento di colesterolo ematico, danni epatici e l'immunotossicità. Per quanto riguarda la cancerogenesi in letteratura si trovano studi che avvalorano tesi opposte, poiché l'utilizzo di modelli animali non è propriamente adatto allo studio di queste sostanze.

In seguito alla contaminazione delle acque del Veneto è nato il progetto Pamper (*Pharmacokinetics modeling for Pfas exposure and related risk*), una collaborazione tra Arpa Emilia-Romagna, Arpa Veneto, Università di Modena e Reggio Emilia e la London School of hygiene, con lo scopo di fornire agli organi decisori gli elementi chiave per la valutazione del rischio per la salute umana.

Il progetto si basa sull'utilizzo di due metodi alternativi: il *physiologically based pharmacokinetic* (Pbpbk) e il *transformics assay*. I Pbpbk sono modelli di simulazione

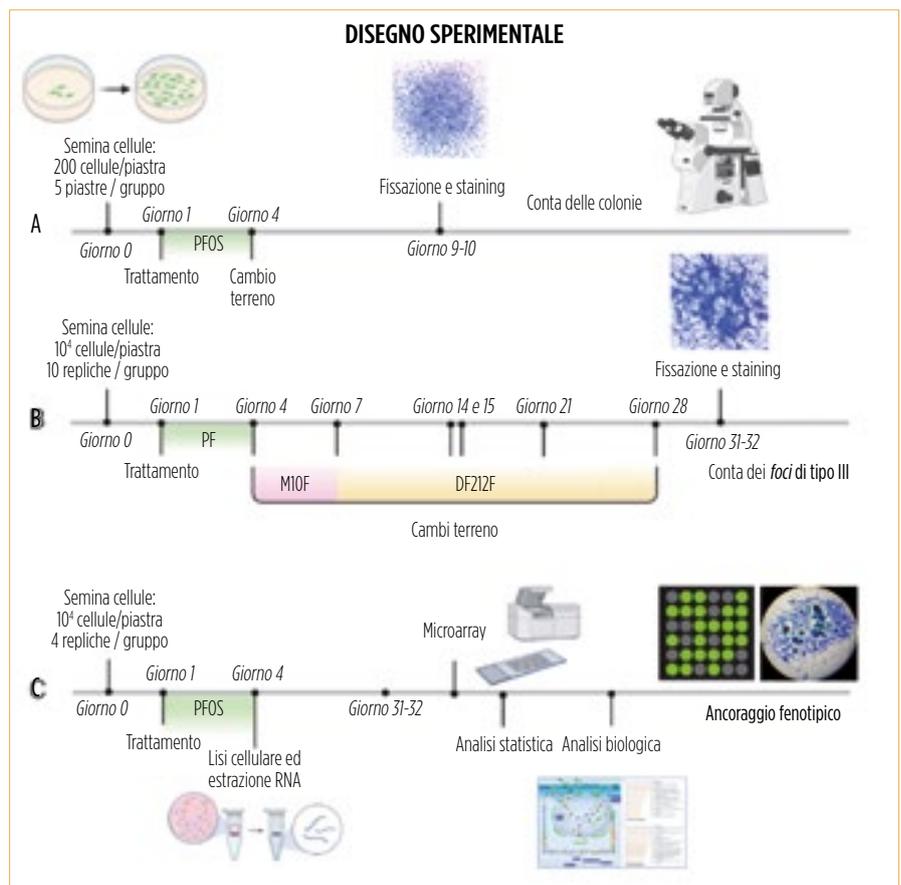


FIG. 1 TRANSFORMICS ASSAY
 Schema sperimentale del *transformics assay*.
 A) Saggio di citotossicità avente come endpoint le colonie
 B) Saggio di trasformazione, avente come endpoint i foci
 C) Analisi trascrizionale, che permette di capire i meccanismi molecolari sottesi all'evento di oncotrasformazione in vitro.
 Immagine creata con Biorender.

che si prefiggono di calcolare e predire la concentrazione di una sostanza chimica e dei suoi metaboliti all'interno dell'organismo. In questi modelli si immettono parametri specifici per gli xenobiotici e *system-specific* per l'organismo. In questo studio sono stati applicati vari Pbpk per valutare la relazione tra esposizione e concentrazione sierica di Pfos e Pfoa, e i risultati ottenuti sono stati confrontati con uno studio di biomonitoraggio.

La via di esposizione principale è quella alimentare e per ogni soggetto è stata calcolata l'assunzione totale giornaliera di Pfas (*Pfas total daily intake*). Sono stati quindi analizzati i dati di contaminazione di varie categorie alimentari, acqua di rubinetto non trattata o trattata con filtri (*granular active carbon*) e acque sotteranee. Infine sono stati creati vari scenari di esposizione, ovvero il *worst case scenario*, il *most likely scenario* e il *best case scenario*, che vengono combinati con il *median scenario* (si considerano le mediane di concentrazione) oppure con l'*average scenario* (si considerano le medie), sia a livello individuale sia aggregato. Il modello in vitro utilizzato è il *transformics assay*: prevede un saggio di citotossicità e un saggio di trasformazione eseguiti in parallelo, utilizzando come linea cellulare i fibroblasti murini Balb/c 3T3 clone A 31-1-1. Questo è un ottimo metodo in vitro poiché i meccanismi di cancerogenesi in vitro mimano efficacemente quelli in vivo, e aggiungendo l'analisi trascrizionale, si può ragionare su come il trattamento con una sostanza alteri il profilo trascrizionale della cellula, il meccanismo attraverso cui il codice genetico risponde alle sollecitazioni, e come questa alterazione porti alla trasformazione cellulare.

Dai risultati ottenuti con i modelli Pbpk è stato notato che la combinazione tra il *most likely scenario* e il *median scenario* è risultata quella più affidabile e realistica tramite analisi a livello individuale. Con questo set, le concentrazioni sieriche di Pfoa calcolate sono risultate più basse in tutti i comuni dell'area contaminata e la concentrazione mediana è stata sottostimata per la popolazione totale, per gli uomini e per le donne, mentre per il Pfos questo tipo di analisi è stata ritenuta non necessaria. Le analisi a livello aggregato hanno mostrato che tutti i modelli hanno ottenuto risultati soddisfacenti, in particolare il modello *Modified Luccisano 2*. Le concentrazioni di Pfoa predette dai modelli sono risultate in generale sottostimate rispetto alla media e mediana di concentrazione

PRESENTAZIONE DELLA RELATRICE

Next generation risk assessment (Ngra) è un approccio alla valutazione del rischio guidato dall'esposizione, basato su ipotesi, che integra approcci in silico, in chimico e in vitro. L'obiettivo generale di un Ngra è che sia rilevante per gli esseri umani, guidato dall'esposizione, basato su ipotesi e progettato per prevenire esiti avversi per la salute. Ogni Ngra è personalizzato, non esiste né è appropriata una lista prescrittiva di test per garantire la sicurezza di una sostanza chimica. Generalmente Ngra raccoglie, integra e implementa informazioni ricavate dalla letteratura scientifica. In questo studio, invece, lo schema Ngra è stato sviluppato sulla base di dati reali e misurati a partire dal monitoraggio ambientale, al biomonitoraggio, ai dati in silico (Pbpk) e in vitro (*transformic assay*), integrati in un *Aep-Aop pathway*, che consente di leggere il percorso che porta alla malattia, attraverso tappe discrete, segnate da un evento chiave che risponde a una specifica concentrazione di esposizione. Questo processo consente di identificare il livello di concentrazione ambientale che può portare a una concentrazione effettiva ed efficace a livello di organo bersaglio. L'obiettivo ultimo è quello di arrivare a definire una dose soglia, al di sotto della quale, verosimilmente, non c'è un eccesso di rischio per la salute della popolazione esposta.

Annamaria Colacci

Arpae e Università degli studi di Bologna

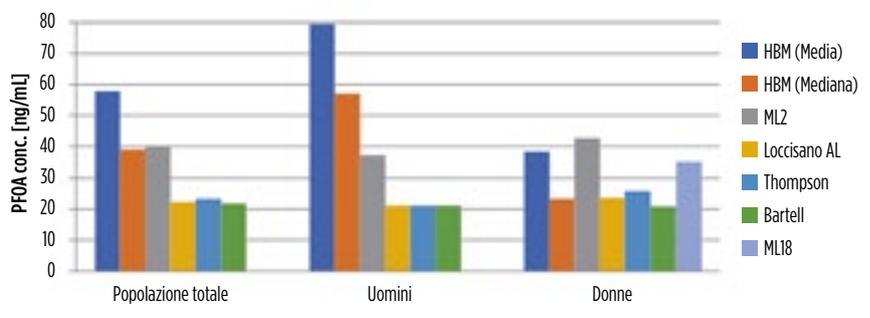


FIG. 2 CONCENTRAZIONI PFOA

Confronto tra concentrazioni sieriche di Pfoa osservate e predette dai vari modelli a livello aggregato (ng/ml) per la popolazione totale, popolazione maschile e popolazione femminile.

Hbm = Studio di biomonitoraggio, ML2 = Luccisano modificato versione 2, ML1 = Luccisano modificato versione 1, Luccisano AL = modello Luccisano model a livello aggregato, ML18 = Luccisano modificato 18%, Thompson = modello Thompson, Bartell = modello Bartell (modificato da Vaccari et al., 2023, articolo in preparazione di pubblicazione).

dello studio di biomonitoraggio. Le concentrazioni di Pfos, al contrario, sono state sovrastimate da tutti i modelli. Le differenze tra le concentrazioni predette e misurate nello studio di biomonitoraggio sono comunque nell'ordine di grandezza di ng/ml, perciò questo tipo di modellistica può essere uno strumento efficace a supporto di studi di esposizione. Mediante il *transformics assay* si evince che solo la concentrazione più alta testata è risultata citotossica e trasformante, mentre la dose più bassa, oltre a non aver causato una modulazione genica significativa ai tempi precoci, non ha mostrato citotossicità né attività trasformante.

L'integrazione di questi due modelli, in ottica di *Next generation risk assessment*, permette la valutazione della complessità della risposta fisiopatologica all'esposizione ambientale. Le informazioni derivate dai due approcci proposti vengono organizzate in step sequenziali attraverso vari ordini di grandezza biologica. In questo modo

si generano due strumenti di enorme importanza: l'*aggregate exposure pathway* (Aep) e l'*adverse outcome pathway* (Aop). L'Aep si inserisce nella valutazione dell'esposizione ai Pfas, quindi partendo dalle concentrazioni ambientali si arriva a valutare l'effettiva dose interna, la tossicocinetica e il destino dei Pfas nell'organismo attraverso modelli Pbpk. L'Aop, attraverso il *transformics assay*, si pone come obiettivo la costruzione lineare e sequenziale degli eventi molecolari che, partendo da un *molecular initiating event* (Mie), attraverso diversi eventi chiave, culminano all'evento fenotipico di oncotrasformazione. In questo modo si sono riuscite a integrare informazioni complesse utili agli organi decisori per la valutazione del rischio per la salute umana in seguito all'esposizione a sostanze inquinanti.

Federico Aldrovandi

Alma Mater Institute on Healthy Planet, Università di Bologna