

DOTTORATO DI RICERCA IN
ONCOLOGIA E PATOLOGIA SPERIMENTALE
Progetto N°1: Oncologia
CICLO XXVI

Settore Concorsuale di Afferenza: 06/D3, 05/E2

Settore Scientifico Disciplinare: MED/06, BIO/11

TITOLO DELLA TESI

COMPOSTI PERFLUORURATI: VALUTAZIONE DEGLI EFFETTI BIOLOGICI E
MOLECOLARI IN MODELLI CELLULARI

Presentata da: Francesca Pirini

Coordinatore Dottorato:
Chiar.mo Prof
Sandro Grilli

Relatore:
Chiar.mo Prof
Andrea Pession

ESAME FINALE ANNO
2014

INDICE

INTRODUZIONE	5
1. I COMPOSTI PERFLUORURATI.....	5
2. Farmacocinetica	6
3. ESPOSIZIONE AI PFAAs	10
4. PFCs ed esposizione pre-natale	12
5. EFFETTI DEI PFAAs E PFCS	14
5.1 Effetto sulla prole.....	14
5.2 Neurotossicità	16
5.3 Immunotossicità.....	17
5.4 Disfunzioni riproduttive e ormonali	18
5.5 Epatotossicità.....	20
6. Cancerogenesi e possibili meccanismi d'azione	21
7. EFFETTI EPIGENETICI	26
SCOPO DELLA TESI	28
MATERIALI E METODI	29
1. COLTURE CELLULARI	29
2. TRATTAMENTI	29
3. DETERMINAZIONE DELLA VITALITA' CELLULARE CON WST-1	30
4. DETERMINAZIONE DEL CICLO CELLULARE E APOPTOSI TRAMITE PROPIDIO IODURO	31
5. ESTRAZIONE RNA	31
6. ESTRAZIONE DEL DNA TRAMITE FENOLO CLOROFORMIO-8 (PC-8).....	32
7. RETROTRASCRIZIONE, RT-PCR.....	32
8. Real Time PCR	32
9. DETERMINAZIONE DELLAMETILAZIONE GLOBALE	34
10. GENOME WIDE METHYLATION TRAMITE COMPREHENSIVE HIGH-THROUGHPUT ARRAYS FOR RELATIVE METHYLATION (CHARM).....	34
RISULTATI	36
1. SAGGI DI VITALITA'	36
2. CICLO CELLULARE E apoptosi	39
3. EFFETTI MOLECOLARI.....	42
4. EFFETTI EPIGENETICI	44
4.1 Metilazione globale.....	44
4.2 Genome wide methylation, risultati preliminari	46
DISCUSSIONE	52
BIBLIOGRAFIA	60

INTRODUZIONE

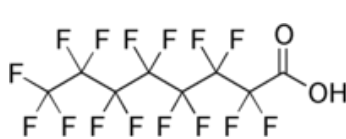
1. I COMPOSTI PERFLUORURATI

Col nome sostanze perfluoroalchilate (PFASs), viene indicato un vasto gruppo di molecole sintetiche costituite da catene carboniose di lunghezza variabile, tipicamente da C4 a C16, con un gruppo idrofilico terminale $F(CF_2)_n-R$. Quando i legami carbonio-idrogeno nella parte idrofobica sono sostituiti da legami carbonio-fluoro vengono anche indicati col nome di Composti Perfluorurati (PFC). Questa struttura chimica conferisce loro una particolare resistenza termica, inerzia chimica ed una eccezionale idrofobicità e lipofobicità, caratteristiche che hanno reso estremamente differenziato l'impiego dei PFCs sia in ambito industriale che in ambito domestico.

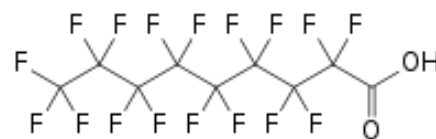
Sin dagli anni '50 sono infatti impiegati come tensioattivi e protettivi superficiali in detersivi, pitture e vernici, tappeti, tessuti, pelle, mobili, scarpe, prodotti cartacei, estintori, schiume, cosmetici, insetticidi, contenitori per alimenti, repellenti, lubrificanti e utilizzati nella produzione di fluoropolimeri per le pentole antiaderenti [Fromme et al., 2009; Prevedouros et al., 2006]. Il largo consumo e le applicazioni industriali hanno portato a una distribuzione globale dei PFC nell'ambiente ed anche nell'uomo. L'acido perfluorottano sulfonato (PFOS), l'acido perfluorottanoico (PFOA) e l'acido perfluorononanoico (PFNA) sono tre dei PFCs più presenti in aria, acqua, sedimenti, nei tessuti animali [Giesy et al. 2001] e umani [Calafat et al. 2006; Kannan et al. 2004; Midasch et al. 2006], infatti, data la stabilità del legame C-F, sono poco biodegradabili, hanno un'emivita molto lunga, tendendo così ad accumularsi nell'organismo.



PFOS



PFOA



PFNA

Figura 1: *Struttura molecolare dei PFCs PFOS, PFOA e PFNA.*

A differenza di altri inquinanti organici persistenti, i PFC non si accumulano preferenzialmente nel tessuto adiposo. Grazie alle loro proprietà anfifiliche si accumulano negli organismi legandosi alle proteine [Jones et al. 2003]. Il Bioaccumulo nel biota e la bioamplificazione nella catena alimentare è stata anche dimostrata [Haukås et al. 2007; Meyer et al. 2009; Herzke et al. 2009]. Inoltre, alcuni composti non si accumulano come tali nell'organismo ma

costituiscono precursori per altri PFASs, in alcuni casi con ancora maggiore persistenza e potenzialità bioaccumulative [Brandsma et al. 2011].

Una delle fonti principali di “inquinamento” da PFCs deriva dalla biodegradazione di alcuni precursori, quali per esempio l'ammonio perfluoronanoato (APFN) [Feng et al. 2010], responsabile dell'aumento delle concentrazioni di PFNA nell'ambiente, e i pesticidi sulfamidici, che sono rapidamente metabolizzati a PFOS [Peden-Adams et al. 2007]. Studi recenti indicano, inoltre, che PFNA e PFOA sono originati insieme dagli stessi precursori durante il trattamento delle acque reflue [Murakami et al. 2009].

Considerando i fattori sopra menzionati, questi composti sono sospettati di esplicare tossicità e, a tal proposito, Kleszczynski et al. (2007) hanno rilevato una tossicità proporzionale alla lunghezza della catena.

L'acido perfluorottano sulfonato (PFOS) e suoi sali sono stati recentemente inclusi nella lista degli inquinanti organici persistenti (POP) nell'allegato B della Convenzione di Stoccolma (Convenzione di Stoccolma sugli inquinanti organici persistenti, 2010), il che significa che il loro uso è accettato solo per un elenco definito di applicazioni. Per l'acido perfluorottanoico (PFOA) è stata segnalata la capacità di indurre tumori nei roditori [EPA 2002] e nel 2009 è stato iscritto nell'elenco dei POPs (Persistent Organic Pollutants) da parte dell'UNEP (United-Nations-Environment-Program). L'EPA ha inoltre lavorato in collaborazione con 10 aziende al 2010/2015 PFOA Stewardship Program allo scopo di ridurre del 95% le emissioni e il contenuto residuo del PFOA e dei PFC a catena lunga entro il 2010, con l'obiettivo finale di eliminarli dalla produzione entro il 2015.

Un simile accordo è stato preso anche tra le autorità ambientali e sanitarie canadesi e 5 società per limitare l'emissioni di PFCAs (Canada Environment 2010), mentre l' European Union Marketing and Use Directive ha ristretto l'uso del “perfluorooctane sulfonates” nell'unione europea nel 2006 [European Parliament 2006 b].

2. FARMACOCINETICA

La maggior parte dei PFAAs possiedono proprietà farmacocinetiche uniche, dipendenti dalla lunghezza della catena di carbonio e dai gruppi funzionali, nonché dalla specie, il sesso e l'età dei soggetti valutati. Come già accennato, da studi condotti su animali, sappiamo che sono ben assorbiti per via orale (entro poche ore), non sono metabolizzati, sono sottoposti ad ampia circolazione enteroepatica, e possono facilmente attraversare la placenta. I PFAAs sono scarsamente espulsi dall'organismo (in particolare quelli a catena lunga), e l'eliminazione avviene principalmente attraverso escrezione urinaria [Johnson et al. 1984; Hanhijarvi et al.

1988; Vanden Heuvel et al. 1991]. Questi prodotti chimici sono distribuiti principalmente nel siero, nel rene, e nel fegato, con concentrazioni epatiche molte volte superiore rispetto alle concentrazioni sieriche (con l'eccezione di PFBA, perfluorobutanoate). Il volume di distribuzione allo stato stazionario suggerisce che la distribuzione dei PFAA è probabilmente extracellulare. Queste sostanze chimiche inoltre hanno alta affinità di legame per una vasta varietà di proteine [Luebker et al. 2002; Woodcroft et al. 2010; Han et al. 2004; Jones et al. 2003; Chen et al. 2009].

Le emivite di eliminazione di diversi PFAAs sono diverse nei diversi organismi. Risultano molto più lunghe nell'uomo rispetto agli animali, come mostrato in tabella 1 [Bartell et al. 2010; Ohmori et al. 2003; Butenhoff et al. 2004; Harada et al. 2005; Hinderliter et al. 2005; Olsen et al. 2007; Chang et al. 2008; Olsen et al. 2009; Sundstrom et al. 2011; Chang et al. 2011], e dipendono anche dalla lunghezza della catena di carbonio. Pertanto, le emivite di eliminazione di PFOS, PFOA e PFNA sono nell'ordine di anni nell'uomo, di giorni negli animali. Negli esseri umani o nelle scimmie si osservano poche differenze di genere, mentre nel ratto sono molto marcate. In particolare, l'emivita di PFNA e PFOA nelle femmine di ratto è 20 e 50 volte più breve di quella nei maschi. Differenze nei tempi di eliminazione dipendenti dal sesso sono molto più piccole nel topo che nel ratto [Hundley et al. 2006]. A questo proposito, il topo è più vicino all'uomo, quindi fornisce un modello roditore più suscettibili per gli studi tossicologici in particolare quelli incentrati sulla tossicità riproduttiva e dello sviluppo, dove la farmacocinetica in donne in gravidanza ha un ruolo importante nel determinare l'esposizione del concepito.

I meccanismi che sottolineano le differenze di genere per l'eliminazione dei PFCs nel ratto sono attualmente sotto studio e sembrano essere correlate all'attività renale. Un certo numero di studi rilevano il coinvolgimento di trasportatori di anioni organici (OATs) che mediano l'escrezione renale e che sono regolati dagli ormoni sessuali [Buist et al. 2003; Ljubojevic et al. 2007]

Un recente studio condotto da Weaver IM. (2010) indica i trasportatori OAT1 e OAT3 come coinvolti nella secrezione renale di acido perfluoroheptanoico (PFHpA), PFOA, e PFNA, mentre OATP1a1 contribuisce al riassorbimento di PFOA, PFNA, e dell'acido perfluorodecanoico (PFDA). Ljubojevic M. et al. (2007) hanno riportato che il pattern di espressione renale di OAT2 nel topo è simile a quello nel ratto, ed entrambi sono regolamentati da ormoni sessuali. Al contrario, Buist et al. (2004) hanno indicato che i livelli renali di mRNA di OAT2 sono marcatamente maggiori nelle femmine che nel ratto maschio, ma non vi è alcuna differenza di sesso nell'espressione OAT2 nel rene di topo. Ulteriori studi sono

necessari per risolvere il problema. D'altra parte, è incoraggiante che questi trasportatori (come OAT4 e urato transporter 1, URAT1) giochino un ruolo chiave nel riassorbimento renale dei PFC anche nell'uomo [Yang et al. 2010], suggerendo un potenziale meccanismo comune tra le specie.

Species	PFBS		PFHxS		PFOS		PFBA		PFHxA		PFOA		PFNA	
	Female	Male	Female	Male	Female	Male	Female	Male	Female	Male	Female	Male	Female	Male
Rat	4.0 h	4.5 h	0.8 days		62-71 days	38-41 days	1.0-1.8 h	1.0 h	0.42 h	1.0 h	2-4 h	4-6 days	1.4 days	30.6 days
Mouse			25-27 days	28-30 days	31-38 days	36-43 days	3 h				17 days	19 days	25.8-68.4 days	34.3-68.9 days
Rabbit											7 h	5.5 h		
Dog											8-13 days	20-30 days		
Monkey	3.5 days	4.0 days	87 days	141 days	110 days	132 days	1.7 days	0.1-0.8 days	0.2-1.5 days	30 days	21 days			
Human	1 month		8.5 years		5.4 years		3 days				2.3-3.8 years			

Tabella 1: emivita nel siero/plasma di alcuni PFAAs

3. ESPOSIZIONE AI PFAAS

La vasta distribuzione nell'ambiente, la tossicità osservata negli animali e la lunga emivita all'interno dell'organismo hanno attirato l'attenzione su questi composti a causa del potenziale rischio sulla salute umana.

Da uno studio condotto nel 2004 su campioni provenienti da diverse parti del mondo risulta che nel siero di tutte le persone che vivono nei paesi industrializzati sono presenti molti PFC nell'ordine di ng/mL [Kannan et al. 2004], ma individuare le vie di esposizione ed il rischio derivante da questo è complicato da diversi fattori, come la presenza di pochi dati disponibili e dalla mancanza di conoscenze adeguate sui meccanismi di farmacocinetica [Loccisano et al. 2011] e la lunga emivita.

Dati recenti forniti da Kato et al. (2011) sulla popolazione americana riportano concentrazioni di PFOS nella popolazione generale di 20 ng/ml, maggiore rispetto a PFOA e PFNA, i quali sono presenti in valori medi rispettivamente pari a 4.13 ng/ml e 1.49 ng/ml. I valori aumentano di un ordine di misura se si considerano i lavoratori cronicamente esposti, in cui PFOS raggiunge valori fino a 13 µg/ml (26 µM) e PFOA 114 µg/ml (276 µM) [Lau et al. 2007; Olsen et al. 1999, 2003]; riguardo al PFNA non sono ancora presenti studi occupazionali.

In un studio che riassume i dati del NHANES (National Health and Nutrition Examination Survey), livelli medi di PFOS e PFOA sono diminuiti rispettivamente del 32 % e 25% dal 1999/2000 fino 2003/2004 [Calafat et al. 2007]

Un più recente studio del NHANES (2007/2008) indica invece che, mentre le concentrazioni di PFOS continuano a diminuire, i livelli di altri PFC, come PFOA, sono rimaste costanti o sono addirittura aumentate (PFHxS, PFNA) [Kato et al. 2011]. Anche Calafat et al. (2007) hanno riportato un aumento della concentrazione di PFNA nel siero della popolazione statunitense tra il 2000 ed il 2004. Queste variazioni dei livelli dei diversi PFC nella popolazione è consistente con l'applicazione di normative che hanno regolamentato l'utilizzo e l'emissione di PFOS sin dal 2002 determinandone una diminuzione nei campioni di sangue americani coerente con l'emivita nell'uomo suggerendo che uno dei fattori responsabili dell'esposizione sia stato notevolmente ridotto [Olsen et al. 2007] ma anche che conseguentemente i regolamenti restrittivi su PFOS e PFOA siano stati introdotti composti in grado di sostituirli nei processi industriali.

Come menzionato in precedenza però, questi composti sono utilizzati da più di 60 anni in diversi processi industriali interessati nella produzione di beni di consumo domestici e non, e sono perciò ampiamente diffusi nell'ambiente. Studi condotti in Europa, America ed Asia

riportano la presenza di PFC in cibo [Schechter et al. 2010] acqua potabile, aria esterna, aria domestica, [Langer et al. 2010] polvere, e negli imballaggi dei prodotti alimentari [D'eon et al. 2010] rendendo così multiple le fonti di esposizione a questi composti.

Attualmente, un certo numero di studi di modellizzazione hanno stimato che l'esposizione cronica ai bassi livelli di PFC presenti nel cibo possano essere la principale fonte di esposizione non professionale a questi composti. In una recente review, Fromme et al. (2009) hanno valutato la potenziale esposizione derivante da aria domestica ed esterna, polvere di casa, acqua potabile, e cibo. Lo studio conclude che l'assorbimento medio di PFOS e PFOA è stato dell'ordine di 23 ng/kg al giorno, e il cibo è responsabile di oltre il 90% di questa esposizione.

Dal report dell'EFSA (European Food Safety Authority) del 2012 condotto su campioni provenienti da tutta la zona europea, si evince che la presenza di PFAS è stata segnalata più frequentemente nel pesce e frutti di mare, in carne e derivati e acqua potabile, e in misura minore in frutta e prodotti derivati dalla frutta.

In questo studio è stato anche valutato il contributo giornaliero portato dalla dieta e diviso per classi di età. Per PFOS, il più alto valore di esposizione per la popolazione adulta è 5.2 ng/kg di peso corporeo/giorno, che rappresenta il 3,5% del Tolerable Daily Intake (TDI) (di 150 ng/kg di peso corporeo/giorno), mentre la stima più alta del 95° percentile è di 10 ng/kg di peso corporeo al giorno, che rappresenta il 6,7% del TDI. I bambini con età compresa tra 1 e 3 anni e i bambini con età superiore sono la classe di età che presenta la massima esposizione con rispettivamente il 9,3% e il 19% del TDI). Per PFOA, la maggiore esposizione per la popolazione adulta è di 4.3 ng/kg di peso corporeo al giorno (0,3% del TDI) mentre la stima più alta del 95° percentile è di 7,7 ng/kg di peso corporeo al giorno (0,5% del TDI). Ancora una volta i bambini con età compresa tra 1 e 3 anni e i bambini con età superiore sono le classe di età maggiormente esposte, rispettivamente 1,1% e il 2,1% del TDI.

Altre potenziali vie di esposizione includono l'aria, la polvere e contatto diretto con materiali contenenti perfluorurati. Molte di queste sostanze sono anche volatili e si possono trovare nell'ambiente casalingo in concentrazioni dell'ordine del pg/m³ o ng/m³. [Shoeib et al. 2011] Una volta inalati, questi materiali possono essere metabolizzati dai normali processi enzimatici, ed in seguito accumulati nell'organismo. Studi sulla polvere di casa indicano che un range di contaminazione da 10 a 100 ng/g sia abbastanza comune [Shoeib et al. 2005; Strynar et al. 2008], suggerendo che l'inalazione del materiale aereo o il contatto con la polvere portando ad esempio la mano alla bocca (soprattutto per i bambini) potrebbe contribuire all'esposizione.

Il contatto diretto con gli oggetti di uso comune trattati con PFC o che contengono residui di fabbricazione costituisce un'altra potenziale fonte di esposizione per l'uomo [Guo et al. 2009]. La lenta eliminazione di questi composti rende difficile determinare come i cambiamenti nello stile di vita, dieta, o altri fattori di esposizione possano influenzare i livelli ematici. Studi hanno inoltre indicato che mentre l'età apparentemente ha poca influenza sui livelli di PFC in circolo, sesso ed etnia sembrano influenzare l'accumulo di alcuni composti [Kato et al. 2011]. Ciò indica che stile di vita e, eventualmente, i fattori genetici giocano un ruolo nella diffusione e mantenimento dei PFC. Ci sono anche differenze geografiche chiare che sono state osservate, indicando che la vicinanza ai principali fonti o grado di urbanizzazione svolgono un importante ruolo [Saito et al. 2004].

4. PFCS ED ESPOSIZIONE PRE-NATALE

Come visto sugli animali, feti e neonati nelle prime fasi di vita sono più vulnerabili rispetto agli adulti al potenziale tossico dei PFCs e l'esposizione a questi potrebbe predisporli a patologie nella vita adulta. Pertanto ultimamente l'attenzione è stata spostata sugli effetti avversi provocati al feto e al neonato, valutando l'associazione tra l'esposizione della madre e gli effetti che i bambini hanno riportato. I neonati possono essere esposti ai PFCs attraverso trasmissione verticale madre-feto o attraverso l'allattamento [Inoue et al., 2004; So et al., 2006; Apelberg et al. 2007; Karman et al. 2006; Monroy et al. 2008; Tao et al. 2008].

Fromme et al. (2010) hanno analizzato le concentrazioni di PFCs nel sangue materno, sangue cordonale, sangue del neonato e latte materno, osservando un aumento delle concentrazioni di PFCs per tutte e quattro le matrici dal primo mese di gestazione fino alla nascita del bambino, e all'età di sei mesi il carico corporeo tossico di PFOS e PFOA era risultato rispettivamente simile o superiore a quanto riscontrato negli adulti.

Liu et al. (2011), oltre a misurare i livelli di PFCs in sangue materno (MS), sangue cordonale (CS) e nel latte materno (HM) di 50 coppie di donne e i loro figli; hanno anche cercato di valutare l'esposizione ai PFCs derivante dalla trasmissione madre-feto durante la gestazione e dall'allattamento.

Degli otto PFCs considerati (PFHxS, PFOS, PFOA, PFNA, PFDA, PFUdA, PFDoA, and PFTrDA) e rilevati nel siero materno e nel sangue cordonale solo cinque di essi sono stati rilevati anche nel latte (PFOS, PFOA, PFNA, PFDA, PFUdA).

La media aritmetica delle concentrazioni di PFOS e PFOA e PFNA nel siero materno è risultata di 3.1 ng/ml, 1.6 ng/ml, e 0.5 ng/ml rispettivamente. La concentrazione degli altri componenti si è presentata in un range compreso tra 0.36 e 0.89 ng/ml. Le concentrazioni nel

siero cordonale sono risultate di 1.6 ng/ml per PFOS, 1.5 ng/ml per PFOA e 0.3 ng/ml per PFNA e sono 2-4 volte inferiori rispetto a quelli del siero materno per tutti i PFCs. Nel latte materno le concentrazioni risultano ancora inferiori, (0.06 ng/ml PFOS; 0.18 ng/ml PFOA, 0.026 ng/ml PFNA) e PFOA risulta essere il più presente. Confrontati con il siero materno, i campioni di latte contenevano uno o due ordini di magnitudo inferiori come mostrato anche da Kim et al. (2010). In percentuale la concentrazione di PFOA aumentava dal 24.3% nel sangue materno fino al 33.4% nel cordone ombelicale e al 53.7% nel latte materno. In contrasto la proporzione di PFOS diminuiva dal 45.8% nel sangue materno al 39.9% nel siero cordonale e al 20% nel latte materno. La causa della diminuzione di PFOS nel latte materno può essere dovuta alla minore concentrazione di proteine (ipotetiche trasportatrici di PFCs) rispetto al sangue considerando che il legame dei PFCs all'albumina del siero è considerato il meccanismo più plausibile di distribuzione dei PFCs. In accordo con questo meccanismo, la diversa quantità dei differenti PFCs che attraversa la placenta e che si riscontra nel latte dipenderebbe dalla loro efficienza di legame con le proteine, questo suggerisce un meccanismo di trasporto simile per i PFCs attraverso la barriera placentare e l'allattamento.

Lo studio dimostra inoltre che la quantità di trasferimento dal siero della madre al siero del feto è molto diversa tra i vari PFCs indicando che l'efficienza di trasferimento diminuisce del 70% all'aumentare delle unità $-CF_2$ del composto. PFOA è risultato essere il composto che più facilmente passa la placenta.

A causa della lenta eliminazione di PFOS e PFOA nei gli esseri umani, l'onere totale sul corpo del neonato potrebbe essere rappresentato dall'esposizione durante la gestazione e durante l'allattamento. Secondo gli autori, l'esposizione durante la gravidanza per PFOS e PFOA era rispettivamente di 183 e 472 ng, inferiore rispetto all'esposizione calcolata per un mese di allattamento con latte umano (751 ng per PFOS, 2173 ng per PFOA). Ciò significa che i rapporti di esposizione prenatale alla stima dell'esposizione totale mensile attraverso l'allattamento erano 0.63:1 e 0.08:1 per PFOS e PFOA, rispettivamente. L'esposizione attraverso l'allattamento risulta quindi essere significativamente maggiore rispetto quella nell'età gestazionale.

Correlazioni non significative sono state osservate tra le caratteristiche demografiche delle madri e i livelli individuali di PFCs nel siero e nel latte. Inoltre da uno studio Italiano ad opera del CABALAB del Dip. Scienze mediche veterinarie dell'università di Bologna in collaborazione con il nostro laboratorio su 37 campioni di latte materno, si evidenzia una differenza tra le concentrazioni di PFOS e PFOA anche fra primipare e multipare, infatti le concentrazioni sono maggiori nelle prime rispetto alle seconde. [Barbarossa et al. 2012].

5. EFFETTI DEI PFAAS E PFCS

5.1 Effetto sulla prole

Durante le prime fasi di vita, feti e neonati sono più vulnerabili dei soggetti adulti ai potenziali effetti dei PFCs, per cui l'esposizione precoce può predisporre a maggiori rischi di effetti tossici cronici rispetto a un'esposizione in una fase successiva della vita [Steenland et al. 2002].

L'esposizione a PFOS e PFOA durante la gravidanza nei ratti e topi produce difetti anatomici evidenti nella prole come la palatoschisi, ma solo a dosi elevate, mentre altre anomalie morfologiche sono dovute a ritardi nello sviluppo [Luebker et al. 2005; Lau et al. 2006; Era et al. 2009; Das et al. 2008]. Lo sviluppo della ghiandola mammaria in offspring di topo femmina esposta al PFOA è notevolmente ritardata, portando ad anomalie persistenti [Abbott et al. 2009]. Le conseguenze funzionali di tali morfologica anomalie sono attualmente sconosciute.

PFOS può anche indurre nei ratti una maggiore attività motoria e una minore capacità di adattamento ambientale [Butenhoff et al. 2009].

In presenza di PFOA o PFBA sono state notate perdite durante i primi mesi di gravidanza ma solo a dosi molto elevate, e l'eziologia di questo effetto non è chiaro. L'esposizione prenatale al PFOS è stata anche associata a una maggiore mortalità post-natale e sviluppo di danni [Luebker et al., 2005; Lau et al., 2003].

Nei topi è stata notata una compromissione della crescita nei neonati esposti a dosi relativamente elevate (3-10 mg/kg) di PFOA durante la gestazione, mentre quelli esposti alle basse dosi (0,01-0,3 mg/kg) hanno riportato significativi aumenti di peso corporeo, insulina nel siero e concentrazioni di leptina a metà vita [Abbott et al. 2009].

Butenhoff et al. (2004) hanno evidenziato invece una diminuzione del peso nel periodo post svezzamento dopo somministrazione prenatale di PFOA nei ratti.

L'esposizione ai PFC può influire anche su l'istologia e la morfometria dei polmoni dei neonati dopo somministrazione di alte dosi di PFOS, suggerendo che PFOS possa inibire o creare ritardo nello sviluppo del polmone in fase perinatale, ma anche carenze neuromotorie nei ratti [Grasty et al. 2005; Fuentes et al. 2007]. L'osservazione di un accumulo preferenziale di PFOS nel polmone fetale sostiene questa ipotesi [Butenhoff et al. 2004].

Per quanto riguarda accoppiamento e fertilità è stato visto che l'esposizione prenatale ai PFCs nei ratti non produce effetti significativi [Butenhoff et al. 2009].

Nell'uomo, effetti dell'esposizione prenatale a PFOA e al PFOS sono stati riportati in diversi studi. Essi possono influire sulla crescita e sullo sviluppo del feto [Steenland et al. 2010].

L'esposizione a PFOA è associata ad un minor peso del bambino alla nascita [Fei et al. 2007] con una minore lunghezza e circonferenza addominale [Fei et al. 2008]. Entrambi i PFC sono invece associati a un minore indice ponderale e della circonferenza della testa [Apelberg et al. 2007]; di contro, però, altre ricerche non hanno rivelato alcuna significativa associazione tra le caratteristiche alla nascita e il livello di PFCs nelle madri [Inoue et al. 2004; Hamm et al. 2009]. Il risultato di uno studio giapponese indica che l'esposizione prenatale a bassi livelli di PFOS è correlata negativamente con il peso alla nascita, ma solo nelle neonate femmine [Washino et al. 2009].

In uno studio condotto su 69000 abitanti vicino a uno stabilimento con produzione di PFCs a Washington sono stati rilevati elevati livelli di PFOA nei bambini associati ad alti livelli di colesterolo, situazione predisponente a futuri problemi di peso e alto rischio di problemi cardiaci [Steenland et al. 2009].

PFOS è stato anche associato a carenze di sviluppo motorio solo nei primi due anni di vita [Fei et al. 2008]. Nonostante i PFCs non si accumulino nel cervello [Lau et al. 2006] ne è stata rilevata la presenza nel tessuto cerebrale dopo esposizione orale [Bogdanska et al. 2001] a concentrazioni minori rispetto ai livelli sierici, ma che potrebbero essere sufficienti per limitare le funzioni del sistema nervoso centrale. PFOS infatti è associato ad un aumento della norepinefrina nel nucleo paraventricolare dell'ipotalamo [Austin et al. 2003] portando ad effetti di tipo comportamentale come l'impulsività [Basar et al. 2010]. Inoltre PFOS e PFOA interagendo con le proteine nel cervello potrebbero influire sulla crescita neuronale e sinaptogenesi [Johansson et al. 2009].

Due studi riportano anche associazioni positive tra concentrazioni sieriche nei bambini di PFOA, PFOS, PFNA e PFHxS e diagnosi di ADHD (Attention-Deficit/Hyperactivity Disorder) [Hoffman et al. 2010; Savitz et al. 2001].

Wang et al. (2010), invece, hanno esaminato gli effetti dell'esposizione prenatale ai PFCs sul livello di IgE e sviluppo di dermatite atopica (AD). I livelli di PFOS e PFOA sono risultati positivamente correlati con i livelli di IgE nel sangue cordonale; su un totale di 244 bambini che hanno completato il follow-up, 43 hanno sviluppato AD. L'esposizione prenatale ai suddetti PFCs è quindi correlata positivamente con i livelli di IgE e l'analisi stratificata per genere ha rivelato che i livelli di PFOA e PFOS sono positivamente correlati con i livelli di IgE del sangue cordonale, ma solo nei maschi.

Valutazioni di follow-up in neonati appartenenti alla Danish National Birth Cohort non indicano alcuna associazione tra esposizione prenatale a PFAAs e il rischio di malattie infettive, tappe dello sviluppo, malattie comportamentali e problemi di coordinazione motoria

[Frisbee et al. 2010; MacNeil et al. 2009; Steenland et al. 2010]. Un recente studio su una coorte britannica, inoltre, non ha evidenziato associazioni tra l'esposizione materna a PFAA e alterazioni dell'età di comparsa del menarca dei loro figli [Lin et al. 2009].

5.2 Neurotossicità

Nel complesso, l'indagine sulla neurotossicità dei PFCs è solo emergente. Nonostante la natura altamente polare dei gruppi sulfonilici o carbossilici, i PFCs entrano nel cervello in via di sviluppo e probabilmente ciò è dovuto sia alle proprietà tensioattive dei composti che all'imaturità della barriera emato-encefalica [Lau et al., 2004, 2006, 2007].

Slotkin et al. (2008) hanno caratterizzato il potenziale neurotossico della sulfonamide perfluorottano (PFOSA), PFOS, PFBS, e PFOA su cellule di ratto PC12. È stato trovato che PFOSA, PFOS, PFBS promuovono la differenziazione fenotipica di queste cellule, seppur in maniera diversa, mentre PFOA ha avuto poco o nessun effetto.

Espressione di fattori di trascrizione, c-fos e c-jun, e segnali calcio-dipendenti sono state alterate nell'ippocampo e nella corteccia cerebrale di ratti dopo esposizione con PFOS [Wang et al. 2010]. Alte dosi di PFCs non solo risultano tossiche per lo sviluppo nei roditori portando a morbilità e mortalità, ma sono associate anche ritardi neurologici [Lau et al., 2003; Luebker et al. 2005a, 2005b].

Johansson et al. (2008; 2009) hanno dimostrato cambiamenti nelle proteine coinvolte nella neurogenesi e sinaptogenesi nel cervello di topo in via di sviluppo dopo l'esposizione neonatale a PFOS e PFOA, che sono stati accompagnati da difetti neurocomportamentali in età adulta.

Esposizioni molto più basse a PFOS e PFOA producono difetti comportamentali che persistono anche in età adulta probabilmente per coinvolgimento del sistema dell'acetilcolina (ACh) come si evince dall'alterata risposta alla nicotina riscontrata nei roditori esposti; sembra quindi che lo sviluppo del cervello sia influenzato anche a livelli minimi di esposizione [Johansson et al., 2008].

Tuttavia questi studi non riescono a risalire esattamente alla causa effettiva della neurotossicità osservata, che potrebbe essere dovuta all'azione diretta dei PFCs, ma anche ad episodi di ipossia neonatale o ad altri tipi di tossicità [Lau et al., 2004, 2006, 2007].

I dati relativi all'uomo sono ancora molto scarsi e prevalentemente di natura epidemiologica e riportano deboli associazioni con problemi comportamentali durante lo sviluppo, già elencati nel paragrafo precedente.

5.3 Immunotossicità

Depierre e colleghi sono stati i primi a dimostrare gli effetti immunotossici di PFOA nel topo C57BL/6, dove è stata osservata un'atrofia timica e splenica associata ad un arresto della proliferazione di timociti e splenociti e una marcata riduzione della popolazione cellulare dopo l'esposizione alimentare subcronica alla sostanza chimica [DeWitt JC et al 2009; Fairley KJ et al 2007; Son HY et al 2009]. Questi effetti sono risultati essere mediati da PPAR α , in quanto gli effetti di alterazione del peso degli organi linfoide e la cellularità sono attenuati nei topi PPAR- α null. Inoltre, questo recettore è coinvolto nei processi del sistema immunitario in maniera indiretta modulando il livello di lipidi che portano ad epatotossicità e stress cellulare, effetto che non si verifica in topi PPAR- α null dopo esposizione a PFOA [Yang et al. 2002a]. Di contro, altri autori non riportano tossicità e cambiamenti degli organi del sistema immunitario [Lefebvre et al. 2008, Nelson et al. 1992, Peden-Adams et al. 2007].

PFOS e PFOA inducono inoltre uno sbilanciamento tra linfociti e le subpopolazioni linfocitarie; soprattutto i CD4⁺ e i CD8⁺ sono ridotti [Yang et al. 2000, 2001] con conseguente alterazione della loro funzione. PFOS provoca una riduzione nella liberazione di IgM anche quando somministrato a concentrazioni inferiori a quelle che si trovano nei lavoratori [Peden-Adams et al., 2008], pari anche a 1.66 $\mu\text{g}/\text{K g}$ [Guruge et al. 2009].

Risultati immunologici avversi da esposizione a PFOA sono estesi ad altri PFCs come PFNA [Qazi et al. 2009; Lefebvre et al. 2008; Peden-Adams et al. 2008]. L'esposizione subcronica a PFNA nei topi ha portato a riduzione del peso dell'organo linfoide, arresto del ciclo cellulare e apoptosi in milza e timo, accompagnati da una produzione ridotta di IL-4 e interferone- γ da parte dei linfociti splenici, oltre a up-regolazione di IL-1 β . Simili cambiamenti istopatologici indotti da PFNA sono stati visti nel ratto, con alterazioni delle citochine sieriche, che a loro volta attivano le vie di segnalazione delle MAPKinasasi che modulano il sistema immunitario. Inoltre, l'apoptosi splenica causata da PFNA può essere associata a stress ossidativo, in quanto il livello di perossido di idrogeno aumenta, mentre l'attività della superossido dismutasi e i livelli di Bcl-2 diminuiscono drasticamente nella milza.

Ad ulteriore conferma che il sistema immunitario è uno dei target della tossicità dei PFCs, è stato osservato che i pesticidi sulfamidici, che sono rapidamente metabolizzati a PFOS, influiscono sulle cellule T; inoltre i livelli di IgM diminuiscono anche a esposizioni 10 volte inferiori di quelle associate ad evidente tossicità [Peden-Adams et al. 2007].

Diversi studi dimostrano che i PFCs influenzano la risposta immunitaria innata modificando il rilascio di citochine prodotte dai macrofagi e la loro differenziazione [Qazi et al. 2009b], in particolare per effetto dei perfluorurati risulta modificato il rilascio di IL-6 e TNF- α , citochine proinfiammatorie coinvolte nella risposta immunitaria, e alterata l'attività delle cellule natural

killer [Dong et al. 2010] con conseguente indebolimento dei sistemi di difesa contro le infezioni [Guruge et al. 2009].

Infine, è stato dimostrato che nei topi l'esposizione a PFOS in età gestazionale sopprime la funzione immunitaria nel corso della vita, indicando che il sistema immunitario nello sviluppo è sensibile ai PFAA e che questi deficit funzionali potrebbero non essere apparenti fino a quando gli animali raggiungono l'età adulta [Langley et al. 1985].

Anche nell'uomo uno dei bersagli dell'azione dei PFCs sembra essere il sistema immunitario.

Da uno studio *in vitro* su leucociti umani di Brieger et al. (2010) risulta che dosi superiori a 100 µg/ml di PFOS sono in grado di indurre una significativa diminuzione dell'attività delle cellule natural-killer (NK) e di ridurre il rilascio di citochine proinfiammatorie, TNF- α e IL-6, a seguito della stimolazione liposaccaridica (LPS). Dopo esposizione alle stesse dosi di PFOA è stato invece osservato un aumento lineare della relazione tra stimolazione LPS e del TNF- α e il rilascio di IL-6. Questo risultato è stato confermato anche da Corsini et al. (2010), per cui dopo somministrazione di dosi > 100 µg/ml di PFOS in cellule THP-1 (human promyelocytic cell line) il rilascio di IL-6 e di IFN- γ diminuisce con l'esposizione a PFOS. PFOS e PFOA riducono i derivati delle cellule T, PHA indotti, nonché il rilascio di IL-4 e di IL-10, e PFOS risulta più tossico di PFOA. Ulteriori indagini sono state condotte al fine di identificare i meccanismi molecolari alla base dell'immunotossicità indotta da questi due PFCs e risulta che l'immunotossicità di PFOA sia associata all'attivazione del recettore PPAR- α , mentre l'effetto immunomodulatorio di PFOS pare sia dovuto alla degradazione di I- κ B, coinvolto nel signaling di NF- κ B.

Questo diverso ruolo di PPAR- α nell'immunotossicità indotta da PFOS e PFOA è consistente con i diversi effetti osservati nel rilascio della metalloproteinasi MMP-9 indotto da LPS, per cui PFOA come agonista di PPAR- α modula questo rilascio mentre PFOS non ha alcun effetto [Corsini et al., 2010].

5.4 Disfunzioni riproduttive e ormonali

In molti studi sono stati riportati effetti sulla biosintesi degli ormoni. L'esposizione a PFOA porta a diminuzione di testosterone nel siero e nei testicoli e aumenta i livelli di estradiolo nel siero dei ratti maschi, presumibilmente tramite induzione di aromatasi epatica [Liu et al. 1996; Zhao et al. 2010]. PFOS, PFOA, e alcoli telomerici hanno dimostrato di esercitare un'attività estrogenica in epatociti di Tilapia da allevamento, lievito ed epatociti di Medaka [Liao et al. 2009; Shi et al. 2007; Shi et al. 2009a] e di inibire gli enzimi steroidogenici testicolari [Shi et al. 2009b]. Inoltre, l'acido perfluorododecanoico (PFdoDA) diminuisce la sintesi di testosterone nei ratti maschi, di estradiolo sierico e l'espressione genica dei recettori estrogenici nei ratti

femmina, probabilmente attraverso i pathway dello stress ossidativo [Shi et al. 2010; Slotkin et al. 2008; Liao et al. 2008; Fuentes et al. 2007; Liu et al. 2010].

Il PFNA è stato trovato nel plasma seminale [Guruge et al., 2005], dove, secondo Feng et al. (2010), interferisce con varie funzioni delle cellule del Sertoli. Alte dosi di PFNA inducono inoltre l'espressione della vimentina e un aumento dei livelli dei mRNAs dei geni WT1 (Wilms' tumor gene), MIS (Mullerian inhibing substance) e ABP (Androgen binding prote in), che potrebbe essere indirettamente la causa della riduzione delle concentrazioni di testosterone libero nei testicoli ed interferire con lo sviluppo e la maturazione delle cellule germinali [Feng et al. 2010].

Un altro effetto dell'esposizione ai PFCs, in particolare PFOA e PFNA, è l'inibizione dell'efflusso delle proteine canale ABC [Stevenson et al., 2006]. Queste e proteine contribuiscono alla formazione della barriera emato-testicolare, pertanto, una diminuzione della loro funzionalità potrebbe associarsi ad una riduzione della protezione degli spermatozoi dagli xenobiotici nonché da interferenze con il rilascio di sostanze endogene che ne favoriscono lo sviluppo [Su et al., 2009].

Oltre ad alterare il rilascio e la sintesi di ormoni, i PFC provocano disorganizzazione dell'epitelio seminifero, aumento dell'apoptosi germinale [Shi et al., 2007; Feng et al., 2009], diminuzione del peso e dell'altezza dell'epitelio degli organi sessuali [Bookstaff et al., 1990]. Insieme agli ormoni steroidei, diversi studi confermano anche la capacità dei PFC di alterare gli ormoni tiroidei. Seacat et al (2002) furono i primi a rilevare alterazioni nei livelli di ormoni tiroidei circolanti durante l'esposizione cronica a PFOS in scimmie *Cynomolgus* che consiste in una riduzione del 50% di triiodotiroidina (T3), e una diminuzione anche di tiroxina (T4) confermata poi anche nei ratti [Martin MT et al 2007; Luebker et al. 2005; Weiss et al. 2009] e che sembra essere direttamente correlata con la concentrazione di composto somministrata.

L'esposizione ai PFC può inoltre alterare le dimensioni della tiroide e l'espressione di geni per il metabolismo degli ormoni tiroidei in ratto [Bjork et al. 2008; Weiss et al. 2009]

I dati relativi all'uomo sono scarsi. Alcuni autori riportano effetti dei perfluorurati sulla fecondità e riportano una precoce induzione della maturazione sessuale [Fei et al. 2009; Joensen et al. 2009; Lopez-Espinosa et al. 2011; Christensen et al. 2011]. Pare inoltre siano associati a disfunzioni tiroidee in bambini da 1-17 anni [Lopez-Espinoza et al. 2012]. Esiste un'associazione positiva tra PFOA e tumore alla prostata [Alexander et al. 2003, 2007] e un recente studio mostra per la prima volta una relazione tra i livelli di PFCs nel siero e il rischio di insorgenza del cancro al seno su una popolazione di Inuit dalla Groenlandia. [Bonefeld-Jorgensen et al. 2011]. Sono stati anche riportate proprietà estrogen like per alcuni PFAAs in

linee cellulari umane; è stato ad esempio confermato che PFOS e PFOA transattivano ER α umano nelle cellule embrioniche del rene HEK-293T, e causano un incremento della proliferazione in MCF-7 BOS [Maras et al. 2006; Henry and Fair 2011; Benningof et al. 2011]. Inoltre, PFOA e PFNA possono interagire direttamente con i recettori degli estrogeni e indurre proteine biomarker estrogeno responsive come la vitellogenina nell'uomo [Benninghoff et al. 2011; Wei et al. 2007]. Kjeldsen et al. (2013) hanno dimostrato in uno studio in vitro che PFOS e PFOA agiscono come agonisti dei recettori ER, e insieme a PFNA agiscono anche come agonisti dei recettori androgenici.

5.5 Epatotossicità

L'effetto epatotossico dei PFC è stato notato prevalentemente sugli animali.

Tra gli effetti più riscontrati negli animali da laboratorio c'è l'epatomegalia prodotta da PFOS, PFHxS, PFBS, PFDA, PFNA, PFOA, PFHpA, PFHxA, e PFBA [Kennedy et al. 2004; Lau et al. 2007; OECD (2002); Loveless et al. 2009; US EPA 2005; Kudo et al. 2006; Ehresman et al. 2007; Lieder et al. 2009; Foreman et al. 2009; Chengelis et al. 2009] che è probabilmente associata a proliferazione dei perossisomi. L'esposizione cronica ad alte dosi di PFOA e PFOS portato a vacuolizzazione epatocellulare, degenerazione e necrosi, accumulo di goccioline lipidiche legate al metabolismo lipidico alterato e trasporto, e l'induzione del tumore [OECD 2002; US EPA 2005]. I PFAAs, in particolare il PFCs (C6-C10), sono noti per indurre β -ossidazione epatica perossisomica degli acidi grassi in ratti e topi [Kudo et al. 2006; Kudo et al. 2000; Hoff et al. 2004], con conseguente riduzione dei trigliceridi e colesterolo [[Kennedy et al. 2004; Curran et al. 2008]. L'effetto ipolipemizzante di PFOA è dovuto, in parte, alla ridotta sintesi di colesterolo e un'ossidazione migliorata di acidi grassi nel fegato. Tuttavia, nonostante una maggiore β -ossidazione degli acidi grassi, Kudo et al. (1999) hanno dimostrato un aumento di glicerolipidi e trigliceridi nel fegato di ratti trattati con PFOA, che può essere legato all'aumentata sintesi de novo. Recenti analisi tossicogenomiche dei fegati di roditori dopo l'esposizione al PFOA e PFOS hanno rivelato un forte coinvolgimento di PPAR α [Guruge et al. 2006; Martin et al. 2007; Rosen et al. 2007] ulteriormente confermato da studi su topi PPAR α -null [Wolf et al. 2008; Rosen et al. 2010]. Tuttavia, mentre nei topi PPAR α -null il 99 % dei cambiamenti osservati nella espressione genica sono stati eliminati, nei topi PPAR α -knock out circa il 20 % delle risposte genomiche indotte da PFOA sono stati ancora rilevate, suggerendo l'esistenza di un meccanismo PPAR α indipendente [Starkov et al. 2002]. Le risposte genomiche PPAR α indipendenti potrebbero implicare la partecipazione di altri recettori nucleari, come il costitutivo androstane receptor (CAR) [Rosen et al. 2008; Ren et al.

2009], che è noto per essere coinvolto nel metabolismo xenobiotico, il pregnane X receptor (PXR) e il recettore X del fegato (LXR) [Vanden Heuvel JP et al 2006]. Questi recettori nucleari (PPAR, CAR, PXR, e LXR) sono importanti regolatori di trasporto degli acidi grassi, del metabolismo delle sostanze xenobiotiche, e della colesterolo e omeostasi del glucosio, che può facilmente spiegare alcuni delle risposte cellulari indotte dai PFAAs.

Nell'uomo non ci sono rilevanti evidenze di epatotossicità conseguenti ad esposizione ai PFC anche se, Bjork et al. (2011) riportano che anche epatociti primari umani esposti a PFOA rispondono al trattamento con un aumento dei geni correlati all'attivazione del pathway PPAR- α , come l'Acyl CoA ossidasi, ACOX 1, anche se in maniera molto inferiore rispetto agli epatociti primari murini, forse per il fatto che i livelli di espressione basale di PPAR- α nell'uomo sono molto inferiori rispetto a quelli riscontrati nei modelli murini.

6. CANCEROGENESI E POSSIBILI MECCANISMI D'AZIONE

La letteratura ad oggi disponibile attribuisce ai PFCs un potenziale effetto cancerogeno specie-specifico e evidente soprattutto nei modelli animali. Sono stati segnalati significativi aumenti nell'incidenza di fibroadenoma mammario nei ratti esposti a dosi dietetiche di 30 o 300 ppm (16,1 mg / kg / giorno) di PFOA per 2 anni [US EPA 2005], e di adenoma epatocellulare in ratti esposti a alte dosi di PFOS (1.5 mg/kg/giorno). Si registra anche un aumento significativo nell'incidenza di tumori al fegato, adenomi, tumori a cellule acinose del pancreas e adenomi delle cellule dei testicoli (Leydig) nei ratti esposti cronicamente a 300 ppm di PFOA nella dieta [Kennedy et al. 2004]. Nell'uomo sono riportate associazioni positive tra PFOA e tumore alla prostata [Alexander et al. 2003, 2007] e PFCs e tumore al seno [Bonefeld-Jorgensen et al. 2011]. Studi di esposizione professionale hanno suggerito associazioni deboli tra l'esposizione PFOA e il cancro alla prostata e l'esposizione PFOS e il cancro della vescica [Alexander et al. 2003; Gilliland et al. 1993].

Molto poco chiari e controverse sono invece le ipotesi sui meccanismi d'azione dei perfluorurati che porterebbero all'insorgenza del cancro.

I PFCs infatti sono sempre stati considerati agenti non genotossici, ma alcuni studi sembrano invece attribuirgli un effetto mutagenico. Nei linfociti infatti APFO è in grado di indurre sia aberrazioni cromosomiche che poliploidia [Murli et al. 1996; NOTOX 2000]. Un recente studio condotto da Yao et al. (2005) riporta un aumento di rotture del genoma in cellule HepG2 esposte a PFOA e anche un aumento dose-dipendente della frequenza di micronuclei, indicativo del fatto che si sono verificate rotture cromosomiche. Shabalina et al. (1999) hanno invece notato la presenza di rotture del DNA in HepG2 esposte a PFOA utilizzando il test di

TUNEL e colorazione del DNA con propidio ioduro. Anche Eriksen et al. (2010) hanno evidenziato che l'esposizione al PFNA in cellule HepG2 causa un modesto aumento di danni al DNA ma solo a concentrazioni citotossiche.

Studi condotti per la United States Environmental Protection Agency da un laboratorio indipendente concludono invece che PFOA e APFO non sono in grado di indurre mutazioni in linfociti umani o in cellule di ovaie di criceto cinese (CHO) [Lawler et al. 1995; Lawler et al. 1996]. Lo stesso laboratorio ha anche testato le proprietà mutagene in vivo di APFO avvalendosi di studi micronucleo sul midollo osseo di topi [Hazleton et al. 1995; Murli et al. 1996a] con risultati negativi. Un altro potenziale effetto dell'esposizione ai PFC e potenzialmente responsabile della mitagenicità di questi composti è la produzione di Specie Reattive dell'Ossigeno (ROS). La produzione di ROS indotta da agenti chimici o inquinanti porta la cellula ad uno stato di stress ossidativo e conseguentemente a mutazioni geniche e danni alla struttura del DNA, contribuendo ad alterare l'espressione genica e l'attività enzimatica e di conseguenza anche la proliferazione e l'apoptosi. Tutti questi effetti sono il preludio allo sviluppo del cancro. Nell'uomo Hu et al. (2009) hanno notato che esponendo le cellule Hep G2 umane a concentrazioni di 50-200 $\mu\text{mol/L}$ (50-200 $\mu\text{mol/L}$) di PFOS e PFOA si aveva la generazione di ROS. Effetto confermato anche da Panaretakas et al. (2001) i quali hanno registrato un aumento di anioni superossido e perossido di idrogeno dopo 3 h di esposizione alle stesse concentrazioni. Eriksen et al. (2010) hanno dimostrato che PFOA e PFOS aumentano la produzione intracellulare di ROS di 1.52 e 1.25 volte rispettivamente in cellule HepG2 anche se non in maniera concentrazione-dipendente ma i composti non generano danni al DNA. Molti altri studi hanno verificato il coinvolgimento di ROS e stress ossidativo nei tumori umani [Chen et al. 1992; Ikeda et al. 1993; Kato et al. 2001; Saito et al. 1990; Waalkes et al. 2000], il che indica che la generazione di ROS da parte dei perfluorurati può giocare un ruolo nella carcinogenesi umana.

I PFCs sono però indicati principalmente come agonisti dei recettori PPAR, una famiglia di recettori nucleari di cui sono state identificate tre isoforme: α , β/δ , γ [Dreyer et al. 1992; Jessemann et al. 1990]. Questi recettori vengono attivati dai Proliferatori dei Perossisomi (PPs) i quali sono stati associati a processi di cancerogenesi nel fegato, infatti studi condotti su roditori indicano che l'esposizione ai PPs induce epatomegalia, proliferazione dei perossisomi e ad un aumento del catabolismo degli acidi grassi come risultato di un aumento dell'espressione dei geni coinvolti nel trasporto lipidico e nella β -ossidazione degli acidi grassi [Lazarow et al., 1976; Reddy et al. 1975]; si verifica inoltre un 100% di incidenza di tumore al fegato nei roditori [Reddy et al. 1980].

Diverse evidenze suggeriscono che i PFCs possano agire attraverso l'attivazione dei recettori PPAR in particolare attivando l'isoforma α .

PPAR- α funziona come fattore di trascrizione appartenente alla via ligando-dipendente dei recettori nucleari degli ormoni; dopo il legame con il ligando all'interno del citoplasma, PPAR- α va incontro a modificazioni conformazionali che gli permettono di liberarsi dei co-repressori ed entrare nel nucleo, in cui eterodimerizza con il recettore X retinoico ed avviene il legame con specifiche regioni chiamate 'elementi di risposta ai PP' nel promotore dei geni targets.

L'attivazione di PPAR- α può produrre diversi effetti, come il mantenimento dell'omeostasi lipidica inducendo l'espressione di geni perossisomiali ed enzimi mitocondriali coinvolti nel metabolismo degli acidi grassi [Berger et al. 2002], regolazione del ciclo vita/morte della cellula, aumento della proliferazione cellulare e diminuzione dell'apoptosi, inoltre sembra associata a stress ossidativo e danni al DNA che possono essere implicati nella carcinogenesi mediata dai PPs [Klaunig et al. 2003].

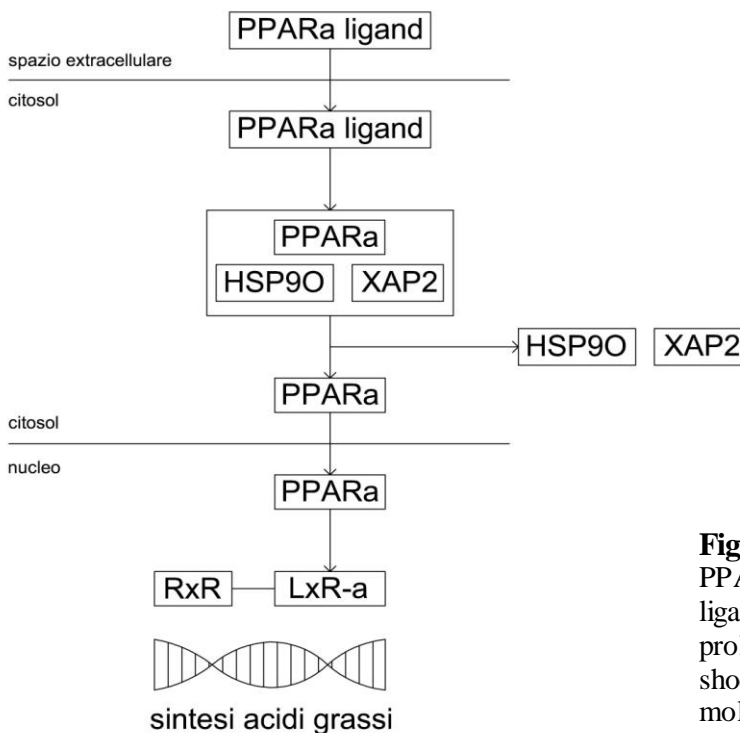


Figura 2: Meccanismo di attivazione di PPAR- α . *Abbreviazioni:* PPAR- α ligand, ligando del recettore attivato della proliferazione dei perossisomi; HSP90, heat shock proteins; XAP2, co-chaperonina molecolare; RXR, recettore X retinoico; LxR- α , liver X receptor α , recettore nucleare.

Dalla letteratura sappiamo che PPAR- α è coinvolto in diversi effetti PFOA-mediati in ratti e topi, e molti studi confermano che PFOA sia in grado di transattivare PPAR- α alterando conseguentemente l'espressione di geni appartenenti ai diversi pathway ad esso correlati, in particolare enzimi dell'ossidazione degli acidi grassi come ACOX 1 (Acyl CoA ossidasi), enzima che caratterizza il primo step limitante della β -ossidazione, Ehhadh, e diversi geni della famiglia dei citocromi P450 [Bjork et al. 2011; Rosen et al. 2009].

Nell'uomo però gli effetti di derivanti dall'attivazione di PPAR- α ad opera dei PFCs sono ancora controverse, infatti questo meccanismo non sembra avere lo stesso effetto che si riscontra nei roditori. È stata infatti riscontrata una variazione nell'espressione di geni associati al metabolismo dei lipidi anche in epatociti primari [Bjork et al. 2011], dopo esposizione con PFOA in particolare, ma non proliferazione perossisomiale. Secondo Palmer et al (1998) ciò è dovuto al fatto che nell'uomo i livelli di espressione di questo recettore sono molto inferiori rispetto ai roditori oppure perché nell'uomo potrebbe indurre differenti risposte rispetto a quelle riscontrate nei topi, come dimostrato da uno studio di Klaunig et al. (2003) in cui si è visto che in topi PPAR- α umanizzati si aveva l'alterazione dei geni associati al metabolismo dei lipidi ma non veniva indotta la proliferazione dei lipidi. Vista la scarsità di dati, questo processo nell'uomo è ancora sotto verifica.

La biogenesi mitocondriale è un altro ipotetico meccanismo d'azione. Starkov et al. (2002) dimostrarono che PFOA e PFOS possono causare un leggero aumento della perdita protonica intrinseca della membrana mitocondriale interna, che somigliava ad un cambiamento nella fluidità di membrana, influenzando così il gradiente elettrochimico e la produzione di ATP. Anche Berthiaume e Wallace nel 2002 notarono una diminuzione nell'attività della citocromo ossidasi e un aumento del numero di copie di DNA mitocondriale dopo esposizione a PFOA inducendo così un aumento della biogenesi mitocondriale, altro meccanismo associato con lo sviluppo di tumori, in quanto può portare a stress ossidativo e induzione di mutazioni nel DNA.

Walters et al. (2009) hanno portato alla luce il fatto che PFOA sia in grado di trans attivare anche un'altra isoforma dei recettori PPAR, ossia PPAR- γ il quale è coinvolto nella biogenesi mitocondriale.

Un regolatore chiave dell'attivazione del pathway PPAR- γ , e quindi della biogenesi mitocondriale e della trascrizione dei geni mitocondriali, è il PPAR- γ coattivatore-1 α (Pgc-1 α nel topo, PPARGC-1 α nell'uomo). L'ipotesi è che PFOA possa stimolare l'attività di Pgc-1 α tramite attivazione diretta o indiretta di recettori nucleari PPAR oppure tramite cambiamenti della bioenergetica percepiti da AMPK (AMP protein chinasi attivata).

Oltre legandosi direttamente al recettore nucleare, PFOA può attivare il pathway di PPAR- γ anche indirettamente, come conseguenza dell'inibizione del metabolismo mitocondriale. Questo può portare ad un accumulo intracellulare di acidi grassi nel fegato, i quali transattivano PPAR- γ e di conseguenza Pgc-1 α . Quest'ultimo coattiva l'espressione del recettore α degli estrogeni (Err α), principale induttore dell'espressione del fattore nucleare di respirazione 1 e 2 (Nrf1 e Nrf2) [Ryan et al. 2007]. Entrambi stimolano la sintesi delle proteine mitocondriali

codificate dal nucleo. Nrf2, inoltre, induce l'espressione del fattore di trascrizione mitocondriale A (Tfam), che è richiesto per la replicazione dell' mtDNA ed è parte necessaria al complesso di trascrizione mitocondriale [Parisi et al. 1991; Ryan et al. 2007]. Viene così stimolata la biogenesi mitocondriale, forse come meccanismo compensatorio per ripristinare la capacità mitocondriale di ossidazione degli acidi grassi.

I risultati ottenuti da Walters et al. (2009) indicano comunque che nei ratti la somministrazione di PFOA si associa ad un'attivazione trascrizionale del pathway PPAR- γ , con aumento dell'espressione del gene Pgc-1 α e stimolazione della biogenesi mitocondriale come dimostrato dal raddoppio del numero di copie dell' mtDNA. La trascrizione dei geni per le proteine della fosforilazione ossidativa (OXPHOS) codificati dall' mtDNA è risultata essere 3-4 volte maggiore rispetto alla trascrizione dei geni nucleari indicando una preferenza nella trascrizione di mtDNA. L'aumento dell'espressione del gene Pgc-1 α è stato, inoltre, confermato anche a livello proteico mediante Western Blot.

Nell'uomo non è stato ancora identificato questo meccanismo.

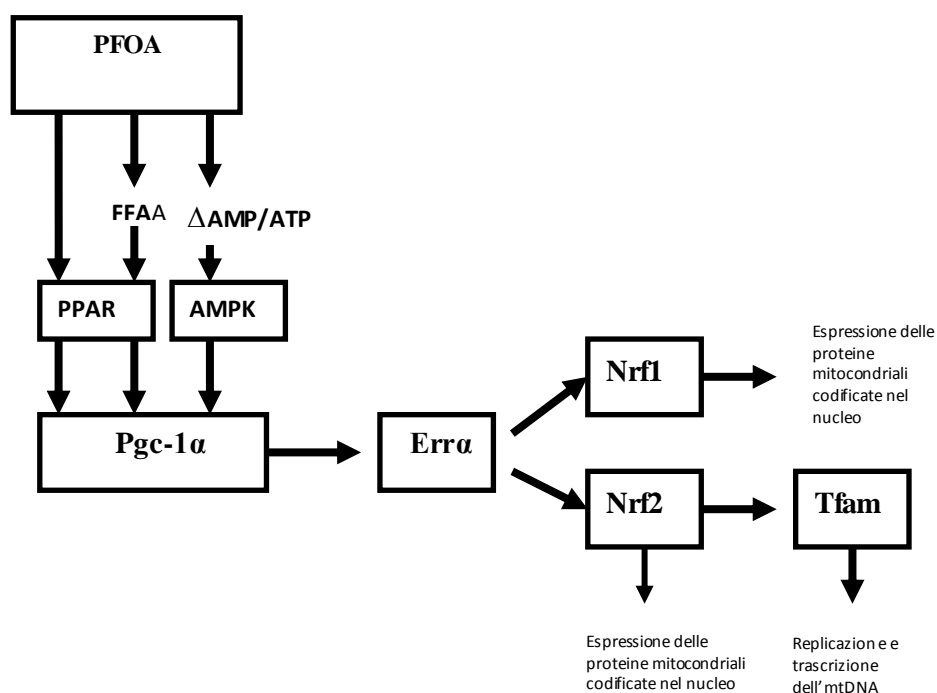


Figura 3: Pathway di Pgc-1 α nei roditori e possibile modo di attivazione da parte di PFOA.

Pgc-1 α può essere stimolato da PFOA tramite attivazione diretta o indiretta di recettori nucleari PPAR oppure tramite cambiamenti della bioenergetica percepiti da AMPK. Abbreviazioni: PFOA, acido perfluorottanoico; FFA, acidi grassi liberi; PPAR, recettore attivato della proliferazione dei perossisomi; AMPK, AMP protein chinasi attivata; Pgc-1 α , recettore gamma coattivatore 1 α proliferatore attivato dei perossisomi; Err- α , recettore α degli estrogeni; Nrf1 e Nrf2, fattore nucleare della respirazione 1 e 2; Tfam, fattore di trascrizione mitocondriale A.

Negli ultimi anni, da studi epidemiologici e studi condotti su modelli animali sappiamo che alcuni PFCs hanno caratteristiche estrogen-like, che possono legarsi ai recettori ormonali e disturbare l'omeostasi ormonale. Gli ormoni sono interessati nell'insorgenza di diversi tumori, pertanto anche l'alterazione della segnalazione ormonale potrebbe rappresentare un possibile meccanismo di cancerogenicità indotti da questi composti, ma questa ipotesi è ancora sotto studio ed è necessario verificare come e se vengono alterate le vie di segnalazione a valle dei recettori ormonali.

7. EFFETTI EPIGENETICI

Nonostante le conflittuali evidenze riguardo gli effetti genotossici, i PFCs sono considerati agonisti dei recettori PPAR, i quali sono considerati come agenti non genotossici. Nonostante ciò diversi studi indicano che l'esposizione a questi composti alteri l'espressione di alcuni geni. La modulazione dell'espressione genica può avvenire anche attraverso alterazioni epigenetiche come la metilazione. La metilazione del DNA è un meccanismo che consiste nell'aggiunta di gruppi metili alle cisteine presenti nei dinucleotidi CpG, poco rappresentati nel genoma umano, ma concentrate nelle CpG island. Queste isole si estendono per circa 0,5-3 kb, e si trovano in media ogni 100 kb nel genoma, spesso nella zona di promotore di geni (Cross & Bird 1995). Infatti, circa la metà di tutti i geni nell'essere umano (circa 45 000 geni) contengono isole CpG (Antequera & Bird 1993). L'alterazione epigenetica del DNA è ereditabile, ma non altera la sequenza nucleotidica, a differenza delle mutazioni genetiche (Feinberg 2001) rendendole così potenzialmente reversibili (Baylin et al. 2001). La metilazione avviene ad opera di DNA-metiltransferasi citosina-1 (DNMT1) [Bestor e Verdine 1994]. Questo enzima trasferisce un gruppo metile dal donatore di metile, S-adenosilmetionina, al DNA nascente utilizzando un DNA stampo emimetilato.

La metilazione del DNA gioca un ruolo importante in diverse meccanismi come l'inattivazione del cromosoma X, lo sviluppo normale, la repressione della trascrizione genica, la soppressione delle sequenze di DNA parassitarie, ma anche nell'insorgenza del cancro. [Heard et al. 1997, Li et al. 1993, Weiss & Cedar 1997, Chan et al. 2000, Yoder et al. 1997]. Tramite le alterazioni epigenetiche infatti può essere regolata l'espressioni di geni che intervengono nella cancerogenesi. Inoltre, le alterazioni epigenetiche sono considerate eventi precoci nella carcinogenesi.

Dalla letteratura è noto che molti cancerogeni non genotossici come piombo, acetato, pirazinamide e arsenico inorganico, mediano l'espressione genica alterando la metilazione del DNA e inducendo tossicità epatica [Li et al. 2011; Kovalenko et al. 2007; Xie et al. 2007],

probabilmente attraverso la deplezione del glutatione [Lee et al. 2009; Foley et al. 2009]. Recentemente, Wan et al. (2010) hanno riportato che l'esposizione prenatale a PFOS è associata ad un'ipermetilazione del promotore del gene GSTP nei ratti. Nell'uomo, trattamenti con PFOA su epatociti immortalizzati (L02), non alterano la metilazione globale del DNA ma viene comunque registrata una ipermetilazione dose risposta nel promotore di GSTP ed anche un'up-regolazione dell'espressione di DNMT3A (per la sintesi de novo di 5mdC da dC), p16 (per la regolazione del ciclo cellulare) e Acox (per il metabolismo dei lipidi) [Tian et al., 2012]. Da uno studio di Guerrero-Preston R. et al. (2010) risulta che l'esposizione prenatale a PFOA è inversamente proporzionale a metilazione globale del DNA nel siero cordonale. Watkins D.J et al (2014) osservano una consistente associazione positiva tra livelli di PFOS nel siero di 685 partecipanti allo studio e la percentuale di metilazione nelle regioni ripetute LINE-1 (Long Interspersed Nuclear Element -1), un gruppo di sequenze retrotrasposoniche, la cui ipermetilazione è stata associata a instabilità genomica e rischio di cancro [Belancio et al. 2009, 2010]. Questa relazione non è presente con PFOA o PFNA. Ancora una volta possiamo dire che gli studi presenti in letteratura relativi agli effetti sulla metilazione derivanti dall'esposizione a PFC nell'uomo sono molto pochi. Si può però ipotizzare che i perfluorurati abbiano un effetto sulla metilazione e di conseguenza anche sulla modulazione di alcuni geni.

SCOPO DELLA TESI

Nonostante i precedenti studi sperimentali ed epidemiologici, gli effetti dei composti perfluorurati (PFCs) sulla salute umana rimangono tuttora controversi.

L'acido perfluorottano sulfonato (PFOS), è già stato indicato come sospetto cancerogeno e rispetto ad esso esiste un'ampia letteratura; per l'acido perfluorottanoico (PFOA) è stata segnalata la capacità di indurre tumori nei roditori (EPA 2002) e nel 2009 è stato iscritto nell'elenco dei POPs (Persistent Organic Pollutants) da parte dell'UNEP (United Nations Environment Program). Al momento non esistono dati relativi all'effetto dell'acido perfluorononanoico (PFNA). E' stata verificata la presenza dei PFCs nel sangue cordonale e nel latte materno, per cui è plausibile supporre che la loro stessa trasmissione sia la causa di documentati danni al neonato quali minor peso alla nascita, minore lunghezza, circonferenza addominale inferiore, carente sviluppo motorio.

Alla luce di queste evidenze lo scopo di questo studio è stato la valutazione degli effetti biologici e molecolari dei composti perfluorurati PFOA e PFNA nell'uomo per definire il rischio derivante dall'esposizione a queste sostanze.

A tal fine, per valutare gli effetti biologici su ciclo cellulare e morte cellulare, sono state utilizzate linee cellulari tumorali umane e primarie appartenenti a putativi organi target e sono state esposte a concentrazioni crescenti di PFOA e PFNA nel range dei livelli sierici registrati nella popolazione umana e usati in precedenti studi di tossicità dei PFCs.

Successivamente, per chiarire il possibile coinvolgimento dei pathways PPAR- α e PPAR- γ nella risposta ai PFCs nell'uomo, come già dimostrato nel topo, si sono valutati i livelli di espressione dei geni ACOX 1 e PPARGC-1 α , mediatori dei due pathways, a diversi tempi di esposizione ai trattamenti.

Infine, sono stati valutati gli effetti epigenetici, in particolare la metilazione globale e genespecifica, su linee cellulari primarie di epitelio mammario allo scopo di individuare eventuali variazioni nei livelli di metilazione su promotori di geni markers del tumore al seno e geni chiave dei pathway del ciclo cellulare, apoptosi, pathway di PPAR e metabolismo degli acidi grassi, metabolismo degli estrogeni.

Il presente studio è stato effettuato presso il Laboratorio di Oncologia ed Ematologia Pediatrica 'Lalla Seràgnoli' U.O. Pediatria Pession del Policlinico Sant'Orsola-Malpighi di Bologna in collaborazione con il professor Rafael Guerrero-Preston del laboratorio di Head and Neck Cancer Research, Department of Otolaryngology della Johns Hopkins University.

MATERIALI E METODI

1. COLTURE CELLULARI

In questo studio sono state utilizzate quattro linee cellulari tumorali umane appartenenti a diversi tessuti: Molm-13 (leucemia acuta mieloide umana), RPMI 8402 (leucemia acuta linfoblastica umana a immunofenotipo T), HeLa (carcinoma della cervice umana), HepG2 (epatoma umano). Sono anche state utilizzate cellule primarie: WBC (whole blood cells), HMEC (cellule primarie di epitelio mammario), MCF12A (cellule primarie di epitelio mammario immortalizzate).

Tutte le linee cellulari tumorali sono state cresciute in mezzo di coltura costituito da RPMI 1640 (GIBCO) con 10% di siero fetale bovino scomplementato (FBS, Invitrogen), 2mM L-glutammina (GIBCO), 100U/ml penicillina e 100 g/ml di streptomina (GIBCO). Le HMEC sono state cresciute con terreno HuMEC ready medium costituito da HuMEC Basal serum free medium e da HuMEC supplement kit contenente epidermal growth factor, hydrocortisone, isoproterenolo, transferrina, insulina, estratto pituitario bovino. Le MCF12A sono state cresciute con terreno MEGM™ Mammary Epithelial Cell Growth Medium con epidermal growth factor, hydrocortisone, isoproterenolo, transferrina, insulina, estratto pituitario bovino. Le WBC sono state ricavate da Buffy coat tramite Ficoll, cresciute in fiasche con terreno Gibco® PB-MAX™ Karyotyping Medium RPMI 1640 medium, contenente Fetal Bovine Serum (FBS), L-glutamine, e phytohemagglutinin (PHA).

Tutte le linee sono state mantenute in incubatore umidificato a 37°C in atmosfera costituita da 5% di CO₂. Le cellule sono state coltivate in fiasche T25 o T75 (FALCON). Le cellule in adesione sono state trapiantate ogni qual volta arrivavano a confluenza applicando un veloce lavaggio in PBS 1X e un'esposizione di 5 minuti in tripsina 1X e EDTA. Nelle linee primarie la tripsina è stata neutralizzata tramite Tripsine Neutralizer Solution (Gibco) seguita da centrifugazione e risospensione in terreno adatto. Le cellule in sospensione sono state semplicemente centrifugate e risospese in terreno nuovo.

2. TRATTAMENTI

Le cellule utilizzate nei saggi di vitalità e propidio ioduro sono state trattate con 8 dosi seriali di acido perfluorottanoico (PFOA) e acido perfluorononanoico (PFNA) (Sigma-Aldrich®) (Concentrazioni finali: 3.12 nM, 312 nM, 3.125 µM, 31.25 µM, 62.5 µM, 125 µM, 250 µM, 500 µM) in un range che comprende ampiamente le concentrazioni minime riscontrate nel siero umano e nel latte materno.

Le soluzioni madre di PFOA e PFNA (600 mM) sono state ottenute sciogliendo i reagenti in DMSO (Dimetil solfossido).

Le diluizioni seriali per raggiungere le concentrazioni riportate sopra sono state ottenute utilizzando il terreno di coltura e sono state preparate al momento del trattamento.

I controlli sono stati trattati con terreno di coltura a cui è stata aggiunto il DMSO alla più alta concentrazione utilizzata nelle dosi delle sostanze testate (0.08%). Il DMSO allo 0.08% non è risultato essere tossico.

Per le HMEC e MCF12A è stato utilizzato un range di concentrazione più ristretto (15.6 μ M, 31.25 μ M, 62.5 μ M, 125 μ M, 250 μ M).

3. DERMINAZIONE DELLA VITALITA' CELLULARE CON WST-1

La vitalità cellulare delle colture dopo trattamento con i PFCs è stata valutata utilizzando il Cell Proliferation Reagent WST-1, un saggio colorimetrico a base di WST-1 (4-[3-(4-Iodophenyl)-2-(4-nitrophenyl)-2H-5-tetrazolio]-1,3-benzene disulfonate). Il WST-1 è un sale di tetrazolio che viene ridotto a sale di formazano dalle succinato-tetrazolio reduttasi presenti nei mitocondri delle cellule vitali.

La quantità di sale di formazano prodotto è direttamente correlabile al numero di cellule metabolicamente attive e di conseguenza all'attività delle deidrogenasi mitocondriali presenti nel campione e può essere quantificata attraverso misura dell'assorbanza alle lunghezze d'onda di 450-750 nm.

Le cellule sono state seminate in piastre da 96 pozzetti in numero diverso in base al tipo cellulare. L'esperimento è stato condotto in triplicato per ogni concentrazione di composto. Per ogni linea e time points, l'esperimento è stato condotto in quadruplicato .

Le cellule in adesione, dopo la semina, sono state incubate in terreno di crescita per almeno 24 ore prima dell'aggiunta dei composti, mentre le cellule in sospensione sono state lasciate in incubazione per almeno 2 ore prima del trattamento.

Dopo 24, 48 e 72 ore di trattamento, sono stati aggiunti 10 μ l di WST-1 per pozzetto e le piastre sono state conservate a 37°C in atmosfera costituita da 5% di CO₂. Dopo 2 ore di incubazione, si è proceduto con la lettura delle piastre al lettore SpectraMAX, M2 molecular devices, misurando l'assorbanza a 450 nm e a 750 nm. Dalla differenza delle letture alle 2 lunghezze d'onda si sono ottenuti per ciascun pozzetto valori di assorbanza correlati alla vitalità cellulare. La percentuale di inibizione cellulare dopo trattamento è stata calcolata dal rapporto dei valori di assorbanza delle cellule trattate verso i controlli non trattati. I grafici dose-risposta sono stati

ottenuti utilizzando GraphPad Prism Software (San Diego, CA, USA). L'analisi statistica è stata effettuata tramite paired t test, $P \leq 0.05$.

4. DETERMINAZIONE DEL CICLO CELLULARE E APOPTOSI TRAMITE PROPIDIO IODURO

Il ciclo cellulare e la morte cellulare sono stati analizzati marcando le cellule con ioduro di propidio (PI), un colorante fluorescente che si intercala al DNA ogni 4-5 paia di basi, marcandolo in maniera quantitativa. L'intensità di fluorescenza correla pertanto con la quantità di DNA presente nelle cellule marcate da PI permettendo di distinguere le varie fasi del ciclo cellulare e l'apoptosi.

Le cellule in fase G1 sono infatti caratterizzate dalla presenza di una unica copia di DNA, quelle in fase G2/M da due copie, mentre le cellule in fase S sono caratterizzate da un quantitativo intermedio tra aploide e diploide poichè sono nella fase di replicazione del DNA. La fase subG1 invece presenta un quantitativo inferiore di DNA rispetto alla fase G1, essendo rappresentata da DNA degradato o cellule con contenuto ipoploide di DNA rispetto alle cellule sane.

Le cellule sono state seminate in fiasche di coltura e trattate con PFOA e PFNA dopo 24 ore dalla semina per le cellule in adesione e 3 ore per le cellule in sospensione. Dopo 24, 48 e 72 ore di trattamento, le cellule sono state staccate dalle fiasche di coltura tramite tripsina 1X ed EDTA oppure semplicemente raccolte nel caso delle cellule in sospensione ed in seguito lavate in PBS 1X. Per ogni campione sono state prelevate 5×10^5 cellule e fissate con etanolo al 70% per 30 minuti in ghiaccio o conservate a -20°C per giorni. È stato poi eliminato l'etanolo e sono stati aggiunti 50 μL di RNasi A (10 $\mu\text{g}/\text{ml}$) e 400 μL di soluzione ipotonica contenente PI (PI 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ e PBS 1X) ed incubati per 1 ora a 4°C al buio in accordo con il protocollo. L'etanolo al 70% funge da fissativo, mentre l'RNasi elimina tutti i filamenti di RNA che potrebbero interferire con la lettura, poiché il PI si intercala anche all'RNA. La fluorescenza emessa dallo ioduro risulterà proporzionale alla quantità di DNA cellulare.

L'acquisizione dei dati relativi alla fluorescenza è stata operata mediante citofluorimetro FACSCANTO II il cui laser eccita il campione ad una λ di 488 nm. L'analisi è stata effettuata tramite Software FACSDiva.

5. ESTRAZIONE RNA

L'estrazione dell'RNA Per l'analisi di espressione genica è stata effettuata con RNeasy Mini Kit della Qiagen. Dopo i trattamenti le cellule sono state raccolte, lavate in PBS 1X e

pellettate, quindi si è proceduto con l'estrazione dell'RNA sulla base del protocollo. L'RNA è stato eluito aggiungendo 30 µl di acqua Rnase-free. L'RNA totale di ciascun campione è stato quantificato tramite lettura al NanoDrop ND-1000 e conservato a -80°C.

6. ESTRAZIONE DEL DNA TRAMITE FENOLO CLOROFORMIO-8 (PC-8)

Dopo i trattamenti le cellule sono state raccolte e lavate in PBS 1X e digeriti in 3 ml di SDS-TE (tris HCl 1M pH 9, EDTA 0.5M pH 8, NaCl 5M, DI water, SDS 1%) con 0,02% di Proteinase K. I campioni sono stati incubati a 48°C per 3 giorni aggiungendo due volte al giorno 5 µl di Proteinase K 2%. Dopo i 3 giorni è stato aggiunto il PC-8, vortexato per 40 secondi e dispensato negli appositi vacutainer tube (Quiagen). In seguito centrifugato per 15 minuti a 2000 rpm. Lo strato organico viene poi aggiunto ad una soluzione contenente etanolo 100%, ammonio acetato 7,5M e glicogeno per far precipitare il DNA e viene messo a decantare a -20°C per almeno due ore per poi essere centrifugato 45 minuti a 5100 RPM, e lavato 2 volte in etanolo 70%. Il pellet viene lasciato asciugare e risospeso in 30 µl di LoTE (acqua distillata, Tris HCl 1M pH 9, EDTA 0.5M pH 8). Il DNA è stato quantificato tramite lettura al NanoDrop ND-1000 e conservato a -20°C.

7. RETROTRASCRIZIONE, RT-PCR

L'RNA ottenuto è stato retrotrascritto a cDNA utilizzando la trascrittasi inversa della Roche. 0.5-1 µg di RNA per campione sono stati preparati in H₂O RNAase free per un volume finale di 12 µl. All'RNA sono stati aggiunti Oligo dT primers secondo protocollo, il tutto è stato incubato a 65°C per 10 minuti nel termociclatore. Dopo incubazione, 7 µl di mix contenente 4.0 µl di 5X Reaction buffer, 0.5 µl di RNAase inhibitor 40U/µl, 2.0 µl di dNTPs (10mM ognuno), 0.5 µl di Reverse Transcriptase 20 U/µl sono stati aggiunti alla miscela RNA/Oligo dT primers per un volume finale di 20 µl. I campioni sono incubati a 50°C per 60 minuti e poi a 85°C per 5 minuti; in seguito sono stati conservati a -20°C.

8. REAL TIME PCR

La PCR quantitativa è stata realizzata utilizzando la metodica SYBR Green tramite lo strumento LightCycler[®] 480 (Roche).

Questo saggio di quantificazione si basa sull'incremento della fluorescenza, in seguito ad amplificazione del template, causato dalla molecola SYBR Green legata al DNA a doppio filamento. Al termine dell'amplificazione, per ogni campione si è calcolato il "valore del ciclo soglia", Ct, proporzionale alla quantità di template di partenza.

La Real-Time è stata eseguita partendo da 1 µl di cDNA, ottenuto come precedentemente descritto, a cui sono stati aggiunti 12.5 µl di FastStart SyBr Green Master Mix 2X (Roche), 0.2 µM di primer senso e 0.2 µM di primer antisenso e H₂O per un volume finale di 25 µl.

Come gene di controllo endogeno per la normalizzazione dei dati è stato utilizzato il gene housekeeping glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH). Per l'amplificazione delle diverse sequenze geniche sono state utilizzate le seguenti coppie di primers, disegnati utilizzando il software Primer Express e controllati su Blastn:

- PPARGC-1 α
primer s (5'-3') 5'-ACCAGCCTCTTTGCCCAGAT-3'
primer as (5'-3') 5'-AAATGAGGGCAATCCGTCTTC-3'
- ACOX 1
primer s (5'-3') 5'-GGGACCCATAAGCCTTTGCC-3'
primer as (5'-3') 5'-GCCTTAGACAGAGCCCGAGC-3'
- GAPDH
primer s (5'-3') 5'-CCAATATGATTCCACCCATGGC-3'
primer as (5'-3') 5'-CTTGATTTTCGAGGGATCTCGC-3'

Per ogni campione, la reazione di amplificazione è stata effettuata in duplicato e l'analisi successiva è stata effettuata calcolando la media dei valori di Ct ottenuti per pozzetto.

Le condizioni di PCR per l'amplificazione dei cDNA PPARGC-1 α e ACOX 1 sono: 10 minuti a 95°C per l'attivazione della polimerasi e (95°C 15 secondi, 62°C 30 secondi, 72°C 30 secondi) per 40 cicli. Per l'amplificazione del gene GAPDH la temperatura di annealing è di 60°C.

I dati grezzi di espressione genica sono stati elaborati per un'analisi quantitativa relativa calcolando a partire dai valori soglia (ct), i Δ Ct, i $\Delta\Delta$ Ct e i Ratio. Intendiamo per valore soglia il ciclo della PCR in cui viene rilevato un aumento significativo della fluorescenza. I Δ Ct sono determinati dal rapporto del valore medio dei Ct del gene in esame rispetto al valore medio dei

Ct del gene di controllo endogeno, nella fattispecie GAPDH. I $\Delta\Delta Ct$ rappresentano il rapporto tra il ΔCt del campione di interesse e il ΔCt del campione rispetto al quale si intende valutare la differenza del livello di espressione, nello specifico i campioni controllo. Il Ratio è il livello di espressione del gene di interesse verso il controllo, dato da $2^{-(\Delta\Delta Ct)}$.

Il livello di espressione dei trattati viene considerato convenzionalmente diverso quando differisce di almeno 2 volte dal livello di espressione del controllo (*fold change* >2). L'analisi statistica è stata effettuata tramite one-way ANOVA con test di Dunnet ($P \leq 0.05$).

9. DETERMINAZIONE DELLAMETILAZIONE GLOBALE

La quantificazione della metilazione è stata condotta attraverso il kit ELISA Methylflash Methylated DNA quantification (colorimetric). Quest'ultimo è un high-throughput kit che permette di misurare la metilazione globale utilizzando un minimo di 50 ng di DNA genomico. 60-100 ng di DNA sono stati diluiti in binding buffer ed incubati a 37°C per 90 minuti. I campioni sono stati poi incubati con capture e detection anticorpi e in seguito letta l'assorbanza a 450 nanometri con SpectraMAX M2e, Molecular Devices. La quantità di DNA metilato è proporzionale all'intensità degli OD misurata. La quantità assoluta di DNA metilato è stata quantificata come da protocollo tramite l'utilizzo di una curva standard plottando gli OD vs 5 diluizioni seriali di DNA controllo, completamente metilato (1-10 ng).

10. GENOME WIDE METHYLATION TRAMITE COMPREHENSIVE HIGH-THROUGHPUT ARRAYS FOR RELATIVE METHYLATION (CHARM)

La Comprehensive High-throughput Arrays for Relative Methylation (CHARM) è una piattaforma sperimentale che è stata recentemente sviluppata per valutare la metilazione del DNA (DNAm) sull'intero genoma con approccio analitico. Questa piattaforma comprende la grande maggioranza delle sequenze potenzialmente metilate che sono mancanti nei promoter o CpG island arrays ed è in grado di riconoscere la metilazione sull'intero genoma con una sensibilità del 100% e una specificità del 90%.

Il DNA è stato estratto tramite fenolo cloroformio dai campioni controllo ed esposti a concentrazione di 31,25 μM dopo 72 ore di esposizione. Il DNA è stato in seguito frammentato tramite Diagenode **Bioruptor**®, in modo da produrre frammenti di lunghezza compresa tra 200 e 800 bp. I frammenti di DNA metilati sono stati isolati tramite immunoprecipitazione (methylated DNA immunoprecipitation, MeDIP, Diagenode) con anticorpo specifico per le 5-methyl cystidine. Dopo essere stati purificati tramite IPure kit (Diagenode) i campioni metilati

ed i campioni controllo (input) sono stati amplificati utilizzando il kit Whole-Genome Amplification (Sigma–Aldrich, St. Louis, MO) e purificati tramite Quick PCR Purification Kit (Qiagen). Gli amplificati degli input e degli immunoprecipitati ottenuti sono stati marcati in maniera differente e ibridizzati agli array NimbleGen 2.1 M feature CHARM microarray (Roche-NimbleGen) come indicato nel protocollo. Questi array coprono 2,1 milioni di siti CpG presenti sull'intero genoma. Gli arrays sono stati scannerizzati con NimbleGen MS 200 Microarray Scanner ed i dati sono stati estratti con software DEVA. L'analisi dei dati è stata fatta incrociando i risultati ottenuti tramite BioC 2.6 (R-2.11) e BioC 2.13 (R-3.0) per identificare le regioni DMRs. Per l'analisi preliminare sono stati confrontati i picchi di fluorescenza tra controlli e trattati. Sono stati considerati due gruppi, uno dei controlli e uno dei trattati. Da entrambi i gruppi sono stati eliminati i geni metilati in entrambi i gruppi, in modo da ottenere solo i geni che acquisivano metilazione dopo l'esposizione o quelli che venivano demetilati dopo l'esposizione. Sono stati considerati fortemente metilati quelli che presentavano picchi superiori ad un valore di 4 e che non risultavano metilati nel controllo, mediamente metilati quelli con valore di picco compreso tra 2 e 3, e debolmente metilati quelli con valori di picco inferiori a 2.

In particolare sono stati valutati i livelli di metilazione di 35 geni solitamente metilati nel tumore al seno (TP53, TP73, SFRP1, SFRP2, RASSF1, BRCA1, BRCA2, TIMP3, SASHI, GNE, WT1, HSD17B4, HCK, ARAF, EPHA2, GUCY2F, IGFBP7, PAX6, PSAT1, GBP4, SFN, E-caderina, GSTP1, BRCA3, CDKN1A, RAR β 2, APC, ESR1, ESR2, P16, P15, NOTCH2, CDH1, PGR, PPP2RB2, ABCB1), e geni chiave appartenenti ai pathway del ciclo cellulare, apoptosi, pathway di PPAR e metabolismo degli acidi grassi, pathway degli estrogeni e androgeni.

RISULTATI

1. SAGGI DI VITALITA'

I dati sulla vitalità cellulare relativi a tutte le linee tumorali in seguito a trattamento con PFOA dopo 48 e 72 ore di trattamento, rivelano una diminuzione significativa della vitalità solo alla concentrazione di 500 μM ad entrambi i tempi di incubazione col composto. Nel caso delle MOLM-13, MCF-7 e HEPG2 l'effetto è tempo dipendente. Solo nelle HEPG2 si verifica un calo della vitalità significativo fino a circa il 20% anche alla concentrazione di 250 μM al secondo time point, raggiungendo una vitalità vicina allo 0 alla concentrazione più alta (Figura 4).

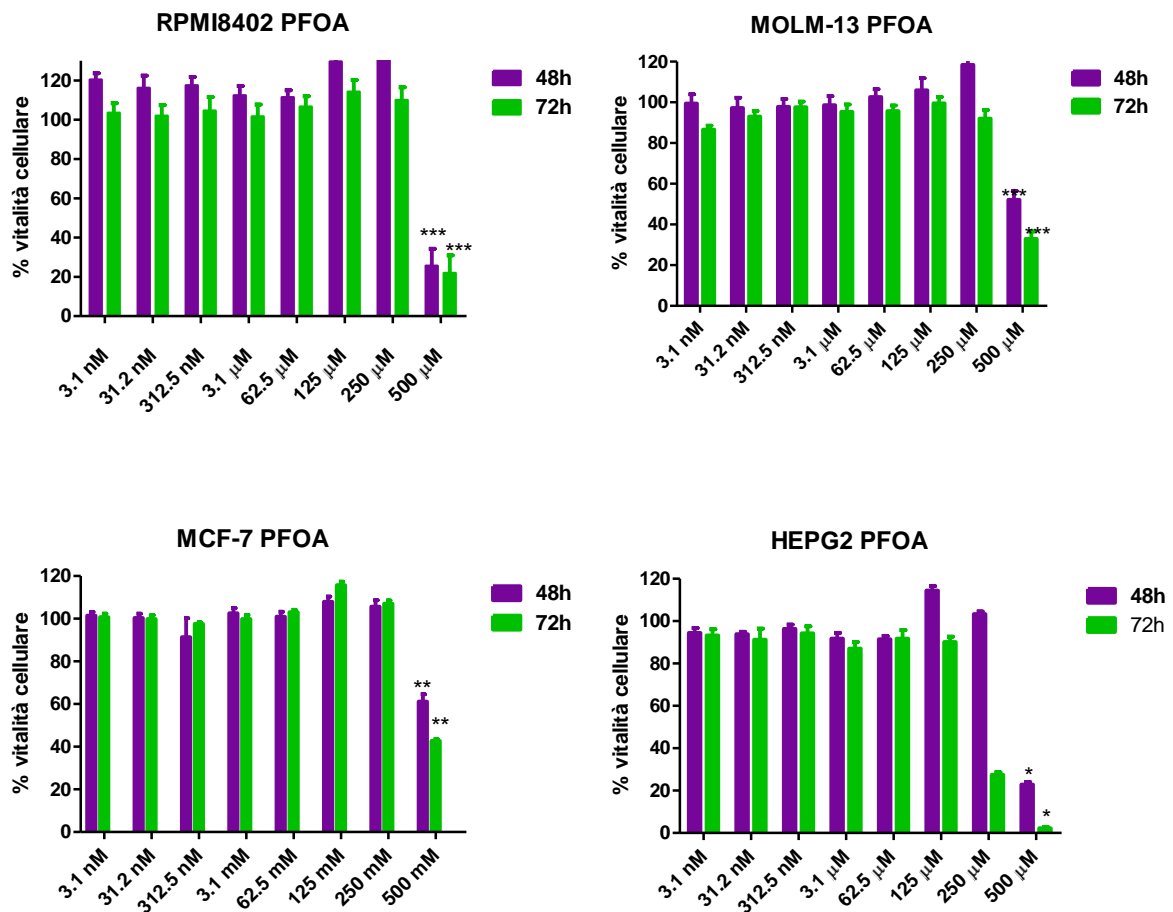


Figura 4: Vitalità cellulare espressa in percentuale per tutte le linee considerate in presenza di dosi crescenti di PFOA. Analisi statistica tramite paired t test (* $P \leq 0.05$; ** $P \leq 0.01$; *** $P \leq 0.005$).

In presenza di PFNA in tutte le linee cellulari tumorali si ottiene un calo della vitalità pari a circa il 100% alla concentrazione più elevata. Questa molecola sviluppa comunque un maggiore effetto rispetto al PFOA in quanto determina una diminuzione della vitalità anche alla concentrazione di 250 μM in maniera tempo dipendente e significativa su tutte le linee tranne nelle MOLM-13. La linea cellulare che sembra subire maggiormente l'effetto della molecola è quella delle HEPG2 in cui si nota un effetto tempo dipendente anche alla concentrazione di 125 μM (Figura 5).

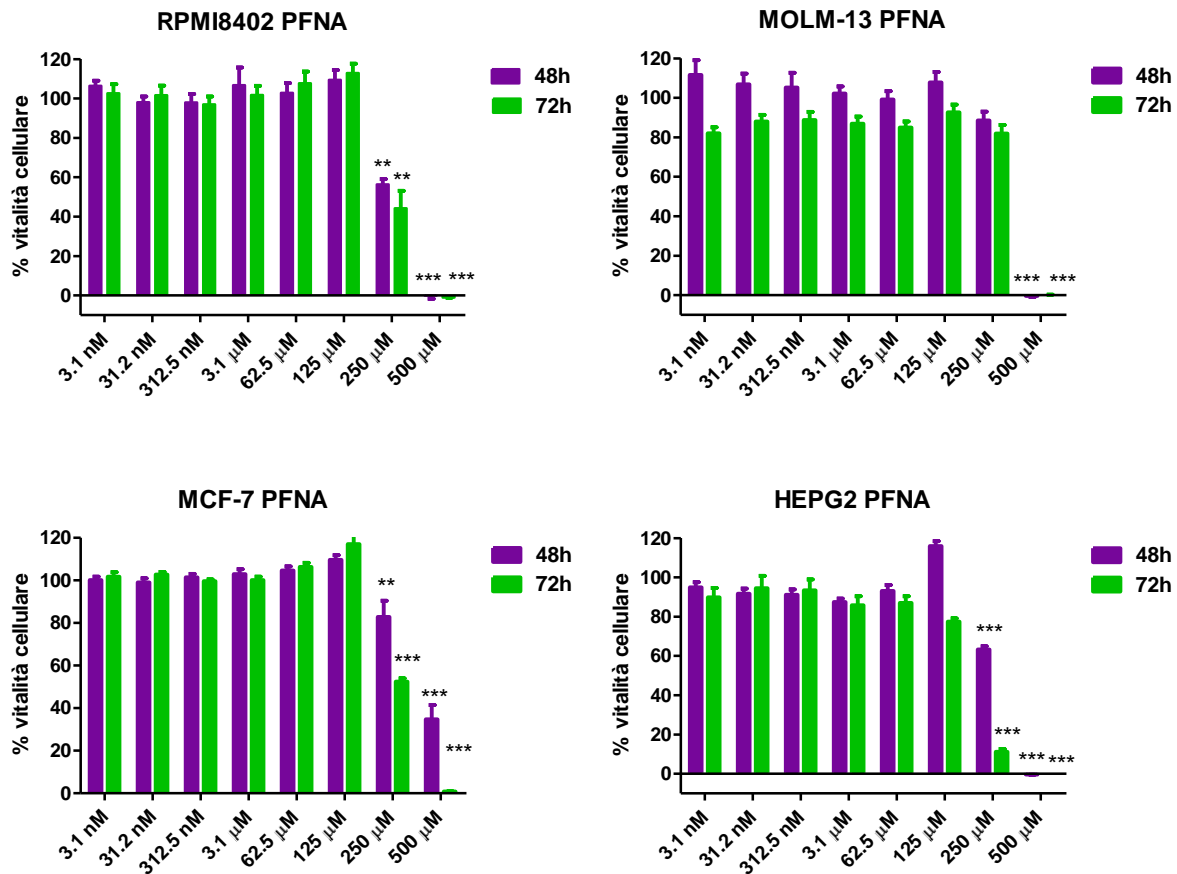


Figura 5.: Vitalità cellulare espressa in percentuale per tutte le linee considerate in presenza di dosi crescenti di PFNA. Analisi statistica tramite paired t test (* $P \leq 0.05$; ** $P \leq 0.01$; *** $P \leq 0.005$).

Riguardo alle cellule primarie, le WBC reagiscono alla presenza di prefluorurati in maniera simile alle due linee emopoietiche tumorali considerate. In presenza di PFOA si verifica un calo della vitalità cellulare di circa il 40% alla concentrazione più elevata in maniera tempo dipendente. Anche su queste cellule il PFNA ha un effetto maggiore inducendo il 100% di mortalità alla concentrazione più alta ad entrambi i time point ed inducendo un lieve calo della vitalità anche a 250 μM . (Figure 6-7). Situazione ampiamente differente si verifica nelle HMEC e MCF12A. Per queste due linee è stato valutato un range inferiore di concentrazioni che comprende comunque le dosi che sono risultate essere maggiormente significative nella

linea tumorale appartenete allo stesso tessuto e considerando anche concentrazioni presenti nella popolazione cronicamente esposta ai composti, e sono stati considerati tre time point: 24h, 48h e 72h. Dopo trattamento con PFOA mostrano una diminuzione significativa a concentrazioni $\geq 62,5 \mu\text{M}$ dopo 48 e 72 ore di esposizione in maniera dose dipendente e tempo dipendente per entrambe le linee cellulari considerate. L'effetto maggiore si nota alla dose più elevata ($125 \mu\text{M}$) dopo 72 ore di esposizione, in cui si raggiunge una percentuale di vitalità pari al $52\% \pm 1.8$ nelle MCF12A e pari al $44\% \pm 10.2$ nelle HMEC (figure 6-7). Non si nota nessun effetto alla minore concentrazione considerata ($15.6 \mu\text{M}$) su entrambe le linee cellulari.

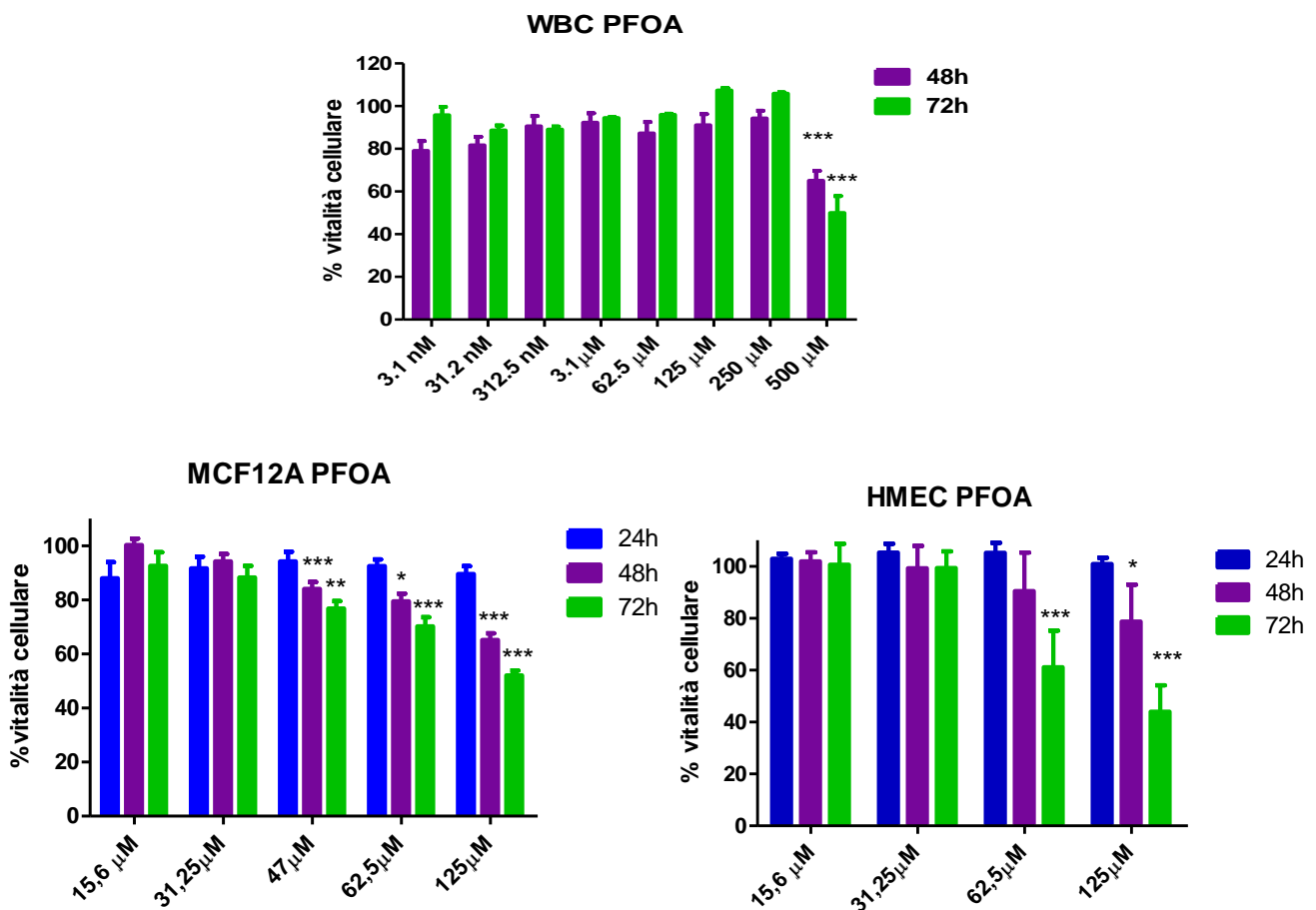


Figura 6: Vitalità cellulare espressa in percentuale per tutte le linee considerate in presenza di dosi crescenti di PFOA. Analisi statistica tramite paired t test (* $P \leq 0.05$; ** $P \leq 0.01$; *** $P \leq 0.005$).

Il PFNA mostra un effetto dose dipendente e tempo dipendente sulla vitalità cellulare ma più elevato rispetto al PFOA, esercitando il suo effetto già a concentrazioni $\geq 31,25 \mu\text{M}$ e già alle 24 ore alle concentrazioni più elevate ($62.5 \mu\text{M}$, $125 \mu\text{M}$) in entrambe le linee cellulari. L'effetto maggiore si nota alla dose più elevata ($125 \mu\text{M}$) dopo 72 ore di esposizione, in cui si raggiunge una diminuzione della vitalità vicina al 100% in entrambe le linee. Anche in questo caso non ci sono variazioni significative alla concentrazione minore.

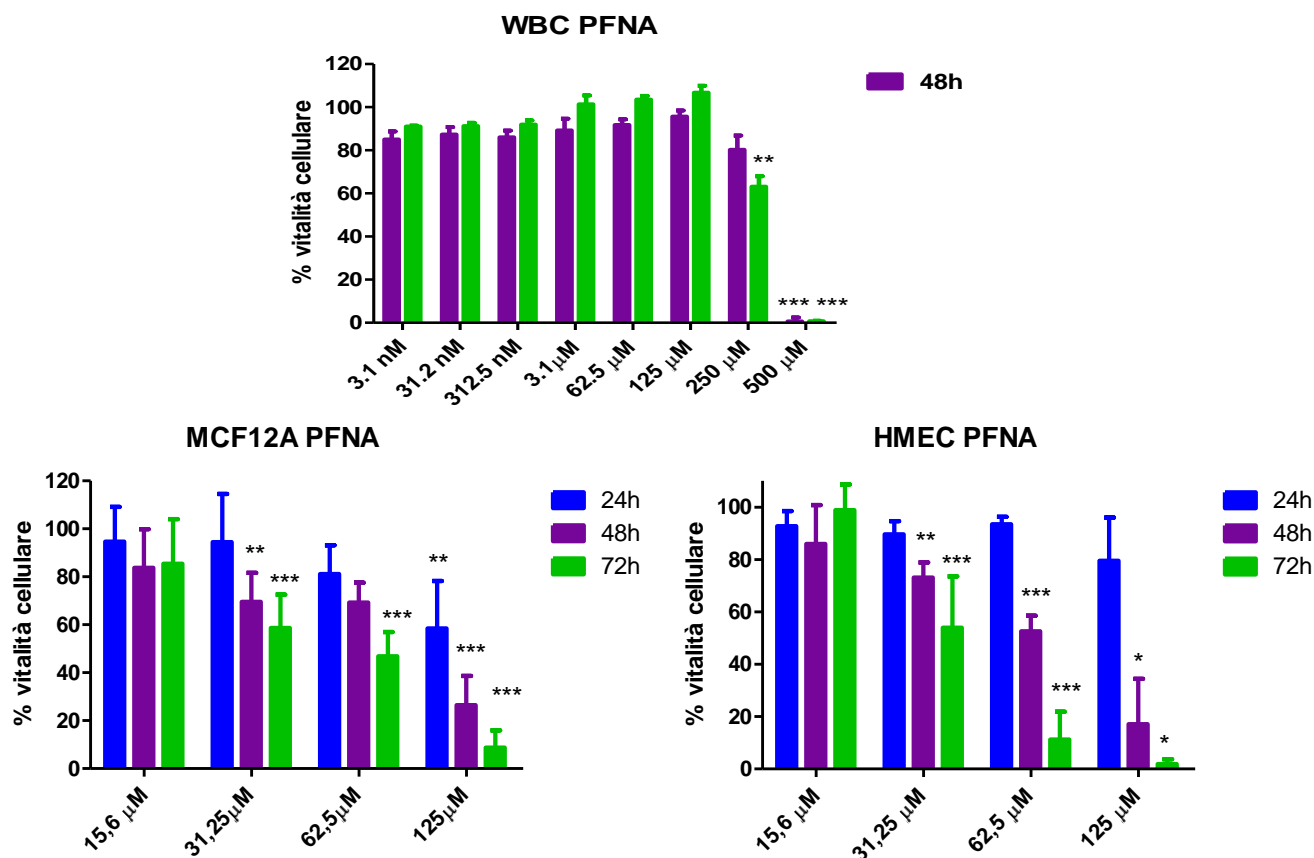


Figura 7: Vitalità cellulare espressa in percentuale per tutte le linee considerate in presenza di dosi crescenti di PFNA. Analisi statistica tramite paired t test (* $P \leq 0.05$; ** $P \leq 0.01$; *** $P \leq 0.005$).

2. CICLO CELLULARE E APOPTOSI

Per identificare i meccanismi alla base di questa inibizione sono stati valutati ciclo cellulare e apoptosi con saggio con propidio ioduro valutando anche il quantitativo di cellule in fase subG1. Considerando gli effetti ottenuti da entrambi i perfluorurati in vitalità cellulare e tenendo conto del fatto che la concentrazione di 500 μM è difficilmente riscontrabile nel sangue, siero e latte materno, si è deciso di valutarne gli effetti su un range più ristretto di concentrazioni anche nelle linee cellulari tumorali (31.5 μM , 62.5 μM , 125 μM , 250 μM). Le linee tumorali, le HMEC e le WBC sono state esposte per 48 ore ai composti, mentre le MCF12A per 24, 48 e 72 ore. Nelle due linee emopoietiche tumorali (MOLM-13 e RPMI8402) si nota un aumento di cellule in fase G1 solo in presenza di PFNA alla concentrazione di 250 μM . L'effetto è più evidente nelle RPMI8402 in cui si ha un aumento del 20% della fase G1. Diverso è l'effetto su MCF7 e HEPG2. In tutte e due le linee si verifica un aumento di cellule in fase G1 alla concentrazione di 250 μM sia in presenza di PFOA, sia in presenza di PFNA. L'effetto è maggiore nelle HEPG2 (circa 20%). In nessuna delle linee sopra citate si registra un aumento significativo di cellule in fase subG1 (Figura 8). Riguardo alle cellule primarie, le WBC non mostrano variazioni nelle fasi del ciclo cellulare per entrambi i PFC. A causa del

limitato numero, capacità proliferative e tempo di vita tipico delle cellule primarie, i cambiamenti relativi alle varie fasi del ciclo cellulare nelle HMEC sono stati effettuati solo dopo le 48 ore di esposizione per entrambi i PFC, mentre per le MCF12A la valutazione è stata effettuata a tutti e 3 i time point ed in entrambe le linee sono state utilizzate concentrazioni da 15,6 μM a 125 μM . In entrambe le linee cellulari, dopo esposizione a PFOA non si rileva un significativo aumento di cellule in fase subG1 ma piuttosto un aumento di cellule in fase G1, in particolare alle concentrazioni di 62,5 μM e 125 μM . Nelle MCF12A l'aumento sembra essere tempo dipendente. Il PFNA sembra invece avere un effetto diverso. Infatti nelle MCF12A, alle concentrazioni 15,6 μM , 31,2 μM si nota un aumento delle cellule in fase G1, ma non alle concentrazioni più elevate in cui tutte le fasi del ciclo sono paragonabili ai controlli. Al contrario, dall'osservazione al microscopio ottico si nota un crescente numero di cellule morte, specialmente alle concentrazioni 62,5 μM e 125 μM , dopo 48 e 72 ore di esposizione, come confermato anche dai saggi di vitalità, ma dall'analisi del ciclo cellulare risulta esserci solo un lieve aumento, inferiore al 5%, di cellule in fase sub G1 (Figura 9).

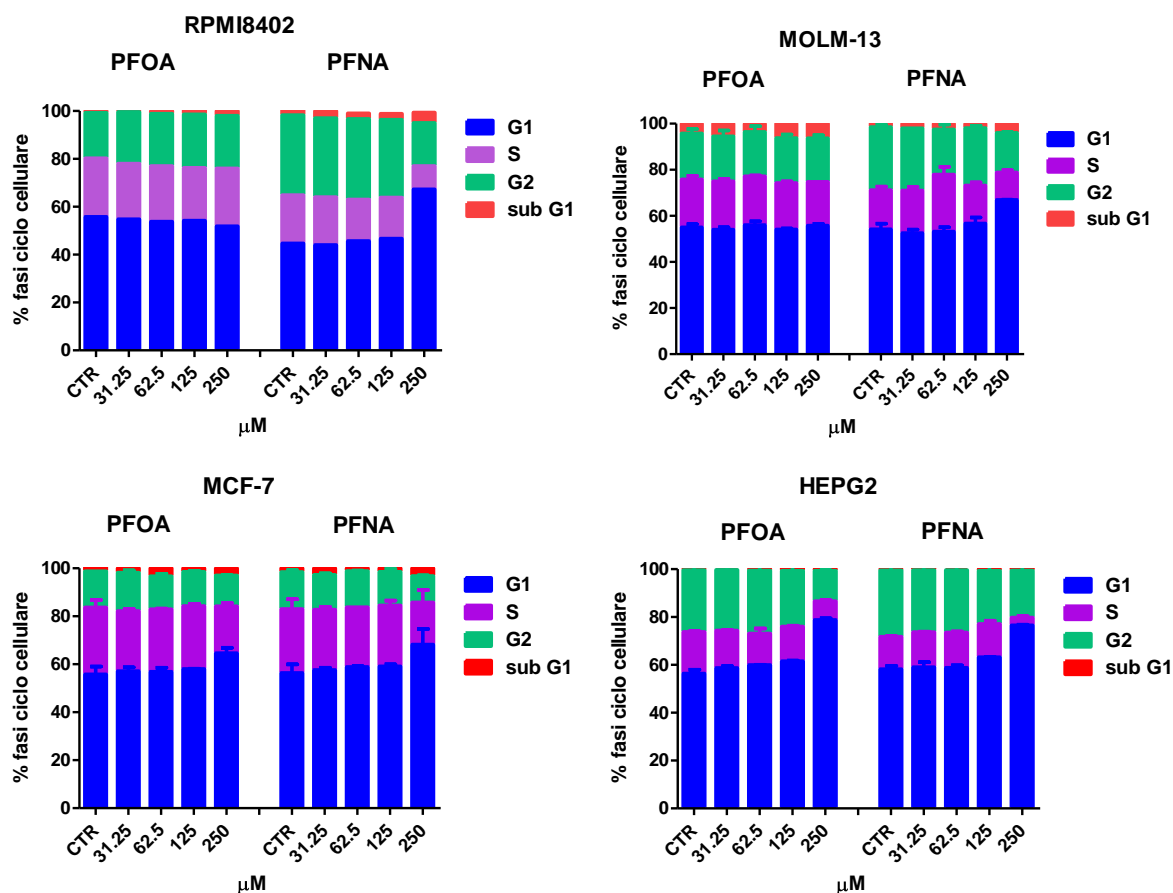


Figura 8: percentuali delle fasi di ciclo cellulare su linee cellulari tumorali, in presenza di PFOA o PFNA.

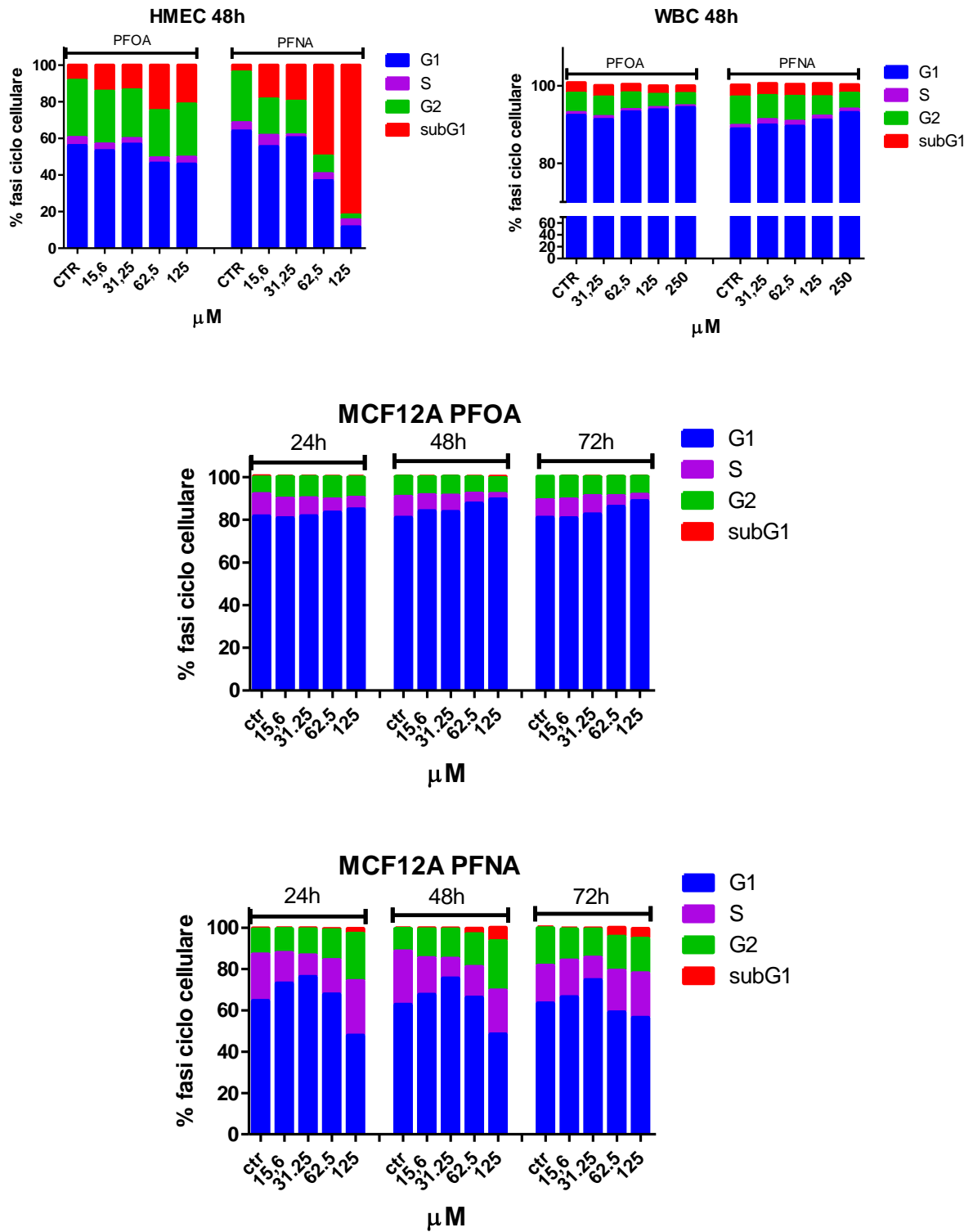


Figura 9: percentuali delle fasi di ciclo cellulare su linee cellulari primarie, in presenza di PFOA o PFNA.

3. EFFETTI MOLECOLARI

Al fine di valutare un possibile rischio genotossico successivo all'attivazione dei recettori PPAR- α e PPAR- γ , è stata valutata in Real-Time PCR l'espressione genica di ACOX1 (Acetil CoA Ossidasi1) coinvolto nel pathway PPAR- α , e di PPARGC-1 α (PPAR γ co-activator 1 α) mediatore del pathway PPAR- γ .

L'espressione di questi geni è stata valutata solo sulle linee cellulari tumorali dopo 48 ore di trattamento con le dosi più alte di PFOA e PFNA (31.25 μ M, 62.5 μ M, 125 μ M, 250 μ M). L'analisi statistica è stata effettuata tramite one way ANOVA, con Test di Dunn considerando un P value ≤ 0.05 .

Nell'analisi del livello di espressione di PPARGC1- α in risposta ai trattamenti, sono state escluse le Molm-13 per assenza di espressione basale del gene di interesse.

Dai dati ottenuti si evidenzia che nelle MOLM-13 il PFOA induce un aumento di espressione di ACOX1, a tutte le concentrazioni rispetto al controllo ma statisticamente rilevante solo alla concentrazione di 62.5 μ M. Nelle RPMI8402 si verifica un aumento dell'espressione dello stesso gene in presenza di PFNA. In presenza di PFOA pare delinearci un calo dell'espressione non supportato però dal trend della concentrazione più alta. Nelle HEPG2 e nelle MCF-7 non si verificano variazioni significative nell'espressione di ACOX1 in presenza di PFOA, nelle MCF-7 si può comunque notare un trend di overespressione in presenza di PFNA, seppur non significativo (Figura 10).

PPARGC-1 α risulta essere overespresso in presenza di PFNA nelle RPMI8402, trend che si evidenzia anche nelle MCF-7 con rilevanza statistica alla concentrazione di 250 μ M (Figura 11) che però potrebbe essere una conseguenza del fatto che a queste concentrazioni iniziano a verificarsi eventi di morte cellulare.

Nelle HEPG2 si evidenzia un andamento di aumento dell'espressione in presenza di PFOA.

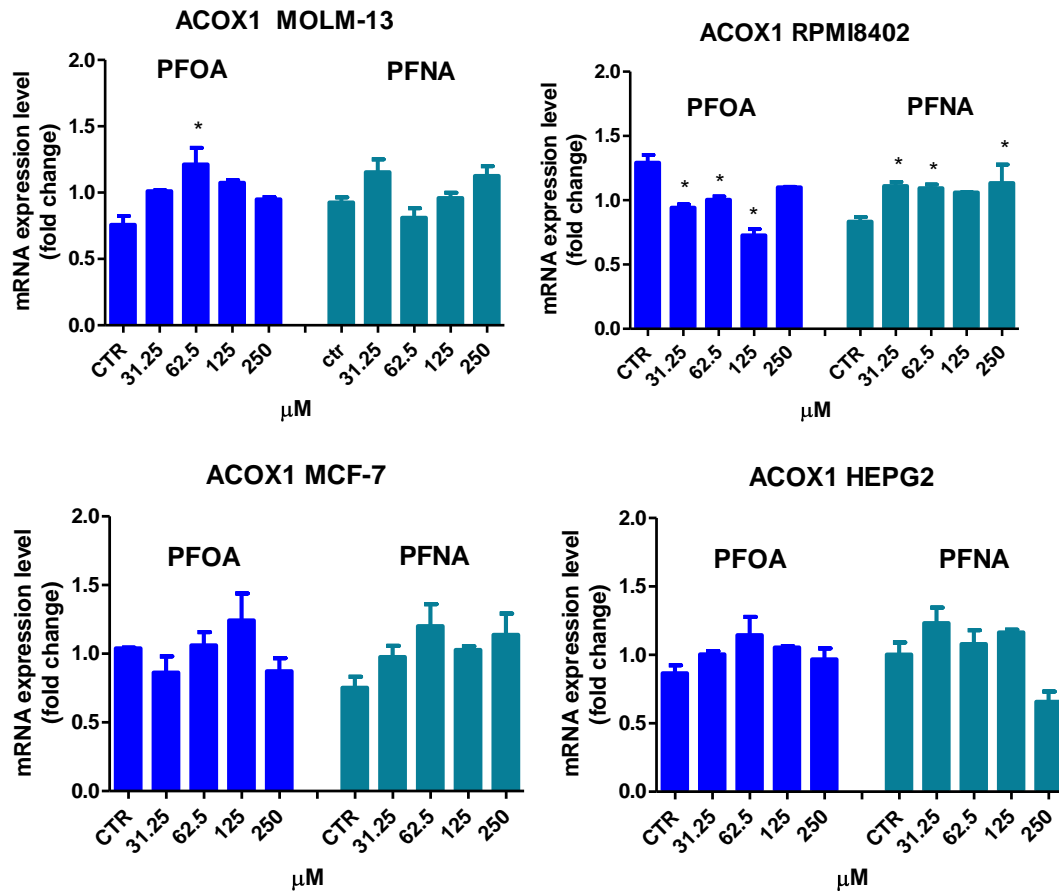


Figura 10: valutazione dell'espressione genica di ACOX1 su tutte le linee considerate. L'analisi statistica è stata effettuata tramite one-way ANOVA con test di Dunnet (* $P \leq 0.05$).

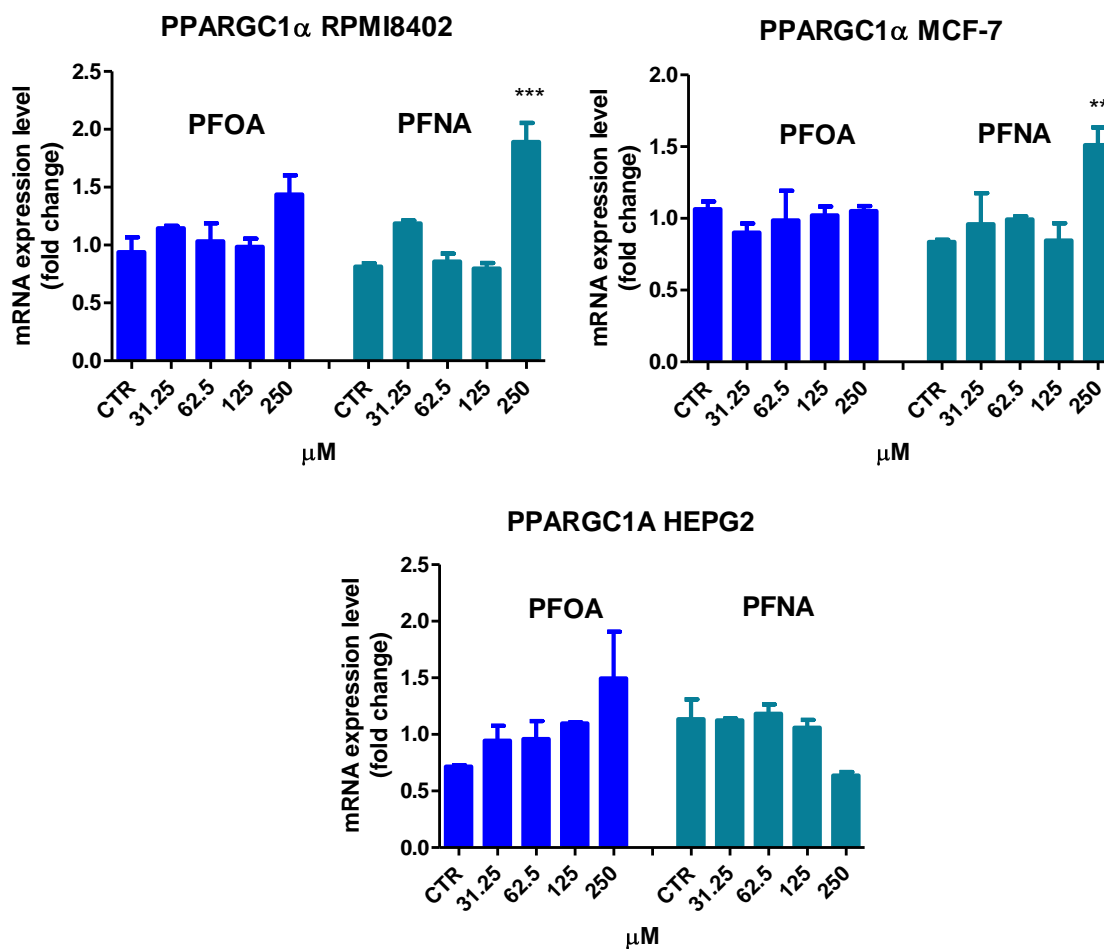


Figura 11: valutazione dell'espressione genica di *PPARGC1α* su tutte le linee considerate. L'analisi statistica è stata effettuata tramite one-way ANOVA con test di Dunnet (* $P \leq 0.05$).

4. EFFETTI EPIGENETICI

Gli effetti epigenetici sono stati valutati solo sulle cellule primarie HMEC e MCF12A. Queste due linee sono state scelte poiché sono le uniche che mostravano risultati significativi sia negli esperimenti di vitalità che nel ciclo cellulare dopo esposizione ad entrambi i PFC.

4.1 Metilazione globale

La valutazione della percentuale di metilazione globale è stata effettuata tramite Methylflash Methylated DNA Quantification Kit (Colorimetric), un kit ELISA che permette di quantificare sia il DNA metilato sia il DNA idrossimetilato. Per questo esperimento le cellule sono state esposte per 24, 48 e 72 ore e sono state utilizzate le due concentrazioni più basse (15,6 μM, 31,2 μM e 47 μM) per entrambi i composti considerati, concentrazioni in cui le cellule

mostravano percentuali alte di vitalità cellulare e molto vicine alle concentrazioni rilevate nel siero di lavoratori cronicamente esposti (Figura 12).

Entrambe le linee cellulari non hanno mostrato cambiamenti significativi nei livelli di metilazione rispetto ai controlli dopo esposizione a PFOA e a PFNA a nessuno dei time point considerati, sebbene si possa rilevare un trend di crescita tempo dipendente e dose dipendente in presenza di PFNA su entrambe le linee cellulari. Questi risultati sono in accordo con i risultati presenti in letteratura ottenuti da Tian et al. (2011).

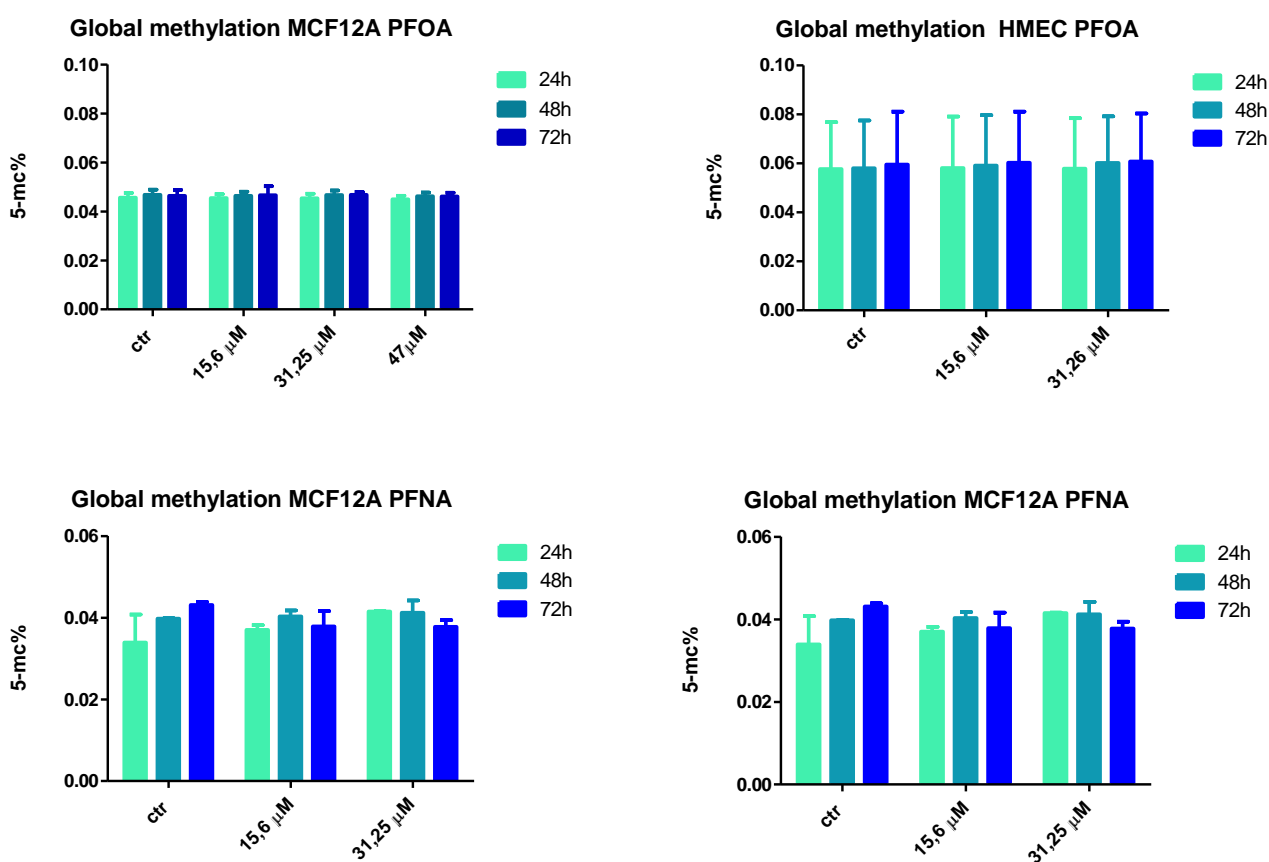


Figura 12: metilazione globale del DNA dopo esposizione a PFOA e PFNA (15,6 μM; 31,25 μM; 47 μM) nei tre tempi di esposizione.

4.2 Genome wide methylation, risultati preliminari

La metilazione sull'intero genoma è stata valutata tramite CHARM assay e sono stati utilizzati i campioni di MCF12A controllo ed esposti alla concentrazione di 31,25 μM di entrambi i PFC per 72 ore.

L'analisi è stata condotta esaminando i valori di picco di fluorescenza di tutti i campioni. Sia nel gruppo dei controlli che nei trattati sono stati eliminati quei geni che erano presenti in entrambi i gruppi e quindi metilati in entrambi i gruppi. In questo modo nel gruppo dei trattati sono presenti solo i geni che non erano metilati prima del trattamento, mentre nel gruppo dei controlli solo i geni che perdono metilazione dopo il trattamento. I picchi sono stati divisi in alto livello di metilazione (peaks >4.0), medio (tra 3 e 4), e basso (peaks <2). Sono stati analizzati i livelli di metilazione di 35 geni solitamente ipermetilati nel tumore al seno (TP53, TP73, SFRP1, SFRP2, RASSF1, BRCA1, BRCA2, TIMP3, SASH1, GNE, WT1, HSD17B4, HCK, ARAF, EPHA2, GUCY2F, IGFBP7, PAX6, PSAT1, GBP4, SFN, E-caderina, GSTP1, BRCA3, RAR β 2, APC, ESR1, ESR2, P16, P15, NOTCH2, CDH1, PGR, PPP2RB2, ABCB1). [Dobrovic & Simpfendorfer 1997; Bachman et al. 1999, X Yang et al 2001; Zeller C. et al 2003; Kaneuchi M. et al 2005; Veeck J et al 2006; Veeck J. et al 2008; Ronneberg et al 2011; Warwick J. Locke and Susan J. Clark, 2012; Bue D. et al 2013; Fleischer T. et al 2013] Inoltre è stato valutato il livello di metilazione di geni appartenenti ai pathway dell'apoptosi, ciclo cellulare, pathway di PPAR e metabolismo degli acidi grassi, metabolismo degli estrogeni e androgeni sia nei trattati che nei controlli.

Dall'analisi preliminare risulta che sia nei campioni trattati con PFOA che nei campioni trattati con PFNA 21 dei 35 geni indicati in letteratura come biomarker per il tumore al seno risultano ipermetilati (Tabella 2). La maggior parte di questi presenta valori di picco medio bassi, compresi tra 2.29 e 4, mentre TP53, SFRP1 e RASSF1 nel trattato con PFNA (rispettivamente 4.7813; 4.2881; 4.7728) e WT1, TIMP3, IGFBP7 e GBP4 nel trattato con PFOA (rispettivamente 4.7255; 4.1493; 4.0309; 4.6223) presentano livelli di metilazione superiori a 4 (Tabella 2).

Oltre a questi geni, si rileva un aumento di metilazione anche di ERGIC2 (PFNA: 4.2881, PFOA: 2.4924) molto più evidente in presenza di PFNA, il quale è una proteina nucleare, down regolata nel tumore alla prostata (Kwok et al., 2001). Non risulta nessuna variazione nei livelli di metilazione sui recettori estrogenici né per nessuno dei geni della famiglia delle DNA metiltrasferasi (DNMTs) né nei controlli né nei trattati. Solo DNMT3L (DNA (cytosine-5)-methyltransferase 3-like) risulta essere metilato nel controllo ma non nei trattati (CTR PFNA: 2,9434; CTR PFOA: 2,6931).

Sono stati inoltre considerati i livelli di metilazione di geni appartenenti a pathway su cui potrebbero agire i composti perfluorurati: ciclo cellulare, apoptosi, pathway di PPAR e metabolismo degli acidi grassi, metabolismo degli estrogeni.

Confrontando i controlli con i trattati si evidenzia un aumento di geni metilati appartenenti a tutti i pathway dopo trattamento. Per il ciclo cellulare si registra un aumento della metilazione per E2F2 (E2F transcription factor 2) maggiore in presenza di PFNA (PFNA: 3.4746; PFOA: 2.5424), e valori di picco superiori a 4 per CDKN1A (p21) (PFNA: 5.2672; PFOA: 4.0116), CDK8 (cyclin-dependent kinase 8) (PFNA: 4.3148; PFOA: 3.6126), ATR (ataxia telangiectasia and Rad3 related)

(PFNA: 3.7737; PFOA: 4.2342), CCNB2 (G2/mitotic-specific cyclin-B2) (PFNA: 4.0006; PFOA: 4.1878) e TP53 (Tabella 3). Per l'apoptosi, si registrano valori superiori o vicini a 4 per DIABLO (diablo, IAP-binding mitochondrial protein) (PFNA: 4.0769; PFOA: 3.8384), CASP10 (caspase 10, apoptosis-related cysteine peptidase) (PFNA: 4.1991; PFOA: 3.7422), RASSF1 (Ras association (RalGDS/AF-6) domain family member 1) (PFNA: 4.7728; PFOA: 3.9554), oltre a TP53, mentre per CASP9 (caspase 9, apoptosis-related cysteine peptidase) e PRKACG (protein kinase, cAMP-dependent, catalytic, gamma) il picco di fluorescenza risulta essere elevato solo dopo trattamento con PFOA (rispettivamente PFOA: 4.3444; 4.4391) (Tabella 3). Per il pathway di PPAR e metabolismo degli acidi grassi i livelli di metilazione di tutti i geni considerati sono medio bassi, tranne per FABP3 che dopo esposizione a PFOA raggiunge un picco di 4.1179 (Tabella 4).

Per il pathway degli estrogeni e androgeni, alti livelli di metilazione si raggiungono solo per CREB3L2 (cAMP responsive element binding protein 3-like 2) dopo esposizione con PFNA (PFNA: 4.5734; PFOA: 3.585), e per HSP90AB1 (heat shock protein 90kDa alpha (cytosolic), class B member 1) dopo esposizione a PFOA (PFNA: 2.5077; PFOA: 4.3045).

Nei controlli, tutti i geni appartenenti ai pathway sopra considerati presentavano livelli di metilazione bassi, per lo più inferiori a 3 (Tabella 5).

Questi dati dovranno essere confermati tramite Q-MSP e verificata la corrispondenza tra variazione della metilazione ed espressione genica tramite array e RT-PCR.

	Name	ncbi_gene_id	Peak PFNA	Peak PFOA	
Breast cancer markers	TP53	7157	4.7813	3.513	tumor protein p53
	TP73	7161	3.3956	2.7451	tumor protein p73
	SFRP1	6422	4.2881	3.9704	secreted frizzled-related protein 1
	SFRP2	6423	3.6552	3.4683	secreted frizzled-related protein 2
	RASSF1	11186	4.7728	3.9554	rass association domain family 1A
	BRCA1	672	3.702	2.2947	breast cancer 1
	TIMP3	7078	2.8043	4.1493	tissue inhibitor of metalloproteinases 3
	SASH1	23328	2.9373	2.6382	SAM and SH3 domain containing 1
	GNE	10020	2.9376	2.5112	glucosamine (UDP-N-acetyl)-2-epimerase/N-acetylmannosamine kinase
	WT1	7490	3.9867	4.7255	Wilms tumor 1
	HSD17B4	3295	3.3332	3.3779	hydroxysteroid (17-beta) dehydrogenase 4
	HCK	3055	3.9792	2.8177	hemopoietic cell kinase
	ARAF	369	2.7142	2.5405	v-raf murine sarcoma 3611 viral oncogene homolog
	EPHA2	1969	3.4873	2.7658	EPH receptor A2
	GUCY2F	2986	3.7167	3.0284	guanylate cyclase 2F, retinal
	IGFBP7	3490	3.8107	4.0309	insulin-like growth factor binding protein 7
	PAX6	5080	3.1367	3.312	paired box 6
	PSAT1	29968	3.8037	2.9732	phosphoserine aminotransferase 1
	GBP4	115361	3.7918	4.6223	guanylate binding protein 4
	UCHL1	7345	3.2757	2.4848	ubiquitin carboxyl-terminal esterase L1
WDR66	144406	2.7146	3.8833	WD repeat domain 66	

Tabella 2: Livelli di metilazione di geni solitamente metilati nel cancro al seno nelle MCF12A trattate con PFOA o PFNA (31,25 μ M).

	Name	ncbi_gene_id	Peak PFNA	Peak PFOA	
cell cycle	E2F2	1870	3.4746	2.5424	E2F transcription factor 2
	ANAPC5	51433	3.4146	2.7607	anaphase promoting complex subunit 5
	SMC1B	27127	2.8195	3.7625	structural maintenance of chromosomes 1B
	CDKN1A	1026	5.2672	4.0116	cyclin-dependent kinase inhibitor 1A (p21, Cip1)
	CDK8	1024	4.3148	3.6126	cyclin-dependent kinase 8
	PCNA	5111	3.0804	2.1317	proliferating cell nuclear antigen
	ATR	545	3.7737	4.2342	ataxia telangiectasia and Rad3 related
	CCNE1	898	3.117	2.1014	cyclin-D1
	CCNH	902	3.0833	3.1091	Cyclin-H
	CCNB2	9133	4.0006	4.1878	Cyclin-B2
	ZBTB17	7709	3.146	3.6982	Zinc finger and BTB domain-containing protein 17
	SKP1	6500	3.9498	3.6737	S-phase kinase-associated protein 1
	PLK1	5347	3.9035	3.8312	polo-like kinase 1
apoptosi	DIABLO	56616	4.0769	3.8384	diablo, IAP-binding mitochondrial protein
	PRKAR2A	5576	2.2196	2.6704	protein kinase, cAMP-dependent, regulatory, type II, alpha
	PRKACG	5568	2.5154	4.4391	protein kinase, cAMP-dependent, catalytic, gamma
	PRKACB	5567	2.65	2.2432	protein kinase, cAMP-dependent, catalytic, betap
	PRKAR1A	5573	3.3575	2.6009	protein kinase, cAMP-dependent, regulatory, type I, alpha
	BIRC7	79444	2.2826	2.7292	baculoviral IAP repeat containing 7
	CASP10	843	4.1991	3.7422	caspase 10, apoptosis-related cysteine peptidase
	BCL2	596	2.5901	2.3963	B-cell CLL/lymphoma 2
	CASP9	842	2.6387	4.3444	caspase 9, apoptosis-related cysteine peptidase
	RASSF1	11186	4.7728	3.9554	Ras association (RalGDS/AF-6) domain family member 1
	ENDOG	2021	2.2172	2.391	Endonuclease G
	NFKBIA	4792	2.3391	2.6246	nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells inhibitor, alpha

Tabella3: livelli di metilazione di geni coinvolti nel ciclo cellulare, apoptosi in MCF12A trattate con PFOA o PFNA (31,25 μ M).

	Name	ncbi_gene_id	Peak PFNA	Peak PFOA	
PPARs pathway and fatty acids metabolism	ACOX3	8310	3.6256	3.6115	acyl-CoA oxidase 3, pristanoyl
	EHHADH	1962	2.3394	2.9446	enoyl-CoA, hydratase/3-hydroxyacyl CoA dehydrogenase
	ACAA2	10449	3.4829	3.0065	acetyl-CoA acyltransferase 2
	SCD	6319	2.9769	3.2282	stearoyl-CoA desaturase
	CYP7A1	1581	2.9795	2.7279	cytochrome P450, family 7, subfamily A, polypeptide 1
	CYP8B1	1582	2.4925	2.5169	cytochrome P450, family 8, subfamily B, polypeptide 1
	FABP1	2168	3.3629	2.6119	fatty acid binding protein 1, liver
	FABP3	2170	3.4423	4.1179	fatty acid binding protein 3
	FABP4	2167	3.638	3.8375	fatty acid binding protein 4, adipocyte
	ACSL5	51703	2.4114	2.8304	acyl-CoA synthetase long-chain family member 5
	ACSL3	2181	2.6416	2.3898	acyl-CoA synthetase long-chain family member 3
	CD36	948	2.114	2.9962	CD36 molecule (thrombospondin receptor)
	MMP1	4312	2.3208	2.9187	matrix metalloproteinase 1 (interstitial collagenase)
	PPARD	5467	2.5137	3.1623	peroxisome proliferator-activated receptor delta
	RXRG	6258	2.5303	2.6945	Retinoid X receptor gamma
estrogen and androgen pathway	MMP2	4313	2.5117	2.5931	matrix metalloproteinase 2
	MAPK1	5594	3.0801	2.0101	mitogen-activated protein kinase 1
	PLCB1	23236	2.7313	2.5958	phospholipase C, beta 1 (phosphoinositide-specific)
	CREB3L2	64764	4.5734	3.5815	cAMP responsive element binding protein 3-like 2
	PTENP1	11191	3.3639	2.6021	phosphatase and tensin homolog pseudogene 1
	HSP90AB1	3326	2.5077	4.3045	heat shock protein 90kDa alpha (cytosolic), class B member 1

Tabella4: livelli di metilazione dei geni coinvolti nel pathway di PPARs e metabolismo degli acidi grassi, pathway degli estrogeni e degli androgeni in MCF12A trattate con PFOA o PFNA (31,25 μ M).

	Name	ncbi_gene_id	Mean	
cell cycle	CDC25A	993	2.4535	cell division cycle 25 homolog A
	MDM2	4193	3.0472	E3 ubiquitin-protein ligase Mdm2
	SMC3	9126	2.90945	structural maintenance of chromosomes 3
	ESPL1	9700	2.4151	extra spindle poles like 1
	FZR1	51343	2.7444	fizzy/cell division cycle 20 related 1
	apoptosi	TNFSF10	8743	3.2777
TRAF2		7186	2.21855	TNF receptor-associated factor 2
BID		637	2.8107	BH3 interacting-domain death agonist
IRA K1		3654	2.3705	Interleukin-1 receptor-associated kinase 1
DFFA		1676	2.58485	DNA fragmentation factor subunit alpha
PPARs pathway and fatty acids metabolism	RXRA	6256	2.32505	Retinoid X receptor alpha
	HMGCS2	3158	2.97005	3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA synthase 2
	APOA1	335	2.4132	apolipoprotein A1
	APOC3	345	2.4142	apolipoprotein C3
	CPT1A	1374	3.4604	carnitine palmitoyltransferase I
estrogen and androgen pathway	AKR1D1	6718	2.6853	aldo-keto reductase family 1, member D1
	UGT1A10	54575	2.7072	DP-glycosyltransferase 1-10
	SRD5A2	6716	3.3301	steroid-5-alpha-reductase, alpha polypeptide 2

Tabella 5: livelli di metilazione di geni coinvolti nel ciclo cellulare, apoptosi, PPARs e metabolismo degli acidi grassi, pathway degli estrogeni e degli androgeni in MCF12A controllo.

DISCUSSIONE

La maggior parte degli studi ad oggi esistenti sugli effetti tossici dell'esposizione ai PFCs riguardano gli animali, e si concentrano prevalentemente su PFOS e PFOA. Su questi ultimi i PFCs possono indurre epatotossicità, immunotossicità, disfunzioni ormonali e disfunzioni nello sviluppo [Kennedy et al. 2004, Lau et al. 2007; Andersen et al. 2008]. Sono state inoltre riportate associazioni positive tra l'esposizione cronica a PFOA e lo sviluppo di tumori al fegato, pancreas e testicoli in particolare nel ratto [Abdellatif et al. 2003; Kennedy Jr et al. 2004].

Riguardo agli studi sull'uomo, viene riportata negli ultimi decenni la presenza di PFOA e PFNA nel siero umano, nel siero cordonale e nel latte materno, principale via di eliminazione dei PFC nelle donne. Nel siero della popolazione generale è stata riportata una concentrazione di PFOA maggiore rispetto a PFNA, con valori medi rispettivamente pari a 4.13 ng/mL e 1.49 ng/mL [Kato et al. 2011]. Il PFOA raggiunge nei lavoratori cronicamente esposti valori fino a 114 µg/mL(276 µM) [Lau et al. 2007; Olsen et al 1999, 2003]. Riguardo al PFNA non sono ancora presenti studi occupazionali ma Calafat et al. (2007) hanno riportato un aumento della concentrazione nel siero della popolazione statunitense tra il 2000 ed il 2004 di PFNA.

Uno studio, condotto da Liu et al. (2011) su un gruppo di 50 donne cinesi ed i loro neonati, indica questi due perfluorurati tra i più presenti nel siero cordonale e nel latte materno riscontrando però la presenza maggiore di entrambi nel latte materno, con valori medi di PFOA pari a 0.18 ng/mL e di PFNA pari a 0.026 ng/mL (~55% PFOA e ~12% PFNA). Secondo Landrigan et al. (2002) nei bambini, un'esposizione precoce ai PFCs aumenta maggiormente il rischio di effetti tossici cronici rispetto ad un'esposizione tardiva.

Da alcuni studi risulta inoltre che l'esposizione precoce ai PFC è associata a diverse condizioni patologiche nei neonati [Inoue et al. 2004; Apelberg et al. 2007; Fei et al. 2007] e a difetti nello sviluppo degli organi, dello scheletro e neuronale [Apelberg et al. 2007; Andersen et al. 2010; Olsen et al. 2009; Fei et al. 2008]. Inoltre, un'esposizione precoce ai PFCs aumenta maggiormente il rischio di effetti tossici cronici rispetto ad un'esposizione tardiva [Landrigan et al. 2002].

Negli ultimi anni sono state anche riportate proprietà estrogen-like dei PFC, infatti PFOA e PFNA possono interagire direttamente con i recettori degli estrogeni e attivare l'espressione di

geni marcatori anche nell'uomo [Benninghoff et al. 2010]. Pare inoltre siano associati a disfunzioni tiroidee in bambini da 1-17 anni [Lopez-Espinoza et al. 2012] e che inducano una precoce maturazione sessuale [Christensen et al. 2011]. L'associazione tra tumori ed esposizione a PFNA e PFOA nell'uomo non è stata ancora indagata in maniera approfondita. Si rilevano tuttavia alcuni studi che evidenziano un'associazione positiva tra PFOA e tumore alla prostata [Alexander et al. 2003, 2007] e PFCs e tumore al seno [Bonefeld-Jorgensen et al. 2011]. Si può per tanto ipotizzare che i perfluorurati abbiano un effetto sia biologico che molecolare specialmente su tessuti ormone-responsivi.

Il grande impiego e diffusione nell'ambiente e negli esseri viventi, unito alle loro caratteristiche biochimiche e alla potenziale pericolosità, hanno fatto sì che l'attenzione verso questi composti aumentasse notevolmente negli ultimi anni, e che anche gli organi internazionali emanassero atti per la regolamentazione del loro utilizzo e la salvaguardia della salute pubblica. Queste regolamentazioni riguardano quasi esclusivamente PFOS e PFOA per i quali si è riscontrata una diminuzione della loro presenza sia nell'ambiente sia nell'uomo, ma questo ha anche determinato un incremento nella presenza di altri composti utilizzati in sostituzione dei PFCs soggetti a regolamentazioni. Kato et al. (2011) e prima Calafat et al. (2007), hanno riportato un aumento della concentrazione nel siero della popolazione statunitense di PFNA negli ultimi 10 anni, sul quale non esistono ancora studi approfonditi riguardanti gli effetti sulla salute.

Alla luce di queste evidenze, lo studio svolto in questa tesi si è posto come obiettivo quello di ampliare le conoscenze sul rischio derivante dall'esposizione a questi composti. A tal fine, si sono valutati gli effetti biologici e molecolari di due dei PFCs più presenti nell'uomo, PFOA e PFNA, su linee cellulari umane modello e primarie, appartenenti a diversi tessuti. I composti sono stati utilizzati in un range di concentrazioni inizialmente molto ampio, tenendo conto della letteratura, ma anche in modo che venissero comprese sia le concentrazioni riportate nel siero della popolazione generale, che le concentrazioni riscontrate nei lavoratori cronicamente esposti. La scelta di un range così ampio è dovuta anche al fatto che non esistono informazioni precise riguardo alla concentrazione di PFC che si possono riscontrare nei diversi tessuti.

Inizialmente sono stati valutati gli effetti biologici su linee cellulari tumorali emopoietiche (MOLM-13, RPMI8402), di fegato (HEPG2), e epitelio mammario (MCF-7). I risultati ottenuti hanno evidenziato una diminuzione della vitalità cellulare ed un blocco del ciclo cellulare ma solo alle dosi più alte utilizzate (250 μ M e 500 μ M) sia in risposta a PFOA che a PFNA, come confermato anche in letteratura da Maras et al. (2006). Nessun effetto è stato riscontrato a concentrazioni inferiori a 125 μ M e più vicine alle medie riscontrate nella popolazione

generale. Si nota però una diversa risposta ai perfluorurati in base alla linea cellulare utilizzata e di conseguenza al tessuto considerato seppur in maniera molto lieve. Le linee cellulari emopoietiche infatti sembrano meno sensibili ai PFC rispetto alle MCF-7 e alle HEPG2. Il PFNA sembra inoltre avere un effetto maggiore rispetto al PFOA, su tutte le linee considerate. I dati ottenuti su PFOA risultano in linea con quanto già osservato precedentemente da altri autori [Liu et al., 2007]. In un secondo momento si è passati alla valutazione degli effetti su linee cellulari primarie. Delle tre linee considerate (WBC, MCF12A, HMEC), solo le WBC rispondono ai trattamenti in maniera molto simile alle linee cellulari tumorali dello stesso tessuto, mentre le HMEC e le MCF12A rispondono in maniera diversa.

Infatti, I dati relativi a vitalità cellulare e ciclo cellulare su queste ultime due linee mostrano effetti a concentrazioni superiori o uguali a 31,25 μM , concentrazioni ben inferiori di quelle registrate sulle linee cellulari tumorali e riscontrabili nel siero di lavoratori cronicamente esposti. Appare inoltre molto più evidente anche il diverso effetto esercitato dai due composti. Infatti il PFNA ha un effetto maggiore e diverso su entrambe le linee cellulari rispetto al PFOA. Il PFOA mostra prevalentemente un effetto citostatico, mentre il PFNA mostra un effetto prevalentemente citotossico, inducendo la morte cellulare alle concentrazioni più elevate. Quest'ultimo effetto sembra non essere un processo apoptotico poiché i risultati ottenuti e le osservazioni al microscopio suggeriscono che il PFNA non agisca attivando il pathway dell'apoptosi, ma che agisca in maniera più drastica sfruttando altri meccanismi, come ad esempio la catastrofe mitotica. I risultati ottenuti sulle linee cellulari primarie e tumorali evidenziano una sensibilità tessuto dipendente ai perfluorurati, ma anche una diversa aggressività dei due composti. Risulta inoltre chiaro come le cellule primarie presentino una maggiore sensibilità rispetto alle linee tumorali ed anche gli effetti dei due composti siano diversi rispetto alle linee tumorali, risultando quindi più indicate per questo genere di studi.

Sulla base di questi risultati si è passati alla valutazione degli effetti biologici, partendo dalle linee cellulari tumorali.

Dagli studi condotti su animali, prevalentemente su ratto sappiamo che la principale modalità di azione dei PFCs possa essere l'attivazione dei pathways a valle dei recettori PPAR- α e PPAR- γ . Lavori condotti *in vitro* e *in vivo* su ratti hanno infatti dimostrato l'attivazione dei pathways PPAR- α e PPAR- γ in risposta ai PFCs, in particolare a PFOA [Vanden Heuvel et al. 2006; Walters et al. 2009].

I peroxisome proliferator activated receptors (PPARs) sono recettori nucleari che regolano importanti processi fisiologici quali l'omeostasi lipidica, l'infiammazione, l'adipogenesi e la cui attivazione è stata già associata alla cancerogenesi [Chinetti et al. 2000].

In particolare, l'isoforma PPAR- α ha un ruolo centrale nel mantenimento dell'omeostasi lipidica inducendo l'espressione di geni perossisomiali ed enzimi mitocondriali coinvolti nel metabolismo degli acidi grassi [Berger et al. 2002]; PPAR- γ , invece, è coinvolto nella regolazione della biogenesi mitocondriale. Entrambe le vie di segnalazione potrebbero essere responsabili della produzione di specie reattive dell'ossigeno (ROS) e di conseguenza di genotossicità e carcinogenesi.

Nei ratti l'attivazione di PPAR- α è stata già associata a stress ossidativo, responsabile di danni al DNA che potrebbero implicare carcinogenesi mediata dalla proliferazione dei perossisomi [O'Brien et al. 2005], e diversi autori hanno confermato che nei ratti l'esposizione cronica a PFOS e PFOA è associata allo sviluppo di tumori nel fegato, pancreas e testicoli [Abdellatif et al. 2003; Kennedy et al. 2004; OECD, 2002], probabilmente proprio per proliferazione dei perossisomiale conseguente ad attivazione di PPAR- α [Klaunig et al. 2003].

Studi sul ruolo dei pathways di PPAR nella risposta ai PFCs nell'uomo sono tuttora scarsi. La maggior parte degli studi sono infatti stati effettuati in modelli animali, da cui si è notato che i recettori PPARs presentano affinità specie-specifiche [O'Brien et al. 2005] e nei quali il recettore presenta una diversa distribuzione cellulare rispetto all'uomo, rendendo perciò imprecisa la traslazione delle conoscenze acquisite sull'attività di PPAR- α da modelli animali a modelli umani [Eriksen et al. 2010].

Altrettanto dubbia e controversa è l'associazione nell'uomo tra PFCs e sviluppo tumorale [Eriksen et al. 2009] nonché il coinvolgimento dei pathways dei PPARs [Bjork et al. 2009], benchè alcuni studi sembrano suggerirne un coinvolgimento come nell'immunotossicità PFOA-indotta [Corsini et al. 2010]. Nuovi studi sul coinvolgimento dei pathways PPAR- α e PPAR- γ su cellule umane diventano, dunque, fondamentali per definirne l'effettivo coinvolgimento nella risposta ai PFCs nell'uomo e, di conseguenza, nel rischio di cancerogenesi.

Questa parte del lavoro è stata dunque finalizzata a valutare l'attivazione dei pathways PPAR- α e PPAR- γ nelle linee cellulari tumorali umane in risposta all'esposizione a PFOA e PFNA. È stata quindi valutata, sulle linee cellulari tumorali, l'espressione di geni targets coinvolti nei pathways in esame, tra cui PPARGC-1 α (PPAR γ co-activator 1 α), gene attivato da PPAR- γ e coinvolto nella regolazione della biogenesi mitocondriale [Ryan et al. 2007], e ACOX 1 (Acyl CoA Ossidasi 1), enzima che caratterizza il primo step limitante la β -ossidazione degli acidi grassi [Bjork et al. 2011] e coinvolto nel pathway PPAR- α . Non esistono dati relativi agli effetti dei perfluorurati sul pathway di PPAR γ nell'uomo.

Dai dati di espressione genica di ACOX1 non risulta alcuna induzione del gene in risposta ai trattamenti a basse dosi dei composti (31,25 μ M) concentrazioni facilmente riscontrabili anche

nella popolazione dei lavoratori cronicamente esposti, suggerendo che non vi è attivazione del pathway di PPAR- α a queste concentrazioni, a differenza di quanto suggerito dai modelli murini. I risultati ottenuti nelle HEPG2 sono in accordo con i risultati di Walter et al. 2009 ottenuti su epatociti umani, e sono anche in accordo con i risultati di Nakamura et al. (2009) i quali, confrontando topi wild-type, topi PPAR- α null e topi umanizzati con PPAR- α umano dopo somministrazione di ammonio perfluottanoato (APFO), hanno notato che alte dosi di APFO aumentano i livelli lipidici e di espressione genica degli enzimi tiolasi perossisomiali, di Cyp4a10 e di Acyl CoA deidrogenasi solo nei topi wild type mentre le cellule ingegnerizzate con il recettore umano PPAR- α sono risultate essere meno responsive. Anche l'espressione di PPARGC-1 α non varia in maniera significativa alle concentrazioni più basse in nessuna delle linee cellulari considerate.

Benché i dati ottenuti in questa tesi suggeriscano un'assenza di attivazione dei pathways PPAR- α e PPAR γ in risposta a PFOA e PFNA alle dosi utilizzate in cellule tumorali umane, non si può in primis escludere che l'effetto possa essere diverso nelle linee cellulari primarie e quindi un possibile coinvolgimento di questi pathways. Infatti, importante è anche considerare che l'uomo è esposto a diversi ligandi dei recettori PPARs sia esogeni che endogeni. Lecito è dunque supporre che, per esempio, PFOA possa contribuire assieme ad altri ligandi all'attivazione dei recettori in esame con conseguente influenza sui processi pato-fisiologici che coinvolgono l'attivazione di PPAR- α [Corsini et al. 2010].

Nel tentativo di comprendere gli effetti molecolari dei composti perfluorurati e sulla scia dell'aumentato interesse generale riguardo le modificazioni epigenetiche, alcuni ricercatori hanno spostato l'attenzione principalmente sulla metilazione derivante dall'esposizione a questi composti. La metilazione del DNA è un meccanismo che avviene ad opera delle di DNA- metiltransferasi e che porta all'aggiunta di gruppi metile a livello dei residui di citosine dei dinucleotidi CpG nel DNA. La metilazione svolge un ruolo molto importante in diversi meccanismi cellulari, tra cui anche lo sviluppo. Queste modificazioni possono regolare l'espressione genica quando avvengono nelle regioni promotoriali e possono anche portare ad instabilità genetica. L'instabilità genetica è altresì, una caratteristica del cancro. Le isole CpG generalmente non sono metilate nei tessuti normali adulti, con l'eccezione dei geni silenti nel cromosoma X inattivo e geni dell'imprinting come H19 [Tremblay et al. 1995]. Al contrario, molti tessuti neoplastici dimostrano una ipometilazione del genoma, accompagnata ad una ipermetilazione dei promotori di alcuni geni oncosoppressori e regolatori della crescita

[Baylin et al. 1998]. Il meccanismo responsabile per questo tipo di pattern rimane comunque ancora largamente non chiaro.

Nonostante i pochi studi ad oggi presenti, pare che alcuni PFC possano avere un effetto a livello epigenetico, regolando l'espressione di alcuni geni, tra cui GSTP, come dimostrato da Tian et al. (2012) nell'uomo e Wan et al. (2010) nel ratto, mentre Guerrero-Preston et al. (2010) rilevano che l'esposizione prenatale a PFOA è inversamente proporzionale a metilazione globale del DNA nel siero cordonale e Watkins D.J et al. (2014) osservano una consistente associazione positiva tra livelli di PFOS nel siero di 685 partecipanti allo studio e la percentuale di metilazione nelle regioni ripetute LINE-1 (Long Interspersed Nuclear Element - 1), un gruppo di sequenze retrotrasponiche, la cui ipermetilazione è stata associata a instabilità genomica e rischio di cancro [Belancio et al. 2009, 2010].

Per verificare questo effetto epigenetico dei perfluorurati da noi utilizzati e meglio comprendere il potenziale effetto cancerogeno, sono stati condotti esperimenti per la valutazione della metilazione globale e gene specifica sui campioni controllo e trattati di HMEC e MCF12A, due linee cellulari primarie di epitelio mammario. È stato scelto questo tessuto poiché dalla letteratura sappiamo che alcuni PFCs hanno caratteristiche estrogen-like [Maras et al. 2006; Henry and Fair 2011; Benningof et al. 2011], che possono legarsi ai recettori ormonali e disturbare l'omeostasi ormonale. Gli ormoni sono interessati nell'insorgenza di diversi tumori, come il tumore al seno, ed un recente studio mostra per la prima volta una relazione tra i livelli di PFCs nel siero e il rischio di insorgenza del cancro al seno su una popolazione di Inuit dalla Groenlandia. [Bonefeld-Jorgensen et al. 2011].

In entrambe le linee cellulari considerate e a tutti i tempi di incubazione con entrambi i perfluorurati non si rilevano significative variazioni nella metilazione globale, risultato in linea con Tian et al. (2012).

In questo studio è stata condotta per la prima volta l'analisi della metilazione gene specifica in seguito a trattamenti con PFCs. La valutazione è stata condotta tramite CHARM assay, ed al momento sono stati valutati solo campioni controllo ed esposti ad entrambi i PFCs (31 μ M) per 72 ore appartenenti alle MCF12A.

In questa analisi preliminare sono stati considerati 35 geni frequentemente metilati nei tumori al seno [Dobrovic & Simpfendorfer 1997; Bachman et al. 1999, X Yang et al. 2001; Zeller C. et al. 2003; Kaneuchi M. et al. 2005; Veeck J et al. 2006; Veeck J. et al. 2008; Ronneberg et al. 2011; Warwich J. Locke and Susan J. Clark, 2012; Bue D. et al. 2013; Fleischer T. et al. 2013]. Tra questi sono compresi noti oncosoppressori come TP53 (tumor protein p53), WT1 (Wilms tumor 1), BRCA1 e 2 (breast cancer 1, 2) RAR β 2 (retinoic acid receptor β 2) e putativi

oncosoppressori come RASSF1 (rass association domain family 1A) e SASH1 (SAM and SH3 domain containing 1), ma che sono anche interessati alla regolazione del ciclo cellulare (APC, P16, P15), come recettori ormonali (ESR1, ESR2, PGR, RAR β 2), nella riparazione del DNA (BRCA1 e 2), detossificazione da carcinogeni (GSTP1), adesione cellulare (E-caderin) e inibitori delle metallo proteine (TIMP-3).

Sono stati anche valutati geni chiave appartenenti ai pathway del ciclo cellulare, apoptosi, pathway di PPAR e metabolismo degli estrogeni e degli androgeni.

Dei 35 geni considerati, 21 risultano metilati nei trattati e non nei controlli. Tra questi, TP53, noto oncosoppressore mutato o alterato nella maggior parte dei tumori, SFRP1 e 2 antagonisti di Wnt, il cui pathway svolge un ruolo fondamentale nello sviluppo embrionale, nella differenziazione cellulare, proliferazione ed anche nel cancro al seno [Cadigan and Nusse, 1997; Polakis 2000], ma anche WT1, RASSF1, IGFBP7, TIMP3, GBP4, i quali presentano dei livelli di metilazione superiori a 4 o border line in entrambi i trattati. Anche BRCA1 risulta essere metilato nei trattati, ma in particolar modo dopo trattamento con PFNA. BRCA1 è un ben noto gene oncosoppressore nel cancro al seno [Miki et al.1994]. La sua inibizione di espressione aumenta la proliferazione di cellule mammarie maligne, mentre la sovraespressione di BRCA1 wild-type sopprime la tumorigenesi di cellule di cancro al seno MCF-7 nei topi. Inoltre è mutato in metà dei carcinomi mammari ereditari [Friedman et al. 1994]. Non si sono rilevate variazioni nei livelli di metilazione di altri importanti markers per il cancro al seno come i recettori degli estrogeni e del progesterone o importanti geni regolatori del ciclo cellulare come P16 sia nei controlli, sia nei trattati.

Non è stato rilevato nessun aumento di metilazione nei promotori dei geni appartenenti alla famiglia delle DNA Metiltransferasi (DNMT 1, 2, 3A, 3B, 3L), ma solo una diminuzione della metilazione a seguito di trattamento in DNMT3L (DNA (cytosine-5)-methyltransferase 3-like), che potrebbe indicare un aumento di trascrizione del trascritto di questo gene. Le DNMTs sono geni che codificano per proteine che metilano il DNA e che controllano lo stato di metilazione risultando quindi come elementi chiave anche nella regolazione dell'espressione genica. Il prodotto del gene DNMT3L non funziona come un DNA metiltransferasi in quanto non contiene i residui amminoacidici necessari per l'attività di metiltransferasi. Tuttavia, questa proteina stimola la metilazione de novo ad opera della DNA metiltransferasi 3 alpha e si pensa possa essere richiesta per l'imprinting genetico materno. Questa proteina media anche la repressione trascrizionale attraverso l'interazione con l'istone deacetilasi 1. (Pubmed gene ID 29947)

Riguardo ai geni relativi al ciclo cellulare, si verifica un aumento di metilazione sul promotore di E2F2, fattore di trascrizione e oncosoppressore, e su ATR, altro gene necessario per l'arresto del ciclo cellulare e in grado di fosforilare BRCA1. Confrontando i controlli e i trattati si registra inoltre una perdita di metilazione, seppur non elevata in CDC25A (cell division cycle 25A) e MDM2 (MDM2 E3 ubiquitin protein ligase). Il primo è un oncogene e il secondo un promotore della formazione di tumori. Nel pathway dell'apoptosi, oltre a TP53 anche DIABLO e caspasi 9, che svolgono un importante ruolo regolatore di questo processo, risultano altamente metilati. Per il pathway degli estrogeni e androgeni risulta mediamente metilato PTENP1, oncosoppressore che regola in maniera negativa il pathway di AKT/PKB. Interessante invece notare che non risultano metilati i promotori di ACOX1 e PPARGC1 α , in linea con i risultati ottenuti sulle linee cellulari tumorali, ma si verifica un aumento di metilazione nel promotore di EHHADH (enoyl-CoA, hydratase/3-hydroxyacyl CoA dehydrogenase) che potrebbe portare a disordini perossisomiali. Anche il promotore di FABP3 (fatty acid binding protein 3, muscle and heart (mammary-derived growth inhibitor)), oncosoppressore impiegato nel trasporto e metabolismo degli acidi grassi, ma anche come modulatore della crescita cellulare e proliferazione, risulta metilato dopo trattamento. Perde invece la regolazione da parte della metilazione RXRA (retinoid X receptor alpha), un recettore nucleare che si lega ai recettori PPAR modulandone l'attività.

Questi risultati sono ancora risultati preliminari, pertanto dovranno essere confermati e ampliati, utilizzando anche altre linee cellulari, ma si può già ipotizzare una potenzialità cancerogena di entrambi i composti utilizzati riguardo al tumore al seno, ed un potenziale controllo a livello epigenetico su geni importanti per lo sviluppo ma anche per il ciclo cellulare e apoptosi.

BIBLIOGRAFIA

- Abbott BD (2009) Review of the expression of peroxisome proliferator-activated receptors alpha (PPAR α), b (PPAR β), and g (PPAR γ) in rodent and human development. *Reprod Toxicol* 27:246–257
- Abbott BD, Wolf CJ, Das KP, Zehr RD, Schmid JE, Lindstrom AB, Strynar MJ, Lau C (2009) Developmental toxicity of perfluorooctane sulfonate (PFOS) is not dependent on expression of peroxisome proliferator activated receptor- α (PPAR α) in the mouse. *Reprod Toxicol* 27:258–265
- Abdellatif A., Al-Tonsy A.H., Awad M.E., Roberfroid M., Khan M.N., Peroxisomal enzymes and 8-hydroxydeoxyguanosine in rat liver treated with perfluorooctanoic acid, *Dis. Markers* 19 (2003) 19–25.
- Alexander B.H., Olsen G.W., Bladder cancer in perfluorooctanesulfonyl fluoride manufacturing workers, *Ann. Epidemiol.* 17 (2007) 471–478.
- Alexander B.H., Olsen G.W., Burris J.M., Mandel J.H., Mandel J.S., Mortality of employees of a perfluorooctanesulphonyl fluoride manufacturing facility, *Occup. Environ. Med.* 60 (2003) 722–729.
- Antequera F & Bird A 1993 Number of CpG islands and genes in human and mouse. *PNAS* 90 11995–11999.
- Apelberg BJ, Goldman LR, Calafat AM, Herbstman JB, Kuklennyik Z, Heidler J, et al. Determinants of fetal exposure to polyfluoroalkyl compounds in baltimore, maryland. *Environ Sci Technol* 2007;41:3891–7.
- Apelberg BJ, Witter FR, Herbstman JB, Calafat AM, Halden RU, Needman LL, et al. Cord serum concentrations of perfluorooctane sulfonate (PFOS) and perfluorooctanoate (PFOA) in relation to weight and size at birth. *Environ Health Perspect* 2007; 115:1670-6.
- Austin, M. E.; Kasturi, B. S.; Barber, M.; Kannan, K.; Mohan- Kumar, P. S.; MohanKumar, S. M. J. Neuroendocrine effects of perfluorooctane sulfonate in rats. *Environ. Health Perspect.* 2003, 111, 1485–1489.
- Bachman KE, Herman JG, Corn PG, Merlo A, Costello JF, Cavenee WK, Baylin SB & Graff JR 1999
- Bartell SM, Calafat AM, Lyu C, Kato K, Ryan PB, Steenland K (2010) Rate of decline in serum PFOA concentrations after granular activated carbon filtration at two public water systems in Ohio and West Virginia. *Environ Health Perspect* 118:222–228

- Basar K., Sesia T., Groenewegen H., Steinbusch W. M., Visser-Vanderwalle V., Temel Y., Nucleus accumbens and impulsivity. *Prog. Neurobiol.* 2010, 92, 533–557.
- Baylin SB, Esteller M, Rountree MR, Bachman KE, Schuebel K & Herman JG 2001 Aberrant patterns of DNA methylation, chromatin formation and gene expression in cancer. *Human Molecular Genetics* 10 687–692.
- Baylin SB, Herman JG, Graff JR, Vertino PM & Issa JP 1998 Alterations in DNA methylation: a fundamental aspect of neoplasia. *Advances in Cancer Research* 72 141–196.
- Belancio VP., Roy-Engel A., and Deininger. P. All y'all need to know 'bout retroelements in cancer. *Seminars in Cancer Biology*. Invited review. Aug;20(4):200-10 2010
- Belancio VP., Roy-Engel AM., Pochampally RR., and Deininger P. Somatic expression of LINE-1 elements in human tissues. *Nucleic Acid Research*. Jul 1;38(12):3909-22, 2010
- Benninghoff AD, Bisson WH, Koch DC, Ehresman DJ, Kolluri SK, Williams DE (2011) Estrogen-like activity of perfluoroalkyl acids in vivo and interaction with human and rainbow trout estrogen receptors in vitro. *Toxicol Sci* 120(1):42–58.
- Berger J. and Moller D. E. (2002). The mechanisms of action of PPARs. *Annu. Rev. Med.* 53, 409–435
- Berthiaume J., Wallace K.B., 2002. Perfluorooctanoate, perfluorooctanesulfonate, and N-ethyl perfluorooctanesulfonamido ethanol: peroxisome proliferation and mitochondrial biogenesis. *Toxicol. Lett.* 129, 23–32.
- Bestor TH & Verdine GL 1994 DNA methyltransferases. *Current Opinion in Cell Biology* 6 380–389.
- Bjork J.A., Butenhoff J.L., Wallace K.B. (2011) Multiplicity of nuclear receptor activation by PFOA and PFOS in primary human and rodent hepatocytes.
- Bjork J.A., Wallace K.B., Structure–activity relationships and human relevance for perfluoroalkyl acid-induced transcriptional activation of peroxisome proliferation in liver cell cultures, *Toxicol. Sci.* 111 (2009) 89–99.
- Bjork JA, Lau C, Chang S, Butenhoff JL, Wallace KB (2008) Perfluorooctane sulfonate-induced changes in neonatal rat liver gene expression. *Toxicology* 251:8–20
- Bogdanska J., Borg D., Sundstrom M., Halldin K., Abedi-Valugerdi M., Bergman A., Nelson B., DePierre J., Nobel S., Tissue distribution of 35S-labelled perfluorooctane sulfonate in adult mice after oral exposure to a low environmentally relevant dose or a high experimental dose. *Toxicology* 2011, 284, 54–62.

- Bonefeld-Jorgensen EC, Long M, Bossi R, Ayotte P, Asmund G, Kruger T, Ghisari M, Mulvad G, Kern P, Nzulumiki P, Dewailly E (2011) Perfluorinated compounds are related to breast cancer risk in Greenlandic Inuit: a case control study. *Env Health* 10:88.
- Bookstaff R.C., Moore R.W., Ingall G.B., Peterson R.E., Androgenic deficiency in male rats treated with perfluorodecanoic acid. *Toxicol Appl Pharmacol* 1990;104:322–33.
- Brandsma SH, Smithwick M, Solomon K, Small J, de Boer J, Muir DCG. (2011) Dietary exposure of rainbow trout to 8:2 and 10:2 fluorotelomer alcohols and perfluorooctanesulfonamide: Uptake, transformation and elimination. *Chemosphere* 82:253–258.
- Brieger A., Bienefeld N., Hasan N., Goerlich R., Haase H.(2010). Impact of perfluorooctanoic acid on human peripheral leukocytes.
- Buist SC, Cherrington NJ, Klaassen CD (2003) Endocrine regulation of rat organic anion transporters. *Drug Metab Dispos* 31:559–564
- Buist SC, Klaassen CD (2004). Rat and mouse differences in gender-predominant expression of organic anion transporter (Oat1-3; Slc22a6-8) mRNA levels. *Drug Metab Dispos* 32: 620–625
- Butenhoff J.L., Chang S.C., Ehresman D.J., York R.G., (2009). Evaluation of potential reproductive and developmental toxicity of potassium perfluorohexanesulfonate in Sprague Dawley rats. *Reprod. Toxicol.*, 27, 331–341.
- Butenhoff J.L., Kennedy G.L., (2004). The reproductive toxicology of ammonium perfluorooctanoate (APFO) in the rat. *Toxicology*, 196, 95–116.
- Butenhoff JL, Kennedy GL Jr, Hinderliter PM, Lieder PH, Jung R, Hansen KJ, Gorman GS, Noker PE, Thomford PJ (2004) Pharmacokinetics of perfluorooctanoate in cynomolgus monkeys. *Toxicol Sci* 82:394–406
- Calafat A.M., Needham L.L., Kuklennyik Z., Reidy J.A., Tully J.S., Guilar- Villalobos M., Naeher L.P., (2006). Perfluorinated chemicals in selected residents of the American continent, *Chemosphere* 63 490–496.
- Calafat, A. M.; Wong, L. Y.; Kuklennyik, Z.; Reidy, J. A.; Needham, L. L. (2007). Polyfluoroalkyl chemicals in the U.S. Population: Data from the National Health and Nutrition Examination Survey (NHANES) 2003_2004 and Comparisons with NHANES 1999_2000. *Environ. Health Perspect.*, 115 (11), 1596–1602.
- Chan MF, Liang G & Jones PA (2000) Relationship between transcription and DNA methylation. *Current Topics in Microbiology and Immunology* 249 75–86.

- Chang SC, Das K, Ehresman DJ, Ellefson ME, Gorman GS, Hart JA, Noker PE, Tan YM, Lieder PH, Lau C, Olsen GW, Butenhoff JL (2008) Comparative pharmacokinetics of perfluorobutyrate in rats, mice, monkeys, and humans and relevance to human exposure via drinking water. *Toxicol Sci* 104:40–53
- Chang SC, Noker PE, Gorman GS, Gibson SJ, Hart JA, Ehresman DJ, Butenhoff JL (2011) Comparative pharmacokinetics of perfluorooctanesulfonate (PFOS) in rats, mice, and monkeys. *Reprod Toxicol*. Epub ahead
- Chen YM, Guo LH (2009) Fluorescence study on site-specific binding of perfluoroalkylacids to human serum albumin. *Arch Toxicol* 83:255–261
- Chen, C.J., Chen C.W., Wu M.M., and Kuo T.L., 1992. Cancer potential in liver, lung, bladder and kidney due to ingested inorganic arsenic in drinking water. *Br J Cancer*, 66(5): p. 888-92.
- Chengelis CP, Kirkpatrick JB, Radovsky A, Shinohara M (2009) A 90-day repeated dose oral (gavage) toxicity study of perfluorohexanoic acid (PFHxA) in rats (with functional observational battery and motor activity determinations). *Reprod Toxicol* 27:342–351.
- Chinetti G., Fruchart J.C., Staels B., (2000). Peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs): nuclear receptors at the crossroads between lipid metabolism and inflammation. *Inflamm. Res.* 49, 497–505.
- Christensen KY, Maisonet M, Rubin C, Holmes A, Calafat AM, Kato K, Flanders WD, Heron J, McGeehin MA, Marcus M (2011). Exposure to polyfluoroalkyl chemicals during pregnancy is not associated with offspring age at menarche in a contemporary British cohort. *Environ Int* 37:129–135
- Corsini E., Avogadro A., Galbiati V., Dell'Agli M., Marinovich M., Galli C.L., Germolec D.R. (2010). In vitro evaluation of the immunotoxic potential of perfluorinated compounds (PFCs).
- Cross SH & Bird AP 1995 CpG islands and genes. *Current Opinion in Genetics and Development* 5 309–314.
- Curran I, Hierlihy SL, Liston V, Pantazopoulos P, Nunnikhoven A, Tittlemier S, Barker M, Trick K, Bondy G (2008) Altered fatty acid homeostasis and related toxicologic sequelae in rats exposed to dietary potassium perfluorooctanesulfonate (PFOS). *J Toxicol Environ Health A* 71:1526–1541
- Das KP, Grey BE, Zehr RD, Wood CR, Butenhoff JL, Chang SC, Ehresman DJ, Tan YM, Lau C (2008) Effects of perfluorobutyrate exposure during pregnancy in the mouse. *Toxicol Sci* 105:173–181

- Dawei Bu, Cheryl M. Lewis, Venetia Sarode, Min Chen, Xiaotu Ma, Aaron M. Lazowitz, Roshni Rao, Marilyn Leitch, Amy Moldrem, Valerie Andrews, Adi Gazdar, and David Euhus. Identification of Breast Cancer DNA Methylation Markers Optimized for Fine-Needle Aspiration Samples. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*; 22(12) December 2013
- D'eon JC, Mabury SA (2010). "Exploring Indirect Sources of Human Exposure to Perfluoroalkyl Carboxylates (PFCAs): Evaluating Uptake, Elimination and Biotransformation of Polyfluoroalkyl Phosphate Esters (PAPs) in the Rat". *Environ Health Perspect* 119 (3): 344–350.
- DeWitt JC, Shnyra A, Badr MZ, Loveless SE, Hoban D, Frame SR, Cunard R, Anderson SE, Meade BJ, Peden-Adams MM, Luebke RW, Luster MI (2009) Immunotoxicity of perfluorooctanoic acid and perfluorooctane sulfonate and the role of peroxisome proliferator-activated receptor α . *Crit Rev Toxicol* 39:76–94
- Dobrovic A & Simpfendorfer D 1997 Methylation of the BRCA1 gene in sporadic breast cancer. *Cancer Research* 57 3347–3350.
- Dong G.H., Zhang Y.H., Zheng L., Liang Z.F., Jin Y.H., He Q.C., (2010). Subchronic effects of perfluorooctanesulfonate exposure on inflammation in adult male C57BL/6 mice. *Environmental Toxicology*. doi:10.1002/tox.20642.
- Dreyer C., Krey G., Keller H., Givel F., Helftenbein G., and Wahli W (1992). Control of the peroxisomal beta-oxidation pathway by a novel family of nuclear hormone receptors. *Cell* 68, 879–887.
- Ehresman DJ, Chang S, Bjork JA, Hart JA, Lieder PH, Wallace KB, Butenhoff JL (2007). Increased acyl CoA oxidase activity in rats after five consecutive daily doses of perfluorobutanesulfonate, perfluorohexanesulfonate, and perfluorooctanesulfonate. *Toxicologist* 96:179
- Era S, Harada KH, Toyoshima M, Inoue K, Minata M, Saito N, Takigawa T, Shiota K, Koizumi A (2009). Cleft palate caused by perfluorooctane sulfonate is caused mainly by extrinsic factors. *Toxicology* 256:42–47
- Eriksen K.T., Raaschou-Nielsen O., Soresen M., Roursgaard M., Loft S., Moller P (2010). Genotoxic potential of the perfluorinated chemicals PFOA, PFOS, PFBS, PFNA and PFHxA in the human Hep G2 cells.
- Eriksen K.T., Soresen M., McLaughlin J.K., Lipworth L., Tjonneland A., Overvad K., Raaschou-Nielsen O. (2009). Perfluorooctanoate and perfluorooctanesulfonate plasma levels and risk of cancer in the general Danish population, *J. Natl. Cancer Inst.* 101 605–609.

- European Parliament. 2006b. Directive 2006/122/EC of the European Parliament and of the Council of 12 December 2006. Official Journal of the EU, 27 December 2006, L372/32-L372/34.
- Fairley KJ, Purdy R, Kearns S, Anderson SE, Meade BJ (2007) Exposure to the immunosuppressant, perfluorooctanoic acid, enhances the murine IgE and airway hyperreactivity response to ovalbumin. *Toxicol Sci* 97:375–383
- Fei C, McLaughlin JK, Lipworth L, Olsen J (2009) Maternal levels of perfluorinated chemicals and subfecundity. *Hum Reprod* 24:1200–1205
- Fei C., McLaughlin J. K., Tarone R. E., Olsen J., 2008. Fetal growth indicators and perfluorinated chemicals: A study in the Danish National Birth Cohort. *Am. J. Epidemiol.* 168, 66–72.
- Fei C., McLaughlin J. K., Tarone R. E., Olsen J., (2007). Perfluorinated chemicals and fetal growth: a study within the Danish National Birth Cohort. *Environ. Health Perspect.* 115, 1677–1682.
- Feinberg AP 2001 Cancer epigenetics takes center stage. *PNAS* 98 392–394.
- Feng Y., Fang X., Shi Z., Xu M., Dai J. (2010). Effect of PFNA exposure on expression of junction-associated molecules and secretory function in rat Sertoli cells.
- Feng Y., Fang X., Shi Z., Xu M., Dai J. (2010). Effect of PFNA exposure on expression of junction-associated molecules and secretory function in rat Sertoli cells.
- Feng Y., Shi Z., Fang X., Xu M., Dai J., Perfluorononanoic acid induces apoptosis involving the Fas death receptor signaling pathway in rat testis. *Toxicol Lett* (2009);190:224–30.
- Foley, D.L., Craig, J.M., Morley, R., Olsson, C.J., Dwyer, T., Smith, K., Saffery, R., 2009. Prospects for epigenetic epidemiology. *Am. J. Epidemiol.* 169, 389–400.
- Foreman JE, Chang SC, Ehresman DJ, Butenhoff JL, Anderson CR, Palkar PS, Kang BH, Gonzalez FJ, Peters JM (2009) Differential hepatic effects of perfluorobutyrate mediated by mouse and human PPAR- α . *Toxicol Sci* 110:204–211
- Frisbee SJ, Shankar A, Knox SS, Steenland K, Savitz DA, Fletcher T, Ducatman AM (2010) Perfluorooctanoic acid, perfluorooctanesulfonate, and serum lipids in children and adolescents: results from the C8 Health Project. *Arch Pediatr Adolesc Med* 164:860–869
- Fromme H., Mosch C., Morovitz M., Alba-Alejandre I., Boehmer S., Kiranoglu M., et al. Pre and postnatal exposure to perfluorinated compounds (PFCs). *Environ Sci Technol* (2010); 44:7123-9.

- Fromme H., Tittlemier S.A., Volkel W., Wilhelm M., Twardella D., (2009). Perfluorinated compounds—exposure assessment for the general population in western countries. *Int.J.Hyg. Environ.Health* 212,239–270.
- Fuentes S., Colomina M. T., Vicens P., Franco-Pons N., Domingo J. L., Concurrent exposure to perfluorooctane sulfonate and restraint stress during pregnancy in mice: effects on postnatal development and behavior of the offspring. *Toxicol Sci.* 2007, 98, 589–598.
- Giesy J.P., Kannan K., Global distribution of perfluorooctane sulfonate in wildlife, *Environ. Sci. Technol.* 35 (2001) 1339–1342.
- Gilliland, F.D. and Mandel J.S., Serum perfluorooctanoic acid and hepatic enzymes, lipoproteins, and cholesterol: a study of occupationally exposed men. *Am J Ind Med*, 1996. 29(5): p. 560-8.
- Grasty R.C., Bjork J.A., Wallace K.B., Wolf D.C., Lau C.S., Rogers R.J., 2005. Effects of prenatal perfluorooctane sulfonate (PFOS) exposure on lung maturation in the perinatal rat. *Birth Defects Res. B Dev. Reprod. Toxicol.* 74, 405–416.
- Guerrero-Preston, R., Goldman, L.R., Brebi-Mieville, P., et al. (2010). Global DNA hypomethylation is associated with in utero exposure to cotinine and perfluorinated alkyl compounds. *Epigenetics* 5, 539–546.
- Guo, Z.; Liu, X.; Krebs, K.; Roache, N. Perfluorocarboxylic Acid Content in 116 Articles of Commerce, EPA/600/R-09/033; U.S. Environmental Protection Agency: Washington, DC, 2009.
- Guruge K.S., Hikono H., Shimada N., Murakami K., Hasegawa J., Yeung L.W., Yamanaka N., Yamashita N., 2009. Effect of perfluorooctane sulfonate (PFOS) on influenza A virus-induced mortality in female B6C3F1 mice. *J. Toxicol. Sci.* 34, 687–691.
- Guruge K.S., Taniyasu S., Yamashita N., Wijeratna S., Mohotti K.M., Seneviratne H.R., et al. Perfluorinated organic compounds in human blood serum and seminal plasma: a study of urban and rural tea worker populations in Sri Lanka. *J Environ Monit* 2005;7:371–7.
- Guruge KS, Yeung LW, Yamanaka N, Miyazaki S, Lam PK, Giesy JP, Jones PD, Yamashita N (2006) Gene expression profiles in rat liver treated with perfluorooctanoic acid (PFOA). *Toxicol Sci* 89:93–107
- Hamm M.P., Cherry N.M., Chan E., Martin J.W., Burstyn I., Maternal exposure to perfluorinated acids and fetal growth. *J. Exposure Sci. Environ. Epidemiol.* 2009, 20, 589–597.
- Han X, Hinderliter PM, Snow TA, Jepson GW (2004) Binding of perfluorooctanoic acid to rat liver-form and kidney-form a2u-globulins. *Drug Chem Toxicol* 27:341–360

- Hanhijarvi H, Ylinen M, Haaranen T, Nevalainen T (1988). A proposed species difference in the renal excretion of perfluorooctanoic acid in the beagle dog and rat. In: Beynen AC, Solleveld HA (eds) *New development in biosciences: their implications for laboratory animal sciences*. Martinus Nijhoff Publishers, Dordrecht, The Netherlands, pp 409–412
- Harada K, Inoue K, Morikawa A, Yoshinaga T, Saito N, Koizumi A (2005) Renal clearance of perfluorooctane sulfonate and perfluorooctanoate in humans and their species-specific excretion. *Environ Res* 99:253–261
- Haukås M, Berger U, Hop H, Gulliksen G, Gabrielsen GW. (2007) Bioaccumulation of per- and polyfluorinated alkyl substances (PFAS) in selected species from the Barents Sea food web. *Environmental Pollution* 148:360-371.
- Hazleton, I., Mutagenicity test with T-6342 in an in vivo mouse micronucleus assay. Corning Hazleton, Inc. Final Report CHV Study Number 17073-0-455. December 14, 1995. US EPA AR226-0435. 1995.
- Heard E, Clerc P & Avner P 1997 X-chromosome inactivation in mammals. *Annual Review of Genetics* 31 571–610.
- Henry ND, Fair PA (2011) Comparison of in vitro cytotoxicity, estrogenicity and anti-estrogenicity of triclosan, perfluorooctane sulfonate and perfluorooctanoic acid. *JAT*.
- Herzke D, Nygård T, Berger U, Huber S, Rørv N. (2009) Perfluorinated and other persistent halogenated organic compounds in European shag (*Phalacrocorax aristotelis*) and common eider (*Somateria mollissima*) from Norway: A suburban to remote pollutant gradient. *Science of the Total Environment* 408: 340–348.
- Hinderliter PM, Mylchreest E, Gannon SA, Butenhoff JL, Kennedy GL (2005) Perfluorooctanoate: placental and lactational transport pharmacokinetics in rats. *Toxicology* 211:139–148
- Hoff PT, Scheirs J, Van de Vijver K, Van Dongen W, Esmans EL, Blust R, De Coen W (2004) Biochemical effect evaluation of perfluorooctane sulfonic acid-contaminated wood mice (*Apodemus sylvaticus*). *Environ Health Perspect* 112:681–686
- Hoffman K., Webster T.F., Weisskopf M.G., Weinberg J., Vieira V.M., Exposure to polyfluoroalkyl chemicals and attention deficit hyperactivity disorder in US children aged 12_15 years. *J. Environ. Health Perspect.* 2010, 118, 1762–1767.
- Hu, X.Z. and Hu D.C., Effects of perfluorooctanoate and Perfluorooctane sulfonate exposure on hepatoma Hep G2 cells. *Arch Toxicol*, 2009. 83(9): p. 851-61.

- Hundley SG, Sarrif AM, Kennedy GL (2006) Absorption, distribution, and excretion of ammonium perfluorooctanoate (APFO) after oral administration to various species. *Drug Chem Toxicol* 29:137–145
- Ikeda, K., Saitoh S., Koida I., Arase Y., Tsubota A., Chayama K., Kumada H., and Kawanishi M., A multivariate analysis of risk factors for hepatocellular carcinogenesis: a prospective observation of 795 patients with viral and alcoholic cirrhosis. *Hepatology*, 1993. 18(1): p. 47-53.
- Inoue K., Okada F., Ito R., Kato S., Sasaki S., Nakajima S., Uno A., Saijo Y., Sata F., Yoshimura Y. et al. Perfluorooctane sulfonate (PFOS) and related perfluorinated compounds in human maternal and cord blood samples: assessment of PFOS exposure in a susceptible population during pregnancy. *Environ Health Perspect.* 2004, 112, 1204–1207.
- Issemann I. and Green S. (1990). Activation of a member of the steroid hormone receptor superfamily by peroxisome proliferators. *Nature* 347, 645–650.
- Joensen UN, Bossi R, Leffers H, Jensen AA, Skakkebaek NE, Jorgensen N (2009) Do perfluoroalkyl compounds impair human semen quality? *Environ Heal Perspect* 117(6):923–927.
- Johansson N, Fredriksson A, Eriksson P (2008) Neonatal exposure to perfluorooctane sulfonate (PFOS) and perfluorooctanoic acid (PFOA) causes neurobehavioural defects in adult mice. *Neurotoxicology* 29:160–169
- Johansson N., Eriksson P., Viberg H., Neonatal exposure to PFOS and PFOA in mice results in changes in proteins which are important for neuronal growth and synaptogenesis in the developing brain. *Toxicol. Sci.* 2009, 108, 412–418.
- Johnson JD, Gibson SJ, Ober RE (1984) Cholestyramine-enhanced fecal elimination of carbon-14 in rats after administration of ammonium [14C]perfluorooctanoate or potassium [14C]perfluorooctanesulfonate. *Fundam Appl Toxicol* 4:972–976
- Jones PD, Hu W, Coen W de, Newsted JL, Giesy JP. (2003) Binding of perfluorinated fatty acids to serum proteins. *Environmental Toxicology and Chemistry* 22, 2639-2649.
- Kaneuchi M, Sasaki M, Tanaka Y, et al. WT1 and WT1-AS genes are inactivated by promoter methylation in ovarian clear cell adenocarcinoma. *Cancer. This issue*
- Kannan K., Corsolini S., Falandysz J., Fillmann G., Kumar K.S., Loganathan B.G., Mohd M.A., Olivero J., Van W.N., Yang J.H., Aldoust K.M., Perfluorooctanesulfonate and related fluorochemicals in human blood from several countries, *Environ. Sci. Technol.* 38 (2004) 4489–4495.

- Karmann A., Mueller J.F., Van Bavel B., Harden F., Toms L.M., Lindstrom G., Levels of 12 Perfluorinated chemicals in pooled Australian serum, collected 2002-2003, in relation to age, gender and region. *Environ Sci Technol* 2006; 40:3742-8.
- Kato K., Wong L., Jia L., (2011) Trends in exposure to perfluoroalkyl chemicals in the US population: 1999-2008 *Environ Sci Technol*
- Kato, J., Kobune M., Nakamura T., Kuroiwa G., Takada K., Takimoto R., Sato Y., Fujikawa K., Takahashi M., Takayama T., Ikeda T., and Niitsu Y., Normalization of elevated hepatic 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine levels in chronic hepatitis C patients by phlebotomy and low iron diet. *Cancer Res*, 2001. 61(24): p. 8697-702.
- Kennedy GL, Butenhoff JL, Olsen GW, O'Connor JC, Seacat AM, Perkins RG, Biegel LB, Murphy SR, Farrar DG (2004) The toxicology of perfluorooctanoate. *Crit Rev Toxicol* 34:351–384
- Kim S.K., Lee K.T., Kang C., Tao L., Kannan K., Kim K.R., Yoo W., (2010) Distribution of perfluorochemicals between sera and milk from the same mothers and implications for prenatal and postnatal exposures.
- Klaunig J.E., Babich M.A., Baetcke K.P., Cook J.C., Corton J.C., David R.M., DeLuca J.G., Lai D.Y., McKee R.H., Peters J.M., Roberts R.A., Fenner-Crisp P.A., PPAR_α agonist-induced rodent tumors: modes of action and human relevance, *Crit. Rev. Toxicol.* 33 (2003) 655–780.
- Kleszczynski K., Gardzielewski P., Mulkiewicz E., Stepnowski P., Skladanowski A.C., 2007. Analysis of structure-cytotoxicity in vitro relationship (SAR) for perfluorinated carboxylic acids. *Toxicology in Vitro* 21, 1206e1211
- Kovalenko, V.M., Bagnyukova, T.V., Sergienko, O.V., et al. (2007). Epigenetic changes in the rat livers induced by pyrazinamide treatment. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 225, 293–299.
- Kudo N, Bandai N, Suzuki E, Katakura M, Kawashima Y (2000) Induction by perfluorinated fatty acids with different carbon chain length of peroxisomal beta-oxidation in the liver of rats. *Chem Biol Interact* 124:119–132
- Kudo N, Mizuguchi H, Yamamoto A, Kawashima Y (1999) Alterations by perfluorooctanoic acid of glycerolipid metabolism in rat liver. *Chem Biol Interact* 118:69–83
- Kudo N, Suzuki-Nakajima E, Mitsumoto A, Kawashima Y (2006) Responses of the liver to perfluorinated fatty acids with different carbon chain length in male and female mice in relation to induction of hepatomegaly, peroxisomal beta-oxidation and microsomal acylglycerophosphocholine acyltransferase. *Biol Pharm Bull* 29:1952–1957

- Langer V, Dreyer A, Ebinghaus R (November 2010). "Polyfluorinated compounds in residential and nonresidential indoor air". *Environ. Sci. Technol.* 44 (21): 8075–81.
- Langley AE, Pilcher GD (1985) Thyroid, bradycardic and hypothermic effects of perfluorodecanoic acid in rats. *J Toxicol Environ Health* 15:485–491
- Lau C, Anitole K, Hodes C, Lai D, Pfahles-Hutchens A, Seed J (2007) Perfluoroalkyl acids: a review of monitoring and toxicological findings. *Toxicol Sci* 99:366–394
- Lau C, Thibodeaux JR, Hanson RG, Narotsky MG, Rogers JM, Lindstrom AB, Strynar MJ (2006) Effects of perfluorooctanoic acid exposure during pregnancy in the mouse. *Toxicol Sci* 90:510–518
- Lau C., Thibodeaux J., Ehresman D., Tanaka S., Froehlich J., Butenhoff J., Evaluation of perfluorooctanesulfonate in rat brain. *The Toxicologist*, 2006, 90, 118.
- Lau C., Thibodeaux J.R., Hanson R.G., Rogers J.M., Grey B.E., Stanton M.E., et al. 2003. Exposure to perfluorooctane sulfonate during pregnancy in rat and mouse. II: postnatal valuation. *Toxicol Sci* 74:382–392
- Lawler, T.E., Mutagenicity test with T-6342 in the Salmonella-Escherichia Coli/mammalian microsome reverse mutation assay with a confirmatory assay. Laboratory number: 17073-0-409. Corning Hazelton Inc., Vienna, VA. 3M Company. St. Paul, MN. USA EPA AR226-0432. 1995.
- Lawler, T.E., Mutagenicity test with T-6564 in the Salmonella-Escherichia Coli/mammalian microsome reverse mutation assay with a confirmatory assay. Corning Hazelton Inc., Final report. CHV Study No. 17750-0-409R. USA EPA R226-0432. 1996.
- Lazarow P.B. and De Duve C. (1976). A fatty acyl-CoA oxidizing system in rat liver peroxisomes; enhancement by clofibrate, a hypolipidemic drug. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 73, 2043–2046.
- Lee, D.H., Jacobs, D.J., Porta, M., 2009. Hypothesis: a unifying mechanism for nutrition and chemicals as lifelong modulators of DNA hypomethylation. *Environ. Health Perspect.* 117, 1799–1802.
- Lefebvre DE, Curran I, Armstrong C, Coady L, Parenteau M, Liston V, Barker M, Aziz S, Rutherford K, Bellon-Gagnon P, Shenton J, Mehta R, Bondy G (2008) Immunomodulatory effects of dietary potassium perfluorooctane sulfonate (PFOS) exposure in adult Sprague--Dawley rats. *J Toxicol Environ Health A* 71:1516–1525
- Li E, Beard C, Forster AC, Bestor TH & Jaenisch R 1993 DNA methylation, genomic imprinting, and mammalian development. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology* 58 297–305.

- Liao C, Wang T, Cui L, Zhou Q, Duan S, Jiang G (2009) Changes in synaptic transmission, calcium current, and neurite growth by perfluorinated compounds are dependent on the chain length and functional group. *Environ Sci Technol* 43:2099–2104
- Liao CY, Li XY, Wu B, Duan S, Jiang GB (2008) Acute enhancement of synaptic transmission and chronic inhibition of synaptogenesis induced by perfluorooctane sulfonate through mediation of voltage-dependent calcium channel. *Environ Sci Technol* 42:5335–5341
- Lieder PH, York RG, Hakes DC, Chang SC, Butenhoff JL (2009) A two-generation oral gavage reproduction study with potassium perfluorobutanesulfonate (K+PFBS) in Sprague Dawley rats. *Toxicology* 259:33–45
- Lin CY, Chen PC, Lin YC, Lin LY (2009) Association among serum perfluoroalkyl chemicals, glucose homeostasis, and metabolic syndrome in adolescents and adults. *Diabetes Care* 32:702–707
- Lisbeth Stigaard Kjeldsen & Eva Cecilie Bonefeld-Jørgensen Perfluorinated compounds affect the function of sex hormone receptors Received: 18 January 2013 / Accepted: 16 April 2013 / Published online: 14 June 2013 # Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2013
- Liu J., Li J., Liu Y., Man Chan H., Zhao Y., Cai Z., Wu Y. (2011). Comparison on gestation and lactation exposure of perfluorinated compounds for newborns.
- Liu RC, Hurtt ME, Cook JC, Biegel LB (1996) Effect of the peroxisome proliferator, ammonium perfluorooctanoate (C8), on hepatic aromatase activity in adult male Crl:CD BR (CD) rats. *Fundam Appl Toxicol* 30:220–228
- Liu X, Liu W, Jin Y, Yu W, Liu L, Yu H (2010) Effects of subchronic perfluorooctane sulfonate exposure of rats on calcium-dependent signaling molecules in the brain tissue. *Arch Toxicol* 84:471–479
- Ljubojevic M, Balen D, Breljak D, Kusan M, Anzai N, Bahn A, Burckhardt G, Sabolic I (2007) Renal expression of organic anion transporter OAT2 in rats and mice is regulated by sex hormones. *Am J Physiol Renal Physiol* 292:F361–372
- Loccisano A.E., Campbell J.L., Butenhoff J.L., Andersen M.E., Clevel H.E.(2011). Comparison and evaluation of pharmacokinetics of PFOS and PFOA in the adult rat using a physiologically based pharmacokinetics model.
- Lopez-Espinosa M.J., D Mondal, B Armstrong, et al.(2012) Thyroid Function and Perfluoroalkyl Acids in Children Living Near a Chemical Plant. *Environ Health Perspect* July; 120(7): 1036–1041
- Lopez-Espinosa MJ, Fletcher T, Armstrong B, Genser B, Dhatariya K, Mondal D, Ducatman A, Leonardi G (2011) Association of perfluorooctanoic acid (PFOA) and perfluorooctane

- sulfonate (PFOS) with age of puberty among children living near a chemical plant. *Environ Sci Technol* 45(19):8160–8166.
- Loveless SE, Slezak B, Serex T, Lewis J, Mukerji P, O'Connor JC, Donner EM, Frame SR, Korzeniowski SH, Buck RC (2009) Toxicological evaluation of sodium perfluorohexanoate. *Toxicology* 264:32–44
- Luebker D. J., Case M. T., York R. G., Moore J. A., Hansen K. J., Butenhoff J. L., Two-generation reproduction and cross-foster studies of perfluorooctanesulfonate (PFOS) in rats. *Toxicology* 2005, 215, 126–148.
- Luebker D.J., York R.G., Hansen K.J., Moore J.A., Butenhoff J.L. 2005b. Neonatal mortality from in utero exposure to perfluorooctanesulfonate (PFOS) in Sprague-Dawley rats: dose-response, and biochemical and pharmacokinetic parameters. *Toxicology* 215:149–169.
- Luebker DJ, Case MT, York RG, Moore JA, Hansen KJ, Butenhoff JL (2005) Two-generation reproduction and cross-foster studies of perfluorooctanesulfonate (PFOS) in rats. *Toxicology* 215:126–148
- Luebker DJ, Hansen KJ, Bass NM, Butenhoff JL, Seacat AM (2002) Interactions of fluorochemicals with rat liver fatty acid-binding protein. *Toxicology* 176:175–185
- MacNeil J, Steenland NK, Shankar A, Ducatman A (2009) A cross-sectional analysis of type II diabetes in a community with exposure to perfluorooctanoic acid (PFOA). *Environ Res* 109:997–1003
- Maras M, Vanparys C, Muylle F, Robbens J, Berger U, Barber JL, Blust R, De Coen W (2006) Estrogen-like properties of fluorotelomer alcohols as revealed by mcf-7 breast cancer cell proliferation. *Environ Heal Perspect* 114(1):100–105
- Martin MT, Breman R, Hu W, Ayanoglu E, Lau C, Ren H, Wood CR, Corton JC, Kavlock RJ, Dix DJ (2007) Toxicogenomic study of triazole fungicides and perfluoroalkyl acids in rat livers accurately categorizes chemicals and identifies mechanisms of toxicity. *Toxicol Sci* 97:595–613
- Meyer J, Jaspers VLB, Eens M, Coen W de. (2009) The relationship between perfluorinated chemical levels in the feathers and livers of birds from different trophic levels. *Science of the Total Environment* 407:5894-5900.
- Midasch O., Schettgen T., Angerer J., Pilot study on the perfluorooctanesulfonate and perfluorooctanoate exposure of the German general population, *Int. J. Hyg. Environ. Health* 6 (2006) 489–496.

- Monroy R., Morrison K., Teo K., Atkinson S., Kubwabo C., Stewart B., et al. Serum levels of perfluoroalkyl compounds in human maternal and umbilical cord blood samples. *Environ Res* 2008;108:56–62.
- Murakami M., Shinohara H., Takada H. Evaluation of wastewater and street runoff as sources of perfluorinated surfactants (PFSs). *Chemosphere* 2009;74:487–93.
- Murli, H., Mutagenicity test on T-6342 measuring chromosomal aberrations in human whole blood lymphocytes with a confirmatory assay with multiple harvests. Corning Hazleton Inc., Vienna, VA. Study number 17073-0-449CO, November 1, 1996. US EPA AR226-0433. 1996c.
- Murli, H., Mutagenicity test on T-6564 in an in vivo mouse micronucleus assay. Corning Hazleton Inc., Vienna, VA. Study number 17750-0-455, November 1, 1996. US EPA AR226-0430. 1996a.
- Nakamura T., Ito Y., Yanagibaa Y., Ramdhana D., Konoa Y., Naitoa H., Hayashia Y., (2009) Microgram-order ammonium perfluorooctanoate may activate mouse peroxisome proliferator-activated receptor, but not human PPAR.
- Nelson D.L., Frazier Jr. D.E., Ericson J.E., Tarr M.J., Mathes L.E., 1992. The effects of perfluorodecanoic acid (PFDA) on humoral, cellular, and innate immunity in fischer 344 rats. *Immunopharmacology and Immunotoxicology* 14, 925–938.
- NOTOX, Evaluation of the ability of T-7524 to induce chromosomal aberrations in cultured peripheral lymphocytes. NOTOX project number 292062. Hertogenbosch, the Netherlands. 2000.
- O'Brien M.L., Spear B.T., Glauert H.P., Role of oxidative stress in peroxisome proliferator-mediated carcinogenesis, *Crit. Rev. Toxicol.* 35 (2005) 61–88.
- OECD (2002) Hazard assessment of perfluorooctane sulfonate (PFOS) and its salts. Online available at http://www.oecd.org/document/58/0,3343,en_2649_34375_2384378_1_1_1_37465,00.html
- Ohmori K, Kudo N, Katayama K, Kawashima Y (2003) Comparison of the toxicokinetics between perfluorocarboxylic acids with different carbon chain length. *Toxicology* 184:135–140
- Olsen G.W., Burris J.M., Mandel J.H., Zobel L.R. 1999. Serum perfluorooctane sulfonate and hepatic and lipid clinical chemistry tests in fluorochemical production employees. *J Occup Environ Med* 41:799–806.

- Olsen G.W., Burris JM, Burlew MM, Mandel JH. 2003a. Epidemiologic assessment of worker serum perfluorooctanesulfonate (PFOS) and perfluorooctanoate (PFOA) concentrations and medical surveillance examinations. *J Occup Environ Med* 45:260–270
- Olsen G.W., Zobel L.R., 2007. Assessment of lipid, hepatic, and thyroid parameters with serum perfluorooctanoate (PFOA) concentrations in fluorochemical production workers. *Int. Arch. Occup. Environ. Health* 81, 231–246.
- Olsen GW, Burris JM, Ehresman DJ, Froehlich JW, Seacat AM, Butenhoff JL, Zobel LR (2007) Half-life of serum elimination of perfluorooctanesulfonate, perfluorohexanesulfonate, and perfluorooctanoate in retired fluorochemical production workers. *Environ Health Perspect* 115:1298–1305
- Olsen GW, Chang SC, Noker PE, Gorman GS, Ehresman DJ, Lieder PH, Butenhoff JL (2009) A comparison of the pharmacokinetics of perfluorobutanesulfonate (PFBS) in rats, monkeys, and humans. *Toxicology* 256:65–74
- Palmer, C.N., Hsu M.H., Griffin K.J., Raucy J.L., and Johnson E.F., Peroxisome proliferator activated receptor- α expression in human liver. *Mol Pharmacol*, 1998. 53(1): p. 14-22.
- Panaretakis, T., Shabalina I.G., Grander D., Shoshan M.C., and DePierre J.W., Reactive oxygen species and mitochondria mediate the induction of apoptosis in human hepatoma HepG2 cells by the rodent peroxisome proliferator and hepatocarcinogen, perfluorooctanoic acid. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2001. 173(1): p. 56-64.
- Peden-Adams M.M., EuDaly J.G., Dabra S., EuDaly A., Heesemann L., Smythe J., Keil D.E., 2007. Suppression of humoral immunity following exposure to the perfluorinated insecticide sulfuramid. *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A* 70, 1130–1141.
- Peden-Adams M.M., Keller J.M., EuDaly J.G., Berger J., Gilkeson, G.S., Keil D.E., 2008. Suppression of humoral immunity in mice following exposure to perfluorooctane sulfonate. *Toxicological Science* 104, 144–154.
- Prevedouros K, Cousins IT, Buck RC, Korzeniowski SH. (2006) Sources, Fate and Transport of Perfluorocarboxylates. *Environmental Science & Technology*, 40:32-44.
- Provisional Health Advisories for Perfluorooctanoic Acid (PFOA) and Perfluorooctane Sulfonate (PFOS); U.S. Environmental Protection Agency: Washington, DC, January 8, 2009.
- Qazi MR, Xia Z, Bogdanska J, Chang SC, Ehresman DJ, Butenhoff JL, Nelson BD, DePierre JW, Abedi-Valugerdi M (2009) The atrophy and changes in the cellular compositions of the thymus and spleen observed in mice subjected to short-term exposure to

- perfluorooctanesulfonate are high-dose phenomena mediated in part by peroxisome proliferator-activated receptor- α (PPAR α). *Toxicology* 260:68–76
- Rønneberg JA, Fleischer T, Solvang HK, et al. Methylation profiling with a panel of cancer related genes: association with estrogen receptor, TP53 mutation status and expression subtypes in sporadic breast cancer. *Mol Oncol* 2011;5:61–76.
- Reddy J. K., Azarnoff D. L. and Hignite, C. E. (1980). Hypolipidaemic hepatic peroxisome proliferators form a novel class of chemical carcinogens. *Nature* 283, 397–398.
- Reddy J.K. and Krishnakantha T.P. (1975). Hepatic peroxisome proliferation: induction by two novel compounds structurally unrelated to clofibrate. *Science* 190, 787–789
- Ren H, Vallanat B, Nelson DM, Yeung LW, Guruge KS, Lam PK, Lehman-McKeeman LD, Corton JC (2009) Evidence for the involvement of xenobiotic-responsive nuclear receptors in transcriptional effects upon perfluoroalkyl acid exposure in diverse species. *Reprod Toxicol* 27:266–277
- Rosen M.B., Lau C., Corton J.C., 2009. Does exposure to perfluoroalkyl acids present a risk to human health? *Toxicol. Sci.* 111, 1–3.
- Rosen MB, Lee JS, Ren H, Vallanat B, Liu J, Waalkes MP, Abbott BD, Lau C, Corton JC (2008) Toxicogenomic dissection of the perfluorooctanoic acid transcript profile in mouse liver: evidence for the involvement of nuclear receptors PPAR α and CAR. *Toxicol Sci* 103:46–56
- Rosen MB, Schmid JR, Zehr RD, Das KP, Abbott BD, Lau C (2010) Gene expression profiling in wild-type and PPAR α -null mice exposed to perfluorooctane sulfonate reveals PPAR α -independent effects. *PPAR Res.* Epub ahead
- Rosen MB, Thibodeaux JR, Wood CR, Zehr RD, Schmid JE, Lau C (2007) Gene expression profiling in the lung and liver of PFOA-exposed mouse fetuses. *Toxicology* 239:15–33
- Ryan M.T., Hoogenraad N.J., 2007. Mitochondrial-nuclear communications. *Annu. rev. Biochem.* 76, 701–722.
- Saito, I., Miyamura T., Ohbayashi A., Harada H., Katayama T., Kikuchi S., Watanabe Y., Koi S., Onji M., Ohta Y., and et al., Hepatitis C virus infection is associated with the development of hepatocellular carcinoma. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1990. 87(17): p. 6547–9.
- Saito, N.; Harada, K.; Inoue, K.; Sasaki, K.; Yoshinaga, T.; Koizumi, A. Perfluorooctanoate and perfluorooctane sulfonate concentrations in surface water in Japan. *J. Occup. Health* 2004, 46, 49–59.

- Savitz D.A., Steenland K., Fletcher K. E. Status report: Association of perfluorinated compounds with attention deficit/attention deficit hyperactivity disorder and learning disorder among children aged 5_18 years with elevated community exposure to PFOA. Unpublished
- Schechter A, Colacino J, Haffner D, Patel K, Opel M, Pöpke O, Birnbaum L (2010). "Perfluorinated Compounds, Polychlorinated Biphenyl, and Organochlorine Pesticide Contamination in Composite Food Samples from Dallas, Texas". *Environ. Health Perspect.* 118 (6):796–802
- Seacat AM, Thomford PJ, Hansen KJ, Olsen GW, Case MT, Butenhoff JL (2002) Subchronic toxicity studies on perfluorooctanesulfonate potassium salt in *Cynomolgus* monkeys. *Toxicol Sci* 68:249–264
- Shabalina, I.G., Panaretakis T., Bergstrand A., and DePierre J.W., Effects of the rodent peroxisome proliferator and hepatocarcinogen, perfluorooctanoic acid, on apoptosis in human hepatoma HepG2 cells. *Carcinogenesis*, 1999. 20(12): p. 2237-46.
- Shi Z, Ding L, Zhang H, Feng Y, Xu M, Dai J (2009a) Chronic exposure to perfluorododecanoic acid disrupts testicular steroidogenesis and the expression of related genes in male rats. *Toxicol Lett* 188:192–200
- Shi Z, Feng Y, Wang J, Zhang H, Ding L, Dai J (2010) Perfluorododecanoic acid-induced steroidogenic inhibition is associated with steroidogenic acute regulatory protein and reactive oxygen species in cAMP-stimulated Leydig cells. *Toxicol Sci* 114:285–294
- Shi Z, Zhang H, Ding L, Feng Y, Xu M, Dai J (2009b) The effect of perfluorododecanoic acid on endocrine status, sex hormones and expression of steroidogenic genes in pubertal female rats. *Reprod Toxicol* 27:352–359
- Shi Z., Zhang H., Liu Y., Xu M., Dai J. Alterations in gene expression and testosterone synthesis in the testes of male rats exposed to perfluorododecanoic acid. *Toxicol Sci* 2007;98:206–15.
- Shoeib, M. H., T; Wilford, B. H.; Jones, K. C.; Zhu, J. Perfluorinated sulfonamides in indoor and outdoor air and indoor and dust: occurrence, partitioning, and human exposure. *Environ. Sci. Technol.* 2005, 39, 6599–6606.
- Shoeib, M.; Harner, T.; M. Webster, G.; Lee, S. C., Indoor sources of poly- and perfluorinated compounds (PFCS) in Vancouver, Canada: Implications for human exposure. *Environ. Sci. Technol.* 2011,

- Slotkin TA, MacKillop EA, Melnick RL, Thayer KA, Seidler FJ (2008) Developmental neurotoxicity of perfluorinated chemicals modeled in vitro. *Environ Health Perspect* 116: 716–722
- So M.K., Yamashita N., Taniyasu S., Jiang Q., Giesy J.P., Chen K., et al. Health risks in infants associated with exposure to perfluorinated compounds in human breast milk from Zhoushan, China. *Environ Sci Technol* 2006;40:2924–9.
- Son HY, Lee S, Tak EN, Cho HS, Shin HI, Kim SH, Yang JH (2009) Perfluorooctanoic acid alters T lymphocyte phenotypes and cytokine expression in mice. *Environ Toxicol* 24: 580–588
- Starkov AA, Wallace KB (2002) Structural determinants of fluorochemical-induced mitochondrial dysfunction. *Toxicol Sci* 66:244–252
- Steenland K, Fletcher T, Savitz DA. Epidemiologic evidence on the health effects of perfluorooctanoic acid (PFOA). *Environ Health Perspect* 2010;118:1100–8.
- Steenland K, Jin C, MacNeil J, Lally C, Ducatman A, Vieira V, et al. 2009. Predictors of PFOA levels in a community surrounding a chemical plant. *Environ Health Perspect* 117:1083–1088;
- Steenland K, Tinker S, Shankar A, Ducatman A (2010) Association of perfluorooctanoic acid (PFOA) and perfluorooctane sulfonate (PFOS) with uric acid among adults with elevated community exposure to PFOA. *Environ Health Perspect* 118:229–233
- Stevenson C.N., MacManus-Spencer L.A., Luckenbach T., Luthy R.G., Epel D. New perspectives on perfluorochemical ecotoxicology: inhibition and induction of an efflux transporter in the marine mussel, *Mytilus californianus*. *Environ Sci Technol* 2006;40(September 1 (17)):5580–5.
- Stockholm Convention on Persistent Organic Pollutants (POPs). Available: <http://chm.pops.int/Portals/0/download.aspx?d=UNEP-POPS-TREATY-NOTIF-CN524-2009.En.pdf> (accessed 2 November 2010).
- Strynar, M. J.; Lindstrom, A. B. Perfluorinated compounds in house dust from Ohio and North Carolina, USA. *Environ. Sci. Technol.* 2008, 42 (10), 3751–6.
- Su L., Cheng C.Y., Mruk D.D. Drug transporter, P-glycoprotein (MDR1), is an integrated component of the mammalian blood–testis barrier. *Int J Biochem Cell Biol* 2009;41(December(12)):2578–87.
- Sundstrom M, Chang SC, Noker PE, Gorman GS, Hart JA, Ehresman DJ, Bergman A, Butenhoff JL (2011) Comparative pharmacokinetics of perfluorohexanesulfonate (PFHxS) in rats, mice, and monkeys. *Reprod Toxicol*. Epub ahead

- Tao L., Ma J., Kunisue T., Libelo E.L., Tanabe S., Kannan K. Perfluorinated compounds in human breast milk from several Asian countries, and in infant formula and dairy milk from the United States. *Environ Sci Technol* 2008a;42:8597–602.
- Thomas Fleischer, Hege Edvardsen, Hiroko K. Solvang, Christian Daviaud, Bjørn Naume, Anne-Lise Børresen-Dale. Integrated analysis of high-resolution DNA methylation profiles, gene expression, germline genotypes and clinical end points in breast cancer patients Vessela N. Kristensen^{1,2,5} and Jörg Tost. *Int. J. Cancer*: 00, 00–00 (2014) VC 2013 UIC
- Tian M., Peng S., Martin F.L., et al. (2012). Perfluorooctanoic acid induces gene promoter hypermethylation of glutathione-S-transferase Pi in human liver L02 cells. *Toxicology* 296 48– 55
- Tremblay KD, Saam JR, Ingram RS, Tilghman SM & Bartolomei MS 1995 A paternal-specific methylation imprint marks the alleles of the mouse H19 gene. *Nature Genetics* 9 407–413.
- U.S. Environmental Protection Agency (US EPA) (2005) Draft risk assessment of the potential human health effects associated with exposure to perfluorooctanoic acid and its salts. Online available at <http://www.epa.gov/opptintr/pfoa/pubs/pfoarisk.html>
- United Nations Environment Programme Report of the Conference of the Parties of the Stockholm Convention on Persistent Organic Pollutants on the work of its fourth meeting. <http://chm.pops.int/Portals/0/Repository/COP4/UNEP-POPS-COP.4-38>. English. pdf (accessed September 1, 2001).
- USEPA 2010/15 PFOA Stewardship Program. <http://www.epa.gov/oppt/pfoa/pubs/stewardship/index.htm> (accessed September 1, 2001).
- Vanden Heuvel JP, Kuslikis BI, Van Raelghem ML, Peterson RE (1991) Tissue distribution, metabolism, and elimination of perfluorooctanoic acid in male and female rats. *J Biochem Toxicol* 6:83–92
- Vanden Heuvel JP, Thompson JT, Frame SR, Gillies PJ (2006) Differential activation of nuclear receptors by perfluorinated fatty acid analogs and natural fatty acids: a comparison of human, mouse, and rat peroxisome proliferator-activated receptor- α , - β , and - γ , liver X receptor- β , and retinoid X receptor- α . *Toxicol Sci* 92:476–489
- Veeck J, Niederacher D, An H, Klopocki E, Wiesmann F, Betz B, Galm O, Camara O, Dürst M, Kristiansen G, Huszka C, Knüchel R, Dahl E: Aberrant methylation of the Wnt antagonist SFRP1 in breast cancer is associated with unfavourable prognosis. *Oncogene* 2006, 25:3479-3488.
- Veeck Jürgen, Erik Noetzel, Nuran Bektas, Edgar Jost, Arndt Hartmann, Ruth Knüchel and Edgar Dahl. Promoter hypermethylation of the SFRP2 gene is a high-frequent alteration and

- tumor-specific epigenetic marker in human breast cancer. *Molecular Cancer* 2008, 7:83
doi:10.1186/1476-4598-7-83
- Waalkes, M.P., Cadmium carcinogenesis in review. *J Inorg Biochem*, 2000. 79(1- 4): p. 241-4.
- Walters M.W., Bjork J.A., Wallace K.B. (2009), Perfluorooctanoic acid stimulated mitochondrial biogenesis and gene transcription in rats.
- Wan, Y.J., Li, Y.Y., Xia, W., Chen, J., Lv, Z.Q., Zeng, H.C., Zhang, L., Yang, W.J., Chen, T., Lin, Y., Wei, J., Xu, S.Q., 2010. Alterations in tumor biomarker GSTP gene methylation patterns induced by prenatal exposure to PFOS. *Toxicology* 274, 57–64.
- Wang F, Liu W, Jin Y, Dai J, Yu W, Liu X, Liu L (2010) Transcriptional effects of prenatal and neonatal exposure to PFOS in developing rat brain. *Environ Sci Technol* 44:1847–1853
- Wang I-J, Hsieh W-S, Chen C-Y, Fletcher T., Lien G-W, Chiang H-L, (2010) The effect of prenatal perfluorinated chemicals exposures on pediatric atopy.
- Warwick J Lockel and Susan J Clark. Epigenome remodelling in breast cancer: insights from an early in vitro model of carcinogenesis *Breast Cancer Research* 2012, 14:215
- Washino N., Saijo Y., Sasaki S., Kato S., Ban S., Konishi K., et al. Correlations between prenatal exposure to perfluorinated chemicals and reduced fetal growth. *Environ Health Perspect* 2009;117:660–7
- Watkins DJ, Wellenius GA, Butler RA, Bartell SM, Fletcher T, Kelsey KT. Associations Between Serum Perfluoroalkyl Acids and LINE-1 DNA Methylation. 2014 *Environment Int.* 63:71-76.
- Weaver YM, Ehresman DJ, Butenhoff JL, Hagenbuch B (2010) Roles of rat renal organic anion transporters in transporting perfluorinated carboxylates with different chain lengths. *Toxicol Sci* 113:305–314
- Wei Y, Dai J, Liu M, Wang J, Xu M, Zha J, Wang Z (2007) Estrogenlike properties of perfluorooctanoic acid as revealed by expressing hepatic estrogen-responsive genes in rare minnows (*Gobiocypris rarus*). *Env Toxicol and Chem/SETAC* 26(11):2440–2447.
- Weiss A & Cedar H 1997 The role of DNA demethylation during development. *Genes and Cells* 2 481–486.
- Weiss JM, Andersson PL, Lamoree MH, Leonards PEG, van Leeuwen SPJ, Hamers T (2009) Competitive binding of poly- and perfluorinated compounds to the thyroid hormone transport protein transthyretin. *Toxicol Sci* 109:206–216
- Wolf DC, Moore T, Abbott BD, Rosen MB, Das KP, Zehr RD, Lindstrom AB, Strynar MJ, Lau C (2008) Comparative hepatic effects of perfluorooctanoic acid and WY 14,643 in PPAR α -knocked out and wild-type mice. *Toxicol Pathol* 36:632–639

- Woodcroft MW, Ellis DA, Rafferty SP, Burns DC, March RE, Stock NL, Trumpour KS, Yee J, Munro K (2010) Experimental characterization of the mechanism of perfluorocarboxylic acids' liver protein bioaccumulation: the key role of the neutral species. *Environ Toxicol Chem* 29:1669–1677
- X Yang, L Yan and N E Davidson DNA methylation in breast cancer *Endocrine-Related Cancer* (2001) 8 115–127
- Xie, Y., Liu, J., Benbrahim-Tallaa, L., Ward, J.M., Logsdon, D., Diwan, B.A., Waalkes, M.P., 2007. Aberrant DNA methylation and gene expression in livers of newborn mice transplacentally exposed to a hepatocarcinogenic dose of inorganic arsenic. *Toxicology* 236, 7–15.
- Yang CH, Glover KP, Han X (2010) Characterization of cellular uptake of perfluorooctanoate via organic anion-transporting polypeptide 1A2, organic anion transporter 4, and urate transporter 1 for their potential roles in mediating human renal reabsorption of perfluorocarboxylates. *Toxicol Sci* 117:294–302
- Yang Q., Xie Y., Alexson S.E., Nelson B.D., DePierre J.W., 2002a. Involvement of the peroxisome proliferator-activated receptor alpha in the immunomodulation caused by peroxisome proliferators in mice. *Biochem. Pharmacol.* 63, 1893–1900.
- Yang Q., Xie Y., DePierre J.W., (2000). Effects of peroxisome proliferators on the thymus and spleen of mice. *Clinical and Experimental Immunology* 122, 219–226.
- Yang Q., Xie Y., Eriksson A.M., Nelson B.D., DePierre J.W., (2001). Further evidence for the involvement of inhibition of cell proliferation and development in thymic and splenic atrophy induced by the peroxisome proliferator perfluorooctanoic acid in mice. *Biochemical Pharmacology* 62, 1133–1140.
- Yao, X. and Zhong L., Genotoxic risk and oxidative DNA damage in HepG2 cells exposed to perfluorooctanoic acid. *Mutat Res*, 2005. 587(1-2): p. 38-44.
- Yoder JA, Walsh CP & Bestor TH 1997 Cytosine methylation and the ecology of intragenomic parasites. *Trends in Genetics* 13 335–340.
- Zeller C, B. Hinzmann, S. Seitz, Helmuth Prokoph, E. Burkhard- Goettges, Joerg Fischer, Burkhard Jandrig, Lope-Estevez Schwarz, Andre Rosenthal and Siegfried Scherneck. SASH1: a candidate tumor suppressor gene on chromosome 6q24.3 is downregulated in breast cancer *Oncogene* (2003) 22, 2972–2983
- Zhao B, Chu Y, Hardy DO, Li XK, Ge RS (2010) Inhibition of 3b- and 17b-hydroxysteroid dehydrogenase activities in rat Leydig cells by perfluorooctane acid. *J Steroid Biochem Mol Biol* 118:13–17

Ringrazio per il significativo contributo scientifico il professor Rafael Guerrero-Preston della Johns Hopkins University di Baltimora.

