



UNIVERSITÀ POLITECNICA DELLE MARCHE
DIPARTIMENTO SCIENZE DELLA VITA E
DELL'AMBIENTE

Corso di Laurea Magistrale in
Scienze della Nutrizione e dell'Alimentazione

*Uso della linea cellulare HepG2 per lo studio della tossicità
epatica causata da PFOA*

Use of HepG2 cell line to study liver toxicity caused by PFOA

Tesi di Laurea Magistrale di:

Cecilia Brandimarti

Relatore

Chiar.ma Prof.ssa Francesca Maradonna

Correlatore

Dott. Damiano Carbonari

Sessione Autunnale

Anno Accademico 2023/2024

Indice

1. Introduzione

- 1.1 Interferenti endocrini
- 1.2 PFAS
- 1.3 PFOA
- 1.4 Scopo della ricerca
- 1.5 Modello sperimentale

2. Materiali e metodi

- 2.1 Linea cellulare
- 2.2 Reagenti chimici
- 2.3 Vitalità cellulare
 - 2.3.1 Saggio del MitoSox RED tramite citofluorimetria a flusso
 - 2.3.2 Determinazione dei ROS citosolici mediante citofluorimetria a flusso
 - 2.3.3 Determinazione dell'apoptosi mediante citofluorimetria a flusso
- 2.4 Analisi biomolecolari
 - 2.4.1 Estrazione dell'RNA totale e valutazione della sua qualità
 - 2.4.2 Sintesi del cDNA
 - 2.4.3 Real time PCR
 - 2.4.4 Analisi statistica

3. Risultati

- 3.1 Vitalità cellulare
- 3.2 ROS intracellulari
- 3.3 ROS mitocondriali
- 3.4 Apoptosi
- 3.5 PCR

4. Discussione

5. Conclusione

6. Bibliografia e sitografia

1. Introduzione

Interferenti endocrini

Secondo l'Endocrine Society, un Endocrine Disrupting Chemical (EDC) è "una sostanza chimica esogena, o una miscela di sostanze chimiche, presente nell'ambiente, nel cibo, nei prodotti per l'igiene personale e nei prodotti industriali in grado di interferire con il funzionamento del sistema endocrino".

L'alterazione endocrina da parte degli EDC può verificarsi modificando i normali livelli ormonali, inibendo o stimolando la produzione di ormoni, influenzandone così le funzioni (Ahn et al., 2023).

La maggior parte delle EDC ha natura lipofila e per questo motivo vengono bioaccumulati a livello del tessuto adiposo.

Gli EDC possono interferire con la sintesi, l'azione e il metabolismo degli ormoni steroidei sessuali in quanto possiedono strutture simili a quelle degli ormoni endogeni, causando anche problemi di infertilità, sviluppo, e la loro esposizione è considerata una delle cause principali dell'insorgenza di tumori sensibili agli ormoni sia nelle donne che negli uomini.

In particolare, gli EDC di cui sono note le proprietà estrogeniche, tra cui gli alchilfenoli, il bisfenolo A (BPA) e gli ftalati, possono indurre una pubertà precoce. In un test condotto in ratti femmine sessualmente mature, esposte a dei parabeni, è stato osservato un calo significativo della concentrazione sierica di estradiolo e tiroxina, un ritardo nella data di apertura vaginale, un'alterazione della durata del ciclo estrale e una riduzione del numero dei corpi lutei, evidenziando chiaramente l'attività estrogenica di questi composti chimici, benché comunque inferiore a quella derivante dall'esposizione all'estradiolo che ha anche determinato dei cambiamenti morfologici degli organi riproduttivi (Ahn et al., 2023).

Nella specie umana, l'esposizione prenatale agli EDC, in particolare al dietilstilbestrolo (DES) e al BPA, è associata all'insorgenza di malformazioni riproduttive femminili oltre alla presenza di cisti, adenomi e carcinomi nei tessuti riproduttivi. I dati clinici e sperimentali indicano inoltre che l'esposizione agli EDC può influire sulla riproduzione interferendo negativamente sulla steroidogenesi, sulla follicologenesi, sull'ovulazione, la fecondazione e la gestazione (Ahn et al., 2023).

Numerosi studi hanno suggerito che l'esposizione a questi inquinanti può aumentare l'incidenza di fibromi uterini, promuovendo l'iperplasia estrogeno-dipendente del miometrio, l'endometriosi, l'insufficienza ovarica prematura e la sindrome dell'ovaio policistico (PCOS). Inoltre, l'esposizione agli EDC durante le prime fasi della gravidanza interferisce con l'impianto intrauterino e la ricettività endometriale, portando al fallimento dell'impianto (Ahn et al., 2023).

Altri studi hanno mostrato che, nel ratto, l'esposizione al BPA riduce la fertilità promuovendo l'apoptosi delle cellule follicolari. In uno studio in donne coinvolte in un percorso di PMA, i livelli di BPA plasmatici sono stati associati a un numero ridotto di follicoli antrali e ovociti che vanno incontro a maturazione (Ahn et al., 2023). Inoltre uno studio epidemiologico condotto su 137 donne sottoposte a fecondazione *in vitro*, è stata riscontrata un'associazione tra aumento delle concentrazioni urinarie di BPA e aumento del fallimento dell'impianto (Ahn et al., 2023). L'esposizione a questo plastificante è anche considerata tra le concause della sindrome dell'ovaio policistico, dell'endometriosi, della riduzione dei tassi di fecondazione e dell'impianto. Nascite premature, aborti spontanei, anomalie dello sviluppo e deficit comportamentali sono stati collegati all'esposizione al BPA, agli ftalati e ai fenoli (Yilmaz et al., 2020).

Gli effetti degli EDC hanno ripercussioni anche sul ciclo mestruale. Uno studio condotto su donne residenti in aree agricole ha mostrato un'associazione tra esposizione all'atrazina e aumento dell'irregolarità mestruale (Ahn et al., 2023).

Nel contesto dei disturbi riproduttivi maschili, gli EDC causano la riduzione della qualità dello sperma. Nella specie umana, l'esposizione durante la fase embrionale agli EDC, causa alterazioni nei feti che presentano anomalie del tratto urogenitale, tra cui ipospadia e criptorchidismo e successivamente in età adulta anche oligospermia e livelli di testosterone più bassi (Ahn et al., 2023).

Anche l'esposizione a ftalati e BPA ha effetti avversi sul numero di spermatozoi e sulla motilità, che presentano anche danni al DNA. Inoltre, anche l'esposizione a metalli pesanti come piombo e cadmio influisce sui parametri riproduttivi maschili (Yilmaz, *et al.* 2020).

Gli EDC sono in grado di interferire con il metabolismo. Infatti una serie di studi ha mostrato che sono in grado di causare disturbi metabolici contribuendo all'epidemia globale di obesità (Yilmaz et al., 2020), agendo negativamente sulla regolazione dell'insulina, e aumentando il rischio di diabete di tipo II (Yilmaz, et al., 2020).

Negli studi sull'uomo, il rilevamento di metaboliti dello ftalato è stato associato ad un aumento dell'indice di massa corporea (BMI) e della circonferenza della vita. Anche l'esposizione ai "persistent organic pollutants" (POP) è stata correlata all'obesità e ai disturbi del metabolismo (Yilmaz et al., 2020).

Altri studi clinici hanno dimostrato che l'esposizione al BPA è collegata al rischio di insulino-resistenza e diabete mellito di tipo 2 (T2D) nelle donne in età riproduttiva, comprese le donne in gravidanza. Studi epidemiologici hanno mostrato un aumento dei metaboliti urinari dello ftalato nelle donne di tutte le età con diabete mellito. (Ahn et al., 2023).

Inoltre, l'esposizione agli EDC può causare una serie di difetti nello sviluppo neurologico e carenze funzionali. Esistono quindi serie preoccupazioni riguardo ai potenziali effetti degli EDC sulla funzione celebrale e si ipotizza che possa essere legata all'aumento dei disturbi psichiatrici, cognitivi e comportamentali osservato degli ultimi decenni. Infatti gli EDC possono agire e modificare l'azione dei recettori ormonali nucleari (NR), espressi nelle cellule ipotalamiche, causando una serie di difetti del suo corretto sviluppo neurologico (Ahn et al., 2023).

Ad esempio il silossano ciclico ottametilciclotetrasilossano (D4) ha un'attività estrogeno simile, può legare i NR risultando in questo modo di essere in grado di influire sulla progressione del ciclo cellulare delle cellule progenitrici neuronali durante lo sviluppo neurologico, causando possibili deficit cognitivi (Ahn et al., 2023). Un altro studio ha dimostrato che l'esposizione perinatale all'OP altera lo sviluppo e il funzionamento del cervello nei topi diminuendo la lunghezza degli assoni e dei dendriti e aumentando il numero di dendriti primari e secondari, con conseguente riduzione della proliferazione delle cellule progenitrici neuronali nel cervello della progenie (Ahn et al., 2023)

È difficile valutare l'impatto completo dell'esposizione precoce umana agli EDC perché gli effetti avversi possono manifestarsi solo in età avanzata. La latenza tra le esposizioni precoci agli EDC e la disfunzione/malattia dell'adulto può essere superiore a 50 anni.

Una delle principali vie di contaminazione da parte degli EDC avviene attraverso l'ingestione di cibo contaminato nelle diverse fasi che precedono il suo consumo, dall'ottenimento (contaminazione del suolo, dei fiumi, degli oceani), alla manipolazione, al trasporto, alla lavorazione e alla produzione.

L'inalazione rappresenta un'altra possibile via di esposizione, soprattutto per alcune sostanze chimiche volatili o semi-volatili.

Pertanto, l'esposizione agli EDC avviene a casa, in ufficio, in fattoria, nell'aria che respiriamo, nel cibo che ingeriamo e nell'acqua che consumiamo. Gli studi di biomonitoraggio hanno mostrato che quasi tutti gli esseri umani hanno un carico corporeo di queste sostanze chimiche in diversi tessuti corporei (tessuto adiposo, sangue, urina, placenta e sangue fetale) (Panieri et al., 2022).

La risposta degli individui tuttavia può essere diversa. Alcuni possono sperimentare una tossicità evidente, altri possono mostrare disfunzioni più sottili e altri ancora non ne saranno affatto influenzati. Queste differenze nella reattività sono dovute al background genetico, ai fattori ambientali, occupazionali e di stile di vita, alle malattie, ad altri fattori di stress, alle abitudini alimentari e alla fonte di cibo consumato (Yilmaz et al., 2020).

Prove crescenti supportano la correlazione tra esposizione agli EDC e malattie epatiche. In particolare si parla di steatosi epatica non alcolica (NAFLD), una malattia epatica definita “malattia del fegato grasso associata a sostanze tossiche”.

Il fegato è l'organo coinvolto nella difesa del corpo contro le sostanze tossiche circolanti nell'organismo, poiché filtra le sostanze chimiche nocive che riceve attraverso la circolazione sanguigna e ne riduce la tossicità attraverso diversi meccanismi che coinvolgono ossidazioni e coniugazioni; pertanto, la funzionalità epatica risente molto dell'esposizione alle tossine. Recentemente 123 sostanze chimiche sono state etichettate come interferenti endocrini in grado di alterare la funzionalità epatica e tra queste, alcune sono state anche classificate come “sostanze che alterano il metabolismo”, risultando in grado di promuovere l'insorgenza della sindrome metabolica, un fattore di rischio per la NAFLD (Treviño et al., 2018).

A questo proposito, uno studio ha mostrato che l'esposizione di cuccioli di ratto Wistar a 40 µg/kg/d di BPA in una finestra temporale specifica che va dal giorno gestazionale (GD) 0 allo svezzamento (PND) 21, è in grado di causare a 15 settimane di età, una lieve steatosi epatica, che è successivamente progredita in una steatosi epatica moderata, accompagnata da elevati livelli sierici di trigliceridi, acidi grassi liberi nel siero (Treviño et al., 2018).

Diversi studi hanno dimostrato come le esposizioni ambientali aumentino i rischi di malattie in età adulta e tardiva. Inoltre gli effetti delle esposizioni chimiche ambientali possono essere transgenerazionali, influenzando così le generazioni future.

Negli ultimi anni, diversi studi sperimentali e alcune prove epidemiologiche hanno altresì dimostrato che l'esposizione agli EDC può indurre cambiamenti epigenetici. Le modifiche epigenetiche sono le "modifiche ereditarie e reversibili della cromatina, che determinano un aggiustamento della sua attività senza modificare la sequenza di DNA, bensì indurre modifiche degli istoni o alterazioni nel funzionamento di miRNA o ncRNA". Le alterazioni epigenetiche possono essere trasmesse attraverso la linea germinale alla generazione successiva non esposta causando effetti nocivi sulle generazioni successive (Ahn et al., 2023).

PFAS

I composti perfluoroalchilici (PFAS) sono sostanze organiche composte da una catena di atomi di carbonio (in numero variabile, da 4 a 16) legati ad atomi di fluoro. Un gruppo funzionale all'estremità della catena distingue essenzialmente i vari composti di questa famiglia l'uno dall'altro. I PFAS sono generalmente classificati in composti a catena lunga e corta a causa della presenza di più di sei (catena lunga) o meno di otto (catena corta) atomi di carbonio. I legami carbonio-fluoro sono tra i legami chimici più forti nella chimica organica (Coperchini et al., 2021).

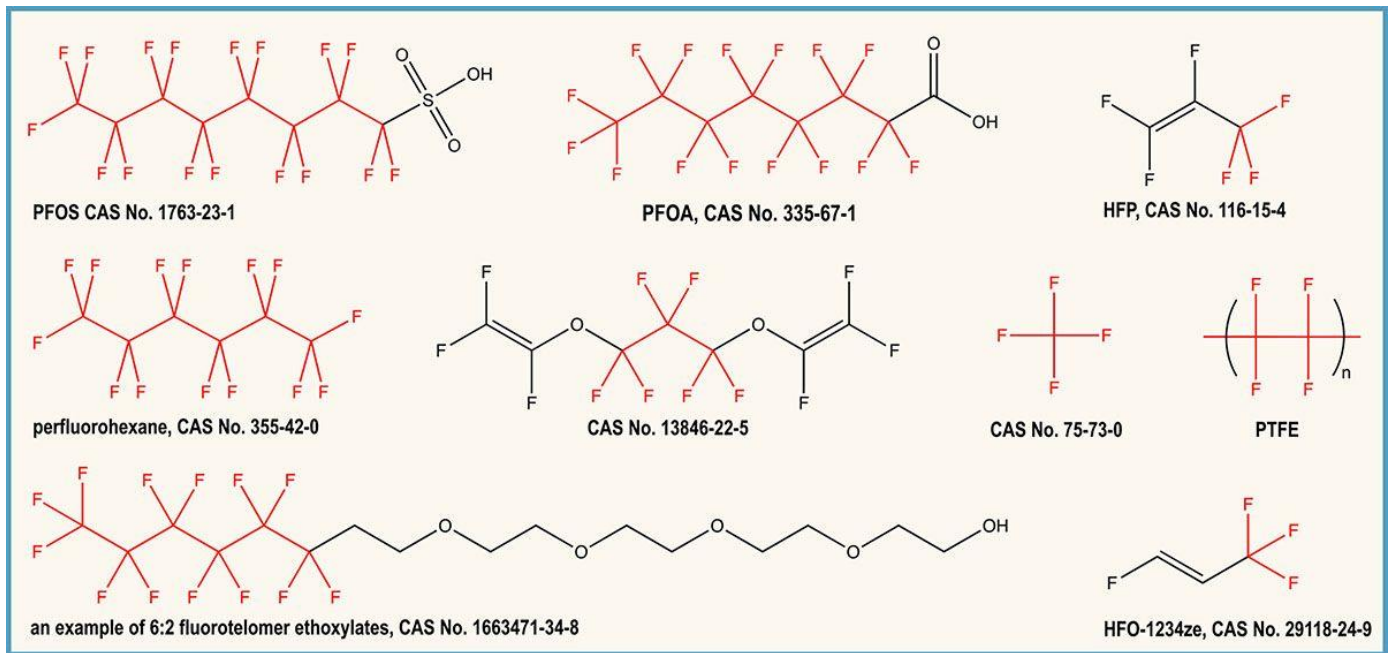


Fig.1

Grazie a questo legame, i PFAS sono in grado di resistere alla degradazione e persistono non solo nell'ambiente, ma anche nel corpo umano e animale da cui sono difficili da eliminare. I PFAS non sono infiammabili e non sono corrosivi, non bruciano, non si degradano e non reagiscono con altre sostanze chimiche (Coperchini et al., 2021).

I PFAS vengono utilizzati in oltre 60 diverse categorie merceologiche, tra cui pentole antiaderenti, indumenti medici, imballaggi alimentari, schiume antincendio e tessuti antimacchia (Glüge et al., 2020). Sono stati utilizzati in svariate applicazioni industriali e prodotti di largo consumo per le loro abilità di abbassare la tensione superficiale.

I PFAS possono essere rilevati in numerose matrici, tra cui acqua, suolo, piante, animali, prodotti alimentari e siero umano (Brase et al., 2021).

L'esposizione può essere anche di tipo occupazionale e tra le categorie maggiormente esposte, ci sono i lavoratori dell'industrie di prodotti chimici fluorurati, i vigili del fuoco, i tecnici della sciolinatura da sci e i placcatori di metallo oppure tramite l'alimentazione attraverso l'utilizzo di acqua potabile o alimenti contaminati.

Si ritiene inoltre che PFOS, PFOA, PFNA e PFHxS siano le specie di PFAS che attualmente contribuiscono maggiormente all'esposizione umana, motivo per cui nel 2020 l'Autorità europea per la sicurezza alimentare (EFSA) ha stabilito dei limiti di assunzione giornaliera (Tolerable day intake-TDI). Indipendentemente dalla specifica via di esposizione attraverso la quale possono entrare in contatto con l'uomo, le sostanze PFAS rappresentano una seria preoccupazione per la salute umana, inducendo

potenzialmente alterazioni nello sviluppo, nel metabolismo dei lipidi e nel sistema endocrino, cancerogenicità, immunotossicità ed epatotossicità.

Una volta nel circolo sanguigno, i PFAS si legano all'albumina sierica che, insieme a lenti tassi di eliminazione, è responsabile delle lunghe emivite sieriche: 3,8 anni per il PFOA e 5,4 anni per il PFOS.

Per quanto riguarda l'epatotossicità, è stato dimostrato che entrambe le sostanze inducono proliferazione dei perossisomi negli epatociti, ipertrofia epatica, vacuolizzazione e iperplasia (Behr et Al., 2020).

La maggior parte degli studi *in vitro* si è concentrata sugli effetti dei PFAS sulla tiroide e le cellule epatiche. In uno studio, Conti e collaboratori (2020) hanno esposto le cellule follicolari tiroidee a 1–100 mM di PFOS o PFOA, concludendo che entrambe le sostanze sono in grado di inibire in modo acuto e reversibile l'accumulo di iodio da parte dei tireociti.

Altri studi sempre *in vitro* hanno esplorato la tossicità epatica dei PFAS valutando l'insorgenza di stress ossidativo in diverse linee cellulari epatiche, così come l'apoptosi/autofagia. È stato testato l'impatto di PFOS, PFOA, PFHxS, PFNA, PFDA, PFUnA e PFDoA sulla linea cellulare (HepG2). Ad eccezione del PFDoA, tutti gli altri PFAS hanno favorito la formazione di ROS (Panieri et al., 2022)

Li e collaboratori (2017) hanno esposto neuroni ippocampali primari e astrociti di ratto a PFOS, osservando un aumento nello squilibrio redox, di apoptosi e di autofagia. Negli astrociti, il PFOS ha alterato le concentrazioni extracellulari di glutammato e glutammina, ridotto l'attività della glutammina sintasi e dei trasportatori di glutammato e glutammina (Panieri et al., 2022).

Una serie di studi *in vitro*, hanno evidenziato gli effetti tossici del PFAS sulla funzione riproduttiva. Eggert e collaboratori (2019) hanno valutato gli effetti dell'esposizione a 0–100 µg/mL di PFOA sui testicoli di ratto e sui segmenti del tubulo seminifero di ratto adulto. I risultati hanno rivelato livelli inferiori di espressione di cAMP, progesterone, testosterone.

Inoltre studi *in vivo* effettuati su topi e ratti esposti a PFOS e PFOA hanno indicato una relazione tra esposizione ai contaminanti e alterazioni del metabolismo lipidico epatico. Infatti in seguito all'esposizione di topi C57BL/6 a 10 mg di PFOS/kg di peso corporeo/giorno per 14 giorni, 241 proteine coinvolte nel metabolismo lipidico e xenobiotico nel fegato sono risultate deregolate (Panieri et al., 2022).

Dopo l'esposizione alimentare dei ratti a 20 o 100 ppm di PFOS per 7 giorni, Elcombe e collaboratori (2012) hanno anche notato alterazioni in vari parametri epatici (ad esempio, aumento del peso del fegato; diminuzione del colesterolo plasmatico, dell'alanina aminotransferasi e dei trigliceridi; aumento della concentrazione citosolica

epatocellulare del CYP450; aumento dell'attività epatica dell'acil CoA ossidasi, CYP4A, CYP2B e CYP3A; aumento dell'indice proliferativo epatico e diminuzione dell'indice apoptotico epatico).

Prove emergenti hanno anche suggerito che un accumulo di PFAS nel corpo umano potrebbe essere associato ad effetti negativi sulla salute, tra cui il sistema immunitario (come malattie allergiche, infezioni e risposta ai vaccini) (Wang, et al., 2021).

Esperimenti su animali e cellule in vitro hanno già dimostrato che i PFAS possiedono capacità immunotossiche provocando gravi infiammazioni in diversi organi, tra cui fegato, reni, polmoni e sistema nervoso. Quando i PFAS si accumulano nei tessuti, questi vengono riconosciuti dai macrofagi residenti. Questo processo determina la produzione di molteplici citochine proinfiammatorie (come IL-1 β , TNF- α e IL-6), che portano ad infiammazione tissutale (Wang, et al., 2021). Inoltre, l'esposizione a PFOS è in grado di danneggiare i mitocondri e promuovere il rilascio di mtDNA ma non di DNA genomico nel citoplasma, che di conseguenza innesca l'attivazione dell'inflammasoma AIM2 (Wang, et al., 2021).

PFOA

PFOS e PFOA agiscono come EDC grazie alla loro capacità di interferire con i sistemi ormonali e indurre risposte biologiche. Una volta che PFOS e PFOA entrano in un organismo, tendono a concentrarsi principalmente nel sangue e nel fegato e ad associarsi fortemente a proteine come l'albumina sierica e la proteina legante gli acidi grassi del fegato (L-FABP) (Hungerbuehler et al., 2020).

In origine, l'esposizione al PFOA è stata associata a disfunzioni della tiroide, a cancro ai reni e testicoli, correlata a una risposta immunitaria compromessa nei bambini e aumentati livelli di colesterolo e obesità negli adulti.

Il PFOA è risultato tumorigeno nei ratti e nei topi e potenzialmente tumorigeno negli esseri umani. In uno studio del 2023 è stato valutato l'effetto dell'esposizione a lungo termine al PFOA utilizzando cellule epiteliali del fegato di ratto (TRL 1215). Le cellule hanno mostrato cambiamenti morfologici, inibizione del contatto cellulare, formazione di cellule giganti multinucleate e fusiformi avvalorando la tesi che il PFOA è in grado di generare cancerogenicità (Wei et al., 2023, Wen Et al., 2020).

Per quanto riguarda l'epatotossicità, sia il PFOA che il PFOS inducono proliferazione dei perossisomi degli epatociti, ipertrofia epatica, vacuolizzazione e iperplasia.

A livello molecolare, la maggior parte di questi effetti è associata a un'attivazione mediata da PFOA e PFOS del recettore attivato dal proliferatore del perossisoma alfa (PPAR α), che è un membro della famiglia dei recettori nucleari e svolge un ruolo cruciale nella regolazione del metabolismo lipidico, della crescita cellulare e del differenziamento (Behr et al., 2020).

A causa di questi effetti pericolosi, i PFAS a catena lunga e i loro precursori sono stati gradualmente eliminati dai principali produttori in Europa, Giappone e Stati Uniti grazie al programma di gestione del PFOA 2010/15 dell'Agenzia per la protezione ambientale degli Stati Uniti (EPA) (Coperchini et al., 2021).

Diversi studi sugli animali hanno collegato l'esposizione a PFOA alla steatosi epatica. Ad esempio in uno studio condotto su ratti era noto che l'esposizione cronica a PFOA induceva adenomi epatocellulari, con aumento del peso del fegato e dell'attività di β -ossidazione epatica (Biegel et al., 2001).

È stato confermato attraverso studi epidemiologici che PFOS e PFOA non sono solo associati a livelli ridotti di testosterone negli esseri umani, ma sono in grado di alterare la funzionalità della barriera emato-testicolare (Panieri et al., 2022). Inoltre, nelle donne, PFOA e PFOS sono correlati a livelli anormali di ormoni sessuali e aumentano il rischio di infertilità e ciclo mestruale anomalo (Panieri et al., 2022).

Sibinski ha osservato per la prima volta gli effetti avversi indotti dal PFOA associati allo sviluppo testicolare nei ratti in uno studio di due anni nel 1987. Nei topi maschi adulti, la somministrazione orale di PFOA ha determinato non solo l'accumulo di PFOA nel sistema riproduttivo, ma anche la distruzione dei dotti spermatici, una diminuzione del numero e della vitalità degli spermatozoi dell'epididimo e una significativa diminuzione dei livelli di testosterone e progesterone. (Panieri et al., 2022)

Per quanto riguarda la salute riproduttiva femminile è stato dimostrato che l'attività del progesterone e la fertilità nelle giovani donne sono alterate dal PFOA nelle cellule endometriali umane. In più è stata anche osservata un'associazione tra PFOA e presenza dell'endometriosi nelle donne americane. PFOA e PFOS influenzano la funzione ovarica negli adulti e possono aumentare il rischio di insufficienza ovarica prematura.

Scopo della ricerca

Studi di biomonitoraggio hanno dimostrato che gli esseri umani sono esposti in modo ubiquitario ai PFAS. Esistono tuttavia categorie professionali che sono esposte maggiormente come ad esempio vigili del fuoco o lavoratori tecnici della sciolinatura da sci e i placcatori di metallo.

Gli individui ad alto rischio dovrebbero essere informati e dovrebbero essere implementate misure preventive per evitare un'esposizione estesa.

Inoltre, non meno importante è l'esposizione attraverso la dieta. Diversi studi hanno dimostrato che questo tipo di esposizione può rappresentare un rischio per la salute

umana. I neonati e i bambini piccoli vanno incontro ad un'esposizione maggiore a causa del loro peso corporeo e delle loro abitudini alimentari. Ad esempio, i dati suggeriscono che l'esposizione alimentare al PFOA in seguito al consumo di determinati alimenti può essere significativa, specialmente nelle regioni caratterizzate da grande contaminazione industriale. Nonostante le riduzioni nella produzione e nell'uso del PFOA, i residui nell'ambiente agricolo rimangono una preoccupazione, in particolare in alimenti come verdure e pesce.

L'obiettivo del presente studio, vista la stretta associazione esistente tra PFOA e danni epatici, è stato quello di indagare gli effetti dati dall'esposizione al PFOA nella linea cellulare HepG2. Il fegato, infatti è l'organo centrale di disintossicazione del corpo e le sue funzioni possono essere compromesse da sostanze tossiche come il PFOA.

L'esposizione al PFOA è stata collegata a tossicità cellulare, nonché all'insorgenza di neoplasie epatiche. Comprendere i meccanismi specifici di tossicità può aiutare i ricercatori a individuare e proporre alla governance valide strategie di mitigazione.

Per questo motivo, l'utilizzo di linee cellulari può fornire delle indicazioni di partenza per comprendere meccanismi più complessi che si instaurano negli individui.

In particolare, in questo studio, si sono valutati gli effetti indotti dall'esposizione a concentrazioni alimentari e occupazionali di PFOA, focalizzando sul sistema di detossificazione cellulare.

Modello sperimentale

La linea cellulare HepG2 è stata isolata per la prima volta nel 1975 ed è comunemente utilizzata come modello in vitro per gli epatociti umani primari. Queste linee cellulari offrono vantaggi quali la proliferazione indefinita, il fenotipo stabile, la facile accessibilità e la facilità di manipolazione.

Derivate dal carcinoma epatocellulare, le cellule HepG2 proliferano rapidamente e hanno una morfologia simile a quella epiteliale, svolgendo molte funzioni epatiche specializzate. Le cellule HepG2 sono ampiamente utilizzate nello studio del metabolismo e della tossicità, grazie alla loro somiglianza con le cellule di carcinoma epatocellulare e di epatoblastoma in termini di metabolismo e proteine di trasporto.

Le HepG2 sono una linea cellulare che viene utilizzata comunemente in molte ricerche scientifiche atte a valutare e indagare gli effetti citotossici citomorfologici e apoptotici di contaminanti e inquinanti, tra cui l'esposizione combinata a BPA e al mono(2- etilesil)ftalato (Ozkemahali et al., 2023) o –al dietil ftalato (DEP) e al dibutil ftalato (DBP) (Gutierrez-Garcia et al., 2024). Utilizzando questa linea cellulare, è anche stato possibile valutare gli effetti del cadmio sul metabolismo del glucosio (Lia et al., 2024)

2 Materiali e metodi

2.1 Linea Cellulare

La linea cellulare HepG2 derivata da carcinoma epatocellulare umano (HB-8065TM; ATCC, Manassas, VA, USA) è stata mantenuta in terreno di coltura denominato Roswell Park Memorial Institute (RPMI-1640) (Gibco, Paisley, UK) integrato con 2 mM di L-glutamina (Gibco, Paisley, UK), il 10% di siero fetale bovino (FBS) inattivato al calore (FBS) (Gibco, Paisley, UK) e l'1% di antibiotici (50 U/mL di penicillina e 50 µg/mL di streptomina, entrambi da (Sigma) in un incubatore per colture cellulari a 37 °C, con il 5% di CO₂ e il 95% di aria in *flask* da 25 cm², da 75 cm² o piastre *multiwell*. Quando necessario, le cellule HepG2 sono state raccolte mediante tripsinizzazione (Trypsin-EDTA 1X, SAFC), centrifugate (1200 rpm per 5 minuti a 4°C) e contate, dopo colorazione con Trypan Blue (Merck, Life Science), con il contatore automatico *Countess 3 Automated Cell Counters* (Thermo Fisher Scientific), quindi, sono state risospese in terreno di coltura a una densità di $\sim 2,5 \times 10^4$ cellule/cm². Tutte le esposizioni con e senza PFOA, alle concentrazioni e ai tempi selezionati, sono state eseguite in terreno di coltura *deplete* con una concentrazione di FBS pari all'1%.

2.2 Reagenti chimici

Il PFOA (Merck, Life Science) è stato disciolto in dimetilsolfossido (DMSO; Merck Life Science) sterile alla concentrazione di 500mM (*stock solution*) dalla quale sono stati preparati i terreni di esposizione attraverso diluizioni in terreno coltura; l'esposizione a PFOA ha portato a un residuo di DMSO pari allo 0,02%. Negli esperimenti dose-risposta il veicolo è stato testato alla concentrazione corrispondente al volume più elevato di PFA (0,02%).

2.3 Vitalità Cellulare

La vitalità delle cellule HepG2 è stata valutata mediante il saggio di riduzione MTT [3-(4,5-Dimetiltiazol-2-il)-2,5-Difeniltetrazolio Bromuro] (Merck, Life Science). In breve, le cellule (1×10^4 cellule/pozzetto) sono state seminate su piastre da 96 pozzetti, in un volume finale di 100 µl per pozzetto e incubate per 24, 48 e 72h in presenza o in assenza di concentrazioni crescenti di PFOA (da 0,5 a 400 µM). Dopo il trattamento, il terreno è stato rimosso da ogni pozzetto e sono stati aggiunti 100 µl di una soluzione di MTT, in terreno di coltura senza siero, alla diluizione 1:12. Dopo un'incubazione di 2 ore a 37 °C, il terreno è stato rimosso, quindi, per sciogliere i cristalli scuri di

formazano, prodotti dalla riduzione del sale tetrazolio MTT, 100 μ l di isopropanolo (Fluka) sono stati aggiunti, ad ogni pozzetto, in maniera da formare una soluzione di colore viola scuro. La densità ottica dell'MTT ridotto è stata misurata a 570 nm, con una lunghezza d'onda di riferimento di 690 nm, utilizzando il lettore di Bio-tek Synergy HT *Multi-mode microplate reader* (Agilent Biotek, Winooski, VT, USA). Per ogni tempo di esposizione è stata calcolata la concentrazione minima alla quale la vitalità risulta ridotta del 50% (IC₅₀) mediante il programma GraphPad Prism 7.0 (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA, USA). Questo valore è stato calcolato per definire le condizioni di esposizione per le successive indagini sperimentali. Ciascun end-point espositivo del saggio è stato ripetuto in triplicato e i risultati sono stati riportati come media di almeno tre esperimenti indipendenti.

2.4 Saggio del Mitosox RED tramite citofluorimetria a flusso

La produzione di ROS mitocondriali, in particolare del radicale idrossilico, è stata valutata mediante l'utilizzo della sonda fluorimetrica MitoSOX (ThermoFisher) specificamente mirata ai mitocondri nelle cellule vive. Le cellule (2.5×10^4 cellule/pozzetto) sono state seminate su piastre da 24 pozzetti, in un volume finale di 500 μ l per pozzetto di RPMI 10% FBS e incubate per 24h a 37°C, 5% CO₂. Una volta raggiunta la confluenza desiderata, le cellule sono state incubate per 24h in presenza o in assenza di concentrazioni crescenti di PFOA (da 10 a 100 μ M) a 37°C con il 5%CO₂. Dopo il trattamento, il terreno è stato rimosso da ogni pozzetto e le cellule sono state lavate con PBS 1X. Contemporaneamente, la sonda MitoSOX, ricostituita in DMSO, è stata diluita 1:1000 con PBS 1X, alla concentrazione finale di 5 μ M e 150 μ l della sonda diluita, è stata aggiunta ad ogni pozzetto. La piastra è stata quindi incubata per 15 minuti a 37°C al buio per consentire alla sonda di diffondere all'interno delle cellule vive. Trascorso questo tempo, le cellule sono state lavate una volta con 200 μ l di PBS 1X e staccate mediante trattamento con 150 μ l tripsina-EDTA 1X (FCTA) per 5 minuti, la quale è stata poi neutralizzata tramite l'aggiunta di 200 μ l RPMI 10% FBS. I campioni sono stati quindi trasferiti in eppendorf e centrifugati per 5 minuti a 500 g a 4°C. Al termine della centrifuga il surnatante è stato eliminato e le cellule sono state risospese in 250 μ l di PBS 1X. La sospensione cellulare è stata infine letta in citofluorimetria (Guava Easycyte, Merck Millipore) utilizzando una lunghezza d'onda di eccitazione di 488 nm. Le emissioni sono state registrate utilizzando il canale verde per il *Mitosoxred*. Le analisi sono state effettuate su una media di 5000 cellule per ciascun campione e i risultati sono stati espressi come percentuale di cellule con alti livelli di ROS mitocondriali. Ciascun'end-point espositivo del saggio è stato ripetuto in triplicato e i risultati sono stati riportati come media di almeno tre esperimenti indipendenti. I risultati sono stati analizzati utilizzando il software *In-cytes*.

2.5 Determinazione dei ROS citosolici mediante citofluorimetria a flusso.

Per determinare i livelli totali di ROS cellulari è stato utilizzato un derivato clorometilico della dicloro-diidro-fluoresceina-diacetato (H₂DCFDA) chiamato CM-H₂DCFDA che viene maggiormente ritenuta dalle cellule vive rispetto alla molecola originaria. Le cellule HepG2 sono state seminate su piastre da 24 pozzetti, alla concentrazione di 2.5×10^4 cellule/pozzetto in un volume finale di 500 μ l di RPMI 10% FBS e incubate per 24h a 37°C, 5% CO₂. Una volta raggiunta la confluenza desiderata le cellule sono state incubate per 24h in presenza o in assenza di concentrazioni crescenti di PFOA (da 10 a 100 μ M) a 37°C con il 5%CO₂. Dopo il trattamento, il terreno è stato rimosso da ogni pozzetto e una soluzione 1 μ M di CM-H₂DCFDA in PBS è stata aggiunta a ciascun pozzetto, quindi, le cellule sono state incubate al buio per 15 minuti a 37 °C. Dopo la tripsinizzazione, le cellule sono state raccolte e centrifugate a 500×g per 5 minuti. Il pellet cellulare è stato quindi risospeso in circa 150 μ L di PBS 1X. Le analisi sono state eseguite su un citometro a flusso Guava *Easycyte* (Cytex Biosciences, Cytex Biosciences B.V., California, USA) utilizzando una lunghezza d'onda di eccitazione di 488 nm. Le emissioni sono state registrate utilizzando il canale verde per il *carboxy*-DCF. Le analisi sono state effettuate su una media di 5000 cellule per ciascun campione e i risultati sono stati espressi come percentuale di cellule con alti livelli di ROS citosolici. Ciascun'end-point espositivo del saggio è stato ripetuto in triplicato e i risultati sono stati riportati come media di almeno tre esperimenti indipendenti. I risultati sono stati analizzati utilizzando il software *In-cytes*.

2.6 Determinazione dell'Apoptosi mediante citofluorimetria a flusso.

La capacità di indurre apoptosi da parte del PFOA è stata valutata mediante il saggio dell'Annexina V, coniugata con la fluoresceina isotiocianato (FITC). Nelle cellule in apoptosi, grazie all'attivazione dell'enzima flippasi, la fosfatidilserina, viene traslocata dal versante citoplasmatico della membrana a quello esterno. La fosfatidilserina esposta viene rilevata dall'Annexina V, coniugata con la FITC, permettendo di evidenziare le cellule apoptotiche che presentano una fluorescenza verde. Le cellule HepG2 sono state seminate su piastre da 24 pozzetti, alla concentrazione di 2.5×10^4 cellule/pozzetto, in 500 μ l di RPMI 10% FBS e incubate per 24h a 37°C, 5% CO₂. Una volta raggiunta la confluenza desiderata, le cellule sono state incubate per 24h in presenza o in assenza di concentrazioni crescenti di PFOA (da 10 a 100 μ M) a 37°C con il 5%CO₂. Dopo il trattamento, il terreno è stato rimosso da ogni pozzetto, le cellule sono state lavate con PBS 1X, quindi, staccate mediante trattamento con 150 μ l tripsina-EDTA 1X (FCTA) per 5 minuti, la quale è stata poi neutralizzata tramite

l'aggiunta di 200 μ l RPMI 10% FBS. I campioni sono stati quindi trasferiti in eppendorf e centrifugati per 5 minuti a 500 g a 4°C. Al termine della centrifuga il surnatante è stato eliminato e le sono state risospese in 250 μ l di Binding Buffer ai quali sono stati aggiunti 5 μ l di Annexina V-FITC (50 μ g/ml). Dopo incubazione per cinque minuti, a temperatura ambiente, al buio, la sospensione cellulare è stata letta in citofluorimetria (Guava Easycyte, Merck Millipore) utilizzando una lunghezza d'onda di eccitazione di 488 nm ed emissione di 530nm. Le analisi sono state effettuate su una media di 5000 cellule per ciascun campione e i risultati sono stati espressi come percentuale di cellule vive, e apoptotiche. Ciascun'end-point espositivo del saggio è stato ripetuto in triplicato e i risultati sono stati riportati come media di almeno tre esperimenti indipendenti. I risultati sono stati analizzati utilizzando il software In-cytes.

2.7 Analisi biomolecolari

2.7.1 Estrazione dell'RNA totale e valutazione della sua qualità

L'estrazione dell'RNA dalle cellule HepG2 esposte a PFOA è stata eseguita utilizzando come reagente l'RNAzol (Sigma) seguendo il protocollo suggerito dal produttore.

L'RNA estratto è stato poi conservato a -80° C fino al suo utilizzo.

La concentrazione e la qualità dell'RNA totale estratto è stata determinata allo spettrofotometro NanoDrop™ 1000 (Thermo Scientific) e il rapporto fra la lettura della lunghezza d'onda a 260 e quella a 280 nm ha fornito indicazioni riguardo la purezza dell'RNA estratto rispetto alle componenti proteiche.

Per escludere la possibilità di contaminazione genomica durante le fasi di estrazione, è stata effettuata una corsa su gel d'agarosio all'1%, visualizzato grazie all'utilizzo del gelRed. Ogni campione conteneva:

- 1 μ l di RNA

- 6 μ l di sample buffer

- 2 μ l di loading buffer

- 3 μ l di H₂O

La corsa elettroforetica dei campioni è stata effettuata con ΔV di 100 V in TAE 1:50.

A corsa ultimata il gel è stato osservato ad un transilluminatore e la buona riuscita dell'estrazione è stata confermata dalla visualizzazione di tre bande, di cui due corrispondenti alle subunità ribosomiali (rRNA 18S e 28S) e una al t-RNA.

2.7.2 Sintesi del cDNA

La sintesi del cDNA è stata ottenuta partendo da 1 µg di RNA estratto precedentemente utilizzando il kit *iScript cDNA Synthesis Kit* (Bio-Rad) e seguendo il protocollo suggerito dal produttore. Per ogni campione è stato preparato un mix di reazione con:

- 4 µl di *5x iScript Reaction Mix*
- 1 µl di *iScript Reverse Transcriptase*
- 1 µl di RNA
- x µl di *Nuclease-Free-Water*

L'acqua è stata aggiunta in funzione della quantità di RNA per ottenere un volume finale di 20 µl.

La reazione viene condotta in un termociclatore, seguendo lo specifico protocollo: 25°C per 5 minuti, 42°C per 30 minuti e 85°C per 5 minuti.

Il cDNA prodotto viene diluito 1:10 al fine di renderlo utilizzabile nelle reazioni di Real Time PCR e conservato a -20° C.

2.7.3 Real time PCR

Le analisi in PCR Real time sono state condotte con il metodo del SYBR Green in un termociclatore CFX (BioRad). Ogni campione è stato analizzato in triplicato.

Per ogni campione è stato preparato il seguente mix di reazione:

- 1 µl di cDNA (diluito 1/10);
- 5 µl di 2X SYBR Green PCR Master Mix (BioRad);
- 0,1 µM di primer forward 0,3µM;
- 0,1 µM di primer reverse 0,3µM;
- 3,8 µl di acqua milli-Q.

Per i geni analizzati in questo studio sono state utilizzate le seguenti coppie di primers:

Gene	Forward Sequence (5'-3')	Reverse Sequence (5'-3')	Accession number	Source
<i>cat</i>	TCCGGGATCTTTTAACGCCATTG	TCGAGCACGGTAGGGACAGTTCAC	NM_012520.2	Almeer et al., 2019
<i>gpx4</i>	CAGGGAGTAACGAAGAGATC	TCTTCATCCACTTCCACAGC	NM_205625.1	Zhang et al., 2022
<i>HO-1</i>	CCTTCTTCACCTTCCCCAAC	GCCTCTTCTATCACCCCTCTG	NM_002133.3	Wang et al., 2023
<i>parp-1</i>	AAGCCCTAAAGGCTC AGAAC	AGAAGGCACTTGCTGCTTGT	NM_001618	Tomasetti et al., 2011
<i>sod-1</i>	ATCCTCTATCCAGAAAACACGG	GCGTTTCCTGTCTTTGTA CTTT	NM_000454.5	Medina-Pizaño., et al 2022
<i>Gadph</i>	TCCACTGGCGTCTTCACC	GGCAGAGATGATGACCCTTTT	NM_017008.4	Liu et al., 2014

La quantificazione è stata effettuata utilizzando come standards interni di riferimento *rpl0* e *gadph*. Questi geni sono stati scelti come standard dal momento che i loro mRNA risultano avere una espressione costante (*housekeeping*) sia negli organismi *wil-type* che in quelli mutati.

Il protocollo per ogni reazione è stato:

- 3 minuti a 95°C: attivazione della Taq polimerasi
- 45 cicli con il seguente profilo termico:
 - 95°C per 10 secondi: denaturazione con separazione della doppia elica
 - 50-60°C a seconda dei geni in analisi per 20 secondi: la temperatura viene raffreddata alla temperatura di melting dei primers permettendo l'*annealing* degli oligonucleotidi alla loro sequenza complementare.
 - 72°C per 20 secondi: fase di elongazione del filamento di cDNA

➤ 72°C per 8 minuti: fase di estensione

Per esprimere l'espressione relativa di ogni gene i dati vengono analizzati mediante l'iQ5 Optical System Software versione 2.1 (Bio-Rad) insieme al software GeneEx Macro Conversion IQ5 e Genex file IQ macro.

2.7.4 Analisi statistica

I risultati delle analisi sono stati elaborati mediante GraphPad Prism 7.0 (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA, USA) e sono stati riportati come media \pm SD di almeno tre esperimenti indipendenti. La comparazione tra gruppi sperimentali è stata effettuata mediante lo Student's t-test (confronto tra due gruppi), oppure, mediante One way ANOVA (tre o più gruppi). Il valore di $p < 0.01$ è stato considerato statisticamente significativo. Sono state considerate significative differenze tra i gruppi sperimentali per valore di $p < 0.05$. Differenze statisticamente significative tra i cervelli e le classi di oociti +/+ e +/- sono indicate dalla presenza di lettere diverse.

3 Risultati

3.1 Valutazione della Vitalità cellulare- saggio MTT

L'effetto dell'esposizione a PFOA sulla vitalità delle HepG2 è stata valutata esponendo le cellule per 24-48-72 ore a concentrazioni comprese tra 0.5 μM – 400 μM .

Come si può osservare dal grafico i risultati mostrano una diminuzione significativa della vitalità alle concentrazioni di 50, 100, 200 e 400 μM per tutti i tempi di esposizione all'inquinante.

Nello specifico la maggiore tossicità rispetto al controllo è stata osservata con le esposizioni a 100 μM 200 e 400 μM .

Al contrario alle concentrazioni di 0.5 μM e 5 μM non sono state osservate differenze statisticamente significative della vitalità cellulare rispetto al gruppo di controllo, a tutti i tempi di esposizione.

Quest'analisi ci ha permesso di calcolare l'EC50, che a 24 ore è risultato essere pari a 176,3 μM e di stabilire le condizioni per le successive osservazioni che sono state condotte per 24 ore esponendo le cellule alle concentrazioni comprese tra 10 e 100 μM in modo da garantire una vitalità cellulare superiore al 70%. Le concentrazioni di 200 e 400 μM , invece, non sono state più utilizzate in quanto come si evince dal grafico, le cellule hanno evidenziato una vitalità cellulare al di sotto del 50%.

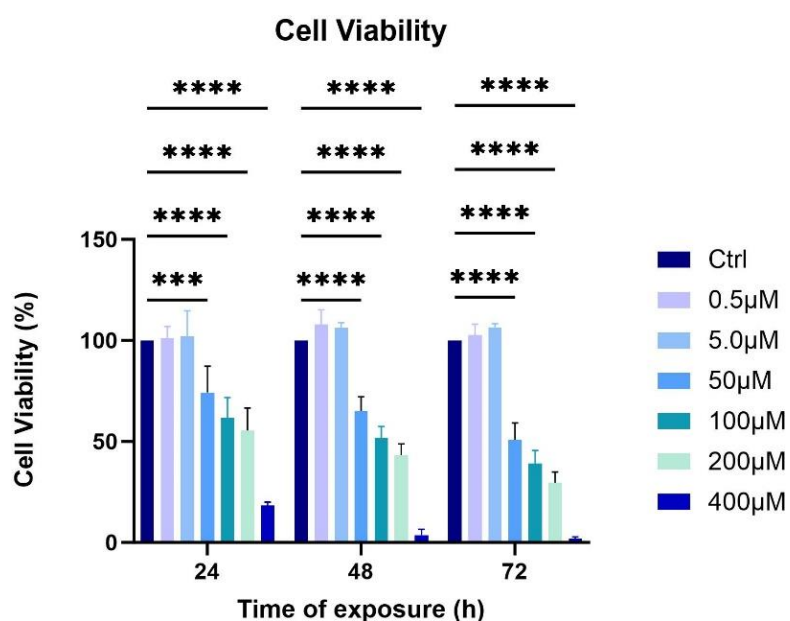


Fig.2 Vitalità cellulare nelle HepG2 esposte a 0.5-400 μM PFOA per 24, 48 72h. Gli asterischi indicano le differenze statisticamente significative tra il controllo (Ctrl) e i diversi gruppi sperimentali ($P < 0.05$).

Valutazione della produzione di ROS

3.2 ROS citoplasmatici

Per poter comprendere e valutare gli effetti tossici indotti dall'esposizione al PFOA sono stati misurati i livelli di ROS intracellulari mediante una sonda redox, la CM-DCF-DA, e la valutazione è stata effettuata dopo 24 ore dall'aggiunta delle diverse concentrazioni di PFOA (10-100 μM), mediante citometria a flusso.

Come si può vedere dal grafico in Fig.3 è stato riscontrato un aumento significativo di ROS alle concentrazioni di 10,25 e 50 μM rispetto al controllo.

Per quanto riguarda le concentrazioni più alte, (75 e 100 μM) è stata osservata una diminuzione significativa di produzione di ROS intracellulare. Le concentrazioni di 50 e 75 μM hanno indotto una riduzione della produzione di ROS, che però non è risultata statisticamente significativa ($P > 0.05$).

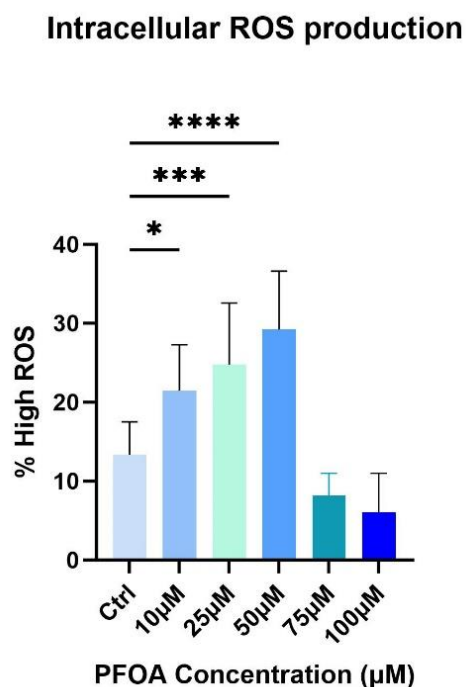


Fig.3 Produzione di ROS intracellulari nelle cellule HepG2 esposte a 10-100 μM PFOA. Gli asterischi indicano differenze statisticamente significative tra il controllo (Ctrl) e i diversi gruppi sperimentali ($P < 0.05$).

3.3 ROS mitocondriali

Nelle cellule HepG2 esposte per 24 ore a PFOA a concentrazioni comprese tra 10 e 100 μM , è stato anche valutato il livello di specie reattive dell'ossigeno mitocondriali tramite un saggio citofluorimetrico che utilizza la sonda fluorescente mitoSOX in grado di penetrare all'interno dei mitocondri di cellule vive. Come si può osservare dal grafico in Fig.4 le concentrazioni di 10,25 e 50 μM hanno determinato un aumento di ROS mitocondriali statisticamente significativo ($P < 0.05$). Anche le due concentrazioni più alte hanno indotto un aumento di ROS, che però non è risultato statisticamente significativo ($P < 0.05$).

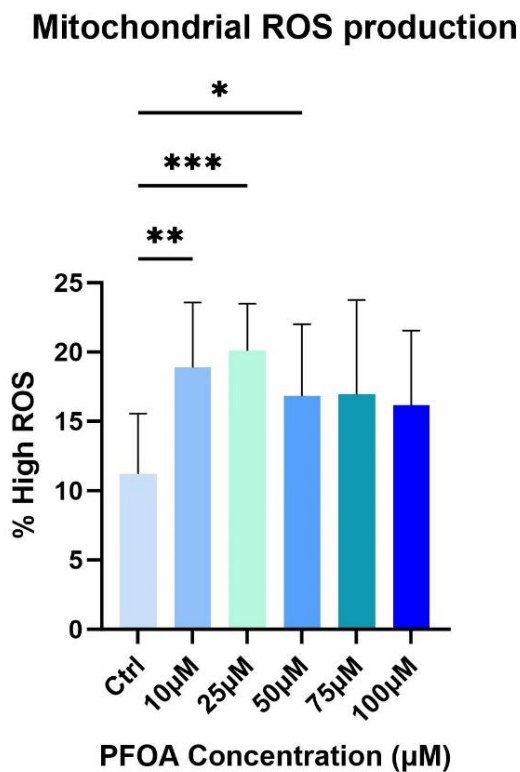


Fig.4 Produzione di ROS mitocondriali nelle cellule HepG2 esposte a 10-100 μM PFOA. Gli asterischi indicano differenze statisticamente significative tra il controllo (Ctrl) e i diversi gruppi sperimentali.

3.2 Induzione di processi apoptotici

Verificato l'aumento di stress ossidativo, sia intracellulare che mitocondriale nelle cellule trattate con PFOA, si è valutata l'induzione di apoptosi attraverso il saggio citofluorimetrico dell'annexina V coniugata con FITC.

Come si evince dal grafico in Fig. 5, dopo 24 ore di esposizione, il PFOA induce un incremento dose dipendente delle cellule apoptotiche con un incremento statisticamente significativo, rispetto al controllo, a 50, 75 e 100 μM . La maggiore significatività è stata osservata alle due concentrazioni più alte di PFOA.

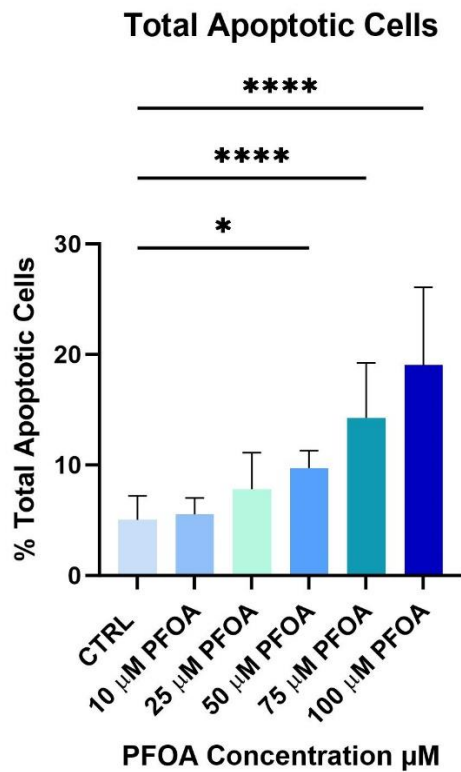


Fig.5 Apoptosi nelle cellule HepG2 esposte a 10-100 μM PFOA. Gli asterischi indicano differenze statisticamente significative tra il controllo (Ctrl) e i campioni esposti.

3.3 PCR

Tramite Real Time PCR è stata valutata all'espressione di geni coinvolti nel processo di detossificazione cellulare in seguito all'aumento dello stress ossidativo, tra cui la catalasi (CAT), l'eme ossigenasi (HO-1), la glutatione perossidasi 4 (GPX4) e il gene che codifica per la Poli ADP-ribosio polimerasi-1 (PARP1) coinvolta nei sistemi di riparo del danno al DNA in cellule HepG2 esposte, per 24 ore, a concentrazioni comprese tra 10 e 100 μM di PFOA.

Relativamente alla CAT si può osservare dal grafico una diminuzione di mRNA significativa rispetto al controllo nelle cellule esposte a 50, 75 e 100 μM (Fig.6a).

Per l'mRNA di HO-1 i risultati mostrano una simile riduzione dei livelli di trascrizione genica nei gruppi esposti alle concentrazioni più elevate, a partire dal 50 μ M. (Fig.6b).

I livelli di trascritto di GPX4 mostrano una diminuzione significativa a tutte le concentrazioni testate (Fig.6c).

Per ciò che riguarda i livelli di PARP1, come si evince dal grafico, mostrano una diminuzione significativa dell'espressione genica a partire da 50 fino a 100 μ M (Fig.6d).

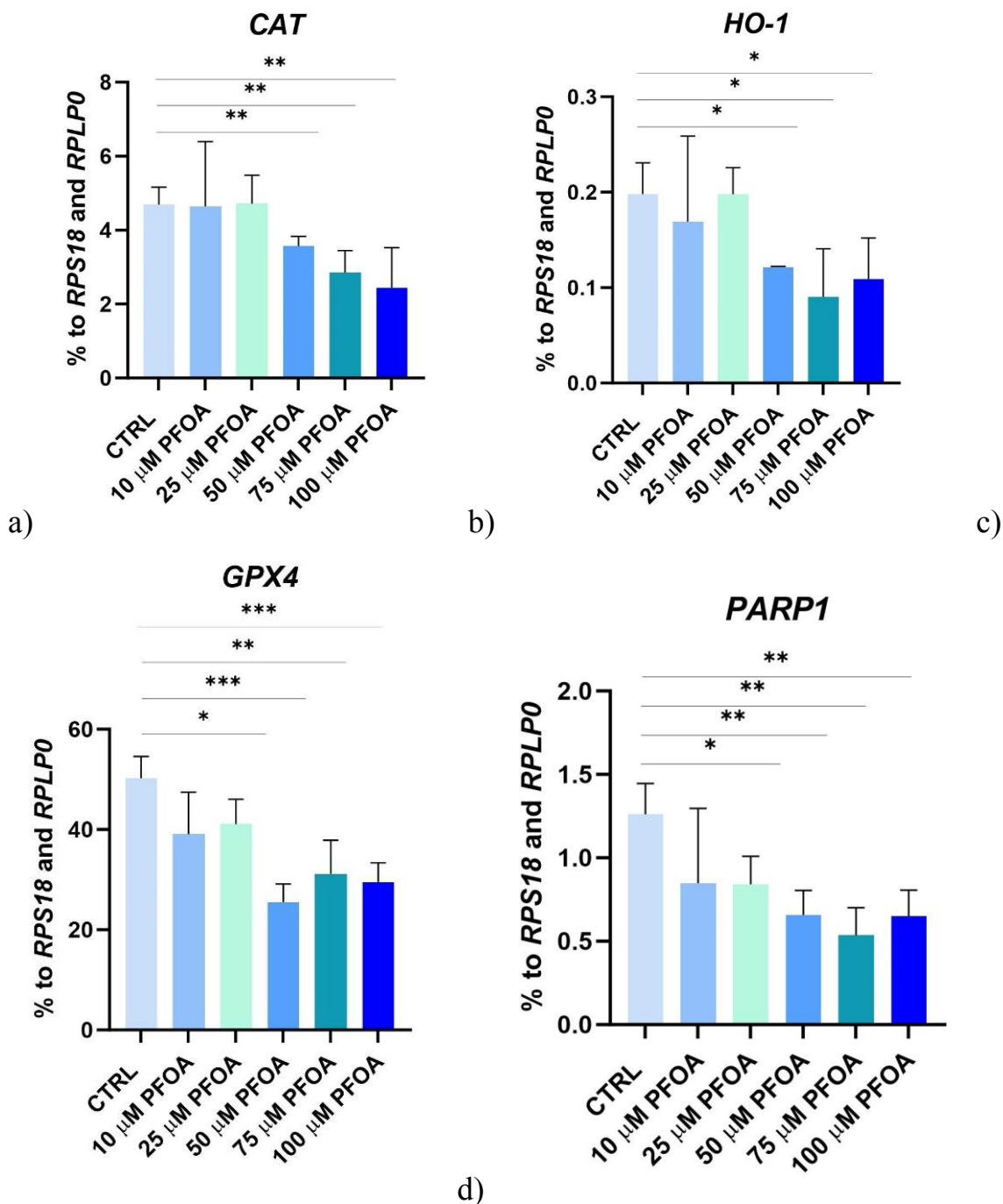


Fig.6 Espressione genica nelle HepG2 esposte a 10-100 μ M PFOA di a) CAT b) HO-1 c) GPX-4 d) PARP1. Gli asterischi indicano la differenza statisticamente significativa tra il controllo (Ctrl) e i diversi gruppi sperimentali.

4 Discussione

Ad oggi, diversi studi hanno dimostrato la tossicità causata dall'esposizione a PFAS. Le loro caratteristiche più preoccupanti sono la persistenza ambientale e biologica, mobilità, potenziale di bioaccumulo e tossicità (EPA, 2022).

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 al PFOA, in particolare a livello epatico.

La tossicità del PFOA è stata valutata utilizzando cellule epatiche tumorali umane HepG2 esposte a concentrazioni crescenti dell'inquinante, in un range inizialmente compreso tra 0.5-400 μ M.

I risultati ottenuti, hanno rilevato una sostanziale diminuzione della vitalità cellulare nei campioni esposti a PFOA alle concentrazioni comprese tra 50-400 μ M, proporzionale sia dalla concentrazione che alla durata dell'esposizione.

Gli effetti citotossici osservati potrebbero essere correlati alle proprietà fisico-chimiche dei perfluorocarburi in particolare alla loro azione di tensioattivi (Quinete et al., 2010). (Florentin et al., 2011). La maggior parte delle caratteristiche fisico-chimiche dei PFAS, infatti, sono dovute all'estrema resistenza del legame carbonio-fluoro (C-F).

In uno studio condotto nel 2011, Florentin e collaboratori, hanno osservato che l'esposizione a PFOA e PFOS delle HepG2, per 24 ore, causava citotossicità. Inoltre, hanno anche osservato che le cellule esposte subivano delle modifiche conformazionali come, comparsa di vacuoli e perdita di adesione cellulare. I tensioattivi, infatti possiedono attività come detergenza, emulsione, dispersione e solubilizzazione (Florentin et al., 2011)

Eriksen e collaboratori già nel 2010, dimostrarono che l'esposizione a PFOA e PFOS aumentano la produzione intracellulare di ROS rispettivamente di 1,52 volte (95% CI, 1,37-1,67) e 1,25 volte (95% CI, 1,10-1,40) nelle cellule HepG2 (Eriksen et al 2010), confermando quanto precedentemente osservato da Liu e collaboratori (2007).

Questi ultimi autori hanno condotto lo studio allestendo una coltura primaria di epatociti di tilapia e esponendola per 24 h a concentrazioni di PFOA e PFOS comprese tra 0 e 30 mg L⁻¹. Solamente nelle cellule trattate con 15 mg L⁻¹ di PFOS, le concentrazioni di ROS sono aumentate significativamente (52,7%) rispetto al controllo. Al contrario, nelle cellule trattate con PFOA, è stato misurato un aumento dose-dipendente di ROS con un aumento del 43,0% nel gruppo esposto a 15 mg L⁻¹ e del 60,0% nel gruppo esposto a 30 mg L⁻¹. Lo studio ha quindi dimostrato una radicale diminuzione della vitalità cellulare di tipo dose-dipendente in seguito all'esposizione ad entrambi i composti utilizzati, associata all'aumento di ROS (Liu et al., 2007)

Liu e collaborati (2007), hanno dimostrato un aumento drammatico del contenuto cellulare di anioni superossido e perossido di idrogeno in seguito all'esposizione delle HepG2 a 200 o 400 µM di PFOA per 3 ore (Liu et al., 2007).

I risultati ottenuti quindi risultano essere in accordo con quelli ottenuti negli studi precedenti che mettono in evidenza, in tutti i casi, una stretta relazione tra esposizione al PFOA e diminuzione della vitalità cellulare, causata dall'aumento della produzione di ROS.

I ROS sono specie transitorie a causa della loro elevata reattività chimica e possono reagire con DNA, proteine, carboidrati e lipidi in modo distruttivo. Precedenti studi hanno già dimostrato che i ROS sono sostanziali per la disfunzione indotta da PFOA. (Zhao et al., 2011). Le sostanze perfluorate, in generale, sono infatti in grado di causare alterazioni nella fluidità della membrana e di pH. Le variazioni del pH citosolico o del potenziale della membrana plasmatica sono fondamentali nella risposta cellulare a diversi stimoli, compresi quelli che segnalano la sopravvivenza o la morte cellulare (Kleszczyński et al., 2009).

Le specie reattive dell'ossigeno possono essere generate in molti organelli diversi, incluso il mitocondrio, che è responsabile della respirazione aerobica, la fonte più comune di generazione di ROS. I mitocondri, il centro metabolico di una cellula, sono quindi intimamente coinvolti nella produzione di ROS e sono un bersaglio potenzialmente suscettibile di mutageni/cancerogeni ambientali. Studi precedenti hanno anche scoperto che la disfunzione mitocondriale può essere correlata alla tossicità di PFOA (Zhao et al., 2011).

I mitocondri contengono il loro DNA extranucleare (mtDNA), che è molto importante per varie funzioni, in particolare per la catena di trasporto degli elettroni (ETC). È stato dimostrato che l'ETC è uno dei principali generatori cellulari di ROS, come il superossido (O₂⁻), il perossido di idrogeno (H₂O₂) e il radicale libero idrossile (.OH). La perdita di mtDNA potrebbe causare una possibile disfunzione dell'ETC. Di conseguenza è facile comprendere il ruolo fondamentale che i mitocondri possiedono

nella mutagenicità indotta da PFOA e anche che l'eccesso di ROS potrebbe derivare proprio dall'ETC (Zhao et al., 2011).

Lo stress ossidativo attiva la “mitochondrial permeability transition” (MPT) (Halestrap et al., 1997), modificando la permeabilità della membrana mitocondriale esterna e causando il rilascio di alcune proteine che inducono l'apoptosi (Desagher et al., 2000). A questo proposito, studi precedenti hanno dimostrato che negli epatociti esposti a PFOS e PFOA l'aumento di ROS cellulari porta all'apoptosi (Liu et al., 2007).

Quindi, considerato l'aumento dello stress ossidativo osservato, attraverso il saggio dell'Annexina V, si è visto che, a partire dalla concentrazione 50 μ M di PFOA, il numero di cellule apoptotiche aumentava significativamente.

Nel complesso, quindi, i risultati di questo lavoro di tesi mostrano un aumento significativo di ROS, rispetto al controllo, sia citoplasmatici che mitocondriali nei diversi trattati. Per ciò che riguarda quelli mitocondriali, e quindi essenzialmente l'anione superossido, tutte le concentrazioni utilizzate ne indicano un aumento, anche se non sempre significativo, mentre per quelli citoplasmatici, la questione è più complessa, infatti alle concentrazioni di 75 e 100 μ M la percentuale di ROS è molto vicina a quella del controllo, nonostante le concentrazioni dell'inquinante siano più elevate.

Il fatto che alle concentrazioni più elevate si osservino dei valori ROS simili al controllo, associati ad un aumento di apoptosi, ci fa immaginare che le concentrazioni più elevate, caratterizzate tra l'altro dai valori più bassi di vitalità cellulare sono quelle in cui le cellule presentano un danno talmente alto per cui il sistema di detossificazione è altamente compromesso. A supporto di questa considerazione, l'analisi in PCR di una serie di segnali coinvolti nella risposta allo stress, infatti suggerisce la compromissione del sistema.

Tra i biomarkers analizzati c'è la CAT, il cui gene codifica per l'enzima catalasi, un'ossidoreduttasi coinvolta nella detossificazione della cellula da ROS. E' localizzata principalmente nel perossisoma ed è responsabile della riduzione del perossido di idrogeno e della protezione dall'ossidazione degli acidi grassi insaturi nella membrana cellulare (Pietra vivente, 2001). La mancanza di variazioni del livello di trascritto rispetto al CTRL in corrispondenza delle concentrazioni più elevate, lascia speculare sulla possibilità che venga prodotta una quantità di ROS tale da indurre un elevato stress ossidativo e compromettere così la funzionalità dell'enzima antiossidante.

Tra i geni codificanti enzimi coinvolti nella risposta antiossidante, notevole importanza ha l'eme ossigenasi-1 (HO-1). Il gene HO-1 (HMOX1) è localizzato sul cromosoma 22q12 e codifica una proteina costituita da 728 amminoacidi e con un peso molecolare di 32-36 kDa. Mediante l'attivazione di molteplici vie di segnale, HO-1 è in grado di

rispondere a una vasta gamma di stimoli quali ROS, radiazioni, fattori di crescita, citochine infiammatorie (Maines, 1988; Piras et al., 2017). Substrato dell'attività di HO-1 sono i gruppi eme che derivano dal catabolismo cellulare e vengono convertiti in monossido di carbonio (CO), biliverdina e Fe²⁺ libero. Il CO presenta proprietà anti-apoptotiche e anti-infiammatorie (Loboda et al., 2015) (Motterlini et al., 2012), la biliverdina viene convertita dall'enzima biliverdina reduttasi (BVR) in bilirubina, che è in grado di limitare la produzione di ROS prevenendo la perossidazione di lipidi e proteine ed esercitando quindi un elevato potere antiossidante (Stocker et al., 1987), anti-infiammatorio (Loboda et al., 2016) e antiapoptotico.

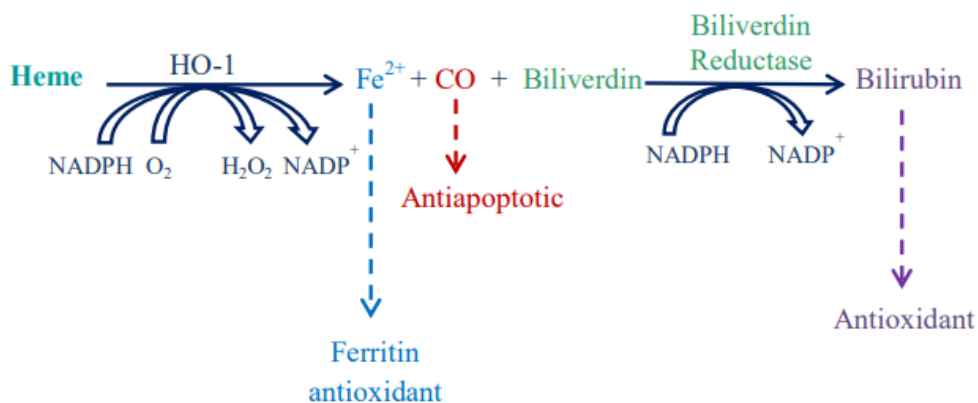


Fig.4. Schema della funzione cellulare di HO-1. Degradazione di Eme in Fe²⁺, CO e Biliverdina che viene ridotta in Bilirubina dall'enzima Biliverdina Reduttasi

Fig.7 uno schema della funzione di HO-1. Degradazione di Eme in Fe²⁺, CO e Biliverdina che viene ridotta in Bilirubina dall'enzima Biliverdina Reduttasi.

I risultati ottenuti mostrano una diminuzione significativa dell'espressione di HO-1. In particolare alle concentrazioni di 50, 75 e 100 μM. Una possibile spiegazione risulta simile a quella data per la catalasi ossia che la cellula ha subito uno stress ossidativo talmente alto da compromettere la funzionalità di HO-1.

La glutatione perossidasi 4 (GPX4) è un gene che codifica per la fosfolipide idroperossidasi, un enzima che catalizza in particolare la riduzione dei perossidi di idrogeno ed è considerato un enzima protettivo efficiente contro la perossidazione lipidica (Winston e Di Giulio, 1991)

I risultati mostrano una sostanziale diminuzione dell'espressione di GPX4 e questa volta a tutte le concentrazioni testate. Ciò può suggerire che anche qui si sia verificato un fallimento nel sistema di detossificazione causato da un grave stress ossidativo.

Infine, l'ultimo segnale analizzato è la poli(ADP-ribosio) polimerasi 1 (PARP1), avente un ruolo chiave nel decidere il destino delle cellule. PARP ha come funzione principale quella di partecipare al processo di riparazione del DNA in condizioni fisiopatologiche. A causa della sua attivazione immediata in caso di danni o rotture al

DNA, l'espressione di PARP-1 potrebbe essere un fattore importante per la cellula nel momento in cui si innesca l'apoptosi. La ragione principale dell'inattivazione di PARP-1 sembra essere la conservazione dell'ATP cellulare necessario per realizzare l'apoptosi. La scissione di PARP-1 può essere importante per l'inibizione della riparazione del DNA, della trascrizione genica specifica e di altri processi cellulari che non sono più necessari per una cellula morente (Véronique J. Et al 2003).

I risultati ottenuti in questo studio hanno già dimostrato che in seguito all'esposizione di PFOA si verifica un aumento di cellule apoptotiche che rispecchia l'andamento di espressione di PARP-1. È ragionevole supporre che, nel momento in cui la cellula ha subito gravi danni al DNA la scelta migliore risulta quella di inattivare PARP-1, non spreco di energia per una cellula che è destinata ad una morte programmata ed è molto probabile che sia ciò che è successo alle HepG2 in seguito all'esposizione di PFOA.

5 Conclusione

Gli esseri umani sono esposti a migliaia di sostanze chimiche durante l'arco di tutta la vita attraverso l'aria che respirano, il cibo che mangiano e l'acqua che bevono. Un numero significativo di queste sostanze chimiche è in grado di agire come interferente endocrino. Tra tutti i composti ad oggi conosciuti, abbiamo posto la nostra attenzione sul PFOA e abbiamo sperimentato ed esaminato il suo effetto sulla linea cellulare epatica HepG2.

Con il presente studio abbiamo dimostrato che l'esposizione al PFOA a partire da determinate concentrazioni, è in grado di indurre una diminuzione della vitalità cellulare e un aumento di ROS intracellulari e mitocondriali, responsabili dell'aumento di apoptosi.

Considerando che le concentrazioni di PFOA testate sono quelle a cui siamo esposti nella nostra quotidianità, attraverso l'alimentazione oppure in alcuni ambienti lavorativi, i risultati dovrebbero essere presi in considerazione da parte degli enti proposti alla nostra sicurezza al fine di ridurre il rischio per la nostra salute.

Bibliografia e sitografia

Ahn C, Jeung EB. (2023) Endocrine-Disrupting Chemicals and Disease Endpoints. *International Journal of Molecular Sciences*. 2023; 24(6):5342.

Bansal A, Henao-Mejia J, Simmons RA. (2018) Immune System: An Emerging Player in Mediating Effects of Endocrine Disruptors on Metabolic Health. *Endocrinology*.

Behr A, Plinsch C, Braeuning A, Buhrke T, (2020) Activation of human nuclear receptors by perfluoroalkylated substances (PFAS), *Toxicology in Vitro*, 62, 104700,

Bouchard V, Rouleau M, Poirier G, (2003) PARP-1, a determinant of cell survival in response to DNA damage, *Experimental Hematology*, 31(6) 446-454

Brase RA, Mullin EJ, Spink DC (2021). Legacy and Emerging Per- and Polyfluoroalkyl Substances: Analytical Techniques, Environmental Fate, and Health Effects. *International Journal of Molecular Sciences* . 22(3), 995.

Coperchini F, Croce L, Ricci G, Magri F, Rotondi M, Imbriani M, Chiovato L. (2021). Thyroid Disrupting Effects of Old and New Generation PFAS. *Front Endocrinol (Lausanne)*.

Eriksen K, Raaschou-Nielsen O, Sørensen M, Roursgaard M, Loft S, Møller P, (2010), Genotoxic potential of the perfluorinated chemicals PFOA, PFOS, PFBS, PFNA and PFHxA in human HepG2 cells, *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 700(1–2), 39-43.

Florentin A, Deblonde T, Diguio N, Hautemaniere A, Hartemann P, (2011) Impacts of two perfluorinated compounds (PFOS and PFOA) on human hepatoma cells: Cytotoxicity but no genotoxicity?, *International Journal of Hygiene and Environmental Health*, 214(6),493-499.

Gálvez-Ontiveros Y, Páez S, Monteagudo C, Rivas A. (2020). Endocrine Disruptors in Food: Impact on Gut Microbiota and Metabolic Diseases *Nutrienti*. 12(4),1158

Gutiérrez-García A, Torres-García D, Leon-Rodríguez A, (2024) Diethylphthalate and dibutylphthalate disrupt sirtuin expression in HepG2 cells, *Toxicology Research*, 13(4)

Kleszczyński K, Andrzej C. Składanowski, (2009), Mechanism of cytotoxic action of perfluorinated acids.: I. Alteration in plasma membrane potential and intracellular pH level, *Toxicology and Applied Pharmacology* 234(3), 300-305

Li, Lin C, Xiao K, Dilixiati L, Huo Y, Zhang Y, Zengli (2024) Evaluation of cadmium effects on the glucose metabolism on insulin resistance HepG2 cells

Liu C, Ke Yu, Shi K, Wang J, Lam P, Wu R, Zhou B, (2007) Induction of oxidative stress and apoptosis by PFOS and PFOA in primary cultured hepatocytes of freshwater tilapia (*Oreochromis niloticus*), *Aquatic Toxicology*, 82, (2), 135-143

Ojo A, Peng C, Jack C. Ng, (2020) Combined effects and toxicological interactions of perfluoroalkyl and polyfluoroalkyl substances mixtures in human liver cells (HepG2), *Environmental Pollution*, 263, Part B, 2020, 114182

Ozkemahli, G., Erkekoglu, P., Ercan, A. *et al.* (2023) Effects of single or combined exposure to bisphenol A and mono(2-ethylhexyl)phthalate on oxidant/antioxidant status, endoplasmic reticulum stress and apoptosis in the HepG2 cell line. *Environ Sci Pollut Res* 30, 12189–12206.

Panaretakis T, Shabalina I, Grandér D, Shoshan M, DePierre J, (2001) Reactive Oxygen Species and Mitochondria Mediate the Induction of Apoptosis in Human Hepatoma HepG2 Cells by the Rodent Peroxisome Proliferator and Hepatocarcinogen, Perfluorooctanoic Acid, *Toxicology and Applied Pharmacology*, 173, (1), 56-64,

Panieri E, Baralic K, Djukic-Cosic D, Buha Djordjevic A, Saso L. (2022) PFAS Molecules: A Major Concern for the Human Health and the Environment. *Toxics*; 10(2):44.

Pedroso de Paula L, Alves C, (2024), Food packaging and endocrine disruptors, *Jornal de Pediatria*, 100(1), S40-S47.

Qu W, Yan Y, Gerrish K, Scappini E, Tucker C, Dixon D, Merrick A, (2023) Chronic PFOA exposure in vitro causes acquisition of multiple tumor cell characteristics in rat liver cells, *Toxicology in Vitro*, 89, 105577

Treviño LS, Katz TA, (2018). Endocrine Disruptors and Developmental Origins of Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Endocrinology*. Jan 1;159(1):20-31.

Wang, LQ., Liu, T., Yang, S. *et al.* (2021) Perfluoroalkyl substance pollutants activate the innate immune system through the AIM2 inflammasome. *Nat Commun* 12, 2915

Wen Y, Chen J, Li J, Arif W, Kalsotra A, Irudayaraj J. (2020). Effect of PFOA on DNA Methylation and Alternative Splicing in Mouse Liver.

Yilmaz, B., Terekeci, H., Sandal, S. *et al.* (2020). Endocrine disrupting chemicals: exposure, effects on human health, mechanism of action, models for testing and strategies for prevention. *Rev Endocr Metab Disord* 21, 127–147.

Zhao G, Wang J, Wang X, Chen S, Zhao Y, Gu F, Xu A, Wu L, (2011) *Environmental Science and Technology* 45 (4), 1638-1644 DOI: 10.1021/es1026129 Mutagenicity of PFOA in Mammalian Cells: Role of Mitochondria-Dependent Reactive Oxygen Species

Zhao, Wang G, Wang J, Chen X, Zhao S, Gu Y, Xu F, Wu A, Lijun, (2011), Mutagenicity of PFOA in Mammalian Cells: Role of Mitochondria-Dependent Reactive Oxygen Species, *Environmental Science & Technology*, 45 (4), 1638-1644,