

Immunotossicità da PFAS: biomarcatori e meccanismi molecolari

Martina Iulini

Università degli Studi di Milano, Milano

IMMUNOTOSSICITÀ DA PFAS: BIOMARCATORI E MECCANISMI MOLECOLARI

L'immunotossicità indotta dai PFAS rappresenta attualmente uno degli *endpoint* più rilevanti, sensibili e ampiamente documentati nelle valutazioni del rischio associate a questa vasta classe di sostanze. Le evidenze epidemiologiche e sperimentali che mostrano una chiara associazione tra esposizione a PFAS e ridotta risposta anticorpale ai vaccini, insieme all'aumento della suscettibilità alle infezioni, sono talmente robuste da costituire la base dei valori guida stabiliti dalle principali agenzie regolatorie internazionali. L'Autorità Europea per la Sicurezza Alimentare (EFSA) ha identificato la diminuzione della risposta anticorpale nei bambini come l'*endpoint* critico per derivare la dose tollerabile settimanale (*Tolerable Weekly Intake* – TWI) per PFOS, PFOA, PFHxS e PFNA, sottolineando che tali effetti immunitari si verificano a livelli di esposizione bassi e ampiamente diffusi nella popolazione europea (EFSA, 2020). Allo stesso modo, l'*Environmental*

Protection Agency (EPA) statunitense ha basato l'impostazione dei nuovi livelli di allerta sanitaria (*Health Advisory Levels* – HALs) per PFOS e PFOA principalmente sull'immunotossicità, in particolare sulla riduzione dei titoli anticorpali, riconosciuta come l'effetto più sensibile e di maggiore rilevanza per la salute pubblica (EPA, 2022). L'impatto dei PFAS sul sistema immunitario umano si manifesta attraverso meccanismi complessi e articolati che includono interazioni dirette con le cellule immunitarie e modulazioni persistenti delle vie di segnalazione responsabili delle risposte infiammatorie e adattative. A ciò si aggiungono interferenze nello sviluppo e nell'architettura degli organi linfoidi, insieme ad alterazioni profonde della memoria immunitaria, sia adattativa sia innata, attraverso programmi epigenetici e metabolici di *trained immunity*. L'insieme di questi effetti conferisce ai PFAS un ruolo peculiare di immunotossici sistemici, capaci di indebolire la risposta vaccinale e

di aumentare la suscettibilità alle infezioni respiratorie e virali, alterando in modo significativo l'omeostasi immunitaria.

L'evidenza epidemiologica più solida riguarda la compromissione della risposta anticorpale ai vaccini in seguito all'esposizione, soprattutto prenatale e infantile, a PFOS, PFOA e altri PFAS a catena lunga. Nella coorte dei bambini delle Isole Faroe sono stati osservati per la prima volta segnali di un'associazione inversa tra livelli sierici di PFAS e risposta vaccinale. Studi successivi hanno confermato che concentrazioni più elevate di PFOS e PFOA nei bambini di cinque anni si correlano a una riduzione significativa dei titoli anticorpali contro difterite e tetano, spesso al di sotto delle soglie considerate protettive dalle autorità sanitarie. Questi risultati sono stati replicati in diverse popolazioni, dimostrando che l'effetto immunotossico non è limitato a contesti di esposizione eccezionali, ma si manifesta anche a livelli relativamente bassi. In una coorte norvegese, l'esposizione prenatale ai PFAS è stata associata ad alterazioni delle risposte anticorpali nei primi anni di vita, e livelli più elevati di PFOA nei bambini di un anno risultavano correlati a una minore risposta ai vaccini di routine, evidenziando la persistenza delle alterazioni immunitarie. Analoghe associazioni sono state documentate anche in Paesi con minori risorse sanitarie, come la Guinea-Bissau, confermando la natura globale del fenomeno. Nel complesso, queste osservazioni convergono nell'identificare la risposta anticorpale post-vaccinale come uno degli indicatori più sensibili e biologicamente rilevanti di una competenza immunitaria compromessa.

Le evidenze epidemiologiche trovano un forte supporto nei dati sperimentali *in vivo* e *in vitro*, che consentono di stabilire un nesso causale tra esposizione ai PFAS e immunosoppressione. Studi condotti

in modelli murini hanno dimostrato che l'esposizione a PFOA o PFOS determina una soppressione dose-dipendente della risposta anticorpale T-dipendente, con riduzione significativa dei livelli di immunoglobuline di tipo M e G in seguito a immunizzazione con antigeni classici. Questa soppressione è accompagnata da alterazioni delle popolazioni linfocitarie B e T, da una compromissione della cooperazione tra di esse e da modificazioni strutturali della milza, indicando un'interferenza diretta con i meccanismi cellulari alla base della risposta adattativa. Inoltre, l'esposizione perinatale a PFOS è associata a una riduzione dei titoli anticorpali post-immunizzazione e a una maggiore suscettibilità alle infezioni respiratorie in modelli murini, rafforzando la connessione tra immunosoppressione e *outcome* clinicamente rilevanti. Ulteriori conferme derivano da modelli di infezione virale: è stato dimostrato che PFOS compromette in modo significativo la risposta immunitaria in topi infettati con virus influenzale A, determinando un aumento della mortalità, una *clearance* virale ritardata e una riduzione dell'attività delle cellule NK e delle cellule T citotossiche. Questi risultati mostrano che la soppressione della risposta immune indotta dai PFAS ha conseguenze funzionali dirette sulla capacità dell'organismo di contrastare patogeni respiratori, fornendo una base meccanicistica per interpretare l'aumento di infezioni osservato negli studi epidemiologici pediatrici.

I modelli *in vitro* hanno contribuito a chiarire in modo significativo i meccanismi cellulari alla base degli effetti immunotossici dei PFAS. L'esposizione di cellule B a PFOS o PFOA ha comportato una riduzione della proliferazione, della differenziazione in plasmacellule e della secrezione di immunoglobuline, anche in presenza di stimolazione antigenica controllata. Parallelamente, i PFAS compromettono

la funzionalità delle cellule dendritiche e dei macrofagi, diminuendo la capacità di presentare l'antigene e di produrre citochine fondamentali per l'attivazione coordinata delle cellule T e B. La coerenza tra le evidenze epidemiologiche e quelle sperimentali è stata recentemente analizzata anche in ambito regolatorio. In un progetto sostenuto da EFSA, i dati provenienti da studi sull'uomo sono stati integrati con simulazioni basate su sistemi *in silico* e modelli *in vitro*. Questa valutazione ha portato a concludere che la riduzione della produzione anticorpale rappresenta l'*endpoint* immunotossicologico più sensibile per l'esposizione a PFOS, PFOA, PFHxS e PFNA. Tuttavia, è emerso che anche altre funzioni immunitarie risultano compromesse, confermando la natura sistemica dell'impatto dei PFAS sul sistema immunitario.

Accanto agli effetti sulla risposta vaccinale, infatti, numerosi studi epidemiologici indicano che l'esposizione prenatale ai PFAS è associata a un aumento del rischio di infezioni durante l'infanzia, in particolare infezioni respiratorie più frequenti, severe e ricorrenti. Anche in questo caso, i dati sperimentali suggeriscono che tali effetti riflettano una compromissione integrata dell'immunità innata e adattativa, piuttosto che un deficit isolato di un singolo comparto immunitario.

Nonostante gli effetti immunosoppressori dei PFAS più studiati, come PFOS e PFOA, siano ad oggi ben documentati sia in ambito epidemiologico che sperimentale, la natura del meccanismo d'azione alla base di tale soppressione resta ancora incerta. Infatti non è stato identificato un meccanismo unificante: i PFAS sembrano agire su più livelli, interferendo con le cellule B e T, i macrofagi, le vie di segnalazione intracellulari e il metabolismo lipidico. Inoltre, la variabilità tra i diversi composti rende difficile selezionare un meccanismo

chiave per tutti: alcuni PFAS attivano i recettori nucleari PPAR α , altri modulano il recettore dei glucocorticoidi (GR), altri ancora inducono stress ossidativo. Ad oggi, i meccanismi più consolidati riguardano l'alterazione delle vie di segnalazione immunitaria (NF- κ B, MAPK), l'attivazione di PPAR α , la generazione di specie reattive dell'ossigeno e l'interferenza con l'asse ormonale, che insieme delineano un quadro complesso e multifattoriale dell'immunotossicità da PFAS.

Il sistema immunitario innato rappresenta uno dei bersagli molecolari dei PFAS. I macrofagi, che orchestrano fagocitosi, presentazione dell'antigene e regolazione delle risposte infiammatorie, risultano particolarmente sensibili. Diversi PFAS possono comprometterne la funzione, riducendo la capacità fagocitaria e alterando la produzione di citochine chiave. Un punto critico è la modulazione dei *Toll-like receptor* (TLR); infatti, la segnalazione TLR/MyD88, fondamentale per l'attivazione dell'immunità innata, può venire sia iperattivata sia desensibilizzata in seguito all'esposizione ai PFAS. In alcuni modelli, PFOS ha indotto un'attivazione eccessiva della via TLR4/MyD88/NF- κ B con aumento di citochine proinfiammatorie, mentre in esposizioni croniche a basse dosi si è osservata una riduzione della risposta TLR-dipendente. Questa dualità riflette l'interferenza dei PFAS con i processi metabolici che sostengono la plasticità dei macrofagi e si collega al concetto di "*trained immunity*" alterata, ovvero una memoria funzionale anomala impressa alle cellule mieloidi generata da modificazioni epigenetiche e metaboliche avvenute in seguito all'esposizione a questa classe di sostanze.

Tra i meccanismi più rilevanti, l'attivazione dei recettori nucleari PPAR riveste un ruolo centrale. PFOS, PFOA e altri PFAS attivano soprattutto PPAR α , influenzando il

metabolismo lipidico e l'espressione di geni infiammatori. PPAR α regola l'ossidazione degli acidi grassi e la risoluzione dell'infiammazione; la sua iperattivazione può alterare l'equilibrio tra fase proinfiammatoria e ritorno all'omeostasi. Inoltre, PPAR α interagisce con NF- κ B tramite meccanismi di transrepressione, modulando la risposta infiammatoria e contribuendo a immunosoppressione cronica. L'interferenza con i percorsi lipidici intracellulari modifica anche la struttura delle membrane e dei microdomini lipidici, influenzando direttamente la soglia di attivazione delle cellule immunitarie.

Un ulteriore asse meccanicistico chiave è lo stress ossidativo. PFOA, PFOS e altri PFAS sono in grado di indurre un aumento di specie reattive dell'ossigeno (ROS), con danno mitocondriale, alterazione degli enzimi antiossidanti e attivazione di vie di morte cellulare. Le cellule immunitarie sono particolarmente vulnerabili: nei linfociti umani PFOS ha provocato depolarizzazione del potenziale mitocondriale, perossidazione lipidica e attivazione delle caspasi. Effetti simili sono stati osservati in altri tipi cellulari e con PFAS diversi, con intensità crescente in relazione alla lunghezza della catena perfluoroalchilica. L'aumento di ROS e la compromissione delle difese antiossidanti contribuiscono sia alla ridotta produzione di anticorpi, sia a uno stato infiammatorio cronico di basso grado, con possibile coinvolgimento dell'inflammasoma.

I PFAS, agendo come interferenti endocrini, possono interferire anche con il recettore dei glucocorticoidi (GR), che regola fisiologicamente la risposta allo stress e l'immunità. Alcuni studi hanno mostrato che PFOS e PFOA alterano l'espressione del GR e ne riducono la funzionalità, con conseguente peggioramento della regolazione infiammatoria. Tuttavia, in alcuni modelli

la soppressione della risposta anticorpale indotta dai PFAS non è risultata dipendere direttamente dal recettore, suggerendo che esso possa modulare, ma non sempre mediare, l'immunosoppressione. In sintesi, l'interferenza con il GR rappresenta un meccanismo aggiuntivo, ma non univoco, che si integra con gli altri *pathway* immunitari.

Oltre agli effetti funzionali, l'esposizione ai PFAS induce modificazioni strutturali negli organi linfoidi. Nei modelli murini sono stati descritti atrofia del timo, riduzione delle cellule T *naïve*, diminuzione del peso della milza, alterazioni dei follicoli linfoidi e ipocellularità del midollo osseo. Questi effetti indicano un'interferenza con la linfopoiesi e con la capacità di generare nuove cellule immunitarie.

Dal punto di vista dei biomarcatori, la misurazione dei PFAS nel siero rappresenta oggi lo strumento principale per valutare l'esposizione, grazie alla lunga emivita e alla stabilità delle concentrazioni plasmatiche. Tuttavia, negli ultimi anni l'attenzione della ricerca si è progressivamente spostata verso i biomarcatori di effetto, che consentono di caratterizzare in modo più diretto l'impatto dei PFAS sul sistema immunitario. Tra questi, la risposta anticorpale post-vaccinale rappresenta uno dei parametri più robusti, standardizzati e clinicamente rilevanti, poiché diversi studi hanno dimostrato una riduzione significativa dei titoli anticorpali in soggetti esposti, con implicazioni dirette sull'efficacia vaccinale e sulla protezione immunitaria a lungo termine. Accanto alla risposta anticorpale, la quantificazione delle citochine plasmatiche (in particolare IL-6, TNF- α e IFN- γ) e l'analisi delle sottopopolazioni linfocitarie (cellule T CD4+, CD8+ e cellule B) offrono ulteriori informazioni sulla natura delle alterazioni immunitarie indotte dai PFAS, evidenziando spesso una riduzione della

funzionalità effettrice e una modulazione delle vie infiammatorie. Parallelamente, le modifiche epigenetiche e metaboliche, comprendenti modificazioni della metilazione del DNA, variazioni degli istoni e profili di microRNA, si stanno affermando come biomarcatori sensibili e precoci, capaci di rilevare alterazioni persistenti della regolazione immunitaria anche in popolazioni pediatriche e neonatali. Infine, i parametri clinici, come la frequenza e la severità delle infezioni respiratorie e virali, costituiscono indicatori complementari che confermano la rilevanza biologica dei biomarcatori immunologici e ne rafforzano la validità traslazionale. L'integrazione di biomarcatori di esposizione (concentrazioni sieriche), di effetto (risposta anticorpale, profili citochinici, sottopopolazioni linfocitarie, firme epigenetiche) e di outcome clinico (infezioni ricorrenti) consente una valutazione più completa e multidimensionale del rischio immunitario associato ai PFAS, delineando un quadro coerente della loro azione come immunotossici sistemici.

References

1. Abraham, K., Mielke, H., Fromme, H., Völkel, W., Menzel, J., Peiser, M., Zepp, F., Willich, S. N., & Weikert, C. (2020). Internal exposure to perfluoroalkyl substances (PFASs) and biological markers in 101 healthy 1-year-old children: associations between levels of perfluorooctanoic acid (PFOA) and vaccine response. *Archives of toxicology*, 94(6), 2131-2147. <https://doi.org/10.1007/s00204-020-02715-4>.
2. Antoniou, E., Colnot, T., Zeegers, M., & Dekant, W. (2022). Immunomodulation and exposure to per- and polyfluoroalkyl substances: an overview of the current evidence from animal and human studies. *Archives of Toxicology*, 96(8), 2261-2285. <https://doi.org/10.1007/s00204-022-03303-4>.
3. Corsini E, Iulini M, Galbiati V, Maddalon A, Pappalardo F, Russo G, Hoogenboom R, Beekmann K, Janssen A, Louise J, Fragki S and Paini A, 2024. EFSA Project on the use of NAMs to explore the immunotoxicity of PFAS. EFSA supporting publication 2024: 21(8): EN-8926 146 pp. <https://doi.org/10.2903/sp.efsa.2024.EN-8926>.
4. Dalsager, L., Christensen, N., Husby, S., Kyhl, H., Nielsen, F., Høst, A., Grandjean, P., & Jensen, T. K. (2016). Association between prenatal exposure to perfluorinated compounds and symptoms of infections at age 1-4 years among 359 children in the Odense Child Cohort. *Environment international*, 96, 58-64. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2016.08.026>.
5. Dewitt, J. C., Copeland, C. B., Strynar, M. J., & Luebke, R. W. (2008). Perfluorooctanoic acid-induced immunomodulation in adult C57BL/6J or C57BL/6N female mice. *Environmental health perspectives*, 116(5), 644-650. <https://doi.org/10.1289/ehp.10896>.
6. DeWitt, J. C., Shnyra, A., Badr, M. Z., Loveless, S. E., Hoban, D., Frame, S. R., Cunard, R., Anderson, S. E., Meade, B. J., Peden-Adams, M. M., Luebke, R. W., & Luster, M. I. (2009). Immunotoxicity of perfluorooctanoic acid and perfluorooctane sulfonate and the role of peroxisome proliferator-activated receptor alpha. *Critical reviews in toxicology*, 39(1), 76-94. <https://doi.org/10.1080/10408440802209804>.
7. DeWitt, J. C., Peden-Adams, M. M., Keller, J. M., & Germolec, D. R. (2012). Immunotoxicity of perfluorinated compounds: recent developments. *Toxicologic pathology*, 40(2), 300-311. <https://doi.org/10.1177/0192623311428473>.
8. Dong, G. H., Zhang, Y. H., Zheng, L., Liu, W., Jin, Y. H., & He, Q. C. (2009). Chronic effects of perfluorooctanesulfonate exposure on immunotoxicity in adult male C57BL/6 mice. *Archives of toxicology*, 83(9), 805-815. <https://doi.org/10.1007/s00204-009-0424-0>.
9. Dong, G. H., Tung, K. Y., Tsai, C. H., Liu, M. M., Wang, D., Liu, W., Jin, Y. H., Hsieh, W. S., Lee, Y. L., & Chen, P. C. (2013). Serum polyfluoroalkyl concentrations, asthma outcomes, and immunological markers in a case-control study of Taiwanese children. *Environmental health perspectives*, 121(4), 507-513. <https://doi.org/10.1289/ehp.1205351>.
10. Ehrlich, V., Bil, W., Vandebriel, R., Granum, B., Luijten, M., Lindeman, B., Grandjean, P., Kaiser, A. M., Hauzenberger, I., Hartmann, C., Gundacker, C., & Uhl, M. (2023). Consideration of pathways for immunotoxicity of per- and polyfluoroalkyl substances (PFAS). *Environmental health: a global access science source*, 22(1), 19. <https://doi.org/10.1186/s12940-022-00958-5>.
11. EFSA Panel on Contaminants in the Food Chain (EFSA CONTAM Panel), Schrenk, D., Bignami, M., Bodin, L., Chipman, J. K., Del Mazo, J., Grasl-Kraupp, B., Hogstrand, C., Hoogenboom, L. R., Leblanc, J. C., Nebbia, C. S., Nielsen, E., Ntzani, E., Petersen, A., Sand, S., Vleminckx, C., Wallace, H., Barregård, L., Ceccatelli, S., Cravedi, J. P., Schwerdtle, T. (2020). Risk to human health related to the presence of perfluoroalkyl

- substances in food. *EFSA journal. European Food Safety Authority*, 18(9), e06223. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2020.6223>.
12. Grandjean, P., Andersen, E. W., Budtz-Jørgensen, E., Nielsen, F., Mølbak, K. R., Weihe, P., & Heilmann, C. (2012). Serum vaccine antibody concentrations in children exposed to perfluorinated compounds. *JAMA*, 307(4). <https://doi.org/10.1001/jama.2011.2034>.
 13. Grandjean, P., Timmermann, C. A. G., Kruse, M., Nielsen, F., Vinholt, P. J., Boding, L., Heilmann, C., & Mølbak, K. (2020). Severity of COVID-19 at elevated exposure to perfluorinated alkylates. *medRxiv: the preprint server for health sciences*, 2020.10.22.20217562. <https://doi.org/10.1101/2020.10.22.20217562>.
 14. Granum, B., Haug, L. S., Namork, E., Stølevik, S. B., Thomsen, C., Aaberge, I. S., van Loveren, H., Løvik, M., & Nygaard, U. C. (2013). Pre-natal exposure to perfluoroalkyl substances may be associated with altered vaccine antibody levels and immune-related health outcomes in early childhood. *Journal of immunotoxicology*, 10(4), 373–379. <https://doi.org/10.3109/1547691X.2012.755580>.
 15. Iulini, M., Bettinsoli, V., Maddalon, A., Galbiati, V., Janssen, A. W. F., Beekmann, K., Russo, G., Pappalardo, F., Fragki, S., Paini, A., & Corsini, E. (2025a). In vitro approaches to investigate the effect of chemicals on antibody production: the case study of PFASs. *Archives of toxicology*, 99(5), 2075–2086. <https://doi.org/10.1007/s00204-025-03993-6>.
 16. 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 Sciences*, 104(1), 144–154. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfn059>.
 17. Qiu, J., Huo, X., Dai, Y., Huang, Y., & Xu, X. (2025). Potential effects of PFAS exposure on trained immunity: From mechanisms to health risks. *Ecotoxicology and environmental safety*, 302, 118757. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2025.118757>.
 18. U.S. Environmental Protection Agency (EPA). (2022). Interim updated drinking water health advisories for PFOA and PFOS. U.S. EPA. <https://www.epa.gov/sdwa/historical-pfoa-and-pfos-health-effects-science-documents>.
 19. Timmermann, C. A., Budtz-Jørgensen, E., Jensen, T. K., Osuna, C. E., Petersen, M. S., Steuerwald, U., Nielsen, F., Poulsen, L. K., Weihe, P., & Grandjean, P. (2017). Association between perfluoroalkyl substance exposure and asthma and allergic disease in children as modified by MMR vaccination. *Journal of immunotoxicology*, 14(1), 39–49. <https://doi.org/10.1080/1547691X.2016.1254306>.
 20. Timmermann, C. A. G., Jensen, K. J., Nielsen, F., Budtz-Jørgensen, E., van der Klis, F., Benn, C. S., Grandjean, P., & Fisker, A. B. (2020). Serum Perfluoroalkyl Substances, Vaccine Responses, and Morbidity in a Cohort of Guinea-Bissau Children. *Environmental health perspectives*, 128(8), 87002. <https://doi.org/10.1289/EHP6517>.
 21. Wang, Z., Cousins, I. T., Scheringer, M., & Hungerbühler, K. (2013). Fluorinated alternatives to long-chain perfluoroalkyl carboxylic acids (PFCAs), perfluoroalkane sulfonic acids (PFSA) and their potential precursors. *Environment international*, 60, 242–248. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2013.08.021>.
 22. Wang, Z., Shi, R., Ding, G., Yao, Q., Pan, C., Gao, Y., & Tian, Y. (2022). Association between maternal serum concentration of perfluoroalkyl substances (PFASs) at delivery and acute infectious diseases in infancy. *Chemosphere*, 289, 133235. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2021.133235>.
 23. Wang, Z., DeWitt, J. C., Higgins, C. P., & Cousins, I. T. (2017). A Never-Ending Story of Per- and Polyfluoroalkyl Substances (PFASs)? *Environmental science & technology*, 51(5), 2508–2518. <https://doi.org/10.1021/acs.est.6b04806>.
 24. Wang, C., Magnuson, J. T., Zheng, C., & Qiu, W. (2025). Incidence of pollution, bioaccumulation, biomagnification, and toxic effects of per- and polyfluoroalkyl substances (PFAS) in aquatic ecosystems: A review. *Aquatic toxicology (Amsterdam, Netherlands)*, 286, 107469. Advance online publication. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2025.107469>.