



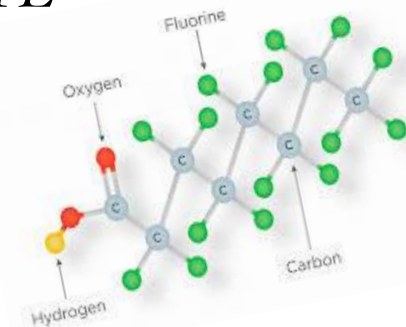
UNIVERSITA' POLITECNICA DELLE MARCHE

DIPARTIMENTO DI SCIENZE DELLA VITA E DELL'AMBIENTE

CORSO DI LAUREA IN:
SCIENZE BIOLOGICHE

TITOLO TESI:

***«LEGACY PFAS VS NEXT GENERATION PFAS: VALUTAZIONE DELLA TOSSICITA
ATTRAVERSO L' ANALISI DEL METABOLOMA»***



«Comparative toxicometabolomics of perfluorooctanoic acid (PFOA) and next-generation perfluoroalkyl substances.»

TESI DI LAUREA DI:
Roberta Maggetti

DOCENTE REFERENTE:
Chia.ma
Francesca Maradonna

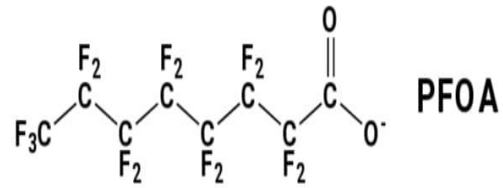
Sessione: Febbraio 2021
Anno accademico: 2019/2020

INTRODUZIONE

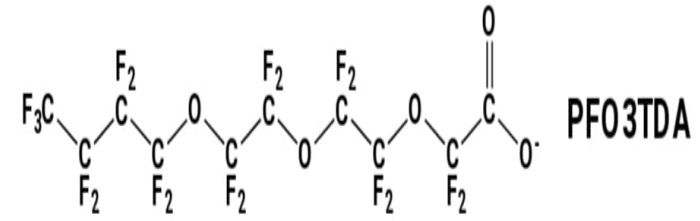
Soggetti dello studio:

PFAS=PolyfFuoronicAlkyl Substance

«legacy» PFAS



PFECA(PerFluorEther Carboxylic Acids)

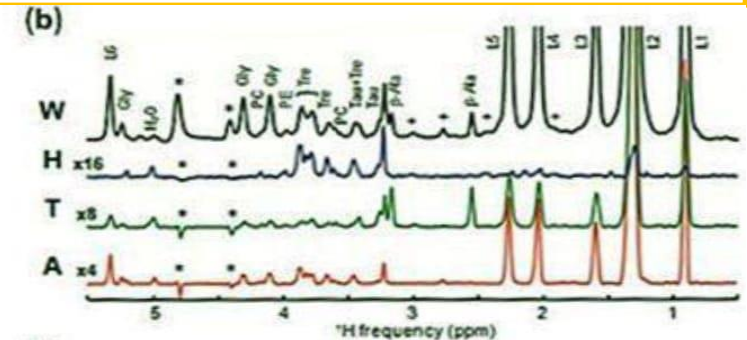
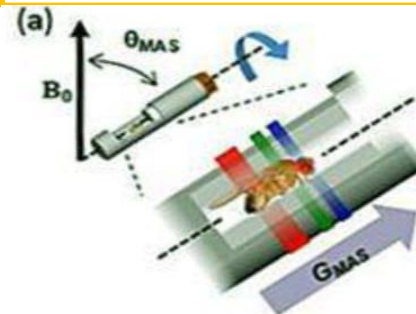


Modello:
Zebrafish



Tecniche: HR-MAS NMR Spettroscopia

Utilizzato per effettuare il profilo metabolico di embrioni intatti!



SCOPO DELLO STUDIO

Valutare la tossicità di alcuni dei più rappresentativi PFAS di nuova generazione (PFCECA) attraverso un confronto con i «legacy» PFAS e costruire un modello metabolico per spiegarne le tossicità attraverso lo studio del metaboloma di embrioni di zebrafish esposti a PFAS

MATERIALI E METODI

TOSSICITÀ PFECA E PFOA NEGLI EMBRIONI DI ZEBRAFISH

Composti testati: PFECA (PFMOBA, PFO₃TDA, PFO₃DA, GenX, PFO₂H_pA, PFDMMOBA PFO₂DA) e «legacy» PFAS (PFOA)

SAGGIO DI TOSSICITÀ:

1) gli embrioni 4 hpf sono stati esposti a serie di concentrazioni

PFOMOBA, GENX, PFO ₂ HPA, PFO ₃ DA, PFOA	25, 50, 75, 100, 150, 200 ppm
PFOMMBA	100, 150, 200, 250, 300 ppm
PFO ₂ A	5, 10, 50, 75, 100 ppm
PFO ₃ TDA	1, 5, 10, 20, 30, 40 ppm

2) la tossicità è stata rilevata per 4 timepoint rilevanti per lo sviluppo: 1, 2, 5, 7 dpf di esposizione continua

PARAMENTI RILEVATI

- 1) Letalità/Mortalità → LC₅₀
- 2) Deformità morfologiche → micrografia leggera
- 3) Inibizione dello sviluppo → IOD (interocular distance)
- 4) Disfunzioni comportamentali → % listing

PROFILO METABOLICO DEGLI EMBRIONI ESPOSTI A PFAS

Composti testati: PFOA, GENX, PFO₃TDA

HR-MAS NMR ALAISIS:

LC₅₀: PFO₃TDA > PFOA > GENX
CONCENTRAZIONI: PFOA 50 ppm,
GENX 100 ppm, PFO₃TDA 10 ppm
ESPOSIZIONE: 72 to 96 hpf

METABOLITI ANALIZZATI:

appartengono a 4 classi:

- 1) Indicatori di epatotossicità
- 2) Neurotrasmettitori
- 3) Associati con stress ossidativo
- 4) Correlati con metabolismo di carboidrati, lipidi e aa (energetica cellulare)

RISULTATI E DISCUSSIONI: TOSSICITÀ

LC50 : la concentrazione letale media per i PFECA è uguale a quella riportata per i PFAS (10 e 10² μM)

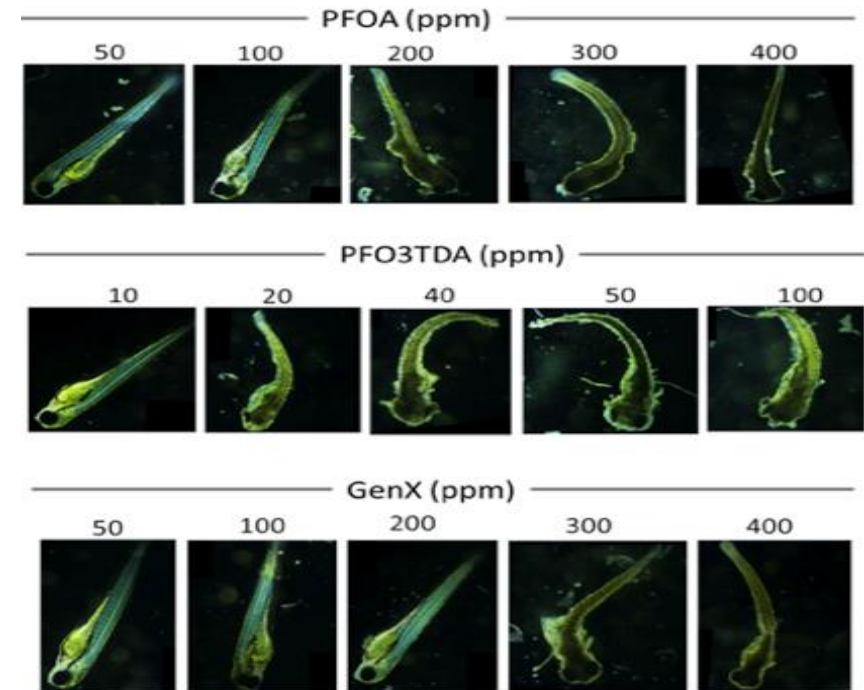
DEFORMITÀ MORFOLOGICHE:

1) Gli embrioni esposti per 24 h a 72hpf presentano malformazioni della testa, piegamento della parte alta del corpo e della coda e desquamazione del derma

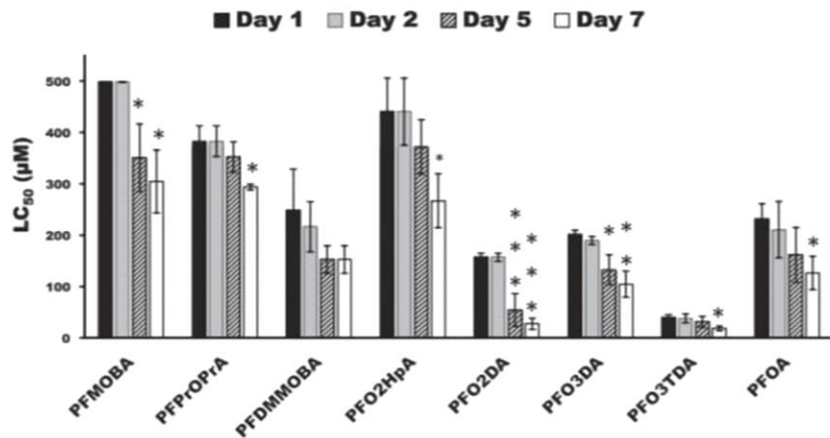
2) Il 7% delle deformità si osserva a e sopra 300 ppm per PFOA e GENX

Per PFO3TDA le deformità dell'embrione sono al 7% per gli embrioni a 40 e 50 ppm e 10% a 100ppm

	Alkyl Chain		LC ₅₀ (μM) ± 95% CI
	-CF _x -	-O-	
PFECA			
PFMOBA	5	1	499 ± 0.0
GenX	5	1	383 ± 30
PFDMMOBA	6	1	248 ± 81
PFO2HpA	4	2	441 ± 66
PFO2DA	7	2	157 ± 8
PFO3DA	6	3	202 ± 8
PFO3TDA	9	2	38 ± 6
PFOA	7	0	232 ± 29

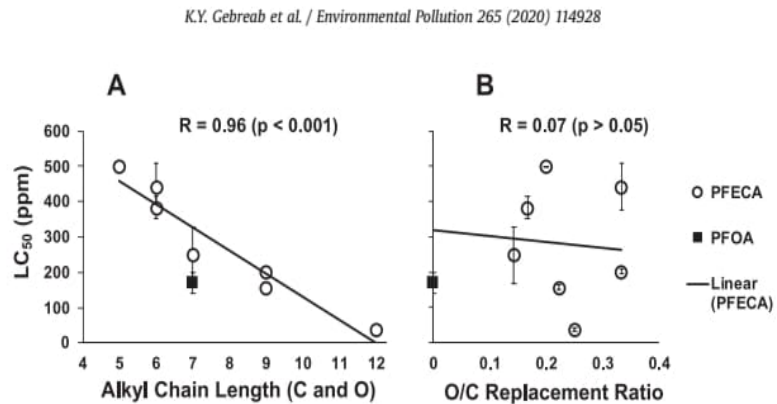


RISULTATI E DISCUSSIONI: TOSSICITÀ



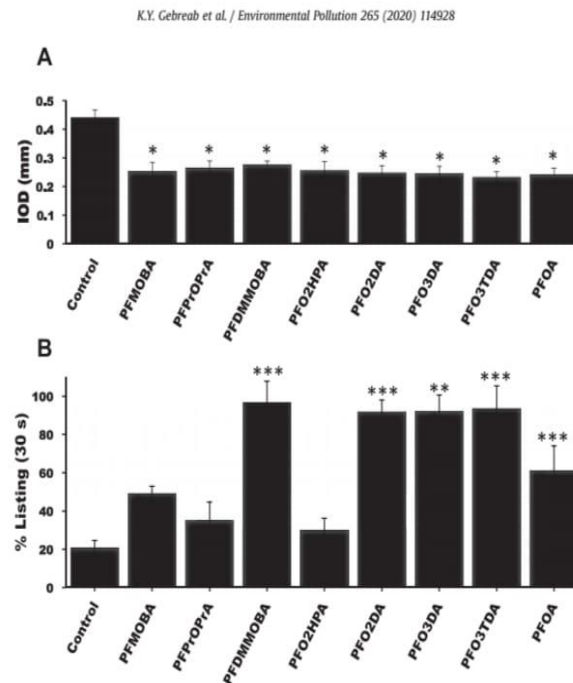
MORTALITÀ EMBRIONALE:

- 1) Aumenta per tutti i PFECA e PFOA dopo 7 giorni continui di esposizione.
- 2) La LC50 decresce tra il 1 e 7dpf per 6 PFECA



EMBRIOTOXICITY:

- 1) Correlata con la lunghezza della catena
- 2) Non correlata con il grado di sostituzione di-CF₂-



INIBIZIONE DELLO SVILUPPO:

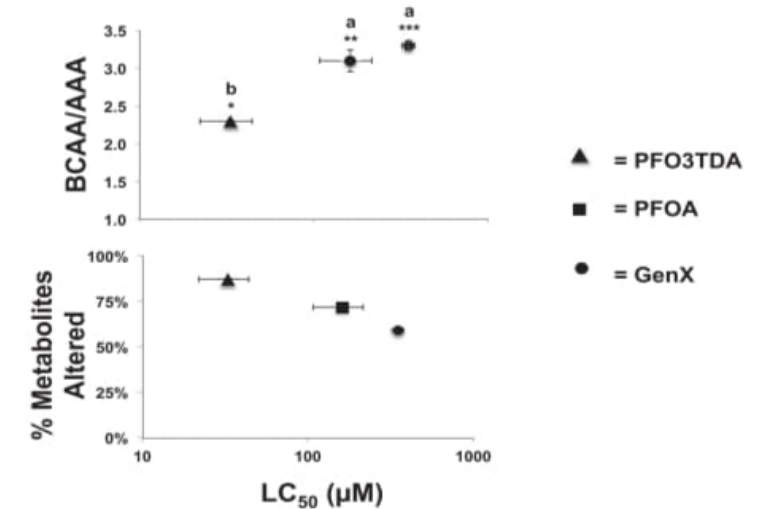
- 1) IOD ridotto per tutti i PFAS

DISFUNZIONI COMPORTAMENTALI:

- 1) 5 dei 7 PFECA e il PFOA incrementano in maniera significativa la percentuale di listing

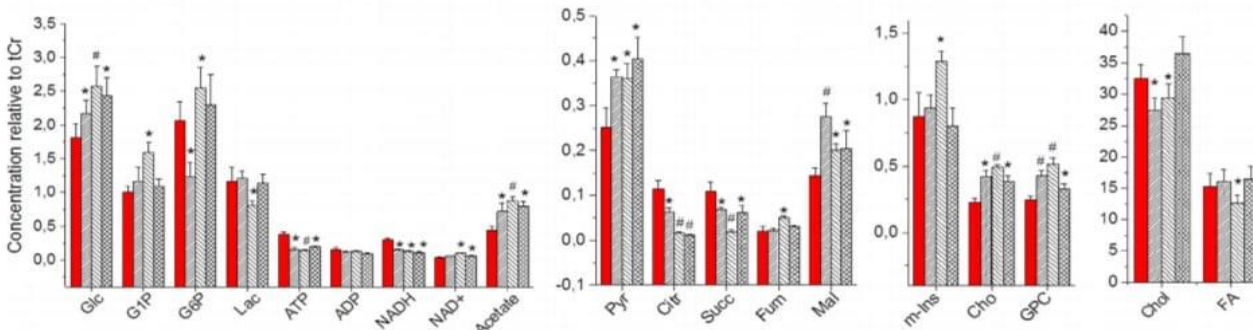
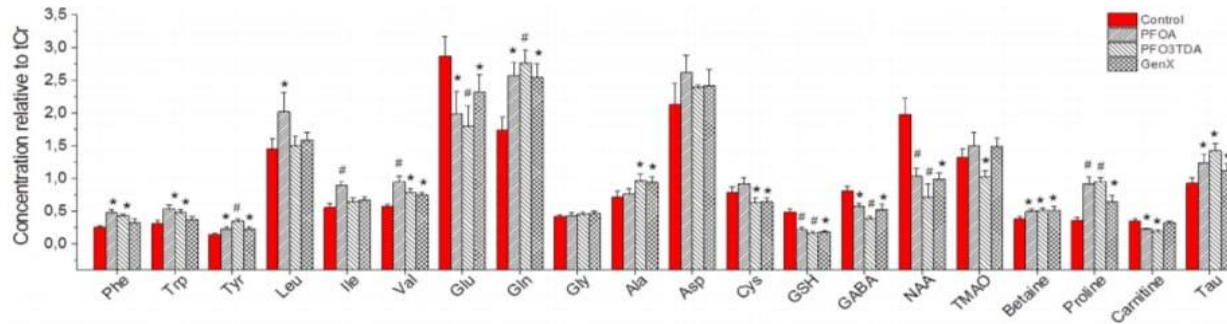
RISULTATI E DISCUSSIONI: *PROFILO METABOLICO*

- SIGNIFICATIVA ALTERAZIONE DI 33 METABOLITI PER UNO O PIU PFAS VALUTATI
- LA PERCENTUALE DEI METABOLITI ALTERATI E' CORRELATA AL LC50
- I PFAS COLPISCONO SOPRATTUTTO IL **FEGATO** (BCAA/AAA TMAO, GSH)



K.Y. Gebreab et al. / Environmental Pollution 265 (2020) 114928

7



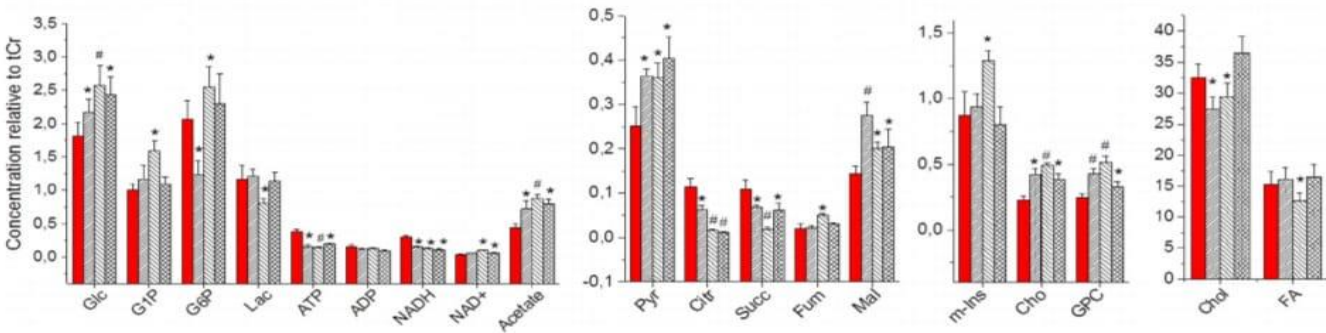
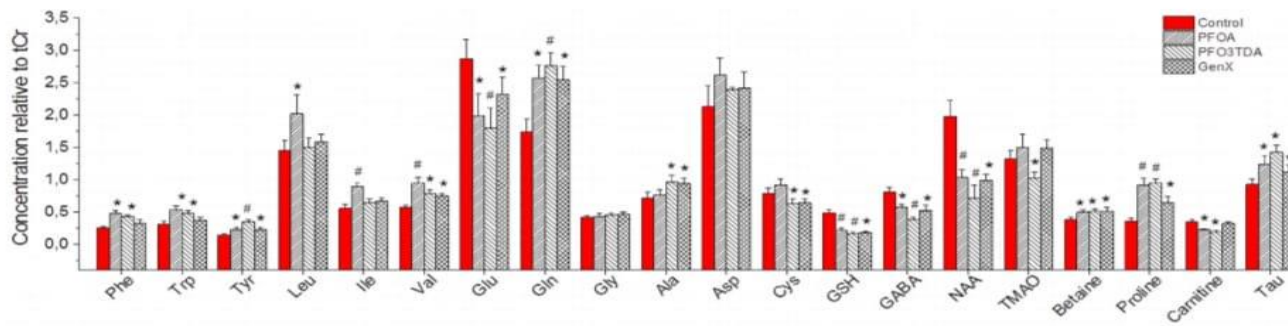
FEGATO:

↑ **TMAO**: indicatore di epatotossicità
Indicatore di sindromi metaboliche

↓ **GSH**: correlato con epatotossicità (Phase II)
Stress ossidativo

CNS:

↓ **GLU E GABA**
 ↓ **NAA**
 Gln/Glu ↑
 (glutammato/glutamine cycle)



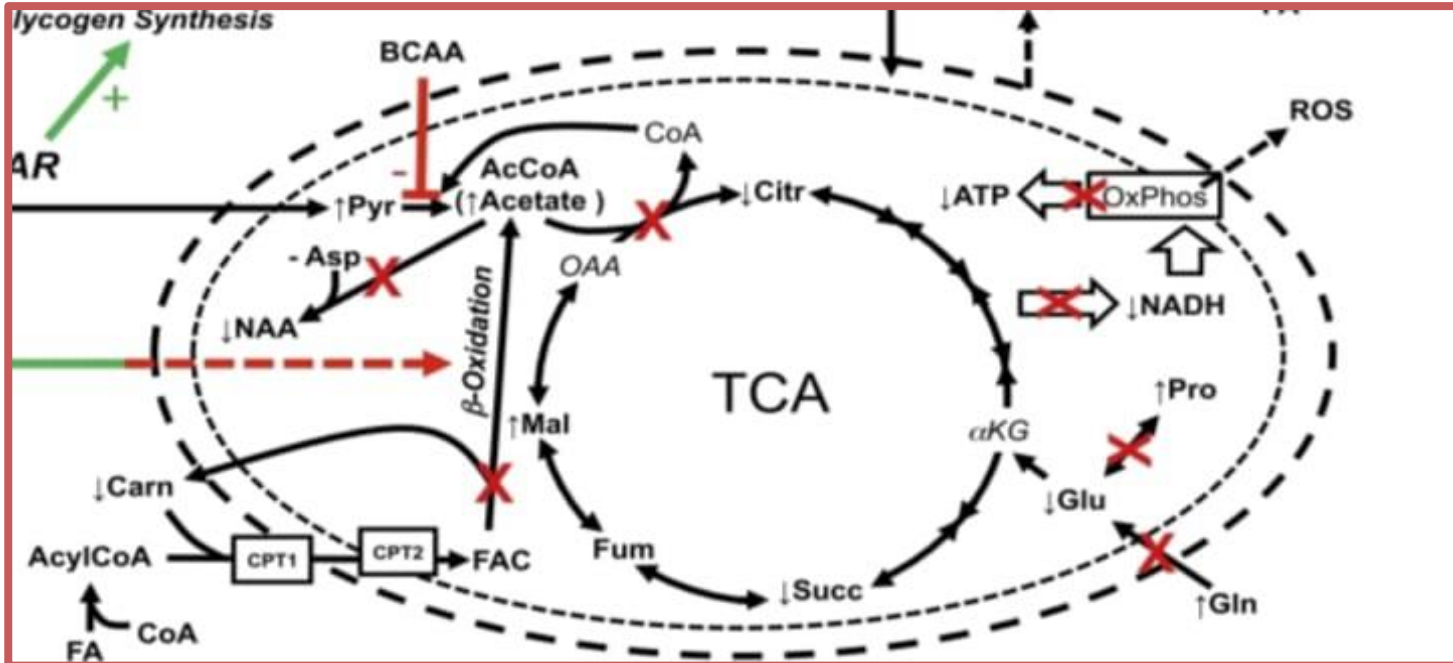
RISULTATI E DISCUSSIONI: DISTRUZIONE MITOCONDRI:

IL **PROFILO METABOLICO** → HA PERMESSO DI ELABORARE UN MODELLO DELLE VIE METABOLICHE ASSOCIATE ALLA TOSSICITÀ DEI PFAS

A livello subcellulare i PFAS hanno 2 target:

DISTRUZIONE MITOCONDRI

ATTIVAZIONE PPAR



DISTRUZIONE MITOCONDRI
MEMBRANA: CHO, GPC, m-Ins ↑
TCA: Citrato, succinato ↓ Malato ↑
 Gln ↑ Glu ↓
β OSSIDAZIONE: Carnitina ↓
STRESS OSSIDATIVO: ROS ↑

CONCLUSIONI

→ QUESTO STUDIO CONFERMA CHE LA TOSSICITÀ DEI PFECA É QUANTITATIVAMENTE E QUALITATIVAMENTE SIMILE ALLA TOSSICITÀ DEI PFAS PER GLI EMBRIONI DI ZEBRAFISH

→ C'E' UNA CONNESSIONE TRA PFAS ED EPATOTOSSICITÀ, NEUROTOSSICITÀ E SINDROMI METABOLICHE DOVUTE ALLA DISTRUZIONE DEL MITOCONDRIO E L'ATTIVAZIONE DEI PPAR



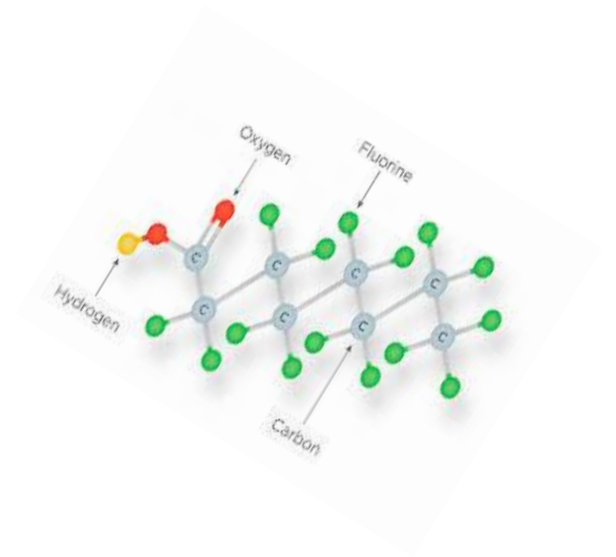
**I NEXT GENERATION PFAS SONO
DA CONSIDERARSI UGUALMENTE
TOSSICI PER GLI ORGANISMI E PER
L'AMBIENTE**

BIBLIOGRAFIA:

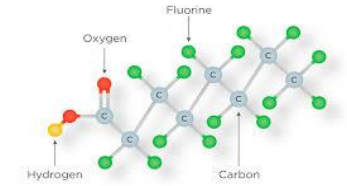
Kiflom Y. Gebreab, Muhamed N.H. Eeza, Tianyu Bai, Zain Zuberi, Jorg Matysik , Kevin E. O'Shea, A. Alia, John P. Berry.

Comparative toxicometabolomics of perfluorooctanoic acid (PFOA) and next-generation perfluoroalkyl substances.

Environmental Pollution



RIASSUNTO



Grazie all'attenzione verso la salute ambientale un numero elevato di PFAS sono stati eliminati e sostituiti con analoghi chimici (PFECA) la quale tossicità e salute ambientale non è ancora stata studiata.

In questo studio è stato usato l'embrione di zebrafish come modello tossicologico per indagare la tossicità dei PFECA più rappresentativi a fianco del PFOA, uno dei più studiati e usati PFAS. Inoltre il HR-MAS NMR è stato utilizzato per il profilo metabolico di embrioni intatti di zebrafish al fine di caratterizzare le vie metaboliche associate con la tossicità dei PFAS.

La letalità, sviluppo ridotto e comportamenti locomotori alterati sono stati osservati per tutti i PFAS testati.

L' LC50 è correlata con la lunghezza della catena e la concentrazione tossica è qualitativamente simile per PFAS e PFECA.

Il profilo metabolico degli embrioni, esposti a 3 PFAS selezionati (PFOA, GENX, PFO3TDA), hanno permesso la creazione di un modello delle vie metaboliche associate con la tossicità dei PFAS. Le alterazioni dei metaboliti suggeriscono che i PFAS alterino l'attività dei PPAR (coinvolti in molte vie metaboliche) e in concomitanza promuovono la distruzione dei mitocondri con conseguente disfunzione del metabolismo dei carboidrati, lipidi e aa e un contributo dei PFAS nella sindromi metaboliche.

Si conclude che la tossicità dei PFECA è qualitativamente e quantitativamente simile a quella dei PFAS, pertanto anch'essi sono da considerarsi pericolosi per l'ambiente e per l'uomo