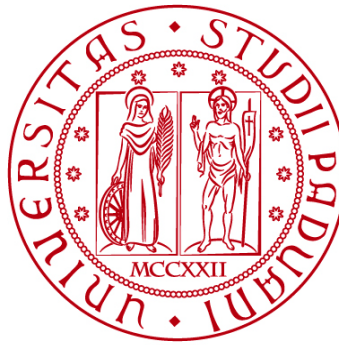


UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA

DIPARTIMENTO DI BIOLOGIA

Corso di Laurea in Biotecnologie



ELABORATO DI LAUREA

**APPROCCI IN VITRO ED IN VIVO PER LO STUDIO
DELLA NEUROTOSSICITÀ DEI PFAS NELLE
PRIME FASI DELLO SVILUPPO**

**Tutor: Prof.ssa Marianna Pauletto
Dipartimento di Biomedicina Comparata e Alimentazione**

Laureanda: Giulia Scaranaro

ANNO ACCADEMICO 2024/2025

SOMMARIO

ABSTRACT	1
CAPITOLO 1: Introduzione	3
1.1 PFAS: definizione e classificazione	3
1.2 Fonti di esposizione.....	3
1.2.1 Esposizione ambientale.....	4
1.2.2 Dispositivi medici	4
1.3 Tossicocinetica	5
1.4 Tossicodinamica	5
1.4.1 Effetti più comuni.....	5
1.4.2 Effetti in gravidanza	5
1.4.2.1 Esposizione e trasferimento placentare	5
1.4.2.2 Conseguenze per la madre	6
1.4.2.3 Conseguenze per il feto	7
1.4.3 Neurotossicità dello sviluppo.....	7
1.4.3.1 Blood Brain Barrier (BBB).....	7
1.4.3.2 Neurotrasmettitori.....	8
1.4.3.3 Asse brain-gut.....	8
1.4.3.4 Infiammazione: Stress ossidativo	8
1.4.4 Sviluppo di ADHD e Disordine dello Spettro Autistico (ASD).....	9
CAPITOLO 2: Analisi articolo “Developmental neurotoxicity of PFOA exposure on hiPSC-derived cortical neurons” (Shichen Wu et al., 2024)	10
2.1 Obiettivi dello studio.....	10
2.2 Materiali e metodi.....	10
2.3 Risultati ottenuti.....	11
2.3.1 Alterazioni morfologiche	11
2.3.2 Alterazione dell’attività neuronale indotta da esposizione a PFOA in fase di pre-differenziamento	12
2.3.3 Cambiamenti del trascrittoma associati a tauopatia e Alzheimer	12
2.3.4 Induzione di tauopatia con esclusione di patologie legate ad A β	13
2.3.5 Alterazione dell’omeostasi lipidica	13
2.3.6 Disregolazione della traduzione dell’RNA	13
2.4 Discussione	14
CAPITOLO 3: Analisi articolo “Effects of developmental exposure to individual and combined PFAS on development and behavioral stress responses in larval zebrafish” (Mohamed Hamed et al., 2024).....	15
3.1 Obiettivi dello studio.....	15
3.2 Materiali e metodi.....	15
3.3 Risultati ottenuti.....	16
3.3.1 Difetti nello sviluppo e mortalità.....	16
3.3.2 Crescita delle larve.....	16

3.3.3 Attività basale delle larve.....	17
3.3.4 Risposte comportamentali	18
3.3.4.1 A stimoli acustici.....	18
3.3.4.2 A stimoli visivi.....	18
3.4 <i>Discussione</i>	18
<i>CAPITOLO 4: Conclusioni</i>	20
<i>BIBLIOGRAFIA</i>	22

ABSTRACT

Oggetto di studio di questo elaborato di tesi sono i PFAS, composti chimici di sintesi ampiamente usati in molti processi industriali, spesso rilevati nell'ambiente e nei cibi, e noti per la loro rilevante tossicità. Dopo un'iniziale panoramica sulle loro caratteristiche peculiari (e.g., struttura chimica, proprietà ed effetti tossici generali), la tesi si concentra sulla potenziale neurotossicità indotta da alcuni PFAS nel corso delle prime fasi di sviluppo del sistema nervoso centrale. In particolare, il presente elaborato si focalizza su due possibili approcci sperimentali utili allo studio di questo fenomeno: uno *in vitro*, che vede l'impiego di neuroni corticali derivati da cellule staminali umane pluripotenti indotte (hiPSC), ed uno *in vivo*, usando larve di Zebrafish. Due pubblicazioni vengono quindi sintetizzate e discusse: la prima si focalizza sullo studio degli effetti tossici di un PFAS a catena lunga (PFOA) a carico di cellule hiPSC in fase di differenziamento; la seconda sugli effetti neurotossici di PFAS a corta e lunga catena (PFOA, PFOS, PFHxA, PFHxS) nelle prime fasi di sviluppo embrionale di Zebrafish. Le conclusioni desunte dai due articoli scientifici confermano una correlazione tra l'esposizione a questi inquinanti e lo sviluppo di patologie a livello neurologico.

CAPITOLO 1: Introduzione

1.1 PFAS: definizione e classificazione

Le sostanze per- e polifluoroalchiliche (PFAS) sono una famiglia di composti chimici sintetici usati ampiamente in ambito industriale a partire dagli anni '40 del secolo scorso grazie alle loro notevoli proprietà di anti-aderenza, impermeabilità e oleo-repellenza. Essi sono contaminanti antropogenici che negli ultimi cinquanta anni hanno minacciato non solo l'ambiente, ma anche la salute umana. In quanto idrofobici e oleofobici, sono ottimi surfattanti e, per questo motivo, sono ritrovabili in un'ampia gamma di prodotti di uso quotidiano come padelle antiaderenti, alimenti, bustine del tè, acqua, cosmetici, creme, shampoo, tessuti impermeabili, tappeti, etc. (Briassoulis *et al.*, 2025). Altre applicazioni riguardano pesticidi, vernici, pitture, schiume anti-incendio, imballaggi degli alimenti, etc. (Ajana *et al.*, 2025).

Una prima definizione di questi composti li definisce come sostanze alifatiche fluorurate contenenti uno o più atomi di carbonio sui quali idrogeni alifatici possono essere sostituiti parzialmente oppure totalmente da atomi di fluoro. Dal 2018, sono stati però definiti come sostanze che contengono $-C_nF_{2n+1}$ o $-C_nF_{2n}$ ($n \geq 1$). Successivamente, la classificazione li divide in “non polimeri” e “polimeri”. I “non polimeri” sono sostanze per- e polifluorate, tra le quali le polifluorate possiedono un gruppo polare idrofilo come quello carbossilato (COO^-), che è la forma anionica del gruppo carbossilico $COOH$, quello solfonato (SO_3^-) o quello fosfato (OPO_3^-), principalmente legati alla catena carboniosa idrofobica.

Al contrario, i “polimeri” sono composti ad elevato peso molecolare suddivisi in fluoropolimeri, polimeri con catene laterali fluorurate e perfluoropolieteri, i quali non sono biodisponibili e non si accumulano nell'ecosistema, in quanto insolubili in acqua e termicamente stabili. (Ajana *et al.*, 2025; Mišl'anová *et al.*, 2025)

La più comune ed utilizzata classificazione inquadra i diversi PFAS a seconda della lunghezza della loro catena carboniosa: un PFAS può essere un composto a catena lunga, con un numero di atomi di carbonio tra 7 e 13 o corta, con 7 o meno atomi (Mislanova *et al.*, 2025). In entrambi i casi, sono notevolmente resistenti alla biodegradazione e al metabolismo di organismi viventi, per esempio a processi di idrolisi, fotolisi, azione di basi o acidi. Tuttavia, i composti a catena corta mostrano generalmente una maggiore idrosolubilità rispetto a quelli a catena lunga, i quali tendenzialmente vengono bioaccumulati, in quanto si associano saldamente a proteine del sangue, come albumina sierica umana e globuline (Peixoto-Rodrigues *et al.*, 2024). Per questo motivo, i PFAS a lunga catena sono considerati i più rilevanti per la tossicità nell'uomo.

1.2 Fonti di esposizione

Un gran numero di studi ha permesso di capire quali siano le effettive fonti di esposizione ai PFAS negli individui adulti ed in età pediatrica. La contaminazione avviene principalmente attraverso l'ambiente naturale, in particolare suolo, acqua e

aria. In aggiunta, sono stati rilevati anche in ambiente intra ospedaliero (Briassoulis *et al.*, 2025).

1.2.1 Esposizione ambientale

I PFAS sono ubiquitari (Wang *et al.*, 2025). In particolare, sono presenti in elevate percentuali in aree prossime a zone industriali, dove le industrie producono questi composti chimici o li utilizzano per trattamenti e finissaggio di prodotti, rilasciando così materiali di scarto nelle acque reflue, costituendo la principale fonte di contaminazione per gli organismi viventi che popolano queste regioni. Infatti, la loro elevata solubilità e resistenza alle varie operazioni di purificazione permettono ai PFAS di raggiungere le fonti di acqua potabile. Per esempio, queste acque vengono prelevate e utilizzate per l'irrigazione, introducendo i PFAS nel suolo, contaminando non solo le coltivazioni, ma anche permette loro di raggiungere le falde acquifere.

Inoltre, la contaminazione può avvenire per via aerea tramite PFAS volatili presenti non solo nell'aria inquinata, ma anche nella polvere che si forma a seguito dell'utilizzo di prodotti trattati con questi composti (Briassoulis *et al.*, 2025).

Malgrado la vastità di vie di esposizione, il contatto con acqua potabile contaminata rimane la principale fonte di contaminazione, assieme ad alimenti e aria.

1.2.2 Dispositivi medici

Le proprietà fisicochimiche dei PFAS come stabilità termica e chimica, resistenza alla corrosione, biocompatibilità, basso attrito e proprietà di isolamento elettrico, hanno reso questi composti indispensabili nella produzione di numerosi strumenti diagnostici e terapeutici.

Le principali applicazioni riguardano:

- *Stent* e impianti ortopedici, con l'obiettivo di minimizzare la formazione di biofilm e infiammazioni tissutali silenti;
- Dispositivi a contatto con fluidi corporei e sangue, come tubi e cateteri, per i quali rimuovono potenziale capacità di emolisi e trombogenicità;
- Dispositivi chirurgici impiantabili, quali fili di sutura e innesti, per aumentare la resistenza e la biocompatibilità, camici e teli chirurgici, oltre a medicazioni di ferite, le quali di norma contengono rivestimenti fluorochimici per la riduzione del rischio di contaminazione;
- Imballaggio di dispositivi medici per il mantenimento di condizioni di sterilità;
- Reagenti, solventi e strumenti atti alla diagnostica in vitro.

Inoltre, alcuni studi hanno messo in luce un rischio allarmante causato dalla presenza di PFAS nei dispositivi e strumenti utilizzati in terapia intensiva neonatale e nel trattamento del paziente pediatrico. I suddetti studi hanno dimostrato il trasferimento di questi composti chimici dai componenti plastici e rivestimenti polimerici ai fluidi amministrati tramite via endovenosa o enterale. Questa via di esposizione rimane ancora poco indagata (Briassoulis *et al.*, 2025).

1.3 Tossicocinetica

Il trasporto, l'accumulo e la *clearance* metabolica dei PFAS dipendono in modo notevole dalla loro elevata affinità alle proteine presenti nell'organismo.

Come anticipato nel paragrafo 1.1, grazie alle catene carboniose fluorurate idrofobiche, questi composti tendono a formare legami forti con gli amminoacidi presenti nei bersagli molecolari, quali proteine del sangue, trasportatori di acidi grassi e di anioni organici. In aggiunta, i PFAS possono attraversare la barriera fosfolipidica.

La principale forma di eliminazione dei PFAS è la via urinaria, tuttavia troviamo anche *clearance* biliare ed escrezione fecale.

L'eliminazione di questi composti dipende anche dal sesso, poiché le donne hanno la possibilità di abbassare i livelli di PFAS tramite ciclo mestruale, gravidanze e allattamento. Nel primo caso in particolare, la perdita di sangue facilita l'eliminazione degli inquinanti. Inoltre, è importante sottolineare che il flusso mestruale abbondante, cicli mestruali irregolari, assunzione di contraccettivi orali e mestruazioni prolungate possono interferire con l'eliminazione dei PFAS. Per quanto riguarda il secondo ed il terzo caso, le gravidanze ed il conseguente allattamento possono sì aiutare con la *clearance*, ma contemporaneamente minacciare la salute ed il corretto sviluppo del neonato (Qu *et al.*, 2024).

1.4 Tossicodinamica

1.4.1 Effetti più comuni

Un individuo che è venuto a contatto con i PFAS non manifesta effetti visibili nell'immediato; è l'accumulo progressivo che può portare ad effetti a lungo termine e cronici. I più noti esempi di patologie che si possono sviluppare a parimenti tra donne e uomini sono infertilità, interferenze nella segnalazione ormonale steroidea, disregolazione lipidica e insulinica, innalzamento dei livelli di colesterolo, diabete mellito, cancro (ai testicoli, al seno, ai reni, al fegato), alterazioni immunologiche e tiroidee, ed effetti cardiovascolari.

Nei neonati e nei bambini, l'esposizione potrebbe determinare: ridotta crescita, sviluppo di *Attention Deficit Hyperactivity Disorder* (ADHD), ridotte capacità visuo-motorie, livelli inferiori di anticorpi contro parotite e rosolia, ridotte funzioni respiratorie, senza dimenticare le problematiche a livello neurologico (Mislanova *et al.*, 2025).

1.4.2 Effetti in gravidanza

Durante la gravidanza, la donna è più esposta a contrarre malattie e sviluppare patologie a lungo termine rispetto a donne non gestanti. Pertanto, la donna in gravidanza esposta a PFAS può presentare effetti tossici che interessano la sua salute, ma soprattutto quella del feto.

1.4.2.1 Esposizione e trasferimento placentare

La placenta è un organo fetale transiente ed è necessaria per il mantenimento, lo sviluppo e la salute del feto, dei suoi polmoni, intestino, fegato e reni. L'esposizione

ai PFAS può condurre alla diminuzione della funzionalità placentare, portando la donna a sviluppare preclampsia, una patologia cardiovascolare ipertensiva, risultante in morte della madre o ridotto peso fetale, morte prenatale o parto prematuro, e ipertensione, entrambi accertabili eseguendo le giuste analisi durante il primo e secondo trimestre, ovvero il periodo più favorevole per lo studio dell'assorbimento delle varie tipologie di PFAS, che varia a seconda della struttura chimica (Mislanova *et al.*, 2025; Ajana *et al.*, 2025).

Un recente studio condotto in Cina testimonia l'accumulo dei PFAS in placenta, siero materno e cordone ombelicale, dove sono stati rilevati circa 70 PFAS. Ciò che ha sorpreso gli studiosi è stato il contributo sempre crescente di 49 nuove tipologie di PFAS (*novel PFAS*) stimato al 90% nel siero materno, e nella placenta e nel cordone ombelicale esso aumenta fino al 96% (in Figura 1, vengono confrontate le concentrazioni di PFAS) (Bao *et al.*, 2022).

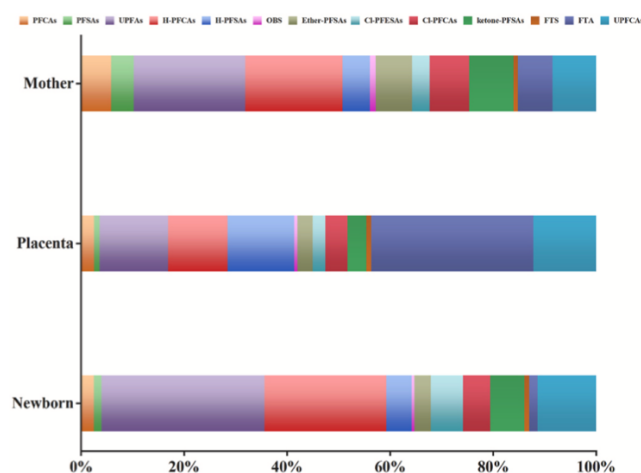


Figura 1- Assorbimento PFAS (Bao *et al.*, 2022)

1.4.2.2 Conseguenze per la madre

Come anticipato nel paragrafo 1.4.2.1, la madre potrebbe sviluppare preclampsia e ipertensione, le quali creano scompensi cardiaci a volte fatali. Inoltre, è stata dimostrata la comparsa di diabete, disfunzionalità lipidica e sviluppo di iperglicemia, ripercuotendosi quest'ultima nel feto, rendendolo più suscettibile all'assorbimento di PFAS (Briassoulis *et al.*, 2025).

Alcune conseguenze riguardano patologie renali, respiratorie ed epatiche. Inoltre, una disfunzionalità da non sottovalutare riguarda la tiroide, in quanto è stata osservata un'associazione tra l'esposizione a PFAS ed il possibile sviluppo di ipotiroidismo. Come evidenziato nell'articolo "*Health Impacts of Per- and Polyfluoroalkyl Substances (PFASs): A Comprehensive Review*" (Mislanova *et al.*, 2025), molti studi condotti sia in età compresa tra i 13 e i 17 anni che in gestanti hanno dimostrato un'associazione tra l'esposizione ad alcuni PFAS, in particolare PFOS, PFOA, PFNA e PFHxS, e i livelli bassi di tiroxina TF4 libera ed alti di TSH. Dunque, è importante monitorare questi parametri durante la gravidanza, in quanto livelli insufficienti di questi ormoni tiroidei possono condurre il feto a sviluppare paralisi cerebrale infantile, ovvero un insieme di disturbi che impediscono la fluidità del movimento e la postura in modo permanente.

1.4.2.3 Conseguenze per il feto

Il principale effetto della presenza di PFAS nel feto o neonato è il ridotto peso fetale e minor crescita post-natale dell'individuo. Possono inoltre emergere le seguenti problematiche:

- Disfunzionalità del sistema immunitario, che rendono il bambino più sensibile a determinati patogeni in maniera superiore alla normalità (vedi sezione 1.4.1), ridotta risposta anticorpale alla vaccinazione di routine e ridotta funzionalità dell'immunità adattativa e innata;
- Disfunzionalità endocrina, con conseguente pubertà e fertilità alterati;
- Cancerogenesi;
- Alterazioni del neurosviluppo e della salute mentale, con possibile manifestazione di ADHD, ridotti livelli cognitivi ed elevato rischio di depressione (potenzialmente causato da stress ossidativo e interruzione dei *pathway* di diversi neurotrasmettitori);
- Predisposizione ad obesità e cambiamenti nel metabolismo lipidico e glucidico;
- Alterazione della densità minerale ossea (Mislanova *et al.*, 2025).

1.4.3 Neurotossicità dello sviluppo

Il sistema nervoso e in particolare il cervello, per la sua alta vascolarizzazione e la natura lipofila, tendono ad assorbire sostanze chimiche come i PFAS, specialmente durante il primo periodo di crescita, causando nel lungo periodo modificazioni a livello cognitivo. La maggioranza di PFAS ritrovati in questi tessuti presenta più di otto atomi di carbonio, un maggiore rapporto tra atomi di carbonio-fluoro e di gruppi carbossilici.

Il cervello di un individuo adulto presenta due livelli di protezione: la barriera ematoencefalica (BBB) ed il fluido cerebrospinale, entrambi necessari per impedire l'entrata di sostanze estranee tossiche e patogene. Tuttavia, in feti e neonati, questi tessuti non sono ancora sviluppati pienamente e l'accumulo di PFAS può essere responsabile del malfunzionamento della BBB parallelamente ad un'alterazione dell'omeostasi del calcio sinaptico e dei neurotrasmettitori (e.g., acetilcolina e dopamina), causando stress ossidativo. Inoltre, si possono presentare delle conseguenti disfunzionalità nell'asse *brain-gut*, il quale collega condizioni di disbiosi intestinale allo sviluppo di patologie a livello neurologico.

Il meccanismo di neurotossicità non è stato pienamente compreso, tuttavia è stato notato un aumento di glutammato nell'ippocampo e di catecolammine nell'ipotalamo e, infine, una generale diminuzione di dopamina in tutte le aree cerebrali (Bharal *et al.*, 2024).

1.4.3.1 Blood Brain Barrier (BBB)

I PFAS potrebbero entrare nel cervello determinando una diminuzione della funzionalità delle *tight junctions* (TJs) interferendo con i trasportatori presenti nella BBB e generando infiammazione.

La principale via di infiammazione riguarda l'alterazione delle TJ, che permettono di sigillare tra loro le cellule endoteliali e mantenere la loro caratteristica permeabilità selettiva, che, però, viene a mancare a seguito di una down-regolazione delle TJs.

Inoltre, l'assorbimento può avvenire tramite diffusione passiva transmembrana o attiva grazie all'intervento di proteine come albumina o proteine leganti acidi grassi (FABPs). Alcuni esempi di trasportatori che si ipotizza favoriscano l'entrata dei PFAS nel cervello sono la P-glicoproteina (Pgp), la proteina di resistenza al cancro al seno (BCRP) e le proteine di resistenza multifarmaco (MRPs) (Bharal *et al.*, 2024).

1.4.3.2 Neurotrasmettitori

I neurotrasmettitori (NT) sono i messaggeri chimici che permettono la comunicazione neuronale, con effetto di eccitazione o inibizione. Studi precedenti hanno messo in evidenza come elevate quantità di PFAS nel neonato alterino i livelli di dopamina, serotonina e glutammato. La dopamina influenza il controllo motorio, l'umore e i comportamenti spinti dalla necessità di ricevere una ricompensa; la serotonina regola l'umore, l'appetito ed il sonno; infine il glutammato regola i livelli intracellulari di calcio, il cui eccesso può causare tossicità.

L'assorbimento di PFAS può ridurre i livelli di dopamina, causando ridotte capacità decisionali, disregolazioni emotive, e ridotto controllo motorio. Inoltre, l'influenza sulla serotonina può portare il bambino a non saper relazionarsi con altri individui, sviluppando meccanismi di aggressività e sintomi di depressione. Infine, se viene alterato il glutammato, i processi di apprendimento e di memoria possono variare (Bharal *et al.*, 2024).

1.4.3.3 Asse brain-gut

L'asse *brain-gut* rappresenta una comunicazione bidirezionale tra il microbiota intestinale e il sistema nervoso centrale. Condizioni di disbiosi possono quindi influenzare *pathway* neuronali, immunologici ed endocrini, risultando in infiammazioni croniche e disfunzioni nella risposta anticorpale.

Il microbiota produce triptofano ed il suo derivato 5-idrossitriptamina influenza notevolmente la regolazione emotiva, l'apprendimento e la memoria. Se la produzione di questo neurotrasmettitore viene a mancare, il rischio di comparsa di malattie neurodegenerative aumenta, in quanto processi infiammatori mediati da citochine possono aumentare la suscettibilità non solo ad Alzheimer e Parkinson, ma anche alla malattia di Huntington, alla sclerosi laterale amiotrofica (SLA), alla sclerosi multipla e ad altre patologie neurodegenerative (Bharal *et al.*, 2024).

1.4.3.4 Infiammazione: Stress ossidativo

La normale produzione di specie reattive dell'ossigeno (ROS) può non essere contrastata da meccanismi antiossidanti se i PFAS sono presenti nell'organismo. Ciò si spiega analizzando la qualità dell'attività dei mitocondri, i quali accumulano calcio intracellulare oppure non producono sufficiente ATP portando ad alterazione

della funzionalità della catena respiratoria mitocondriale e dei suoi complessi. Inoltre, vengono modificate le segnalazioni intraneuronali come l'attività ATPasica Na^+/K^+ , alterando l'omeostasi osmotica cellulare.

1.4.4 Sviluppo di ADHD e Disordine dello Spettro Autistico (ASD)

Il periodo fetale e neonatale rappresenta una finestra notevolmente delicata per lo sviluppo del sistema nervoso, in quanto la BBB dei bambini è immatura, tanto quanto il sistema immunitario. Pertanto, le fasi fetali e neonatali sono estremamente suscettibili a numerose sostanze chimiche, come i PFAS, i quali minacciano, quindi, un corretto neurosviluppo.

La review “*Relationship between PFAS and attention-deficit/hyperactivity disorder or autism spectrum disorder: Epidemiological and experimental evidence*” (K. Wu *et al.*, 2025) spiega la relazione tra l'assorbimento di PFOA, PFOS e PFHxS e la comparsa di ASD e ADHD, qui di seguito sintetizzata.

Il PFOA è il composto più ricorrente negli studi legati alla tossicità dei PFAS.

Numerosi casi-studio si sono concentrati sul legame tra la sua presenza in pazienti pediatriche e lo sviluppo di ASD e ADHD. Essi mostrano che l'esposizione a PFOA intorno agli anni 2 di età, può condurre a disturbo dello spettro autistico intorno all'età di 8 anni, oltre a problematiche a livello cognitivo e sviluppo di ADHD in età adolescenziale (13-17 anni). Va comunque ricordato che non tutti gli studi hanno dimostrato questa associazione, lasciando, pertanto, un margine di incertezza.

La forte stabilità del PFOS rende questa tipologia di PFAS resistente alla degradazione, caratteristica che lo rende notevolmente persistente nell'ambiente, soprattutto nell'acqua e nel suolo. In questo caso, già un'esposizione prenatale conduce ad ADHD, iperattività e ASD, con una prevalenza in bambini di sesso maschile rispetto al sesso femminile.

Il PFHxS è un PFAS a catena corta con 6 atomi di carbonio, e seppur sia considerato meno tossico per l'organismo grazie alle sue caratteristiche chimico-molecolari e la sua tendenza ad essere più facilmente degradato, sono emerse evidenze di tossicità con conseguente sviluppo di ADHD già intorno agli 8 anni, con un picco tra i 12 ed i 15. Analogamente al caso del PFOA, alcuni studi tra quelli considerati non hanno mostrato associazione tra PFHxS e disturbi cognitivi (K. Wu *et al.*, 2025).

Nei due capitoli successivi vengono discussi due approcci sperimentali volti ad indagare neurotossicità dei PFAS, uno *in vitro*, tramite l'impiego di neuroni corticali derivati da cellule staminali umane pluripotenti indotte (hiPSC), e uno *in vivo*, con l'utilizzo di Zebrafish.

CAPITOLO 2: Analisi articolo “Developmental neurotoxicity of PFOA exposure on hiPSC-derived cortical neurons” (Shichen Wu *et al.*, 2024)

2.1 Obiettivi dello studio

In questo articolo, gli autori intendono valutare i rischi neurodegenerativi associati all'esposizione al PFOA nel periodo di pre-differenziamento di neuroni, porgendo particolare attenzione alle alterazioni a carico dei meccanismi molecolari.

In particolare, è stato impiegato un modello neuronale *in vitro* derivato da cellule staminali pluripotenti indotte (hiPSC) ai fini di valutare gli effetti del PFOA a basse dosi di PFOA sull'integrità dei neuroni e misurare i cambiamenti nell'espressione di proteine associate ad un possibile sviluppo di Alzheimer (AD) seguendo l'ipotesi DOHaD. Come spiegato nell'articolo “*The Developmental Origins of Health and Disease (DOHaD)*” (S. Lacagnina, 2019) estratto da *American Journal Of Lifestyle Medicine*, l'ipotesi DOHaD, derivante dalla *Barker hypothesis*, suggerisce un legame tra le fasi periconcezionali, fetali e le prime fasi neonatali, e lo sviluppo nel lungo periodo di patologie metaboliche, caratterizzate da una longevità alterata, e maggiore incidenza di comparsa di cancro. Secondo questa ipotesi, in risposta ad influenze ambientali dovute allo stile di vita di entrambi i genitori, si possono presentare delle modificazioni epigenetiche già nel genoma fetale/neonatale.

La letteratura offre numerosi studi su animali modello (e.g., *Mus musculus* e *Danio rerio*) riguardanti l'esposizione prenatale e infantile al PFOA, tuttavia non è mai stato eseguito uno studio che seguisse il paradigma DOHaD in un modello *in vitro* di hiPSC.

Alcuni studi sul PFOS, composto strutturalmente simile al PFOA, mostrano come esso possa accumularsi nel cervello umano e dei ratti, dove può cambiare i livelli di marker di AD patologici, quali un'aumentata espressione della proteina tau, tau fosforilata (pTau), *Amyloid Precursor Protein* (APP), *Amyloid-β 42* (Aβ42), 90 giorni dopo la nascita.

Nello studio analizzato di seguito, gli studiosi hanno cercato di confermare l'ipotesi, dimostrata per PFOS, secondo la quale l'esposizione al PFOA è connessa all'incremento del rischio di sviluppare AD in età avanzata.

Le cellule *hiPSC* (e i neuroni corticali derivanti) sono ampiamente utilizzate dalla comunità scientifica per eseguire studi sul neurosviluppo, su malattie neurodegenerative e sulla neurotossicità di varie sostanze chimiche, rendendosi un modello più che valido per sostenere questa indagine.

2.2 Materiali e metodi

Sono stati differenziati neuroni corticali a partire da hiPSC, ponendo quest'ultime in un mezzo *StemFlex*, con lo scopo di mantenere una iniziale pluripotenza sostenendo marcatori come OCT4, SOX2 e NANOG, per poi creare una *dual SMAD inhibition*, ovvero il blocco di due vie di segnalazione intracellulare che coinvolgono TGF-β e *bone morphogenetic protein* (BMP), spingendo le hiPSC a diventare prima corpi embrioidi (EB) e poi cellule progenitrici neuronali (NPC).

Le NPC vengono coltivate per 8 giorni in un mezzo utile al differenziamento in cellule corticali tipiche della parte anteriore del cervello formato dal medium *Brainphys*, i supplementi N2 e B27+, *Brain-Derived Neurotrophic Factor* (BDNF) al 20 ng/ml, *Glial cell line-Derived Neurotrophic Factor* (GDNF) al 20 ng/ml, 1%

di Penicillina-Streptomina, GlutaMAX come fonte di glutammina, *Non-Essential Aminoacids* (NEAA), 10 μ M cAMP dibutirilato e 200 μ M di Acido Ascorbico (i.e. Vitamina C).

Il PFOA è stato disciolto in acqua ultrapura ad una concentrazione di 4 parti per milione (ppm) e diluito in un medium per cellule progenitrici neuronali ad una concentrazione di 0.04 parti per miliardo (ppb) oppure 0.4 ppb e, infine, usata per trattare le NCP 48 ore prima del differenziamento.

Entrambe le concentrazioni di PFOA sono state analizzate: per quanto riguarda 0.4 ppb, essa viene utilizzata perché si avvicina alla quantità plasmatica della popolazione statunitense e nel cervelletto umano (rilevato a 32.28 ppb); anche 0.04 ppb viene incluso nello studio, poiché sono stati rilevati quantitativi di PFOA pari a 0.01-0.05 ppb nel latte materno.

Le metodologie di rilevamento dei diversi risultati includono:

- *MTT assay kit*, utile a misurare la vitalità metabolica delle cellule;
- Immunocitochimica e microscopia a fluorescenza;
- *Microelectrode array* (MEA) per registrare l'attività neuronale;
- Rilevamento di calcio (Ca), per il quale viene inserito precedentemente un indicatore fluorescente di Ca (i.e. jRCaMP7) nelle cellule tramite un Virus Adeno-associato di tipo 1 (AAV1);
- La linea cellulare HEK293T funge da biosensore per il rilevamento della proteina tau patologica: le cellule possiedono delle varianti di *repeat-domain* (RD) di tau che portano la mutazione P301S. Le RD aggregano se esposte a fibrille internalizzate di tau preformate (PFF) che emettono un segnale FRET (i.e. *Förster resonance energy transfer*), utile a rilevare e quantificare le PFF di tau nel mezzo di coltura;
- ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) per quantificare la concentrazione di due isoforme di A β (i.e. A β ₄₀ e A β ₄₂);
- Analisi delle gocce lipidiche (LD) tramite la colorazione fluorescente LipidSpot 488;
- Puromicina diluita nel mezzo di coltura per la maturazione neuronale;
- *RNA-sequencing* (RNA-seq);
- Analisi dei dati e analisi statistiche.

2.3 Risultati ottenuti

2.3.1 Alterazioni morfologiche

A seguito dell'esposizione delle NCP alle concentrazioni di PFOA pari a 0.4 ppb e 0.04 ppb, gli studiosi hanno valutato l'attività metabolica neuronale (attraverso l'*MTT assay*), la morfologia nucleare dei neuroni corticali e le loro proprietà neuronali a seguito del completo differenziamento. Inoltre, hanno quantificato la percentuale di condensazione della cromatina (CCP) nei nuclei e stabilito il grado di rotondità cellulare.

I neuroni sono stati colorati per accertare la complessità neuronale e la presenza di MAP2 (i.e. una proteina legante i microtubuli di cui i dendriti sono ricchi), per

visualizzare i differenti prolungamenti assonici, la crescita di nuovi assoni e le loro ramificazioni prima e dopo l'esposizione al PFOA.

I risultati legati ai 0.4 ppb di PFOA mostrano un aumento dell'area nucleare con una diminuzione della CCP, tuttavia nessun cambiamento nella rotondità è stato rilevato. Nel caso dell'esposizione a 0.04 ppb di PFOA prima del differenziamento, non sono stati rilevati cambiamenti nella morfologia nucleare.

Per quanto riguarda gli assoni, i loro prolungamenti e le loro ramificazioni, è stata notata una maggior diminuzione a seguito dell'esposizione a PFOA al 0.4 ppb rispetto a 0.04 ppb.

2.3.2 Alterazione dell'attività neuronale indotta da esposizione a PFOA in fase di pre-differenziamento

Un'ottima attività neuronale si caratterizza per l'abilità dei neuroni di generare segnali elettrici tramite le sinapsi che partecipano anche al consolidamento e alla formazione della memoria.

Le sinapsi sono composte da terminali pre-sinaptici e bottoni post-sinaptici e svolgono il ruolo di giunzioni per la trasmissione del segnale elettrico.

I pazienti con AD mostrano una comune disfunzione sinaptica ed in presenza di PFOA al 0.4 ppb appare una diminuzione della densità pre-sinaptica e delle sinapsi, con al contempo, un aumento della densità post-sinaptica. Tuttavia, con il PFOA al 0.04 ppb, emerge solo un aumento della densità post-sinaptica e nessuna alterazione significativa riguardante gli altri due valori considerati.

Inoltre, è stata valutata tramite MEA l'attività elettrica della rete neuronale sia prima che dopo l'esposizione al PFOA: la frequenza di scarica e la frequenza dei potenziali d'azione (PA) sono entrambi ridotti, sebbene i dati raccolti siano stati significativi solo a seguito del trattamento con la concentrazione al 0.4 ppb.

Infine, è stato inserito JGCaMP7 tramite un plasmide all'interno delle cellule neuronali con lo scopo di rilevare l'attività dello ione Ca^{2+} alla frequenza di 4 Hz grazie al segnale fluorescente che il legame tra i due genera. I risultati hanno mostrato una discrepanza nell'attività neuronale a seguito di una precedente esposizione in particolare al PFOA al 0.4 ppb, nonostante per entrambe le concentrazioni sia stata rilevata un'alterazione nell'ampiezza dei picchi di Ca^{2+} .

2.3.3 Cambiamenti del trascrittoma associati a tauopatia e Alzheimer

Grazie all'RNA-seq sono state indagate le alterazioni di espressione genica potenzialmente responsabili di patologie neurodegenerative.

Grazie al sequenziamento, sono stati individuati dei geni espressi in modo differenziale (DEG) in neuroni trattati con entrambi 0.4 ppb e 0.04 ppb di PFOA.

Inoltre, sono state eseguite analisi di arricchimento per determinare se tra i DEG vi fossero in numero significativo di geni appartenenti a determinati *pathway* che descrivono processi biologici (BP), compartimenti cellulari (CC) e funzioni molecolari (MF).

In riferimento ai BP è stata identificata una regolazione positiva dell'attività chinasi della proteina tau; in merito ai CC, è risultata significativa la matrice extracellulare associata alle sinapsi; infine per i MF, ad essere arricchita era l'attività della fosfatidato fosfatasi, un *pathway* strettamente collegato a tauopatie.

I dati emersi dalle analisi degli MF arricchiti hanno mostrato un nesso con le apolipoproteine che giocano un ruolo cruciale nel trasporto di A β e nella captazione di tau. Inoltre, l'MF *insulin-like growth factor I* suggerisce una correlazione con il potenziale rischio di AD.

Infine, attraverso *Ingenuity Pathway Analysis* (IPA) sono stati identificati i geni collegati a AD e tauopatie, e generate delle *heatmap* di DEG. In seguito all'esposizione a PFOA, sono stati osservati dei cambiamenti dell'espressione a carico di geni collegati ad AD, più precisamente GRIA2, una subunità del recettore ionotropico glutamatergico AMPA, e di GSK3B, una chinasi che catalizza la fosforilazione di tau.

Complessivamente, i risultati ottenuti suggeriscono che il PFOA contribuisca nei neuroni corticali al potenziale sviluppo di AD e tauopatie.

2.3.4 Induzione di tauopatia con esclusione di patologie legate ad A β

Per indagare il potenziale effetto di un'esposizione da PFOA ed il suo legame con le tauopatie, le pTau Thr181 e Ser202-Thr205 in neuroni corticali sono state marcate rispettivamente con anticorpi AT270 e AT8: i risultati hanno mostrato un'elevata presenza di pTau Thr181 nei neuriti a contatto con 0.4 ppb di PFOA, mentre i livelli di pTau Ser202-Thr205 sono diminuiti sia a concentrazione 0.04 ppb che 0.4 ppb. Inoltre, è stata utilizzata la linea cellulare-biosensore HEK293T che ha rivelato la presenza di fibrille di tau a livello extracellulare in cellule trattate con 0.4 ppb PFOA.

È stato escluso il collegamento tra patologie legate ad A β e PFOA, in quanto non sono state rilevate differenze nelle cellule esposte o meno al PFOA.

Complessivamente, i risultati ottenuti dimostrano che l'esposizione da PFOA aumenta il rischio di tauopatie.

2.3.5 Alterazione dell'omeostasi lipidica

Le LD sono organelli immagazzinati in lipidi neutri intracellulari e segnalano un'alterazione lipidica in AD. Esse sono state quantificate in numero e grandezza tramite il LipidSpot 488 (Figura 2-A) ed i risultati hanno mostrato un incremento di numero di LD per cellula (maggiormente per 0.04 PFOA rispetto a 0.4 PFOA) e una riduzione nella grandezza delle LD.

2.3.6 Disregolazione della traduzione dell'RNA

Nella letteratura, sono state già associate alcune alterazioni nella traduzione dell'RNA ad AD. Per confermare l'associazione tra l'esposizione al PFOA e questa anomalia è stata incorporata la puomicina nei neuroni per 10 minuti e a seguire sono stati fissati e visualizzati (Figura 2-B) tramite l'uso di anticorpi (AB) anti-puomicina, anti-MAP2 e il colorante 4',6-diamidin-2-fenilindolo (DAPI).

I risultati mostrano un calo progressivo di marcatura parallelamente all'aumento della concentrazione di PFOA, spiegando la possibile compromissione della traduzione dell'RNA a seguito dell'esposizione.

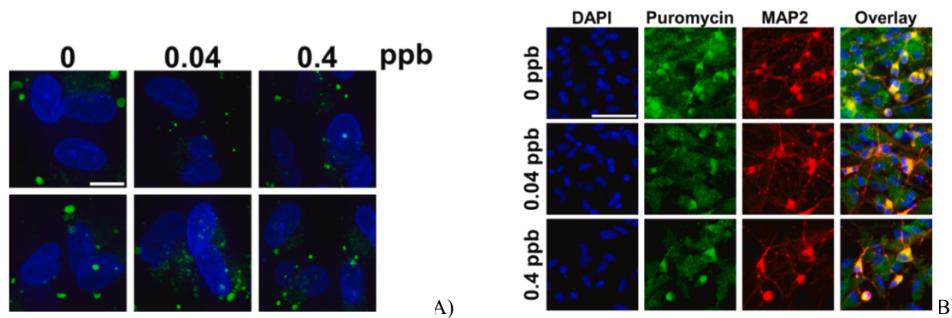


Figura 2: A) Neuroni marcati con LiquidSpot 488; B) Neuroni marcati con DAPI, AB anti-puromicina e anti-MAP2.

2.4 Discussione

In questo studio, sono stati utilizzati *hiPSC-cortical neurons*, differenziati in neuroni corticali composti principalmente da neuroni glutamatergici e infine esposti a dosi di PFOA pari a 0.4 e 0.04 ppb.

In sintesi, lo studio ha messo in evidenza come il PFOA, in modo dose-dipendente, sia in grado di determinare i seguenti effetti:

- Aumento morfologico dei neuroni e diminuzione della condensazione cromatinica con 0.4 ppb di PFOA;
- Decrescita dei neuriti, dei processi e della rete neuronale, generando neuroni distrofici, sintomo di AD;
- Aumento della densità post-sinaptica e decremento della frequenza di scarica dei PA, alterazione frequente nel cervello di pazienti con AD;
- Aumento di pTau (Thr181) in neuriti, un marker patologico per il declino cognitivo e lo sviluppo di demenza, e aumento delle fibrille extracellulari di tau; sorprendentemente, non ci sono stati cambiamenti nei livelli di A β , dimostrando che l'esposizione al PFOA influenza maggiormente AD tramite tauopatie;
- Accumulo e ridotte dimensioni di LD dimostrano un danno neuronale dovuto a stress, ipossia e disfunzioni mitocondriali;
- La traduzione dell'RNA è diminuita e ciò comporta una ridotta risposta nella trasmissione elettrica e delle alterazioni della plasticità sinaptica.

In conclusione, questo studio ha dimostrato un legame tra l'esposizione a PFOA e lo sviluppo di patologie neurodegenerative, spiegando gli effetti sub-letali di questo xenobiotico e, seguendo il paradigma di DOHaD, ha dimostrato come il PFOA possa essere potenzialmente neurotossico già in periodo pre-natale e neonatale.

CAPITOLO 3: Analisi articolo “Effects of developmental exposure to individual and combined PFAS on development and behavioral stress responses in larval zebrafish” (Mohamed Hamed *et al.*, 2024)

3.1 Obiettivi dello studio

In questo articolo, gli studiosi intendono valutare gli effetti di singole tipologie di PFAS (i.e. PFOA, PFOS, PFHxS e PFHxA) e di loro combinazioni sulla crescita e sul comportamento di larve di Zebrafish (*Danio rerio*) in risposta a stimoli di stress. Questo modello *in vivo* (Zebrafish) è ampiamente utilizzato per studi di tossicologia, poiché possiede caratteristiche anatomiche e fisiologiche che permettono un'analisi diretta di esposizione a inquinanti ambientali, farmaceutici o sostanze chimiche industriali. Le caratteristiche che rendono questa specie molto popolare sono la trasparenza degli embrioni, la facilità nella manipolazione genetica, uno sviluppo rapido ed extrauterino. Inoltre, gli Zebrafish mostrano una complessità comportamentale avvicinata a quella dei vertebrati superiori già nel primo sviluppo, permettendo agli studiosi di quantificare e analizzare eventuali variazioni neurocomportamentali in determinate condizioni di stress.

3.2 Materiali e metodi

Sono state utilizzate linee AB stabili e di elezione di wild-type Zebrafish, mantenute a temperatura pari a 28 ± 0.5 °C, in 14 ore di luce e 10 di buio ed in un sistema di ricircolo d'acqua, dechlorata e filtrata per osmosi inversa, ai fini della sua purificazione. Il pH è stato mantenuto nel range di 7.0-7.5 ed è stato aggiunto sale marino per raggiungere un livello di conduttività pari a 500 μ S/cm. Inoltre, gli Zebrafish sono stati nutriti con scaglie di mangime per pesci e piccoli crostacei due volte al giorno.

Gli embrioni utilizzati per questa indagine sono stati ottenuti dall'incrocio di oltre 12 gruppi destinati all'accoppiamento con un rapporto tra i sessi pari a 1 maschio ogni 3 femmine in vasche apposite. Due ore dopo l'accoppiamento (2 hpf), gli embrioni sono stati raccolti e posti su piastre Petri in un mezzo per embrioni (E3), composto a partire da una soluzione madre 60x di 34.5 g NaCl, 1.6 g KCl, 5.8 g di CaCl₂-H₂O e 9.78 g di MgCl₂-6H₂O disciolti in 2 L di acqua Millipore con pH pari a 7.2, e successivamente incubati a 28 ± 0.5 °C.

Le soluzioni madre (50 mM) contenenti PFAS, in particolare PFOA, PFOS, PFHxS e PFHxA, sono state preparate con dimetilsolfossido (DMSO) puro al 100% e, a seguire, le soluzioni intermedie sono state diluite in combinazione o singolarmente nel mezzo E3 tramite concentrazioni sequenziali pari a 1.75, 0.7, 0.35 e 0.07 μ g/L, fino al raggiungimento della concentrazione massima di 3.5 μ g/L con lo scopo di esporre gli embrioni a diversi livelli di sostanza tossica.

Per aumentare la biodisponibilità dei PFAS, è stato rimosso a 4 hpf il corion degli embrioni, ovvero una membrana extraembrionale permeabile, tramite una digestione enzimatica. Successivamente (6 hpf), gli embrioni sono stati inseriti in 8 piastre quadrate a 96 pozzetti, sigillate con parafilm per ridurre l'evaporazione, agitate per 30 minuti a 75 giri al minuto (rpm) e incubate al buio ad una temperatura di 28 ± 0.5 °C. È importante mantenere l'assenza di luce, affinché gli embrioni si abituino a crescere al buio e, soprattutto, è utile per ridurre la fotodegradazione chimica e gli effetti dati da stimoli luminosi che possono causare stress.

Per accertare l'eventuale mortalità delle larve e i loro possibili cambiamenti morfologici, a 120 hpf esse sono state anestetizzate con tricainina, anestetico veterinario utilizzato in acquacoltura, e poi visualizzate ad uno stereomicroscopio, determinandone la morte solo se presente disintegrazione tissutale o assenza di battito cardiaco. I criteri per determinare alterazioni morfologiche sono difetti agli occhi, alla mandibola, alla pigmentazione e alla vescica natatoria, edema al sacco vitellino e al pericardio, deformità dell'asse corporeo e corpo troncato.

Infine, oltre ad analisi statistiche, sono state condotte indagini sul comportamento in risposta a stimolazione luminosa e acustica. Nello specifico, a seguito di 20' di acclimatamento delle larve al buio, così da registrare la loro attività basale, esse sono state esposte a frequenze di 100 Hz ad intervalli di 100 ms per 1 minuto in totale. Nuovamente sono state acclimate per 10' al buio, per poi essere esposte a luce improvvisa per 10' con intensità 1200 lux. Questi processi sono stati condotti massimo per 1h. L'attività delle larve è stata quantificata come distanza percorsa (mm) durante intervalli di 2" nel caso di risposte motorie acustiche (AMR), a differenza delle risposte motorie visive (VMR) quantificate sempre in distanza, però in intervalli di 60". AMR è stata registrata immediatamente all'inizio dello stimolo acustico in quanto l'attività larvale sarebbe ritornata a livelli basali con velocità dopo l'interruzione dello stimolo. Invece, VMR è stata rilevata per più di 5' solo dopo terminazione dello stimolo luminoso. Per concludere, l'attività larvale rappresenta la somma delle distanze compiute nei singoli intervalli di tempo.

3.3 Risultati ottenuti

3.3.1 Difetti nello sviluppo e mortalità

Le larve a 120 hpf esposte a 0.07 µg/L di PFOA ed a tutte le concentrazioni sia di PFOS che di PFHxS, hanno mostrato in percentuale un aumento significativo di mortalità rispetto al controllo, che tuttavia non ha mai superato il 23.2% (Figura 3A, B e C). Invece i livelli di mortalità a seguito di esposizione ad altre concentrazioni di PFOA e PFHxA sono rimasti inalterati (Figura 3A e D).

Per quanto riguarda le alterazioni morfologiche descritte nel paragrafo 3.2, sono aumentate a seguito dell'esposizione a concentrazioni pari a 0.07, 1.75 e 3.5 µg/L di PFOA, a 0.35, 0.7, 1.75 e 3.5 µg/L di PFOS, a 0.35 e 3.5 µg/L di PFHxS e infine a tutte le concentrazioni di PFHxA. Per ciascun inquinante la percentuale di alterazione non ha superato il 36.1% (Figura 3E).

La loro combinazione, invece, è stata associata ad un aumento di mortalità fino al 22.66% (Figura 8A) e tutte le concentrazioni nei mix di PFAS hanno portato a difetti morfologici fino ad un massimo di 32.8% (Figura 8B).

3.3.2 Crescita delle larve

La diminuzione di crescita delle larve è stata rilevata a seguito dell'esposizione a 3.5 µg/L di PFOA e alle diverse combinazioni di PFAS. Tuttavia, non sono emerse differenze con altre concentrazioni di PFOA e neppure con tutte le concentrazioni di PFOS, PFHxS e PFHxA (Figura 4). In caso di esposizione in combinazione, vi è stata una diminuzione della lunghezza larvale (Figura 8C).

3.3.3 Attività basale delle larve

Le larve di Zebrafish a 120 hpf hanno mostrato una ridotta attività ai livelli basali di stress a seguito dell'esposizione a 1.75 µg/L di PFOA (Figura 5A), a 0.07 µg/L di PFOS (Figura 5B), a 0.07 µg/L di PFHxS (Figura 5C) ed a 3.5 µg/L di PFHxA (Figura 5D) rispetto ai gruppi di controllo. Le rimanenti concentrazioni non hanno portato a risultati significativi.

Per quanto riguarda i mix di PFAS, solamente le concentrazioni 0.35, 0.7, 1.75 e 3.5 µg/L hanno mostrato un'attività larvale ridotta (Figura 8D).

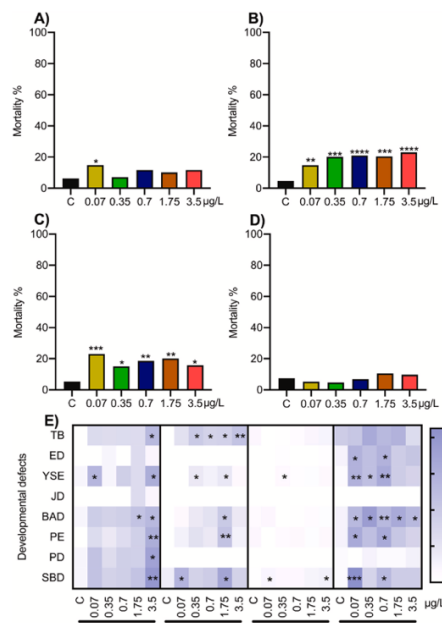


Figura 3: Livelli in percentuale di mortalità dopo l'esposizione a A) PFOA, B) PFOS, C) PFHxS, D) PFHxA; E) Heat map per i cambiamenti morfologici, dove le alterazioni significative rispetto al controllo sono segnate con un asterisco. Abbreviazioni: TB, corpo troncato; ED, difetti degli occhi; YSE, edema del sacco vitellino; JD, difetto alla mascella; BAD, deformità dell'asse corporeo; PE, edema del pericardio; PD, difetti nella pigmentazione; SBD, difetti nella vescia natatoria.

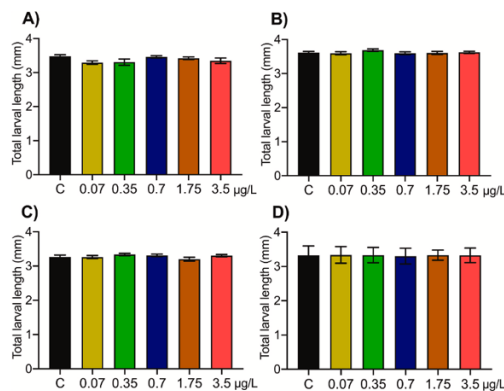


Figura 4: Cambiamenti dopo esposizioni a singoli A) PFOA, B) PFOS, C) PFHxS, D) PFHxA.

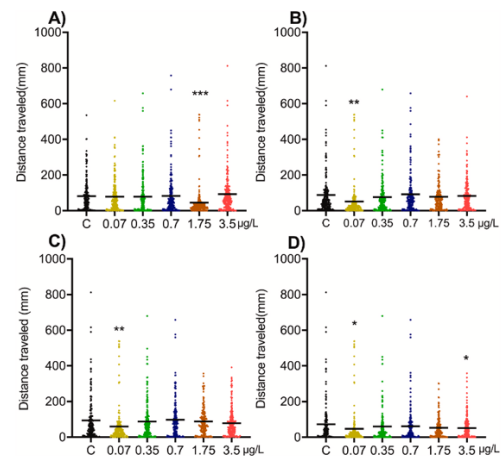


Figura 5: Attività basale delle larve a seguito dell'esposizione ad A) PFOA, B) PFOS, C) PFHxS, D) PFHxA; i 5 colori rappresentano le diverse concentrazioni di sostanza tossica a cui le larve sono state esposte, oltre al parametro di colore nero che identifica il controllo.

3.3.4 Risposte comportamentali

3.3.4.1 A stimoli acustici

I picchi di AMR sono aumentati in Zebrafish se esposti a concentrazioni di PFOA pari a 0.07, 0.35 e 3.5 µg/L. Al contrario, esposti a 0.35, 0.7 e 3.5 µg/L di PFHxS e 0.35, 0.7, 1.75 e 3.5 µg/L di PFHxA è emersa una diminuzione della risposta. Con le restanti concentrazioni di PFOS, PFOA, PFHxS, PFHxA, non sono state rilevate alterazioni nel comportamento dopo stimolo acustico (Figura 6).

L'esposizione ai mix di PFAS è stata associata ad una riduzione generale delle risposte larvali allo stress a tutte le concentrazioni considerate (Figura 9D, E, F).

3.3.4.2 A stimoli visivi

I picchi di VMR sono stati rilevati per larve esposte a PFOA 1.75 e 3.5 µg/L (Figura 7A, B, C), che hanno causato una diminuzione delle risposte a stress, risultati paragonabili all'esposizione ai mix di PFAS (Figura 9D, E, F). Al contrario, se esposte a 0.35 e 1.75 µg/L di PFHxS (Figura 7G, H, I) e a 0.7 e 3.5 µg/L di PFHxA (Figura 7J, K, L), emerge un aumento di risposte da stress. Le restanti concentrazioni non sono state significative in questa parte di indagine.

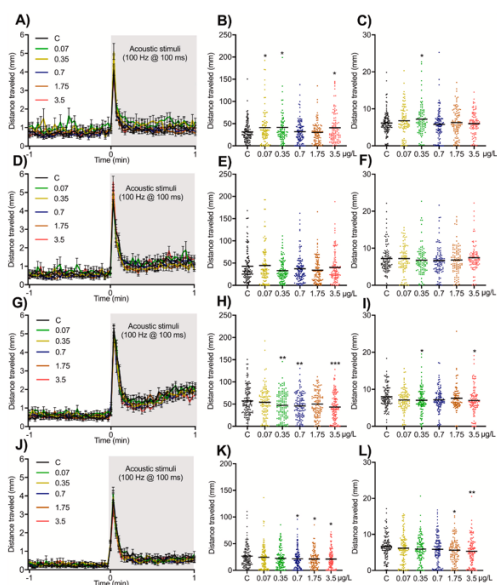


Figura 6: Risposte a stimoli acustici A-B-C) PFOA; D-E-F) PFOS; G-H-I) PFHxS; J-K-L) PFHxA.

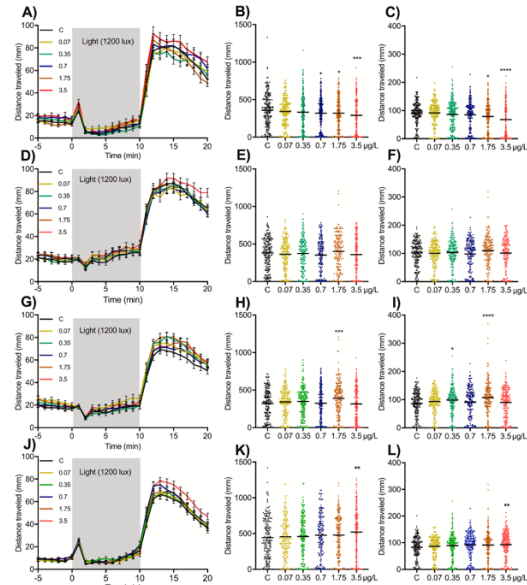


Figura 7: Risposte a stimoli visivi dopo esposizione a A-B-C) PFOA; D-E-F) PFOS; G-H-I) PFHxS; J-K-L) PFHxA

3.4 Discussione

I risultati emersi da questo studio sono in accordo con precedenti studi che hanno dimostrato effetti neurotossici e di interferenza endocrina dei PFAS, oltre che l'associazione tra questi composti e alcuni disturbi psichiatrici legati allo stress come depressione e ansia.

Lo studio si concentra su due PFAS a lunga catena PFOS e PFOA, e su due PFAS a catena corta PFHxS e PFHxA, tutti utilizzati in singolo ed in miscela.

Sono emerse le seguenti evidenze:

- PFOS: aumento di mortalità dopo l'esposizione a concentrazioni pari a 0.07, 0.35, 0.7, 1.75 e 3.5 µg/L, e a 0.7, 1.75 e 3.5 µg/L sono state registrate alterazioni morfologiche, nessuna differenza di crescita delle larve; attività basale ridotta a 0.07 µg/L; nessuna alterazione dell'attività in seguito a stimoli acustici o visivi;
- PFOA: aumento di mortalità a 0.07 µg/L; alterazioni morfologiche a 0.35, 0.7, 1.75 e 3.5 µg/L; diminuzione di crescita delle larve a 3.5 µg/L; ridotta attività basale a 1.75 µg/L; ridotta AMR a 0.07, 0.35 e 3.5 µg/L; infine VMR ridotte a 1.75 e 3.5 µg/L;
- PFHxS: aumento di mortalità a tutte le concentrazioni; aumento di alterazioni morfologiche a 0.35 e 3.5 µg/L; nessun cambiamento nella crescita delle larve; ridotta attività basale a 0.07 µg/L; nessun cambiamento nelle AMR, aumento di VMR a 0.35 e 1.75 µg/L;
- PFHxA: nessun cambiamento nella mortalità e nella crescita delle larve; alterazioni morfologiche a tutte le concentrazioni; riduzione di attività basale a 3.5 µg/L; aumento di AMR a 0.35, 0.7, 1.75 e 3.5 µg/L; aumento di risposte a stress post stimoli visivi a 0.7 e 3.5 µg/L;
- Mix di PFAS: per tutti i parametri considerati è stata registrata una diminuzione nelle attività, tranne per la mortalità e le alterazioni morfologiche che aumentano.

Le percentuali di alterazione di tutti i parametri mostrano un picco massimo pari al 25%, suggerendo un'influenza sub-letale dei singoli PFAS come sub-letale, invece le miscele di PFAS amplificano gli effetti avversi sullo Zebrafish, dimostrando un effetto sinergico. Il presente studio traccia quindi una possibile correlazione tra la sintomatologia evidenziabile in larve di Zebrafish e quella riscontrabile in individui di giovane età.

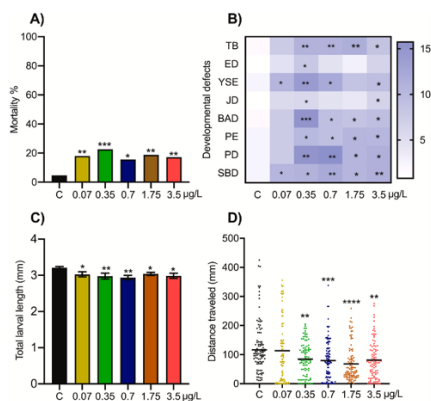


Figura 8: Influenza della miscela di PFAS su
A) Livelli di mortalità; B) Alterazioni morfologiche;
C) Crescita larvale; D) Attività larvale.

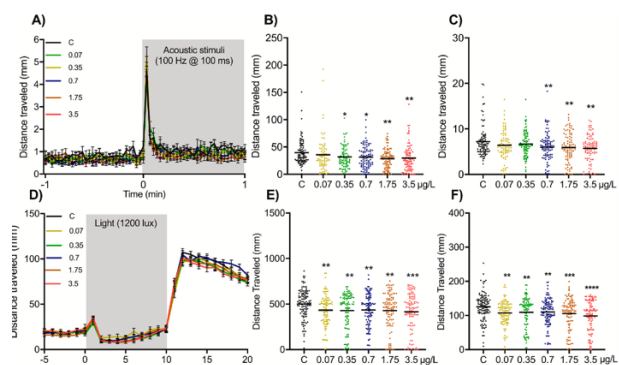


Figura 9: AMR (A-B-C) e VMR (D-E-F) a seguito dell'esposizione alla miscela di PFAS.

CAPITOLO 4: Conclusioni

I due studi analizzati hanno permesso di approfondire l'ipotesi secondo cui l'esposizione a diversi PFAS può determinare neurotossicità nelle prime fasi di sviluppo.

I PFAS a catena lunga sono gli inquinanti più studiati, poiché presenti da anni nell'ambiente e a disposizione degli studiosi, mentre quelli a catena corta o i cosiddetti *novel PFAS* hanno origini recenti e tendono ad essere difficilmente eliminabili dall'ambiente per le loro caratteristiche chimico-fisiche, le quali non sono ancora completamente note e minacciano la salute umana. Per questo motivo, è importante indagare gli effetti dei composti chimici ed è anche fondamentale promuovere studi che mettano in relazione l'esposizione e l'assorbimento di queste molecole nella popolazione.

Ciò che emerge nel primo studio evidenzia l'influenza data dall'esposizione a varie concentrazioni di PFOA (una tipologia di PFAS a catena lunga) sullo sviluppo neuronale nelle fasi che precedono il differenziamento dei neuroni corticali *in vitro*, dimostrando come questi composti chimici possano determinare cambiamenti morfologici e trascrittomici, alterando la traduzione dell'RNA e i meccanismi alla base della produzione di proteine funzionali, modificando i livelli ormonali e dei neurotrasmettitori e causando manifestazioni patologiche nel primo apprendimento, nella memoria e nei disturbi del comportamento. Inoltre, sono emerse evidenze di aumentata infiammazione, che può coinvolgere sia organelli cellulari come i mitocondri, sia il sistema immunitario. Infine, tutti i cambiamenti sopra descritti possono rappresentare una causa latente di AD in tarda età.

Nel secondo studio, invece, è stata analizzata la relazione tra l'esposizione a quattro tipi di PFAS e le prime fasi di sviluppo del modello *in vivo* Zebrafish che ha fatto emergere risultati contrastanti, tuttavia utilissimi per comprendere l'influenza di questi composti chimici sull'organismo in embriogenesi. In particolare, i PFAS a catena lunga causano effetti negativi principalmente nella vitalità, nell'alterazione morfologica e nell'attività basale, con alcune evidenze anche di AMR e VMR. Per i PFAS a catena corta, le influenze sono comparse per quasi tutti i parametri considerati. Già la letteratura scientifica ha dimostrato un'influenza negativa sui neurotrasmettitori, anch'essi causa di innumerevoli cambiamenti a livello comportamentale e che possono essere inclusi nelle potenziali cause di sviluppo di patologie legate allo stress come ansia e depressione.

La combinazione di tutti i risultati analizzati in questi due studi può confermare la neurotossicità dei PFAS già nelle prime fasi dello sviluppo fetale, la quale, è incentivata dalla comparsa di nuove tipologie di inquinanti chimici che contribuiscono ad aumentare il rischio di tossicità, in particolare, nella popolazione pediatrica.

In conclusione, appare necessario attuare misure di prevenzione al più presto, accompagnate da un controllo approfondito e costante dei livelli di PFAS a cui i pazienti pediatrici potrebbero essere esposti. Questo include anche l'impegno delle aziende ospedaliere a favorire l'utilizzo di strumentazione certificata senza PFAS e

che vengano garantiti adeguati protocolli di smaltimento e riciclo degli eventuali strumenti utilizzati con all'interno questi composti.

Inoltre, le istituzioni stesse devono essere coinvolte direttamente nel monitoraggio dei livelli ambientali, per lo più nelle aree circostanti le aziende che utilizzano PFAS, le quali devono essere incoraggiate ad azzerarne l'utilizzo, favorendo composti e materiali più sicuri per la salute umana e, in particolare, dei pazienti più fragili (Briassoulis *et al.*, 2025).

BIBLIOGRAFIA

Ajana Robinson, Dominik Rachoń, Grażyna Gałęzowska, Reproductive toxicity of per- and polyfluoroalkyl substances, *Environmental Toxicology and Pharmacology*, Volume 117, 2025, 104740, ISSN 1382-6689, <https://doi.org/10.1016/j.etap.2025.104740>

Bao Jia, Li-Xin Shao, Yang Liu, Shi-Wei Cui, Xin Wang, Gui-Lin Lu, Xue Wang, Yi-He Jin, Target analysis and suspect screening of per- and polyfluoroalkyl substances in paired samples of maternal serum, umbilical cord serum, and placenta near fluorochemical plants in Fuxin, China, *Chemosphere*, Volume 307, Part 1, 2022, 135731, ISSN 0045-6535, <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2022.135731>

Bharal Bhagyashree, Chanda Ruchitha, Paarth Kumar, Rukmani Pandey, Mahesh Rachamalla, Som Niyogi, Ravi Naidu, Ravinder K. Kaundal, Neurotoxicity of per- and polyfluoroalkyl substances: Evidence and future directions, *Science of The Total Environment*, Volume 955, 2024, 176941, ISSN 0048-9697, <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2024.176941>

Briassoulis, G., Iliá, S., & Briassouli, E. (2025). Exposure to Per- and Polyfluoroalkyl Substances (PFASs) in Healthcare: Environmental and Clinical Insights. *Life*, 15(7), 1057. <https://doi.org/10.3390/life15071057>

Lacagnina S. The Developmental Origins of Health and Disease (DOHaD). *American Journal of Lifestyle Medicine*. 2019;14(1):47-50. doi:10.1177/1559827619879694

Mišťanová, C., & Valachovičová, M. (2025). Health Impacts of Per- and Polyfluoroalkyl Substances (PFASs): A Comprehensive Review. *Life*, 15(4), 573. <https://doi.org/10.3390/life15040573>

Mohamed Hamed, Ajn Vats, Ignitius Ezekiel Lim, Biplov Sapkota, Ahmed Abdelmoneim, Effects of developmental exposure to individual and combined PFAS on development and behavioral stress responses in larval zebrafish, *Environmental Pollution*, Volume 349, 2024, 123912, ISSN 0269-7491, <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2024.123912>

Peixoto-Rodrigues Maria Carolina, José Raphael Monteiro-Neto, Timea Teglas, Michal Toborek, Natalia Soares Quinete, Rachel Ann Hauser-Davis, Daniel Adesse, Early-life exposure to PCBs and PFAS exerts negative effects on the developing central nervous system, *Journal of Hazardous Materials*, Volume 485, 2025, 136832, ISSN 0304-3894, <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2024.136832>

Qu, R., Wang, J., Li, X., Zhang, Y., Yin, T., & Yang, P. (2024). Per- and Polyfluoroalkyl Substances (PFAS) Affect Female Reproductive Health: Epidemiological Evidence and Underlying Mechanisms. *Toxics*, 12(9), 678. <https://doi.org/10.3390/toxics12090678>

Wang Cunlong, Jason T. Magnuson, Chunmiao Zheng, Wenhui Qiu, Incidence of pollution, bioaccumulation, biomagnification, and toxic effects of per- and polyfluoroalkyl substances (PFAS) in aquatic ecosystems: A review, *Aquatic Toxicology*, Volume 286, 2025, 107469, ISSN 0166-445X, <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2025.107469>

Wu Keyue, Aoxue Tang, Xing Zhang, Shun Zhou, Nana Wu, Junyan Tao, Yun Chen, Guanghong Yang, Hao Zhou, Mingdan You, Relationship between PFAS and attention-deficit/hyperactivity disorder or autism spectrum disorder: Epidemiological and experimental evidence, *Ecotoxicology and Environmental Safety*, Volume 302, 2025, 118519, ISSN 0147-6513, <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2025.118519>

Wu Shichen, Junkai Xie, Han Zhao, Xihui Zhao, Oscar F. Sánchez, Jean-Christophe Rochet, Jennifer L. Freeman, Chongli Yuan, Developmental neurotoxicity of PFOA exposure on hiPSC-derived cortical neurons, *Environment International*, Volume 190, 2024, 108914, ISSN 0160-4120, <https://doi.org/10.1016/j.envint.2024.108914>