



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA

DIPARTIMENTO DI SCIENZE CHIMICHE

DIPARTIMENTO DI BIOLOGIA

CORSO DI LAUREA IN SCIENZE E TECNOLOGIE PER L'AMBIENTE

**VALUTAZIONE DELLE RISPOSTE ALLO STRESS, IN CONDIZIONI
CONTROLLATE DI LABORATORIO, CAUSATE
DALL'ESPOSIZIONE AL PFOA IN *Adamussium colbecki*, UN
MOLLUSCO ENDEMICO DELL'ANTARTIDE**

Relatore:

Prof. Paola Irato

Correlatrici:

Dr.ssa Sara Pacchini

Dr.ssa Elisabetta Piva

Laureanda: Marina Nicoletti

Matricola: 2013899

Anno Accademico: 2022/2023

INDICE

1. INTRODUZIONE

1.1. ANTARTIDE.....	1
1.1.1 IL CONTINENTE ANTARTICO	1
1.1.2 IMPATTO DEGLI INQUINANTI IN ANTARTIDE	2
1.1.3 IL PNRA E IL PROGETTO ANTA-GPS	3
1.1.4 LA FAUNA ANTARTICA	3
1.2. PFAS	3
1.2.1. PROPRIETÀ CHIMICO-FISICHE E USO DEI PFAS	3
1.2.2. STRUTTURA MOLECOLARE E CARATTERISTICHE CHIMICHE DEI PFAS.....	4
1.2.3. DISTRIBUZIONE DEI PFAS NELL'AMBIENTE	4
1.3. LE SPECIE REATTIVE DELL'OSSIGENO (ROS)	5
1.4. LE DIFESE ANTIOSSIDANTI	7
1.4.1. LA CATALASI (CAT)	7
1.4.2. LE SUPEROSSIDO DISMUTASI (GPx).....	8

2. SCOPO DELLA TESI

3. MATERIALI E METODI

3.1. DESCRIZIONE DELLA SPECIE TARGET	10
3.2. CAMPAGNA DI CAMPIONAMENTO	10
3.3. TRATTAMENTO DELLA SPECIE TARGET	10
3.4. OMOGENEIZZAZIONE DEI CAMPIONI	11
3.5. DOSAGGIO PROTEICO SECONDO LA METODICA <i>LOWRY ET AL</i> <i>(1951)</i>	11
3.6. DOSAGGIO DELL'ATTIVITÀ CATALASICA SECONDO LA METODICA DI <i>AEBI (1984)</i>	13
3.7. DOSAGGIO DELLE GLUTATIONE PEROSSIDASI SE-DIPENDENTI SECONDO LA METODICA DI <i>LIVINGSTONE ET AL. (1992)</i>	14
3.8. DOSAGGIO DELLE GLUTATIONE PEROSSIDASI TOTALI SECONDO LA METODICA DI <i>LIVINGSTONE ET AL. (1992)</i>	15
3.9. ANALISI STATISTICA	15

4. RISULTATI	16
5. DISCUSSIONE E CONCLUSIONI	18
6. BIBLIOGRAFIA	23
7. SITOGRAFIA	28

1) INTRODUZIONE

1.1) ANTARTIDE

1.1.1) IL CONTINENTE ANTARTICO

L'Antartide si estende intorno al polo sud ed è il continente che si colloca nella parte più meridionale del pianeta Terra. (Figura 1.1)

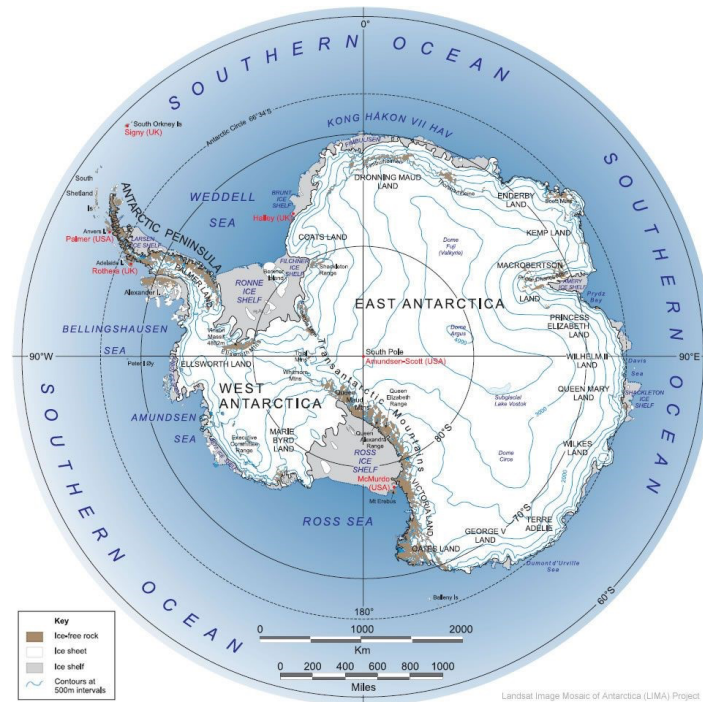


Figura 1.1: Il continente antartico.

Si estende per una superficie totale (comprese anche le piattaforme di ghiaccio) di 13,8 milioni di km², di cui il ghiaccio rappresenta circa il 98%, racchiudendo quasi il 70% dell'acqua dolce della Terra (PNRA 2019). L'enorme strato di ghiaccio che ricopre la maggior parte dell'Antartide implica che questo continente sia quello che riceve meno calore dai raggi solari, in quanto il ghiaccio agisce come uno specchio (infatti si ha un'albedo $\geq 80\%$) (Colacino, 1996). Inoltre, un'altra caratteristica che lo distingue dagli altri continenti è l'assenza di acqua liquida a scala continentale (PNRA, 2019). La calotta polare può avere uno spessore che varia in base alla zona che si considera, e può andare dai 2000 m fino ai 4000 m nella parte più centrale del continente stesso (Cassaro et al., 2021).

L'Antartide si contraddistingue per avere varie caratteristiche estreme a partire dalle temperature molto basse (temperatura media nell'entroterra di -55°C), una bassa umidità relativa dell'aria (tra 50 e 80%), scarse precipitazioni (media di 130 mm/anno) ed un vento estremamente forte (può raggiungere anche i 300 km/h) (Colacino, 1996). Questo clima unico che caratterizza l'Antartide è dato dal fatto che

l'asse di rotazione terrestre è inclinato di 23°27' rispetto al piano dell'orbita: di conseguenza la regione antartica viene esposta al sole solamente in due principali periodi dell'anno, che corrispondono ai momenti in cui la calotta polare si rivolge verso il sole, e sono la primavera e l'estate australe (PNRA, 2019).

Questo continente, inoltre, risulta un luogo particolarmente utile per studiare l'evoluzione e l'adattamento degli organismi, grazie alla sua lontananza ed isolamento dagli altri continenti. Infatti, l'Oceano Antartico (detto anche Oceano Australe o Oceano Meridionale) è separato dagli altri oceani confinanti (ovvero Atlantico, Indiano e Pacifico) a causa del fatto che è caratterizzato da una diversa temperatura e diverse proprietà chimico-fisiche rispetto agli altri (PNRA, 2019); tali caratteristiche definiscono geograficamente e fisicamente una corrente oceanica permanente, detta corrente circumpolare antartica (Irianni et al., 2014). L'esistenza di tale corrente ha fatto sì che venisse impedito lo scambio di acqua e, di conseguenza, forme di vita da un lato verso l'altro (PNRA 2019). Nel lungo periodo però, tra le masse d'acqua temperate e quelle fredde avviene un graduale scambio di calore, di sostanze nutritive, ossigeno e anidride carbonica (Irianni et al., 2014). Inoltre, le condizioni estreme di luce e temperatura, unite ai processi di formazione e fusione dei ghiacci, rendono molto complesse le interazioni tra clima, processi fisici e processi biogeochimici nell'Oceano Meridionale (Spezie, 1996).

1.1.2) IMPATTO DEGLI INQUINANTI IN ANTARTIDE

Le condizioni avverse di questo continente fanno sì che non possa essere abitato in maniera permanente dall'uomo (ma solo temporaneamente presso le stazioni di ricerca): si tratta quindi di un territorio per la gran parte incontaminato e che quindi costituisce un importantissimo archivio della storia geologica e climatica del pianeta Terra (UTA PNRA, 2020).

Al giorno d'oggi le regioni polari fungono da indicatori dell'inquinamento globale, avendo scarse fonti locali di contaminazione e in particolare la regione antartica è molto importante per lo studio dell'impatto dei POPs (Persistent Organic Pollutants). Se comparato con l'Artide, l'Antartide risulta molto più isolato dalle fonti di inquinamento (quali ad esempio le fonti che generano POPs) essendo circondato dall'oceano meridionale e grazie alle condizioni di circolazione atmosferica e oceanica che fungono da barriera per gli inquinanti (Gemma Casas Papell, 2022).

Tuttavia, allo stesso tempo, il continente non risulta immune dall'impatto negativo delle attività umane: infatti, gran parte dei contaminanti (tra cui i POPs) possono raggiungere l'Antartide tramite delle masse d'aria provenienti dalle latitudini settentrionali, ovvero dalle zone più antropizzate (meccanismo del trasporto atmosferico a lungo raggio: LRAT) (Olech et al., 1998). Inoltre, desta molta preoccupazione il fatto, dimostrato da molti studi, che con il ritiro dei ghiacci è possibile che vengano mobilizzati i POPs che erano stati precedentemente immobilizzati tramite deposizione al suolo (Cabrerizo et al., 2013).

1.1.3) IL PNRA E IL PROGETTO ANTA-GPS

Il PNRA è il programma Nazionale di Ricerche in Antartide, nato nel 1985. Esso ha come obiettivo quello di agire da founding agency e promuovere la ricerca nazionale in Antartide (PNRA, 2019).

Questo ampio programma di ricerca finanzia molti progetti scientifici, tra cui Anta-GPS (Antarctica as a Global Pollution Sensor), che prevede di usare organismi endemici antartici per monitorare l'inquinamento a livello globale; in particolare l'obiettivo è biomonitorare inquinanti, sia tradizionali che emergenti, valutandone anche gli effetti, e valutare l'andamento della contaminazione negli ultimi decenni (Anta-GPS, 2021).

1.1.4) LA FAUNA ANTARTICA

L'ambiente antartico, sia quello marino che quello terrestre, è caratterizzato dal fenomeno detto 'endemismo': infatti vi sono varie specie che sono presenti solo in questo continente.

Inoltre, gli organismi che si trovano oggi in Antartide sono il risultato di quella che è stata una rapida diversificazione ed occupazione di nicchie ecologiche vuote in seguito alla scomparsa delle specie precedenti, dovuta ad un cospicuo abbassamento delle temperature e alla conseguente formazione della calotta glaciale in Antartide (Battaglia et al., 1996).

E' importante inoltre considerare che molto diverse sono le condizioni nella terraferma e le condizioni nell'ambiente marino: infatti, mentre l'habitat terrestre antartico è caratterizzato da scarsa popolazione e poco diversificata, l'habitat marino è molto popolato e ricco di specie differenti, sia che si consideri la zona bentonica che quella pelagica; ciò è dovuto principalmente al fatto che il continente è caratterizzato da scarsità d'acqua allo stato liquido o di vapore, mentre l'ambiente marino ha dei fattori ambientali molto stabili (Irianni et al., 2014; PNRA 2019).

1.2) PFAS

L'acronimo PFAS indica le sostanze perfluoroalchiliche, ed è un insieme di molti composti chimici (sono oltre 4600, di cui si hanno ancora pochissime informazioni sugli effetti biologici), prodotti in maniera sintetica dall'uomo (Bonato et al., 2020; ECHA,2023).

I PFAS fanno parte di una più grande categoria di inquinanti chiamati POPs: Persistent Organic Pollutants; si tratta di contaminanti organici prodotti sinteticamente in tutto il mondo che persistono nell'ambiente. In generale sono composti pericolosi in quanto, potendosi accumulare negli organismi viventi, possono andare a costituire un rischio per la salute umana e l'ecosistema. Per tali motivi è stato deciso di andare a disciplinare i POPs a livello mondiale, tramite il protocollo di Aarhus (1998) e la convenzione di Stoccolma (2009) (ECHA,2023; Liu, 2014).

1.2.1) PROPRIETÀ CHIMICO-FISICHE E USO DEI PFAS

La classe dei PFAS è particolarmente importante da studiare, tra quelle comprese nei POPs, in quanto i composti che comprende presentano una elevata solubilità rispetto a quelli delle altre classi, risultando quindi molto impattante a livello degli ecosistemi

acquatici (Pacchini et al., 2023). Ciò si combina al fatto che possono dare bioaccumulo e biomagnificazione (in particolare gli acidi perfluoroalchilici, PFAA), risultando tossici per il biota e per l'uomo.

Per quanto riguarda le proprietà chimico-fisiche di questi composti, essi sono noti per essere idro e lipofobici, presentano proprietà dielettriche, resistenza al calore e agli agenti chimici, bassa energia superficiale e anche proprietà di basso attrito (Bonato et al., 2020; Piva et al., 2022). Queste proprietà rendono i PFAS fortemente persistenti nell'ambiente e ciò è proprio il motivo per cui si è iniziato ad usarli così largamente a partire dagli anni 1940-1950 (Piva et al., 2022). Questa persistenza è data dai legami carbonio-fluoro, noti per essere estremamente stabili: ciò conferirà loro resistenza all'idrolisi, alla fotolisi, alla biodegradazione o al metabolismo (Hansen et al., 2001). Tutte queste varie proprietà dei PFAS li rendono anche dei composti difficilmente sostituibili, in quanto non esistono al momento alternative valide; essi, inoltre, sono costosi da produrre e quindi sono utilizzati proprio quando non esista una sostanza alternativa più economica che possa fornire le stesse prestazioni (Glüge et al., 2020). Tra gli utilizzi più comuni abbiamo ad esempio i componenti di prodotti per la pulizia, refrigeranti, rivestimenti, cere, pitture, cosmetici e prodotti per la cura della persona, ma sono usati molto spesso anche nel settore dell'edilizia e delle costruzioni (Gaines, 2023; Hansen et al., 2001).

1.2.2) STRUTTURA MOLECOLARE E CARATTERISTICHE CHIMICHE DEI PFAS

I PFAS sono caratterizzati da uno scheletro carbonioso in cui i carboni sono saturati principalmente da atomi di fluoro, mentre quelli che non lo sono, sono caratterizzati da un gruppo funzionale come un acido carbossilico, ammina, acido solfonico o altro. Le due parti di cui si compone un PFAS portano a determinarne caratteristiche e proprietà:

- La componente di gruppo funzionale consente a questi composti di interagire con molecole polari;
- La parte fluorurata conferisce al PFAS sia idro che lipofobicità; inoltre, i legami carbonio-fluoro sono quelli che rendono i PFAS estremamente stabili e persistenti (Gaines, 2023; Glüge et al., 2020).

1.2.3) DISTRIBUZIONE DEI PFAS NELL'AMBIENTE

L'estrema stabilità dei PFAS ha fatto sì che essi si siano diffusi ampiamente nell'ambiente, espandendosi a livello mondiale (Bonato et al., 2020). In particolare, si è cominciato a rilevare i PFAS dall'inizio degli anni 2000, e da allora, proseguendo le ricerche e gli studi, sono stati rilevati in numerose matrici come i sedimenti, gli ecosistemi acquatici ma anche negli organismi viventi come pesci, uccelli, mammiferi e l'uomo stesso (Bonato et al., 2020; Piva et al., 2023).

Se si considerano poi gli acidi perfluoroalchilici (PFAA), facenti parte dei PFAS, essi risultano estremamente persistenti nell'ambiente, tanto che sono presenti in tutti gli oceani e sono stati anche rilevati in aree remote come l'Antartide, dove però il passaggio di sostanze dagli oceani Atlantico, Pacifico e Indiano a quello Meridionale

è molto limitato a causa della presenza della Corrente Circumpolare Antartica: ciò ha portato a supporre che un importante meccanismo di trasporto dei PFAA, oltre che quello tramite le correnti marine, possa essere quello del trasporto atmosferico, con successiva ossidazione e deposizione atmosferica (Casas et al., 2023).

In particolare, è verificato che l'acido perfluorooctansolfonico (PFOS) e l'acido perfluorooctanoico (PFOA), che sono i due acidi perfluoroalchilici a catena lunga più utilizzati, possono essere trasportati in due modi:

- Attraverso le correnti oceaniche (OCTs) e l'aerosol marino
- Attraverso trasporto atmosferico a lungo raggio (LRAT) (Olech et al., 1998; Pacchini et al., 2023).

È importante sottolineare il fatto che, ancora oggi, esistono ampie lacune per quanto riguarda le informazioni sui PFAS, come ad esempio la localizzazione, la quantità di produzione di alcuni di essi e le finalità d'uso; di conseguenza molto spesso ciò si traduce in difficoltà nell'identificare dove si verificano l'esposizione umana e quella ambientale a tali sostanze (Evich et al., 2022).

In questo lavoro di tesi mi sono occupata in particolare del PFOA, che è tra i PFAA più studiati dal punto di vista della sua insorgenza e del suo impatto (Casas et al., 2023).

Si tratta di un composto a catena lunga (figura 1.5), infatti è costituita da una catena di otto atomi di carbonio; questa struttura viene detta composto C8 (Ma et al., 2024). Ha forti proprietà tensioattive e per questo viene sfruttato molto in vari settori industriali.

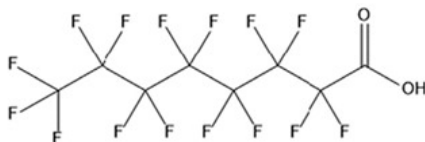


Figura 1.2: acido perfluorooctanoico (PFOA)

Esso è molto persistente e tende a bioaccumularsi. Nelle persone e negli animali, si distribuisce principalmente nel fegato e nel plasma e può provocare epatotossicità, cancerogenicità, neurotossicità e genotossicità (Yang et al., 2014).

1.3) LE SPECIE REATTIVE DELL'OSSIGENO (ROS)

La produzione di specie reattive dell'ossigeno (ROS) negli organismi aerobi è un fenomeno naturale, in quanto è provocato dal processo di assorbimento progressivo di elettroni da parte dell'ossigeno molecolare, durante la respirazione cellulare (Demirci-Çekiç et al., 2022). Gli organismi aerobi, infatti, utilizzano l'ossigeno come accettore finale di elettroni nella catena di trasporto di essi, e la reazione che avviene è la riduzione di ossigeno ad acqua (figura 1.3). Questo processo è fondamentale per la produzione di energia sotto forma di ATP attraverso la fosforilazione ossidativa (Poli et al., 2018).

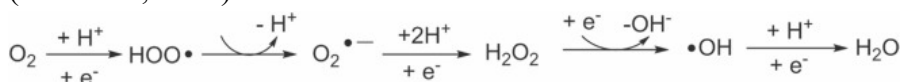


Figura 1.3: la riduzione graduale di O₂ ad acqua nella catena respiratoria (Demirci-Çekiç et al., 2022)

È però verificato che inevitabilmente una parte dell'ossigeno molecolare usato dalla cellula (circa il 3%) reagisce con gli elettroni e va quindi a formare degli intermedi reattivi.

Gli intermedi reattivi dell'ossigeno possono essere:

- Specie radicaliche quali, ad esempio, radicale superossido ($\cdot\text{O}_2^-$), radicale idrossile ($\cdot\text{OH}$) e ossigeno singoletto ($\cdot\text{O}_2$);
- Specie non radicaliche quale il perossido di idrogeno (H_2O_2) (Poli et al., 2018).

Le specie reattive dell'ossigeno sono caratterizzate dall'aver uno o più elettroni spaiati, il che conferisce elevata reattività a questi elementi.

Si può inoltre fare una distinzione tra ROS primarie e secondarie: la ROS 'primaria' è l'anione superossido, ed è detto così poiché è quello che, interagendo con altre molecole, può formare le ROS 'secondarie'. L'anione superossido viene prodotto principalmente all'interno dei mitocondri, a causa del fatto che alcuni elettroni vengono 'persi' dalla catena di trasporto e contribuiscono quindi alla formazione di questo ione che, acquisendo elettroni e trovandosi nella sua forma anionica, sarà troppo carico per attraversare la membrana mitocondriale interna.

Le ROS possono avere sia effetti positivi che negativi sugli organismi viventi: gli effetti positivi si hanno quando si è in condizioni di "equilibrio redox" o "omeostasi redox", che si verifica quando le specie reattive dell'ossigeno sono presenti a basse concentrazioni; in questo caso hanno appunto funzione benefica, come può essere, ad esempio, l'induzione di una risposta mitogenica; al contrario l'effetto dannoso, detto stress ossidativo, avviene quando si ha un disequilibrio delle reazioni pro-ossidanti/antiossidanti in un organismo vivente (Valko et al., 2007). Tale stress ossidativo può poi portare a conseguenze molto dannose, in quanto le ROS vanno ad ossidare macromolecole biologiche quali lipidi, proteine, DNA, causando inattivazione di enzimi, danni al DNA e aumento dei livelli di malondialdeide (quest'ultimo fenomeno è una conseguenza dell'ossidazione di acidi grassi polinsaturi) (Bonato et al., 2020; Poli et al., 2018). Inoltre, i prodotti generati dai danni alle macromolecole possono a loro volta andare ad agire da segnali ossidanti secondari (Sies & Jones, 2020).

La formazione delle ROS è favorita da varie condizioni quali esposizione dell'organismo vivente a fattori di stress fisico (come, ad esempio, raggi UV e raggi X), stress psicologico, stress meccanico, stress termico, ipossia ed elevata pressione (Poli et al., 2018; Sies & Jones, 2020).

Quest'ultima situazione si presenta proprio nelle acque dell'Oceano Antartico: infatti le basse temperature favoriscono la dissoluzione dei gas all'interno dell'acqua stessa, e si ha quindi maggiore pressione parziale di ossigeno nell'acqua, nei tessuti e anche all'interno delle cellule degli organismi stessi (Abele & Puntarulo, 2004).

Il fatto che l'ossigeno, se presente a pressioni elevate porti a stress ossidativo, però allo stesso tempo costituisca una molecola essenziale per la sopravvivenza degli organismi aerobi, costituisce il 'paradosso dell'ossigeno' (Salvagno et al., 2022).

Un altro fattore che favorisce la formazione delle ROS è l'interazione della cellula con composti xenobiotici, come i contaminanti chimici. Ne sono un esempio i PFAS,

sui quali diversi studi sperimentali hanno confermato la correlazione tra la tossicità indotta dagli xenobiotici e un aumento di formazione di ROS, con conseguente maggior rischio di stress ossidativo (Buytaert et al., 2023; Poli et al., 2018). I PFAS possono infatti bioaccumularsi nei tessuti animali e biomagnificare lungo le reti trofiche, influenzando la produzione di ROS a livello molecolare e portando a uno squilibrio redox cellulare. Ciò può provocare la morte cellulare, danni al DNA, alterazione della funzione enzimatica e conseguenti danni ossidativi all'interno dell'organismo (Panieri et al., 2022; Piva et al., 2022).

1.4) LE DIFESE ANTIOSSIDANTI

Le cellule possiedono delle difese antiossidanti (figura 1.4) che hanno evoluto con lo scopo di agire da scavenger delle ROS, in modo da mantenere il più possibile un equilibrio redox ed inibire la propagazione dello stress ossidativo (Santovito et al., 2005). Esistono difese antiossidanti di due tipi:

- difese antiossidanti non enzimatiche: si tratta di molecole a basso peso molecolare, tra cui si hanno composti sintetizzati dalla cellula stessa, come ad esempio le metallotioneine (MT), glutatione (GSH), e composti che sono perlopiù assunti con la dieta, quali le vitamine C, E, B6, B9, B12, provitamina A, polifenoli.
- difese antiossidanti enzimatiche: le reazioni che danno questi enzimi possono creare composti che sono ancora una volta reattivi e tossici per la cellula, quali il perossido di idrogeno.

Sono antiossidanti enzimatici, per esempio, superossido dismutasi (SOD), catalasi (CAT), glutatione perossidasi (GPx) (Poli et al., 2018).

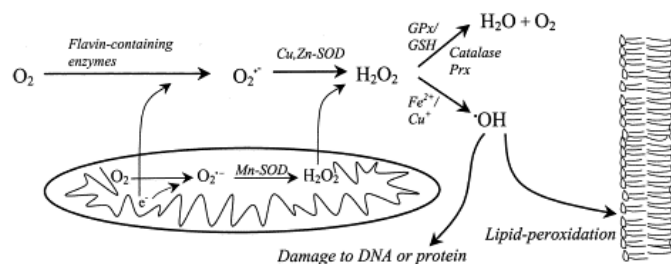
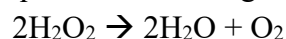


Figura 1.4: schema semplificato dei sistemi ossidativo ed antiossidante nelle cellule (Nordberg ed Arnér, 2001)

1.4.1) LA CATALASI

La catalasi, o più correttamente idroperossidasi, è un tetramero composto da quattro subunità uguali tra loro con un gruppo eme al centro attivo di ogni subunità (Chelikani et al., 2004; Xu et al., 2018). È localizzata principalmente a livello dei perossisomi, anche se è stata trovata in quantità minori anche in citoplasma e mitocondri (Radi et al., 1991).

Questo enzima catalizza la reazione di degradazione di due molecole di perossido di idrogeno in due molecole di acqua ed una di ossigeno molecolare (Xu et al., 2018):



1.4.2) LE GLUTATIONE PEROSSIDASI (GPx)

Le glutatione perossidasi costituiscono una famiglia di enzimi antiossidanti, e sono metalloproteine correlate tra di loro dal punto di vista filogenetico.

Esse catalizzano la reazione di riduzione di perossido di idrogeno o di idroperossidi organici ad acqua o ai corrispondenti alcoli; in questa reazione il composto riducente che dona gli elettroni è il glutatione ridotto (GSH), e le reazioni generali che avvengono sono le seguenti (Sattin et al., 2015):



Attualmente nei vertebrati si conoscono 8 isoforme di GPx: le 1, 2, 3, 4, 6 possiedono il selenio nel sito attivo, mentre le 5, 7, 8 no. La differenza sostanziale tra le GPx dipendenti dal selenio (classe più studiata e diffusa) e quelle non dipendenti, è che le prime possono catalizzare sia le reazioni di riduzione sia dei perossidi organici che non organici, mentre le seconde solo dei perossidi organici (Ren et al., 2009).

Le Se-GPx hanno un ciclo catalitico che prevede che il selenio venga ossidato da H_2O_2 ad un prodotto intermedio, l'acido selenico, che viene quindi ridotto dal glutatione ridotto (GSH) (Poli et al., 2018).

2) SCOPO DELLA TESI

Al giorno d'oggi l'impatto degli inquinanti sull'ambiente e sugli organismi viventi è una questione sempre più rilevante. A causa dei fenomeni di trasporto a lungo raggio, spesso la distribuzione di xenobiotici e sostanze inquinanti non è un evento limitato alle zone circostanti al punto di immissione nell'ambiente, bensì possono essere coinvolti in fenomeni di trasporto globale (Olech et al., 1998)). Nel prossimo futuro poi, con l'aumento della richiesta della produzione di beni per l'uomo, si prevede che vi sarà un ulteriore incremento della diffusione di vari inquinanti a livello globale. In particolare, negli ultimi anni si è osservato un crescente interesse negli studi riguardanti la classe di inquinanti PFAS, che destano preoccupazione a causa dell'utilizzo sempre più elevato che ne fa l'uomo e dei potenziali effetti tossici che possono avere sugli organismi viventi. La mia tesi si focalizza appunto su un inquinante facente parte della classe degli PFAS, ovvero l'acido perfluorooctanoico, e sugli effetti che esso ha avuto su organismi appartenenti alla specie *Adamussium colbecki*. È infatti dimostrato che l'acido perfluorooctanoico induce stress ossidativo negli organismi, al quale essi possono rispondere tramite produzione di enzimi antiossidanti (Piva et al., 2022). In questo studio in particolare è stata valutata l'attività degli enzimi catalasi (CAT) e glutatione perossidasi (GPx).

La scelta dell'analizzare organismi appartenenti alla specie *Adamussium colbecki* si motiva innanzitutto dal fatto che essi, essendo endemici dell'ambiente marino antartico, caratterizzato da temperature molto basse (di media $-0,8^{\circ}$), vivono in un ambiente che presenta una elevata pressione parziale di ossigeno, ed hanno quindi un sistema antiossidante già efficiente e sviluppato (Regoli et al., 2002). Con la previsione però di un aumento della circolazione globale di PFAS in futuro, risulta molto importante capire quali possano essere le conseguenze di un'esposizione a concentrazioni relativamente elevate di questo inquinante sugli organismi viventi, aspetto che appunto è stato valutato nel presente studio mediante esposizione degli organismi ad uno stress acuto (esposizione a PFOA per 10 giorni a concentrazione di $1,5 \mu\text{g/L}$).

Gli effetti sono stati analizzati su organi specifici, ovvero le branchie e le ghiandole digestive. Si è scelto di esaminare tali organi per i seguenti motivi: le branchie sono caratterizzate dall'epitelio secondario, che è molto esteso e in contatto diretto con l'ambiente esterno, e inoltre sono coinvolte nella respirazione, osmoregolazione ed escrezione, il che implica che siano la parte dell'organismo più direttamente esposta all'inquinante (Poleksić et al., 1994). La ghiandola digestiva, invece, è rilevante da considerare in quanto costituisce un tessuto bersaglio degli xenobiotici: questo è dovuto principalmente al fatto che i lisosomi delle ghiandole digestive sono responsabili, oltre che della digestione intracellulare dei nutrienti, anche della difesa antiossidante, e sono inoltre anche organelli deputati al sequestro e alla disintossicazione di metalli pesanti ed inquinanti organici (Faggio et al., 2018).

3) MATERIALI E METODI

3.1) DESCRIZIONE DELLA SPECIE TARGET

Gli organismi presi in considerazione in questo studio appartengono alla specie *Adamussium colbecki* (figura 3.1). Si tratta di un mollusco bivalve, ed è stato individuato come organismo adatto a biomonitorare quelli che sono gli impatti dell'attività umana anche a grandi distanze dalle zone antropizzate (Berkamn e Nigro, 1992; Mauri et al., 1990). Inoltre, tale specie costituisce la maggior parte della biomassa bentonica antartica ed è quindi rappresentativa dell'ecosistema marino antartico (Mauri et al., 1990).



Figura 3.1: individuo di *Adamussium colbecki* (G. Moro et al., 2019)

3.2) CAMPAGNA DI CAMPIONAMENTO

Il prelievo degli organismi di *Adamussium colbecki* è avvenuto durante la XXXVII spedizione italiana in Antartide (periodo 2021-2022) nelle vicinanze della stazione italiana Mario Zucchelli, che si colloca nella Baia di Terra Nova dinnanzi al Mare di Ross (74°42'S, 164°7'E).

3.3) TRATTAMENTO DELLA SPECIE TARGET

Gli esemplari prelevati sono stati quindi portati in laboratorio all'interno della stazione di ricerca (figura 3.2) e sono stati inseriti all'interno di acquari aerati e termostati a 0° per 4 giorni, in modo che si potessero acclimatare in conseguenza dello stress causato dalla cattura. Gli organismi sono quindi stati poi inseriti all'interno di due vasche nelle quali sono rimasti per 10 giorni: una parte degli organismi è stato inserito nella vasca che conteneva una concentrazione dell'inquinante PFOA di 1,5 µg/L mentre altri organismi sono stati inseriti in una vasca che simulava l'ambiente esterno in cui vivono normalmente. Dopo i 10 giorni gli organismi sono quindi stati prelevati dalle vasche, sacrificati e dissezionati, separando i tessuti molli dal guscio e andando ad isolare gli organi di interesse, branchie e ghiandola digestiva. Gli organi raccolti sono stati quindi immediatamente congelati in azoto liquido e conservati a -80°, per poi essere trasportati in Italia per le successive analisi di laboratorio.

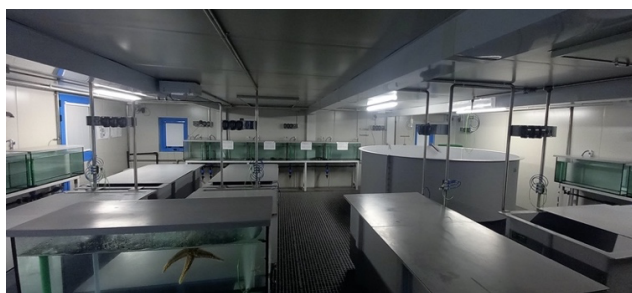


Figura 3.2: laboratorio situato nella stazione italiana Mario Zucchelli (foto del PNRA)

3.4) OMOGENEIZZAZIONE DEI CAMPIONI

I tessuti da esaminare sono stati omogeneizzati meccanicamente in un volume di tampone di omogeneizzazione pari a 4 volte il peso in grammi del campione, utilizzando il Polytron (figura 3.3).

Il tampone utilizzato era formato da Tris HCl 10 mM (pH 7,6), 1,4-Ditio-treitolo (DTT) 1mM, KCl 0,15 M e saccarosio 0,5 M.

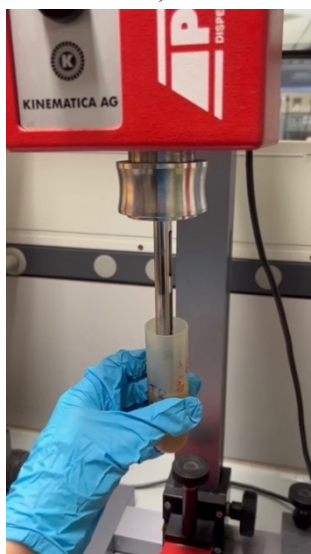


Figura 3.3: omogeneizzazione attraverso Polytron

I campioni sono stati poi centrifugati attraverso centrifuga Beckam per 50 minuti a 20,000 rpm ad una temperatura di 4°C. Attraverso questo procedimento sono state ottenute due fasi separate, isolando quindi la fase di surnatante, che è quella di interesse. Il surnatante di ogni campione è stato aliquotato in provette Eppendorf. L'estratto cellulare è stato congelato in azoto liquido e conservato a -80°C, ed è poi stato utilizzato nelle successive analisi biochimiche.

3.5) DOSAGGIO PROTEICO SECONDO LA METODICA DI *LOWRY ET AL.* (1951)

Questo protocollo permette di determinare il contenuto proteico dell'estratto cellulare, espresso come concentrazione proteica in mg/ml, tramite l'utilizzo del reagente fenolico Folin-Ciocalteu secondo la metodica di Lowry et al (1951). La concentrazione proteica di ciascun campione è determinata attraverso la regressione

lineare tra quantità note e crescenti di standard, il quale consiste in albumina sierica bovina (BSA), e relativi valori di assorbanza misurati a lunghezza d'onda di 750 nm.

I reagenti utilizzati in questo saggio sono i seguenti:

- Soluzione A: Na_2CO_3 2% NaOH 0,1 M
- Soluzione B: $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 0,5% in citrato di sodio 1%
- Soluzione C: 25 mL di soluzione A + 0,5 mL di soluzione B (rapporto 1 a 50)
- Soluzione D: 1,36 mL di H_2O addizionata di 1 mL di folin.
- BSA
- Tampone di omogeneizzazione
- Campioni

La prima parte di questo saggio è consistita nell'ottenimento della retta di taratura. Per farlo si è proceduto andando a preparare una serie di provette contenenti le seguenti soluzioni nelle seguenti quantità (figura 3.4):

n° provette	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Albumina (μL)	0	0	5	5	10	10	20	20	30	30	40	40
H_2O milliQ (μL)	200	200	195	195	190	190	180	180	170	170	160	160
Soluzione D (μL)	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
Soluzione C (mL)	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1

Figura 3.4: schema delle soluzioni usate per creare la retta di taratura

Si è proceduto con le letture di assorbanza con lo spettrofotometro impostato ad una lunghezza d'onda di 750 nm, e con tali misure è stata costruita la retta di taratura (figura 3.5).

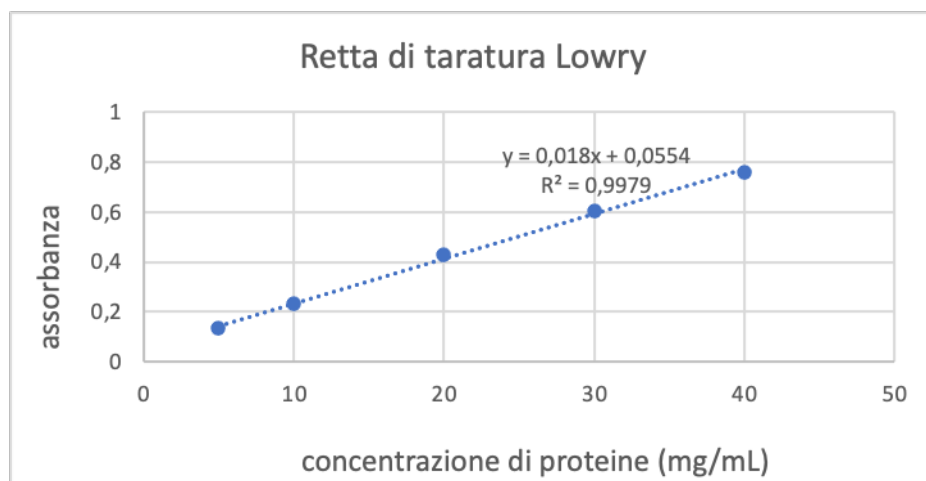


Figura 3.5: retta di taratura che presenta in ascissa la concentrazione di proteine (espressa in mg/mL) e in ordinata il corrispondente valore di assorbanza rilevato tramite spettrofotometro.

Successivamente è stato ripetuto il protocollo precedentemente svolto per ottenere la retta di taratura, ma sostituendo all'albumina quantità note di campione. Le dosi utilizzate per le soluzioni contenenti i campioni sono state le seguenti: 4 μL di campione, 196 μL di acqua milliQ, 100 μL di soluzione D e 1 mL di soluzione C (figura 3.6). Nei bianchi invece il volume di campione è stato sostituito da un uguale volume di tampone di omogeneizzazione. Sia i bianchi che i campioni sono stati analizzati in doppio.

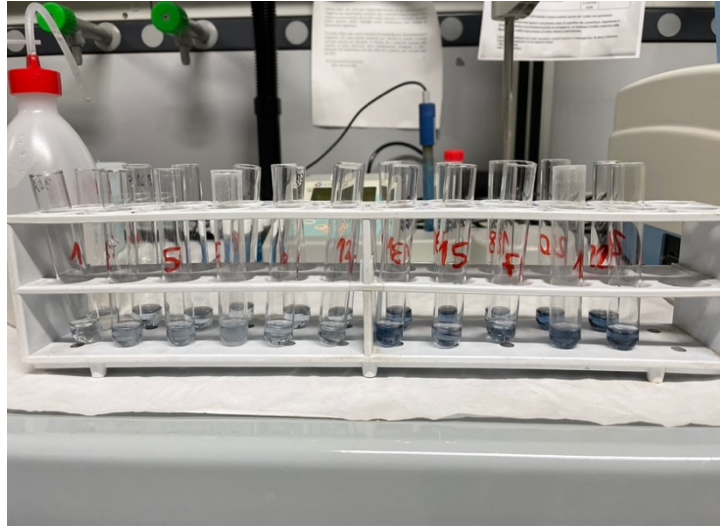


Figura 3.6: provette contenenti soluzioni con 4 μL di branchia (prime 6 provette a sinistra) e provette contenenti soluzioni con 4 μL di ghiandola digestiva (ultime 5 provette a destra). Si può osservare come le provette contenenti campioni di ghiandola digestiva siano colorate più intensamente, poiché più concentrate in proteine.

Dopo aver rilevato assorbanza dei bianchi e dei campioni, è stata calcolata la concentrazione di proteine in ogni campione. Per farlo si è presa in considerazione prima di tutto la seguente equazione che è quella della retta di taratura: $y = 0,018x + 0,0554$, in cui y rappresenta l'assorbanza (nota), x la concentrazione di proteine da determinare, 0,001 è il fattore di conversione da μg a mg . Da questa si ricava quindi il calcolo da eseguire per ottenere la concentrazione proteica per mL di campione:

$$\frac{\text{mg di proteine}}{\text{mL}} = \frac{y - 0,0554}{0,018} \times \frac{0,001}{\text{mL di campione}}$$

3.6) DOSAGGIO DELL'ATTIVITÀ CATALASICA SECONDO LA METODICA DI AEBI (1984)

L'attività catalasica viene misurata in questo saggio, che viene svolto secondo la metodica di Aebi (1984), mediante misura della diminuzione dell'assorbanza nell'unità di tempo, derivata dalla dismutazione del perossido di idrogeno. Per il saggio è stata necessaria la preparazione di tampone di omogeneizzazione, tampone fosfato ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 - \text{NaH}_2\text{PO}_4$ 50 mM pH 7,5) ed H_2O_2 50 mM.

Il saggio è stato eseguito in doppio per ogni campione e per il bianco. Per le letture di assorbanza, nel caso delle soluzioni contenenti i campioni sono stati inseriti nella cuvetta il tampone fosfato e il campione, per un volume totale di 2 mL, mentre per i bianchi il campione è stato sostituito da un pari volume di tampone di omogeneizzazione. Ad ognuna di queste soluzioni, appena prima di inserire la cuvetta dentro allo spettrofotometro, veniva aggiunto molto velocemente 1 mL di H₂O₂.

L'assorbanza è stata letta a 240 nm e ne venivano rilevati due valori: uno iniziale, e uno finale, che era funzione della cinetica enzimatica. Il valore di assorbanza finale è stato rilevato ad un tempo di 1 minuto dall'assorbanza rilevata inizialmente.

In questo saggio l'attività enzimatica viene espressa come unità di catalasi (ovvero la quantità di enzima che in 1 minuto provoca l'ossidazione di 1 mmole di H₂O₂) per mL di soluzione, e la si calcola tramite la seguente formula:

$$\frac{U\ CAT}{mL} = \frac{(A_i - A_f)}{t} \times \frac{V\ totale}{V\ campione} \times 1000$$

A_i e A_f si riferiscono all'assorbanza media iniziale e finale, 40 è il coefficiente di estinzione millimolare di H₂O₂, t è il tempo che intercorre tra la prima e l'ultima misura di assorbanza (in minuti) e 1000 è il fattore di conversione da mmoli a μmoli.

I valori finali vengono poi normalizzati rispetto al contenuto proteico, ottenuto nel saggio precedente, tramite la seguente formula:

$$\frac{U\ CAT}{mg\ di\ proteine} = \frac{\frac{U\ CAT}{mL}}{\frac{mg\ di\ proteine}{mL}}$$

3.7) DOSAGGIO DELLE GLUTATIONE PEROSSIDASI SE-DIPENDENTI SECONDO LA METODICA DI *LIVINGSTONE ET AL. (1992)*

In questo saggio viene misurata la velocità di ossidazione del NADPH operata dall'eccesso di glutatione reduttasi (GR) per la riduzione del GSSG a GSH.

Per svolgere tale saggio è stato necessario preparare una stock solution composta da NADPH (0,15 mM), e GSH (2,5 mM), NaN₃ (1,25 mM) in tampone fosfato (125 mM, pH 7.5).

Le soluzioni di cui si è andati a rilevare l'assorbanza sono i bianchi (composti da 800 μL di stock solution, 100 μL di tampone di omogeneizzazione e 100 μL H₂O₂) e le soluzioni contenenti i campioni. Queste ultime erano composte da 800 μL di stock solution, 100 μL H₂O₂ e 100 μL di campione nel caso delle branchie mentre 800 μL di stock solution, 100 μL di H₂O₂, 10 μL di campione e 90 μL di tampone di omogeneizzazione nel caso delle ghiandole digestive. Sia per i bianchi che per i campioni l'H₂O₂ è stata aggiunta appena prima di inserire la cuvetta nello spettrofotometro, poiché costituisce il substrato per le GPx selenio dipendenti.

È stata seguita la cinetica enzimatica prendendo i valori di assorbanza ogni minuto per verificare la linearità del decremento.

L'attività enzimatica della GPX Se-dipendente, che si calcola come nmol di NADPH ossidato al minuto per mL di soluzione, è stata poi calcolata tramite l'applicazione della seguente formula:

$$\frac{U_{GPx}}{mL} = \frac{(A_i - A_f)}{\Delta t / 6,22} \times \frac{1000}{V_{\text{campione}}}$$

Dove:

A_i corrisponde all'assorbanza media iniziale

A_f corrisponde all'assorbanza media finale

Δt è il tempo intercorrente tra la prima e l'ultima misura di assorbanza (in secondi)

6,22 è una costante per normalizzare i risultati e convertire l'attività enzimatica misurata in unità specifiche

1000 è il fattore di conversione da mL a L

Tale valore viene poi normalizzato rispetto al contenuto proteico tramite la seguente formula:

$$\frac{U_{GPx}}{mg \text{ di proteine}} = \frac{\frac{U_{GPx}}{mL}}{\frac{mg \text{ di proteine}}{mL}}$$

3.8) DOSAGGIO DELLE GLUTATIONE PEROSSIDASI TOTALI SECONDO LA METODICA DI *LIVINGSTONE ET AL.* (1992)

In questo saggio viene quantificata l'attività delle GPx sia Se-dipendenti che di quelle Se-indipendenti, in quanto il substrato utilizzato è il cumene idroperossido, ovvero un perossido organico, la cui riduzione può essere catalizzata da entrambi i tipi di GPx.

Le soluzioni per svolgere tale saggio sono le stesse che si sono utilizzati nel saggio per il dosaggio delle GPx Se-dipendenti, ovvero stock solution e tampone di omogeneizzazione. In aggiunta a tali soluzioni è stato necessario preparare una soluzione di cumene idroperossido 30 mM che ha funto da substrato per la GPx totale.

In questo saggio sono state rilevate le assorbanze dei bianchi e delle soluzioni contenenti i campioni (in doppio), la cui composizione era uguale a quella del saggio precedente, ad eccezione dell' H_2O_2 che è stato sostituito in questo saggio dal CHP.

Anche in questo caso poi, si è andati successivamente a calcolare l'attività enzimatica della GPx su mL di soluzione, per poi normalizzarla su mg di proteine.

3.9) ANALISI STATISTICA

I valori ottenuti sono riportati come media +/- deviazione standard. Per verificare che i risultati ottenuti siano statisticamente significativi, è stata effettuata l'analisi utilizzando il t-test. Sono quindi stati considerati significativi valori con $p < 0,05$.

4) RISULTATI

Analizzando i risultati riguardanti il saggio dell'attività dell'enzima catalasi (figura 4.1), ciò che si può constatare è che nelle branchie si ha una maggiore attività dell'enzima negli individui esposti all'inquinante. In particolare, l'attività dell'enzima negli individui esposti a PFOA risulta aumentata del 113% rispetto che negli individui non esposti all'inquinante. Nelle ghiandole digestive, invece, l'attività dell'enzima catalasi risulta praticamente invariata negli individui esposti a PFOA; può essere anzi colta una leggera diminuzione dell'attività dell'enzima in seguito ad esposizione all'inquinante, tuttavia, la differenza non risulta statisticamente significativa (si ha $p > 0,05$).

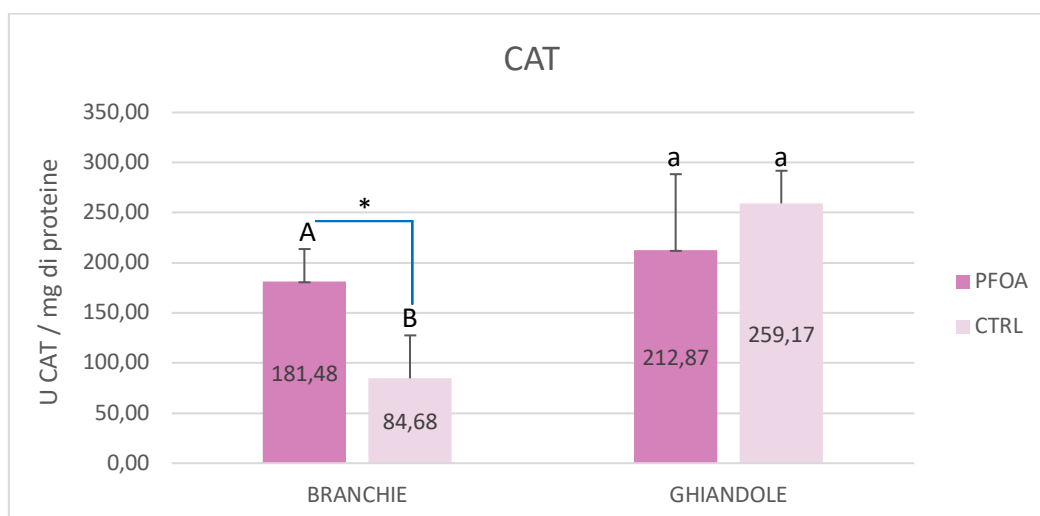


Figura 4.1: Attività della catalasi nei tessuti di branchie e ghiandole digestive di *A. colbecki*: confronto tra gruppo di controllo e gruppo esposto a PFOA. Lettere diverse o carattere diverso indicano differenze statisticamente significative per $p < 0.05$.

Ciò che invece emerge dall'analisi dei risultati del dosaggio dell'attività dell'enzima GPx Se-dipendente osservando la figura 4.2 è che, sia nel caso delle branchie che nel caso delle ghiandole digestive si ha una maggiore attività dell'enzima negli individui esposti all'inquinante rispetto ai controlli, e in entrambi i casi le differenze sono statisticamente significative. In particolare, nelle branchie, in seguito ad esposizione a PFAO, si ha un aumento dell'attività enzimatica del 125%, mentre nelle ghiandole del 152% rispetto ai controlli.

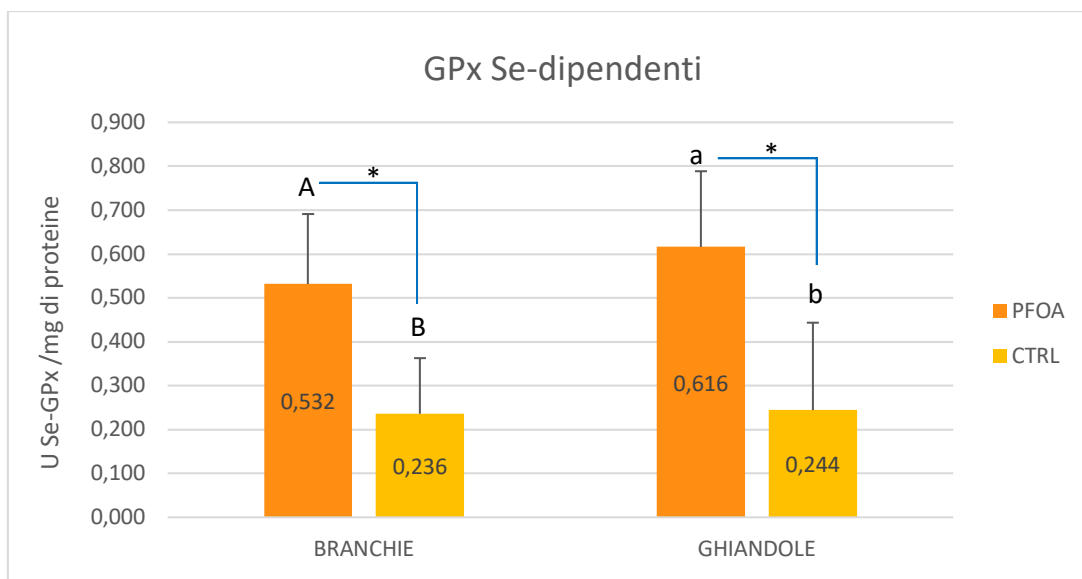


Figura 4.2: Attività delle glutazione perossidasi selenio-dipendenti nei tessuti di branchie e ghiandole digestive di *A. colbecki*: confronto tra gruppo di controllo e gruppo esposto a PFOA. Lettere diverse o carattere diverso indicano differenze statisticamente significative per $p < 0.05$.

Osservando i risultati relativi al saggio delle GPx totali, e quindi osservando il grafico in figura 4.3, si nota che si presenta una situazione piuttosto simile a quella dell'enzima catalasi, in quanto nel caso delle branchie, negli individui esposti a PFOA l'attività degli enzimi risulta maggiore rispetto agli organismi di controllo (in particolare l'attività enzimatica è maggiore del 43%), mentre nelle ghiandole risulta che gli organismi esposti a PFOA presentano una variazione praticamente nulla dell'attività enzimatica rispetto ai controlli. In entrambi i casi però, le differenze non risultano statisticamente significative.

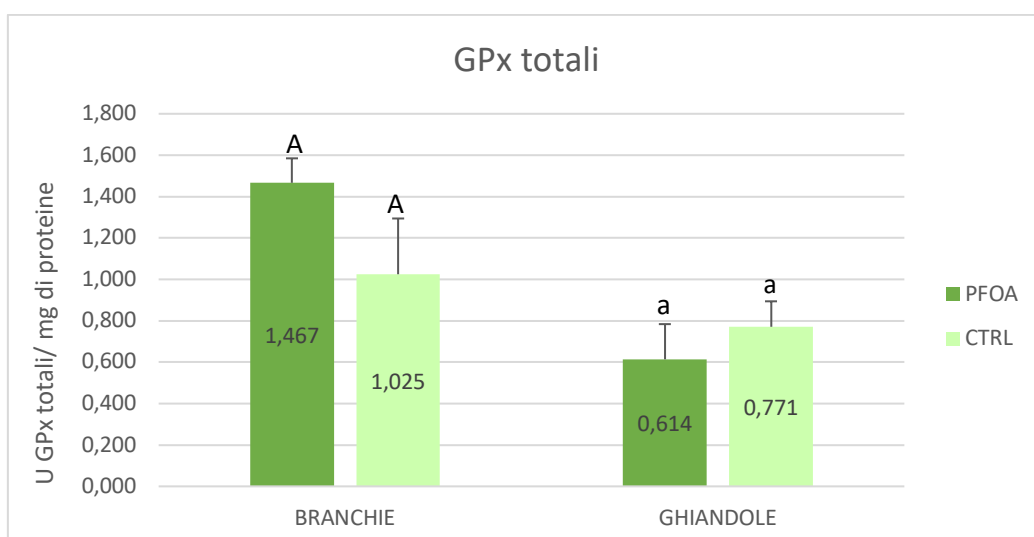


Figura 4.3: Attività delle glutazione perossidasi totali nei tessuti di branchie e ghiandole digestive di *A. colbecki*: confronto tra gruppo di controllo e gruppo esposto a PFOA. Lettere diverse o carattere diverso indicano differenze statisticamente significative per $p < 0.05$.

5) DISCUSSIONE E CONCLUSIONI

Negli ultimi anni, assieme all'incremento di produzione di beni industriali atti al consumo umano, è cresciuta anche la preoccupazione verso i possibili effetti di alcune sostanze molto utilizzate nell'ambito della produzione industriale sull'uomo e in generale sull'ambiente naturale. Risulta infatti fondamentale approfondire la conoscenza di tali sostanze, che si prevede saranno in futuro sempre più diffuse e circolanti nell'ecosistema.

Tra le sostanze che hanno destato maggiore preoccupazione nell'ultimo decennio vi sono sicuramente i PFAS, composti prodotti sinteticamente dall'uomo e molto sfruttati in un'ampia gamma di settori industriali (Glüge et al., 2020). A causa della loro elevata persistenza nell'ambiente sono stati negli ultimi anni fonte di studi e dibattiti, sottolineando la necessità critica di indagare sui loro impatti. In particolare, risulta interessante approfondire lo studio dei PFAS andando a valutarne gli effetti in ambienti remoti e meno impattati dall'uomo, quale ad esempio l'Antartide. Si tratta di un ambiente molto sensibile agli impatti da parte di sostanze antropiche: questo ecosistema, infatti, ospita molte specie endemiche che sono adattate a condizioni estreme e sulle quali risulta interessante studiare le conseguenze dell'esposizione a inquinanti (Bengtson, 2011).

Nel caso del mio studio è stato valutato l'impatto dell'esposizione a PFOA in *Adamussium colbecki*, organismo endemico dell'Antartide, dal punto di vista delle risposte antiossidanti. In quanto organismo endemico dell'Antartide, esso è adattato alle basse temperature e alle alte concentrazioni di ossigeno disciolto nell'acqua, essendo dotato di un sistema antiossidante ben sviluppato (Regoli et al., 2002). Ciò che è stato fatto però nel presente studio è stato valutare la risposta antiossidante in seguito ad esposizione di organismi della presente specie a PFOA il quale, essendo una sostanza xenobiotica, può provocare stress ossidativo.

In particolare, sono stati utilizzati come bioindicatori le attività degli enzimi catalasi, glutatione perossidasi selenio dipendenti e glutatione perossidasi totali.

Ciò che emerge osservando prima di tutto i risultati riguardanti l'attività dell'enzima catalasi, è che, nel caso delle branchie, gli individui che sono stati esposti a PFOA presentano una maggiore attività dell'enzima rispetto ai controlli: questa può essere interpretata come una risposta allo stress ossidativo provocato dall'inquinante stesso. Si può infatti ipotizzare che il PFOA abbia portato alla formazione di specie reattive dell'ossigeno, tra cui perossido di idrogeno; per contrastare ciò ed evitare lo stress ossidativo, l'organismo avrebbe aumentato la produzione dell'enzima catalasi, che si occupa appunto di catalizzare la reazione di dismutazione dell' H_2O_2 in molecole meno dannose per l'organismo.

Nel caso delle ghiandole digestive invece, si nota innanzitutto che l'attività della catalasi negli organismi di controllo risulta superiore a quella rilevata nelle branchie degli organismi di controllo. Ciò è plausibile e sostenuto da uno studio di Santovito et al. (2012), nel quale viene dimostrato che il fegato (che nei molluschi corrisponde appunto alla ghiandola digestiva) è l'organo con la maggiore attività catalasica.

Operando invece un confronto tra le ghiandole digestive degli organismi di controllo e di quelli esposti a PFOA, si nota che non si ha praticamente variazione dell'attività enzimatica in seguito all'esposizione all'inquinante. In merito a ciò, si può ipotizzare che l'elevato stress ossidativo possa aver compromesso l'attività dell'enzima. Potrebbe apparire contraddittorio il fatto che nelle ghiandole digestive vi sia una elevata attività catalasica e che, in seguito all'esposizione a PFOA, essa sembra essere stata compromessa. Bisogna però tenere conto del fatto che le ghiandole hanno elevata capacità di accumulo di sostanze inquinanti. Ciò è stato dimostrato anche nello studio di Li et al. (2021), in cui è stato verificato che, successivamente all'esposizione per 14 giorni a PFOA dei bivalvi della specie *M. edulis*, in quasi tutti i gruppi di trattamento l'inquinante era più abbondante nella ghiandola digestiva più che in qualsiasi altro tessuto. Il maggiore accumulo di PFOA nelle ghiandole digestive rispetto che nelle branchie è supportato anche dai dati relativi al bioaccumulo negli organismi studiati nella presente tesi e forniti dall'Università di Bologna in seguito ad analisi (figura 5.1).

BIOACCUMULO PFOA ($\mu\text{g}/\text{Kg}$)	
BRANCHIE	GHIANDOLE DIGESTIVE
3,3	27

Figura 5.1: dati di bioaccumulo di PFOA in organismi della specie A. colbecki in seguito all'esposizione degli organismi a 1,5 $\mu\text{g}/\text{L}$ di inquinante per 10 giorni.

Il fatto che tale inquinante si accumuli principalmente nelle ghiandole può implicare il fatto che venga prodotta una quantità di ROS tale da indurre un elevato stress ossidativo, e quindi compromettere la funzionalità dell'enzima antiossidante catalasi. Per supportare tale ipotesi sarebbe opportuno rilevare il livello di stress ossidativo: ciò si può fare ad esempio andando a rilevare la quantità di malondialdeide (MDA), che è un prodotto della perossidazione lipidica, presente nell'organismo, oppure si potrebbe andare a misurare la quantità di perossido di idrogeno tramite la misurazione dell'attività dell'enzima SOD, il quale ha la funzione di dismutare il radicale superossido in H_2O_2 e ossigeno molecolare.

Un ulteriore fattore da considerare riguardante il fatto che nelle ghiandole non vi sia stato un aumento della CAT negli organismi esposti all'inquinante, è che esistono in realtà moltissimi sistemi antiossidanti, enzimatici e non, che possono agire in risposta allo stress ossidativo, quali ad esempio metallothioneine, perossiredossine, vitamina C ed E. È quindi possibile che, in base alla fisiologia dell'organismo che si sta considerando, agiscano alcune specifiche molecole mentre altre abbiano minore attività.

Andando invece a considerare l'attività delle GPx Se-dipendenti, si può notare come, sia nelle branchie che nelle ghiandole digestive vi sia un aumento dell'attività

enzimatica negli organismi che sono stati esposti a PFOA, e tali variazioni sono statisticamente significative. Si può quindi ipotizzare che anche in questo caso sia avvenuto ciò che era stato descritto per l'enzima catalasi nel caso delle branchie: l'ipotesi è quindi che l'inquinante abbia indotto nell'organismo formazione di ROS, tra cui H_2O_2 , e che quindi tali enzimi, che si occupano appunto dell'eliminazione di questa specie reattiva dell'ossigeno, abbiano aumentato la loro attività.

Si può quindi constatare che le GPx Se-dipendenti, a differenza dell'enzima CAT, sono risultate attive sia nel caso delle branchie che nel caso delle ghiandole digestive. Osservando invece i risultati delle GPx totali si osserva che, come da previsione, l'attività di questi enzimi sia nelle branchie che nelle ghiandole degli organismi di controllo è maggiore rispetto all'attività delle GPx esclusivamente Se-dipendenti (è visibile dalle tre colonne a destra dei grafici di confronto delle figure 5.2 e 5.3). Ciò è un qualcosa di atteso in quanto le GPx totali comprendono sia quelle Se-dipendenti che quelle Se-indipendenti, di conseguenza l'attività deve risultare per forza maggiore.

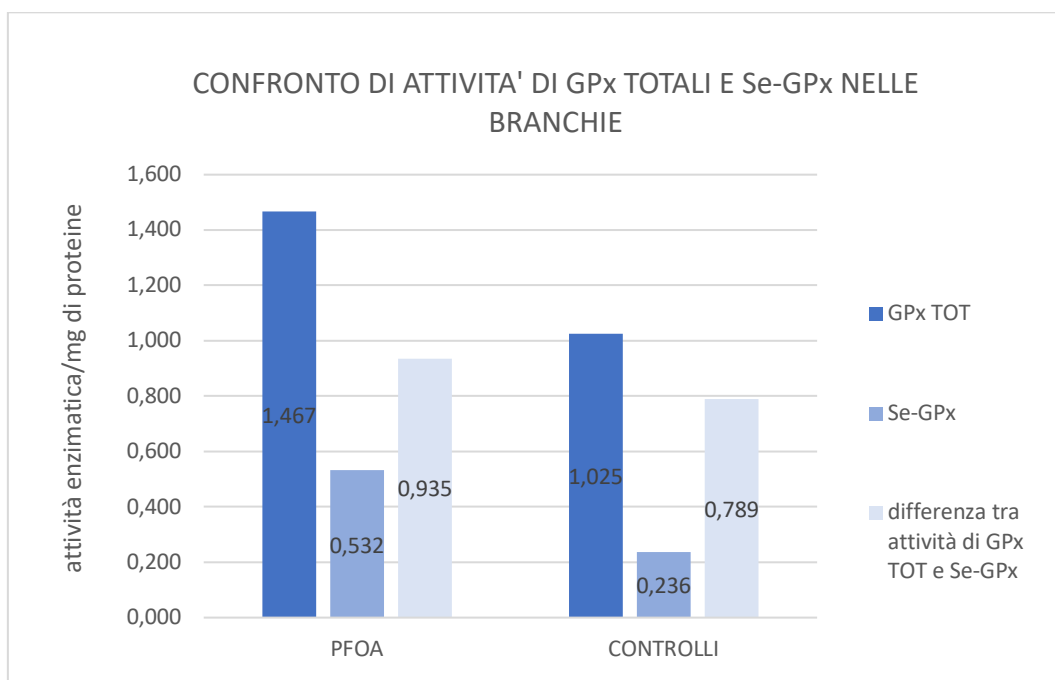


Figura 5.2: risultati dati dal confronto dell'attività delle GPx totali e delle GPx Se-dipendenti nelle branchie di *A. colbecki*.

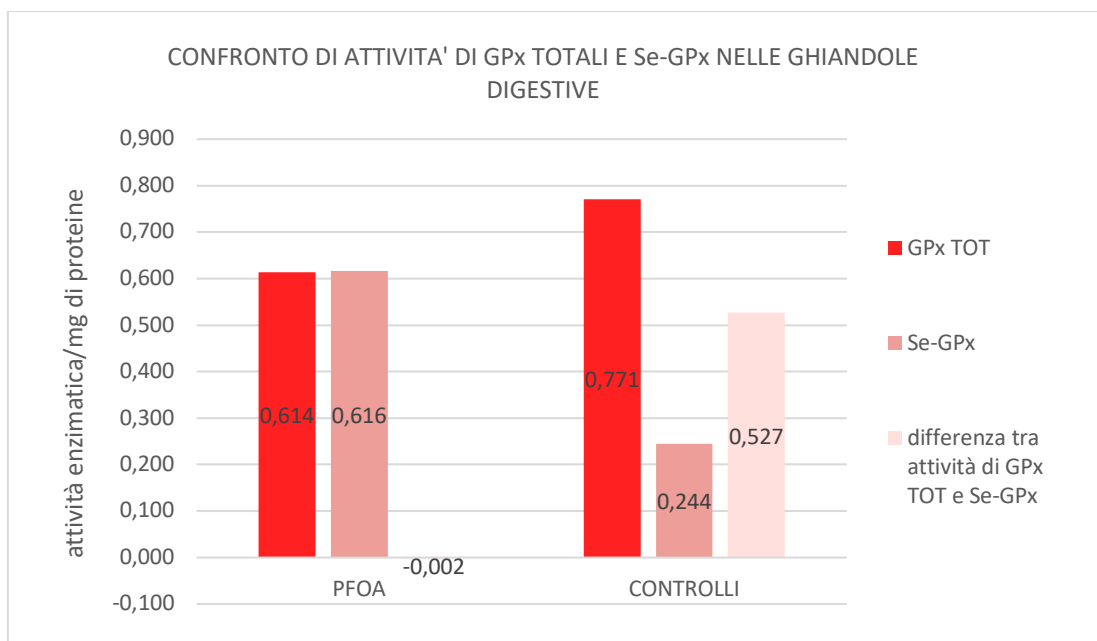


Figura 5.3: risultati dati dal confronto dell'attività delle GPx totali e delle GPx Se-dipendenti nelle ghiandole digestive di *A. colbecki*.

Per quanto riguarda le differenze di attività delle GPx totali tra individui di controllo e individui esposti a PFOA, sia che si considerino le ghiandole digestive che le branchie, tali differenze non sono statisticamente significative. Tuttavia, si possono comunque formulare delle ipotesi. Ciò che si nota è che, come nel caso della CAT, se si considerano le branchie, negli individui esposti a PFOA risulta un'attività enzimatica maggiore rispetto ai controlli, mentre nelle ghiandole non si ha praticamente variazione dell'attività, anzi si può notare una piccola diminuzione. Le ipotesi che si possono avanzare sono le stesse fatte per l'enzima catalasi. In particolare, nel caso ghiandole digestive, l'attività delle GPx, come detto prima, non è aumentata negli individui esposti all'inquinante, bensì ha raggiunto un livello praticamente identico a quello delle Se-GPx rilevato nelle ghiandole degli individui esposti all'inquinante (figura 5.3). Questo può portare a ipotizzare che, in seguito all'esposizione a PFOA, gli enzimi GPx Se-dipendenti abbiano dato risposta adeguata e aumentato la loro attività, mentre il resto delle GPx non risponderebbe all'esposizione allo xenobiotico. Si ricordi infatti che GPx7 e GPx8 sono CysGPx con bassa attività GPx (Brigelius-Flohé & Maiorino, 2013). Per supportare tali ipotesi sarebbe opportuno svolgere ulteriori studi andando ad analizzare e determinare l'espressione genetica dei vari enzimi appartenenti alla classe delle GPx, così da capire quali abbiano agito.

Infine, è bene considerare che l'attività degli enzimi antiossidanti è un qualcosa che dipende dalla fisiologia della specie che si sta considerando, ma che può anche variare nel tempo all'interno di una stessa specie, dipendendo infatti anche dalla stagione e dalla disponibilità di cibo (Liu et al., 2014; Viarengo et al., 1991).

Nel complesso il presente studio ha permesso di evidenziare l'impatto dell'esposizione a un inquinante che desta sempre maggiore preoccupazione e che

quindi è rilevante studiare, ed ha confermato l'utilità di *A. colbecki* come specie per fare biomonitoraggio. Allo stesso tempo risultano necessari e utili ulteriori studi che riguardano l'ecosistema antartico, con lo scopo di approfondire meglio quali possono essere gli impatti futuri di un inquinante rilevante come il PFOA sull'ambiente.

6) BIBLIOGRAFIA

- Abele, D., & Puntarulo, S. (2004).** Formation of reactive species and induction of antioxidant defence systems in polar and temperate marine invertebrates and fish. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*, 138, 405–415. <https://doi.org/10.1016/j.cbpb.2004.05.013>
- Aebi, H. (1984).** Catalase in vitro. *Methods in Enzymology*, 105, 121–126. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(84\)05016-3](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(84)05016-3)
- Battaglia, B., Marcato, S., Patarnello, T., & Bargelloni, L. (1996).** L'evoluzione biologica. Collana *In Antartide.*, PNRA, Museo Nazionale dell'Antartide Felice Ippolito. Dipartimento di Biologia – Università degli Studi di Padova.
- Bengtson Nash, S. (2011).** Persistent organic pollutants in Antarctica: Current and future research priorities. *Journal of Environmental Monitoring*, 13, 497–504. <https://doi.org/10.1039/C0EM00230E>
- Berkman, P. A., & Nigro, M. (1992).** Trace metal concentrations in scallops around Antarctica: Extending the mussel watch programme to the southern ocean. *Marine Pollution Bulletin*, 24, 322–323. [https://doi.org/10.1016/0025-326X\(92\)90594-V](https://doi.org/10.1016/0025-326X(92)90594-V)
- Bonato, M., Corrà, F., Bellio, M., Guidolin, L., Tallandini, L., Irato, P., & Santovito, G. (2020).** PFAS Environmental Pollution and Antioxidant Responses: An Overview of the Impact on Human Field. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 17, 8020. <https://doi.org/10.3390/ijerph17218020>
- Brigelius-Flohé, R., & Maiorino, M. (2013).** Glutathione peroxidases. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*, 1830, 3289–3303. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2012.11.020>
- Buytaert, J., Eens, M., Elgawad, H. A., Bervoets, L., Beemster, G., & Groffen, T. (2023).** Associations between PFAS concentrations and the oxidative status in a free-living songbird (*Parus major*) near a fluorochemical facility. *Environmental Pollution*, 335, 122304. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2023.122304>
- Cabrerizo, A., Dachs, J., Barceló, D., & Jones, K. C. (2013).** Climatic and Biogeochemical Controls on the Remobilization and Reservoirs of Persistent Organic Pollutants in Antarctica. *Environmental Science & Technology*, 47, 4299–4306. <https://doi.org/10.1021/es400471c>
- Casas, G., Iriarte, J., D'Agostino, L. A., Roscales, J. L., Martínez-Varela, A., Vila-Costa, M., Martín, J. W., Jiménez, B., & Dachs, J. (2023).** Inputs, amplification and sinks of perfluoroalkyl substances at coastal Antarctica. *Environmental Pollution*, 338, 122608. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2023.122608>

Casas, G. (2022). *The Antarctic as Sentinel of Global Pollution*. Programma di dottorato, università degli studi di Barcellona.

Cassaro, A., Pacelli, C., Aureli, L., Catanzaro, I., Leo, P., & Onofri, S. (2021). Antarctica as a reservoir of planetary analogue environments. *Extremophiles*, 25, 437–458. <https://doi.org/10.1007/s00792-021-01245-w>

Chelikani, P., Fita, I., & Loewen, P. C. (2004). Diversity of structures and properties among catalases. *Cellular and Molecular Life Sciences (CMLS)*, 61, 192–208. <https://doi.org/10.1007/s00018-003-3206-5>

Colacino, M. (1996). Il clima. Collana *In Antartide.*, PNRA, Museo Nazionale dell'Antartide Felice Ippolito. Istituto di Fisica dell'Atmosfera – CNR.

Demirci-Çekiç, S., Özkan, G., Avan, A. N., Uzunboy, S., Çapanoğlu, E., & Apak, R. (2022). Biomarkers of Oxidative Stress and Antioxidant Defense. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 209, 114477. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2021.114477>

Evich, M. G., Davis, M. J. B., McCord, J. P., Acrey, B., Awkerman, J. A., Knappe, D. R. U., Lindstrom, A. B., Speth, T. F., Tebes-Stevens, C., Strynar, M. J., Wang, Z., Weber, E. J., Henderson, W. M., & Washington, J. W. (2022). Per- and polyfluoroalkyl substances in the environment. *Science*, 375, eabg9065. <https://doi.org/10.1126/science.abg9065>

Faggio, C., Tsarpali, V., & Dailianis, S. (2018). Mussel digestive gland as a model tissue for assessing xenobiotics: An overview. *Science of The Total Environment*, 636, 220–229. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.04.264>

Gaines, L. G. T. (2023). Historical and current usage of per- and polyfluoroalkyl substances (PFAS): A literature review. *American Journal of Industrial Medicine*, 66, 353–378. <https://doi.org/10.1002/ajim.23362>

Glüge, J., Scheringer, M., Cousins, I. T., DeWitt, J. C., Goldenman, G., Herzke, D., Lohmann, R., Ng, C. A., Trier, X., & Wang, Z. (2020). An overview of the uses of per- and polyfluoroalkyl substances (PFAS). *Environmental Science: Processes & Impacts*, 22, 2345–2373. <https://doi.org/10.1039/D0EM00291G>

Hansen, K. J., Clemen, L. A., Ellefson, M. E., & Johnson, H. O. (2001). Compound Specific, Quantitative Characterization of Organic Fluorochemicals in Biological Matrices. *Environmental Science & Technology*, 35, 766–770. <https://doi.org/10.1021/es001489z>

Irianni, A. et al. (2014). Italia in Antartide. ENEA UTA (Unità Tecnica Antartide), Centro Ricerche Casacci.

- Li, F., Yu, Y., Guo, M., Lin, Y., Jiang, Y., Qu, M., Sun, X., Li, Z., Zhai, Y., & Tan, Z. (2021).** Integrated analysis of physiological, transcriptomics and metabolomics provides insights into detoxication disruption of PFOA exposure in *Mytilus edulis*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 214, 112081. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2021.112081>
- Liu, C., Gin, K. Y. H., & Chang, V. W. C. (2014).** Multi-biomarker responses in green mussels exposed to PFCs: Effects at molecular, cellular, and physiological levels. *Environmental Science and Pollution Research*, 21, 2785–2794. <https://doi.org/10.1007/s11356-013-2216-6>
- Livingstone, D. R., Lips, F., Martinez, P. G., & Pipe, R. K. (1992).** Antioxidant enzymes in the digestive gland of the common mussel *Mytilus edulis*. *Marine Biology*, 112, 265–276. <https://doi.org/10.1007/BF00702471>
- Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L., & Randall, R. J. (1951).** Protein measurement with the Folin phenol reagent. *The Journal of Biological Chemistry*, 193, 265–275. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(19\)52451-6](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(19)52451-6)
- Ma, X., Ren, X., Zhang, X., Wang, G., Liu, H., & Wang, L. (2024).** Rutin ameliorate PFOA induced renal damage by reducing oxidative stress and improving lipid metabolism. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 123, 109501. <https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2023.109501>
- Mauri, M., Orlando, E., Nigro, M., & Regoli, F. (1990).** Heavy metals in the Antarctic scallop *Adamussium colbecki*. *Marine Ecology Progress Series*, 67, 27–33. <http://www.jstor.org/stable/24816744>
- Olech, M., Kwiatek, W. M., & Dutkiewicz, E. M. (1998).** Lead pollution in the Antarctic region. *X-Ray Spectrometry*, 27, 232–235. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-4539\(199807/08\)27:4<232::AID-XRS291>3.0.CO;2-U](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-4539(199807/08)27:4<232::AID-XRS291>3.0.CO;2-U)
- Pacchini, S., Piva, E., Schumann, S., Irato, P., Pellegrino, D., & Santovito, G. (2023).** *Are Antarctic Fish Adapted to Face Global Changes? A Study on Antioxidant Enzymes Gene Expression in Trematomus newnesi from Ross Sea, Experimentally Exposed to PFOA* [Preprint]. BIOLOGY. <https://doi.org/10.20944/preprints202301.0100.v1>.
- 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, 44. <https://doi.org/10.3390/toxics10020044>
- Piva, E., Schumann, S., Dotteschini, S., Brocca, G., Radaelli, G., Marion, A., Irato, P., Bertotto, D., & Santovito, G. (2022).** Antioxidant Responses Induced by PFAS Exposure

in Freshwater Fish in the Veneto Region. *Antioxidants*, 11, 1115. <https://doi.org/10.3390/antiox11061115>

Poleksic, V., & Mitrovic-Tutundzic, V. (1994). Fish gills as a monitor of sublethal and chronic effects of pollution. *Sublethal and chronic effects of pollutants on freshwater fish*, 339–352.

Poli A., Fabbri E., Agnisola C., Calamita G., Santovito G., Verri T. (2014). Fisiologia Animale. *EdiSES s.r.l.*, Napoli.

Radi, R., Turrens, J. F., Chang, L. Y., Bush, K. M., Crapo, J. D., & Freeman, B. A. (1991). Detection of catalase in rat heart mitochondria. *The Journal of Biological Chemistry*, 266, 22028–22034. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(18\)54740-2](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(18)54740-2)

Regoli, F., Nigro, M., Chiantore, M., & Winston, G. W. (2002). Seasonal variations of susceptibility to oxidative stress in *Adamussium colbecki*, a key bioindicator species for the Antarctic marine environment. *Science of The Total Environment*, 289, 205–211. [https://doi.org/10.1016/S0048-9697\(01\)01047-6](https://doi.org/10.1016/S0048-9697(01)01047-6)

Ren, Q., Sun, R.-R., Zhao, X.-F., & Wang, J.-X. (2009). A selenium-dependent glutathione peroxidase (Se-GPx) and two glutathione S-transferases (GSTs) from Chinese shrimp (*Fenneropenaeus chinensis*). *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 149, 613–623. <https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2009.01.007>

Salvagno, M., Coppalini, G., Taccone, F. S., Strapazzon, G., Mrakic-Sposta, S., Rocco, M., Khalife, M., & Balestra, C. (2022). The Normobaric Oxygen Paradox-Hyperoxic Hypoxic Paradox: A Novel Expedient Strategy in Hematopoiesis Clinical Issues. *International Journal of Molecular Sciences*, 24, 82. <https://doi.org/10.3390/ijms24010082>

Santovito, G., Piccinni, E., Cassini, A., Irato, P., & Albergoni, V. (2005). Antioxidant responses of the Mediterranean mussel, *Mytilus galloprovincialis*, to environmental variability of dissolved oxygen. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 140, 321–329. <https://doi.org/10.1016/j.cca.2005.02.015>

Santovito, G., Piccinni, E., Boldrin, F., & Irato, P. (2012). Comparative study on metal homeostasis and detoxification in two Antarctic teleosts. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 155, 580–586. <https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2012.01.008>

Sattin, G., Bakiu, R., Tolomeo, A. M., Carraro, A., Coppola, D., Ferro, D., Patarnello, T., & Santovito, G. (2015). Characterization and expression of a new cytoplasmic glutathione peroxidase 1 gene in the Antarctic fish *Trematomus bernacchii*. *Hydrobiologia*, 761, 363–372. <https://doi.org/10.1007/s10750-015-2488-6>

Sies, H., & Jones, D. P. (2020). Reactive oxygen species (ROS) as pleiotropic physiological signalling agents. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 21, 363–383. <https://doi.org/10.1038/s41580-020-0230-3>

Spezie, G. (1996). L'oceanografia fisica. Collana *In Antartide.*, PNRA, Museo Nazionale dell'Antartide Felice Ippolito. Istituto Universitario Navale di Napoli.

Valko, M., Leibfritz, D., Moncol, J., Cronin, M. T. D., Mazur, M., & Telser, J. (2007). Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 39, 44–84. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2006.07.001>

Viarengo, A., Canesi, L., Pertica, M., & Livingstone, D. R. (1991). Seasonal variations in the antioxidant defence systems and lipid peroxidation of the digestive gland of mussels. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Comparative Pharmacology*, 100, 187–190. [https://doi.org/10.1016/0742-8413\(91\)90151-I](https://doi.org/10.1016/0742-8413(91)90151-I)

Xu, M., Cui, Z., Zhao, L., Hu, S., Zong, W., & Liu, R. (2018). Characterizing the binding interactions of PFOA and PFOS with catalase at the molecular level. *Chemosphere*, 203, 360–367. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2018.03.200>

Yang, B., Zou, W., Hu, Z., Liu, F., Zhou, L., Yang, S., Kuang, H., Wu, L., Wei, J., Wang, J., Zou, T., & Zhang, D. (2014). Involvement of oxidative stress and inflammation in liver injury caused by perfluorooctanoic acid exposure in mice. *BioMed Research International*, 2014, 409837. <https://doi.org/10.1155/2014/409837>

7) SITOGRAFIA

ANTA-GPS (2021). Progetto ANTA-GPS. Disponibile online:

<https://sites.google.com/view/anta-gps/progetto> [Ultimo accesso in rete: 19/11/2023]

ECHA (2023). Sostanze perfluoroalchiliche (PFAS). Disponibile online:

<https://echa.europa.eu/it/hot-topics/perfluoroalkyl-chemicals-pfas> [ultimo accesso in rete: 23/11/2023]

UTA PNRA (2020). In Antartide. Disponibile online: <https://www.italiantartide.it/in-antartide/>

ultimo accesso in rete: 27/11/2023]

PNRA (2019). Antartide. Territorio. Ambiente. Disponibile online:

<https://www.pnra.aq/it/antartide> [ultimo accesso in rete: 22/11/2023]

RINGRAZIAMENTI

Vorrei ringraziare prima di tutto i miei genitori per avermi sostenuto e supportata, e anche e soprattutto supportata nei miei momenti meno simpatici pre-esami, in cui ero non sempre al 100%. Vorrei ringraziare anche mia sorella, perché crede in me e mi supporta sempre, e vorrei ringraziarla anche per aver messo al mondo una bambina stupenda che mi riempie il cuore e ha spesso migliorato delle giornate difficili date dall'università, perché bastava vedere un suo sorriso per stare meglio.

Ringrazio anche la Professoressa Irato, che mi ha seguita in questo percorso ed è sempre stata molto gentile e disponibile, e anche le dottorande Elisabetta e Sara, che mi hanno aiutata durante tutto il tirocinio e lo hanno reso più leggero e divertente.

Ringrazio le mie amiche. Ringrazio prima di tutto Soraya, che è come una sorella nonché una delle persone migliori che io conosca, che è la persona che mi sostiene di più, che crede sempre in me, che mi aumenta sempre l'autostima con le sue frasi di affetto, che mi capisce, è un supporto fondamentale e senza la quale non avrei potuto portare a termine questo percorso, perché lei c'è sempre stata e anche nei momenti più difficili mi ha permesso di rialzarmi.

Ringrazio Giorgia, che mi conosce fin da quando ero piccola, e mi sopporta da allora; sopporta i miei cambiamenti, sbalzi di umore, gli alti e bassi, e la ringrazio anche perché so sempre di poter contare su di lei, so che quando dovessi aver bisogno di aiuto lei ci sarebbe subito per me, e lo stesso io per lei.

Ringrazio anche Benedetta che è stata mia coinquilina a Pd (anche se non ci siamo viste più di tanto) e si è presa cura di Camilla.

Ringrazio anche le mie compagne di università: Isabella, ovvero la mia compagna di audio infiniti per parlare dell'uni e che è stata la prima che ho conosciuto bene a STAM (nonché colei con la quale ho fatto il primo ape di tanti in quel di Padova), ringrazio Angela, perché non mi ha lasciata sola nel mio panico universitario, perché ripassava con me prima degli esami, perché è sempre stata un'amica su cui so di poter contare e a cui voglio un mondo di bene; e ringrazio anche Antonia, perché anche lei mi ha sempre sostenuta in questo percorso.

Ringrazio Anna, Chiara e Arianna, che mi hanno supportata per 5 anni di superiori, mi hanno vista cambiare tanto e sono sempre riuscite a carpirmi e ad accettarmi così come sono.

Ringrazio anche Matteo, per le sue frasi filosofiche, per le passeggiate in montagna; lo ringrazio perché mi ha sempre spronata, perché crede in me, e perché è stato ed è per me una persona importantissima.