

UNIVERSITÀ
DEGLI STUDI
DI PADOVA

Università degli Studi di Padova

Dipartimento: Territorio e Sistemi Agro-Forestali

SCUOLA DI DOTTORATO DI RICERCA IN: TERRITORIO, AMBIENTE, RISORSE E
SALUTE

INDIRIZZO: MEDICINA AMBIENTALE, NUTRIZIONE E INQUINAMENTO
CICLO XXIII

VALUTAZIONE DI CEPPI MUTANTI DI *S. TYPHIMURIUM* E DI
M. GALLOPROVINCIALIS COME SISTEMI PER LA CARATTERIZZAZIONE
TOSSICOLOGICA DI NANOPARTICELLE DI AMPIO UTILIZZO

Direttore della Scuola : Ch.mo Prof. Mario Aristide Lenzi

Coordinatore d'indirizzo: Ch.mo Prof. Bruno Saia

Supervisore: Ch.ma Prof.ssa Lucia Celotti

Co-Supervisore: Dott.ssa Paola Venier

Dottorando: Stefania Domeneghetti

INDICE

Riassunto	4
<i>Abstract</i>	6
1 Introduzione:	8
1.1 NANOPARTICELLE E VALUTAZIONE DEL RISCHI ASSOCIATI	8
1.2 CELLULE PROCARIOTICHE COME ORGANISMI BERSAGLIO	12
1.2.1 Cellula batterica e rilevamento di mutazioni geniche	12
1.2.2 Test di mutagenesi e normativa vigente	14
1.2.3 Test di Ames	15
1.2.4 La parete cellulare di Gram negativi	20
1.2.5 Nanoparticelle e test di mutagenesi in procarioti	21
1.3 IL MITILO COME ORGANISMO BERSAGLIO	22
1.3.1 Caratteristiche generali	22
1.3.2 Il mitilo come organismo sentinella	23
1.3.3 Emociti: effettori del sistema immunitario	24
1.3.4 Mitili e nanoparticelle	25
1.4 TEST DI GENOTOSSICITÀ APPLICATI A CELLULE DI MITILO	27
1.4.1 Test della cometa	27
1.4.2 Test del micronucleo	30
Scopo della tesi	33
2 Materiali e metodi:	34
2.1 CEPPI BATTERICI	35
2.1.1 Saggio di citotossicità	36
2.1.2 Saggio di mutagenicità (test di Ames)	36
2.1.3 Saggio di induzione di danno al DNA (<i>SOS umu</i> test)	37
2.2 NANOPARTICELLE DI SILICE:	38
2.3 NANOPARTICELLE DI MAGHEMITE	39
2.4 QUANTUM DOTS	40
2.5 PREPARAZIONE DELLE CELLULE BATTERICHE PER SAGGI DI INTERAZIONE CON NP	40
2.6 ALLESTIMENTO DEL TEST DELLA COMETA CON EMOCITI DI <i>MYTILUS GALLOPROVINCIALIS</i>	41
2.6.1 Trattamento e isolamento delle cellule	42
2.6.2 Procedimento	43
2.6.3 Analisi qualitativa del vetrino	44
2.6.4 Analisi quantitativa del vetrino	46
2.7 MISURA DI VITALITÀ CELLULARE: TEST DI	48

ESCLUSIONE DEL <i>TRYPAN BLU</i>	
2.8 ALLESTIMENTO DEL TEST DEL MICRONUCLEO CON CELLULE BRANCHIALI DI <i>MYTILUS</i> <i>GALLOPROVINCIALIS</i>	49
2.8.2 Trattamento di mitili con una miscela di metalli	49
2.8.1 allestimento e osservazione dei vetrini	49
3 Risultati:	52
3.1 VALUTAZIONE DEGLI EVENTUALI EFFETTI CITOTOSSICI E GENOTOSSICI DI PARTICELLE LUDOX [®] AS 30 E SM 30 IN MUTANTI <i>rfa</i> DI <i>SALMONELLA</i> <i>TYPHIMURIUM</i>	53
3.2 ULTERIORI MISURE SULL'INTERAZIONE TRA NP E MUTANTI <i>RFA</i>	56
3.3 INTERAZIONE TRA NP E COMPOSTI MUTAGENI	60
3.4 RILEVAZIONE DI DANNI AL DNA IN <i>MYTILUS</i> <i>GALLOPROVINCIALIS</i>	62
3.5 EFFETTI CITOTOSSICI E GENOTOSSICI DI PARTICELLE LUDOX [®] AS 30 E SM 30	64
3.6 OTTIMIZZAZIONE DEL TEST DEL MICRONUCLEO IN <i>MYTILUS GALLOPROVINCIALIS</i>	65
4 Discussione	67
Bibliografia	74
Appendici	
Appendice A	83
Appendice B	85
Appendice C	86
Appendice D	87

Riassunto

Nonostante il rapido sviluppo e il molteplice utilizzo di una varietà di nanoparticelle e nanomateriali, a tutt'oggi mancano regolamentazione adeguata e protocolli standard per la loro caratterizzazione tossicologica. In questi anni, il centro di ricerca ECSIN (The European Centre for the Sustainable Impact of Nanotechnology) si è fatto promotore di studi *in vitro* e *in vivo* volti ad accertare i rischi biologici associabili a NP di ampio uso industriale, definendo tra gli altri obiettivi la valutazione di specifiche NP in cellule procariotiche ed eucariotiche.

Benchè i batteri siano incapaci di endocitosi, alcuni dati conflittuali e la frammentarietà delle informazioni disponibili all'inizio di questo studio hanno indotto a considerare come potenziale sistema bersaglio cellule derivate da *S. typhimurium* LT2, mutanti *rfa* caratterizzati da sintesi difettiva delle catene polisaccaridiche dell'LPS, lipopolisaccaride di membrana.

Le Ludox[®] sono NP di silice di ampio utilizzo e di interesse prioritario in ECSIN. Esse vengono usate nella chiarificazione delle bevande e come additivi in polimeri, vernici, rivestimenti e detergenti per la loro capacità di migliorare le proprietà di resistenza, brillantezza e adesione delle superfici e recentemente in prodotti cosmetici. Ludox[®] AS 30 e SM 30, caratterizzate per diametro dinamico e potenziale zeta, sono state incubate con cellule TA 98 e TA 100 per 30 minuti in soluzione salina tamponata a 37°C. Rispetto alle NP come tali, quelle sottoposte ad ultrafiltrazione sono risultate meno citotossiche. Saggiate per attività mutagena sugli stessi ceppi (*plate incorporation test*) le Ludox[®] sono risultate innocue, indipendentemente dalla presenza della frazione microsomiale S9. Per una valutazione più esauriente, le NP AS 30 e SM 30 sono state saggate anche in micropiastra (*Ames fluctuation test*) e nell'SOS/ *umu* test, saggi che hanno confermato l'incapacità di indurre, rispettivamente, mutazioni o danno al DNA.

Per accertare se anche le cellule LPS-difettive escludessero le NP sono state applicate altre tecniche sperimentali. NP elettrondense quali Qtracker[®]800 e maghemite (γ Fe₂O₃) sono state incubate con le cellule TA 100 per 30 minuti e per 6 ore procedendo quindi a visualizzarle al TEM, analisi che hanno dimostrato l'esclusione di entrambe le NP.

Dati ottenuti in citometria a flusso incubando NP di silice marcate con fluoresceina oppure Qtracker[®]800 con cellule TA 100 in PBS a 37°C per 0.5-24 ore hanno rivelato una percentuale molto modesta di cellule fluorescenti.

A compendio del lavoro svolto, e per suggerire un uso alternativo dei test sopra illustrati, è stata valutata l'interazione tra NP (γ Fe₂O₃) e ioni cromato (K₂Cr₂O₇).

L'incubazione in PBS di maghemite e bicromato di potassio in dosi combinate ha dimostrato che le nanoparticelle causano una significativa attenuazione dell'attività mutagenica del cromo esavalente.

Come approccio sperimentale alternativo, è stata messa a punto l'analisi di danno al DNA in emociti di *Mytilus galloprovincialis*, un invertebrato marino già ampiamente usato come organismo sentinella dell'ambiente costiero e che sta emergendo come modello anche per lo studio dell'immunità innata. I primi risultati ottenuti con le particelle Ludox[®] indicano un aumento di frammentazione del DNA negli emociti trattati rispetto al controllo, più accentuato per le SM 30 rispetto alle AS 30. L'individuazione di danno genetico in cellule di mitilo è stato consolidato ottimizzando l'analisi della frequenza di cellule micronucleate come indice di danno cromosomico.

Abstract

A variety of nanomaterials are currently in use or under development in our society. Small size, particular shape, large surface area and activity make them attractive to different application fields, ranging from medical products to industrial processes. Owing to the unique chemico-physical properties, the most common nanoparticles lack of adequate toxicological characterization in different biological systems. To date, first-level assays for the detection of possible cytotoxic and genotoxic effects have not yet identified and validated. The European Centre for the Sustainable Impact of Nanotechnology (ECSIN) was created to ascertain the biological risks related to the use of nanoparticles (NPs) by *in vitro* and *in vivo* studies on prokaryotic and eukaryotic cells (only fragmentary or conflicting data were available for bacterial cells at the start of this study).

Aiming to evaluate the suitability of protocols based on *rfa* mutant *Salmonella thyphimurium* cells, Ludox[®] silica NPs were tested on the strains TA 98, TA 100 (plate and fluctuation test) and TA 1535 pSK1002 (*SOS umu* test). Following incubation with log-phase TA 100 cells at 37 °C in PBS, flow cytometry and fluorimetric measures were carried out to estimate the intracellular uptake of Qtracker[®]800 and fluorescein-loaded silica NPs. The incubation with these NPs slightly increased the fluorescence associated to bacterial cells after 3-6 h and 3-11 h of contact, respectively. Possible internalization of electron-dense quantum dots and $\gamma\text{Fe}_2\text{O}_3$ was also studied by TEM imaging.

Although partially cytotoxic, the silica NPs did not induce mutagenic or genotoxic effects, nor the $\gamma\text{Fe}_2\text{O}_3$ did it. The inability of the tested particles to enter the mutant bacterial cells can explain the overall results, as confirmed by the TEM images. NP-related oxidative stress with indirect alteration of cellular functions cannot be excluded. Hence protocols based on prokaryotes are not suitable for routine NP testing, however they could be rationally used to characterize the combined effect of NPs and genotoxic components occurring together in complex environmental mixtures. For instance, in our hands, $\gamma\text{Fe}_2\text{O}_3$ significantly attenuated the mutagenic effects directly induced by hexavalent ($\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$) on TA 100 cells.

As alternative experimental model, we considered haemocytes and other cell types of the marine invertebrate *Mytilus galloprovincialis*, already used as sentinel organism in environmental studies.

Preliminary data obtained with the Single-Cell gel Electrophoresis (Comet Assay) and Micronucleus test support the use of both assays as a first-screening tools for assessing the DNA damage possibly induced by industrial NPs.

Introduzione

1.1 NANOPARTICELLE E VALUTAZIONE DEI RISCHI ASSOCIATI

Secondo la definizione comunemente accettata, nanomateriali e nanoparticelle (NP) sono oggetti aventi almeno una dimensione inferiore a 100 nm: il parametro di riferimento è quindi la taglia e non la natura o l'organizzazione del materiale che la compone (Schmid, 2004; Feldheim e Foss, 2002).

I nanomateriali non sono solo prodotti antropici, esistono costitutivamente in natura ad esempio sottoforma di polveri prodotte dall'attività vulcanica e geotermica.

Questi sistemi mostrano caratteristiche fisiche e chimiche differenti da quelle del materiale massivo che li compongono. Le loro piccole dimensioni, la particolare morfologia, l'elevata area superficiale, li rendono utilizzabili in una svariata gamma di prodotti emergenti.

Le NP sono impiegate in svariati processi industriali come catalizzatori e nel settore elettronico, nelle pitture, in cosmetici, additivi per il cibo ed altri prodotti di largo consumo (Landsiedel *et al*, 2009). Oggi, stiamo anche assistendo ad un rapido sviluppo di strumenti nanotecnologici per scopi medici e biologici. Dato che le NP possono venire ingegnerizzate per interagire con le cellule, è importante assicurarsi che queste innovazioni terapeutiche non causino effetti avversi, tenendo conto che i nano materiali e NP possono rivelare proprietà tossicologiche inattese.

I nanomateriali rilasciati nell' ambiente potrebbero subire processi di trasformazione tali da generare cambiamenti ed effetti deleteri nei vari comparti dell'ecosistema.

Di conseguenza è importante definire norme che regolino l'introduzione nel mercato di tali sostanze al pari di quelle chimiche sulla base di studi che accertino i rischi per la salute e l'ambiente associati all'utilizzo di nanotecnologie .

Tali norme potranno giovare della ricerca sociologica e analisi giuridica comparativa sulla regolamentazione nel settore nanotecnologico.

Risale ad aprile 2009 l'ultima Risoluzione del Parlamento europeo sugli aspetti normativi in tema di nanomateriali; Il Parlamento europeo (PE) ritiene in sintesi, che “un approccio sicuro, responsabile ed integrato alle nanotecnologie possa coerentemente svilupparsi solo nell'ambito di un chiaro quadro regolamentare e politico che affronti espressamente le applicazioni esistenti e prevedibili dei nanomateriali nonché i

potenziali problemi di sicurezza lungo il loro intero ciclo di vita“ (www.europarl.europa.eu).

La caratterizzazione tossicologica di NP richiede tuttavia un grande sforzo analitico, perché si tratta di materiali possono cambiare le loro proprietà chimico-fisiche a seconda del mezzo in cui si trovano. In pratica per poter descrivere le NP è fondamentale conoscerne non solo la dimensione e l'area, ma la distribuzione di questi parametri in una preparazione. Inoltre è importante stimare la composizione, la reattività di superficie e lo stato di aggregazione o agglomerazione a seconda che siano presenti interazioni forti o deboli tra le stesse (Orts-Gil *et al*, 2010).

Nella varietà di nanosistemi che possono trovare applicazioni di tipo industriale possono essere indicate per la loro importanza NP di metalli in stato di ossidazione zero quali oro e argento; quelle composte da ossidi, quali silice, titanio e magnetite (Fe_3O_4) e maghemite ($\gamma \text{Fe}_2\text{O}_3$); le nanoparticelle di semiconduttori (quantum dots) e i nanotubi di carbonio.

Il centro di ricerca ECSIN (*European Center for the Sustainability Impact of Nanoparticles*, www.ecsin.it) si è posto come scopo la valutazione l'impatto delle nanotecnologie sull'ambiente e sulla salute umana in particolare l'accertamento di rischi biologici associabili alle NP prodotte in larga scala e presenti in prodotti commerciali di largo consumo, con studi *in vitro* e *in vivo*.

La produzione commerciale di nanoparticelle di silice è iniziata negli anni '30 del secolo scorso e ha acquisito un'importanza sempre maggiore (Stöber *et al.*, 1968). Esse vengono prodotte con facilità per condensazione di silicati, alogenossilani e alcossossilani (Bergna & Roberts, 2006). Le particelle ottenute hanno diametri che variano tra le decine e le centinaia di nanometri e una discreta monodispersione; sono generalmente porose e presentano sulla superficie gruppi silanolo (Si-OH) (Van Blaaderen e Vrij, 1993). La stabilità colloidale delle particelle è dovuta alla repulsione elettrostatica: infatti, in seguito alla deprotonazione dei gruppi silanolo, le particelle si comportano come acidi deboli e presentano una carica complessiva negativa. Tale repulsione è però efficace solo se le particelle sono disperse in un solvente, l'evaporazione del quale

provoca aggregazione irreversibile e formazione del corrispondente materiale massivo (il gel di silice).

Le nanoparticelle di silice sono largamente utilizzate: dalla chiarificazione delle bevande, all'utilizzo come additivi per polimeri, vernici, rivestimenti, nell'industria dei pneumatici e nei detergenti per la loro capacità di migliorare le proprietà di resistenza, brillantezza e adesione delle superfici, fino al recente impiego in prodotti cosmetici. Essendo il silicio il secondo materiale più presente sulla terra dopo l'ossigeno, si può capire l'entità delle produzioni industriali stimate 1 tonnellata l'anno a livello mondiale (Higashisaka *et al*, 2011). Per quanto riguarda altre possibili applicazioni, le nanoparticelle di silice contenenti molecole fluorescenti organiche stanno emergendo in campo biomedico come traccianti per applicazioni diagnostiche. Lo sviluppo di vettori per il trasporto di farmaci è un'altra area di grande interesse.

In riferimento alla scarsa tossicità del materiale di partenza, silice amorfa o gel di silice, le NP di silice sono state finora considerate innocue. Ciò nonostante in uno studio recente si è visto che il trattamento di topi con NP di silice di svariate dimensioni (da 30 a 1000 nm) era in grado di causare una variazione del profilo di espressione delle proteine del plasma. In particolare l' aumento di espressione di proteine come Aptoglobina, CReactiveProtein e SerumAmiloidA tipiche dell'infezione e dell'infiammazione è risultato inversamente proporzionale alla dimensione delle particelle; queste proteine potrebbero diventare possibili marcatori dell'esposizione a NP di silice (Higashisaka *et al*, 2011).

Le particelle di magnetite e di maghemite possono essere preparate con facilità per riduzione chimica di sali di ferro e sono molto studiate dato che le particolari proprietà magnetiche le rendono estremamente interessanti per applicazioni di tipo biomedico. Esse infatti possono essere "spostate" mediante campi magnetici esterni e questo rende possibile sia il loro recupero (ad esempio per isolare determinati composti da matrici complesse a scopo diagnostico) che il loro direzionamento (per concentrare le particelle nel tessuto biologico di interesse). Questo tipo di particelle sono interessanti anche come agenti di contrasto per la risonanza magnetica nucleare. In realtà studi recenti evidenziano che tali particelle sono in grado di generare stress ossidativo e apoptosi in cellule umane (Zhu *et al*, 2010).

Le particelle di semiconduttori (quantum dots) sono generalmente costituite da selenuro di cadmio o di altri materiali semiconduttori. Anch'esse di dimensioni molto ridotte, vengono preparate per reazione ad alta temperatura di sali di cadmio, selenio e tellurio. La principale caratteristica dei quantum dots è un'emissione di fluorescenza quasi monocromatica, intensa e modulabile (la posizione del massimo di emissione dipende dalla dimensione della particella) che li rende particolarmente interessanti come sonde, traccianti e marcatori per applicazioni diagnostiche. I problemi legati alla loro tossicità possono derivare dal rilascio di specie tossiche (sali di selenio e cadmio) e inoltre, essendo dei semiconduttori, trasferiscono facilmente energia alle molecole circostanti generando specie reattive dell'ossigeno (Gagne *et al*, 2008). Tuttavia non si può generalizzare in quanto la tossicità di un nanomateriale dipende da svariati fattori, principalmente determinati dalle caratteristiche fisiche-chimiche delle particelle stesse, ma anche dalle condizioni ambientali in cui sono saggiate (Hardman, 2006).

Poiché le potenzialità applicative nel campo dell'industria e della biomedicina sono ingenti, ci si può aspettare un'espansione della produzione di nanostrutture prima ancora che vengano chiariti gli effetti sulla salute umana e ambientale. Sono infatti necessari studi accurati per valutare gli effetti di nanostrutture ingegnerizzate sui processi vitali delle cellule, oltre che una valutazione in organismi sperimentali della distribuzione sistemica, dell'accumulo in organi e tessuti nell'animale *in vivo*.

Seguendo il principio di precauzione, anche il rischio mutageno da NP tradizionali e ingegnerizzate va accertato con attenzione partendo, per la scelta e l'ottimizzazione dei sistemi di saggio, dai protocolli sperimentali e parametri di saggio più robusti e validati. Di seguito sono presentati e discussi due possibili organismi bersaglio (*S. typhimurium* mutanti *rfa* e *M. galloprovincialis*) ed alcuni parametri di attività mutagenica e di danno al DNA (retromutazioni *his*, induzione del sistema di riparazione SOS, analisi di danno cromosomico tramite il test cometa e il test dei micronuclei).

1.2 CELLULE PROCARIOTI COME ORGANISMI BERSAGLIO

1.2.1 La cellula batterica e il rilevamento di mutazioni geniche

I batteri sono organismi unicellulari privi di membrana nucleare il cui genoma è costituito da una doppia elica di DNA circolare in forma superavvolta e nella maggior parte dei casi inferiore a 5 Mb. Molti batteri possiedono anche uno o più plasmidi, cioè piccoli DNA circolari contenenti geni non essenziali alla sopravvivenza batterica in condizioni ambientali favorevoli. Il DNA batterico è per lo più codificante e molti geni fanno parte di operoni, entro i quali gruppi di geni facenti parte di una stessa via metabolica sono localizzati uno vicino all'altro ed organizzati in unità di trascrizione.

La mutagenesi rappresenta l'insieme degli eventi molecolari che definiscono un cambiamento ereditabile nella struttura del DNA. Le cellule, tuttavia, possiedono dei sistemi che sono in grado di riconoscere e riparare diversi tipi di danno. L'effettiva frequenza di mutazione deriva quindi dal numero di eventi che hanno definito un danno al DNA o una mutazione vera e propria e dal numero di eventi di riparazione corretta o errata.

Le cellule batteriche si prestano all'individuazione di mutazioni puntiformi che comportano l'alterazione di una, o alcune, coppie di nucleotidi nel DNA e possono essere dovute a (Russell, 2006):

- Sostituzione di una coppia di basi: per transizione, sostituzione di una coppia purina-pirimidina con un'altra coppia purina-pirimidina, oppure per transversione, sostituzione di una coppia purina-pirimidina con una coppia pirimidina-purina, o viceversa. Spesso la mutazione riguarda un filamento e, viene "fissata" durante la replicazione come risultato dell'appaiamento di un nucleotide complementare a quello mutato; può succedere, tuttavia, che la mutazione sia più drastica e riguardi entrambi i filamenti.
- Scivolamento della cornice di lettura a triplette (*frameshift*): avviene per l'inserimento o la delezione di una o alcune coppie di basi, soprattutto in regioni del DNA caratterizzate da ripetizioni semplici. Anche in questo caso, la mutazione può riguardare solo un filamento, e dopo un ciclo replicativo essere fissata anche su quello replicato, oppure riguardare entrambi i filamenti.

Le mutazioni geniche avvengono per cause endogene (mutagenesi spontanea) come:

- errori nella replicazione del DNA, causati da appaiamento errato e/o difetto nell'attività *proofreading*, portano a sostituzione di base;
- ripiegamento del DNA, che porta all'inserimento o alla delezione di una o più basi;
- alterazioni spontanee delle basi, come, per esempio, la depurinazione o la deaminazione.

Nel primo caso, se la lesione non viene riparata, alla replicazione successiva può inserirsi un nucleotide errato, causando una mutazione per sostituzione di basi. Nel secondo caso, la perdita di un gruppo amminico da parte di una base azotata ne modifica l'identità (per esempio la citosina diventa uracile) e può generare appaiamenti errati e mutazioni. È presente un sistema di riparazione per escissione delle basi che agisce in entrambi i casi rimuovendo una base dal DNA. Intervengono successivamente un'endonucleasi, che provoca l'escissione dell'ossatura fosfodiesterica, una polimerasi ed una ligasi, che infine ripristinano l'integrità della sequenza nucleotidica.

L'insorgenza di mutazioni può avvenire con frequenza significativamente maggiore a causa di esposizione ad agenti fisici o chimici in grado di interagire con il DNA (mutagenesi indotta):

- Gli agenti fisici comprendono le radiazioni ionizzanti (raggi cosmici, raggi X, raggi gamma collidono con le molecole, creando ioni in grado di rompere vari legami covalenti dell'elica di DNA e generare legami tra eliche) e le radiazioni non ionizzanti (raggi UV che provocano la formazione di legami anomali tra basi della stessa elica).

Nel caso di legami inter-elica, può intervenire il sistema di riparazione per escissione di nucleotidi: inizialmente un'endonucleasi taglia da entrambi i lati il tratto di DNA danneggiato e strutturalmente distorto (incisione); successivamente un'esonucleasi 5'→3' rimuove il tratto danneggiato (escissione) ed infine una polimerasi compie una sintesi riparativa utilizzando il filamento integro come stampo.

- Gli agenti chimici sono suddivisi, in base al loro meccanismo di azione, in:
 - Analoghi delle basi che possono essere incorporati occasionalmente al loro posto; la loro struttura tautomerica può inoltre subire oscillazioni, provocando appaiamenti errati. Essi possono essere rimossi dal sistema di riparazione per

escissione di basi; in alcuni casi le basi vengono semplicemente riparate e reinserte nella doppia elica.

- Sostanze che reagiscono con il DNA modificano la struttura chimica e le proprietà delle basi, determinando l'appaiamento con una base diversa dalla complementare. Le basi alterate e modificate da piccoli gruppi alchilici vengono rimosse per escissione di basi.
- Agenti intercalanti (bromuro di etidio) sono molecole sottili e idrofobiche in grado di intercalarsi tra le basi del DNA; gli effetti sono però diversi a seconda di quando si verifica l'inserimento, poiché la molecola può intercalarsi tra due basi di un'elica stampo prima della replicazione (nella nuova elica verrà quindi inserita una base scelta a caso), oppure l'agente intercalante può inserirsi al posto di una base nella nuova molecola di DNA. Può intervenire il sistema di riparazione degli appaiamenti errati.

1.2.2 Test di mutagenesi e normativa vigente

I test di mutagenesi si svilupparono tra la fine degli anni '60 e l'inizio degli anni '70, quando fu chiaro che agenti chimici e fisici presenti nell'ambiente che ci circonda sono in grado di provocare mutazioni ed anche tumori. Fondamentale nello sviluppo dei test di mutagenesi fu l'evidenza sperimentale di una notevole correlazione tra attività mutagena e cancerogena, oggi stimata tra il 60 e l'90 % (Mortelmans e Zeiger, 2000); Sostenuta da studi sperimentali, tale correlazione suggeriva come mutazioni somatiche potessero avere un ruolo fondamentale nell'iniziazione dei tumori senza tuttavia escludere altri fattori causali.

I primi test per le valutazioni dell'attività mutagena delle sostanze chimiche furono messi a punto su batteri, assumendo la possibilità di estrapolare i risultati ottenuti agli organismi più complessi. Infatti, i batteri rappresentano un sistema genetico semplice e di rapido utilizzo: il mantenimento in laboratorio è semplice, economico e richiede poco spazio; la riproduzione è rapida, la progenie generata è numerosa e il genoma aploide consente di poter rilevare in modo diretto le mutazioni.

Test di mutagenesi sono stati messi a punto anche su altri organismi e precedono ulteriori valutazioni *in vivo* che vengono effettuate nel caso in cui i risultati ottenuti indichino effetto mutageno di un composto, o, al contrario, non siano sufficienti per formulare una conclusione.

La standardizzazione dei protocolli di esecuzione dei test è importante per garantire la confrontabilità dei risultati tra laboratori diversi e per migliorarne la predittività, in quanto un elevato numero di falsi positivi accresce il numero di animali da utilizzare nei successivi test *in vivo*. A tale proposito sono state sviluppate linee guida da parte di organizzazioni come l'OECD, *The Organisation for Economic Co-operation and Development*, e l'ICH, *The International Commission on Harmonization*, (www.OECD.org e www.ICH.org).

In risposta alla mancanza di informazioni riguardo a molte delle 100000 sostanze chimiche già conosciute e commercializzate e per riformare il corpo legislativo, inglobando in un unico documento tutte le precedenti leggi sulle sostanze chimiche, è stato emesso il regolamento europeo n. 1907/2006 REACH (*REgistration, Authorization and Evaluation of CHemicals*), riguardante le valutazioni sulla sicurezza delle sostanze chimiche e le informazioni necessarie per la loro commercializzazione entrato in vigore il 01 Giugno 2007.

Esso si pone alcuni obiettivi tra cui la tutela dell'ambiente e della salute, la sicurezza negli ambienti di lavoro, la cooperatività nell'industria europea, la semplificazione normativa e la promozione di alternative ai test *in vivo* sugli animali e prevede che tutte le sostanze prodotte in quantità maggiori di 1 tonnellata/anno vengano sottoposte dai produttori stessi a procedure di registrazione (principio del “*no data, no market*”). In particolare, i test *in vitro* tra cui quelli sui batteri, riguardano le sostanze prodotte in quantità inferiori a 100 tonnellate/anno (a partire da 10 tonnellate/anno affiancati a test *in vivo*; a partire da 100 tonnellate/anno solo test *in vivo*, cioè a lungo termine) (<http://www.helpdesk-reach.it>).

1.2.3 Test di Ames

Questo test fu messo a punto per la prima volta nel 1966 da Bruce N. Ames e H.J. Whitfield che utilizzarono per lo *screening* di agenti chimici mutageni ceppi di *Salmonella typhimurium* con specifiche mutazioni puntiformi in uno dei geni strutturali dell'operone per l'istidina (condizione di auxotrofia). Il trattamento con agenti genotossici, causando mutazioni nello stesso sito delle precedenti, poteva ristabilire la funzionalità del gene, ossia la capacità dei batteri di sintetizzare l'istidina e di formare colonie su terreno minimo (reversione fenotipica per mutazione genica).

Il principio per il quale vengono utilizzati diversi ceppi di *Salmonella* mutanti in uno dei nove geni dell'operone per l'istidina (sequenze bersaglio di retromutazione) è quello di

riuscire a caratterizzare più precisamente l'effetto di composti mutageni diversi. Le mutazioni *his*^r introdotte nei ceppi batterici attualmente più utilizzati sono le seguenti: nel ceppo TA 100 la mutazione *hisG46*, nel gene *hisG* che codifica per la fosforibosil adenosina-3P-pirofosforilasi, provoca la sostituzione di un codone che codifica per la leucina (GAG), con uno che codifica per la prolina (GGG); la reversione avviene per sostituzione di base in una delle tre coppie G-C, principalmente ad opera di nitrosammine, epossidi ed agenti alchilanti in genere; nel ceppo TA 98 la mutazione *hisD3052*, nel gene *hisD* che codifica per un'istidinolo deidrogenasi, provoca delezione di una base in prossimità di quattro GC adiacenti, alterandone, quindi, la cornice di lettura. La reversione tramite mutazione *frameshift* può avvenire ad opera di idrocarburi policiclici aromatici (IPA), o nitro-derivati di ammine aromatiche.

Il saggio di reversione fu dapprima eseguito come spot test, applicando una piccola quantità della sostanza da saggiare al centro di una piastra contenente i batteri piastrati su terreno solido (agar) in modo da formare un gradiente di concentrazione dal centro alla periferia. L'effetto mutageno del composto era rivelato da un anello di colonie revertenti in funzione del medesimo gradiente. Tuttavia questa metodica si rivelò poco sensibile, in quanto non tutti i batteri risultavano esposti al composto e sostanze diverse potevano diffondere diversamente nell'agar.

Tra il 1971 e il 1973 fu introdotto il sistema di attivazione metabolica, per poter rilevare composti promutageni. Questi diventano reattivi dopo reazioni di funzionalizzazione (fase 1) come quelle ossidative mediate dal sistema enzimatico del citocromo P450 o dopo reazioni di coniugazione a substrati endogeni (fase 2);

Gli enzimi che catalizzano queste trasformazioni, assenti nei batteri, sono solitamente deputati alla detossificazione di composti xenobiotici, rendendoli più idrosolubili e più facilmente eliminabili dall'organismo. Nei mammiferi, trasformazioni dipendenti da varie isoforme CYP avvengono tipicamente nel fegato. Per questo il test viene condotto sia in presenza che in assenza del sovranatante post-mitocondriale (frazione microsomiale S9), ricavato per centrifugazione frazionata da omogenati epatici di ratti pretrattati con un induttore enzimatico, con l'aggiunta di opportuni cofattori.

Nel 1973 il saggio fu ulteriormente perfezionato, introducendo il *plate incorporation test*, sostituendo lo *spot test* e ancora oggi utilizzato: i batteri e la sostanza da saggiare, in presenza e in assenza del sistema di attivazione metabolica, sono posti in una provetta

sterile contenente agar molle e tracce di istidina, e da lì versati in una piastra con terreno minimo. Dopo 48 ore di incubazione, vengono contate le colonie revertenti.

In seguito, il protocollo di esecuzione del test è stato modificato per migliorarne la sensibilità e per aumentare il numero di agenti chimici saggiabili: nel saggio di preincubazione, i batteri vengono messi a contatto con la sostanza di interesse per un breve periodo prima di essere piastrati. Inoltre è stata introdotta una variante in micropiastra (test di fluttuazione) che permette di valutare un più ampio intervallo di dosi ed aumentare sostanzialmente il numero di repliche sperimentali, rendendo il test statisticamente più robusto.

Oltre alle mutazioni che interessano l'operone codificante per la sintesi dell'istidina, nel tempo si sono aggiunte altre mutazioni che rendono i ceppi del test di Ames maggiormente sensibili all'azione dei mutageni.

Mutazioni nei geni *rfa* e *gal* determinano una sintesi incompleta dei poliliposaccaridi della membrana esterna della parete batterica; in particolare la mutazione *rfa* determina la mancanza di alcuni enzimi per la sintesi della catena laterale e la mutazione *gal* inibisce l'utilizzo del galattosio per la costruzione della parete, portando ad un'aumentata permeabilità cellulare a sostanze stericamente ingombranti.

Inoltre, delezioni della sequenza nucleotidica che comprende gran parte dei geni *uvrB* e *bio*, coinvolti rispettivamente nella riparazione pre-replicativa del DNA tramite escissione di nucleotidi, e nella sintesi della biotina rendono questi ceppi più sensibili ai mutageni e dipendenti dalla biotina.

L'introduzione del plasmide pKM101 che contiene l'operone *mucAB* che codifica per due proteine coinvolte in un meccanismo inducibile di riparazione, la risposta SOS; vengono espresse le proteine MucAB che consentono alla cellula di continuare a replicarsi a costo di una maggiore mutabilità. Il plasmide, inoltre, conferisce la resistenza all'ampicillina (Joseph *et al.*, 1997).

Ogni ceppo utilizzato nel test presenta un numero caratteristico di colonie revertenti spontanee che viene valutato saggiando un'aliquota di solvente (controllo negativo DMSO o acqua). Il numero di revertenti spontanei viene controllato sia in presenza, che in assenza del sistema di attivazione metabolica dato che alcuni ceppi dimostrano un aumento della frequenza di reversione spontanea dopo aggiunta della frazione S9.

In ogni esperimento vengono inclusi anche mutageni noti che vengono saggiati in presenza o in assenza del sistema di attivazione metabolica (controlli positivi).

Dopo sviluppo delle colonie, i risultati sono espressi come numero di revertenti per piastra. Un composto viene considerato mutageno se, rispetto al controllo negativo, induce un aumento del numero di colonie nella piastra compreso tra 2 e 3 (viene invece ritenuto negativo se non produce un aumento significativo del numero di colonie revertenti rispetto ai controlli) e se induce una relazione dose/risposta lineare e positiva (un punto di flesso può indicare effetto citotossico della sostanza saggiata e talvolta il test può dare risultati inconclusivi).

Alternativamente, una sostanza viene considerata positiva se produce nelle piastre trattate un aumento riproducibile del numero di colonie revertenti per una o più concentrazioni in esperimenti indipendenti.

A prescindere dal criterio di positività applicato, per trarre conclusioni adeguate sulla mutagenicità di un composto è opportuno utilizzare vari ceppi e adeguati sistemi di attivazione metabolica; può essere adottato, per esempio, un *tier approach* che prevede l'esecuzione di test preliminari con i ceppi TA 98 e TA 100 di *S. typhimurium* in presenza o in assenza di S9 mix. Se vengono ottenuti risultati positivi, è sufficiente confermarli con un test di verifica, mantenendo identiche condizioni sperimentali, per concludere che la sostanza è mutagena; se vengono ottenuti risultati negativi, devono essere eseguiti altri test variando le condizioni di attivazione metabolica o i ceppi batterici; se i risultati ottenuti a questo punto sono ancora negativi ma riproducibili, si può concludere che la sostanza non è mutagena (www.OECD.org).

Altri test su procarioti (SOS *umu* test) rilevano l'attivazione di geni coinvolti nella risposta SOS, i quali vengono monitorati in maniera indiretta grazie ad un gene reporter. Una volta attivato, il gene reporter rende disponibile nella cellula batterica un enzima in grado di trasformare un appropriato substrato in un composto colorato oppure una proteina che emette bioluminescenza: in entrambi i casi è possibile misurarne l'intensità. I ceppi batterici così modificati includono solitamente un gene per la resistenza ad un antibiotico, il che ne permette la selezione in coltura. L'attivazione della risposta SOS consente quindi alla cellula batterica con DNA danneggiato di sopravvivere e replicare, a costo però di nuove mutazioni introdotte durante la stessa riparazione "in emergenza" del DNA.

Oltre all'induzione del gene reporter, durante il test viene misurata anche la densità ottica ad una λ di 600 nm, per controllare l'andamento della crescita batterica (si valuta cioè se la sostanza ha effetti citotossici). Generalmente il test viene effettuato su piastre a 96 pozzetti, saggiando diluizioni scalari delle sostanze da esaminare in solventi quali

acqua o DMSO. Pertanto la precisione di misura può essere migliorata utilizzando appositi lettori di micropiastre.

Ai vantaggi dell' utilizzo di sistemi procariotici già descritti nella sezione introduttiva, vanno associate alcune evidenti limitazioni:

- **Struttura cellulare:** nei procariotici, sostanze in grado di entrare nella cellula possono interagire direttamente con il DNA e provocare l'insorgenza di mutazioni; nell'uomo, e negli eucarioti in generale, le cellule presentano organelli racchiusi da membrane ed il nucleo, contenente il materiale genetico, è maggiormente protetto dall'interazione con agenti estranei.
- **Organizzazione del DNA:** i test di mutagenesi più robusti e validati permettono di rilevare solo mutazioni puntiformi; per questo motivo vengono di solito richiesti anche test *in vitro* su cellule di mammifero che evidenziano danni cromosomici.
- **Falsi positivi:** soprattutto nel caso del test di Ames, composti tossici possono indurre un'elevata citotossicità; le poche cellule sopravvissute sono in grado di compiere un maggior numero di cicli replicativi prima di esaurire le tracce aggiunte di istidina e questo si riflette sulla crescita di colonie *his⁻* o pseudo *his⁺*. Lo stesso risultato si ottiene nel caso di sostanze che sono in grado di rilasciare istidina nel mezzo di coltura, particolarmente nel caso di miscele complesse, fluidi biologici. In entrambi i casi è stato osservato che l'aumento di mutazioni "spontanee" è inferiore al raddoppio;
- **Competenza metabolica:** cellule procariotiche ed eucariotiche possiedono enzimi responsabili di specifiche trasformazioni; nei procariotici alcuni composti possono essere trasformati in intermedi reattivi (ed eventualmente mutageni) che non si formano negli eucarioti o, al contrario, i batteri non sono in grado di individuare composti che risultano mutageni in altri organismi.

I test di mutagenesi su batteri sono stati utilizzati per una varietà di scopi tra cui, per esempio, la valutazione del rischio associato all'esposizione a inquinanti ambientali, quali particolato atmosferico (PM), acque, farmaci. Nonostante i test si rivelino utili nel determinare il potenziale mutageno di miscele di varia natura, essi non possono fornire dati e risultati riguardo l'esposizione cronica (cioè prolungata nel tempo) a basse o moderate concentrazioni, come normalmente accade.

1.2.4 La parete cellulare di batteri Gram negativi

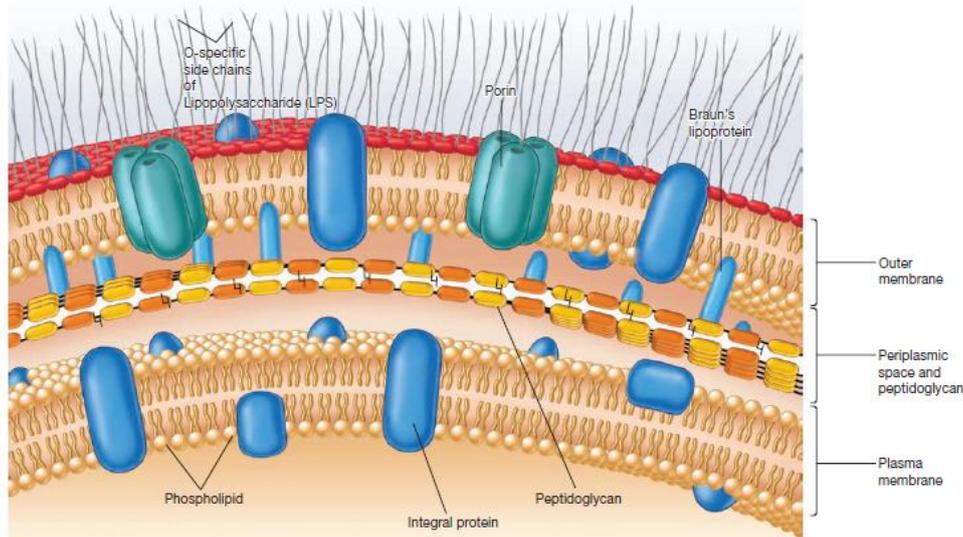


Figura 1: struttura della parete batterica (Gram-negativi)

Il maggior costituente della membrana esterna è il lipolisaccaride (LPS), molecola grande e complessa che è costituita sia da lipidi che da carboidrati. Le funzioni dell'LPS sono molteplici: rende carica negativamente la superficie batterica, contribuisce al riconoscimento e al contatto con altre superfici e, principalmente, limita la permeabilità della parete cellulare. La struttura dell'LPS e le interazioni fra le molecole dello stesso restringono il passaggio di sostanze che potrebbero danneggiare il batterio. Nonostante la barriera definita dall'LPS, proteine dette porine rendono la membrana esterna permeabile a molecole di 600-700 Da ($\varnothing \sim 2$ nm) e trasportatori di membrana mediano l'ingresso di molecole con dimensione ben maggiore (vitamina B12, 1355 Da).

Tra membrana esterna (2-8 nm) e la membrana interna si estende uno spazio periplasmico (30-70 nm occupato solo parzialmente da 2-7 nm di peptidoglicano) la cui natura rende conto della minor resistenza alla pressione osmotica rispetto ai batteri Gram-positivi. Le connessioni che mettono in relazione la membrana esterna con la cellula sono costituite da molti siti di adesione e dalle lipoproteine di Braun, che hanno una funzione prettamente strutturale. Si pensa che le sostanze che debbano entrare nella cellula, passino proprio attraverso queste connessioni, piuttosto che spostarsi nello spazio periplasmico.

1.2.5 Nanoparticelle e test di mutagenesi in procarioti

In letteratura diversi studi si riferiscono alla valutazione di NP mediante il test di Ames. Ad esempio Warheit mostra come particelle di ossido di titanio (\varnothing 140 nm) saggate fino a 5 mg/piastra risultino negative in diversi ceppi di *S. typhimurium* (TA98, TA100, TA1535, TA1537 e nel ceppo di *E. coli* WP2uvrA- Warheit *et al*, 2007).

Altre particelle di TiO₂ p25 (\varnothing 21 nm) saggate fino a 40 mg/ml sono risultate negative nei ceppi TA 98, TA 100 e TA 102 anche in presenza di irradiazione con UV (Nakagawa *et al*, 1997).

Risultati negativi sono stati riportati per l'ossido di zinco saggiato in forma micro (\varnothing 200 nm- Dufour *et al*, 2006) e sottoforma di NP di piccole dimensioni (\varnothing 5.4 nm- Yoshida *et al*, 2009) sui ceppi TA 100, TA 98, TA 1535, TA 1537 and WP2uvrA, con e senza S9.

Un debole effetto mutageno è stato osservato dopo trattamento fino ad 1 mg per piastra con particolari NP magnetiche, ricoperte con silice e rese fluorescenti con rodamina isotiocianato (MNPs@SiO₂-RITC- \varnothing 50 nm), tuttavia tale effetto non è da considerarsi significativo secondo i criteri convenzionali nè è risultato riproducibile (Kim *et al*, 2005).

Altri studi hanno dimostrato l'innocuità di nanotubi di carbonio SWNT (*Single Wall Carbon NanoTubes*, \varnothing 0.4-1.2 nm) saggiati fino a 240 mg per piastra nei ceppi YG1024 e YG1029 (-S9) (Kisin *et al*, 2007) e, analogamente, non sono risultati mutageni agglomerati di MWNT (*Multi Wall Carbon NanoTubes*, lunghezza media stimata fra 0.2 e 1) saggiati fino a 5 mg per piastra su cinque diversi ceppi di *S.typhimurium* (Wirnitzer *et al*, 2009).

Diversamente NP di carbonio (fullereni C₆₀) sono state riportate debolmente mutagene in diversi ceppi di *S. typhimurium* in assenza di S9 (Mori *et al*, 2006) e NP di FePt (\varnothing 5.4 nm) ricoperte da TMAOH (tetrametilammonio idrossido) saggate fino a 5 mg per piastra sono risultate mutagene sul ceppo TA 100 in assenza di S9 (negative in TA 98, TA1535, TA1537 and WP2uvrA/pKM101) (Maenosono *et al*, 2007). Gli stessi autori hanno successivamente saggiato anche NP di FePt (\varnothing 3 nm) ricoperte da AET (2-Aminoetanetiolo) senza rilevare effetti mutageni (Maenosono *et al*, 2009).

1.3 MITILI COME ORGANISMI BERSAGLIO

1.3.1 Caratteristiche generali

I mitili sono comuni bivalvi dell'ambiente marino costiero. Il genere *Mytilus* è ampiamente distribuito nelle acque temperate e fredde dell'emisfero. Il mitilo è un mollusco dotato di una conchiglia composta di due valve convesse, riunite ed articolate dorsalmente fra loro da una fascia proteica elastica non calcificata, detta legamento della cerniera ed, internamente, da muscoli adduttori posteriore ed anteriore. Questi agiscono in antagonismo con il legamento e, contraendosi, determinano la chiusura delle valve anche per lunghi periodi di tempo.

I mitili sono dotati di un appendice muscolosa: il piede consente al mitilo di sondare la superficie su cui si trova ed effettuare piccoli spostamenti. Da un incavo sul lato ventrale del piede viene rilasciata una secrezione viscosa che a contatto con l'acqua solidifica. Essa darà origine ai filamenti del bisso, costituiti da collagene e da particolari proteine di adesione mediante le quali il mitilo aderisce efficacemente a substrati duri (Sun *et al.*, 2002).

Aderente alla superficie interna delle valve, il mantello è sostanzialmente una lamina di tessuto connettivo che racchiude tutta la massa viscerale ed è fissato alla regione dorsale. Presenta un'ampia apertura inalante attraverso cui entra l'acqua e un orificio esalante da cui la espelle dopo aver captato l'ossigeno disciolto in essa e particelle alimentari. Il sifone esalante è piccolo e conico, mentre l'apertura inalante è più ampia e possiede papille sensoriali. Il bordo del mantello presenta dei prolungamenti che, all'atto di apertura delle valve, si intrecciano costituendo una sorta di filtro per evitare che entrino al suo interno particelle di grandi dimensioni (Mengoli, 1998).

Le branchie o ctenidi sono composte da due emibranchie, ognuna delle quali presenta a sua volta due lamelle, una ascendente e una discendente, tenute assieme da giunzioni connettivali (forma a W). Le lamelle branchiali sono rivestite da un epitelio ciliato riccamente vascolarizzato che favorisce la corretta circolazione dell'acqua e che è importante sia per la filtrazione sia per gli scambi respiratori. Le particelle in sospensione nell'acqua vengono trattenute dalle ciglia e convogliate, tramite battito ciliare lungo un solco branchiale, verso i palpi labiali e alla bocca. Da lì, le particelle giungono nello stomaco dotato di sacco dello stilo e, al suo interno, di un bastoncino trasparente e compatto detto stilo cristallino. In esso sono racchiusi enzimi digestivi come amilasi, lipasi e cellulasi. Le particelle alimentari parzialmente digerite vengono

convogliate alla ghiandola digestiva, che consiste in una serie di diverticoli comunicanti con lo stomaco. Infine, il materiale digerito viene convogliato nell'intestino fino a sboccare, tramite l'ano nella cavità palleale in prossimità della corrente esalante.

L'apparato escretore consta di due nefridi di tipo metanefridiale, collocati sotto la cavità pericardica. Ogni nefridio mostra, nella prima parte, pareti pigmentate a funzione ghiandolare e, nella seconda parte, pareti lisce che assumono la funzione di una sorta di vescica urinaria. I prodotti del catabolismo proteico sono rappresentati principalmente da ammoniaca e urea.

L'apparato circolatorio è costituito da un sistema aperto a circolazione incompleta e mista. Posto dorsalmente, il cuore è composto da un ventricolo, il principale propulsore dell'emolinfa, e da due atri. Tramite un sistema di arterie e arteriole, l'emolinfa viene spinta alle lacune del connettivo dove, circolando liberamente, irrori i vari tessuti. Viene quindi, raccolta in un seno ventrale e depurata a livello dei nefridi. Una parte è condotta direttamente agli atri mentre un'altra parte giunge alle branchie, dove si ossigena per poi tornare ai nefridi e quindi, agli atri. Ne risulta una circolazione aperta e con emolinfa mai del tutto arteriosa.

I mitili presentano generalmente sessi separati. Le gonadi sono costituite da tessuto ghiandolare che si insinua tra gli organi digestivi e nel mantello. I gameti in maturazione si raccolgono in dotti e vengono rilasciati esternamente a livello di follicoli genitali. La fecondazione è esterna, anche se talvolta può avvenire all'interno della cavità palleale delle femmine.

I tempi che scandiscono il ciclo riproduttivo variano a seconda delle zone geografiche. Nell'area dell'Alto Adriatico le gonadi sono mature tra settembre ed ottobre e l'emissione dei gameti avviene per tutto l'inverno fino a primavera con vari picchi, ed è particolarmente evidente a febbraio-marzo (Da Ros, 1985).

1.3.2 Il mitilo come organismo sentinella

Molti composti xenobiotici e contaminanti dell'ambiente acquatico possono venire accumulati nei tessuti degli organismi in concentrazioni superiori a quelle ambientali; alcuni di questi, accumulandosi, possono risultare tossici e produrre gravi danni biologici (Kadhim *et al*, 1990; Mailman *et al*, 2006).

Un bioindicatore può essere definito un organismo che fornisce informazioni su una condizione ambientale presente nel suo habitat. Possiamo ricavare queste informazioni

dalla presenza o assenza dell'organismo oppure da suoi particolari comportamenti che possono essere correlati con la presenza di un inquinante (Van der Horst *et al*, 2003).

Requisiti fondamentali affinché una specie possa essere utilizzata come bioindicatore sono l'ampia diffusione geografica, la facilità di raccolta, lo stato sedentario o sessile, le abitudini alimentari preferibilmente di tipo filtratorio e la conoscenza del suo ciclo biologico. Inoltre, la sostanziale mancanza di competenza metabolica è altrettanto fondamentale per la confrontabilità dei dati di accumulo dei contaminanti chimici.

Studi specificamente condotti su *Mytilus* hanno confermato elevata capacità di bioaccumulo e limitata capacità di metabolizzare gli xenobiotici, a conferma dell'uso di questo organismo come indicatore della presenza di inquinanti nelle acque costiere (Geyer *et al*, 1982). Nel 1975 Goldberg propose infatti il cosiddetto “*Mussel Watching*” ossia l'accertamento dello stato di qualità delle acque marine misurando i contaminanti più rappresentativi bioaccumulati dai mitili (Goldberg, 1975; Goldberg *et al*, 2000). L'accumulo di inquinanti può essere cronico, per organismi che vivono in siti posti di zone notoriamente inquinate o causato da eventi puntuali (Lauenstein e Kimbrough, 2007). Inoltre esso non dipende solo dalla concentrazione degli inquinanti nell'acqua circostante ma anche dalla variabilità di fattori biologici e chimico-fisici.

Fra gli inquinanti ambientali oggi noti ci sono potenzialmente genotossiche o mutagene. Dopo esposizione, l'induzione di danno genetico dipende dalla concentrazione del composto mutageno, dal suo ingresso e distribuzione nell'organismo, dalla capacità metabolizzante dei tessuti che raggiunge, dalla reattività del composto come tale e/o i suoi metaboliti con i bersagli cellulari (soprattutto il DNA), dalla capacità delle cellule di riparare il danno. I possibili effetti genetici conseguenti e misurabili includono scambio di cromatidi fratelli, formazione di micronuclei, mutazioni geniche e cromosomiche e, più complesse da interpretare, alterazioni del trascrittoma e del proteoma cellulari. Per l'uomo è noto che l'esposizione a sostanze mutagene può portare, da un lato, ad un aumento di mutazioni in cellule germinali, aumentando il rischio di malattie genetiche nelle generazioni successive, e dall'altro, a mutazioni in cellule somatiche critiche per lo sviluppo di malattie neoplastiche.

1.3.3 Emociti: effettori del sistema immunitario

Negli invertebrati marini, costantemente circondati da microrganismi potenziali invasori, gli emociti circolanti sono un elemento fondamentale del sistema immunitario innato, grazie alla loro capacità di infiltrarsi nei tessuti aggrediti, di fagocitare

microrganismi e rilasciare fattori citotossici, fattori del complemento e AMP (Terahara *et al*, 2006).

Gli emociti di mitilo sono in grado di mediare il riconoscimento di antigeni mediante lectine ed altri recettori (Renwranz, 1985, Pipe, 1990), effettuare migrazione chemotattica (Cheng and Howland, 1979, Stefano, 1989), adsorbire e internalizzare cellule microbiche (Renwranz, 1990), neutralizzarle o ucciderle mediante specie reattive dell'ossigeno, attività enzimatiche (Bugge *et al*, 2007) e peptidi antimicrobici (Mitta *et al*, 2000a). Gli emociti sono normalmente presenti nei tessuti, soprattutto negli epiteli in contatto con l'ambiente esterno. I diversi peptidi antimicrobici sono espressi differenzialmente da sottopopolazioni di emociti che sono in grado di infiltrare i tessuti del mitilo in risposta a determinati stimoli (Mitta *et al*, 2000b). Ad oggi non è chiaro quante siano le diverse sottopopolazioni. Citometria a flusso, attività fagocitica, produzione di ROS (specie reattive dell'ossigeno) ed altre misure sono state utilizzate per a caratterizzare le diverse sottopopolazioni di emociti di mitilo. La specializzazione funzionale degli emociti è sostenuta non solo da differenze morfologiche e biochimiche ma anche dalla localizzazione differenziale di trascritti per hsp70, defensina, mitilina B e miticina B (Li *et al*, 2008 e 2010). Gli articoli più recenti distinguono 3 o 4 tipi cellulari (Garcia-Garcia *et al*, 2008; Le Folle *et al*, 2010):

- -grandi emociti granulari (15-20 μm) con nucleo piccolo ed eccentrico;
- -grandi emociti semigranulari (15-20 μm) con nucleo ampio;
- -emociti semigranulari più piccoli con nucleo piccolo e molte estroflessioni di membrana
- -piccoli emociti agranulari (10-15 μm) con nucleo che occupa gran parte del citoplasma.

Benché dipenda dallo stato funzionale, i grandi emociti granulari (granulociti eosinofili) sono il tipo cellulare più abbondante.

1.3.4 Mitilo e nanoparticelle

L'ampiezza della produzione e dell'utilizzo di NP rende probabile una contaminazione generalizzata dei diversi comparti ambientali, per esempio i corpi idrici, e quindi alla possibilità di fenomeni di bioaccumulo e biomagnificazione lungo la catena alimentare. Finora, gli effetti da NP sono stati studiati principalmente sui mammiferi e mancano in generale studi ecotossicologici. L'assunzione di NPs in organismi bivalvi filtratori viene

favorita proprio dalla dimensione nanometrica del materiale rispetto a quella micrometrica (Ward e Kach, 2009). Non è chiaro se le NP si accumulino nei tessuti analogamente al materiale di partenza di cui sono composte. Un possibile approccio sperimentale per indagare il destino delle NP in un organismo come il mitilo potrebbe fondarsi sulla somministrazione in parallelo del materiale di partenza marcato con radioisotopi (Zuykov *et al*, 2011). Pochi sono ad oggi gli studi effettuati su mitilo. Uno di essi riporta, tramite analisi TEM, l'accumulo di fibre di lana di vetro sia in cellule epiteliali delle branchie che nei tubuli della ghiandola digestiva. A seconda della taglia, le fibre di varia lunghezza risultano distribuite dalle ciglia branchiali (< 200 nm) fino all'interno del nucleo (< 7 nm). L'internalizzazione appare mediata da vescicole che si fondono negli endosomi e sono anche evidenti lisosomi che collassano a causa dell'aggregazione di NP, probabilmente causando morte cellulare (Koehler *et al*, 2008). Recentemente, dopo trattamento *in vitro* di emociti di mitilo con nano *carbon black* sono stati analizzati parametri correlabili con la funzione immunitaria svolta da queste cellule. Anche dopo brevi tempi di esposizione (da 30 min a 4 ore) è stato riportato un significativo aumento della produzione di ROS, di ossido nitrico (NO), rilascio di enzimi idrolitici e maggior attività di fagocitosi (Canesi *et al*, 2008).

1.4 TEST DI DANNO GENETICO APPLICABILI A CELLULE DI MITILO

1.4.1 Test della cometa

Il test della cometa (Single Cell Gel Electrophoresis o SCGE) è un saggio utile non solo a valutare *in vitro* il potenziale genotossico di sostanze e campioni complessi, ma anche ad analizzare il danno al DNA indotto *in vivo*, anche in studi di biomonitoraggio nell'uomo (Sasaki *et al.*, 2000).

Il test è di rapida esecuzione, relativamente semplice da allestire e richiede quantità ridotte di materiali (Kiskinis *et al.*, 2002). Il test è molto sensibile in quanto l'analisi viene condotta su un numero elevato di cellule che vengono classificate per grado di frammentazione del DNA nucleare (Tice *et al.*, 2000).

Il protocollo di saggio prevede l'inglobamento delle cellule da esaminare in agarosio e la loro lisi in condizioni alcaline, così da ottenere lo svolgimento completo del DNA nucleare, ed infine la migrazione elettroforetica del DNA nucleare. I filamenti di DNA macromolecolare migrano scarsamente, tendono a rimanere concentrati in un nucleoide, mentre i frammenti generati da rotture del filamento migrano in proporzione inversa alla loro lunghezza e peso molecolare. Al termine della migrazione elettroforetica, il lisato cellulare viene colorato con intercalanti degli acidi nucleici e visualizzato tramite microscopio a fluorescenza: il campione assume l'aspetto di una cometa, con una coda tanto più lunga e più intensamente fluorescente quanto più il DNA è frammentato, quindi quanto più è elevato il danno.

L'entità del danno al DNA, in termini di rotture, viene stimata mediante l'acquisizione di due parametri fondamentali: % di DNA nella coda (misurabile come intensità di fluorescenza dopo colorazione) e lunghezza della coda. A partire da questi è possibile calcolare il momento di coda (*tail moment*, TM), definito come il prodotto dell'intensità di fluorescenza relativa della coda per la sua lunghezza (Collins *et al.*, 1997, 2001).

Per ogni campione di cellule esaminato vengono scelte in modo casuale 100 nuclei, acquisendone l'immagine tramite telecamera collegata a microscopio. Mediante analisi di immagine si calcola per ciascuna nucleo o cometa i valori dei parametri citati. Successivamente, si effettua l'analisi statistica dei risultati ottenuti e si calcolano i valori medi, per ogni parametro, incluso il TM.

La morfologia della cometa e, di conseguenza, il tipo e l'entità del danno misurato sono dipendenti dalla alcalinità del tampone in cui viene fatto migrare il DNA e dalle condizioni applicate nella fase di srotolamento del DNA: se questa fase è condotta in

condizioni alcaline ($\text{pH} \geq 13$), si rivelano sia i frammenti derivati da rotture a doppio filamento (DBS), che rotture a singolo filamento (SSB) e rotture che si sono generate in corrispondenza di siti labili all'alchilazione del gruppo fosfato o di basi prive dello zucchero (www.cometassay.org).

La fase della migrazione elettroforetica può essere preceduta dall'incubazione con enzimi deputati alla riparazione del DNA quali formamido-pirimidin glicosilasi (Fpg) ed endonucleasi III che, nel contesto di cellule lisate, convertono i danni in rotture del filamento (Collins *et al*, 1996).

In particolare l'Fpg riconosce specificamente e taglia via le basi puriniche ossidate del DNA, producendo siti apurinici. Mentre l'endonucleasi III converte in rotture i siti in cui sono presenti pirimidine ossidate. Il numero di frammenti prodotti dal trattamento enzimatico risulta direttamente proporzionale al danno ossidativo al DNA, mentre le loro dimensioni risultano inversamente proporzionali all'entità del danno indotto.

Il risultato è influenzato inoltre da diversi fattori, come il tipo cellulare e attività di riparazione di DNA, lo stadio del ciclo cellulare e il tempo tra l'esposizione ed analisi.

In condizioni alcaline estreme, le forche replicative si comportano come SSB e di conseguenza il DNA di cellule che si trovano in fase S migra più rapidamente. In condizioni più vicine a neutralità invece, il DNA in fase S genera bolle replicative che rallentano la migrazione durante l'elettroforesi. Dato che il *comet* fornisce la misura del contenuto totale di DNA, si può anche stimare la fase del ciclo in cui si trovano le cellule in esame oltre che analizzarne il relativo danno (Olive e Banáth, 2006).

Una delle limitazioni principali nell'applicazione del test della cometa è l'impossibilità e la difficoltà di rilevare il danno indotto da agenti genotossici aventi specifico meccanismo d'azione. Il test non è in grado di individuare (se non a dosi elevate) gli composti chimici che inducono aneuploidia, ossia alterazioni del numero di cromosomi, per esempio interferendo con la funzione del fuso mitotico.

Un'altra categoria di danno che può rendere problematica l'interpretazione dei risultati del test cometa è la formazione di *crosslink* tra filamenti di DNA (singolo o doppio) oppure tra DNA e proteine. L'instaurarsi di legami crociati porti alla formazione di complessi macromolecolari di dimensioni e peso maggiori, che rallentano la migrazione elettroforetica e che portano a riduzione del TM (Grandi *et al*, 2006).

Il *Comet* test è di grande utilità qualora la sostanza generi ROS mentre per agenti che agiscono con meccanismi d'azione misti e complessi è bene combinare due o più test (addotti al DNA e test del MN) per verificarne la genotossicità (Van Goethem *et al*,

1997). Fondamentali nell'esecuzione del *Comet* test è valutare la possibile interferenza di effetti citotossici, dato che nelle cellule in necrosi o in apoptosi può avvenire frammentazione del DNA. Tali cellule portano di solito alla formazione di comete prive di testa, dette "cellule *ghost*" che routinariamente vengono escluse dall'analisi. La citotossicità va determinata preliminarmente con test di esclusione di coloranti vitali (*Trypan blu*) o misurando l'inibizione massiva della sintesi di RNA e di proteine.

Ad esempio uno studio su cellule linfoblastoidi umane, finalizzato a valutare la specificità e sensibilità del *Comet test* nei confronti di sostanze citotossiche e genotossiche, ha mostrato che quando la sostanza causi una riduzione significativa della vitalità cellulare ($\leq 75\%$) si osserva un aumento di migrazione del DNA. Per evitare i risultati falsi positivi, è perciò importante che la vitalità delle cellule sottoposte a saggio sia $> 75\%$: in tal caso ogni aumento nella lunghezza della coda o nel TM dovrebbe essere interpretabile come effetto genotossico (Henderson *et al*, 1998).

Il test è stato applicato ad una varietà di cellule anche non proliferanti e tessuti, invece le tradizionali tecniche di citogenetica sono comunemente applicate a linfociti stimolati e replicati in colture o cellule in attiva proliferazione.

I meccanismi d'azione proposti per le NP e rilevabili attraverso il *Comet* test sono quelli riconducibili al danno ossidativo. Karlsson individua tre cause principali:

- generazione diretta di ROS da metalli di transizione che costituiscono le NP
- in maniera indiretta, deregolando la catena di trasporto di elettroni mitocondriale o attivando il sistema enzimatico del citocromo p450
- produzione di ROS come conseguenza della risposta infiammatoria

Poiché i pori della membrana nucleare hanno un diametro di 8 nm, si potrebbe pensare che solo NP di dimensioni inferiori possano entrare a contatto diretto con il DNA.

Tuttavia, la presenza di alcune NP di diametro maggiore è stata rilevata anche nel nucleo di cellule di mammifero (Chen e von Mikecz, 2005; AshaRani *et al*, 2009). Si pensa che l'interazione diretta con il DNA possa avvenire durante la mitosi, cioè quando la membrana nucleare si rompe; in alternativa, le particelle o gli ioni metallici che le compongono potrebbero aumentare la permeabilità della membrana lisosomiale, causare rilascio di DNAsi nel citoplasma che, indirettamente, finiscono per danneggiare il DNA (Banasik *et al*, 2005).

In generale, per l'analisi delle comete indotte da NP in cellule in coltura viene suggerito di estendere il trattamento fino a coprire almeno una divisione cellulare (24-72 ore).

Conducendo un'analisi di letteratura sull'applicazione del test cometa in cellule di mammifero emerge che NP di ossido di titanio e di zinco risultano sempre positive, NP di silice forniscono risultati generalmente negativi mentre non vi è uniformità di risultati per quanto riguarda particelle di ossido di ferro, *quantum dots* e nanotubi di carbonio (Karlsson, 2010).

1.4.2 Test del micronucleo

Si tratta di un test per la valutazione del danno cromosomico particolarmente utilizzato per semplicità, bassi costi e significato biologico.

Proposto nel 1976 da P.I. Countryman e J.A. Heddle come alternativa alla più complicata analisi delle metafasi, il test analizza cellule in interfase ed è stato applicato a cellule di specie e tessuti diversi: linfociti umani, linee cellulari di mammifero, eritrociti di pesci e anfibi, cellule di invertebrati marini e di acqua dolce (soprattutto emociti e cellule branchiali) (Koukouzika e Dimitriadis, 2005; Venier e Zampieron, 2005; Nigro *et al*, 2006).

In cellule interfasiche viste al microscopio ottico, i micronuclei (MN) appaiono nel citoplasma come piccoli nuclei, morfologicamente identici al nucleo principale ma di dimensioni ridotte.

Questi corpuscoli di cromatina possono avere diverse origini (Heddle *et al*, 1991). (Figura 2):

- 1-perdita di frammenti cromosomici acentrici durante la mitosi;
- 2-vari meccanismi conseguenti alla rottura ed agli scambi cromosomici;
- 3-perdita mitotica di interi cromosomi;
- 4-apoptosi, un meccanismo fisiologico geneticamente controllato di morte cellulare che comporta la trasformazione delle cellule in composti picnotici. Questi ultimi, fagocitati da altre cellule, possono venir erroneamente scambiati per MN.

In sostanza, i MN possono contenere frammenti di cromosomi che in seguito a rottura non segregano correttamente o interi cromosomi che, ritardando la migrazione anafasica, restano esclusi dai nuclei principali comportando cambiamenti cromosomici numerici. Perciò, essi vengono considerati un indicatore diretto di danno cromosomico, potenzialmente implicato nell'induzione di aneuploidia (Kirsch-Volders *et al*, 1997), difetti ereditari e tumori (Bonassi *et al*, 2007).

Per quanto riguarda la corretta classificazione dei MN (Countryman-Heddle 1976; Fenech 2000) occorre tenere conto di:

- Intensità di colorazione pari o meno intensa (occasionalmente più intensa) di quella del nucleo principale
- Citoplasma intatto comune ad entrambi
- Esistenza di una membrana nucleare separata
- Assenza di qualsiasi connessione citoplasmatica tra nucleo principale e MN
- Dimensioni del MN $\leq 1/3$ del nucleo principale
- Numero di MN ≤ 5 per cellula.

I PRINCIPALI MECCANISMI DI FORMAZIONE DEI MN

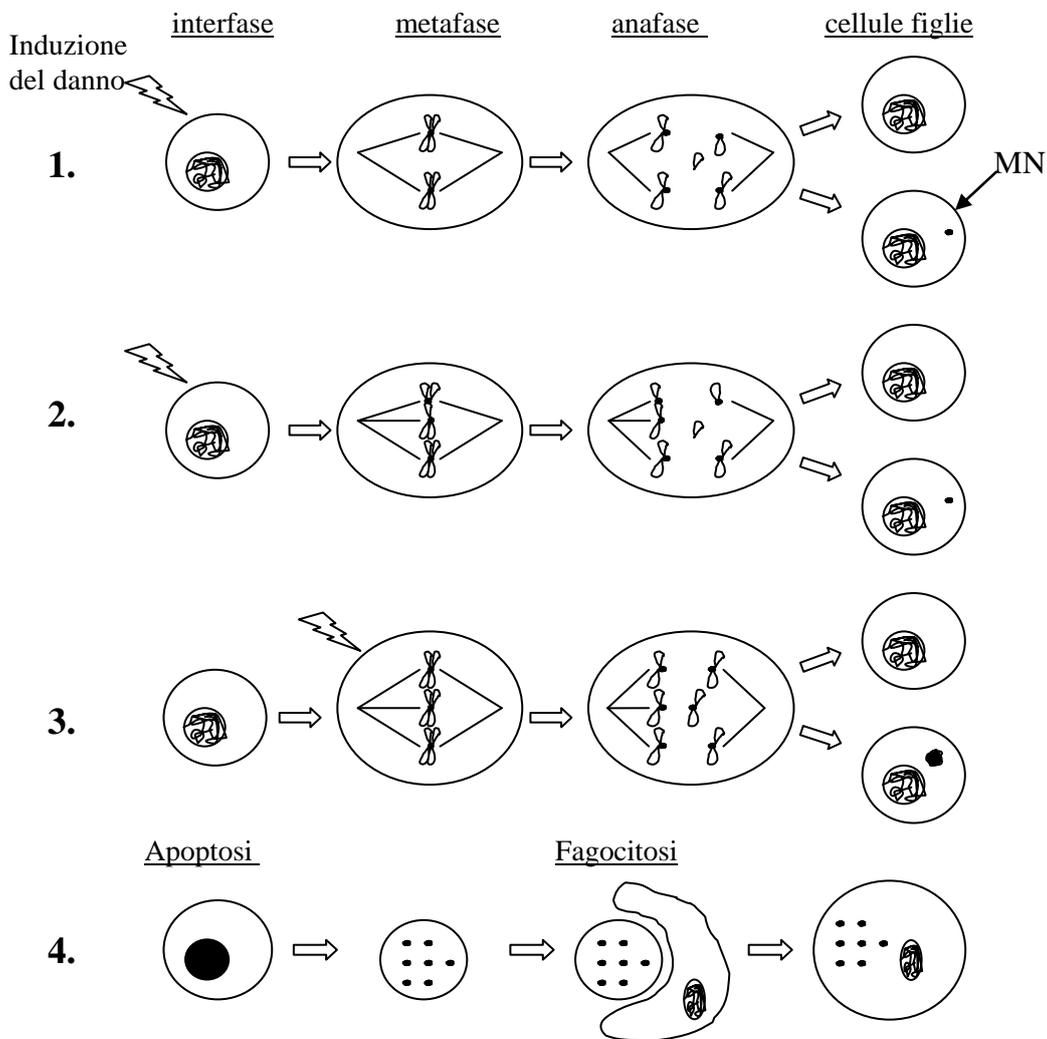


Figura 2: principali meccanismi di formazione dei MN

I MN diventano rilevabili nell'interfase successiva alla loro formazione, ossia dopo un ciclo di divisione nucleare dal momento dell'esposizione. Ciò significa che la loro frequenza, osservata in una popolazione cellulare in replicazione attiva è influenzata dal ritmo di proliferazione (variabile nelle diverse specie e tessuti bersaglio, stimabile ad esempio tra le 24 e 30 ore in cellule del tessuto branchiale di mitilo) e dalle condizioni ambientali (Martinez-Expòsito *et al*, 1994; Al-Sabti e Metcalfe, 1995).

In molti studi *in vitro*, l'analisi della frequenza di cellule micronucleate viene resa più accurata dall'aggiunta di citocalasina B sostanza che blocca la citodieresi senza inibire la divisione nucleare o interferire con l'integrità cromosomica (*cytokinesis-block micronucleus assay*). Ciò implica il rilevamento dei micronuclei nelle sole cellule binucleate (Fenech, 1997).

In generale i tempi di trattamento vanno standardizzati per ogni tipo cellulare e specie. Anche la persistenza dei MN varia in funzione della dinamica di replicazione cellulare. E' comunque ipotizzabile che per esposizioni continue, come spesso sono quelle ambientali, si raggiunga una sorta di equilibrio tra formazione ed eliminazione delle cellule in cui si è definito il MN.

Nell'esecuzione del test, la qualità dei preparati citologici (Lee *et al*, 1994; Vral *et al*, 1994) ed il numero di cellule analizzato sono ulteriori fattori che influenzano il livello di sensibilità ed i risultati. L'ottimizzazione della metodologia permette di semplificare l'interpretazione del conteggio e di ottenere una maggiore numerosità della popolazione cellulare esaminata. In questi ultimi anni, la tecnica della valutazione delle frequenze si sta infatti automatizzando: l'introduzione della citometria a flusso permette di contare molte più cellule in meno tempo e rende oggettiva e più sicura la stima (Torous, 2003).

Una maggior frequenza di micronuclei (MN) e di altre alterazioni nucleari in cellule branchiali ed emociti di mitilo è considerata indicativa dell'esposizione a contaminanti genotossici, capaci di alterare la struttura dei cromosomi o la loro migrazione durante la divisione cellulare. Quando l'analisi della frequenza di cellule micronucleate si riferisca agli effetti indotti da NP, l'uso di citocalasina è fortemente sconsigliato in quanto potrebbe inibire significativamente l'internalizzazione delle NP (Haynes *et al*, 1996; Papageorgiou *et al*, 2007).

Scopo della tesi

Gli obiettivi di questa tesi riflettono quelli del centro di ricerca ECSIN, precisamente la valutazione e l'allestimento di protocolli e sistemi sperimentali per la caratterizzazione tossicologica di NP ad ampia diffusione., in particolare su cellule procariotiche.

In primo luogo, è stata studiata con approcci sperimentali indipendenti l'interazione tra cellule mutanti *rfa* di *Salmonella typhimurium* e diversi tipi di NP, nell'idea che particolari accorgimenti potessero rendere questo sistema valido per un primo *screening* tossicologico delle NP come è avvenuto per il test di Ames e gli agenti mutageni.

Inoltre, sono stati messi a punto e preliminarmente applicati metodi per l'individuazione di danni al DNA, incluso quello derivante da stress ossidativo, in cellule dell'organismo sentinella *Mytilus galloprovincialis*, precisamente l'analisi di rottura al DNA per elettroforesi di cellule singole e l'analisi della frequenza di cellule con micronuclei.

Materiali e metodi

ABBREVIAZIONI

2AA: 2 Amminoantracene
4NQO: 4 Nitrochinolina 1-ossido
ALS: siti labili all'alchilazione
AN: anomalia nucleare
DLS: Dynamic Light Scattering
DMSO: Dimetilsolfossido
d.o: densità ottica
DSB: rotture a doppio filamento
FCS: fetal calf serum
FITC: fluoresceina isotiocianato
LMP: Low melting point
MN: micronucleo
NMP: Normal melting point
NO: ossido nitrico
NP: nanoparticella
OECD: Organisation for Economic Co-operation and Development
ONPG: Orto-Nitrofenil- β -Galattoside
PE Cy7: ficoeritrina Cy7-coniugato
PBS: tampone fosfato salino
PEG: polietilenglicole
REACH: REgistration, AuthorizatiOn and Evaluation of CHEmicals
ROS:specie radicali che dell'ossigeno
rpm: rotazioni al minuto
S9: estratto di enzimi microsomiali epatici
SSB: rotture a singolo filamento
 T_{amb} : temperatura ambiente
TE: tampone Tris-EDTA
TEM: microscopio elettronico a trasmissione
TM: tail moment
TGA: Tellurite-Glycine Agar (medium)

2.1 CEPPI BATTERICI

In questo studio sono stati utilizzati i ceppi TA 98 e TA 100 di *Salmonella typhimurium*, forniti dalla ditta Moltex-Trinova®. Essi portano una mutazione in un gene strutturale dell'operone istidina e sono incapaci di sintetizzare questo amminoacido. La tabella seguente mostra la sequenza di DNA bersaglio e il tipo di retromutazione di questi ceppi (Mortelmans and Geiger, 2000).

CEPPO	DNA BERSAGLIO	EVENTO DI REVERSIONE
TA 100	-G-G-G-	Sostituzione coppia di basi
TA 98	-C-G-C-G-C-G-C-G-	<i>Frameshift</i>

Tali ceppi sono stati resi maggiormente sensibili ai mutageni grazie all'introduzione di alcune mutazioni aggiuntive:

- rfa* determina una ridotta presenza del lipopolisaccaride nella parete cellulare, rendendola maggiormente permeabile a molecole stericamente ingombranti,
- uvrB* determina la perdita di accuratezza di riparazione del DNA tramite escissione,
- pKM101* Plasmide che introduce un sistema di riparazione del DNA poco preciso e che conferisce resistenza all'antibiotico ampicillina.

I ceppi batterici liofilizzati sono stati riattivati per inoculo in brodo nutritivo aggiunto di ampicillina (25 µg/ml) ed agitazione (230 rpm) a 37°C.

Preliminarmente, saggi di crescita e di attività mutagenica sono stati condotti utilizzando batteri cresciuti in brodo nutritivo Luria Bertani, Nutrient Broth® Conda e Oxoid® N°2. Confrontando i risultati ottenuti con quelli indicati in letteratura si è optato per il brodo nutritivo Oxoid® N°2 (Maron e Ames, 1983).

Colture permanenti sono state preparate aggiungendo l'agente crioprotettivo (DMSO Sigma-Aldrich, 0.09 ml per ml di coltura) e congelando aliquote opportune a -80 °C. La determinazione delle curve di crescita a 37°C dei ceppi TA 98 e TA 100 (Appendice A) ha permesso di scegliere la $d_{0.7(600\text{ nm})}$ pari a 0.7 come standard per tutti i saggi successivi (colture omogenee di batteri in fase di crescita logaritmica).

2.1.1 Saggio di citotossicità

Un'aliquota di coltura batterica (100 µl) e della sostanza da saggiare preparata alla concentrazione desiderata (1 ml) sono incubate per 30 minuti a 37°C. Le cellule così trattate e quelle di controllo sono quindi diluite serialmente (10^{-5} , 10^{-6} , 10^{-7}) in brodo nutritivo ed infine 100 µl di ogni diluizione vengono seminati su terreno solido completo (Oxoid® N°2) tramite passaggio in agar molle al 1.5% (2 ml).

Trascorse 24 ore a 37°C viene contato il numero di Unità Formanti Colonia per piastra e calcolata la concentrazione di cellule vive dopo trattamento.

2.1.2 Saggio di mutagenicità (test di Ames)

Un'aliquota di coltura batterica (100 µl) e delle preparazioni di NP (1 ml) sono seminate tramite agar molle al 1.5 % (2 ml) su terreno solido limitante (terreno *his⁻*) in assenza e in presenza di S9 (frazione microsomiale epatica di ratti Sprague-Dawley trattati con Aroclor 1254, Moltox®) secondo il protocollo descritto da Maron ed Ames (1983).

Dopo 48 h a 37°C, il conteggio delle colonie revertenti permette di calcolare la media per ciascun punto sperimentale (N=3). Come controlli positivi sono stati scelti l'icantone (Sigma-Aldrich) direttamente mutageno con meccanismo frameshift su TA 98, il bicromato di potassio (Riedel de Haen) mutageno diretto per sostituzione di base su TA 100 e il 2-aminoantracene (2AA, Sigma-Aldrich) mutageno su entrambi i ceppi in presenza di S9.

Il test è stato eseguito anche pre-incubando per 30 minuti a 37 °C i batteri e preparazione di NP prima della semina in piastra (Gatehouse et al, 1994).

È stato utilizzato anche un protocollo in micropiastra, attualmente in fase di certificazione, che prevede un'incubazione in liquido di 100 minuti a 37°C tra i batteri e la sostanza test, con o senza attivazione metabolica, in piastre da 24 pozzetti.

Successivamente viene aggiunto un mezzo contenente un indicatore di pH (bromocresolo porpora, Sigma-Aldrich) che ha la capacità di virare dal viola al giallo nel momento in cui la crescita dei batteri causa l'acidificazione del mezzo. Infine, il volume di ciascun pozzetto viene distribuito in aliquote da 50 µl in 48 minipozzetti di una piastra da 384. Dopo incubazione al buio per 48 ore a 37°C, vengono conteggiati i pozzetti gialli nei quali è avvenuta la reversione dei batteri allo stato *his⁺* (Ames fluctuation test, ISO/TC147/SC5N0596).

I controlli positivi utilizzati nel saggio in micropiastra per entrambi i ceppi sono il mutageno diretto 4-NQO (Sigma-Aldrich) e l'amina aromatica 2-AA (Sigma-Aldrich), mutagena a seguito di attivazione metabolica (in presenza di S9).

Lavorando in micropiastra si può saggiare un alto numero di sostanze chimiche con notevole risparmio di tempo, reagenti e materiali. L'aumento di sensibilità del saggio sperimentale può far rilevare come significativi anche piccoli incrementi di attività mutagena, anche causati da componenti mutageni rilasciati come impurità da nanoparticelle, ma la capacità dei singoli pozzetti limita il volume assoluto e la dose di sostanza saggiabili.

2.1.3 Saggio di induzione di danno al DNA (*SOS umu* test)

In accordo alla procedura ISO 13829: 1999, il saggio viene condotto in micro piastra e utilizza il ceppo *S. typhimurium* TA1535/pSK 1002 (gentilmente fornito dal Dr. G. Reifferscheid, Federal Institute of Hydrology, Koblenz, Germany) che rende possibile rilevare colorimetricamente l'induzione della risposta SOS. In queste cellule, l'espressione del gene reporter della β galattosidasi è controllata dal promotore del gene *umu*, gene 'danno-inducibile' de-represso durante la risposta SOS (risposta pleiotropica di sopravvivenza e di riparazione di danno al DNA).

Un'aliquota di coltura batterica cresciuta *overnight* viene diluita in terreno TGA e incubata a 37°C finché non riprenda la fase logaritmica di crescita. Dopo incubazione per 30 minuti con la sostanza da saggiare, si stima la crescita batterica misurando la $d_{O(600\text{ nm})}$ mentre l'attività della β -galattosidasi viene determinata attraverso un metodo colorimetrico che utilizza ONPG (Sigma-Aldrich) come substrato e prevede la misura della $d_{O(420\text{ nm})}$.

2.2 NANOPARTICELLE DI SILICE:

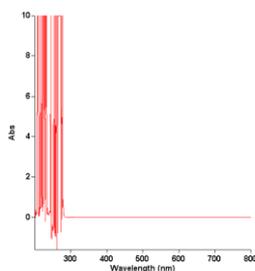
Le NP Ludox AS30 ed SM30 sono state acquistate dalla ditta Sigma-Aldrich come sospensione acquosa di SiO₂ al 30% in peso, sono state diluite in acqua MilliQ e dializzate più volte in una cella per ultrafiltrazione Amicon (75 ml) attraverso una membrana di cellulosa rigenerata con porosità pari a 10-kDa, e infine filtrate a 0.22 µm con membrana Durapore[®]. L'ultrafiltrazione garantisce l'eliminazione di additivi in traccia (es. NH₄⁺, Al), mantenendo intatta la grandezza e la morfologia delle NP (come dimostrato con analisi DLS e TEM dal Prof. F. Mancin, Dip. Scienze Chimiche, Università di Padova). Tutte le preparazioni, ultrafiltrate e non, sono state fornite dal Dipartimento di Scienze Chimiche a pH fisiologico e sono state prudenzialmente sterilizzate per filtrazione a 0.22 µm. Oltre alle caratteristiche specificate dal produttore, in tabella 1 sono riportati anche diametro e potenziale zeta, sperimentalmente determinati.

LUDOX [®] SiO ₂	Contro-ione	Densità a 25°C	pH	Area superficiale m ² /g	Ø DLS (nm)	Ø TEM (nm)	ζ (mV)
AS 30	Ammonio	1.2 g/mL	9.1	~230	20 ± 4	18 ± 3	- 25.9
SM 30	Sodio	1.2 g/mL	10.0	~345	13 ± 4	9 ± 3	- 26.3

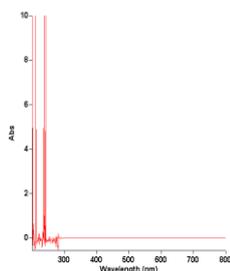
Tabella 1

Per accertarne la stabilità, è stato analizzato lo spettro di assorbimento delle NP AS30 e SM30 in sospensione colloidale nei diversi mezzi di incubazione utilizzabili nei saggi sperimentali.

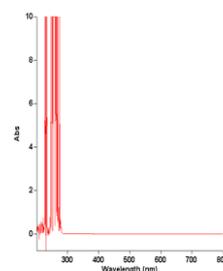
AS30 in H₂O



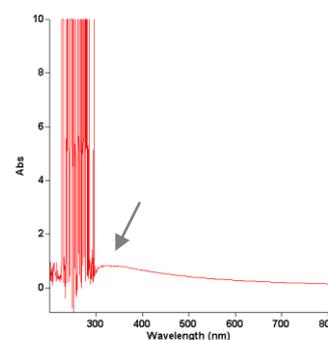
AS30 in PBS



AS30 in V-B salts



AS30 in OXOID #2



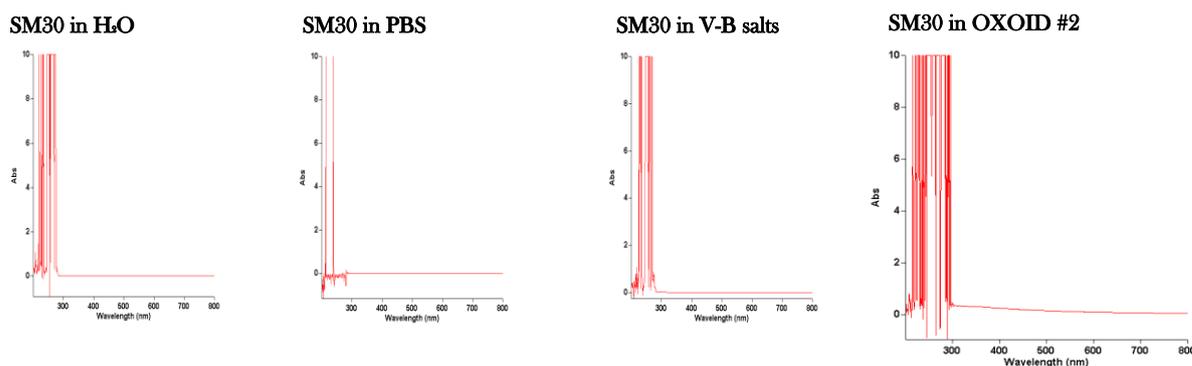


Figura 3. Spettri di assorbimento delle Ludox[®] AS30 ed SM30 disciolte in diversi mezzi.

Lo spettro delle NP in brodo Oxoid N°2 mostra un lieve picco di assorbimento a 300 nm (più evidente per le AS 30), non presente negli altri casi; questo potrebbe indicare la formazione di aggregati in questa condizione, visto che il brodo nutritivo è ricco di proteolisi e che le Ludox hanno potere chiarificante.

Sulla base degli spettri ottenuti, si è preferito risospendere le NP Ludox[®] in PBS per studiarne i potenziali effetti su cellule batteriche, evitando artefatti da aggregazione a costo di una possibile riduzione di vitalità per i tempi di incubazione più lunghi.

Le nanoparticelle di silice fluoresciate sono state sintetizzate dal Dipartimento di Scienze Chimiche (prof. F. Mancin); sono state fornite già ultrafiltrate e hanno subito la sterilizzazione come indicato sopra. Qui di seguito le loro caratteristiche:

NP SiO ₂	fluoroforo	Dye loading (in peso)	Ø DLS (nm)	Ø TEM (nm)	ζ (mV)
AM 22	fluoresceina	0.3- 0.5 %	25 ± 6	22 ± 3	- 20.7
AM 23	fluoresceina	0.3- 0.5 %	23 ± 7	21 ± 4	

2.3 NANOPARTICELLE DI MAGHEMITE:

NP magnetiche (γ -Fe₂O₃) sono state sintetizzate dal Dipartimento di Chimica Biologica (prof. F.Vianello). Sono state trattate con ultrasuoni in acqua MilliQ (48 kHz, 50 W, per almeno 6 ore). Le particelle separate dal liquido circostante con magneti sono state lavate diverse volte con acqua pura e risospese in PBS. La purezza della preparazione è

stata accertata attraverso lo spettro Mössbauer. Le particelle sospese in PBS risultano avere un diametro medio di circa 12 nm (TEM), ed un potenziale zeta di - 22.9 mV.

2.4 QUANTUM DOTS:

I quantum dots sono accumulati dalla caratteristica di assorbire la luce ed emetterla a diverse lunghezze d'onda ed efficienza a seconda delle proprie dimensioni.

Al fine di questo studio sono stati usati Qtracker[®]800 (Invitrogen) aventi un diametro dichiarato pari a 5 nm. Se osservati al TEM, essi però presentano morfologia cuneiforme e un diametro maggiore (~10 nm).

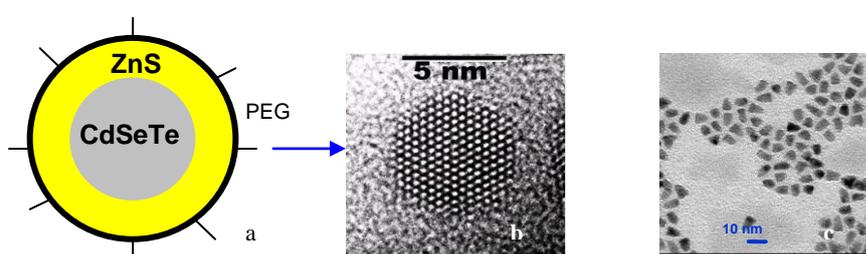


Figura 4. a) Struttura dei Qtracker[®]800, b) diametro dichiarato, c) diametro misurato al TEM

Come illustrato in figura i Qtracker[®] hanno un core metallico di cadmio selenio tellurio, un anello intermedio di semiconduttore, solfuro di zinco e un rivestimento esterno di PEG che ne sfavorisce il riconoscimento da parte del sistema immunitario.

2.5 PREPARAZIONE DELLE CELLULE BATTERICHE PER SAGGI DI INTERAZIONE CON NP

Il ceppo TA100 di *Salmonella typhimurium* viene fatto crescere in brodo Oxoid N°2 finché non raggiunge $d_{(600\text{ nm})}$ pari a 0.7.

Per le analisi di citotometria a flusso preparazioni di NP fluorescinate AM 22- AM 23 e Qtracker[®]800 sono stati incubati con batteri TA 100 in PBS (Vol: 200 μ l) per 0.5, 3, 6, 11, 24 ore a 37 °C in agitazione leggera. Quindi le cellule vengono lavate 2 volte con PBS prima di procedere alla misurazione (citofluorimetro BD FACS Canto[™] II impostato per la lettura della fluorescenza FITC e per i Q800 della fluorescenza PE Cy7).

Per la microscopia elettronica a trasmissione (TEM), i batteri sono stati incubati per 0.5 e 6 ore in presenza di nanoparticelle (Q800 e Fe₂O₃) in due diverse condizioni.

In una prima prova (Appendici B e C), un'aliquota della coltura batterica dopo centrifugazione (3500 xg, 5 min, 25 °C) è stata incubata con le NP a 25 °C in un volume di 200 µl, mentre un'ulteriore prova è stata condotta mediante incubazione in PBS (5 ml) a 37°C.

In entrambi i casi, le cellule batteriche hanno poi subito il medesimo processo di fissazione e disidratazione:

- i. aggiunta di 2 ml gliceraldeide ghiacciata 2.4 % per 45 min
- ii. centrifugazione (3500 xg, 15 min, 4 °C)
- iii. 3 lavaggi di 10 min con 1 ml sodio cacodilato (0.1 M) addizionato con saccarosio al 1.5 %
- iv. 1 ml di tetrossido di osmio al 1 % in tampone cacodilato (0.1 M) per 15 min
- v. 3 lavaggi di 10 min con 1 ml sodio cacodilato (0.1 M)
- vi. Disidratazione mediante passaggi in etanolo a diverse concentrazioni (50 %, 70 %, 90 %) per 10 minuti e *overnight* in etanolo assoluto
- vii. Il pellet fissato viene inglobato in una resina (812 TAAB® embedding kit) a 60°C per 48 ore.
- viii. Le sezioni ultrafini (0.7 µm) vengono ottenute mediante taglio con lama di diamante al microtomo (Ultratome III, LKB)
- ix. Le osservazioni vengono condotte al microscopio elettronico a trasmissione (Tecnai G12, FEI) disponibile presso il dipartimento di biologia.

2.6 ALLESTIMENTO DEL TEST COMETA IN CELLULE DI *MYTILUS GALLOPROVINCIALIS*

Nel 1984 Ostling e Johanson furono i primi a sviluppare un metodo utile a rilevare i danni indotti al DNA di singole cellule utilizzando l'elettroforesi su gel di agarosio. Questa tecnica che prende il nome di elettroforesi su gel a singola cellula (SCGE) o più comunemente test della cometa, permette il rilevamento di rotture a singolo o doppio filamento, siti alcalo-labili e cross-link in cellule eucariotiche *in vitro* e *in vivo* in diversi tessuti di diversi organismi.

Il Comet test si articola in diverse fasi (Fig.5):

- Isolamento delle cellule e preparazione dei vetrini
- Lisi delle cellule per rompere le membrane e liberare il DNA
- Srotolamento del DNA (*unwinding*)
- Elettroforesi

- Neutralizzazione degli alcali
- Colorazione del DNA e osservazione dei vetrini al microscopio a fluorescenza
- Analisi delle comete

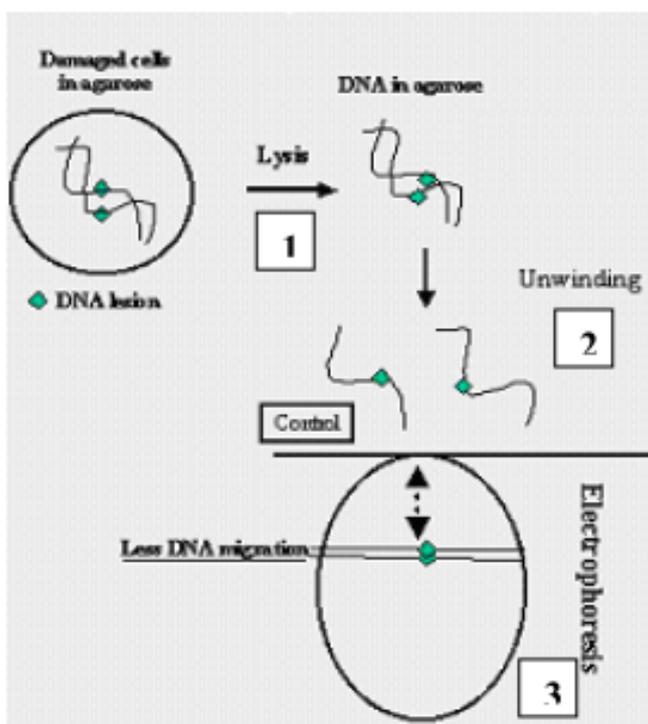


Figura 5: Fasi del test della cometa

La variazione di alcuni fattori, quali la concentrazione di agarosio nel gel, il pH, la temperatura e la durata dell'*unwinding*, il voltaggio, l'ampereaggio e la durata dell'elettroforesi, sono state messe a punto per ottenere la miglior qualità dei nuclei da valutare.

2.6.1 Trattamento e isolamento delle cellule

I mitili utilizzati per la sperimentazione sono destinati al mercato (provenienti dalla Spagna e stabulati per alcuni giorni presso l'azienda C.a.m di Chioggia).

I mitili, sono stati mantenuti in vasche ossigenate contenenti acqua di mare artificiale (Istant Ocean al 32 ‰ di salinità) e alla temperatura di 22 °C. Essi sono stati alimentati con ceppi di alga marina *Isochrysis galbana* e *Tetraselmis suecica* coltivati in laboratorio in F2 Medium (Sigma-Aldrich).

L' emolinfa è stata prelevata viene prelevata con una siringa con 0.2 ml di alsever. Per ogni campione di emolinfa è stata controllata l'assenza di contaminazione al microscopio ottico, l'assenza di contaminazione degli emociti con cellule gametiche.

Il trattamento degli emociti è stato effettuato incubando 250 µl con 50 µl della preparazione di NP per 1 ora a 4 °C in agitazione moderata, usando acqua milliQ sterile come controllo negativo e H₂O₂ (30 % Sigma –Aldrich). Immediatamente prima del saggio le soluzioni madre delle Ludox[®] AS 30 e SM 30 sono state agitate vigorosamente per 5 minuti.

2.6.2 Procedimento

Preparazione dei vetrini

I vetrini porta oggetto superfrost plus (Menzel-Glaser) hanno superficie carica positivamente e di solito sono usati per migliorare l'adesione al vetrino di campioni congelati.

I vetrini vengono ricoperti di Agar a punto normale di fusione (NMP) preparato allo 0.8 % in PBS e lasciati asciugare all'aria.

Successivamente le cellule da saggiare vengono mescolate in 65 µl di gel di agarosio a basso punto di fusione (LMP) preparato allo 0.65 % in PBS a 37°C, vengono distribuite sul vetrino precedentemente preparato e coperte con coprioggetto. Si lascia asciugare e si ricopre con un ulteriore strato di agarosio LMP e si lascia nuovamente solidificare.

Gli strati di agarosio possono variare a seconda del protocollo, ma generalmente sono due o tre. Sia la concentrazione delle cellule sul vetrino che la concentrazione dell'agarosio sono parametri importanti per una corretta analisi. Infatti un'alta concentrazione di agarosio può limitare la migrazione del DNA durante l'elettroforesi e un'alta concentrazione di cellule può determinare la sovrapposizione delle cellule stesse e quindi delle eventuali comete. La stabilità del gel sul vetrino è un altro aspetto critico del test.

Lisi delle cellule

Si compone la soluzione di lisi (pH 10) sciogliendo in acqua distillata:

NaCl (2.5 M), Na₂EDTA (100 mM), TrisHCl (10 mM)

La soluzione va aggiunta di Triton 1 % , tensioattivo che viene usato nella estrazione del DNA.

I vetrini vengono dunque immersi in questa soluzione a 4°C per almeno 1 ora.

Dal momento in cui inizia questa operazione è essenziale lavorare al buio, per evitare che il DNA possa essere danneggiato da radiazioni luminose. In questo passaggio vengono lisate le cellule, causando la rottura delle membrane cellulari e favorendo la successiva migrazione del DNA durante l'elettroforesi.

Srotolamento del DNA

I vetrini vengono incubati nel tampone alcalino di elettroforesi (NaOH 0.03 M) per consentire lo srotolamento del doppio filamento del DNA per 20 minuti. La lisi condotta in condizioni alcaline (pH= 12) permette di rilevare i frammenti derivati da assieme rotture a singolo e doppio filamento.

Elettroforesi

Prima di effettuare la corsa elettroforetica, bisogna controllare che lo strato che ricopre i vetrini sia adeguato al mantenimento dei parametri impostati (25V - 300 mA -10 min).

Fissazione

Se si vuole rimandare la colorazione, i vetrini possono essere fissati immergendoli in metanolo ghiacciato.

Colorazione del DNA e visualizzazione delle comete

I vetrini vengono colorati con un intercalante, il Sybr Gold[®] (Invitrogen) viene diluito 20000 volte in tampone TE. La colorazione non deve durare più di 2 minuti, per avere un buon contrasto tra l'intensità di fluorescenza del DNA e il *background*. A questo punto i vetrini possono essere osservati al microscopio ottico a fluorescenza (obiettivo 20X, filtro per FITC).

2.6.3 Analisi qualitativa del vetrino

Per avere una stima della frequenza delle diverse tipologie di danno, viene eseguita una conta al microscopio dei nuclei classificandoli in tre categorie: nuclei intatti, comete, *ghost*.

Nuclei intatti

Il materiale genetico rimane sostanzialmente confinato all'interno del nucleo; la migrazione nel corso dell'elettroforesi è nulla o minima. Questi nuclei appartengono a cellule con DNA intatto che non hanno subito effetti genotossici rilevanti.

Comete

Le comete presentano una “testa” costituita dalla porzione di DNA intatto e una “coda” che contiene i frammenti di DNA minori che hanno migrato durante l'elettroforesi. I nuclei che generano comete hanno subito effetti genotossici che possono essere stimati attraverso la misura dei parametri indicati in seguito.

Ghost

I *ghost* si riconoscono per l'assoluta mancanza di un corpo centrale e presentano una forma allargata a “macchia”. Il DNA è del tutto frammentato e degradato, fenomeno che non può essere imputabile unicamente ad un danno genotossico, ma ad un effetto citotossico importante o a cellule apoptotiche giunte alla fine del ciclo vitale.

In generale, quando si procede alla lettura del vetrino è bene escludere tutte le cellule che si sovrappongono, quelle poco colorate rispetto alle altre, quelle che presentano difetti morfologici rispetto alle categorie sopra elencate, quelle che non hanno la testa visibile e quelle che hanno la testa e la coda separate (Nakajima –Comet Assay workshop 2009).

Lo scopo dell'osservazione è la quantificazione del numero di cellule che presentano il DNA frammentato rispetto a quelle con nucleo intatto attraverso misurazioni di determinati parametri strutturali della cometa stessa.

- Intensità di fluorescenza nella testa intesa come percentuale di DNA del nucleo rispetto all'intensità di tutta la cometa
- Lunghezza della testa ovvero diametro della stessa
- Intensità di fluorescenza della coda che rispecchia la percentuale di DNA migrato rispetto al resto della cometa
- Lunghezza della coda, indica la distanza tra il centro della testa e la fine della coda
- Migrazione della coda, misura la distanza tra la fine della testa e la fine della coda
- Momento della coda, rappresenta il prodotto dell'intensità per la sua lunghezza

- Intensità totale della cometa, da cui possiamo ricavare quanto DNA è contenuto nella stessa

2.6.4 Analisi quantitativa del vetrino

Per le analisi dei parametri indicativi del danno genotossico vengono solitamente analizzate 100 cellule per campione scelte casualmente su un'area nitida del vetrino in modo da rappresentare oggettivamente la situazione del campione esaminato, escludendo, come detto precedentemente, dalle conte i *ghost*.

Inizialmente, l'analisi delle comete è stata condotta attraverso un *software free* disponibile in rete (<http://casplab.com>) che imponeva di selezionare e salvare al microscopio a fluorescenza diverse immagini (fino ad un centinaio totale di nuclei) che successivamente dovevano essere analizzate singolarmente dal programma per misurare i parametri voluti: l'operatore deve tracciare un rettangolo che includa la cometa per avviare l'algoritmo di analisi dei pixel che realizza la distinzione delle varie parti della cometa e genera i risultati a lato dell'immagine (Figura 5).

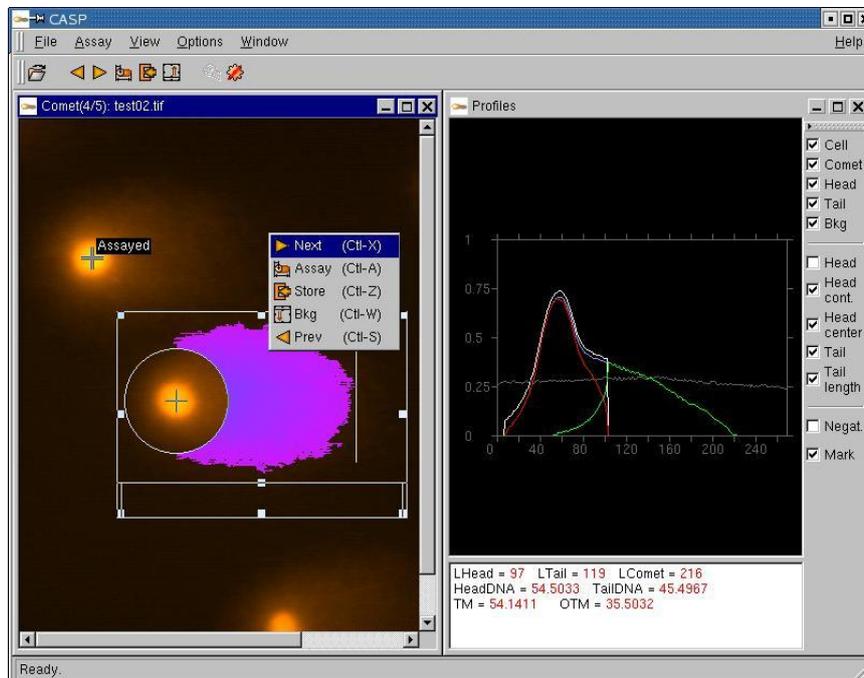


Figura 5. Immagine campione per l'analisi di una cometa acquisita con il *software* Casp

L'utilizzo di questo programma si è rivelato piuttosto laborioso sia perché l'analisi veniva fatta successivamente all'osservazione del vetrino, sia perché i valori

corrispondenti a ciascuna cometa andavano copiati singolarmente in un *file* che raccogliesse tutti i dati relativi al vetrino.

Allo scopo di velocizzare e rendere meno approssimative le analisi, è stato acquisito un programma più avanzato e specifico, *Comet Assay IV* (Perceptive Instruments).

Tale programma velocizza i tempi di analisi, perché la misurazione viene fatta contemporaneamente alla lettura del vetrino. Come è descritto in Figura 6 (1) è sufficiente selezionare con il cursore il punto centrale della “testa” e immediatamente appare lo schema mostrato in Figura 6 (2). Più precisamente il settore giallo individua l’area della cometa, la linea azzurra l’inizio della testa, quella verde il centro della stessa e quella viola la fine della coda. Il programma consente inoltre di poter correggere le linee di divisione manualmente, qualora, per esempio, si sovrapponevano tra cometa e cometa.

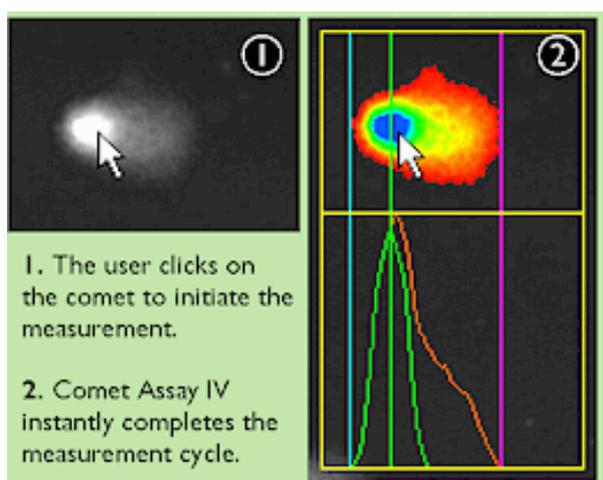


Figura 6 (1 -2) Selezione e discriminazione immediata tra le componenti della cometa

Il programma deve essere impostato correttamente rispetto all’obiettivo utilizzato prima della lettura; il settaggio può essere risolto utilizzando un vetrino micrometrico.

I risultati riportati in questa tesi sono stati ottenuti con l’obiettivo 20x.

L’interfaccia grafica permette di lavorare in due modalità: *live* per spostarsi nelle diverse zone del vetrino e *frozen* che blocca l’immagine in modo che si possano analizzare i nuclei. L’*output* risultante fornisce istantaneamente tutti i parametri corrispondenti a ciascuna cometa (Figura 7).

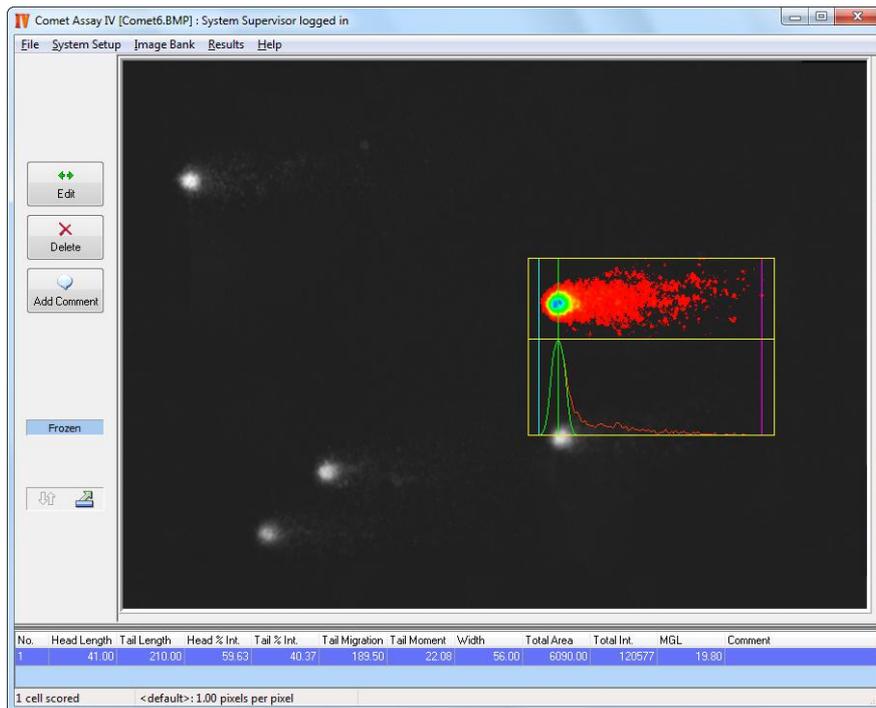


Figura 7: Immagine di *output* del programma

2.7 MISURA DI VITALITA' CELLULARE: TEST DI ESCLUSIONE DEL *TRYPAN BLU*

Per determinare preliminarmente il numero di cellule vitali presenti in una sospensione cellulare si può valutare quante cellule posseggano membrane cellulari intatte e escludano certi coloranti, ad esempio il *Trypan Blu*, che colorano le cellule morte. Secondo questo principio, le cellule vitali appariranno come trasparenti, mentre quelle morte avranno il citoplasma blu.

Il campione di emolinfa di mitilo in Alsever si centrifuga (100 xg, 5 min, T_{amb}), e si risospendono gli emociti in PBS (20 μ l). Si diluiscono quindi 1: 1 con *Trypan blu* 0.4 % (Sigma-Aldrich). Dopo 3 minuti di contatto si prelevano 10 μ l della sospensione e per ognuna delle due camere dell' emocitometro si procede al conteggio differenziale.

2.8 ALLESTIMENTO DEL TEST DEL MICRONUCLEO CON CELLULE BRANCHIALI DI *MYTILUS GALLOPROVINCIALIS*

Il test del micronucleo stima la presenza del danno cromosomico in termini di frequenza di cellule interfasiche con micronuclei.

Il test è stato allestito con mitili trattati *in vivo* con una miscela di metalli

2.8.1 Trattamento dei mitili con una miscela di metalli

È stata composta una miscela equimolare di CdCl₂ H₂O, CuCl₂ H₂O e HgCl₂, Sali solubili di metalli tossici e genotossici in modo da fornire ai mitili dosi nominali di 0.05, 0.10 e 0.20 µM. Queste dosi sono state scelte in modo da essere in grado di causare danno al DNA, ma tali da evitare letalità (Bolognesi *et al*, 1999; Venier *et al*, 2006).

Mitili selezionati per taglia omogenea e mantenuti come precedentemente indicato, sono stati trattati per 48 ore con la miscela di metalli rinnovando acqua, metalli e nutrimento ogni 12 ore. Durante l'esposizione, i mitili sono stati controllati in termini di formazione di bisso, chiusura delle valve in caso di stimolazione, e produzione di pseudofeci. Nel corso della sperimentazione non è stata riscontrata mortalità significativa.

Dato che il periodo temporale in cui si è allestita la sperimentazione coincideva con la gametogenesi, in diversi casi si è assistito ad emissione di gameti, fatto da considerarsi causa di stress ulteriore per mitili trattati.

2.8.2 Allestimento e osservazione dei vetrini

Dopo dissezione e breve lavaggio in PBS, si disgrega il tessuto branchiale in 4 ml di Alsever aggiunto di 80 µl di dispasi II (proteasi neutra da *Bacillus polymyxa*, 0.6 U/ml). La sospensione viene agitata per 15 minuti a temperatura ambiente, poi l'enzima viene inattivato aggiungendo un ugual volume di Alsever più cisteina (10 µM) e EDTA (10 µM). Successivamente, il campione viene filtrato su retini di nylon con porosità pari a 280 µm e 100 µm e centrifugato a 200 xg (10 minuti a 20°C).

Queste condizioni derivano da prove effettuate in diversi mezzi e diverse modalità di manipolazione del campione.

Il pellet di emociti, infine, viene risospeso in Alsever più cisteina. La sospensione viene depositata delicatamente, in una falcon con 3 ml di Histopaque[®] 1077 (Sigma-Aldrich, soluzione di Ficoll a densità 1077 g/m). La successiva centrifugazione a 800 xg per 10 minuti fa ottenere un anello di cellule tra le due fasi, che deve essere trasferito in

provette con Alsever. Inizialmente erano state condotte alcune prove con Histopaque 1119, tuttavia il 1077 ha prodotto preparati cellulari migliori.

Dopo 2 ulteriori lavaggi per centrifugazione a (200 xg per 10 minuti a 20°C) si risospendono le cellule in Alsever più cisteina. Infine, dopo un'ultima centrifugata, si addiziona al pellet 1 ml di Alsever con FCS al 5 % per prevenire l'aggregazione.

I lavaggi e i conseguenti passaggi in centrifuga sono stati ottimizzati allo scopo di ottenere dei campioni che apparissero privi di detriti.

Le sospensioni di cellule branchiali sono state citocentrifugate su vetrino (800 rpm per 2 minuti, Cytospin 3- Shandon) verificando di volta in volta la diluizione più opportuna per ottenere circa 2000 cellule per vetrino (5- 40 µl di cellule in 200 µl di Alsever).

Per ogni mitilo è prudente allestire almeno 5 vetrini, dato che la distribuzione delle cellule può comunque risultare non omogenea. Dopo averli lasciati asciugare per 20-30 minuti, i vetrini vengono fissati in metanolo ghiacciato per 20 minuti. Dopo circa 30 minuti si procede alla colorazione tenendo i vetrini per pochi minuti in colorante Giemsa (Fluka, composto da azzurro eosina e blu di metilene) al 6 % in tampone Sorensen. Dopo 2 risciacqui delicati si osserva al microscopio il grado di colorazione raggiunto. La colorazione è adeguata quando si può distinguere facilmente il nucleo basofilo (blu-viola), il citoplasma (blu pallido) e i suoi componenti a colorazione variabile.

Prima che il vetrino sia asciutto si può aggiustare la colorazione attraverso brevi reimmersioni nella soluzione colorante oppure sciacquando ulteriormente. I vetrini vengono montati in maniera definitiva con DPX Mountant (Fluka).

L'osservazione viene eseguita con microscopio ottico in campo chiaro utilizzando l'obiettivo ad immersione 100x su almeno due vetrini indipendenti per mitilo, classificando almeno 2000 cellule di tipo epiteliale per esemplare.

Per ogni individuo la frequenza di micronuclei viene espressa come numero di cellule micronucleate su 1000 cellule classificate. Affinché l'applicazione del test conduca a risultati validi è necessario tenere conto, al momento dell'osservazione, di alcuni parametri che ne permettono la selezione (Countryman-Heddle 1976; Fenech 2000):

- Intensità di colorazione pari o meno intensa (occasionalmente più intensa) di quella del nucleo principale
- Citoplasma intatto comune ad entrambi
- Esistenza di una membrana nucleare separata

- Assenza di qualsiasi connessione citoplasmatica tra nucleo principale e MN
- Dimensioni del MN $\leq 1/3$ del nucleo principale
- Numero di MN ≤ 5 per cellula

Parallelamente alla valutazione dei micronuclei è stato effettuato, il conteggio delle anomalie nucleari (AN) classificando al microscopio:

- cellule con nuclei morfologicamente anomali,
- cellule bi-trinucleate
- cellule con nuclei vescicolari
- cellule ponti cromatinici tra nucleo e MN

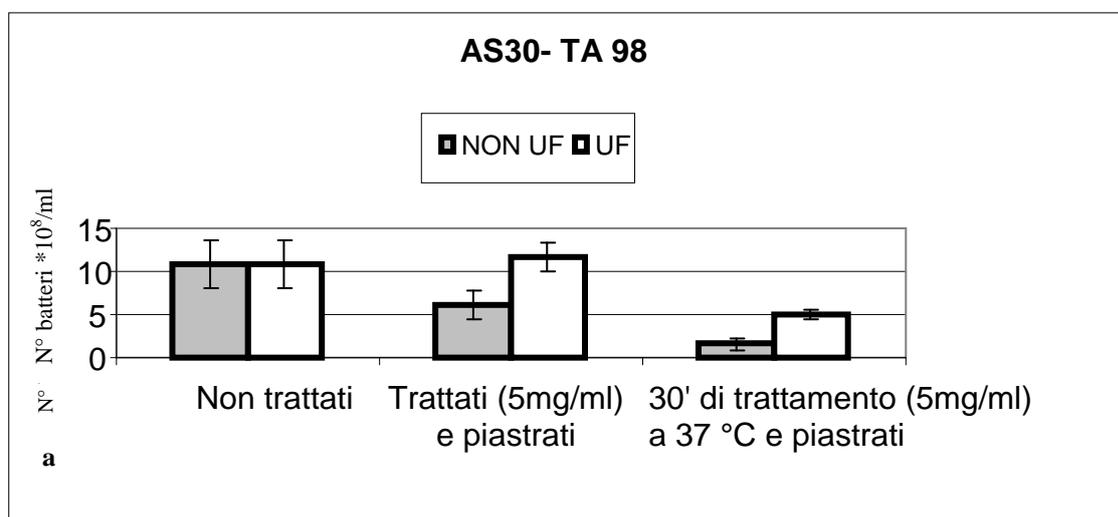
Risultati

3.1 VALUTAZIONE DEGLI EVENTUALI EFFETTI CITOTOSSICI E GENOTOSSICI DI PARTICELLE LUDOX[®] AS 30 E SM 30 IN MUTANTI *RFA* DI *SALMONELLA TYPHIMURIUM*

Le NP Ludox[®] AS 30 e SM 30, commercializzate come sospensioni colloidali di particelle sferiche di silice, sono state indicate dai responsabili scientifici del Progetto ECSIN per l'ampia gamma di applicazioni a cui si prestano. In questo studio, esse sono servite all'allestimento e la validazione di sistemi sperimentali utili ad una prima caratterizzazione tossicologica di NP di uso industriale.

I ceppi mutanti *rfa* TA 98 e TA 100 di *Salmonella typhimurium* sono usati per l'individuazione di agenti genotossici e mutageni fin dai primi anni '70. La mutazione *rfa* comporta una maggior sensibilità a molecole stericamente ingombranti e, potenzialmente, anche a nanoparticelle o componenti ad esse associati. Prima di esporre i ceppi batterici alle NP Ludox[®], ho verificato il mezzo di crescita più opportuno, la curva di crescita a 37°C, la mutabilità spontanea tipica del ceppo e la risposta attesa dopo trattamento con sostanze mutagene note (Appendice A).

Per accertare l'eventuale presenza di contaminanti citotossici che potrebbero mascherare l'effetto mutageno i batteri sono stati mescolati con le AS 30 e SM 30 ultrafiltrate (UF) e non ultrafiltrate (non UF), misurando così l'effetto per diluizione e semina su terreno completo (tre repliche sperimentali). È stata effettuata anche una preincubazione in liquido di batteri e NP prima della diluizione e semina in piastra.



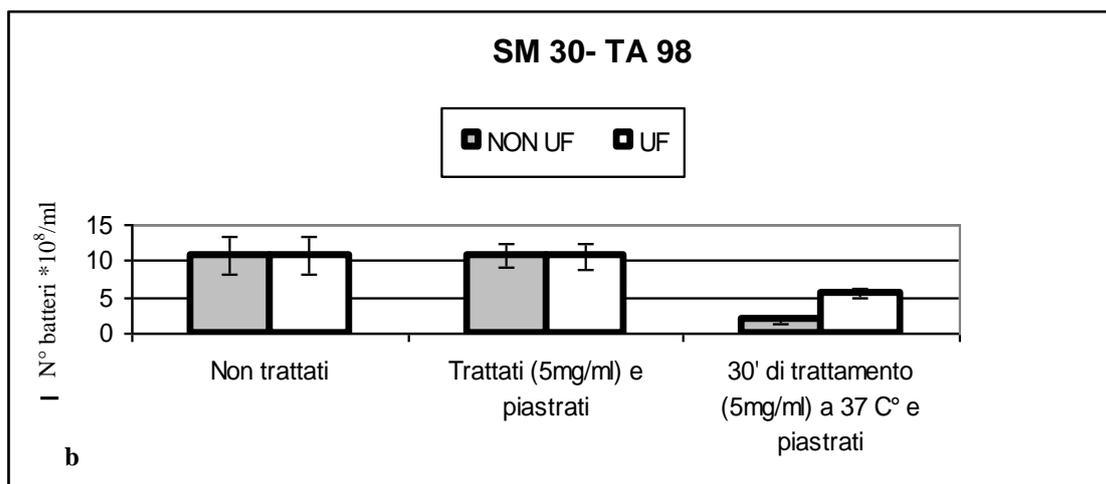


Figura 8: citotossicità con Ludox[®] AS 30 (a) e SM 30 (b) (non UF- UF) nel ceppo TA 98 di *S. typhimurium*.

Entrambe le NP di silice non UF sono risultate significativamente citotossiche, particolarmente dopo preincubazione in liquido, e in modo più spiccato le NP AS 30 non UF. Dopo ultrafiltrazione, entrambe le NP mostrano un effetto citotossico minore.

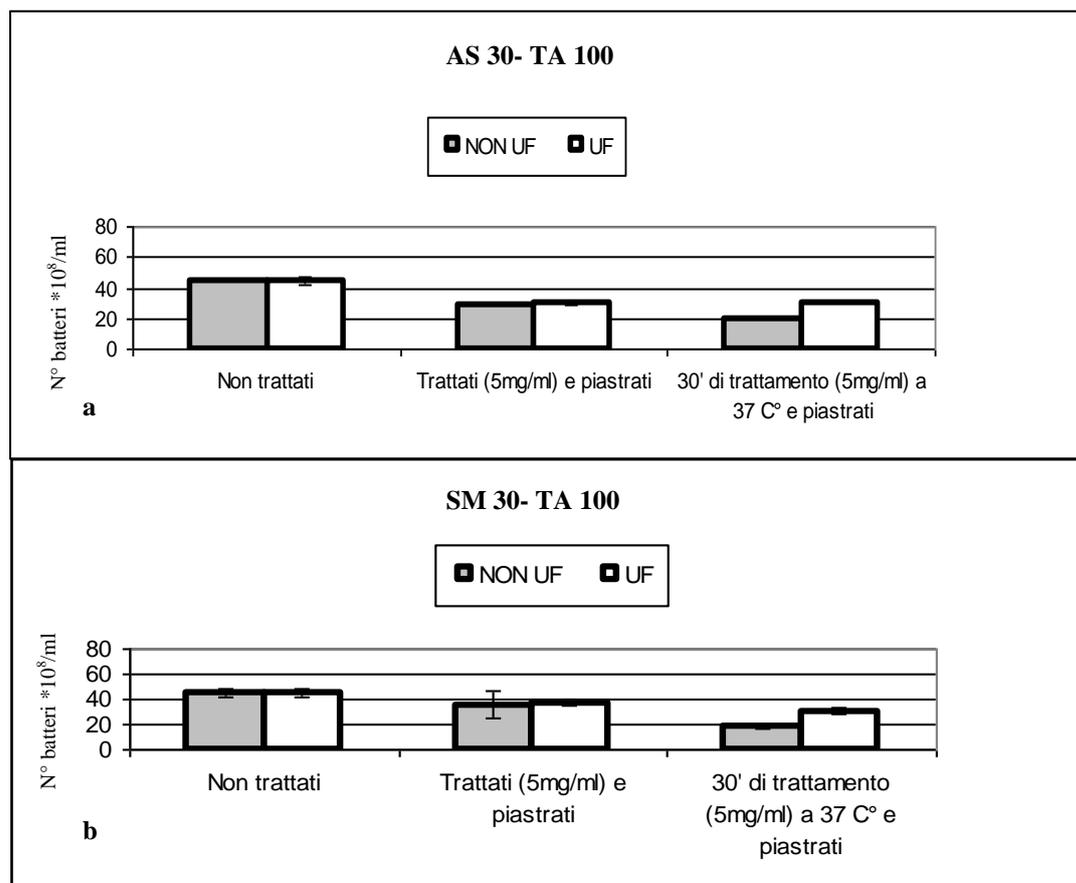


Figura 9: citotossicità con Ludox[®] AS 30 (a) e SM 30 (b) (non UF- UF) nel ceppo TA 100 di *S. typhimurium*.

Anche sul ceppo TA 100 il contatto con le NP Ludox[®] non UF determina una riduzione parziale della vitalità, nettamente più blanda dopo ultrafiltrazione. Le NP più piccole (SM 30) risultano essere più citotossiche dopo preincubazione in liquido. Considerati questi risultati, si è ritenuto di utilizzare per i saggi successivi le Ludox[®] UF.

NP AS 30 e SM 30 sono state saggiate nel test di Ames (versione in piastra) da 0.04 a 5 mg/piastra nei ceppi TA 98 e TA 100 in presenza e assenza di S9. I grafici mostrati in figura 10 mostrano i valori mediati di 2 esperimenti indipendenti.

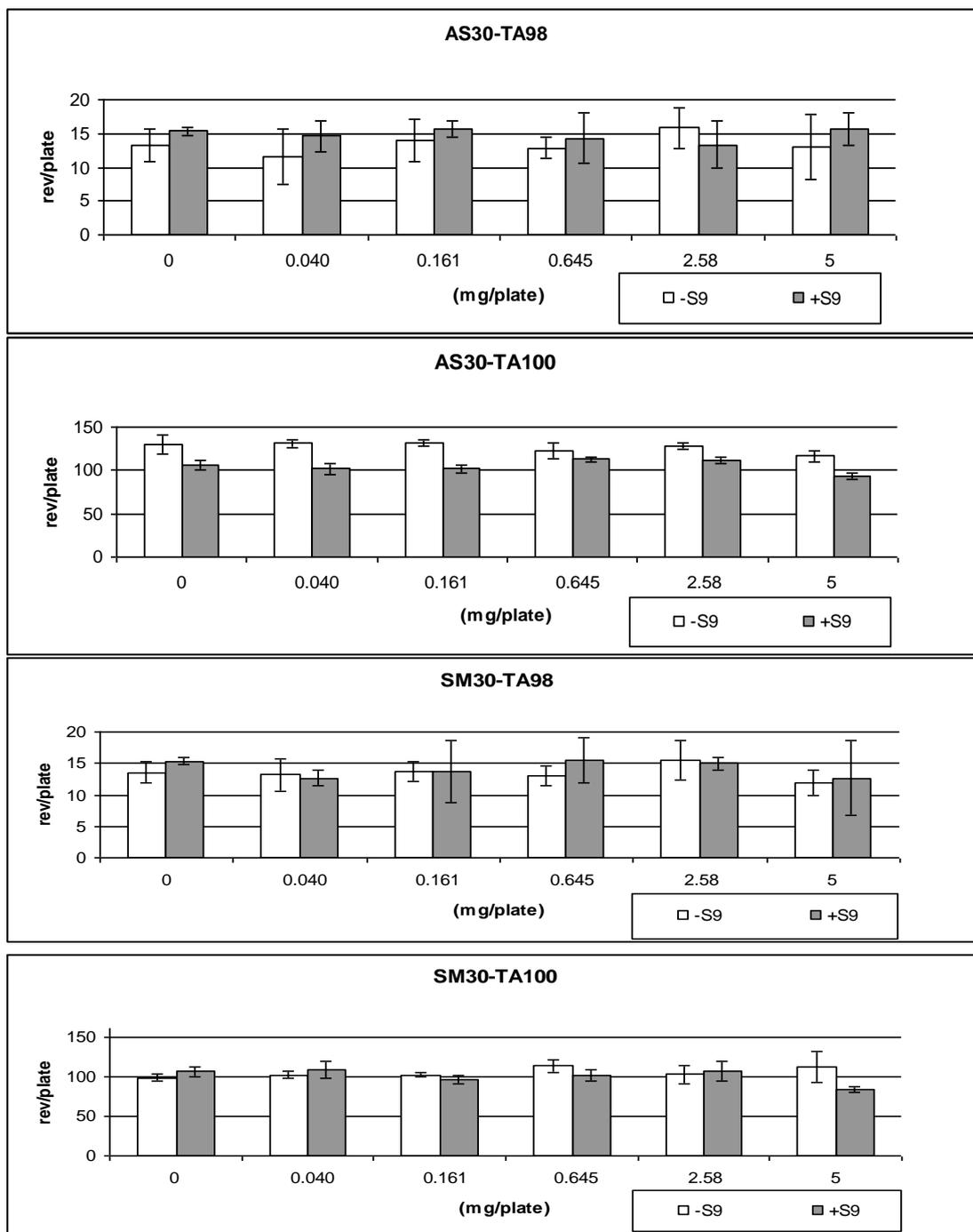


Figura 10: Effetto delle Ludox[®] AS30 e SM30 saggiate fino a 5 mg/piastra.

Controlli positivi (- S9) si è usato bicromato di potassio (20 µg/plate) per il TA 100 (212 ± 19 rev/plate) e icantone (20 µg/plate) per TA98 (180 ± 16 rev/plate); (+ S9) 2AA (30 µg/ml) per entrambi i ceppi.

In sintesi, entrambe le NP di silice non causano effetti mutageni, indipendentemente dal ceppo e dalla presenza del sistema di attivazione metabolica (S9).

I composti utilizzati in qualità di controlli positivi hanno risposto in maniera attesa, significa che il sistema test ha funzionato correttamente.

Le NP di silice sono risultate negative anche utilizzando la variante in micropiastra del test di Ames (test di fluttuazione) (Fig. 11) e nell' SOS umu test (Fig. 12).

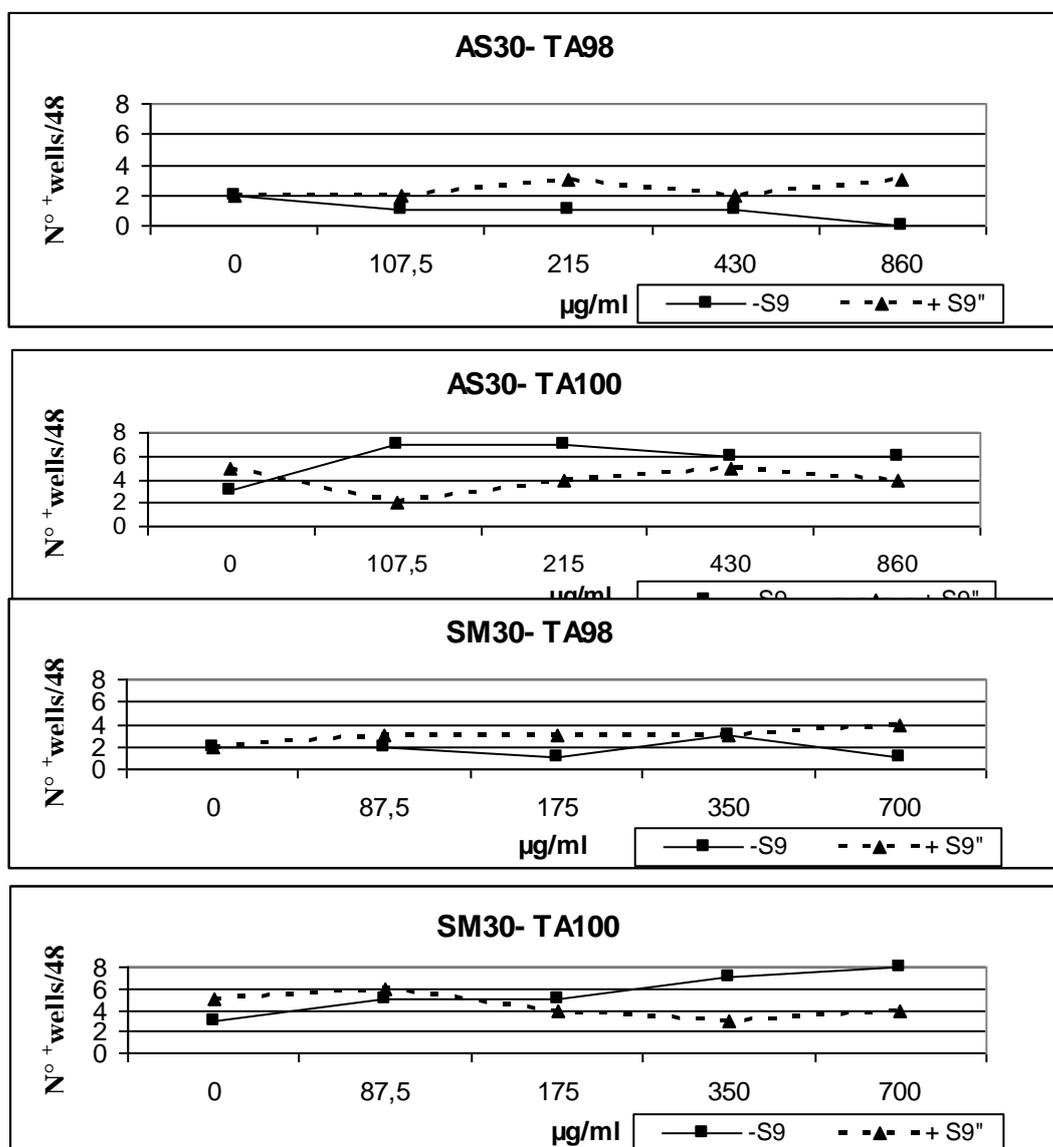


Figure 11: Effetto delle Ludox® nel test di fluttuazione (valore medio di 2 esperimenti indipendenti). AS 30 testate fino a 860 µg/ml e SM 30 testate fino a 700 µg/ml. I controlli positivi (- S9) usati sono stati 4NQO (6.25 ng/ml) per il TA 100 (33 +wells/48) o 0.1 µg/ml per TA 98 (16 +wells/48); (+ S9) 2AA (0.4 µg/ml) per TA 100

(35⁺wells/48) e (1 µg/ml) per TA 98 (18⁺wells/48). Il valori accettati per i controlli negativi sono ≤ 5⁺wells/48 per il TA 98 e ≤ 10 per il TA 100.

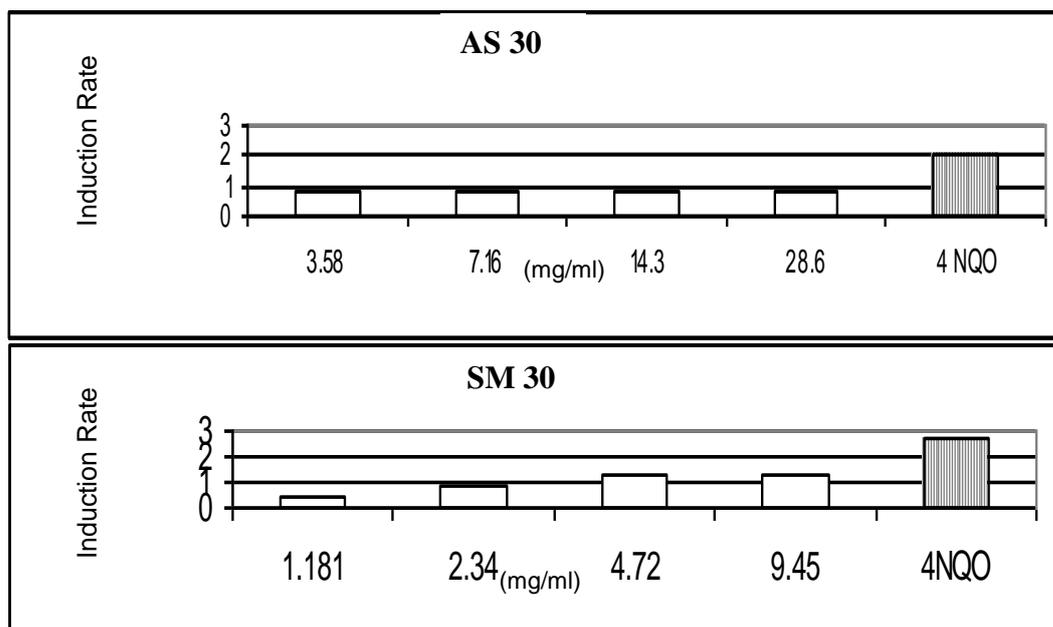


Figura 12: Effetto delle Ludox[®] nel test SOS *umu*. AS 30 testate fino a 28.6 mg/ml e SM 30 testate fino a 9.45 mg/ml in *S. typhimurium* TA 1535/pSK1002. L'induzione della β galattosidasi è riportata nel grafico in funzione della dose del campione. Il controllo positivo utilizzato è 4NQO (50 ng/ml).

3.2 ULTERIORI MISURE SULL'INTERAZIONE TRA NP E MUTANTI *RFA*

Per chiarire se i risultati negativi derivassero dall'impossibilità delle NP di penetrare la parete cellulare batterica sono state effettuate misure di citometria a flusso e osservazioni al TEM.

Cellule TA 100 sono state incubate con nanoparticelle di silice fluoresceinate, AM 22 (ϕ ~25 nm) e AM 23 (ϕ ~23 nm) fino a 24 ore prelevando delle aliquote a diversi tempi intermedi (0.5, 3, 6, 11 e 24 ore) per l'analisi al citofluorimetro. I risultati mostrano una modesta incorporazione delle NP nei batteri (frazione P3 della popolazione totale, Fig 13 a), ossia una piccola percentuale di cellule diventate fluorescenti dopo esposizione (Fig 13 b). In dettaglio, una piccola frazione di cellule fluorescenti è risultata più evidente dopo 6 ore di contatto per le AM 23 e dopo 11 ore per le AM 22, (il segnale delle AM 22 risulta sempre più elevato).

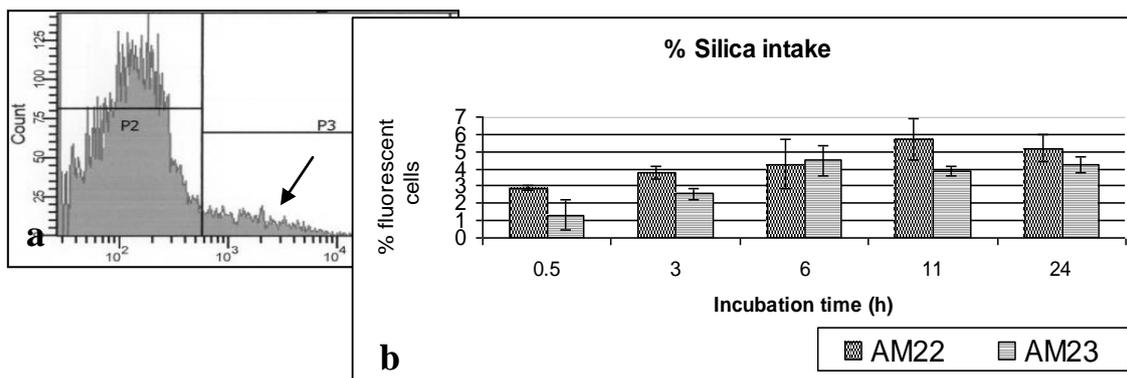


Figura 13: cellule TA 100 incubate con AM 22 [65 $\mu\text{g/ml}$] [fluo: 15.16 mg/ml] e AM 23 [37.5 $\mu\text{g/ml}$] [fluo: 4.38 mg/ml] per 0.5-3-6-11-24 ore.

(a) Immagine di *output* del FACS che separa la regione delle cellule di controllo (P2) e quella della popolazione fluorescente (P3)

(b) Grafico di incorporazione della fluorescenza nella popolazione P3 valutata a diversi intervalli temporali.

L'eventuale incorporazione di fluorescenza dopo incubazione di 0.5, 3, 6 ore con le AM 22 e AM 23 è stata analizzata anche mediante fluorimetro. La figura 14 conferma sostanzialmente i dati di citometria a flusso: al crescere del tempo non emerge un picco di cellule fluorescenti, benché la fluorescenza misurata dopo 3 ore risulti un po' più elevata per entrambe le NP.

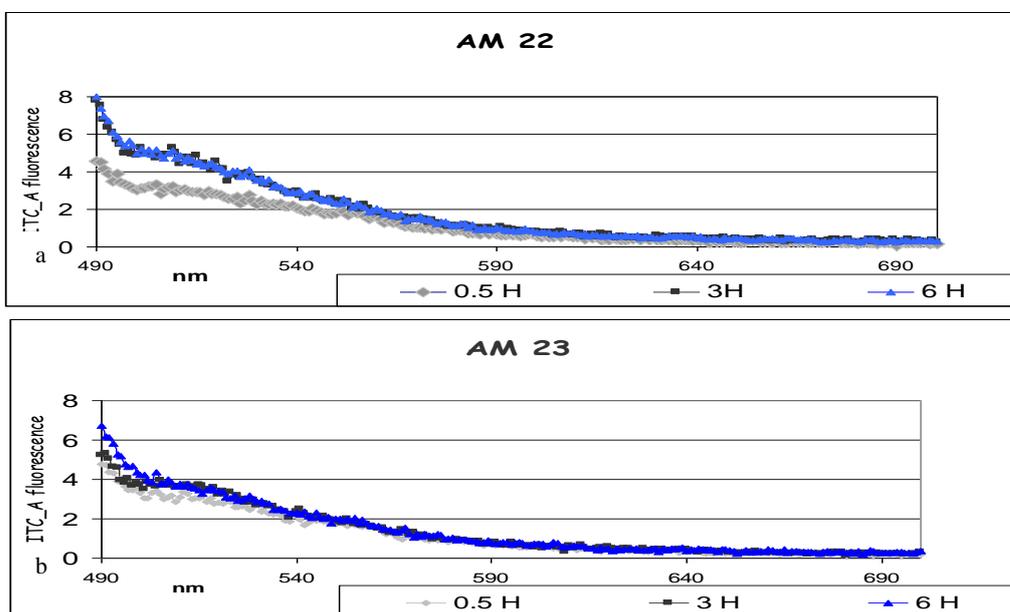


Figura 14: misura fluorimetrica di incorporazione di a) AM 22 [65 $\mu\text{g/ml}$] [fluo: 15.16 mg/ml] e b) AM 23 [37.5 $\mu\text{g/ml}$] [fluo: 4.38 mg/ml] per 0.5-3-6 ore in TA 100

Risultati simili sono stati ottenuti anche incubando con Quantum dots fluorescenti (Qtracker 800[®]), di diametro inferiore ($\phi \sim 10$ nm) rispetto alle NP fluorescentate (AM 22

- AM 23), tranne l'evidenza di un piccolo aumento di cellule fluorescenti dopo 24 ore (Fig. 15).

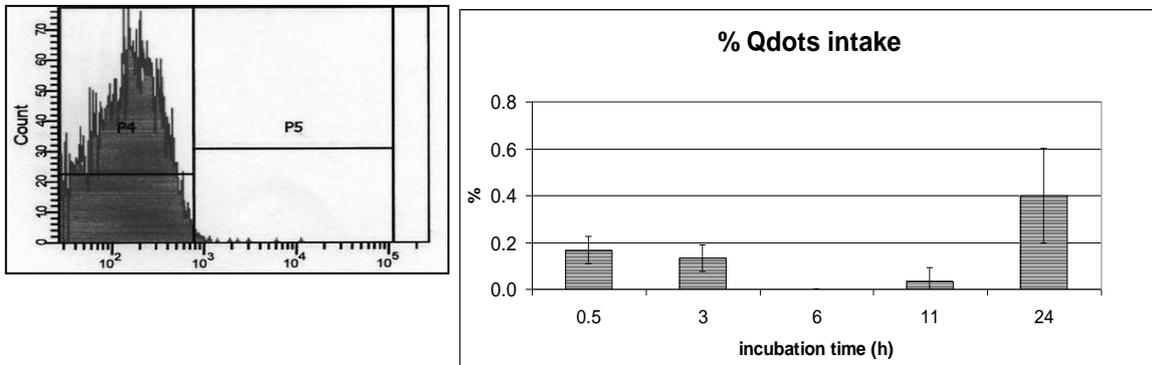


Figura 15: cellule TA100 incubate con Quantum dots (20 nM) per 0.5-3-6-11-24 ore.

Grazie al materiale elettrondenso di cui sono costituiti, si è potuto seguire il destino dei Quantum dots anche attraverso l'osservazione al microscopio elettronico a trasmissione (TEM).

Le immagini delle figure 16 e 17 si riferiscono a cellule TA 100 incubate con i Qtracker in PBS per 30 minuti e per 6 ore, rispettivamente.

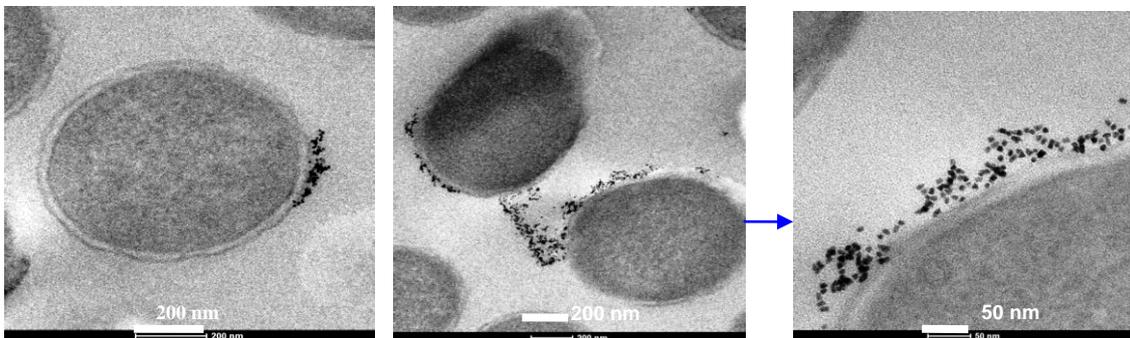


Figura 16: TA 100 incubato con Quantum dots (20 nM) per 30 minuti.

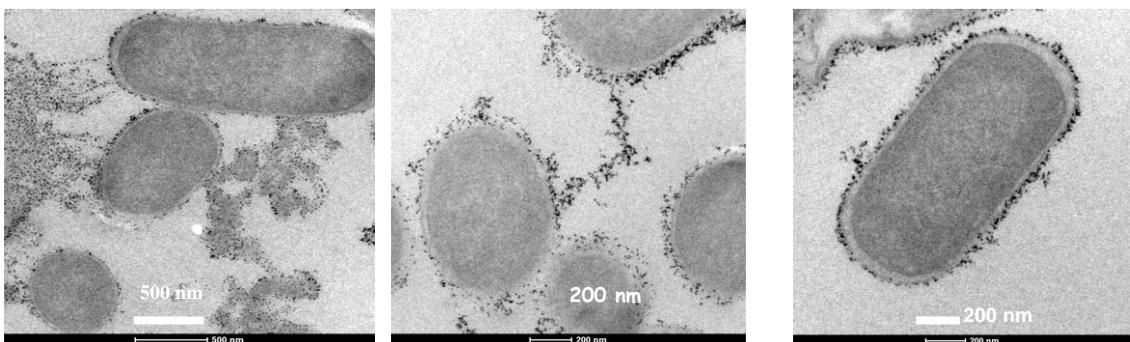


Figura 17: TA 100 incubato con Quantum dots (20 nM) per 6 ore.

Risulta chiaramente che, anche dopo 6 ore di contatto, la membrana esterna della parete cellulare continua a restare una barriera impenetrabile per le NP. In particolare tali Quantum dots sembrano avere un'alta affinità per le componenti della parete, poiché riescono a rimanere adese e circondare completamente il batterio.

Effettuando osservazioni al TEM dopo 30 minuti (Fig.18) di incubazione con NP maghemite (γ Fe₂O₃) anch'esse elettrondense, si è potuto osservare che le le NP formano aggregati nello spazio extracellulare. Dopo 6 ore di contatto (Fig. 19) sono presenti diversi batteri morti, materiale disgregato identificabile con detriti cellulari a cui sono associati agglomerati di NP.

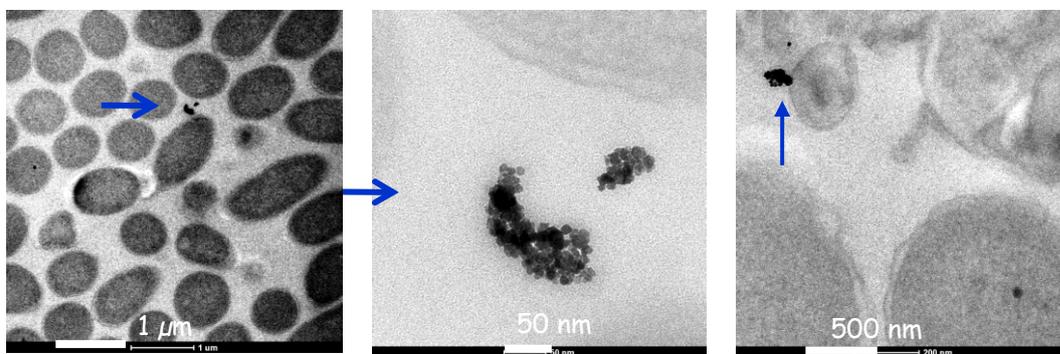


Figura 18: TA100 incubato con γ Fe₂O₃ (2 μ g/ml) per 30 minuti

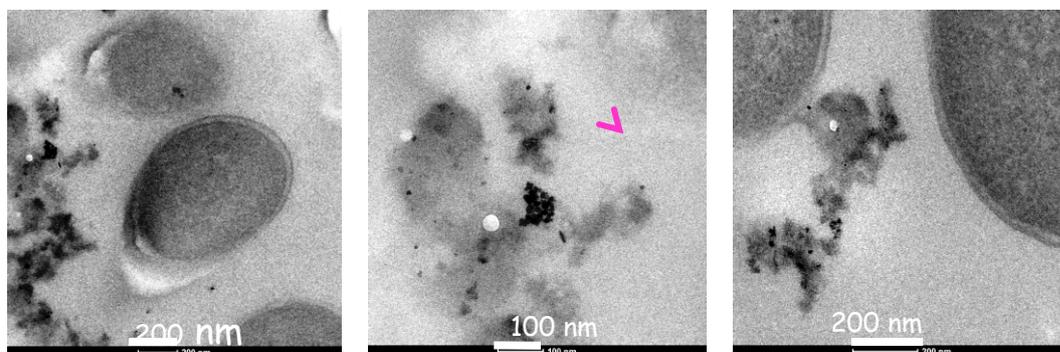


Figura 19: TA100 incubato con γ Fe₂O₃ (2 μ g/ml) per 6 ore

3.3 INTERAZIONE TRA NP E COMPOSTI MUTAGENI

Sebbene i test sui procarioti non si prestino ad indagare l'eventuale genotossicità e mutagenicità delle NP, alcuni saggi preliminari ci hanno indotto a pensare che specifiche NP possano influenzare il comportamento di altri componenti qualora presenti in miscele complesse.

Studiando le possibili affinità di superficie delle NP di maghemite abbiamo ritenuto che potesse legarsi alla struttura del $K_2Cr_2O_7$, un mutageno standard. Pertanto il bicromato di potassio è stato saggiato sul ceppo TA 100 (preincubazione 30 minuti in PBS) in assenza e in presenza delle NP di maghemite (Fig. 20).

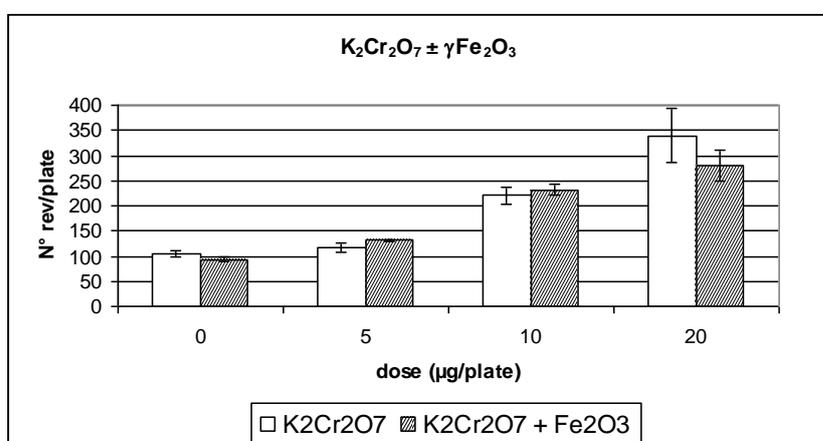


Figura 20: Effetto del $K_2Cr_2O_7$ sul TA100 da solo (barre bianche) e con una dose fissa (204.8 mg/ml) di γFe_2O_3 (barre striate).

Il numero di colonie di revertenti/piastra cresce all'aumentare della dose di $K_2Cr_2O_7$, il che significa che il sistema risponde correttamente. In presenza di maghemite e alla dose di (20 µg- $K_2Cr_2O_7$) il numero dei revertenti risulta ridotto.

Incuriositi da questo effetto, dosi crescenti di γFe_2O_3 si sono saggiate in presenza di una dose fissa (20 µg) di $K_2Cr_2O_7$ (Fig. 21). I risultati confermano l'evidenza precedente ossia un'attenuazione dell'effetto mutageno di $K_2Cr_2O_7$ in presenza di maghemite.

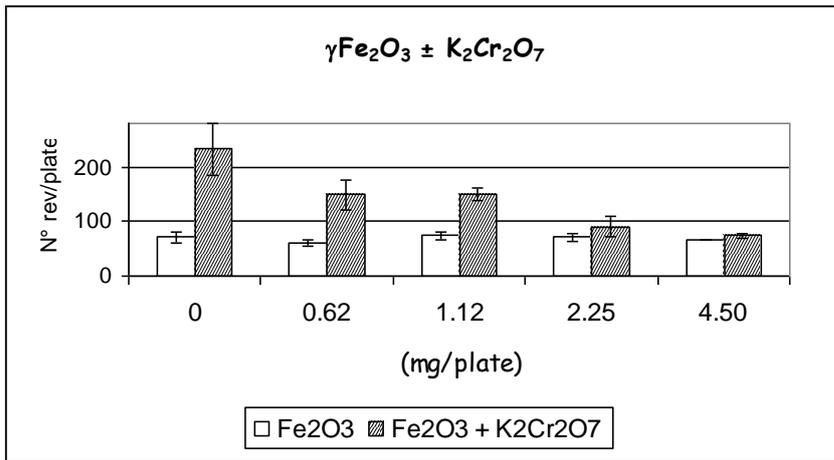


Figura 21: Effetto del $\gamma \text{Fe}_2\text{O}_3$ sul TA100 da solo (barre bianche) e con una dose fissa (20 μg) di $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ (barre striate).

3.4 Rilevazione di danni al DNA in *Mytilus galloprovincialis*

In questa sezione vengono presentati i dati preliminari relativi all'allestimento del test cometa in *Mytilus galloprovincialis*.

Riguardo al comet test, la sua esecuzione non è istintiva e il risultato finale dipende da molteplici variabili in ciascuna fase del test (PAR. 2.6.2).

Come riportato nella tabella a lato, a seconda della % di fluorescenza nella coda della cometa viene associato un punteggio che corrisponde ad una categoria di danno.

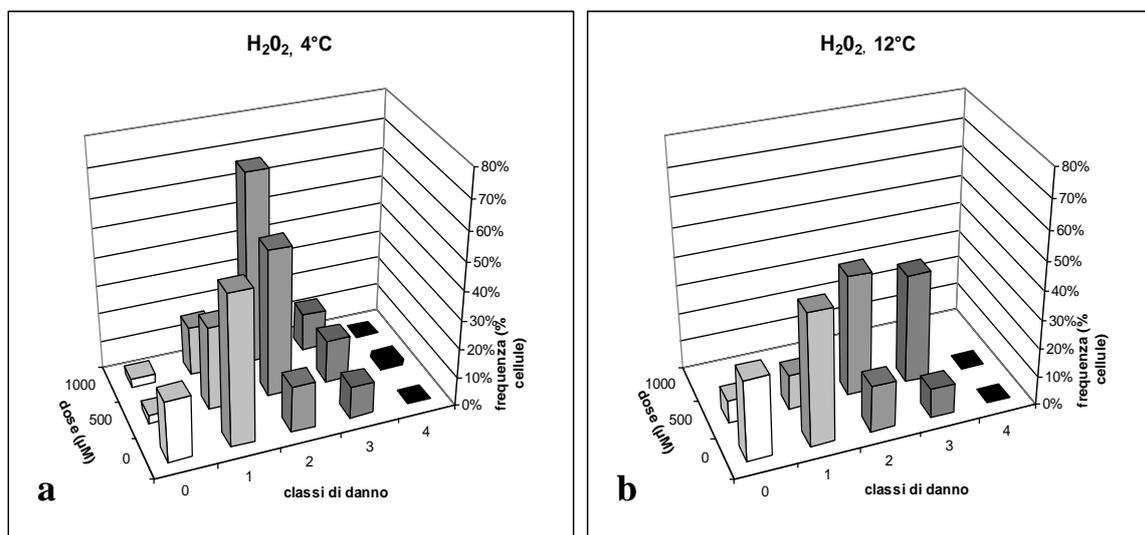
% DNA nella coda	Categoria di danno	Score
0	NESSUNO	0
1 - 20	BASSO	1
21 - 50	MEDIO	2
51 - 99	ALTO	3
100	COMPLETO	4

Per ottenere risultati riproducibili, diverse prove sono state condotte con un composto fortemente ossidante usato da molti come controllo positivo, l'acqua ossigenata o perossido di idrogeno. In una prima prova (Fig. 22) è stata modificata la temperatura di incubazione *in vitro* tra gli emociti e il composto chimico, mentre la durata del contatto è rimasta costante, 1 ora.

Ogni grafico indica la % di DNA presente nelle code delle comete in funzione della frequenza delle cellule che esprimono tale danno.

Confrontando i grafici ottenuti a temperature di 4 °C (a), 12 °C (b), 18 °C (c), 24 °C (d) si nota che, all'aumentare della temperatura di contatto, aumenta la frequenza di cellule che esprimono un danno al DNA considerato "alto", senza però che prevalga un danno completo.

Di conseguenza, per procedere nei saggi successivi, è stata preferita la temperatura di incubazione a 4 °C.



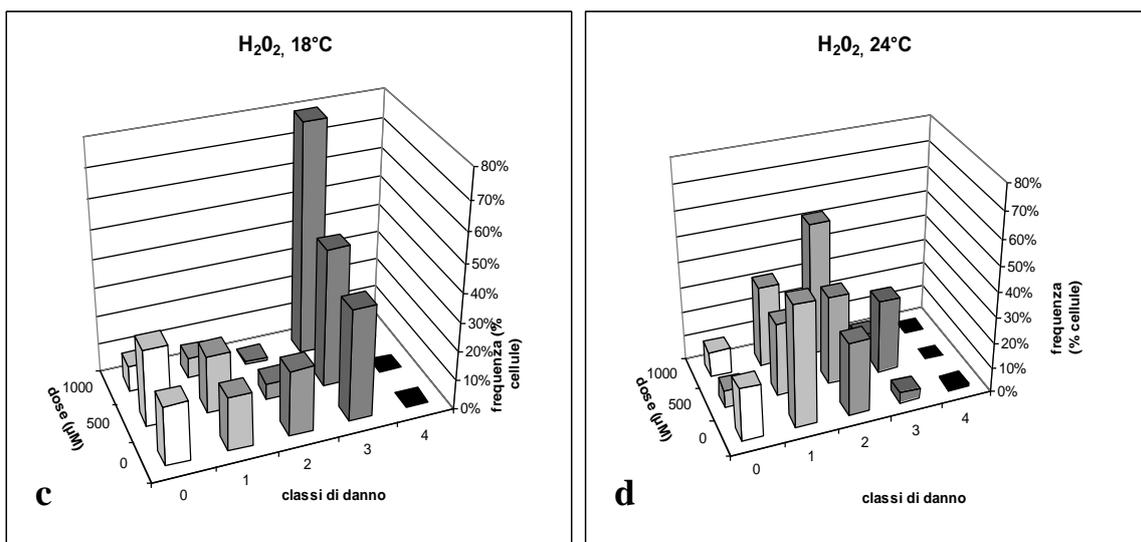


Figura 22: Comet test con emociti trattati per 1 ora con H₂O₂ (0-500-1000 µM) a (a) 4 °C, (b) 12 °C, (c) 18 °C, (d) 24 °C.

Selezionata la temperatura, gli emociti sono stati trattati *in vitro* con H₂O₂ in modo da confermare l'andamento dose- risposta (Fig. 23).

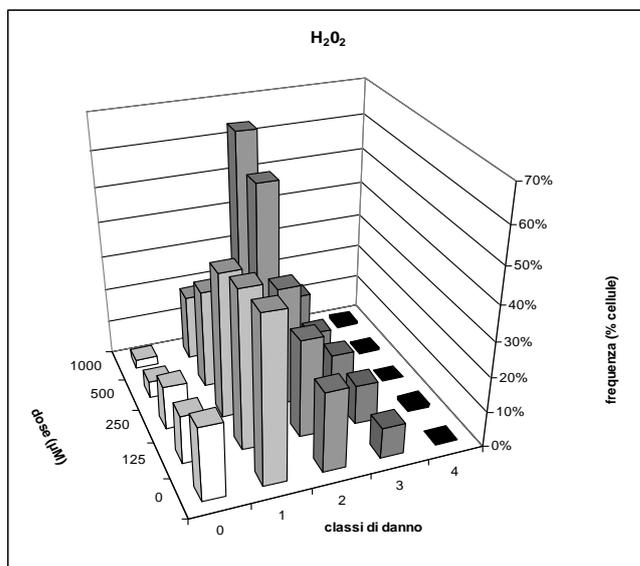


Figura 23: Comet test con emociti trattati per 1 ora con H₂O₂ (0-125-250-500-1000 µM) a 4 °C.

3.5 EFFETTI CITOTOSSICI E GENOTOSSICI DI PARTICELLE LUDOX® AS 30 E SM 30 IN EMOCITI DI MITILO

I risultati ottenuti dopo aver incubato le Ludox® AS 30 (Fig. 24 a) e SM 30 (Fig. 24 b) per 1 ora a 4 °C sono riportati in figura 24 a e b, rispettivamente.

I primi risultati ottenuti con le particelle Ludox® indicano un aumento di frammentazione del DNA negli emociti trattati rispetto al controllo, più accentuato con le particelle più piccole SM 30 (13 nm) rispetto alle AS 30 (20 nm). In particolare le cellule nella classe 2 (danno medio) raggiungono un 60 % se trattate con SM 30 rispetto ad un 45 % delle AS 30.

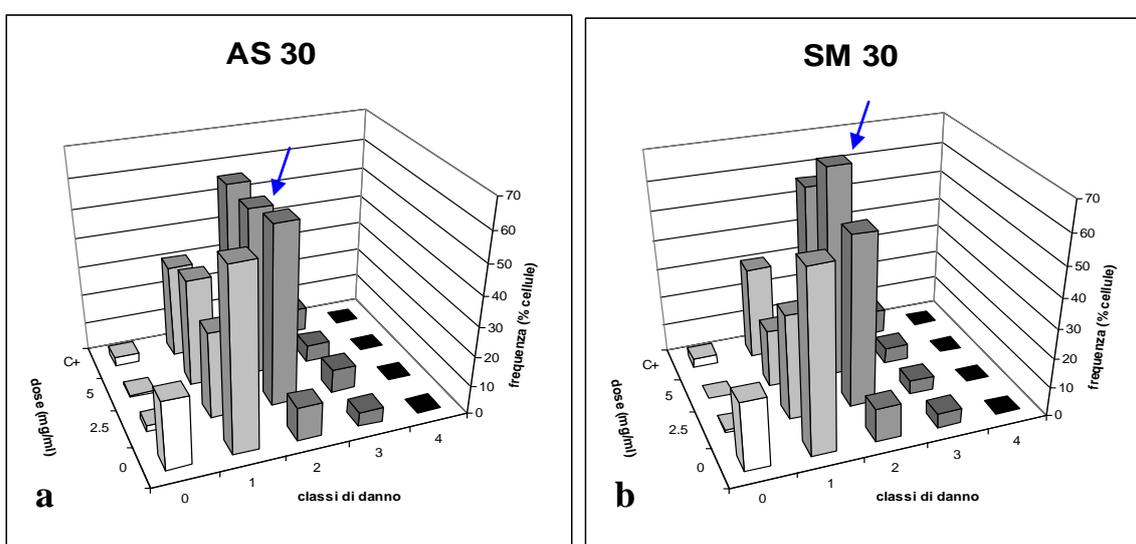


Figura 24: Comet test con emociti trattati *in vitro* per 1 ora, a 4°C con a) AS 30 (2.5-5 mg/ml) e b) SM30 (2.5-5 mg/ml). Come controllo positivo (C+) è stato utilizzato H₂O₂ (500 µM).

Parallelamente il saggio di esclusione del *Trypan blu* ha mostrato che le SM 30 sono più citotossiche rispetto alle AS 30 (Fig. 25).

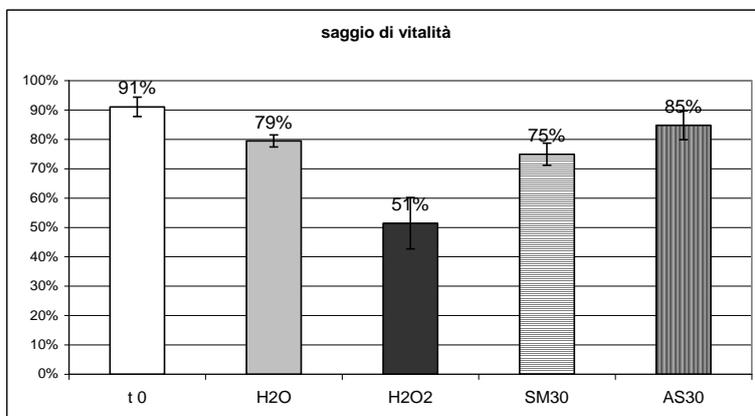


Figura 25: saggio di vitalità (esclusione del *Trypan blu*) misurata al t₀ e dopo 1 ora di contatto con H₂O (50 µl), H₂O₂ (500 µM), AS 30 (5 mg/ml) e SM 30 (5 mg/ml).

3.6 OTTIMIZZAZIONE DEL TEST DEL MICRONUCLEO IN CELLULE DI *MYTILUS GALLOPROVINCIALIS*

Per consolidare l'analisi dei danni al DNA eventualmente indotti da nanoparticelle in cellule di mitilo, è stato ottimizzato il protocollo per la rilevazione dei micronuclei.

Mitili di taglia commerciale sono stati trattati per 48 ore *in vivo* con una miscela equimolare di metalli pesanti ($\text{CdCl}_2 \text{ H}_2\text{O}$, $\text{CuCl}_2 \text{ H}_2\text{O}$ e HgCl_2) e l'analisi della frequenza di cellule micronucleate è stata effettuata nelle cellule branchiali (Fig. 26 e Appendice D).

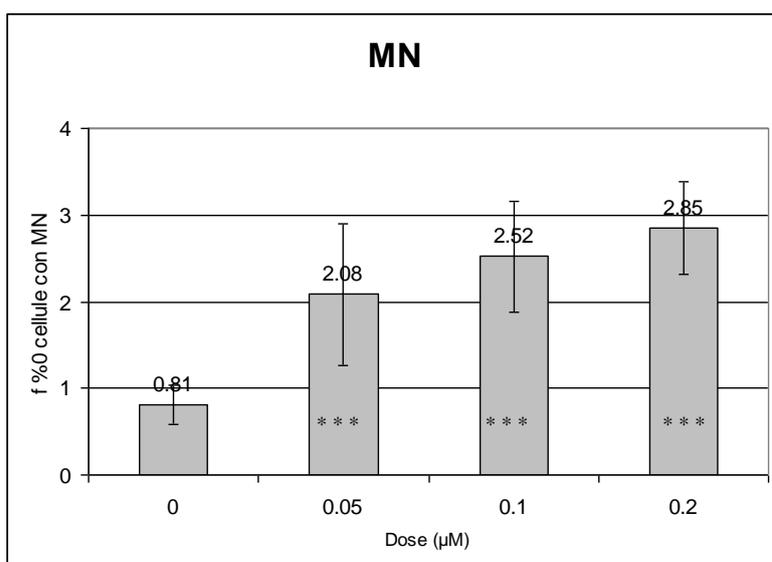


Figura 26: Frequenza di cellule con MN dopo trattamento di mitili per 48 ore con una miscela di metalli $\text{CdCl}_2 \text{ H}_2\text{O}$, $\text{CuCl}_2 \text{ H}_2\text{O}$ e HgCl_2 alle dosi 0- 0.2 μM . [(***) = $P < 0,001$: G test]

I risultati mostrano un incremento della frequenza media di cellule con MN proporzionale all'aumento della dose di trattamento; dallo 0,81 % nei mitili di controllo fino a 2,85 % nei mitili trattati con la dose più alta. La significatività è stata verificata applicando un test non parametrico, G test, ad ogni dose saggiata ($P < 0,001$).

Parallelamente alla valutazione dei micronuclei è stato effettuato anche il conteggio delle anomalie nucleari (AN, Fig. 27 e Appendice D) che includono:

- cellule con nuclei morfologicamente anomali,
- cellule bi-trinucleate,
- cellule con nuclei vescicolari,
- cellule caratterizzate da micronuclei collegati al nucleo madre da ponti cromatinici,
- cellule con nuclei addossati.

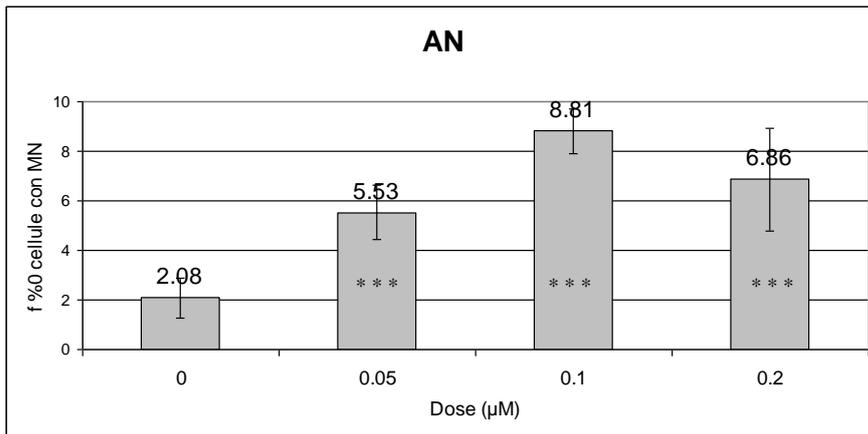


Figura 27: Frequenza di cellule con AN dopo trattamento di mitili per 48 ore con una miscela di metalli CdCl₂ H₂O, CuCl₂ H₂O e HgCl₂ alle dosi 0- 0.2 µM. [(***) = P< 0,001: G test]

L'aumento significativo di AN conferma la genotossicità della combinazione dei tre metalli nei mitili trattati rispetto a quelli di controllo, con andamento dose dipendente fino alla dose di 0.1 µM.

Discussione

Nella nostra società stiamo assistendo ad un rapido sviluppo ed un conseguente utilizzo di molteplici varietà di nanoparticelle e nanomateriali, anche se, a tutt'oggi, manca una regolamentazione adeguata che indichi e standardizzi i protocolli per l'identificazione di effetti citotossici e genotossici. Il centro di ricerca ECSIN (The European Centre for the Sustainable Impact of Nanotechnology) è stato creato per accertare i rischi biologici associati alle nanoparticelle attraverso l'utilizzo di studi *in vitro* e *in vivo*.

Seguendo la linea di ricerca indicata dal tema di dottorato ho inizialmente valutato i protocolli basati sui mutanti *rfa* di *Salmonella typhimurium*, al fine di verificarne la validità e possibilmente ottimizzarli.

La valutazione di attività mutagenica su cellule procarioti è uno dei saggi previsti dal regolamento REACH. In accordo alle linee guida dell'OECD (*Organisation for Economic Co-operation and Development*), il test di Ames deve far parte di una batteria di test per il vaglio iniziale della attività mutagenica di nuove sostanze chimiche in quanto ha un elevato potere predittivo. Una valutazione preliminare della letteratura scientifica riguardo la potenziale mutagenicità delle NP aveva fornito un quadro lacunoso e non omogeneo di informazioni che non consentiva di escludere l'induzione di effetti avversi seppure in cellule incapaci di endocitosi.

I batteri Gram negativi sono circondati da un involucro membranoso asimmetrico entro il quale l'LPS, maggior componente della membrana esterna, esplica molteplici funzioni: rende carica negativamente la superficie batterica, contribuisce a fenomeni di riconoscimento e contatto e, principalmente, limita la permeabilità della parete cellulare. Nonostante la barriera definita dall'LPS, proteine dette porine rendono la membrana esterna permeabile a molecole di 600-700 Da ($\varnothing \sim 2$ nm) e trasportatori di membrana mediano l'ingresso di molecole con dimensione ben maggiore (vitamina B12, 1355 Da) (Prescott *et al*, 2009).

Sapendo che le dimensioni delle NP potevano prevenirne l'entrata nella cellula batterica, si sono utilizzati ceppi di *S. typhimurium* caratterizzati dalla mutazione *rfa* che li rende maggiormente sensibili alla mutagenicità, aumentando la permeabilità a molecole stericamente ingombranti. Di fatto questa mutazione elimina, a differenti lunghezze, la catena polisaccaridica del LPS, senza tuttavia causare letalità in condizioni fisiologiche (Ames *et al*, 1973).

Fra le NP di interesse prioritario, sono state prese esaminate nanoparticelle commerciali di silice Ludox[®] AS 30 e SM 30 di diametro ~ 20 e ~13 nm rispettivamente. È stata dapprima valutata la citotossicità del preparato come tale e dopo ultrafiltrazione (Fig.8 e 9).

Il contatto con le particelle AS 30 non ultrafiltrate (5 mg/ml, 30 min, 37 °C) ha causato una riduzione del numero di UFC dell' 86 % nel ceppo TA 98 e del 55 % nel ceppo TA 100. Minori effetti citotossici sono stati rilevati per le particelle ultrafiltrate (UFC ridotte del 54 % e del 33 % rispettivamente). Risultati simili sono stati ottenuti con le SM 30 come tali (riduzione UFC dell' 83 % nel TA 98 e del 59 % nel TA 100) e dopo ultrafiltrazione (riduzione UFC al 50 % e del 33 %, rispettivamente). Considerati questi risultati, si è ritenuto di utilizzare per i saggi successivi le Ludox[®] UF.

Il saggio delle NP AS 30 e SM 30 nel test di Ames in piastra (Fig. 10) ha mostrato che le particelle Ludox[®] AS 30 e SM 30 non risultano mutagene in *Salmonella* TA 98 e TA 100 fino a 5 mg/piastra, indipendentemente dalla presenza della frazione microsomiale S9.

I dati di letteratura riguardo il test di Ames applicato alle nanoparticelle sono pressochè negativi, tranne per i dati riportati da Maenosono che mostrano la sensibilità del ceppo TA 100 (- S9) agli effetti di NP di FePt (Maenosono *et al*, 2007).

Per una valutazione più esauriente, le particelle sono state saggiate anche in micropiastra nell'*Ames fluctuation test* (Fig. 11) nel quale è prevista un'incubazione in liquido che migliora il contatto tra NP e batteri e che meglio potrebbe far rivelare la mutagenicità di componenti rilasciati dalle NP stesse. Anche questo test ha dato risultati negativi.

Le ludox AS 30 e SM 30 sono risultate negative anche nell'*SOS/umu test* (Fig.12). Quest'ultimo è un saggio fondato sul ceppo *S. typhimurium* TA 1535/pSK 1002 attraverso il quale si può rilevare spettrofotometricamente l'induzione della risposta SOS, indice di un danno al DNA.

Poiché l'incapacità delle NP di entrare nei mutanti *rfa* di *S. typhimurium* può ben spiegare queste evidenze, l'interazione tra nanoparticelle e batteri è stata studiata con altre metodiche.

Dati ottenuti in citometria a flusso e fluorimetria incubando nanoparticelle di silice AM 22 e AM 23 marcate con fluoresceina con cellule TA 100 in PBS a 37°C per 0.5-3-6-11-24 ore hanno rivelato una percentuale molto modesta di cellule fluorescenti

(l'incorporazione di fluorescenza ai tempi più lunghi potrebbe indicare un danno di membrana) (Fig. 13 e 14).

Le stesse condizioni sperimentali sono state applicate anche ai Qtracker 800, piccole NP fluorescenti con un *core* metallico. L'*uptake* osservato è molto modesto e le cellule fluorescenti arrivano ad un massimo di 0.4 % della popolazione totale dopo 24 ore, accumulo è dovuto ad una progressiva riduzione di vitalità in PBS (Fig. 15).

Osservazioni condotte al TEM su cellule TA 100 incubate per 30 minuti e 6 ore in PBS a 25 °C e 37 °C con Qtracker800 hanno confermato la capacità dei mutanti *rfa* di escludere le NP saggiate.

Le prime prove di incubazione condotte a 25 °C con batteri molto concentrati (Vol ~200 µl) avevano mostrato aggregati elettrondensi intracellulari, evidenziabili nella regione del nucleoide ed anche nella regione periplasmatica (Appendice B). Tuttavia, analisi ripetute attenuando o addirittura eliminando la colorazione di contrasto (acetato di uranile e citrato di piombo) hanno dimostrato che, benché difettive, le cellule *rfa* sono in grado di escludere efficacemente nanoparticelle elettrondense.

Infatti un secondo saggio di incubazione in PBS in maggior volume (5 ml), in agitazione, a 37 °C ha definitivamente chiarito che i batteri non sono in grado di internalizzare i Quantum dots, sebbene quest'ultimi mostrino particolare affinità per le componenti della parete batterica, specialmente dopo 6 ore di contatto (Fig.16- 17).

Simili risultati sono stati ottenuti con altre nanoparticelle metalliche (maghemite: γ Fe₂O₃). Dopo 30 minuti di incubazione in PBS, aggregati di NP sono evidenti solo nella zona extracellulare (Fig. 18), e grazie alla differente densità di colorazione, è possibile distinguere scuri corpuscoli intracellulari dalle NP circostanti. Inoltre il riscontro di frammenti di cellule dopo 6 ore suggerisce una riduzione di vitalità dei batteri tenuti a lungo in un mezzo privo di nutrienti.

È interessante notare come le NP di maghemite, di cui si conosce l'affinità per gli acidi nucleici, siano legate individualmente al materiale proveniente dai batteri; di conseguenza si può ipotizzare che in origine, al momento del contatto, fossero presenti come singole e poi aggregatesi nel tempo (Fig. 19).

Facendo un'analisi della letteratura disponibile per NP e cellule procariotiche, è emerso che alcune specifiche NP sono addirittura utilizzate come agenti antimicrobici. Il meccanismo d'azione sicuramente coinvolge la rottura della parete e la penetrazione nella cellula, generando altri danni come l'interruzione del trasferimento transmembrana

di elettroni, l'ossidazione di componenti cellulari o la produzione di prodotti secondari che causano danni.

Ad esempio, sono stati individuati diversi meccanismi che permettono alle particelle di argento di svolgere attività antimicrobica, e l'adesione alla superficie del batterio ne cambia le proprietà della membrana. Le NP di Ag sono in grado di degradare le molecole di LPS, accumularsi dentro le due membrane causando dei buchi, e penetrare dentro la cellula causando anche danni al DNA (Li *et al*, 2008). Evidenze simili sono riportate anche per NP di ossido di zinco; infatti in *E. coli* sono stati evidenziati cambiamenti nella morfologia e nell'organizzazione cellulare (Brayner *et al*, 2006). Identici risultati si sono visti con NP di MgO; le immagini al TEM relative a questa interazione mostrano che tutte le cellule di *E. coli* hanno internalizzato le particelle mentre stanno rilasciando i propri componenti (Stoimenov *et al*, 2002). Sono tuttavia necessari ulteriori studi per capire completamente il meccanismo di azione delle NP come agenti biocidi.

Comunque la sperimentazione sviluppata in questo studio indica assenza di internalizzazione di NP anche in batteri LPS-difettivi.

Per superare la parete batterica, si dovrebbe agire modificando ulteriormente i ceppi utilizzati, producendo dei mutanti maggiormente permeabili, per blanda elettroporazione, o, in un modo più audace/avveniristico generando piccoli fori transienti, che non compromettono la vitalità, con la punta del microscopio a forza atomica (Suo *et al*, 2009).

Sebbene non applicabili direttamente alle NP, i test di mutagenesi con i procarioti possono rivelarsi utili nella caratterizzazione tossicologica di campioni ambientali complessi.

A compendio del lavoro svolto, e per suggerire un uso alternativo di questi test, è stata valutata l'interazione tra particelle di maghemite e ioni cromato ($K_2Cr_2O_7$).

Effettuando un'incubazione per 30 minuti in PBS tra maghemite e bicromato di potassio in dosi combinate (Fig. 20) si nota che in particolare 0.62-4.5 mg γFe_2O_3 attenuano l'attività mutagena di una dose (20 μg di bicromato) (Fig. 21).

La capacità della maghemite di ridurre la presenza del cromato è applicata nelle tecnologie per il trattamento delle acque inquinate. I dati proposti da Hu confermano che le NP di γFe_2O_3 hanno un'alta efficienza di rimozione del Cr(VI) dalle acque di

scarico attraverso un meccanismo di assorbimento che interessa le interazioni elettrostatiche e scambio ionico (Hu *et al.*, 2005).

L'ultimo anno di dottorato è stato dedicato all'individuazione e all'allestimento di sistemi test alternativi a quelli stabiliti inizialmente. In particolare si sono messi a punto test di danno al DNA in cellule di *Mytilus galloprovincialis*, un invertebrato marino già utilizzato in studi multidisciplinari sull'ambiente lagunare veneziano (Venier *et al.*, 2003) e, più recentemente, in studi di genomica funzionale (Venier *et al.*, 2009).

Il comportamento e gli effetti a lungo termine di NP e nanomateriali sono prevedibili con estrema difficoltà per la mancanza di informazioni esaurienti sulle proprietà chimico-fisiche, compartimentazione e persistenza ambientale e sulle loro interazioni con gli organismi viventi. Non sappiamo oggi in che misura nanoparticelle di ampio uso industriale possano contaminare aria, acqua e suolo e se tale contaminazione definisca potenziali effetti avversi per l'uomo e per l'ambiente.

I mitili, comuni bivalvi filtratori dell'ambiente marino costiero sono stati proposti fin dal 1975 per la sorveglianza dell'inquinamento. La convizione ad usare mitilo come sentinella nel controllo ecotossicologico (*Mussel Watching*) è oggi molto ampia e sostenuta anche da indicazione normative. Il biomonitoraggio fondato su questo organismo può avvalersi sia di analisi di inquinanti accumulati nei tessuti molli, sia della misura di tipiche alterazioni biologiche da questi indotte, come danni al DNA ed altri danni rilevabili a livello citologico e individuale che ne alterano le risposte funzionali. Il mitilo è stato proposto come organismo modello anche per studiare la tossicità di NP (Tedesco *et al.*, 2010). Tra le possibili cellule bersaglio, gli emociti, sono effettori fondamentali del sistema immunitario innato del mitilo: essi circolano nell'emolinfa e possono infiltrarsi nei tessuti in risposta a stimoli chemotattici, sono in grado di fagocitare microrganismi e di rilasciare fattori citotossici, fattori del complemento e peptidi antimicrobici (Terahara *et al.*, 2006). L'alterazione degli emociti a seguito di incubazione con NP è già stata accertata da alcuni studi pubblicati (Canesi *et al.*, 2008). Non richiedendo disgregazione da tessuto queste cellule si prestano meglio di altre all'individuazione del danno al DNA mediante il saggio di elettroforesi a singola cellula o test Cometa (Tice *et al.*, 2003). Il saggio misura il grado di frammentazione del DNA di cellule inglobate singolarmente in uno strato di agar, lisate in condizioni alcaline e sottoposte a campo elettrico. Questo saggio è stato condotto su una varietà di

cellule ed organismi, ad esempio per studiare gli effetti di NP su cellule di mammifero. L'applicazione del test Cometa a cellule di *M. galloprovincialis* ha già mostrato difficoltà sperimentali e potenzialità interessanti (Machella *et al*, 2006; Emmanouil e Chipman, 2008) e sarebbe interessante estenderne l'applicabilità allo studio di NP.

La messa a punto di tale protocollo per l'analisi di NP ha richiesto molte prove e l'adozione di parecchi accorgimenti per garantire condizioni di saggio adeguate e riproducibili. In prima istanza sono stati effettuati esperimenti preliminari saggiando H₂O₂ come controllo positivo verificando infine risposte ripetibili e conformi a dati già presenti in letteratura. Quindi si è scelta la temperatura alla quale far avvenire l'incubazione tra gli emociti e la sostanza test, 4°C, come condizione in grado di non alterare lo stato fisiologico degli emociti di controllo e non avere effetti eccessivi sugli emociti trattati (Fig. 22). In questa condizione si è determinato l'andamento dose/effetto dell'acqua ossigenata e scelto una dose che inducesse un buon livello di rotture del filamento di DNA senza compromettere eccessivamente la vitalità delle cellule (Fig. 23).

I primi risultati ottenuti con le particelle Ludox[®] indicano un aumento di frammentazione del DNA negli emociti trattati rispetto al controllo, più accentuato con le particelle più piccole SM 30 (13 nm) rispetto alle AS 30 (20 nm) (Fig. 24). Le SM 30 hanno indotto un effetto citotossico più accentuato rispetto alle AS 30 (saggio di esclusione del *Trypan blue*, Fig. 25).

Non vi sono dati in letteratura che mostrino la risposta di emociti di mitilo al trattamento di nanomateriali tramite il test cometa, tuttavia nanoparticelle di silice in cellule di mammifero non hanno fatto rilevare danno o solo lievi alterazioni nel test cometa, rispettivamente senza e con intervento di enzimi della riparazione (Karlsson H, 2010).

Recentemente emociti di *Mytilus galloprovincialis* trattati in vitro con nanoparticelle di silice hanno mostrato rilascio extracellulare di lisozima, produzione di radicali di ROS, NO, incremento della fosforilazione di p38 e, in un successivo studio, aumento dell'instabilità della membrana lisosomiale, dell'accumulo di granuli di lipofuscina e dell'attività catalasica (Canesi *et al*, 2010, a - b).

Per consolidare l'analisi del danno genetico eventualmente indotto da NP in cellule di mitilo, si è ottimizzato un protocollo sperimentale potenzialmente utile allo studio di NP, l'analisi di frequenza di cellule micronucleate (Venier *et al*, 1997). L'allestimento di preparati citologici mediante citocentrifuga ed usando reagenti opportuni permette di

ottenere cellule in buona parte integre sulle quali si può stimare in modo più accurato la frequenza di cellule micronucleate (un aumento significativo della frequenza di cellule con micronuclei indica l'induzione di danno cromosomico).

Un trattamento preliminare condotto in vivo con una miscela di metalli pesanti ha confermato l'induzione di MN (Fig. 26) e di AN (Fig. 27) nelle cellule branchiali.

Questo saggio si presta quindi ad appurare la possibilità che, NP di SiO₂ producano MN, come osservato in cellule di mammifero (Wang *et al*, 2007).

Bibliografia

- Al-Sabti K., Metcalfe C (1995). Fish micronuclei for assessing genotoxicity in water. *Mutat. Res.*, 343: 121-135;
- Ames B, Lee F and Durston W. (1973) An improved bacterial test system for the detection and classification of mutagens and carcinogens *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 70, 782-786;
- Ames N e Maron M. (1983) Revised methods for the Salmonella mutagenicity test, *Mutat. Res.* 113, 173-215;
- AshaRani P, Kah Mun G, Hande M, Valiyaveetil S (2009) *ACS Nano* 3(2): 279–290
- Banasik A, Lankoff A, Piskulak A, Adamowska K, Lisowska H, Wojcik A (2005) *Environ Toxicol* 20(4):402–406
- Bergna H e Roberts W (2006) *Colloidal Silica: Fundamentals and Applications. Surfactant Science* 131;
- Bonassi S, Znaor A, Ceppi M, Lando C, Chang W, Holland N, Kirsch-Volders M, Zeiger E., Ban S., Barale R, Bigatti M, Bolognesi C, Cebulska-Wasilewska A., Fabianova E, Fucic A, Hagmar L, Joksic G, Martelli A., Migliore L., Mirkova E., Scarfi M.R., Zijno A., Norppa H., Fenech M.,(2007) An increased micronucleus frequency in peripheral blood lymphocytes predicts the risk of cancer in humans. *Carcinogenesis*, (3): 625-31;
- Brayner R, Ferrari-Iliou R, Brivois N, Djediat S, Benedetti MF and Fiévet F. (2006) Toxicological impact studies based on *Escherichia coli* bacteria in ultrafine ZnO nanoparticles colloidal medium. *Nano Lett.* 6(4), 866-870;
- Bugge D, Hegaret H, Wikfors G and Allam B. (2007) Oxidative burst in hard clam (*Mercenaria mercenaria*) haemocytes. *Fish Shellfish Immunol.* 23, 188–196
- Canesi L, Ciacci C, Betti M, Fabbri R, Canonico B, Fantinati A, Marcomini A, Pojana G. (2008) Immunotoxicity of carbon black nanoparticles to blue mussel hemocytes. *Environ Int.* 34(8):1114-9;
- Canesi L, Ciacci C, Vallotto D, Gallo G, Marcomini A, Pojana G (2010 a) *In vitro* effects of suspensions of selected nanoparticles (C60 fullerene, TiO₂, SiO₂) on *Mytilus* hemocytes. *Aquat Toxicol.* 96(2):151-8;

- Canesi L, Fabbri R, Gallo G, Vallotto D, Marcomini A, Pojana G (2010) b) biomarkers in *Mytilus galloprovincialis* exposed to suspensions of selected nanoparticles (nano carbon black, C60 fullerene, Nano-TiO₂, Nano SiO₂) on *Mytilus* hemocytes. *Aquat Toxicol.* 100:168-177;
- Chen M, von Mikecz A (2005) *Exp Cell Res* 305(P): 51–62;
- Cheng, T. e Howland, K. (1979) Chemotactic attraction between hemocytes of the oyster, *Crassostrea virginica*, and bacteria. *J Invertebr Pathol.* 33, 204-210;
- Collins A, Dusinskà M, Gedic C, Stetina R. (1996) Oxidative damage to DNA: do we have a reliable biomarker ? *Environ Health Perspect* 104: 465-469.
- Collins A, Dobson V, Dusinska M, Kennedy G, Stetina R. (1997) The comet assay: what can it really tell us? *Mutat Res*; 375: 183-193;
- Collins A, Dusinska M, Horvathova E, Munro E, Savio M, Stetina R. (2001) Inter-individual differences in repair of DNA base oxidation, measured in vitro with the comet assay. *Mutagen*; 16: 297-301;
- Coutryman P, Heddle J (1976) The production of micronuclei from chromosome aberrations in irradiated cultures of human lymphocytes. *Mutat. Res.*, 41 321-332;
- Da Ros L, Nesto N, (2005). Cellular alterations in *Mytilus galloprovincialis* (LMK) and *Tapes philippinarum* (Adams and Reeve, 1850) as biomarkers of environmental stress: field studies in the Lagoon of Venice (Italy). *Environ Int.* 31(7): 1078-88;
- Dufour E, Kumaravel T, Nohynek G, Kirkland D and Toutain H. (2006) Clastogenicity, photo-clastogenicity or pseudo-photo-clastogenicity: genotoxic effects of zinc oxide in the dark, in pre-irradiated or simultaneously irradiated Chinese hamster ovary cells. *Mutat. Res.* 607, 215–224;
- Emmanouil C, Chipman JK. (2008) Excision of an oxidative DNA lesion (8-oxo-deoxyguanosine) in *Mytilus edulis* populations from two sites in the eastern Irish Sea. *J. Environ Sci Health A Tox Hazard Subst Environ Eng.* 43(14):1586-91;
- Feldheim D, Foss C Jr, (2002) *Metal Nanoparticles: synthesis, characterization and applications.* Marcel Dekker, New York;
- Fenech M. (1997). The advantages and disadvantages of the cytokinesis-block micronucleus method. *Mutat. Res.*, 392: 11-18.

- Fenech M,(2000) The in vitro micronucleus technique. *Mutat. Res.*, 455 (1-2) 81-95;
- Gagné F, Auclair J, Turcotte P, Fournier M, Gagnon C, Sauvé S, Blaise C. (2008) Ecotoxicity of CdTe quantum dots to freshwater mussels: impacts on immune system, oxidative stress and genotoxicity. *Aquat Toxicol.* 86(3): 333-40;
- García-García E, Prado-Alvarez M, Novoa B, Figueras A, Rosales C (2008). Immune responses of mussel hemocyte subpopulations are differentially regulated by enzymes of the PI 3-K, PKC, and ERK kinase families. *Dev Comp Immunol.* 32, 637-653;
- Gatehouse D, Haworth S, Cebula T, Gocke E, Kier L, Matsushima T, Melcion C, Nohmi T, Ohta T, Venitt S, Zeiger E (1994) Recommendations for the performance of bacterial mutation assays. *Mutat. Res.* 312(3), 217-233;
- Geyer H, Sheehan P, Kotzias D, Freitag D, Korte F (1982), Prediction of ecotoxicological behaviour of chemicals: Relationship between physico-chemical properties and bioaccumulation of organic chemicals in the mussel *Mytilus edulis*. *Chemosphere* 11 (11), 1121-1134;
- Goldberg E, (1975) The Mussel Watch a first step in global marine monitoring. *Mar Pollut Bull* 6; 111 ;
- Goldberg E, Bertine K (2000). Beyond the Mussel Watch-new directions for monitoring marine pollution. *Sci.Total Environ.*, 247: 165-174;
- Grandi C, D'Ovidio M, Tomao P., (2006) Use of the comet test in occupational medicine and industrial toxicology: considerations and prospects. *G Ital Med Lav Ergon.* 28(1): 5-13;
- Josephy P, Gruz P, Nohmi T. (1997) Recent advances in the construction of bacterial genotoxicity assays. *Mutat. Res.*, 386: 1-23.
- Kadhim M (1990) Methodologies for monitoring the genetic effects of mutagens and carcinogens accumulated in the body tissue of marine mussels. *Rev. Aquatic Sci.*, 2, 83–107;
- Kim J, Yoon T, Yu K, Kim B, Park S., Kim H., Lee K, Park S, Lee J, and Cho M. (2005) Toxicity and tissue distribution of magnetic nanoparticles in mice. *Toxicol. Sci.* 89, 338–347;
- Kirsch-Volders M., Elhajouji A., Cundari A., Van Hummelen P. (1997). The in vitro micronucleus test: a multi-endpoint assay to detect simultaneously mitotic delay, apoptosis, chromosome breakage, chromosome loss and non-disjunction. *Mutat. Res.*, 392: 19-30;

- Kiskinis E, Suter W, Hartmann A. (2002) High-throughput Comet assay using 96-well plates. *Mutagen*; 17: 37-43;
- Kisin E, Murray A, Keane M, Shi X, Schwegler-Berry D, Gorelik O, Arepalli S, Castranova V, Wallace W, Kagan V and Shvedova A. (2007) Single-walled carbon nanotubes: geno- and cytotoxic effects in lung fibroblast V79 cells. *J. Toxicol. Environ. Health Part A* 70, 2071–2079;
- Koehler A., Marx U., Broeg K., Bahns S, Bressling J.,)(2008). Effects of nanoparticles in *Mytilus edulis* gill and hepatopancreas – a new threat to marine life? *Marine Environmental Research* 66: 12–14;
- Koukouzika N e Dimitriadis V, (2005) Multiple biomarker comparison in *Mytilus galloprovincialis* from the Greece coast: "lysosomal membrane stability, neutral red retention, micronucleus frequency and stress on stress". *Ecotox*, 14(4): 449-63;
- Hardman R (2006) A Toxicologic Review of Quantum Dots: Toxicity Depends on Physicochemical and Environmental Factor. *Environ Health Perspect.* 114 (2): 165–172;
- Haynes D, Rogers S, Howie D, Percy M, Vernon-Roberts B. (1996) Drug inhibition of the macrophage response to metal wear particles in vitro. *Clin Orthop Relat Res*; 323: 316–26;
- Heddle J, Cimino M, Hayashi M, Romagna F, Shelby M, Tucker J, Ph. Vanparys and MacGregor J (1991). Micronuclei as an index of cytogenetic damage: past, present and future. *Environ. Mol. Mutagen.*, 18: 277-291;
- Henderson L, Wolfreys A, Fedyk J, Bourner C, Windebank S, (1998)The ability of the Comet assay to discriminate between genotoxins and cytotoxins. *Mutagen*; 13: 89-94;
- Higashisaka K, Yoshioka Y, Yamashita K, Morishita Y, Fujimura M, Nabeshi H, Nagano K, Abe Y, Kamada H, Tsunoda S, Yoshikawa T, Itoh N, Tsutsumi Y (2011) Acute phase proteins as biomarkers for predicting the exposure and toxicity of nanomaterials. *Biomaterials.* 32(1): 3-9;
- Hu J, Chen G and Lo I. (2005) Removal and recovery of Cr(VI) from wastewater by maghemite nanoparticles. *Water Res.* 39(18), 4528-4536;
- International Standard ISO/CD 13829: Water quality – Determination of the genotoxicity of water and waste water using the umu-test.

- Landsiedel R, Kapp MD, Schulz M, Wiench K, Oesch F. (2009) Genotoxicity investigations on nanomaterials: methods, preparation and characterization of test material, potential artifacts and limitations-many questions, some answers. *Mutat. Res.* 681(2-3), 241-258. Review;
- Lauenstein, G, Kimbrough, K, (2007) Chemical contamination of the Hudson–Raritan Estuary as a result of the attack on the World Trade Center: analysis of polycyclic aromatic hydrocarbons and polychlorinated biphenyls in mussels and sediment. *Marine Pollution Bulletin* 54, 284–294;
- Lee T, Wiley AL Jr, Means J, Biggs L. (1994) Preservation of cytoplasm in the human lymphocyte micronucleus assay. *Mutagenesis*, (6): 559-62;
- Le Foll F, Rioult D, Boussa S, Pasquier J, Dagher Z, Leboulenger F. (2010) Characterisation of *Mytilus edulis* hemocyte subpopulations by single cell time-lapse motility imaging. *Fish Shellfish Immunol.* 28, 372-386;
- Li Q, Mahendra S, Lyon D, Brunet L, Liga M, Li D and Alvarez P. (2008) Antimicrobial nanomaterials for water disinfection and microbial control: potential applications and implications. *Water Res.* 42(18), 4591-4602;
- Li H, Parisi M, Toubiana M, Cammarata M, Roch P. (2008) Lysozyme gene expression and hemocyte behaviour in the Mediterranean mussel, *Mytilus galloprovincialis*, after injection of various bacteria or temperature stresses. *Fish shellfish immunol.* 25, 143-152;
- Li H, Venier P, Prado-Alvarez M, Gestal C, Toubiana M, Quatesan R, Borghesan F, Novoa B, Figueras A, Roch P. (2010) Expression of *Mytilus* immune genes in response to experimental challenge varied according to the site of collection. *Fish shellfish immunol.* 28, 640-648;
- Machella N, Battino M, Pisanelli B, Regoli F. (2006) Influence of the SCGE protocol on the amount of basal DNA damage detected in the Mediterranean mussel, *Mytilus galloprovincialis*. *Environ Mol Mutagen.* 47(8):579-86.
- Maenosono S, Yoshida R and Saita S. (2009) Evaluation of genotoxicity of amine-terminated water-dispersible FePt nanoparticles in the Ames test and in vitro chromosomal aberration test. *J Toxicol Sci.* 34(3), 349-354;
- Maenosono S, Suzuki T and Saita S. (2007) Mutagenicity of water-soluble FePt nanoparticles in Ames test. *J Toxicol Sci.* 32(5); 575-579;

- Mailman M, Stepnuk L, Cicek N, Bodaly R, (2006) Strategies to lower methyl mercury concentrations in hydroelectric reservoirs and lakes: A review. *Sci Total Environ*, 368(1): 224-35;
- Martinez-Expósito M, Pasantes J, Méndez J. (1994). Proliferation kinetics of mussel (*Mytilus galloprovincialis*) gill cells. *Mar. Biol.*, 120: 41-45;
- Mengoli (1998): Documento consultabile su www.regione.emilia-romagna.it
- Mitta G, Vandenbulcke F, Roch P. (2000a) Original involvement of antimicrobial peptides in mussel innate immunity. *FEBS Lett.* 486, 185-90;
- Mitta G, Hubert F, Dyrzynda E, Boudry P, Roch P. (2000b) Mytilin B and MGD2, two antimicrobial peptides of marine mussels: gene structure and expression analysis. *Dev Comp Immunol.* 24, 381-393;
- Mortelmans K, Zeiger E (2000) The Ames Salmonella/microsome mutagenicity assay, *Mutat Res* 455 29-60;
- Mori T, Takada H, Ito S, Matsubayashi K, Miwa N and Sawaguchi T. (2006) Preclinical studies on safety of fullerene upon acute oral administration and evaluation for no mutagenesis. *Toxic.* 225(1), 48-54
- Nakagawa Y, Wakuri S, Sakamoto K and Tanaka N. (1997) The photogenotoxicity of titanium dioxide particles. *Mutat. Res.* 394, 125–132;
- Nigro M, Falleni A, Barga I, Scarcelli V, Lucchesi P, Regoli F, Frenzilli G, (2006). Cellular biomarkers for monitoring estuarine environments: transplanted versus native mussels. *Aquat Toxicol.*, 77(4): 339-47;
- Olive P, Banáth J, (2006). The comet assay: a method to measure DNA damage in individual cells, *nat. prot.* 10.1038;
- Orts-Gil G , Natte K, Drescher D, Bresch H • Manton A, Kneipp J, Osterle W, (2010) Characterisation of silica nanoparticles prior to *in vitro* studies: from primary particles to agglomerates *J Nanopart Res* 1007/s11051-010-9910-9;
- Ostling O, Johanson KJ. (1984) Microelectrophoretic study of radiation-induced DNA damages in individual mammalian cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*; 123 291-298;
- Papageorgiou I, Brown C, Schins R, Singh S, Newson R, Davis S, Fisher J, Ingham E, Case CP. 2007 The effect of nano- and micron-sized

particles of cobalt-chromium alloy on human fibroblasts in vitro.
28(19):2946-58

- Pipe RK. Differential binding of lectins to hemocytes of the mussel *Mytilus edulis*. *Cell Tissue Research* (1990) 261, 261-268.
- Prescott, Harley, and Klein's: *Microbiology*, 7/e 2009
- Renwranzt L, Daniels J and Hansen PD. (1985) Lectin-binding to hemocytes of *Mytilus edulis*. *Dev Comp Immun* 9, 203-210.
- Renwranzt L. Internal defense system of *Mytilus edulis*. (1990) In *Neurobiology of Mytilus edulis*, G. Stephano (Ed). Manchester University Press 256-275;
- Russell P.J., *iGenetica*, Edises (Napoli), 2006, capitoli 19, 20 pagg. 576-592, 608-612;
- Sasaki YF, Sekihashi K, Izumiyama F, Nishidate E, Saga A, Ishida K, Tsuda S. (2000) The Comet assay with multiple mouse organs: comparison of Comet assay results and carcinogenicity with 208 chemicals selected from the IARC monographs and US NTP Carcinogenicity database. *Crit Rev Toxicol*; 30: 629-799;
- Schmid G, (2004) *Nanoparticles: from theory to application*. 19(8), 991, Michael R. Bockstaller
- Stefano G., Leung M, Zhao X. and Scharrer B, (1989) Evidence for the involvement of opioid neuropeptides in the adherence and migration of immunocompetent invertebrate hemocytes. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 86: 626-630;
- Stöber W, Fink A and Bohn E (1968) Controlled growth of monodisperse silica spheres in the micron size range. *Journal of Colloid and Interface Science* 26 (1): 62-69;
- Stoimenov P, Klinger R, Marchin G, and Klabunde K. (2002) Metal Oxide Nanoparticles as Bactericidal Agents. *Langmuir*, , 18 (17), 6679–6686 Copyright © American Chemical Society;
- Sun C, Lucas J, Waite J., (2002) Collagen-binding matrix proteins from elastomeric extraorganismic byssal fibers. *Biomacromolecules* 6, 1240-1248;
- Suo Z, Avci R, Deliorman M, Yang X and Pascual D (2009). Bacteria survive multiple puncturings of their cell walls. *Langmuir*. 25(8) 4588-4594;

- Tedesco S, Doyle H, Blasco J, Redmond G, Sheehan D. (2010) Oxidative stress and toxicity of gold nanoparticles in *Mytilus edulis*. *Aquat Toxicol.* 100(2):178-86
- Terahara K, Takahashi K, Nakamura A, Osada M, Yoda M, Hiroi T, Hirasawa M and Mori K , (2006) Differences in integrin-dependent phagocytosis among three hemocyte subpopulations of the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. *Developmental and Comparative Immunology*, 30:667-683;
- Tice R, Hartmann A, Agurell E, Beevers C, Brendler-Schwaab S, Burlinson B, Clay P, Collins A, Smith A, Speit G and Thybaud V.(2003) Recommendations for conducting the in vivo alkaline Comet assay. *Mutagenesis*,18, 45-51;
- Torous D, Hall N, Murante F, Gleason S, Tometsko C, Dertinger S (2003). Comparative scoring of micronucleated reticulocytes in rat peripheral blood by flow cytometry and microscopy. *Toxicol. Sci.*, 74 (2): 309-314;
- Van Blaaderen, A. Vrij, A. Synthesis and Characterization of Monodisperse Colloidal Organo-silica Spheres *J. Colloid Interface Sci.* 1993, 156, 1-18;
- Van der Oost R., Beyer J., Vermeulen N (2003). Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. *Environ. Toxicol. Pharm.*, 13: 57-149;
- Van Goethem F, Lison D, Kirsch-Volders M. (1997) Comparative evaluation on the *in vitro* micronucleus test and the alkaline single cell gel electrophoresis assay for the detection of DNA damaging agents: genotoxic effects of cobalt powder, tungsten carbide and cobalt-tungsten carbide. *Mutat Res*; 392: 31-43;
- Venier P, Tallandini L, Bisol P (2003) Characterization of coastal sites by applying genetic and genotoxicity markers in *Mytilus galloprovincialis* and *Tapes philippinarum*. *Chem. Ecol.* 19(2-3): 113-128;
- Venier P, Zampieron C, (2005). Evidence of genetic damage in grass gobies and mussels from the Venice lagoon. *Environ Int*, 31(7): 1053-64.
- Venier P, De Pittà C, Bernante F, Varotto L, De Nardi B, Bovo G, Roch P, Novoa B, Figueras A, Pallavicini A, Lanfranchi G (2009) MytiBase: a knowledgebase of mussel (*M. galloprovincialis*) transcribed sequences. *BMC Genomics* 10:72 ISSN: 1471-2164
- Vral A, Verhaegen F, Thierens H, De Ridder L. (1994) The in vitro cytokinesis-block micronucleus assay: a detail description of an

improved slide preparation technique for the automated detection of micronuclei in human lymphocytes. *Mutagenesis*, 9 (5): 439-443;

- Wang J, Sanderson J, Wang H (2007) Cytotoxicity and genotoxicity of ultrafine crystalline SiO₂ particulate in cultured human lymphoblastoid cells. *Environ Mol Mutagen*. 48(2): 151-7;
- Ward J, Kach D, (2009) Marine aggregates facilitate ingestion of nanoparticles by suspension-feeding bivalves. *Mar Environ Res*. 68(3):137-42;
- Warheit D, Hoke R, Finlay C, Donner E, Reed K, Sayes C. (2007) Development of a base set of toxicity tests using ultrafine TiO₂ particles as a component of nanoparticle risk management, *Toxicol. Lett*. 171, 99–110;
- Wirnitzer U, Herbold B, Voetzand M, Ragot J. (2009) Studies on the in vitro genotoxicity of baytubes®, agglomerates of engineered multi-walled carbon-nanotubes (MWCNT). *Toxicol. Lett*. 186, 160-165;
- Yoshida R, Kitamura D and Maenosono S. (2009) Mutagenicity of water-soluble ZnO nanoparticles in Ames test. *J. Toxicol. Sci*. 34(1), 119-22.
- Zhu M, Wang Y, Feng W, Wang B, Wang M, Ouyang H, Chai Z (2010) Oxidative stress and apoptosis induced by iron oxide nanoparticles in cultured human umbilical endothelial cells. *J Nanosci. Nanotechnol*. 10(12): 8584-90;
- Zuykov M, Pelletier E, Demers S, (2011) Colloidal complexed silver and silver nanoparticles in extrapallial fluid of *Mytilus edulis*. *Mar Environ Res*. 71(1): 17-21.

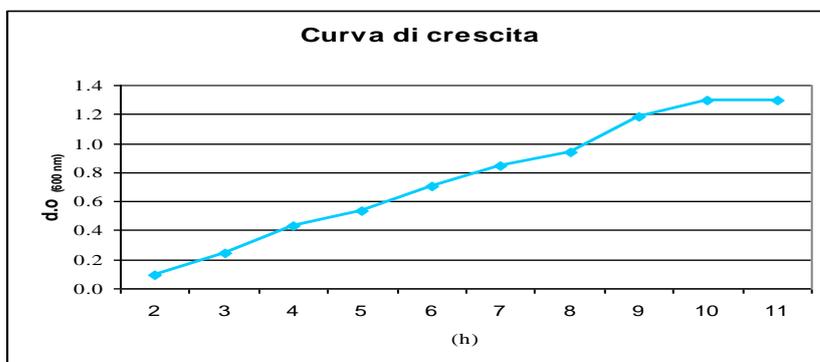
Siti internet consultati

- www.OECD.org
- www.ICH.org
- www.ecsin.it
- www.helpdesk-reach.it
- www.europarl.europa.eu
- www.cometassay.org
- <http://casplab.com>

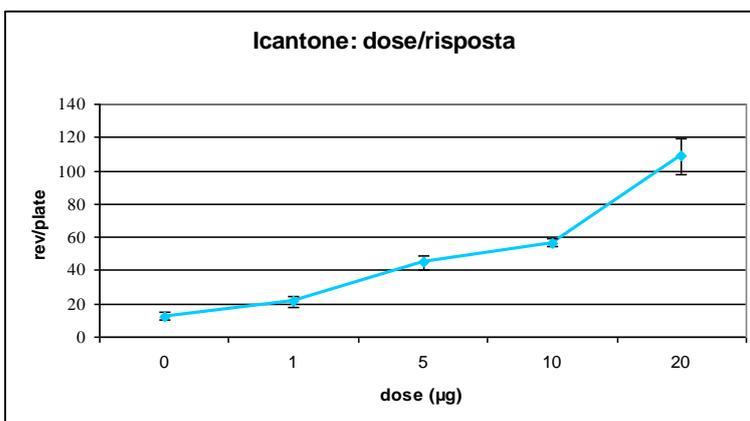
Appendice A

Valutazioni preliminari effettuate nel ceppo TA 98

TA 98	d.o (600 nm)			MEDIA	DV.ST	c.v %
	h	a	b			
2	0.097	0.091	0.095	0.0943	0.0025	2.6443
3	0.245	0.244	0.25	0.2463	0.0026	1.0655
4	0.432	0.435	0.428	0.4317	0.0029	0.6643
5	0.536	0.53	0.54	0.5353	0.0041	0.7677
6	0.704	0.71	0.702	0.7053	0.0034	0.4819
7	0.838	0.846	0.843	0.8423	0.0033	0.3917
8	0.906	0.981	0.943	0.9433	0.0306	3.2459
9	1.167	1.197	1.183	1.1823	0.0123	1.0366
10	1.289	1.27	1.34	1.2997	0.0296	2.2741
11	1.36	1.314	1.278	1.3000	0.0347	2.6662

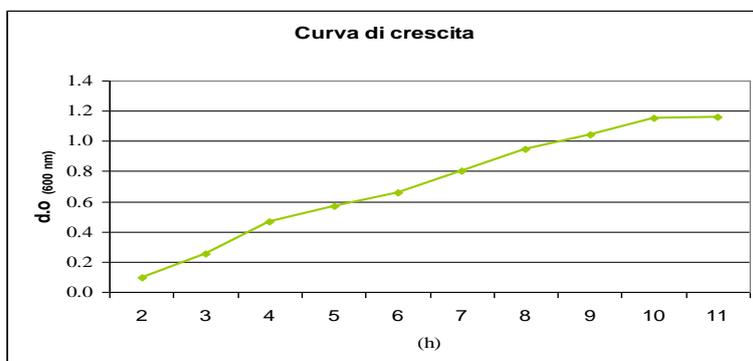


ICANTONE						
TA 98	UFC in piastra			MEDIA	DV.ST	c.v %
dose (µg)	a	b	c			
0	15	11	12	12.7	2.1	16.4
1	20	19	25	21.3	3.2	15.1
5	47	40	47	44.7	4.0	9.0
10	58	58	54	56.7	2.3	4.1
20	105	100	121	108.7	11.0	10.1

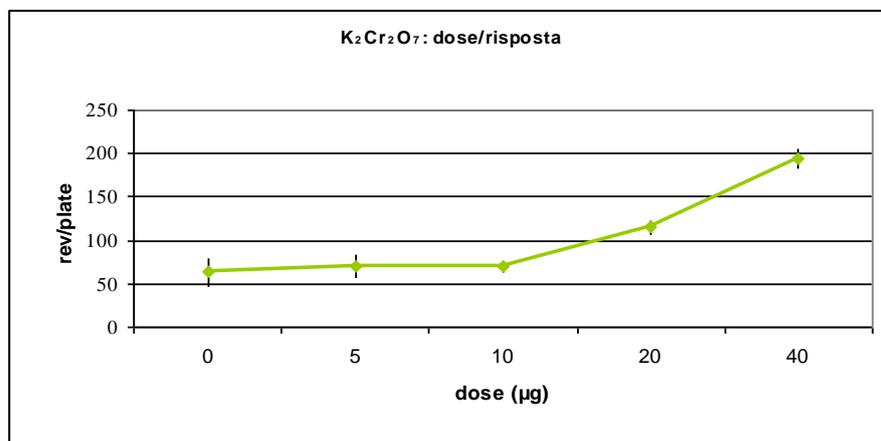


Valutazioni preliminari effettuate nel ceppo TA 100

TA 100	d.o (600 nm)			MEDIA	DV.ST	c.v
	a	b	c			
2	0.09	0.098	0.093	0.0937	0.0033	3.5230
3	0.256	0.253	0.26	0.2563	0.0029	1.1186
4	0.44	0.441	0.51	0.4637	0.0328	7.0665
5	0.557	0.545	0.61	0.5707	0.0282	4.9488
6	0.661	0.666	0.65	0.6590	0.0067	1.0142
7	0.807	0.8	0.806	0.8043	0.0031	0.3843
8	0.953	0.944	0.948	0.9483	0.0037	0.3882
9	1.055	1.04	1.036	1.0437	0.0082	0.7864
10	1.165	1.169	1.123	1.1523	0.0208	1.8056
11	1.163	1.158	1.159	1.1600	0.0022	0.1862



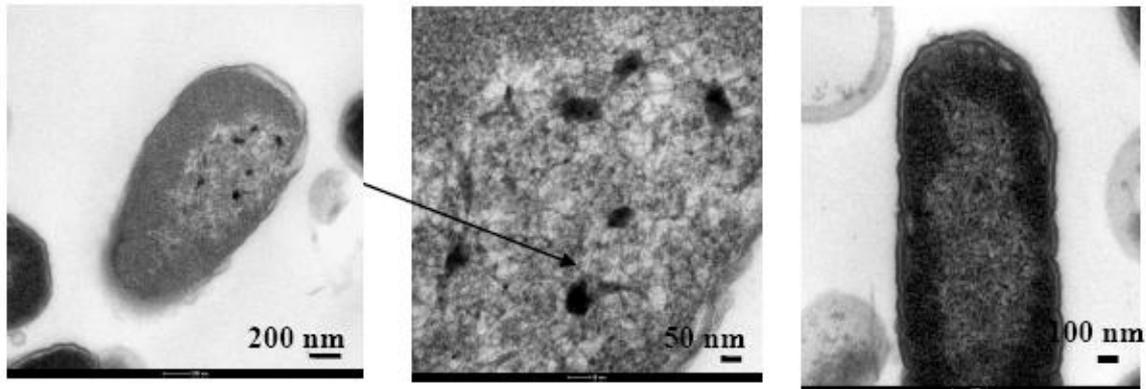
K ₂ Cr ₂ O ₇						
TA 100	rev/plate			MEDIA	DV.ST	c.v %
dose (µg)	a	b	c			
0	74	73	43	63.3	17.6	27.8
5	78	53	80	70.3	15.0	21.4
10	74	73	61	69.3	7.2	10.4
20	125	110	110	115	8.7	7.5
40	194	183	208	195	12.5	6.4



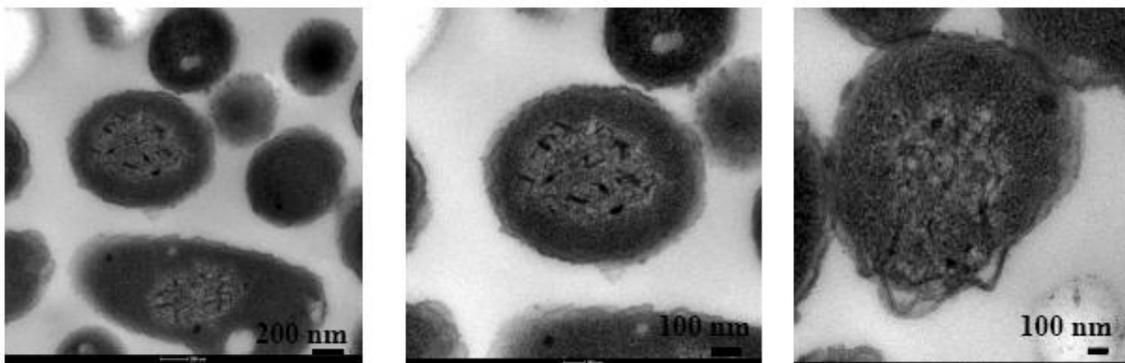
Appendice B

Immagini TEM di interazione Qtracker800[®] e TA 100:

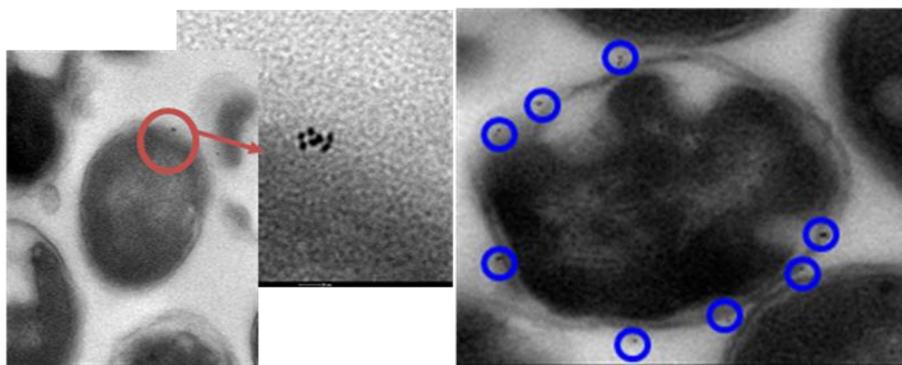
- Incubazione tra Q800 (20 nM) e TA 100, 30 min, 25 °C
Colorazione con acetato di uranile e citrato di piombo



- Incubazione tra Q800 (20 nM) e TA 100 elettroporati, 30 min, 25 °C
Colorazione con acetato di uranile e citrato di piombo



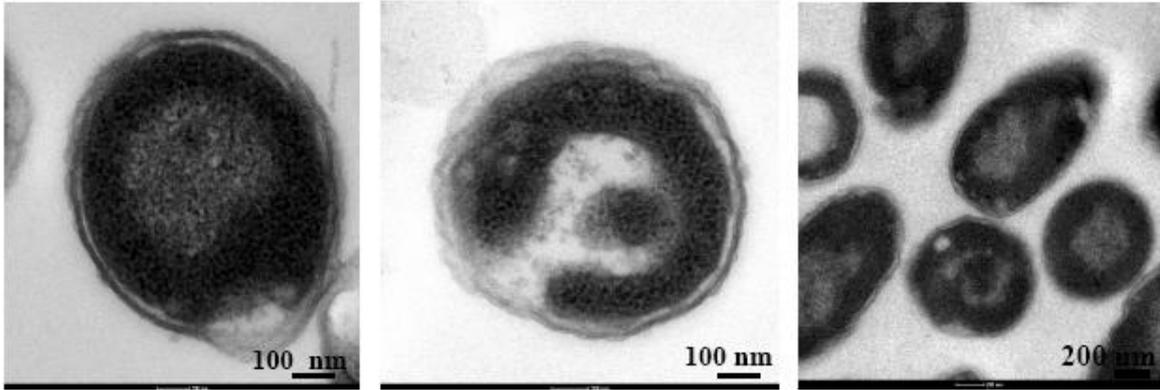
- Incubazione tra Q800 (20 nM) e TA 100 elettroporati, 30 min, 25 °C
Colorazione assente



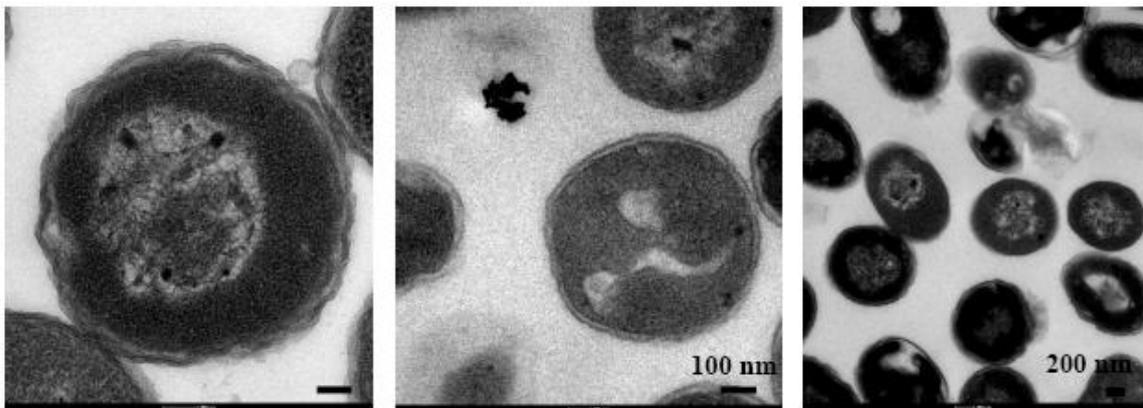
Appendice C

Immagini TEM di interazione $\gamma\text{Fe}_2\text{O}_3$ e TA 100:

- Incubazione tra $\gamma\text{Fe}_2\text{O}_3$ (2 $\mu\text{g}/\text{ml}$) e TA 100 per 30 min, 25 °C
Colorazione con acetato di uranile e citrato di piombo

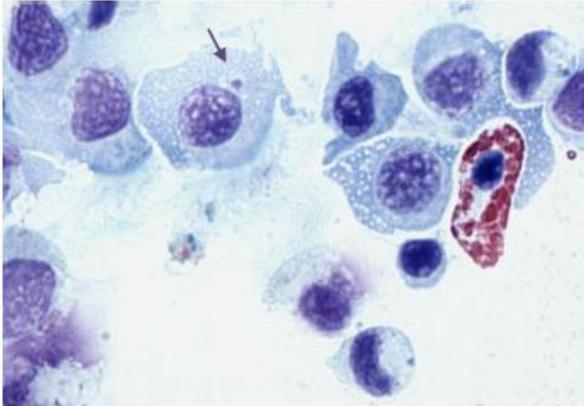


- Incubazione tra $\gamma\text{Fe}_2\text{O}_3$ (2 $\mu\text{g}/\text{ml}$) e TA 100 per 30 min, 25 °C
Colorazione con acetato di uranile e citrato di piombo

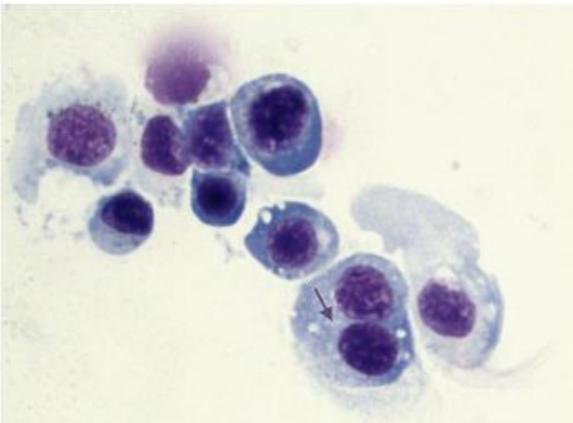


Appendice D

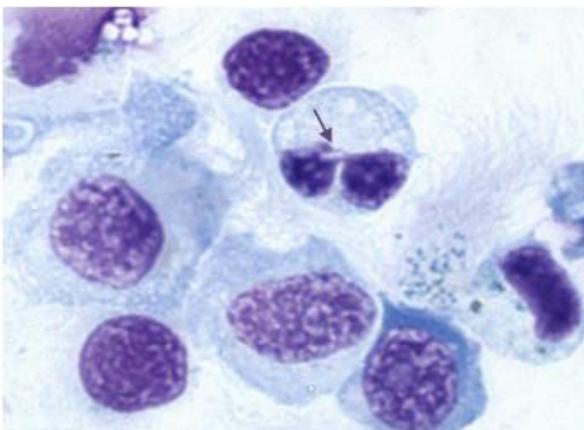
Test del Micronucleo: immagini campione di AN e MN presenti in cellule di branchia di mitilo dopo trattamento *in vivo* con una miscela di metalli pesanti $\text{CdCl}_2 \text{H}_2\text{O}$, $\text{CuCl}_2 \text{H}_2\text{O}$ e HgCl_2 (0.05-0.1-0.2 μM)



Cellula con MN



Cellula binucleata



Cellula con ponte cromatidico tra due nuclei

