



RAPPORTI ISTISAN 15|34

ISSN: 1123-3117 (cartaceo) • 2384-8936 (online)

Implementazione di metodi validati e sviluppo di metodi *in vitro* per determinare le caratteristiche fisico-chimiche e la potenziale attività geno/tossicologica di micro e nanoparticelle di biossido di titanio

F. Barone, I. De Angelis, B. De Berardis, A. Zijno, C. Andreoli,
P. Degan, M.L. Polci, M. Alessandrelli, P. Di Prospero Fanghella



AMBIENTE
E SALUTE

ISTITUTO SUPERIORE DI SANITÀ

Implementazione di metodi validati e sviluppo di metodi *in vitro* per determinare le caratteristiche fisico-chimiche e la potenziale attività geno/tossicologica di micro e nanoparticelle di biossido di titanio

Flavia Barone (a), Isabella De Angelis (a),
Barbara De Berardis (b), Andrea Zijno (a), Cristina Andreoli (a),
Paolo Degan (c), Maria Letizia Polci (d,e), Maria Alessandrelli (d),
Paola Di Prospero Fanghella (d)

*(a) Dipartimento di Ambiente e Connessa Prevenzione Primaria,
Istituto Superiore di Sanità, Roma*

(b) Dipartimento di Tecnologie e Salute, Istituto Superiore di Sanità, Roma

*(c) Unità Operativa Complessa Mutagenesi, IRCCS Azienda Ospedaliera Universitaria
San Martino - IST Istituto Nazionale per la Ricerca sul Cancro, Genova*

(d) Centro Nazionale Sostanze Chimiche, Istituto Superiore di Sanità, Roma

(e) Direzione Generale della Prevenzione sanitaria, Ministero della Salute, Roma

ISSN: 1123-3117 (cartaceo) • 2384-8936 (online)

**Rapporti ISTISAN
15/34**

Istituto Superiore di Sanità

Implementazione di metodi validati e sviluppo di metodi *in vitro* per determinare le caratteristiche fisico-chimiche e la potenziale attività geno/tossicologica di micro e nanoparticelle di biossido di titanio.

Flavia Barone, Isabella De Angelis, Barbara De Berardis, Andrea Zijno, Cristina Andreoli, Paolo Degan, Maria Letizia Polci, Maria Alessandrelli, Paola Di Prospero Fanghella
2015, 57 p. Rapporti ISTISAN 15/34

Per un'adeguata valutazione del potenziale rischio per l'uomo e per l'ambiente associato all'esposizione a nanomateriali è indispensabile studiare la relazione tra composizione fisico-chimica e tossicità. Questo a causa delle peculiari e specifiche proprietà fisico-chimiche delle nanoparticelle (NP), attribuibili alle loro piccole dimensioni (<100 nm). Il Working Party on Manufactured Nanomaterials dell'OECD (Organisation for Economic Co-operation and Development) ha proposto una lista di *endpoint* e una lista di metodi alternativi alla sperimentazione animale, a cui far riferimento qualora si voglia determinare la sicurezza per l'uomo e per l'ambiente dei nanomateriali. Per determinare le caratteristiche fisico-chimiche e la potenziale cito/genotossicità di particelle di titanio (in forma micro e nano), nel presente studio sono stati utilizzati metodi validati e/o alternativi allo scopo di acquisire dati utili all'implementazione e alla trasferibilità delle metodologie utilizzate, con l'obiettivo finale di soddisfare specifiche esigenze dei regolamenti comunitari REACH (*Registration, Evaluation, Authorisation and Restriction of Chemicals*) e CLP (*Classification, Labelling and Packaging*) relativamente all'applicazione e all'utilizzo delle sostanze in nanoforma.

Parole chiave: Nanomateriali; Biossido di titanio; Caratterizzazione chimico-fisica; Metodi *in vitro*; Citotossicità; Genotossicità; Regolamento REACH; Regolamento CLP

Istituto Superiore di Sanità

Implementation of validated methods and development of *in vitro* methods to evaluate the physico-chemical characteristics and the geno/toxic potential of titanium dioxide micro and nanoparticles.

Flavia Barone, Isabella De Angelis, Barbara De Berardis, Andrea Zijno, Cristina Andreoli, Paolo Degan, Maria Letizia Polci, Maria Alessandrelli, Paola Di Prospero Fanghella
2015, 57 p. Rapporti ISTISAN 15/34 (in Italian)

The study of the relationship between physico-chemical composition and potential toxicity is crucial in the risk assessment of nanomaterials, due to their specific properties linked to their small dimensions (<100 nm). The Working Party on Manufactured Nanomaterials of the OECD (Organisation for Economic Co-operation and Development) proposed a list of endpoints as well as a list of alternative methods, which have to be used in the evaluation of safety, for human health and environment, of nanomaterials. In this study, validated and/or alternative methods were used in order to evaluate the physico-chemical properties and the geno/cytotoxic potential of titanium dioxide particles, both in micro and in nano size. Obtained results allowed us to implement the methodologies tested in order to answer to some requirements of European regulations (Registration, Evaluation, Authorisation and Restriction of Chemicals) and CLP (Classification, Labelling and Packaging), related to their application to substances in nanoform.

Key words: Nanomaterials; Titanium dioxide; Physico-chemical characterization; *In vitro* methods; Cytotoxicity; Genotoxicity; REACH regulation; CLP regulation

Progetto realizzato con il supporto finanziario del Ministero della Salute – capitolo 4145.

Per informazioni su questo documento scrivere a: flavia.barone@iss.it

Il rapporto è accessibile online dal sito di questo Istituto: www.iss.it.

Citare questo documento come segue:

Barone F, De Angelis I, De Berardis B, Zijno A, Andreoli C, Degan P, Polci ML, Alessandrelli M, Di Prospero Fanghella P. *Implementazione di metodi validati e sviluppo di metodi in vitro per determinare le caratteristiche fisico-chimiche e la potenziale attività geno/tossicologica di micro e nanoparticelle di biossido di titanio*. Roma: Istituto Superiore di Sanità; 2015. (Rapporti ISTISAN 15/34).

Legale rappresentante dell'Istituto Superiore di Sanità: *Gualtiero Ricciardi*
Registro della Stampa - Tribunale di Roma n. 114 (cartaceo) e n. 115 (online) del 16 maggio 2014

Direttore responsabile della serie: *Paola De Castro*
Redazione: *Paola De Castro* e *Sandra Salinetti*

La responsabilità dei dati scientifici e tecnici è dei singoli autori, che dichiarano di non avere conflitti di interesse.



INDICE

Introduzione	1
1. Caratterizzazione fisico-chimica delle particelle di biossido di titanio	4
1.1. Particelle di TiO ₂	4
1.2. Protocolli di dispersione e preparazione dei campioni per microscopia elettronica.....	4
1.2.1. Particelle come ricevute dal fornitore	4
1.2.2. Particelle in sospensione nel terreno di coltura utilizzato per il test di citotossicità.....	5
1.2.3. Particelle in sospensione nel terreno di coltura utilizzato per i test di genotossicità.....	5
1.3. Caratterizzazione fisico-chimica delle particelle mediante microscopia elettronica.....	5
1.3.1. Dimensione primaria e forma delle singole particelle	6
1.3.2. Distribuzione dimensionale	7
1.3.3. Stato di agglomerazione delle NP.....	8
1.3.4. Area di superficie specifica.....	10
2. Valutazione della citotossicità delle particelle di biossido di titanio	11
3. Valutazione della genotossicità delle particelle di biossido di titanio	17
3.1. Test del micronucleo	17
3.2. Saggio della cometa	21
3.3. Danno ossidativo al DNA	25
4. Valutazione critica dei dati sperimentali ottenuti con le particelle di TiO₂	28
4.1. Valutazione dei risultati ottenuti per la caratterizzazione mediante TEM/SEM	28
4.2. Valutazione dei risultati ottenuti con il test di citotossicità.....	29
4.3. Valutazione dei risultati ottenuti con i test di genotossicità	30
Bibliografia	33
Appendice A	
Procedure operative standard per la coltura delle cellule Balb/3T3	37
Appendice B	
Procedure operative standard per il saggio del rosso neutro	43
Appendice C	
Procedure operative standard per l'esecuzione del test del micronucleo su linfociti umani congelati.....	51

INTRODUZIONE

La nanotecnologia è stata inserita dalla Commissione Europea (CE) tra le *Key Enabling Technologies* (KET), le tecnologie abilitanti fondamentali per la società e per l'economia, soprattutto in virtù delle sue ampie possibilità applicative che spaziano dall'ambito industriale a quello biomedico. Lo sviluppo delle nanotecnologie e la velocità di produzione di prodotti contenenti materiali in nanoforma supera di gran lunga l'acquisizione di conoscenze relative ai possibili effetti dannosi dei NanoMateriali (NM) per la salute umana e per l'ambiente. A tal fine, negli ultimi anni un notevole impegno è stato rivolto, da organismi nazionali e internazionali, all'individuazione di procedure adeguate a garantire uno sviluppo sicuro e responsabile degli NM.

Le peculiari e specifiche proprietà fisico-chimiche gli NM, attribuibili alle loro piccole dimensioni (<100 nm), come struttura e area di superficie, solubilità, forma e aggregazione, carica e reattività superficiale conferiscono loro una maggiore reattività rispetto alle corrispondenti forme *bulk* e rendono complesso lo studio della loro interazione con i sistemi biologici.

A questo riguardo, la CE suggerisce l'utilizzo di metodi appropriati e specifici per valutare le proprietà tossicologiche degli NM; in particolare viene raccomandato l'uso di sistemi *in vitro* per meglio individuarne i meccanismi di azione. Il *Working Party on Manufactured Nanomaterials* (WPMN) dell'OECD (*Organisation for Economic Co-operation and Development*) ha proposto una lista di *endpoint* (1) e una lista di metodi alternativi alla sperimentazione animale (2), a cui far riferimento qualora si voglia determinare la sicurezza per l'uomo e per l'ambiente degli NM. Inoltre, in una sua recente raccomandazione (3), l'OECD ha affermato che, in generale, le linee guida utilizzate per la valutazione di sicurezza delle sostanze chimiche sono applicabili anche agli NM; in alcuni casi sarà però necessario procedere a delle modifiche, affinché le peculiarità degli NM siano opportunamente considerate.

Dal punto di vista regolatorio, in ambito comunitario è ancora in discussione la possibilità di modificare l'attuale legislazione sui prodotti chimici per renderla maggiormente rispondente agli NM, sia inserendo degli allegati specifici per gli NM sia prevedendo una nuova regolamentazione *ad hoc*.

Nel quadro della vigente normativa comunitaria per la gestione delle sostanze chimiche e miscele, gli NM ricadono nella sfera di attuazione dei Regolamenti (CE) n. 1907/2006 (REACH: *Registration, Evaluation, Authorisation and Restriction of Chemicals*) (4) e n. 1272/2008 (CLP: *Classification, Labelling and Packaging*) (5) che coprono le sostanze chimiche (articolo 3(1) del REACH e articolo 2(7) del CLP) in qualsiasi dimensione, forma o stato fisico.

I due Regolamenti si applicano in maniera complementare e parallela. Il CLP è relativo alla classificazione, etichettatura e imballaggio di sostanze e miscele valutate pericolose indipendentemente dal tonnellaggio di fabbricazione e importazione delle sostanze. Il REACH concernente la registrazione, valutazione, autorizzazione e restrizione dei prodotti chimici si basa sul principio che ai fabbricanti, agli importatori e agli utilizzatori a valle spetta l'obbligo di produrre, immettere sul mercato o utilizzare sostanze che non arrechino danno alla salute umana o all'ambiente e che andranno registrate secondo tempistiche legate alla quantità immessa sul mercato e alle loro caratteristiche di pericolo.

È importante sottolineare che, per le sostanze chimiche, il REACH prevede la registrazione di tutte le sostanze prodotte o importate nell'Unione Europea in quantità superiore a 1 tonnellata/anno. Alla domanda di registrazione devono essere allegati le informazioni tecniche riguardanti proprietà, uso e classificazione ed etichettatura delle sostanze, e istruzioni sulla

sicurezza d'uso della sostanza. Secondo tale regolamento, inoltre, l'identificazione di qualsiasi sostanza prevede la determinazione di alcuni parametri quali, ad esempio, il nome e le informazioni correlate alla sua composizione chimica e struttura molecolare. In quest'ottica è fondamentale evidenziare che il termine "sostanza in scala nanometrica" viene utilizzato sia per sostanze in nano-forma già registrate nella forma convenzionale (*bulk*), sia per sostanze esclusivamente prodotte in nano-forma. Le "Competent Authorities for REACH and CLP" (CARACAL), nello specifico sottogruppo "SubGroup on nanomaterials" (CASG Nano) coordinato dalla CE, e il Working Group on Nanomaterials dell'Agenzia Europea per le sostanze chimiche (*European Chemical Agency*, ECHA) hanno individuato tra i focus di primario interesse una più accurata caratterizzazione degli NM che comprenda, qualora sia necessario, l'uso di nuovi descrittori e/o parametri valutativi rispetto alle sostanze in *bulk*.

Per la registrazione di NM identificati quali sostanze chimiche esistenti, è fondamentale stabilire se la forma nanometrica sia da considerarsi come parte della sostanza *bulk*, e fornire quindi dati all'ECHA nello stesso fascicolo di registrazione redatto per la sostanza in *bulk*, oppure debba essere registrata separatamente. Nell'ultimo caso la dimensione delle particelle gioca un ruolo fondamentale nella identità della sostanza (dimensione = identificatore) e la nanoforma è da considerarsi una sostanza diversa dalla forma convenzionale, assunzione che implica una registrazione separata per la stessa nanoforma.

Per acquisire dati utili all'implementazione e alla trasferibilità di metodi *in vitro* validati, o in corso di validazione, oltre che per soddisfare specifiche esigenze dei Regolamenti REACH e CLP relative all'applicazione e all'utilizzo delle sostanze in nanoforma, il Ministero della Salute ha finanziato uno studio (DGPREV 0005460-P-01/03/2011), in cui sono stati analizzati i potenziali effetti cito/genotossici di 5 differenti particelle di biossido di titanio (TiO₂) correlandoli alle loro caratteristiche fisico-chimiche. È, infatti, indispensabile, per un'adeguata valutazione del potenziale rischio associato all'esposizione a NM, studiare la relazione tra composizione fisico-chimica e tossicità.

Le diverse particelle di TiO₂ utilizzate differivano tra di loro sia per dimensione sia per fase cristallina:

1. polveri di TiO₂, rutilo, <100 nm;
2. polveri di TiO₂, anatase, <25 nm;
3. polveri di TiO₂, misto anatase/rutilo, <100 nm;
4. polveri di TiO₂, rutilo, <5 µm;
5. polveri di TiO₂, anatase.

La determinazione delle caratteristiche fisico-chimiche delle particelle di TiO₂, nelle dimensioni micro e nano, è stata effettuata mediante tecniche di microscopia elettronica (*Electron Microscopy*, EM), quali microscopia elettronica a scansione (*Scanning Electron Microscopy*, SEM) e a trasmissione (*Transmission Electron Microscopy*, TEM), in base a quanto riportato nella linea guida n. 110 dell'OECD (6) e nelle norme ISO 16700:2004 (7) e 22309:2006 (8).

Allo scopo di verificare se alcuni dei saggi di tossicità *in vitro*, comunemente richiesti per la valutazione del rischio delle sostanze chimiche, siano sufficientemente predittivi anche per il rischio da NM, sono stati utilizzati i seguenti saggi per la valutazione della citotossicità e della genotossicità:

- *Citotossicità*
vitalità cellulare determinata con il saggio del rosso neutro (*Neutral Red Uptake*, NRU) su fibroblasti Balb/3T3. Il saggio ha completato l'iter di validazione internazionale quale saggio *in vitro* per la definizione della dose iniziale nei saggi di tossicità acuta orale (9).

- *Integrità cromosomica*
valutazione tramite il saggio del Micronucleo (CBMN test, OECD TG487) (10) su linfociti di sangue periferico. Tale test consente la misurazione di parametri di danno cromosomico (micronuclei, ponti citoplasmatici, malsegregazione cromosomica) nonché di proliferazione e morte cellulare.
- *Danno al DNA*
determinazione della presenza di rotture a singolo e doppio filamento sul DNA di cellule mononucleate di sangue periferico (*Peripheral blood mononuclear cells*, PBMC) tramite il saggio della cometa.
- *Danno ossidativo al DNA*
determinazione dei livelli di 8-oxodG, quale principale marker di danno ossidativo, su DNA genomico. La misura è stata effettuata su PBMC tramite la tecnica di cromatografia con rilevazione elettro-chimica (*High Pressure Liquid Chromatography/Electrochemical Detection*, HPLC/EC) (ESCODD, *European Standards Committee on Oxidative DNA Damage*) (11).

1. CARATTERIZZAZIONE FISICO-CHIMICA DELLE PARTICELLE DI BLOSSIDO DI TITANIO

Un obiettivo specifico dello studio è stato lo sviluppo di metodi per la preparazione dei campioni di particelle di TiO_2 in scala nanometrica e micrometrica e per la loro successiva caratterizzazione mediante SEM. I campioni sono stati caratterizzati sia *as received* dal fornitore, sia dispersi nei mezzi di coltura utilizzati nei test *in vitro* effettuati per la determinazione delle proprietà tossicologiche delle particelle di TiO_2 . Sono stati studiati i protocolli di dispersione per le nanoparticelle (NP) proposti dal WPMN (12) e messi a punto quelli per la dispersione nei mezzi di coltura in modo da simulare il più possibile l'esposizione delle particelle con i sistemi biologici. Infine sono state prese in esame le linee guida OECD e ISO per la EM e sviluppati metodi per ottenere campioni idonei per tale tecnica analitica e per la determinazione delle caratteristiche fisico-chimiche.

1.1. Particelle di TiO_2

Sono stati selezionati e acquistati dalla Sigma-Aldrich tre tipi di NP di biossido di titanio con diversa struttura cristallina (rutile, anatase e misto anatase/rutile) e due tipi di particelle di TiO_2 in scala micrometrica (anatase e rutile); in Tabella 1 sono riportati i dati forniti dalla Sigma-Aldrich per ciascuna di esse.

Tabella 1. Particelle di TiO_2 della Sigma-Aldrich e caratteristiche fornite dalla ditta

N. Catalogo	Particelle	Dimensione media	Area di superficie specifica*	Purezza
637262	Rutile < 100 nm	10 nm x 40 nm	130-190 m ² /g	99,5%
637254	Anatase < 25 nm	15 nm	45-55 m ² /g	99,7%
634662	Anatase/rutile <100 nm	25-70 nm	20-25 m ² /g	99,5%
224227	Rutile < 5 µm			99,9%
232033	Anatase			99,8%

* =BET analisi (determinazione mediante applicazione della teoria di Brunauer, Emmett, Teller)

1.2. Protocolli di dispersione e preparazione dei campioni per microscopia elettronica

1.2.1. Particelle come ricevute dal fornitore

Seguendo le indicazioni del WPMN per la caratterizzazione delle NP *as received*, per ciascun tipo di particella in esame sono stati pesati 50 mg di TiO_2 e sospesi in 3,9 mL di acqua distillata, in modo da ottenere una sospensione con una concentrazione di 12,8 mg/mL. 15 µL di queste sospensioni sono stati trasferiti sugli appositi substrati per la successiva analisi TEM e SEM. Per l'analisi SEM i 15 µL di ciascuna delle sospensioni preparate per i 5 tipi di particelle in esame sono stati trasferiti su vetrini ricoperti di polilisina e incubati per 5 minuti prima di essere immersi in acqua per rimuovere le particelle non fissate. Successivamente i vetrini sono

stati essiccati a temperatura ambiente per due ore (13). I campioni ottenuti sono stati poi ricoperti con un film sottile di Au deposto mediante sputtering. Per l'analisi mediante TEM, i 15 μL di ciascuna delle sospensioni preparate sono stati trasferiti su retine rivestite di carbonio. L'osservazione al microscopio elettronico ha evidenziato che queste metodiche di preparazione dei campioni, indicate dal WPMN, introducono degli artefatti nell'agglomerazione delle particelle, rendendo difficile la determinazione della dimensione delle singole particelle, la valutazione della loro distribuzione e del loro stato di aggregazione. Per ridurre gli artefatti sono state quindi utilizzate membrane di policarbonato di 47 mm di diametro e 0,05 μm di porosità, in modo da ottenere una migliore distribuzione delle particelle sul substrato utilizzato per la loro osservazione. 15 μL delle diverse sospensioni sono stati filtrati attraverso tali membrane, porzioni dei filtri sono state tagliate e trasferite su stubs in alluminio per l'analisi SEM e, successivamente, rivestiti di Au. Per l'analisi TEM i filtri ottenuti sono stati rivestiti di un film di carbonio e successivamente il policarbonato è stato dissolto mediante cloroformio.

L'uso di membrane filtranti come supporto per la preparativa dei campioni da analizzare mediante EM presenta tuttavia il seguente limite: è possibile che una certa frazione di NP aventi dimensioni inferiori ai 50 nm passi attraverso i fori della membrana. È quindi indispensabile effettuare una stima della perdita di particelle in seguito alla filtrazione, recuperando l'eluato e trasferendolo ad esempio su wafer di silicio.

1.2.2. Particelle in sospensione nel terreno di coltura utilizzato per il test di citotossicità

Due milligrammi di ciascun tipo delle particelle in esame sono stati sospesi nel terreno di coltura DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle's Medium - high glucose*) contenente il 10% di siero fetale bovino (*Fetal Bovine Serum, FBS*), in modo da ottenere sospensioni aventi una concentrazione compresa tra 40 e 50 $\mu\text{g/mL}$. Le sospensioni sono state sonicate in ghiaccio per 16 minuti mediante un sonicatore a sonda, in condizioni di temperatura controllate (Vibracell, Sonics & Materials Inc, 750 W, frequenza 20 KHz, ampiezza 20%, diametro della sonda 6,5 mm). Da ciascuna sospensione è stato prelevato 1 mL e trasferito sui filtri in policarbonato per l'osservazione in EM.

1.2.3. Particelle in sospensione nel terreno di coltura utilizzato per i test di genotossicità

Per ciascuna delle particelle in esame sono state realizzate sospensioni aventi una concentrazione di 1.5 mg/mL nel terreno di coltura RPMI (*Roswell Park Memorial Institute medium*) e successivamente diluite nel terreno contenente il 15% di FBS in maniera da ottenere una sospensione particellare di 50 $\mu\text{g/mL}$. 750 μL delle sospensioni ottenute sono stati trasferiti su filtri in policarbonato.

1.3. Caratterizzazione fisico-chimica delle particelle mediante microscopia elettronica

Per ciascuna delle particelle in esame sono stati determinati, mediante EM analitica, la dimensione primaria, la distribuzione dimensionale, la forma, lo stato di agglomerazione, la concentrazione numero di particelle, l'area di superficie.

La dimensione primaria e la forma delle particelle sono state valutate mediante TEM a 80 KV (EM 208, FEI, Paesi Bassi). È stato scelto un ingrandimento pari a 15000x per poter osservare accuratamente sia le particelle di dimensioni più piccole sia gli aggregati più grossolani dell'ordine di 2-3 μm .

La distribuzione dimensionale, lo stato di agglomerazione, la concentrazione numero di particelle e l'area di superficie sono stati determinati mediante un microscopio elettronico a scansione (XL30 FEI, Paesi Bassi) munito di un sistema di analisi semiautomatica delle particelle (*Particle Analysis*, EDAX).

Mediante tale sistema per ciascuna particella sono stati determinati una serie di parametri morfologici, quali diametro di Feret, diametro minimo, diametro massimo, diametro equivalente, area, *aspect ratio* (14). Il vantaggio principale di tale sistema di analisi semiautomatica consiste nella possibilità di compiere un'analisi statistica significativa su una elevata quantità di dati morfologici ottenuti dall'analisi delle singole particelle. È stata utilizzata una tensione di accelerazione del fascio di elettroni incidenti pari a 15 KV, un ingrandimento pari a 15000x e sono stati analizzati più di 10 campi, ciascuno di dimensioni pari a 19,4 μm x 14,9 μm . Per ciascun campione sono state analizzate più di 1200 particelle.

1.3.1. Dimensione primaria e forma delle singole particelle

Per ciascun tipo di materiale in esame sono state determinate la dimensione primaria e la forma delle singole particelle (Tabella 2), mediante l'analisi morfologica TEM e la valutazione SEM del parametro morfologico *aspect ratio*, definito come il rapporto tra la lunghezza e la larghezza della particella.

Tabella 2. Caratterizzazione mediante TEM/SEM delle particelle di TiO₂ as received

Particelle di TiO ₂	Dimensione primaria (nm)	Diametro			<i>Aspect ratio</i>	Concentrazione numero particelle (part/g)	Area di superficie specifica (m ² /g)
		<i>minimo</i> (nm)	<i>massimo</i> (μm)	<i>medio</i> (nm)			
rutile <100 nm	30×100	50	2,73	283	2-8	4,13×10 ¹²	1,04
anatase <25 nm	20-60	70	2,13	328	1-6	1,32×10 ¹³	4,45
misto anatase/rutile <100 nm	46-262	40	2,45	303	1-12	5,87×10 ¹¹	0,17
rutile <5 μm	50-3000	50	6,52	687	1-14	1,26×10 ¹¹	0,19
anatase	50-270	50	2,10	260	1-12	7,03×10 ¹¹	0,15

Le NP di rutile presentano prevalentemente la forma di barretta, con una larghezza media di 30 nm e una lunghezza di 100 nm. Occasionalmente si osservano NP approssimativamente sferiche aventi un diametro di 70 nm. L'*aspect ratio* delle NP di rutile è compreso tra valori vicini a 1 e 8. Solo lo 0,6% delle particelle analizzate presenta un *aspect ratio* vicino a 1 (particelle approssimativamente sferiche) e il 4,4% delle particelle presenta la forma a barretta (*aspect ratio* compreso tra 2 e 3) e una dimensione esterna compresa tra 50 nm e 100 nm.

Le NP di anatase presentano due distinte morfologie: forma sferica con una dimensione primaria compresa tra 20 nm e 60 nm e forma irregolare con una lunghezza media pari a circa

60 nm e una larghezza media di circa 40 nm. L'*aspect ratio* delle NP di anatase è compreso tra valori vicini a 1 e 6. Il 34% delle particelle analizzate presenta un *aspect ratio* vicino a 1 (particelle approssimativamente sferiche), il 47% sono particelle irregolari aventi un *aspect ratio* compreso tra 1,5 e 2. Solo 1,2% delle particelle analizzate presenta un *aspect ratio* vicino a 1 e un diametro medio inferiore ai 100 nm.

Le NP misto anatase/rutile presentano tre distinte morfologie: forma sferica con una dimensione primaria compresa tra 46 nm e 56 nm, forma irregolare con un diametro medio compreso tra 88 nm e 192 nm e forma a barretta con una lunghezza compresa tra 82 nm e 262 nm e una larghezza tra 53 nm e 83 nm. L'*aspect ratio* delle NP misto anatase/rutile è compreso tra valori vicini a 1 e 12. Il 7,4% delle particelle analizzate sono approssimativamente sferiche (*aspect ratio* vicino a 1), l'8,9% presenta un *aspect ratio* compreso tra 1,3 e 1,5 (particelle irregolari), e il 44,9% una forma a barretta con *aspect ratio* compreso tra 1,5 e 3 e una lunghezza compresa tra 50 nm e 240 nm.

Le particelle di rutile mostrano tre morfologie principali: una quasi esagonale di dimensioni comprese tra 400 nm e 600 nm, la seconda cubica con dimensioni comprese tra 300 nm e 1,5 μm , la terza irregolare con dimensioni comprese tra 300 nm e 3 μm . L'*aspect ratio* di queste particelle varia tra valori vicini a 1 e 14.

Le particelle di anatase assumono tre morfologie principali: forma cubica di dimensioni comprese tra 87 nm e 238 nm, forma sferica con un diametro compreso tra 65 nm e 200 nm e forma irregolare con un diametro medio compreso tra 190 nm e 270 nm. L'*aspect ratio* è risultato compreso tra valori vicini a 1 e 12. Una percentuale pari a 8,3% delle particelle analizzate presenta valori di *aspect ratio* prossimi a 1 e un diametro medio compreso tra 70 nm e 240 nm (particelle quasi sferiche o cubiche).

1.3.2. Distribuzione dimensionale

Per ciascun tipo di materiale in esame è stata valutata la distribuzione dimensionale delle particelle sia come ricevute dal fornitore, sia sospese nei terreni di coltura utilizzati per i test biologici (vedi Tabella 2, e Tabelle 3 e 4).

Sebbene la EM non sia in grado di descrivere il comportamento idrodinamico delle particelle nei mezzi biologici utilizzati, essa può comunque fornire delle indicazioni su possibili variazioni dello stato di agglomerazione nei vari mezzi.

Tabella 3. Caratterizzazione mediante TEM/SEM delle particelle di TiO₂ in DMEM

Particelle di TiO ₂	Diametro			Concentrazione numero particelle (part/g)	Area di superficie specifica (m ² /g)
	minimo (nm)	massimo (μm)	medio (nm)		
rutile <100 nm	50	1,21	175	$1,13 \times 10^{13}$	1,09
anatase <25 nm	70	1,81	329	$7,04 \times 10^{12}$	2,39
misto anatase/rutile <100 nm	40	1,89	229	$1,15 \times 10^{13}$	1,90
rutile <5 μm	70	3,96	738	$8,43 \times 10^{11}$	1,44
anatase	70	1,86	359	$3,17 \times 10^{12}$	1,28

Tabella 4. Caratterizzazione mediante TEM/SEM delle particelle di TiO₂ in RPMI

Particelle di TiO ₂	Diametro			Concentrazione numero particelle (part/g)	Area di superficie specifica (m ² /g)
	minimo (nm)	massimo (µm)	medio (nm)		
rutile <100 nm	30	3,34	226	3,94×10 ¹³	6,30
anatase <25 nm	50	1,57	210	1,16×10 ¹³	1,60
misto anatase/rutile <100 nm	40	3,01	328	9,73×10 ¹²	3,29
rutile <5 µm	34	8,06	413	4,25×10 ¹²	2,27
anatase	70	4,82	658	3,78×10 ¹²	5,15

Le NP di rutile *as received* presentano uno spettro granulometrico compreso tra 50 nm e 2,73 µm, con un valor medio pari a 283 nm. Le stesse particelle sospese in DMEM presentano uno spettro compreso tra 50 nm e 1,21 µm con valor medio pari a 175 nm, mentre in RPMI il diametro delle particelle raggiunge un valor medio pari a 226 nm e risulta compreso tra 30 nm e 3,34 µm.

Le NP di anatase *as received* presentano uno spettro granulometrico compreso tra 70 nm e 2,13 µm, con un valor medio di 328 nm. Lo spettro granulometrico per le NP sospese in DMEM risulta compreso tra 70 nm e 1,81 µm, e valor medio pari a 329 nm; per le NP sospese in RPMI esso è compreso tra 70 nm e 1,57 µm e il valor medio è pari a 210 nm.

Anche le NP misto anatase/rutile *as received* presentano uno spettro granulometrico esteso, compreso tra 40 nm e 2,45 µm, con un valor medio pari a 303 nm. Per le NP sospese in DMEM lo spettro è risultato compreso tra 40 nm e 1,89 µm e il valor medio è risultato pari a 229 nm. Lo spettro delle NP sospese in RPMI è risultato simile a quello delle particelle *as received*, con un valor medio pari a 328 nm.

Le particelle di rutile *as received* mostrano una distribuzione compresa tra 50 nm e 6,62 µm con un valor medio pari a 687 nm. Le particelle formano grandi agglomerati quando sono sospese nei mezzi di coltura e mostrano uno spettro granulometrico tra 70 e 3,96 µm con un diametro medio di 738 nm in DMEM e tra 34 nm e 8,06 µm in RPMI e un diametro medio di 413 nm.

Le particelle di anatase *as received* mostrano un diametro compresa tra 50 nm e 2,10 µm con un valor medio pari a 260 nm. Le particelle sospese in DMEM presentano una distribuzione compresa tra 70 nm e 1,86 µm con valor medio pari a 359 nm; la sospensione di particelle in RPMI presenta grandi agglomerati e un più ampio spettro granulometrico compreso tra 70 e 4,82 µm con un diametro medio pari a 658 nm.

1.3.3. Stato di agglomerazione delle NP

Al fine di valutare lo stato di agglomerazione di ciascun tipo di NP nei due mezzi di coltura utilizzati nei saggi *in vitro* è stato determinato il numero di particelle in ciascun intervallo di 100 nm dello spettro granulometrico.

Nelle Figure 1, 2, 3 sono riportate le distribuzioni ottenute per ciascun tipo di particella nei due differenti mezzi di sospensione.

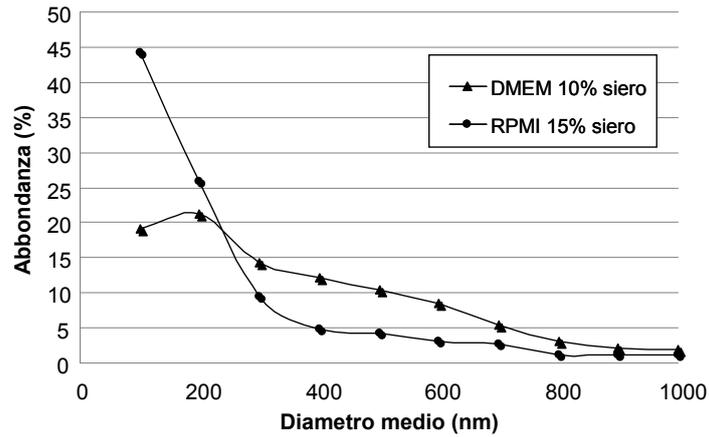


Figura 1. Distribuzione dimensionale delle NP di anatase sospese nei mezzi di coltura utilizzati nei saggi *in vitro*

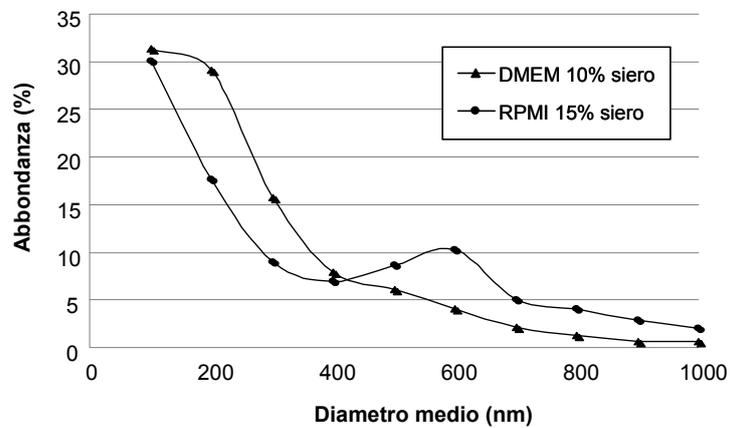


Figura 2. Distribuzione dimensionale delle NP misto anatase/rutile sospese nei mezzi di coltura utilizzati nei saggi *in vitro*

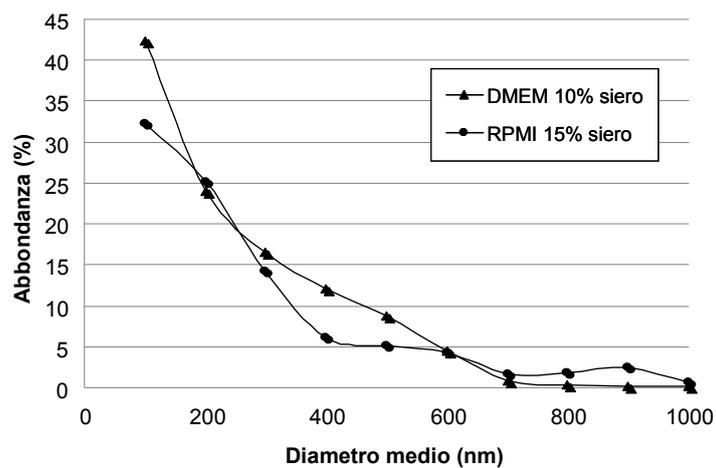


Figura 3. Distribuzione dimensionale delle NP di rutile nei mezzi di coltura utilizzati nei saggi *in vitro*

Le distribuzioni ottenute sembrano indicare uno stato di agglomerazione delle NP differente nei mezzi di sospensione utilizzati e un differente comportamento delle NP nei due mezzi di coltura utilizzati.

Le NP di anatase sembrano mostrare una minore agglomerazione nel mezzo di coltura RPMI con il 15% di FBS, rispetto al mezzo DMEM con il 10% di FBS (il 44,3% delle NP di anatase analizzate hanno un diametro medio <100 nm quando sono sospese in RPMI, contro il 19,1% osservato per le NP sospese in DMEM) (*vedi* Figura 1).

Le NP di rutile sembrano invece mostrare una minore agglomerazione nel mezzo di coltura DMEM con il 10% di FBS (il 42,3% delle NP di rutile analizzate hanno un diametro medio <100 nm quando sono sospese in DMEM, contro il 32,3% determinato per le NP sospese in RPMI) (*vedi* Figura 3).

Le NP misto anatase/rutile non mostrano differenze significative nei due mezzi di coltura utilizzati e i dati sembrano suggerire, nel complesso, un comportamento intermedio di queste NP rispetto alle NP di anatase e di rutile (*vedi* Figura 2).

1.3.4. Area di superficie specifica

Per ciascuna delle particelle in esame è stata valutata l'area di superficie specifica.

Essa è stata stimata elaborando i dati ottenuti dall'analisi morfologica mediante EM. Noti il volume della sospensione trasferito sul filtro, le aree del filtro esposto e il numero totale dei campi di osservazione al SEM, è stata determinata la concentrazione numero di particelle, espressa in particelle/g.

Dalla distribuzione dimensionale ottenuta è stata valutata la percentuale di particelle presenti in intervalli granulometrici aventi ciascuno un'ampiezza di 100 nm. È stato quindi determinato il diametro medio delle particelle appartenenti a ciascuno di questi intervalli granulometrici. Infine è stata calcolata l'area di superficie assumendo che le particelle fossero sferiche.

Nelle Tabelle 2-4 sono riportati i valori ottenuti per tutte le particelle studiate, sia *as received* che nei mezzi utilizzati nei test biologici. Osservando tali tabelle è evidente che la stima dell'area di superficie specifica ottenuta mediante EM differisce in maniera significativa dai valori riportati dal fornitore e ottenuti mediante la tecnica BET. Tale differenza è dovuta all'assunzione fatta sulla forma sferica delle particelle per il calcolo dell'area di superficie e all'elevato stato di aggregazione delle particelle, per cui l'area di superficie risultante è significativamente più piccola della somma delle aree delle singole particelle. La forma irregolare o non perfettamente sferica o a bastoncino delle particelle in esame e infine il loro stato di aggregazione costituiscono i principali limiti di tale tipo di approccio nella valutazione dell'area di superficie mediante EM.

2. VALUTAZIONE DELLA CITOTOSSICITÀ DELLE PARTICELLE DI BISSIDO DI TITANIO

La valutazione della citotossicità delle particelle di TiO_2 precedentemente caratterizzate è stata effettuata tramite NRU, sulla linea cellulare di fibroblasti di topo Balb/3T3 clone A31, proveniente dalla *Systems Toxicology Unit* della *European Commission, DG Joint Research Centre (JRC) Institute for Health and Consumer Protection (IHCP)*. La creazione di strategie integrate di saggi per sostituire l'uso degli animali nella tossicità acuta orale è stata negli ultimi anni oggetto di numerosi e articolati studi (es. il progetto EU-FP6 AcuteTox, www.acutox.org). In particolare il saggio 3T3/NRU è stato ritenuto idoneo quale primo livello di una strategia a tappe per l'identificazione di sostanze non classificate aventi una $\text{LD}_{50} > 2000$ mg/kg (9) e approvato dallo *European Reference Laboratory for Alternatives to Animal Testing (EURL-ECVAM)*, precedentemente noto come *European Centre for the Validation of Alternative Methods (ECVAM)*, per lo screening della tossicità acuta delle sostanze chimiche (15). Nelle sostanze utilizzate per la messa a punto del saggio non erano presenti NM, conseguentemente l'applicabilità di questo test a sostanze in nanoforma deve essere valutata caso per caso.

L'NRU è un saggio colorimetrico comunemente utilizzato per la valutazione della citotossicità. È basato sulla capacità delle cellule di trattenere coloranti vitali in condizioni di integrità delle membrane; in particolare il rosso neutro viene protonato e accumulato all'interno dei lisosomi delle cellule integre ma velocemente rilasciato quando i lisosomi sono danneggiati. Il protocollo di saggio prevede il trattamento con le particelle delle cellule coltivate su piastre da 96 pozzetti con le particelle disperse nel mezzo di coltura (generalmente 24-48 ore). Dopo rimozione delle particelle il monostrato cellulare è incubato per 3 ore con la soluzione di colorante e successivamente estratto con una miscela 1:1 di alcol etilico e H_2O . La quantità di colorante rilasciato dalle cellule, direttamente proporzionale al numero di cellule presenti, è determinata mediante lettura spettrofotometrica con un lettore ELISA (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*).

Inizialmente sono state definite le condizioni ottimali di coltura e di piastramento della linea cellulare Balb/3T3, sia per il mantenimento di routine sia per la determinazione della citotossicità. Le modalità per il mantenimento in coltura sono riportate nell'Appendice A. È stata, successivamente, determinata la curva dose-risposta del Sodio Lauril Solfato (SLS), utilizzato come controllo positivo nel saggio (Figura 4).

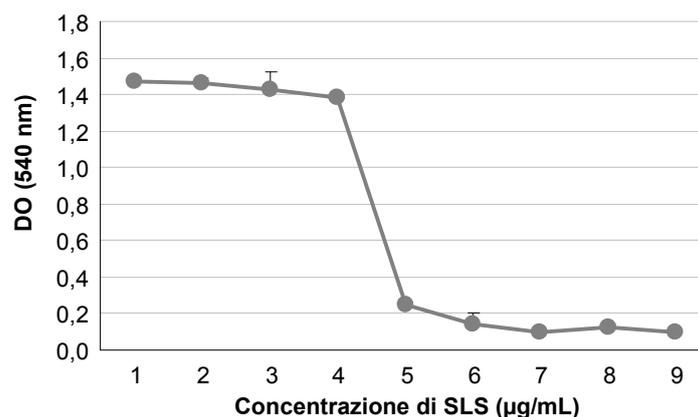


Figura 4. Curva dose-risposta del controllo positivo SLS determinata con il saggio NRU: i dati (espressi come Densità Ottica, DO) sono la media \pm DS (Deviazione Standard) di un esperimento eseguito in triplicato

Per ogni particella, risospesa in mezzo di coltura contenente il 10% di FBS sono state saggiate 4 diverse concentrazioni, selezionate sulla base delle evidenze riportate in letteratura: 12.5-25-50-100 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$. Il trattamento, eseguito su piastre da 96 pozzetti, ha avuto una durata di 48 ore al termine delle quali il monostrato cellulare è stato processato per il saggio del NRU. Tutti i trattamenti sono stati eseguiti in modo da limitare al massimo l'esposizione diretta alla luce della sospensione contenente TiO_2 . Il protocollo utilizzato per il saggio del NRU è riportato in Appendice B.

Per verificare l'eventuale interferenza sperimentale delle particelle con le procedure di saggio, parallelamente al trattamento delle cellule è stato anche eseguito il trattamento di pozzetti privi di cellule; questi sono poi stati incubati e processati in maniera del tutto analoga ai pozzetti contenenti le cellule.

La preparazione della sospensione micro e nanoparticellare è stata effettuata pesando con una bilancia analitica (Mettler H54 AR) la quantità di particelle corrispondente a ciascun punto sperimentale. Immediatamente prima del trattamento le particelle di TiO_2 (precedentemente sospese in alcol etilico e portate a secco overnight in stufa) erano risospese in DMEM e sonicate (42 kHz) per 45 minuti a 37°C .

Particolare cura è stata posta nel proteggere dalla luce i tubi contenenti le particelle di TiO_2 durante il processo di preparazione della sospensione.

Notevoli difficoltà sono state riscontrate nel risospingere le particelle, sia in forma micro sia in forma nano, soprattutto alle due concentrazioni più alte.

I risultati della citotossicità delle NP di TiO_2 nelle forme cristalline anatase e rutilo sono riportati in Figura 5 e 6: sia per l'anatase che per il rutilo, in entrambe le dimensioni particellari, nessuna delle concentrazioni testate è risultata tossica. Al contrario, si è osservato un aumento delle letture dose dipendente probabilmente correlato alla deposizione delle particelle sulle cellule, fenomeno confermato dall'osservazione al microscopio ottico; le particelle rimanevano fortemente adese al monostrato cellulare anche nelle successive fasi di lavaggio con tampone fosfato e di incubazione con il rosso neutro.

L'interferenza delle particelle con la determinazione spettrofotometrica è stata evidenziata dalle letture dei pozzetti privi di cellule trattati con le NP e processati come quelli contenenti le cellule (Figure 7 e 8).

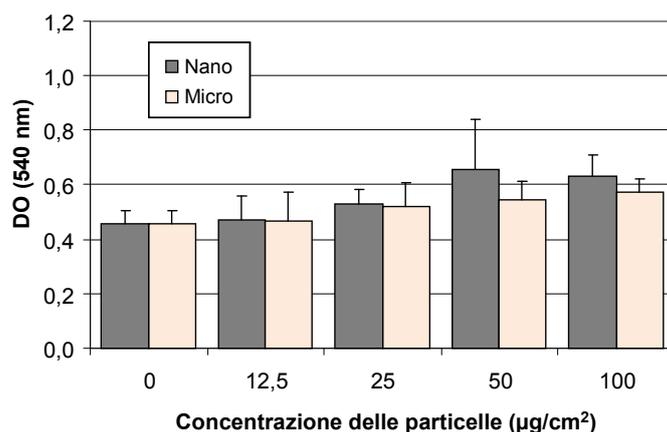


Figura 5. Saggio NRU, su piastre da 96 pozzetti, su fibroblasti Balb/3T3 trattati con diverse concentrazioni di micro e NP di TiO_2 anatase: i dati (espressi come DO) sono la media \pm DS di tre esperimenti eseguiti in sestuplicato

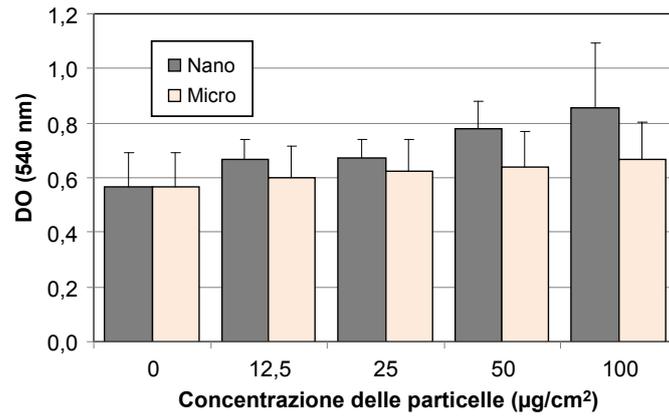


Figura 6. Saggio NRU su piastre da 96 pozzetti, su fibroblasti Balb/3T3 trattati con diverse concentrazioni di micro e NP di TiO₂ rutile: i dati (espressi come DO) sono la media di tre esperimenti ± DS eseguiti in sestuplicato

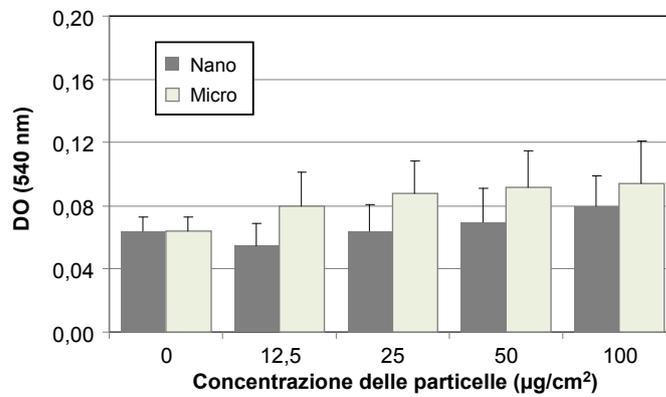


Figura 7. Saggio NRU eseguito su pozzetti privi di cellule, trattati con diverse concentrazioni di particelle di TiO₂ anatase: i dati (espressi come DO) sono la media di tre esperimenti ± DS eseguiti in sestuplicato

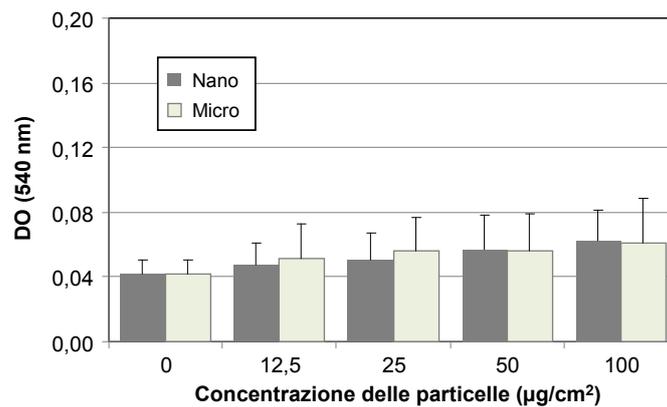


Figura 8. Saggio NRU eseguito su pozzetti privi di cellule, trattati con diverse concentrazioni di particelle di TiO₂ rutile: i dati (espressi come DO) sono la media di tre esperimenti ± DS eseguiti in sestuplicato

La valutazione della citotossicità delle NP misto anatase/rutile (Figura 9) ha confermato i risultati ottenuti con le forme cristalline rutile e anatase; nessuna tossicità anche alle concentrazioni più alte e aumento dose dipendente dei valori di assorbanza, probabilmente correlato alla forte adesione delle NP al monostrato cellulare.

L'adesione delle NP sul fondo dei pozzetti era evidente anche in assenza di cellule, come confermato dall'aumento dose dipendente della densità ottica nei pozzetti privi di cellule ma trattati con le NP (Figura 10). L'aumento rispetto al controllo negativo (mezzo di coltura) era superiore ai limiti di accettabilità del saggio, che fissano a un massimo del 15% la differenza tra assorbanza del mezzo e assorbanza del mezzo contenente la sostanza chimica e/o le particelle.

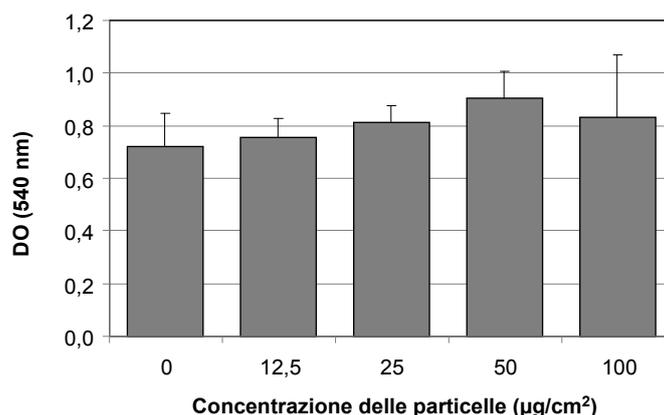


Figura 9. Saggio NRU su piastra da 96 pozzetti, su fibroblasti Balb/3T3 trattati con diverse concentrazioni di NP di TiO₂ misto anatase/rutile: i dati (espressi come DO) sono la media di due esperimenti ± DS eseguiti in sestuplicato

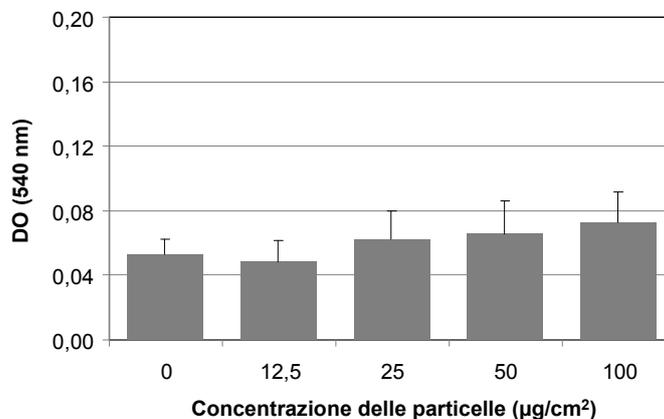


Figura 10. Saggio NRU su pozzetti privi di cellule, trattati con diverse concentrazioni di NP di TiO₂ misto anatase/rutile: i dati (espressi come DO) sono la media di due esperimenti ± DS eseguiti in sestuplicato

Per verificare se la conformazione e le dimensioni delle piastre da 96 pozzetti influenzavano o meno l'adesione delle particelle di TiO₂, il saggio è stato eseguito anche sulle piastre da 24 pozzetti utilizzando le NP misto anatase/rutile. In generale, i risultati di citotossicità ottenuti su

questi supporti, sembrano più riproducibili e meno variabili (Figura 11), almeno per quanto riguarda questa forma cristallina di NP, ma non confermano il coinvolgimento del supporto di coltura; infatti, come riportato in Figura 12, nel trattamento in assenza di cellule, si è osservato un aumento dose dipendente dell'assorbanza, anche se meno marcato rispetto a quello riportato per le piastre da 96 pozzetti.

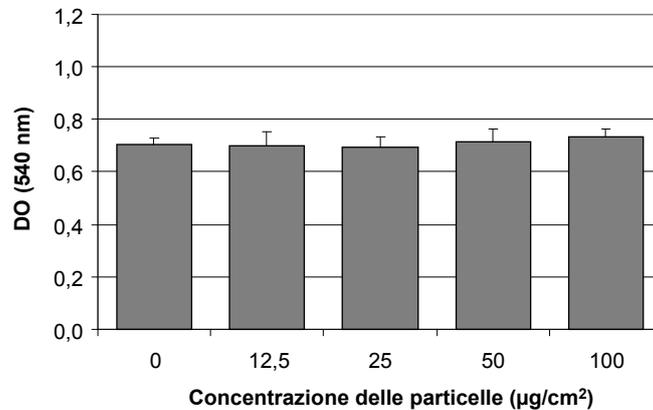


Figura 11. Saggio NRU su piastra da 24 pozzetti, su fibroblasti Balb/3T3 trattati con NP di TiO₂ misto anatase/rutile: i dati (espressi come DO) sono la media di due esperimenti ± DS eseguiti in triplicato

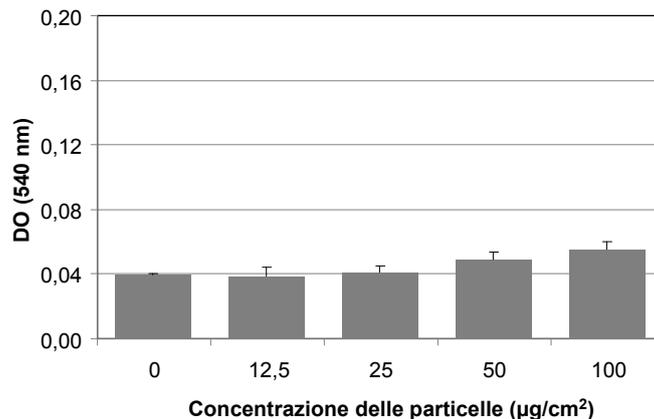


Figura 12. Saggio NRU su piastra da 24 pozzetti privi di cellule, trattati con diverse concentrazioni di NP di TiO₂ misto anatase/rutile: i dati (espressi come DO) sono la media di due esperimenti ± DS eseguiti in triplicato

Dall'insieme dei risultati di citotossicità ottenuti con il saggio NRU su 5 diverse particelle di TiO₂ (anatase micro e nano, rutile micro e nano, misto anatase/rutile nano) è possibile estrapolare i seguenti punti:

- il protocollo sperimentale effettuato secondo le procedure operative standard definite da EURL-ECVAM non ha presentato particolari problemi tecnici di esecuzione, dimostrandosi adatto a saggiare la citotossicità di NP;

- rappresenta un punto di criticità e di variabilità la sospensione delle particelle nel mezzo di coltura, soprattutto ad alte concentrazioni;
- nessuna delle particelle di TiO₂ saggate ha dato una riduzione di vitalità maggiore del 10% rispetto al controllo negativo (cellule non trattate) a nessuna delle concentrazioni utilizzate;
- l'interferenza dei controlli delle particelle con il sistema di saggio è stata superiore ai limiti di accettabilità previsti dal protocollo di saggio. Tranne che per la concentrazione più bassa (12,5 µg/cm²) la differenza tra il mezzo privo di particelle e quello contenente le particelle era superiore alla soglia del 15%, raggiungendo alle concentrazioni più alte, soprattutto nella forma micro, valori superiori al 40%. Anche nei pozzetti da 24 l'interferenza ha superato il 15% alle concentrazioni di 25, 50 e 100 µg/cm².

3. VALUTAZIONE DELLA GENOTOSSICITÀ DELLE PARTICELLE DI BLOSSIDO DI TITANIO

Il modello sperimentale utilizzato per la valutazione degli effetti genotossici delle particelle di TiO₂ è rappresentato da cellule mononucleate di sangue periferico (*Peripheral Blood Mononuclear Cells*, PBMC), isolate da sacche di sangue ottenute dal centro trasfusionale e criopreservate in azoto liquido in aliquote di circa 20x10⁶ cellule.

3.1. Test del micronucleo

Il test del micronucleo è stato eseguito su linfociti umani dopo stimolazione della proliferazione delle PBMC criopreservati. È stata seguita la linea guida OECD 487 con alcune modifiche nelle modalità di trattamento che tengono conto delle peculiari caratteristiche delle particelle di TiO₂. Le condizioni ideali di congelamento, conservazione, scongelamento e coltura per l'esecuzione del saggio dei micronuclei sui linfociti umani criopreservati, sono state messe a punto in precedenza e riportate in Zijno *et al.* (16). I dettagli sperimentali sull'esecuzione del saggio sono riportati nel protocollo descritto in Appendice C.

Per l'esecuzione del test 1x10⁶ cellule sono state scongelate e sospese in 750 µL di mezzo di coltura (RPMI 1640 Gibco), contenenti il 15% di siero (FBS Hyclone) e il 2% di fitoemoagglutinina (HA 15, Remel) per stimolare la proliferazione linfocitaria. Per ogni punto sperimentale sono state preparate 2 colture parallele.

La preparazione della sospensione di particelle di TiO₂ è stata effettuata come da protocollo messo a punto precedentemente: il TiO₂ è stato sospeso immediatamente prima del trattamento in tubi di vetro a fondo tondo in RPMI alla concentrazione di 1,5 mg/mL. La sospensione è stata sonicata (42 kHz) per 45 minuti a 37°C.

Per il trattamento, al fine di tener conto della possibile interferenza sull'assorbimento delle particelle di TiO₂ prodotta dalla citocalasina B (Cit B), necessaria a bloccare la citochinesi e permettere la formazione di linfociti binucleati, è stato utilizzato un protocollo sperimentale che prevede due modalità di esposizione dei linfociti.

Nella *modalità A* i linfociti sono stati trattati con le particelle di TiO₂ 24 ore dopo la stimolazione con fitoemoagglutinina, dopo altre 20 ore è stata aggiunta la Cit B e dopo 28 ore i linfociti sono stati raccolti. Nella *modalità B* i linfociti sono stati trattati con le particelle di TiO₂ 43,5 ore dopo la stimolazione con fitoemoagglutinina, dopo 30 minuti è stata aggiunta la Cit B e dopo altre 28 ore i linfociti sono stati raccolti.

Le due modalità di trattamento sono schematizzate nella Figura 13.

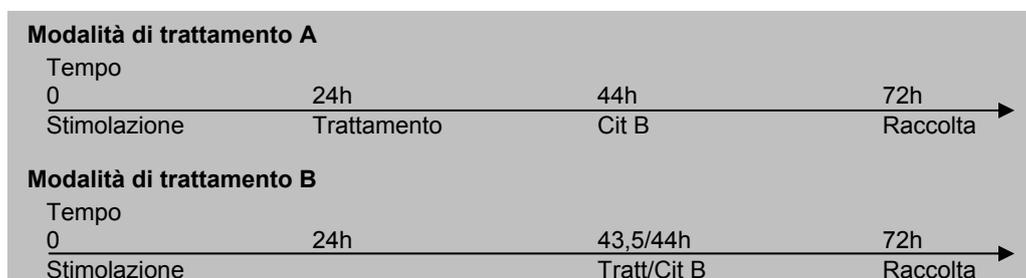


Figura 13. Protocollo sperimentale per il test del micronucleo nei linfociti

Sulla base di evidenze in letteratura sono state definite tre concentrazioni di trattamento: 50-100-200 µg/mL. La dose 200 µg/mL, anche se non ha prodotto un'evidente tossicità, è risultata la massima testabile, a causa dell'elevato numero di particelle depositato sui vetrini che rendeva difficoltosa l'analisi al microscopio ottico.

Come controllo positivo è stata utilizzata H₂O₂ che, come agente ossidante, ha un comportamento analogo al supposto meccanismo di tossicità delle particelle di TiO₂.

Ogni particella è stata saggiata in due esperimenti indipendenti utilizzando linfociti provenienti da due donatori differenti. Gli stessi donatori sono stati utilizzati per tutte le particelle saggiate. Al termine delle colture (2 colture parallele) i linfociti sono stati raccolti su vetrino (2 vetrini per coltura) mediante citocentrifuga, fissati in metanolo per 10 minuti e quindi colorati con Giemsa al 10% in tampone fosfato per circa 4 ore. I vetrini sono stati analizzati al microscopio ottico a 1000x. Sono state analizzate 250 binucleate per vetrino per un numero complessivo di 2000 binucleate per punto sperimentale (cellule per vetrino, 250; cellule per coltura, 500; cellule per esperimento, 1000; cellule per punto sperimentale, 2000).

La citotossicità è stata valutata mediante un indice di replicazione calcolato sulla frequenza di linfociti mononucleati, binucleati e multinucleati su 250 linfociti complessivi analizzati su ciascun vetrino come riportato nella formula sottostante:

$$RI = \frac{(n. \text{ cellule binucleate} + 2 \times n. \text{ cellule multinucleate})}{(n. \text{ cellule mononucleate} + n. \text{ cellule binucleate} + n. \text{ cellule multinucleate})}$$

I risultati degli esperimenti sono riportati nelle figure sottostanti.

Nella Figura 14a sono riportate le frequenze dei micronuclei dopo trattamento con le particelle nano e micro di TiO₂ anatase. Un aumento significativo di micronuclei è stato osservato solo dopo trattamento con 200 µg/mL di particelle micro di TiO₂ utilizzando la modalità di *trattamento B*. L'analisi al microscopio è risultata però condizionata dalla presenza delle particelle adese sopra il vetrino che, soprattutto alla dose massima, può aver influenzato l'osservazione. Per quanto riguarda la tossicità, valutata mediante l'indice di replicazione, nessuna delle due forme con entrambe le modalità di trattamento ha prodotto una chiara diminuzione della capacità proliferativa dei linfociti in coltura (Figura 14b). Esempi di binucleate di controllo e dopo trattamento con le particelle sono mostrati nella Figura 15.

Nella Figura 16 sono riportati i risultati degli esperimenti con le particelle nano e micro di TiO₂ rutilo. Come nel caso dell'anatase, è stato osservato un raddoppio significativo della frequenza di micronuclei solo con la forma micro utilizzando la *modalità B* alla dose di 50 µg/mL e un lieve aumento, non significativo, alla dose di 100 µg/mL. In questa condizione sperimentale si è inoltre osservata una leggera diminuzione della capacità proliferativa, superiore al 20% rispetto ai valori di controllo, dopo trattamento con 200 µg/mL.

Nella Figura 17 sono riportati i risultati degli esperimenti con le particelle di TiO₂ misto anatase/rutilo. Non si è osservato alcun evidente aumento della frequenza dei micronuclei con nessuna delle dosi testate e con entrambe le modalità di trattamento. Per quanto riguarda la capacità proliferativa non si è osservata alcuna diminuzione in tutte le condizioni sperimentali.

Riassumendo, gli incrementi della frequenza di micronuclei osservati sono di limitata entità, sono stati rilevati alla sola dose massima e in un solo esperimento (anatase micro) oppure senza una chiara relazione dose effetto (rutilo micro) e richiederebbero una ulteriore valutazione. Questi dati sono comunque in linea con quanto presente in letteratura, indicante aumenti di micronuclei di piccola entità non sempre riproducibili e probabilmente influenzati da condizioni sperimentali.

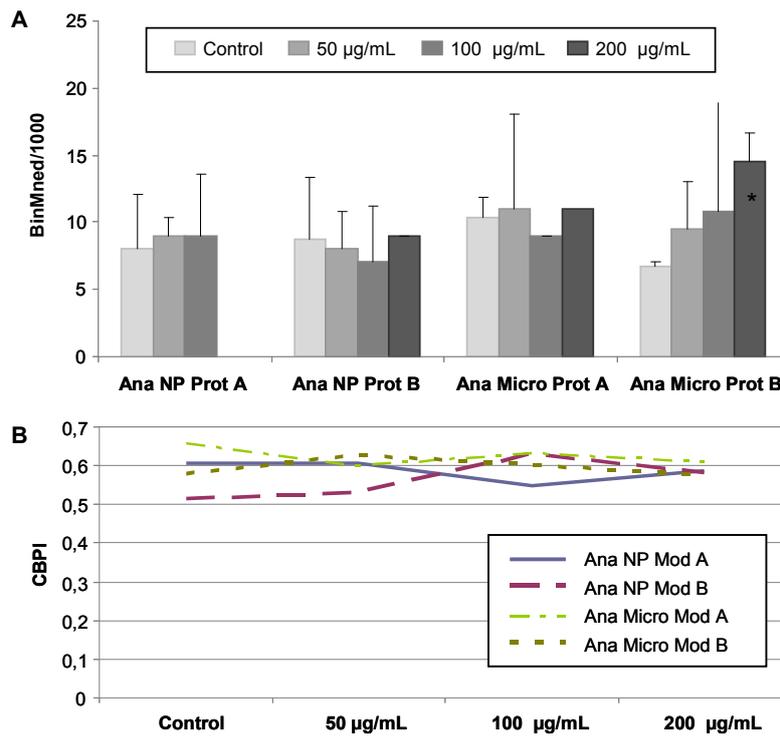


Figura 14. Effetti delle particelle di TiO₂ anatase sulla frequenza di binucleate con micronuclei (A) e sull'indice di proliferazione (B). Media di 2 esperimenti. *p<0,05 con test del chi quadrato

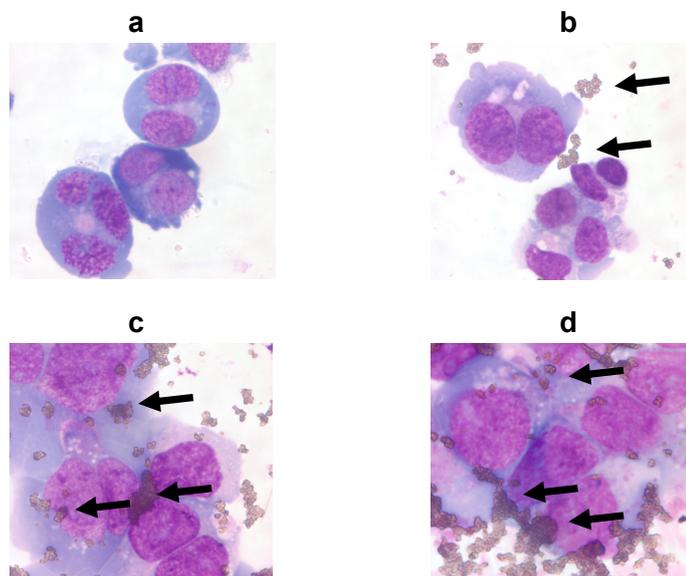


Figura 15. Esempi di linfociti binucleati di controllo (a) e trattati con 50 µg/mL (b), 100 µg/mL (c) e 200 µg/mL (d) di particelle di TiO₂ anatase (le frecce indicano alcune particelle presenti sui vetrini in numero crescente con la dose)

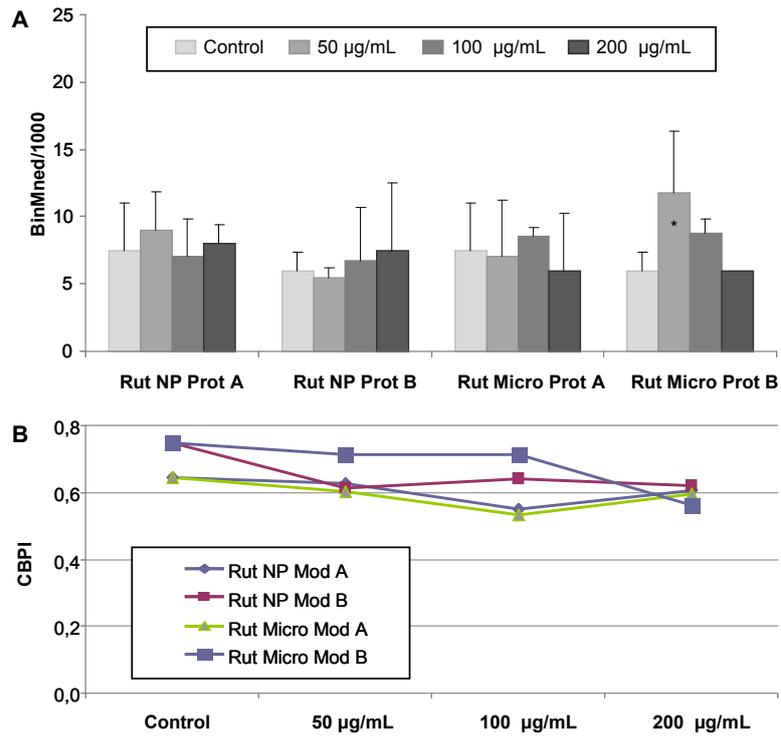


Figura 16. Effetti delle particelle di TiO₂ rutile sulla frequenza di binucleate con micronuclei (A) e sull'indice di proliferazione (B). Media di 2 esperimenti. *p<0,05 con test del chi quadrato

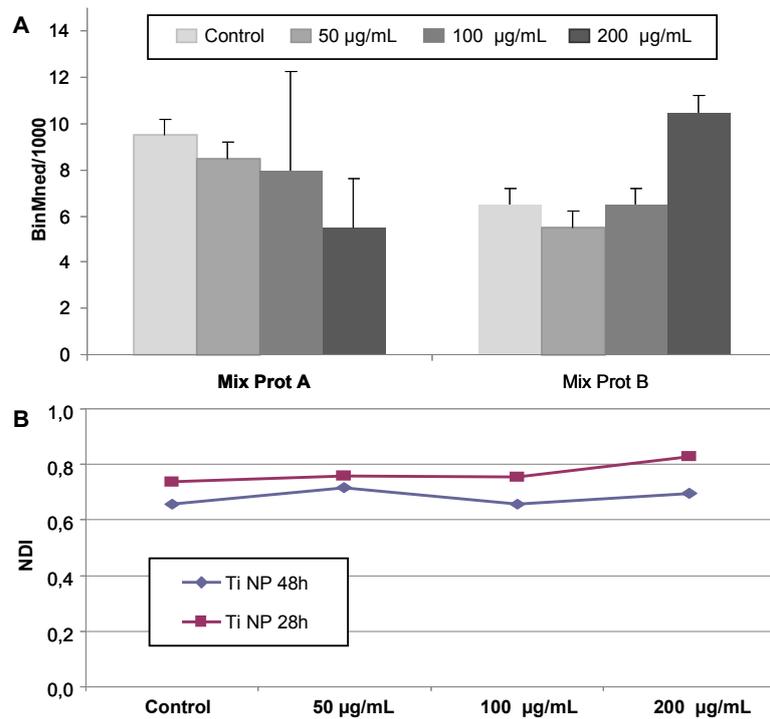


Figura 17. Effetti delle particelle di TiO₂ misto anatase/rutile sulla frequenza di binucleate con micronuclei (A) e sull'indice di proliferazione (B). Media di 2 esperimenti

Gli incrementi della frequenza di micronuclei sia con la forma anatase sia con la forma rutilica sono stati osservati solo dopo trattamenti con particelle dimensionali di tipo micro ed esclusivamente con la *modalità B* di trattamento, che farebbe pensare ad un comune meccanismo associato alle proprietà ossidanti del TiO_2 , più marcate nella forma micro che nella forma nano. Al riguardo si osserva un analogo comportamento del perossido di idrogeno, utilizzato come controllo positivo, in grado di produrre un ampio spettro di danno ossidativo sul DNA, che risulta più efficace nella *modalità B* rispetto alla *A* (Figura 18) sia per l'incremento della frequenza di micronuclei sia per ridurre la capacità proliferativa dei linfociti.

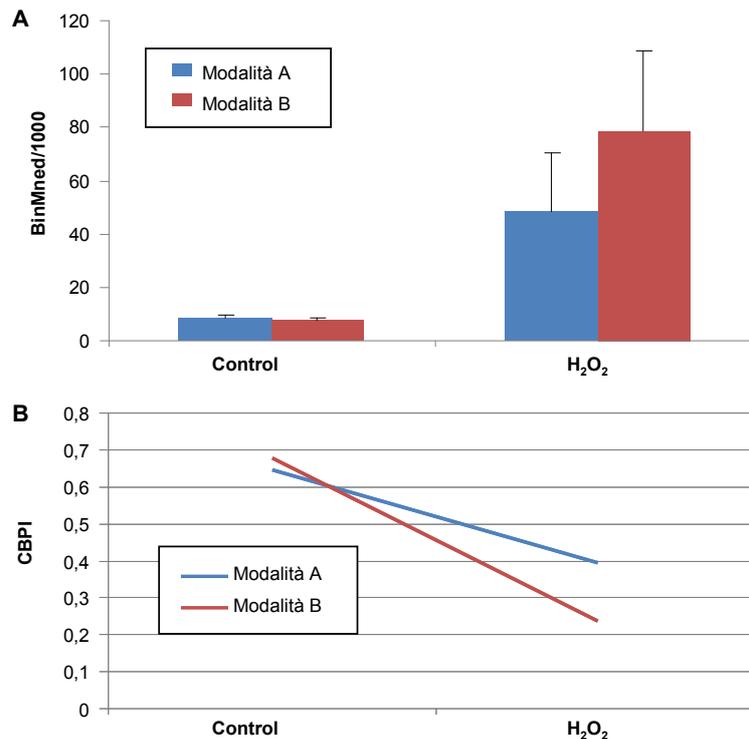


Figura 18. Effetti del perossido di idrogeno (H_2O_2) sulla frequenza di binucleate con micronuclei (A) e sull'indice di proliferazione (B). Media di 6 esperimenti.

3.2. Saggio della cometa

Per la valutazione del danno al DNA indotto dalle particelle di TiO_2 , nella forma anatase e rutilica sia nano che micro più un misto nanoparticellare delle due forme, sono stati eseguiti esperimenti utilizzando il test della cometa su PBMC.

Il test della cometa è stato condotto secondo il protocollo descritto in dettaglio in Andreoli *et al.* (17) e secondo le indicazioni del *Comet assay interest group* (<http://www.cometassay.com>).

Il test è stato eseguito in ambiente alcalino allo scopo di evidenziare rotture a singolo e doppio filamento lungo la doppia elica del DNA.

Il protocollo del saggio prevede l'inclusione del campione cellulare in esame, dopo il trattamento con le particelle di TiO_2 , in uno strato di gel di agarosio su un vetrino da microscopio. Le cellule così preparate vengono lisate, il DNA denaturato e quindi sottoposto ad

elettroforesi alcalina. Durante la corsa elettroforetica le rotture presenti sull'elica di DNA determinano la migrazione del DNA nel campo elettroforetico, facendo assumere alla struttura la forma di una cometa la cui lunghezza e intensità sono proporzionali al numero di rotture. La valutazione del danno presente sul DNA delle cellule trattate viene effettuata mediante il programma dedicato IAS2000 (Delta Sistemi sas), che fornisce parametri quantitativi di danno tra i quali il *tail length* (lunghezza della coda della cometa) e il *tail moment* (lunghezza della coda della cometa x l'intensità della fluorescenza).

La preparazione della sospensione di TiO₂ è stata effettuata come segue: le particelle di TiO₂ sono state sospese, immediatamente prima del trattamento, in tubi di vetro a fondo tondo in terreno di coltura, alla concentrazione di 1,5 mg/mL. I tubi sono stati messi a sonicare (42 kHz) per 45 minuti a 37°C.

Sulla base di evidenze di letteratura è stato definito un range di concentrazioni di trattamento di 10-400 µg/mL. La dose 200 µg/mL, anche se non ha prodotto una evidente tossicità, è risultata la massima testabile a causa dell'elevato numero di particelle depositato sui vetrini che interferiva con l'analisi delle comete al microscopio a fluorescenza. Pertanto le dosi testate sono state fissate in 10-50-100-200 µg/mL per 24 ore di trattamento.

Per la valutazione della vitalità cellulare è stato effettuato il test del Trypan Blu.

L'analisi del danno presente sul DNA dei PBMC umani è stata effettuata dopo trattamento con dosi crescenti di TiO₂ anatase (nano e microparticella), rutilo (nano e microparticella) e misto anatase/rutilo (solo nanoparticella) alle dosi 10-50-100-200 µg/mL per 24 ore.

Il test di vitalità, eseguito con il Trypan Blu, ha evidenziato che il 90% delle cellule erano vitali a tutte le dosi di trattamento con tutte le forme di TiO₂.

I risultati hanno evidenziato un debole ma significativo aumento della presenza di rotture a singolo e doppio filamento sul DNA, quantificate dai valori di *tail moment* e di *tail length*, soprattutto dopo i trattamenti con TiO₂ nanoparticellare.

In particolare, i risultati del trattamento con TiO₂ anatase (Figura 19), analizzati utilizzando le medie di 4 esperimenti indipendenti, hanno evidenziato un significativo aumento correlato alla dose dell'induzione di danno al DNA, maggiormente significativo dopo trattamento con TiO₂ anatase nanoparticellare piuttosto che microparticellare. Il TiO₂ anatase nanoparticella induce un danno significativo sin dalla dose più bassa tra quelle testate, mentre il TiO₂ anatase microparticella non induce un livello significativo di danno. I valori di *tail moment* (Figura 19a) e di *tail length* (Figura 19b) mostrano un quadro del tutto sovrapponibile.

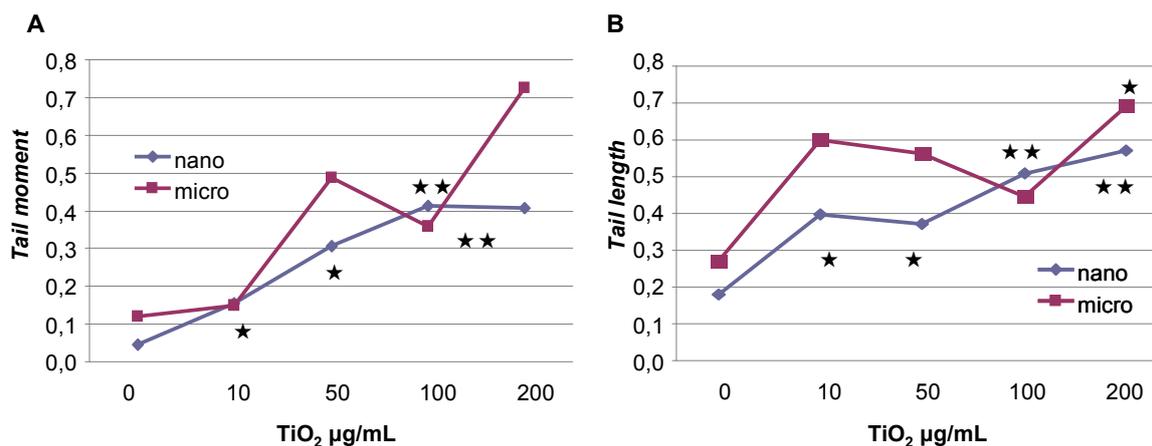


Figura 19. Valori di *tail moment* (A) e di *tail length* (B) dopo trattamento per 24 ore di PBMC umani con TiO₂ anatase nano e microparticellare. * p<0,05, **p<0,01 test del t-Student

Nella Tabella 5 sono riportate le medie e le Deviazioni Standard (DS) di ogni punto sperimentale.

Tabella 5. Valori di *tail moment* e *tail length* delle particelle nano e micro di TiO₂ anatase

TiO ₂ anatase µg/mL	<i>Tail moment</i>	DS	<i>Tail length</i>	DS
Nano				
0	0,05	±0,05	1,79	±1,30
10	0,16	±0,04	3,98	±1,21
50	0,31	±0,29	4,73	±2,32
100	0,41	±0,23	5,58	±1,57
200	0,41	±0,23	5,14	±1,52
Micro				
0	0,12	±0,15	2,72	±1,87
10	0,79	±0,91	6,00	±4,18
50	0,60	±0,16	5,63	±0,39
100	0,36	±0,19	4,46	±0,84
200	0,73	±0,29	6,91	±0,61

I risultati relativi al trattamento con TiO₂ rutilo (Figura 20), ottenuti dalle medie di 2 esperimenti indipendenti, hanno evidenziato un aumento correlato alle dosi dell'induzione di danno al DNA, significativo dopo trattamento con TiO₂ rutilo nanoparticellare, evidenziato maggiormente dalla misurazione del *tail length* piuttosto che del *tail moment*. Infatti, i risultati ci mostrano che il TiO₂ rutilo nanoparticella induce un danno significativo esclusivamente alle dosi 50 µg/mL se misurato con il *tail moment* (Figura 20a), e a tutte le dosi testate (tranne che a 100 µg/mL dove è ai limiti della significatività) se misurato con il *tail length* (Figura 20b).

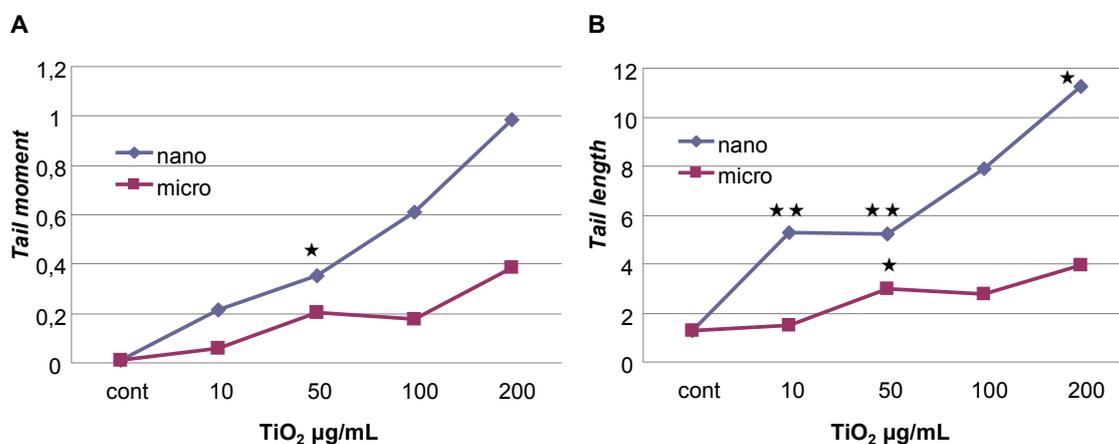


Figura 20. Valori di *tail moment* (A) e di *tail length* (B) dopo trattamento per 24 ore di PBMC umani con TiO₂ rutilo nano e microparticellare. * p<0,05, ** p<0,01 test del t-Student

I valori della deviazione standard delle misure di *tail moment* sono più alti rispetto a quelli di *tail length* (Tabella 6).

Tabella 6. Valori di *tail moment* e *tail length* delle particelle nano e micro di TiO₂ rutilo

TiO ₂ rutilo µg/mL	<i>Tail moment</i>	DS	<i>Tail length</i>	DS
Nano				
0	0,01	±0,01	1,27	±0,56
10	0,21	±0,10	5,27	±0,65
50	0,35	±0,14	5,23	±0,66
100	0,61	±0,44	7,87	±3,85
200	0,99	±0,62	11,26	±2,77
Micro				
0	0,01	0,01	1,27	±0,56
10	0,06	0,04	1,48	±0,26
50	0,20	0,13	2,96	±0,22
100	0,17	0,18	2,78	±0,86
200	0,38	0,28	3,95	±2,05

I risultati relativi del trattamento con TiO₂ misto anatase/rutilo sono riassunti in Figura 21 e ottenuti dalle medie di 2 esperimenti indipendenti.

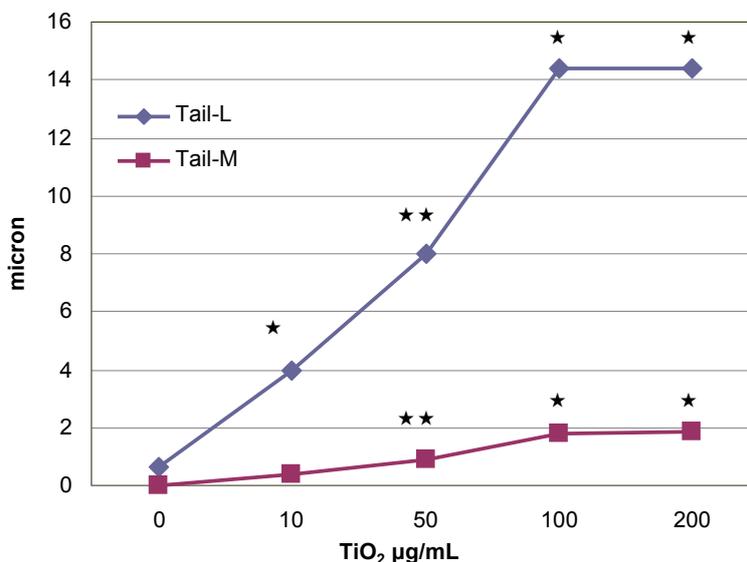


Figura 21. Valori di *tail moment* (Tail-M) e di *tail length* (Tail-L) dopo trattamento per 24 ore di PBMC umani con una miscela di TiO₂ anatase e rutilo. * p<0,05, ** p<0,01 test del t-Student.

L'analisi dei risultati ha evidenziato un aumento significativo, correlato alla dose, dell'induzione di danno al DNA dopo trattamento con TiO₂ misto anatase/rutilo a partire dalla dose più bassa, se misurato con il *tail length*, massimamente significativo alla dose 50 µg/mL con entrambi gli indicatori.

Nella Tabella 7 sono riassunti i dati relativi alle medie e alle deviazioni standard per ogni singolo punto sperimentale.

Tabella 7. Valori di *tail moment* e *tail length* delle nanoparticelle di TiO₂ misto anatase/rutile

TiO ₂ misto anatase/rutile µg/mL	<i>Tail moment</i>	DS	<i>Tail length</i>	DS
0	0,01	±0,01	0,62	±0,63
10	0,39	±0,22	3,98	±1,47
50	0,90	±0,16	8,01	±0,22
100	1,81	±0,55	14,40	±5,58
200	1,86	±0,78	14,38	±5,03

I risultati della valutazione dell'induzione del danno al DNA utilizzando il saggio della Cometa indicano che il TiO₂ causa un lieve ma significativo aumento delle rotture a singolo e doppio filamento sul DNA dei PBMC umani. Tale danno viene maggiormente evidenziato dalla misura del *tail length* piuttosto che da quella del *tail moment*.

Il TiO₂ nanoparticellare è generalmente più attivo del TiO₂ microparticellare e, tra le nanoparticelle, la forma anatase risulta la più efficace nel determinare un aumento del danno al DNA.

3.3. Danno ossidativo al DNA

L'analisi del danno ossidativo al DNA è stata effettuata determinando i livelli basali dell'8-oxodG tramite cromatografia liquida ad alta risoluzione con rivelatore elettro-chimico (HPLC/EC).

L'8-oxodG è una lesione altamente mutagena perché può dare facilmente origine a trasversioni G:C→T:A, che sono le mutazioni somatiche trovate più frequentemente in alcuni tipi di tumori. L'8-oxodG è quindi considerata il principale marker di ossidazione al DNA.

Lo *European Standards Committee on Oxidative DNA Damage* (ESCODD) sta valutando criticamente i metodi differenti che possono essere utilizzati per la misura dei livelli basali di questa base ossidata. Tra questi, l'HPLC/EC utilizza un approccio diretto, facendo uso di un metodo fisico-chimico per individuare la lesione nei campioni di DNA precedentemente estratto e idrolizzato, ed ha dimostrato di avere una buona riproducibilità inter-laboratorio soprattutto per le curve dose-risposta.

Brevemente, il protocollo sperimentale prevede l'estrazione del DNA tramite precipitazione ad alta concentrazione di sale (1,5 M NaCl) e successiva idrolisi enzimatica con RNase e proteinasi K, la separazione dell'8-oxodG con HPLC/EC (Beckman Coulter Inc., Brea, CA, USA) e l'analisi elettrochimica tramite un detector Coulochem II (ESA Inc., Chelmsford, MA, USA). La deossiguanosina (dG) viene misurata nello stesso *run* dell'8-oxodG e i risultati vengono espressi come numero di residui di 8-oxodG/10⁶ residui di dG. Come controllo positivo è stato utilizzato un noto agente ossidante, il KBrO₃ (20 mM per 30 minuti).

Sono stati effettuati esperimenti preliminari, per la messa a punto del metodo, trattando i linfociti umani con dosi crescenti di TiO₂ anatase in forma nano e micro (100-200-400 µg/mL) per 6 e 24 ore. I risultati ottenuti hanno evidenziato l'impossibilità di utilizzare dosi elevate di particelle poiché la presenza stessa delle particelle di TiO₂ rendeva l'estrazione del DNA particolarmente complicata e di scarsa attendibilità.

Si è deciso quindi di trattare i linfociti con 10-50-100-200 µg/mL di particelle di TiO₂ anatase (nano e micro), rutile (nano e micro) e misto anatase/rutile (solo nano) per 6 e 24 ore.

Nelle Figure 22, 23 e 24 sono riportati i risultati, come valori medi di due o tre esperimenti.

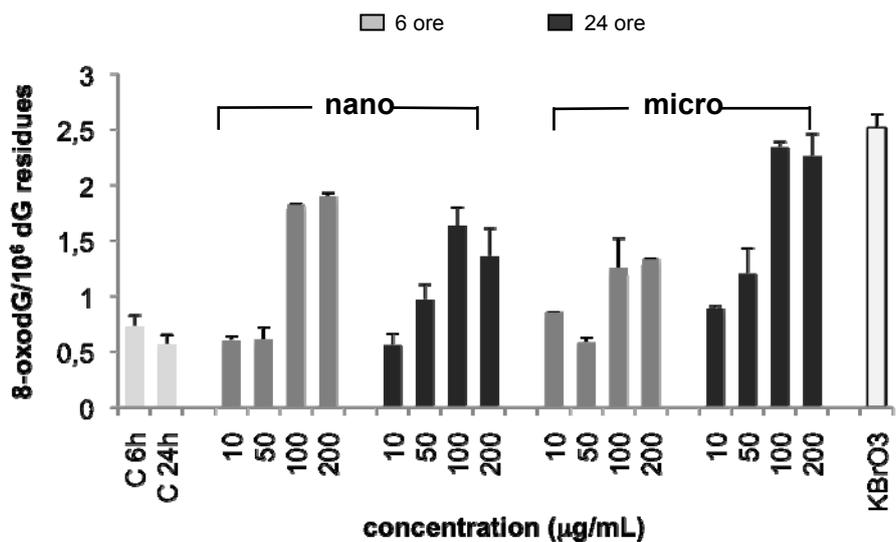


Figura 22. PARTICELLE di TiO₂ ANATASE (in forma nano e micro): livelli basali di 8-oxodG di linfociti trattati con 10-50-100-200 µg/mL per 6 e 24 ore (come controllo positivo le cellule sono state trattate con KBrO₃ 20 mM per 30 minuti)

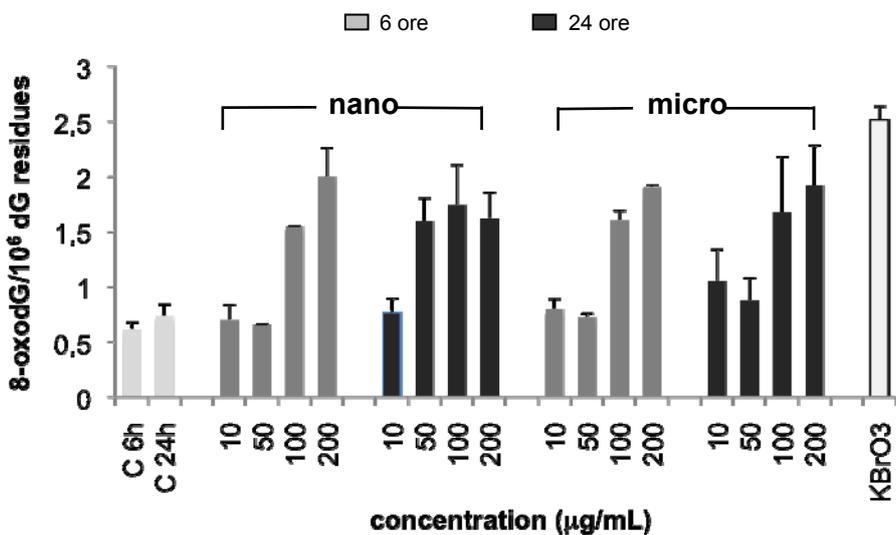


Figura 23. PARTICELLE di TiO₂ RUTILE (in forma nano e micro): livelli basali di 8-oxodG di linfociti trattati con 10-50-100-200 µg/mL per 6 e 24 ore (come controllo positivo le cellule sono state trattate con KBrO₃ 20 mM per 30 minuti)

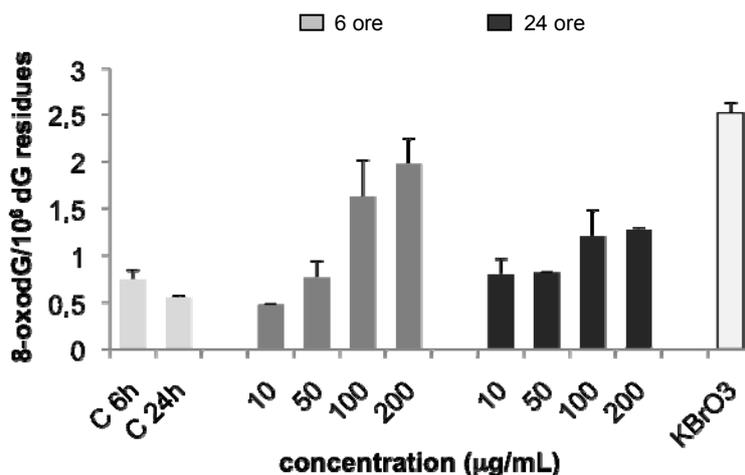


Figura 24. PARTICELLE di TiO₂ MISTO ANATASE/RUTILE:
 livelli basali di 8-oxodG di linfociti trattati con 10-50-100-200 µg/mL per 6 e 24 ore
 (come controllo positivo le cellule sono state trattate con KBrO₃ 20 mM per 30 minuti)

I risultati hanno evidenziato l'induzione di danno ossidativo al DNA nei linfociti trattati con il TiO₂ anatase e rutilo, in forma micro e nano (Figure 22 e 23). L'aumento dei livelli basali di 8-oxodG è evidente soprattutto alle due dosi di trattamento più elevate (100 e 200 µg/mL) e non sembra essere dipendente dal tempo di esposizione, tranne che nel caso del TiO₂ anatase in forma micro in cui i livelli di ossidazione al DNA, alle due dosi più alte, sono confrontabili con il controllo positivo.

Nel caso invece delle NP di TiO₂ misto anatase/rutilo l'induzione della base ossidata sembra particolarmente evidente solo dopo le 6 ore di trattamento con un andamento dose indipendente, mentre alle 24 ore i livelli di 8-oxodG sono leggermente aumentati rispetto al controllo solo alle due dosi più elevate.

Dal punto di vista della metodologia utilizzata, si può concludere che è possibile effettuare la misura di 8-oxodG tramite HPLC/EC per valutare l'induzione di danno ossidativo al DNA anche su cellule trattate con NP che non presentano una elevata citotossicità, ponendo però attenzione alla valutazione della dose massima a cui effettuare il trattamento per poter avere dei risultati riproducibili.

Infine, i risultati derivanti dall'analisi con il saggio della Cometa, insieme a quelli della rilevazione della presenza della base ossidata 8-oxodG dopo trattamento con TiO₂, indicano la possibilità di un prevalente meccanismo di tipo ossidativo nella induzione del danno al DNA da parte del TiO₂ nella forma nanoparticellare.

4. VALUTAZIONE CRITICA DEI DATI SPERIMENTALI OTTENUTI CON LE PARTICELLE DI TiO₂

4.1. Valutazione dei risultati ottenuti per la caratterizzazione mediante TEM/SEM

Nel quadro dell'implementazione regolatoria, l'ECHA e le Autorità Competenti degli Stati Membri sottolineano che l'applicazione di più tecniche per la caratterizzazione delle nanoforme (*multi-method approach*) è auspicabile per sopperire alle limitazioni dell'attuale approccio analitico e per consentire che i parametri chimico-fisici, riportati nei dossier di registrazione REACH, siano adeguati alla caratterizzazione delle nanoforme.

I registranti, in ottemperanza agli obblighi del Regolamento REACH e nello specifico dell'art. 13, devono fornire informazioni dettagliate sulla preparazione del campione, sul tipo di particelle (primarie, aggregate, agglomerate o in combinazione) e sul sistema di misura utilizzato per la distribuzione dimensionale.

Attualmente la caratterizzazione degli NM non si basa su metodi analitici standardizzati. In assenza di un unico metodo di riferimento per tutti i tipi di NM, i parametri per la caratterizzazione chimico-fisica delle NP di TiO₂ sono stati determinati utilizzando il set di metodi analitici (microscopia elettronica a trasmissione e a scansione) più rispondente alle caratteristiche delle particelle oggetto di studio.

L'analisi dei risultati ottenuti sulle particelle TiO₂ analizzate conferma che la TEM assicura una valutazione della dimensione e della forma delle particelle, differenziando le particelle primarie dagli agglomerati.

I dati analitici mostrano che anche la SEM consente una buona valutazione del diametro medio e della distribuzione dimensionale delle particelle.

Inoltre sebbene la SEM non sia il metodo idoneo per descrivere il comportamento idrodinamico delle NP, soprattutto nei mezzi biologici utilizzati nei test tossicologici, i nostri dati sembrano indicare un comportamento differente dei tre tipi di particelle di TiO₂ nelle sospensioni nei due differenti mezzi di coltura (DMEM e RPMI). Per valutare lo stato di agglomerazione delle NP nei mezzi di coltura la EM dovrebbe essere affiancata da altre tecniche, come per esempio la sedimentazione delle particelle per centrifugazione (*Differential Centrifugal Sedimentation*, DCS) e il *light scattering* dinamico (*Dynamic light scattering*, DLS) (18).

Infine i risultati ottenuti in tale studio hanno confermato le limitazioni delle caratteristiche strumentali del microscopio elettronico sia a scansione che a trasmissione nel fornire informazioni analitiche adeguate per la valutazione dell'area di superficie specifica. La principale limitazione è rappresentata dal fatto che tale caratteristica non è misurata direttamente ma ricavata tramite algoritmi a partire da approssimazioni sulla forma delle particelle.

Tuttavia i metodi comunemente utilizzati per la preparazione dei campioni per la EM, e descritti nei rapporti tecnici del WPMN dell'OECD, possono introdurre artefatti nella misura della distribuzione dimensionale.

In questo studio di caratterizzazione, a differenza delle indicazioni relative alla preparazione del campione contenute nella "Guidance on sample preparation and dosimetry for the safety testing of manufactured nanomaterials" dell'OECD (12), sono state utilizzate delle membrane di policarbonato con porosità di 50 nm che hanno portato ad una distribuzione più omogenea delle particelle, diminuito la formazione di artefatti e migliorato la determinazione delle singole

particelle. L'uso di tali membrane filtranti può però comportare la perdita di una frazione di particelle aventi dimensioni inferiori ai 50 nm. È quindi indispensabile determinare una stima della perdita di particelle in seguito alla filtrazione, recuperando l'eluato e trasferendolo ad esempio su wafer di silicio.

In definitiva, la EM fornisce informazioni utili sulla forma, dimensione primaria, distribuzione dimensionale e stato di agglomerazione delle NP ed è particolarmente idonea per la caratterizzazione di campioni contenenti una miscela di NP con forma e dimensioni differenti. Infatti la maggior parte delle tecniche disponibili non consente di determinare la forma delle NP e la mancanza di informazioni su questa caratteristica può portare ad una valutazione non corretta della dimensione.

La significatività delle misure ottenute tramite EM può essere ulteriormente aumentata con l'utilizzo di sistemi semi-automatici di analisi delle micrografie EM che consentono di determinare le distribuzioni numeriche della dimensione e la forma degli NM, partendo dai dati morfologici di elevati numeri di particelle, necessari per un'analisi statistica significativa dei risultati.

I principali svantaggi di questi sistemi sono la necessità di personale tecnico specializzato e la dipendenza dei risultati delle analisi dall'operatore che le effettua. È quindi necessario implementare opportuni protocolli per uniformare e standardizzare le procedure per la caratterizzazione delle NP mediante tali sistemi di analisi d'immagine.

Le informazioni fornite mediante EM, a partire dalla descrizione dell'identità della sostanza, consentono la riproduzione dei metodi di analisi come specificamente richiesto dall'Allegato VI (2.3.7) del REACH. Tuttavia è necessario implementare nuovi metodi per la preparazione dei campioni di NP per analisi mediante EM al fine di ridurre possibili artefatti che possono comportare una non corretta determinazione della distribuzione dimensionale delle stesse. Infine la sola tecnica analitica della EM non è in grado di fornire informazioni sul comportamento idrodinamico delle NP nei mezzi di coltura utilizzati nei test tossicologici. Si raccomanda quindi l'utilizzo di almeno due differenti tecniche per la valutazione delle caratteristiche chimico-fisiche delle NP.

4.2. Valutazione dei risultati ottenuti con il test di citotossicità

Dall'analisi dei risultati ottenuti utilizzando il saggio del NRU per testare la vitalità cellulare dopo esposizione a NP di TiO_2 , è evidente l'interferenza di queste NP con le procedure di saggio. Il protocollo sperimentale, effettuato secondo le procedure operative standard definite da EURL-ECVAM, ha presentato un'interferenza dei controlli delle particelle (sia in forma micro che nano) con il sistema di saggio, superiore ai limiti di accettabilità previsti dal protocollo stesso. Tale effetto sembra diminuire, contestualmente con una minore variabilità dei dati, se si utilizzano per il trattamento dei supporti da 24 pozzetti anziché le piastre da 96 pozzetti; la differenza tra i due supporti risiede in una maggiore superficie di coltura ($1,77 \text{ cm}^2$ contro $0,3 \text{ cm}^2$) e un maggior volume (800 mL contro 125 mL), condizioni che potrebbero favorire una migliore dispersione delle particelle nel mezzo di coltura e sulla superficie dei pozzetti. Tale effetto è stato però determinato per un solo tipo di NP (forma mista anatase-rutile) e andrebbe confermato con le altre particelle utilizzate nello studio. In letteratura è riportata l'interferenza osservata per diversi NM con molti dei saggi comunemente utilizzati per determinarne l'effetto tossico sulle cellule. A causa della loro grande area superficiale, le NP possono infatti legarsi ai

reagenti utilizzati nel saggio, incluso il substrato, e contribuire all'assorbimento o fluorescenza nei saggi colorimetrici o fluorimetrici (19, 20, 21).

L'appendice R7-1 della Linea Guida ECHA sugli obblighi di informazione e sulla valutazione della sicurezza chimica nel Regolamento REACH, recante raccomandazioni per NM riferite al capitolo R7a della Linea Guida (22), riporta una lista di potenziali fonti di interferenza con i saggi comunemente usati (23), tra i quali il saggio del NRU, nel quale i nanotubi di carbonio presentano interferenza nella lettura dell'assorbimento. I risultati ottenuti nel presente studio mostrano chiaramente come anche le NP di TiO₂ determinino questo effetto.

Tra le raccomandazioni citate nella stessa appendice si consiglia l'uso del metodo del *sample spikes* (aggiunta di una quantità nota di campione di controllo al campione di test) per valutare l'inibizione o l'aumento dell'effetto del controllo aggiunto. Si tratta di confrontare il valore misurato con quello atteso. Ogni alterazione del valore indicherebbe l'effetto di inibizione (valore misurato inferiore a quello atteso) o di aumento (valore misurato superiore a quello atteso) del parametro misurato nel saggio. L'uso del metodo del *sample spikes* è consigliabile perché consente in modo semplice di valutare il potenziale effetto di interferenza delle NP con il saggio e aumenta il grado di confidenza dei risultati e la validità del saggio.

Sulla base dei risultati ottenuti e per quanto sopra considerato, il saggio oggetto di studio non è risultato completamente adeguato a determinare la citotossicità di particelle di TiO₂, è consigliabile pertanto utilizzare gli accorgimenti raccomandati dall'appendice R7-1 della linea guida ECHA sugli obblighi di informazione e valutazione della sicurezza chimica, e l'utilizzo di più saggi per confermare i dati relativi all'*endpoint* o all'effetto considerato.

4.3. Valutazione dei risultati ottenuti con i test di genotossicità

La genotossicità del biossido di titanio è stata valutata mediante due differenti metodi: il test del micronucleo in grado di identificare danno di tipo cromosomico e il test della cometa in grado di mettere in evidenza la presenza di danno al DNA, anche in seguito a stress ossidativo. Il danno ossidativo al DNA è stato inoltre valutato mediante l'analisi dei livelli di 8-oxodG. Tutti i test sono stati condotti su PBMC umani che, pur non essendo tra i tipi cellulari rappresentativi del primo potenziale contatto del TiO₂, sono considerati uno dei principali modelli per l'esecuzione dei test di genotossicità in quanto cellule primarie umane.

Il test del micronucleo è considerato al momento il test d'elezione per la valutazione della genotossicità degli NM per la sua capacità di identificare la clastogenicità indotta dalle specie reattive dell'ossigeno, uno dei principali meccanismi della genotossicità degli NM, e per la capacità di identificare potenziali effetti aneugenici dovuti all'interazione fisica degli NM con il fuso e l'apparato mitotico.

Per questo test esiste una linea guida standardizzata OECD, aggiornata recentemente (settembre 2014) (24). Nel Workshop sulla genotossicità degli NM organizzato dall'OECD WPMN (18-19 Novembre 2013, Ottawa, Canada), si è concluso che i test di genotossicità attualmente previsti dalle linee guida OECD non sono completamente adatti a valutare la genotossicità degli NM e che quindi necessitano di alcune modifiche (25). Tra gli specifici adattamenti proposti, per il test del micronucleo si raccomanda un periodo di trattamento con il NM in assenza di Cit B al fine di evitare il potenziale potere inibente di quest'ultima sull'assorbimento degli NM. Infatti, la Cit B, l'agente utilizzato per impedire la citodieresi e produrre cellule binucleate su cui effettuare l'analisi dei micronuclei, è in grado di inibire i filamenti coinvolti nell'endocitosi, il meccanismo di penetrazione degli NM nella cellula; il test

risulterebbe quindi più sensibile se il trattamento con gli NM iniziasse precedentemente a quello con la Cit B (26). Il protocollo sperimentale applicato in questo progetto ha previsto perciò due modalità di trattamento proprio per tener conto di questa ipotesi. Il trattamento secondo la *modalità A* è infatti iniziato 20 ore prima della aggiunta di Cit B mentre quello secondo la *modalità B* è iniziato contemporaneamente all'aggiunta della Cit B. Quest'ultimo è sovrapponibile con quanto indicato nella linea guida OECD 487. Con entrambe le modalità non si è però osservato un chiaro aumento di micronuclei, per cui al momento non è possibile dare alcuna indicazione sul protocollo migliore da utilizzare in questo test. Inoltre, la mancanza di un NM da utilizzare come controllo positivo rappresenta un limite nei test di genotossicità poiché non possono essere identificate le condizioni sperimentali idonee all'esecuzione dei test. Un altro aspetto critico nell'analisi dei micronuclei è rappresentato dalla difficoltà dell'analisi al microscopio dei vetrini trattati con le dosi più alte di particelle di TiO₂. A causa, infatti, dell'elevato numero di particelle depositate sulle cellule le analisi possono risultare poco attendibili.

Tutti questi aspetti sono stati affrontati in un recente meeting dell'OECD (OECD Expert Meeting on the adaptation of the genotoxicity *in vitro* micronucleus assay (TG 487) for testing of nanomaterials. Paris, France, 13-14 October 2014) e saranno oggetto di rivalutazione critica da parte degli esperti all'interno di un trial sperimentale che affronterà queste problematiche.

Il test della cometa è un test molto sensibile per rilevare danni al DNA in forma di rotture a singolo e doppio filamento, sia dirette sia mediate da processi di riparazione del DNA (siti abasici). La presenza di interruzioni lungo la catena di DNA viene quantificata da appositi parametri, il *tail length* e il *tail moment*, che indicano rispettivamente la distanza di migrazione del DNA dalla testa della cometa e il prodotto del *tail length* per la frazione totale del DNA nella coda. Questo saggio è in grado di mettere in evidenza i danni al DNA derivanti dai processi di stress ossidativo.

La valutazione dell'induzione del danno al DNA utilizzando il saggio della cometa ha indicato un lieve ma significativo aumento delle rotture a singolo e doppio filamento sul DNA dei linfociti umani trattati con le particelle di TiO₂. In questo caso tale danno viene maggiormente evidenziato utilizzando l'analisi del *tail length* rispetto al *tail moment*.

Questa osservazione potrebbe essere spiegata sia dalla maggiore variabilità dei risultati ottenuti misurando il *tail moment* sia dal diverso significato dei due parametri. Infatti, i valori della deviazione standard delle misure di *tail moment* sono più alti rispetto a quelli del *tail length* (tabella 3). Inoltre, il *tail moment*, cioè il prodotto del *tail length* per la frazione totale del DNA nella coda, rappresenta una misura sia del più piccolo pezzo di DNA migrato rilevabile (misurato come *tail length*) sia del numero di pezzi di DNA rotti o rilassati che vanno a costituire l'intensità della coda della cometa. Poiché il danno prodotto dalle particelle di TiO₂ saggate si mantiene comunque su valori piuttosto bassi, il *tail length* sembra essere un parametro più idoneo a metterlo in evidenza.

L'analisi del danno ossidativo al DNA è stata effettuata tramite l'analisi del principale marker di ossidazione al DNA, l'8-oxodG. I livelli basali di questa base ossidata sono stati determinati tramite cromatografia liquida ad alta risoluzione con rivelatore elettro-chimico (HPLC/EC), una delle metodologie utilizzate dall'ESCODD per effettuare tale misura, e che ha dato una buona riproducibilità inter-laboratorio soprattutto per le curve dose-risposta.

Gli esperimenti effettuati trattando i linfociti umani con differenti dosi di particelle di TiO₂ hanno evidenziato l'impossibilità di utilizzare dosi elevate di trattamento in quanto la presenza stessa delle particelle rendeva l'estrazione del DNA, necessaria per effettuare la misura di 8-oxodG, particolarmente complicata e di scarsa attendibilità.

Dai risultati ottenuti, si può concludere che è possibile effettuare la misura di 8-oxodG tramite HPLC/EC per valutare l'induzione di danno ossidativo al DNA anche su cellule trattate

con NP che non presentano una elevata citotossicità, ponendo però attenzione alla valutazione della dose massima a cui effettuare il trattamento per poter avere dei risultati riproducibili.

Complessivamente i dati sperimentali hanno indicato che sia le nano che le microparticelle di TiO_2 sono in grado di produrre danno ossidativo sul DNA delle cellule mononucleate di sangue periferico. Il test della Cometa ha evidenziato una debole capacità delle NP di indurre rotture a singolo e doppio filamento sul DNA, mentre il danno ossidativo al DNA rilevato mediante l'analisi della base ossidata 8-oxodG non ha evidenziato uno specifico effetto delle NP. Nelle nostre condizioni sperimentali, questo danno non si è trasformato in un chiaro effetto genotossico rilevabile con il test del micronucleo. Queste osservazioni si aggiungono alle contraddittorie evidenze sperimentali presenti in letteratura (27-31) sulla capacità delle NP di TiO_2 di produrre micronuclei e in generale eventi mutageni. Tali evidenze sono indicative di una variabilità dovuta probabilmente alle condizioni sperimentali non standardizzate utilizzate finora. Infatti, le procedure di sospensione dei materiali nei mezzi di coltura, il tipo cellulare, lo specifico mezzo di coltura, la presenza/assenza e la quantità di siero nel mezzo, la durata dei trattamenti svolgono un ruolo fondamentale nel modulare la distribuzione dimensionale delle particelle, il loro *uptake* nelle cellule e la quantità di specie reattive dell'ossigeno prodotte. Risulta pertanto indispensabile un'accurata standardizzazione dei metodi sperimentali da utilizzare nei test di (geno)tossicità degli NM. Al riguardo diversi progetti europei si sono svolti (www.nanogenotox.eu/) (32) o sono attualmente in corso (<http://nanoreg.eu/>) per mettere a punto procedure sperimentali standardizzate.

BIBLIOGRAFIA

1. Organisation for Economic Co-operation and Development. *Series on the Safety of Manufactured Nanomaterials No. 27. List of manufactured nanomaterials and list of endpoints for phase one of the sponsorship programme for the testing of manufactured nanomaterials: Revision*. Paris: OECD; 2010. (OECD ENV/JM/MONO(2010)46).
2. Organisation for Economic Co-operation and Development. *Series on the Safety of Manufactured Nanomaterials No. 25. Guidance manual for the testing of manufactured nanomaterials: OECD's Sponsorship programme; first revision*. Paris: OECD; 2009. OECD ENV/JM/MONO(2009)20/REV.
3. Organisation for Economic Co-operation and Development. *Recommendation of the Council on the Safety Testing and Assessment of Manufactured Nanomaterials*. Paris: OECD; 2013. (Recommendation C(2013)107).
4. Europa. Regolamento (CE) No 1907/2006 concernente la registrazione, la valutazione, l'autorizzazione e la restrizione di sostanze chimiche (REACH). *Gazzetta ufficiale dell'Unione europea* L 396, 30/12/2006.
5. Europa. Regolamento (CE) No 1272/2008 relativo alla classificazione, all'etichettatura e all'imballaggio delle sostanze e delle miscele (CLP), *Gazzetta ufficiale dell'Unione europea* L 353, 31/12/2008.
6. Organisation for Economic Co-operation and Development. *Test No. 110: Particle size distribution/fibre length and diameter distributions. OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 1: Physical-Chemical properties*. Paris: OECD Publishing; 1981. Disponibile all'indirizzo: <http://dx.doi.org/10.1787/9789264069688-en>; ultima consultazione 28/9/15.
7. BS ISO 16700:2004. *Microbeam analysis. Scanning electron microscopy. Guidelines for calibrating image magnification*. London: British Standard Institution; 2004.
8. BS ISO 22309:2006. *Microbeam analysis - Quantitative analysis using energy-dispersive spectrometry (EDS)*. London: British Standard Institution; 2006.
9. Organisation for Economic Co-operation and Development. *Series on Testing and Assessment No. 129. Guidance document on using cytotoxicity tests to estimate starting doses for acute oral systemic toxicity tests*. Paris: OECD Publishing; 2010. (ENV/JM/MONO(2010)20)
10. Organisation for Economic Co-operation and Development. *Test No. 487: In vitro mammalian cell micronucleus test. OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4: Health Effects*. Paris: OECD Publishing; 2010. Disponibile all'indirizzo: <http://dx.doi.org/10.1787/9789264091016-en>; ultima consultazione 28/9/15.
11. European Standards Committee on Oxidative DNA Damage (ESCODD). Measurement of DNA oxidation in human cells by chromatographic and enzymic methods. *Free Rad Biol Med* 2003;34(8):1089-99.
12. Organisation for Economic Co-operation and Development. *Series on the Safety of Manufactured Nanomaterials No. 36. Guidance on sample preparation and dosimetry for the safety testing of manufactured nanomaterials*. Paris: OECD Publishing; 2012. (ENV/JM/MONO(2012)40).
13. European Commission, Joint Research Centre. *Titanium dioxide NM-100, NM-101, NM-102, NM103, NM 104, NM105. Characterisation and test item preparation. NM-series of Representative manufactured nanomaterials*. Luxembourg: Publications Office of the European Union; 2011. (Report EUR 26637 EN). Disponibile all'indirizzo: <https://ec.europa.eu/jrc/sites/default/files/lbna26637enn.pdf>; ultima consultazione 20/3/15

14. De Angelis I, Barone F, Zijno A, Bizzarri L, Russo MT, Pozzi R, Franchini F, Giudetti G, Uboldi C, Ponti J, Rossi F, De Berardis B. Comparative study of ZnO and TiO₂ nanoparticles: physicochemical characterization and toxicological effects on human colon carcinoma cells. *Nanotoxicology* 2013;7:1361-72.
15. European Commission, Joint Research Centre. *EURL ECVAM Recommendation on the 3T3 Neutral Red Uptake Cytotoxicity Assay for Acute Oral Toxicity Testing*. Luxembourg: Publications Office of the European Union; 2013. Disponibile all'indirizzo: https://eurl-ecvam.jrc.ec.europa.eu/eurl-ecvam-recommendations/files-3t3/ReqNo_JRC79556_lbna25946enn.pdf; ultima consultazione 20/3/15 (Report EUR 25946 EN).
16. Zijno A, Saini F, Crebelli R. Suitability of cryopreserved isolated lymphocytes for the analysis of micronuclei with the cytokinesis-block method. *Mutagenesis* 2007;22(5):311-5.
17. Andreoli C, Leopardi P, Crebelli R. Detection of DNA damage in human lymphocytes by alkaline single cell gel electrophoresis after exposure to benzene or benzene metabolites. *Mutat Res* 1997;377:95-104.
18. Calzolari L, Gilland D, Rossi F. Measuring nanoparticles size distribution in food and consumer products: a review. *Food Additives & Contaminants: Part A* 2012;29(8):1183-93.
19. Monteiro-Riviere NA, Inman AO, Zhang LW. Limitations and relative utility of screening assays to assess engineered nanoparticle toxicity in a human cell line. *Toxicol Appl Pharmacol* 2009;234:222-35.
20. Stone V, Johnston H, Schins RPF. Development of *in vitro* systems for nanotoxicology: methodological considerations. *Critical Reviews in Toxicology* 2009;39(7):613-26.
21. Guadagnini R, Halamoda Kenzaoui B, Cartwright L, Pojana G, Magdolenova Z, Bilanicova D, Saunders M, Juillerat L, Marcomini A, Huk A, Dusinska M, Fjellsbø LM, Marano F, Boland S. Toxicity screenings of nanomaterials: challenges due to interference with assay processes and components of classic *in vitro* tests. *Nanotoxicology* 2015;9(Suppl 1):13-24.
22. European Chemicals Agency. *Guidance on information requirements and chemical safety assessment. Appendix R7-1 Recommendations for nanomaterials applicable to Chapter R7a - Endpoint specific guidance*. Helsinki: ECHA; 2012. (ECHA-12-G-03-EN). p. 50-1
23. Kroll A, Pillukat MH, Hahn D, Schnekenburger J. Current *in vitro* methods in nanoparticle risk assessment: limitations and challenges. *Eur J Pharm Biopharm* 2009;72(2):370-7.
24. Organisation for Economic Co-operation and Development. *Test No. 487: In vitro mammalian cell micronucleus test. OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4: Health Effects*. Paris: OECD Publishing; 2014. Disponibile all'indirizzo: [10.1787/9789264224438-en](https://doi.org/10.1787/9789264224438-en); ultima consultazione 28/9/15.
25. Organisation for Economic Co-operation and Development. *Series on the Safety of Manufactured Nanomaterials No. 43. Genotoxicity of Manufactured Nanomaterials: Report of the OECD Expert Meeting. 2014*. Paris: OECD; 2014. (ENV/JM/MONO(2014)34).
26. Gonzalez L, Sanderson BJS, Kirsch-Volders M. Adaptations on the *in vitro* MN assay for the genotoxicity assessment of nanomaterials. *Mutagenesis* 2011;26:185-91.
27. Falck GCM, Lindberg HK, Suhonen S, Vippola M, Vanhala E, Catalán J, Savolainen K, Norppa H. Genotoxic effects of nanosized and fine TiO₂. *Hum Exp Toxicol* 2009;28:339-52.
28. Catalán J, Järventaus H, Vippola M, Savolainen K, Norppa H. Induction of chromosomal aberrations by carbon nanotubes and titanium dioxide nanoparticles in human lymphocytes *in vitro*. *Nanotoxicology* 2012;6:825-36.
29. Prasad RY, Wallace K, Daniel KM, Tennant AH, Zucker RM, Strickland J, Dreher K, Kligerman AD, Blackman CF, Demarini DM. Effect of treatment media on the agglomeration of titanium dioxide nanoparticles: impact on genotoxicity, cellular interaction, and cell cycle. *ACS Nano* 2013;7:1929-42.

30. Tavares AM, Louro H, Antunes S, Quarré S, Simar S, De Temmerman PJ, Verleysen E, Mast J, Jensen KA, Norppa H, Nessler F, Silva MJ. Genotoxicity evaluation of nanosized titanium dioxide, synthetic amorphous silica and multi-walled carbon nanotubes in human lymphocytes. *Toxicol In Vitro* 2014;28:60-9.
31. Zijno A, De Angelis I De Berardis B, Andreoli C, Russo MT, Pietraforte D, Scorza G, Degan P, Ponti J, Rossi F, Barone F. Different mechanisms are involved in oxidative DNA damage and genotoxicity induction by ZnO and TiO₂ nanoparticles in human colon carcinoma cells. *Toxicol In Vitro* 2015;29:1503-12.
32. The final NANOGENOTOX publishable report. Facilitating the safety evaluation of manufactured nanomaterials by characterising their potential genotoxic hazard. 2013. Disponibile all'indirizzo: http://www.nanogenotox.eu/files/PDF/nanogenotox_web.pdf; ultima consultazione 20/3/15

APPENDICE A
Procedure operative standard
per la coltura delle cellule Balb/3T3

A1. Introduzione

La linea cellulare Balb/3T3 clone A31 (ATCC® CCL-163™) è stata ottenuta da Aaronson e Todaro* nel 1968 da embrioni di topo Balb/c di 14-17 giorni. Le cellule hanno morfologia fibroblastoide e cariotipo ipotetraploide (tra 62 e 109 cromosomi). Non sono tumorigene se iniettate in topi immunosoppressi, ma possono formare colonie in mezzi semisolidi (www.lgcstandards-atcc.org).

A2. Scopo

Mantenere in coltura le cellule Balb/3T3 durante l'effettuazione degli esperimenti di tossicità. Le cellule sono mantenute in uno stato di sub confluenza (80% circa) in fiasche da 25 cm² (T25) o da 75 cm² (T75).

A3. Limitazioni

Le cellule Balb/3T3 devono essere passate almeno due volte dopo lo scongelamento prima di essere utilizzate per il test del rosso neutro (*Neutral Red Uptake*, NRU). Viene considerato come passaggio n. 1 il 1° passaggio dopo lo scongelamento. Le cellule utilizzate per il saggio NRU non vengono mantenute in coltura per più di 15 passaggi.

A4. Metodo

Le cellule Balb/3T3 crescono adese e sono normalmente coltivate in fiasche per colture cellulari con il tappo ventilato in incubatore a 37±1°C, 90±5% umidità e 5,0±1% CO₂. Le cellule sono trasferite in una nuova fiasca quando raggiungono una confluenza di circa il 75-80%, alla densità di piastramento di 8x10³ cellule/cm². Aliquote di Balb/3T3 devono essere mantenute in azoto liquido in apposite fiale da congelamento. Il Dimetil solfossido (DMSO) è utilizzato come agente crio-protettivo. Ogni qual volta le cellule in coltura arrivano al 13° passaggio è necessario procedere allo scongelamento di una nuova aliquota.

A5. Materiali

A5.1. Linea cellulare

Balb/3T3 clone A31 (*American Type Culture Collection*, ATCC® CCL-163™). Le cellule sono state inviate da EURL-ECVAM (*European Union Reference Laboratory for Alternatives to Animal Testing*) al passaggio n. 16.

A5.2. Apparecchiature e materiale monouso

- Incubatore: 37°C ± 1°C, 90% ± 5% umidità, 5.0% ± 1% CO₂/in aria
- Cappa a flusso laminare (biological hazard standard)

* Aaronson SA, Todaro GJ. Development of 3T3-like lines from Balb/c mouse embryo cultures: Transformation susceptibility to SV40. *Journal of Cellular Physiology* 1968;72:141-8.

- Bagno termostato: 37°C ± 1°C
- Microscopio invertito a contrasto di fase
- Centrifuga
- Cell counter o emocitometro (ad esempio camera di Bürker)
- Contenitore per azoto liquido
- Pipet-aid, micropipette
- Fiasche per colture cellulari (25 e 75 cm²) con tappo ventilato
- Provette coniche per centrifuga (15 e 50 mL)
- Pipette con diversa volumetria, puntali per micropipette
- Fiale da congelamento

A5.3. Reagenti, mezzo di coltura e siero

- Mezzo di coltura: Dulbecco's Modified Eagle's Medium 1X (DMEM) [+] 4.5 g/L Glucosio [+] L-Glutammina [-] Piruvato (GIBCO, cat. N. 41965). Conservare a +4°C.
- Siero: Fetal Bovine Serum (FBS) (HyClone, US origin, n. SH30071.03). Prima dell'uso inattivare il siero a 56°C in bagno termostatico per 30 min. Conservare in aliquote da 50 mL a -20°C.
- Antibiotici: soluzione di Penicillina/streptomina 10.000 Unit/mL Pen.; 10.000 Unit/mL Strep. (Gibco, cat. n. 15140). Conservare in aliquote da 10 mL a -20°C.
- Tampone fosfato (Phosphate Buffered Saline, PBS) senza Ca²⁺ e Mg²⁺ (Gibco, cat. n. 20012). Conservare +4°C.
- Soluzione salina di Hanks (Hanks' Balanced Salt Solution, HBSS) (Gibco. Cat. n. 14025). Conservare a +4°C.
- Tripsina TrypLE Select (1x) (Gibco, cat. n.12563). Conservare in aliquote da 20 mL a +4°C.
- Dimetil sulfossido (DMSO) ≥99.5%, CAS. 67-68-5 (Sigma-Aldrich, cat. n. D5879). Conservare a temperatura ambiente.
- Soluzione di Trypan Blue 0.4% (Sigma, cat. n.T8154). Conservare a temperatura ambiente.
- Acqua ultrapura (MilliQ).

A6. Metodi

A6.1. Preparazione del mezzo di coltura e del mezzo di congelamento

Il mezzo di coltura completo (500 mL) è preparato in condizioni di sterilità nel modo seguente:

- Prelevare 55 mL da una nuova bottiglia di DMEM (questo mezzo può essere conservato a +4°C in un recipiente sterile per successivi utilizzi);
- Aggiungere 50 mL of FBS (10% v/v), precedentemente scongelato in bagno termostatico a 37°C;
- Aggiungere 5 mL di soluzione di Penicillina/Streptomina (1% v/v), precedentemente scongelata in bagno termostatico a 37°C.

Il mezzo di coltura completo può essere conservato a +4°C per non più di 3-4 settimane.

Il mezzo di congelamento deve essere preparato al momento dell'uso e contiene una concentrazione doppia (2x) di FBS e DMSO:

- 60% (v/v) mezzo di coltura completo;
- 20% (v/v) FBS inattivato;
- 20% (v/v) DMSO (concentrazione finale 10%).

A6.2. Mantenimento delle cellule in coltura

Le cellule Balb/3T3 vengono normalmente coltivate in fiasche da 25 cm² o da 75 cm² a 37°C in atmosfera con il 5.0% (± 1%) CO₂/aria fino al raggiungimento della subconfluenza (70-80% di confluenza). Le cellule devono essere esaminate regolarmente con il microscopio ottico invertito a

contrasto di fase per controllare che la morfologia e le proprietà di aderenza al substrato rimangano invariate. L'osservazione al microscopio è necessaria anche per verificare l'insorgenza di eventuali contaminazioni batteriche e/o la presenza di muffe o lieviti.

A6.2.1. Passaggio delle cellule

Quando le cellule raggiungono una confluenza tra il 60 e l'80% devono essere divise mediante tripsinizzazione e trasferite in una nuova fiasca con le seguenti modalità:

- Preriscaldare a 37°C in bagno termostato il mezzo di coltura completo, la tripsina e l'HBSS;
- In condizioni di sterilità eliminare il terreno di coltura e sciacquare il monostrato 2 volte con 5 mL di HBSS (10 mL per le T75), agitando delicatamente per eliminare i residui di siero che potrebbero compromettere il distacco delle cellule;
- Aggiungere 0,5 mL di tripsina (1 mL per le fiasche T75) agitando leggermente la fiasca per pochi secondi, quindi rimuovere l'eccesso di tripsina lasciando solo un velo sul fondo del recipiente di coltura;
- Incubare le cellule a 37°C per 3-5 min;
- Controllare al microscopio se le cellule sono divenute tondeggianti e si staccano dal fondo della fiasca; se necessario battere leggermente sulle pareti del recipiente fino a che il monostrato non si stacca dal fondo;
- Aggiungere 5 mL di mezzo di coltura completo pipettando gentilmente le cellule per disperderle in modo omogeneo. Per la successiva fase di conta delle cellule, è particolarmente importante ottenere una sospensione monocellulare;
- Contare le cellule con le seguenti modalità:
 - Aggiungere 30 µL di sospensione cellulare a 30 µL di una soluzione di Trypan Blue in una provetta eppendorf sterile (fattore di diluizione 2). Spipettare gentilmente la soluzione con una micropipetta da 100 µL per circa 30 s.
 - Prelevare una piccola aliquota della sospensione (~10 µL) e procedere alla conta delle cellule utilizzando il Cell counter o un emocitometro (ad esempio la camera di Bürker); in quest'ultimo caso il numero di cellule è calcolato con la seguente formula:

$$N = \{(a + b)/2\} / 9 \times 10^4 \times DF$$

dove: N = numero di cellule/mL

a = numero di cellule contate in 9 quadrati della prima camera

b = numero di cellule contate in 9 quadrati della seconda camera

10^4 = fattore di conversione per il volume della camera

DF = fattore di diluizione della sospensione cellulare (generalmente uguale a 2)

- Aggiungere in una nuova fiasca di coltura 5 mL di mezzo completo (per T25, 10 mL per T75). Segnare sulla fiasca il nome della linea cellulare, il numero e la data di passaggio. Piastrare le cellule alla densità di 8×10^4 cellule/cm². In queste condizioni le cellule dovrebbero raggiungere il 70% di confluenza in 4-5 giorni.

A6.2.2. Congelamento delle cellule

- Staccare le cellule dal supporto di coltura e contarle come descritto al punto 6.2.1.
- Calcolare il numero di provette di congelamento che devono essere preparate, considerando che ogni provetta dovrà contenere 1×10^6 cellule. Segnare su ogni provetta il nome della linea cellulare, il numero di passaggio e la data di congelamento.
- Preparare la necessaria quantità di mezzo di congelamento (0,5 mL/fiala) come descritto al punto 6.1.
- Centrifugare la sospensione cellulare in una provetta conica (200xg, 10 min)
 - Rimuovere il sovrantante e risospesione gentilmente le cellule nella quantità di mezzo necessaria ad ottenere una sospensione di 2×10^6 cell/mL.
 - Distribuire 0,5 mL di mezzo di congelamento in ogni fiala.

- Aggiungere ad ogni fiala 0.5 mL di sospensione cellulare.
- Mescolare delicatamente la sospensione cellulare con il mezzo di congelamento. Questa operazione è molto importante per prevenire la formazione di due fasi separate durante il congelamento).
- Trasferire le fiale in un contenitore isolante (ad esempio Cryo Freezing container, Nalgene®, Sigma cat. N. C1562) e riporle in congelatore a -70/-80°C per almeno 48 h (massimo 1 settimana). È cruciale che la diminuzione di temperatura avvenga alla velocità di circa 1°C/min.
- Trasferire le fiale nel contenitore dell'azoto liquido.

A6.2.3. Scongelo delle cellule

- Rimuovere le fiale di congelamento dall'azoto liquido e scongelarle nel bagno termostatico (37°C ± 1°C). Agitare leggermente la fiala in modo da ridurre il più possibile il tempo di scongelamento.
- Preparare una fiasca T25 con 4 mL di mezzo di coltura pre-riscaldato.
- Lentamente trasferire la sospensione cellulare nella fiasca.
- Incubare a 37°C e 5,0% CO₂ per 24 ore.
- Passate le 24 h aspirare il mezzo di coltura sostituendolo con del mezzo fresco pre-riscaldato. Procedere con la coltura delle cellule come descritto al punto 6.2.1.
- Dopo lo scongelamento passare le cellule almeno due volte prima di effettuare qualsiasi prova sperimentale.

A7. Procedure di sicurezza

Tutte le procedure sopra descritte devono essere condotte in condizioni di sterilità e sotto una cappa a flusso laminare (*biological hazard standard*). Tutti i materiali e prodotti a contatto con le cellule devono essere sterili. Durante la manipolazione delle cellule l'operatore deve sempre indossare guanti e camice. I rifiuti solidi e liquidi devono essere scartati secondo le procedure relative ai rifiuti biologici. Durante le manipolazioni con azoto liquido è necessario indossare la specifica maschera protettiva per l'intero viso e i guanti appositi.

APPENDICE B
Procedure operative standard
per il saggio del rosso neutro

B1. Introduzione

Il saggio di citotossicità del rosso neutro (*Neutral Red Uptake*, NRU) è un saggio di vitalità cellulare basato sulla capacità delle cellule vive di incorporare e trattenere il rosso neutro (*Neutral Red*, NR) un colorante debolmente cationico. Questo colorante penetra facilmente attraverso le membrane cellulari e si accumula all'interno dei lisosomi. L'esposizione a xenobiotici è frequentemente associata ad alterazioni della membrana cellulare e/o lisosomiale che inducono una fragilità lisosomiale, spesso irreversibile. Ne consegue che le cellule morte o danneggiate assumono e trattengono meno colorante delle cellule vive. La quantità di rosso neutro misurata al termine del saggio è quindi direttamente proporzionale al numero di cellule vive presenti.

B2. Scopo

Valutare la citotossicità di nanoparticelle mediante il saggio NRU su cellule Balb/3T3. Viene utilizzato il protocollo sperimentale messo a punto sulla base delle raccomandazioni elaborate da EURL-ECVAM che ha valutato la riproducibilità del saggio e la sua effettiva capacità di predire la dose iniziale per i saggi di tossicità acuta orale sui roditori.

B3. Limitazioni

Il saggio non può essere utilizzato con sostanze che interferiscono con la lettura spettrofotometrica o interagiscono con il colorante. In particolare non è applicabile a sostanze fluorescenti.

B4. Metodo

Le cellule in coltura sono soggette ad un continuo processo di divisione e moltiplicazione. L'esposizione a xenobiotici, indipendentemente dal meccanismo di azione, generalmente interferisce con questo processo causando una riduzione della crescita che si riflette in una diminuzione del numero di cellule. Il parametro "citotossicità", espresso come riduzione dose dipendente dell'*uptake* di NR in seguito a esposizione ad agenti tossici, fornisce un indicatore sensibile e attendibile dell'integrità cellulare e dell'inibizione della crescita.

B5. Materiali

B5.1. Linea cellulare

Balb/3T3 clone A31 (American Type Culture Collection, ATCC® CCL-163™). Le cellule sono state inviate da EURL-ECVAM al passaggio n. 16.

B5.2. Apparecchiature e materiale monouso

- Incubatore: 37 °C ± 1 °C, 90% ± 5% umidità, 5.0% ± 1% CO₂/in aria
- Cappa a flusso laminare (biological hazard standard)
- Bagno termostatico: 37 °C ± 1 °C

- Microscopio invertito a contrasto di fase
- Centrifuga
- Bilancia analitica (precisione 0.01 mg)
- Sonicatore a bagnetto
- Pompa da vuoto
- Cell counter o emocitometro (ad esempio camera di Bürker)
- Tubi pyrex con tappo a vite (10 mL)
- Pipetting-aid
- Micropipette
- Pipette multicanale o Multipette M4/Combitip System (Eppendorf)
- Piastre multiwell a fondo piatto da 24 e 96 pozzetti
- Provette coniche per centrifuga (15 e 50 mL)
- Pipette con diversa volumetria, puntali per micropipette
- Agitatore per piastre
- Lettore di piastre con filtro a 540 nm

B5.3. Reagenti, mezzo di coltura e siero

- Mezzo di coltura: Dulbecco's Modified Eagle's Medium 1X (DMEM) [+] 4.5 g/L Glucosio [+] L-Glutammina [-] Piruvato (GIBCO, cat. N. 41965). Conservare a +4°C.
- Siero: Fetal Bovine Serum (FBS) (HyClone, US origin, n. SH30071.03). Prima dell'uso inattivare il siero a 56°C in bagno termostatico per 30 min. Conservare in aliquote da 50 mL a -20°C.
- Antibiotici: soluzione di Penicillina/streptomina 10.000 Unit/mL Pen.; 10.000 Unit/mL Strep. (Gibco, cat. n. 15140). Conservare in aliquote da 10 mL a -20°C.
- Tampone fosfato (PBS) senza Ca^{2+}/Mg^{2+} (Gibco, cat. n. 20012). Conservare +4°C.
- Soluzione salina di Hanks (HBSS) (Gibco. Cat. n. 14025). Conservare a +4°C.
- Tripsina TrypLE Select (1x) (Gibco, cat. n.12563). Conservare in aliquote da 20 mL a +4°C.
- Soluzione di Trypan Blue 0.4% (Sigma, cat. n.T8154). Conservare a temperatura ambiente.
- Sodium dodecyl sulfate (SLS) solution 10% (Sigma cat. n. L4522)
- NR (Sigma-Aldrich cat. n. N4638)
- Etanolo assoluto.
- Acido acetico glaciale.
- Acqua ultrapura (MilliQ).

B6. Procedure

Tutte le soluzioni e il materiale utilizzato per la coltura delle cellule devono essere sterili. Le procedure di saggio devono essere condotte in condizioni di sterilità (*biological hazard standard*) fino alla fase di estrazione del NR.



B6.1. Piastramento delle cellule

Staccare le cellule dalla fiasca di coltura secondo quanto riportato nell'Appendice A, paragrafo 6.1.1.; la fiasca dovrà avere una confluenza compresa tra il 60 e l'80%. Contare le cellule come riportato nell'Appendice A, paragrafo A6.2.1; la vitalità cellulare non dovrà essere inferiore all'80%.

Centrifugare le cellule a 1000 rpm per 5 min, scartare il sopranatante e risospenderle nel mezzo di coltura alla concentrazione di 1×10^6 cellule/mL.

Calcolare il numero di pozzetti da utilizzare nell'esperimento seguendo lo schema sotto riportato.

Schema della piastra da 96 pozzetti utilizzata per il piastramento e il trattamento

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS
B	Mezzo Completo	NP Conc 1	NP Conc 2	NP Conc 3	NP Conc 4	Contr NEG	Contr POS	NP Conc 1	NP Conc 2	NP Conc 3	NP Conc 4	Contr POS
C	Mezzo Completo	NP Conc 1	NP Conc 2	NP Conc 3	NP Conc 4	Contr NEG	Contr POS	NP Conc 1	NP Conc 2	NP Conc 3	NP Conc 4	Contr POS
D	Mezzo Completo	NP Conc 1	NP Conc 2	NP Conc 3	NP Conc 4	Contr NEG	Contr POS	NP Conc 1	NP Conc 2	NP Conc 3	NP Conc 4	Contr POS
E	Mezzo Completo	NP Conc 1	NP Conc 2	NP Conc 3	NP Conc 4	Contr NEG	Contr POS	NP Conc 1	NP Conc 2	NP Conc 3	NP Conc 4	Contr POS
F	Mezzo Completo	NP Conc 1	NP Conc 2	NP Conc 3	NP Conc 4	Contr NEG	Contr POS	NP Conc 1	NP Conc 2	NP Conc 3	NP Conc 4	Contr POS
G	Mezzo Completo	NP Conc 1	NP Conc 2	NP Conc 3	NP Conc 4	Contr NEG	Contr POS	NP Conc 1	NP Conc 2	NP Conc 3	NP Conc 4	Contr POS
H	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS
	No cellule	No cellule	No cellule	No cellule	No cellule	Cellule	Cellule	Cellule	Cellule	Cellule	Cellule	No cellule

Calcolare la quantità di cellule necessaria per l'effettuazione del saggio, moltiplicando il numero di cellule per pozzetto (1×10^4) per il numero totale di pozzetti che dovranno essere preparati.

Esempio: se si utilizza una intera piastra da 96 pozzetti dovranno essere piastrati 60 pozzetti. Calcolare almeno 6 pozzetti in più del necessario per non dover lavorare con volumi troppo esatti.

$$66 \text{ pozzetti} \times 1 \times 10^4 \text{ cellule} = 6,6 \times 10^5 \text{ cellule totali}$$

Calcolare la quantità di mezzo di coltura necessario in base al numero di pozzetti che dovranno essere piastrati. Per ogni pozzetto considerare 150 μ L di mezzo di coltura completo;

Esempio: 66 pozzetti \times 150 μ L = 9.900 μ L cioè 9,9 mL di mezzo totali

In base a quanto precedentemente calcolato preparare la sospensione di piastramento diluendo opportunamente le cellule risospese dopo la centrifugazione in modo che la quantità totale di cellule richiesta sia contenuta nella corrispondente quantità totale di mezzo (esempio: $6,6 \times 10^5$ cellule in 9,9 mL di mezzo). Spipettare delicatamente le cellule per ottenere una sospensione omogenea, evitando la formazione di schiuma.

Distribuire in ogni pozzetto 150 μ L della sospensione di piastramento, avendo cura di non formare bolle. Utilizzare preferibilmente una pipetta multicannale o una pipetta Multipette M4/Combitip System. Agitare delicatamente la sospensione ogni volta che si preleva una nuova quantità di mezzo.

Come riportato nello schema 1, piastrare le cellule solo nella parte interna della piastra; riempire la cornice della piastra con 150 μ L di PBS. Trasferire la(e) piastra(e) nell'incubatore.

B6.2. Preparazione delle diverse concentrazioni di NP

Pesare con una bilancia analitica in tubi di vetro sterili la quantità esatta di particelle corrispondente a ciascun punto sperimentale e al numero di pozzetti che dovranno essere trattati. Sospenderle in alcol etilico e portarle a secco in stufa overnight. Conservare i tubi a temperatura ambiente proteggendoli dalla luce.

B6.3. Esposizione delle piastre alle NP, al controllo positivo e negativo

Dopo 24 (\pm 2) h dal piastramento procedere con il trattamento dei pozzetti. Controllare le piastre al microscopio per verificare che le cellule abbiano aderito al substrato (il numero di cellule attaccate deve essere \geq al 50%) e l'eventuale presenza di contaminazioni.

Preparare 100 mL di mezzo di coltura senza siero aggiungendo 1 mL di soluzione Pen/Strept (scongelata in bagno termostatico a 37°C) a 99 mL di DMEM precedentemente pre-riscaldato.

Preparare la sospensione delle NP nel modo seguente:

- Aggiungere ad ogni tubo contenente le NP (vedi 6.2.) 1,4 mL di mezzo senza siero. Spipettare energicamente per almeno 20 volte il mezzo, strofinando la punta della pipetta sulle pareti e sul fondo del tubo per staccare bene le NP.
- Agitare i tubi sul vortex per 6 volte e sonicarli per 45 min a 42 kHz, 37 \pm 2°C.
- Al termine della sonicazione aggiungere ad ogni tubo 160 μ L di FBS.

Aspirare delicatamente il mezzo da tutti i pozzetti e trasferire 130 μ L della sospensione di trattamento in ogni pozzetto. Procedere con 1 concentrazione alla volta, agitando il rispettivo tubo sul vortex per 6 volte (evitare accuratamente la formazione di schiuma!). Per ogni concentrazione trattare 12 pozzetti, 6 con le cellule e 6 senza cellule.

Preparare il controllo positivo, diluendo la soluzione iniziale di SLS 1:100 in HBSS (stock solution 1 mg/mL). Diluire la stock solution nel mezzo di coltura, 80 μ L stock/mL: concentrazione finale 80 μ g/mL. Preparare le diluizioni fresche ogni volta.

Trattare con 100 μ L di SLS 80 μ g/mL i pozzetti del controllo positivo (6 pozzetti con cellule e 6 pozzetti senza cellule) e con 130 μ L di mezzo di coltura completo i 6 pozzetti del controllo negativo e del controllo mezzo senza cellule.

Agitare delicatamente la(e) piastra(e) per 5 min su un agitatore per piastre. Trasferire nell'incubatore.

B 6.4 Colorazione con il NR

B6.4.1. Soluzioni di saggio

- **NR stock solution:** 5 mg/mL (100x) in H₂O sterile. Conservare a temperatura ambiente al buio.
- **NR working solution:** 50 μ g/mL in mezzo di coltura completo. Preparare 18-24 h prima dell'uso e mantenere overnight a 37°C; centrifugare immediatamente prima dell'uso a 2.600 rpm per 10 min per eliminare gli eventuali precipitati.
- **Soluzione wash-fix:** 50% (v/v) alcol etilico, 49% (v/v) H₂O distillata, 1% (v/v) acido acetico glaciale. Conservare a temperatura ambiente.

6.4.2. Procedura

Dopo 48 \pm 2 h dal trattamento procedere alla colorazione con il NR. Esaminare accuratamente la(e) piastra(e) al microscopio ottico, prendendo nota di qualsiasi alterazione morfologica e della crescita, sofferenza cellulare o distacco dal substrato. Verificare l'eventuale presenza di contaminazioni.

Rimuovere delicatamente il mezzo da tutti i pozzetti trattati. Sciacquarli con 150 μ L di PBS completo pre-riscaldato a 37°C in bagno termostatico.

Aggiungere ad ogni pozzetto 100 μ L della *working solution* di NR. Trasferire la(e) piastra(e) in incubatore per 3 h.

Al termine dell'incubazione rimuovere delicatamente la soluzione di NR dai pozzetti e sciacquarli con 150 μ L di PBS completo pre-riscaldato.

Aggiungere ad ogni pozzetto 100 μ L di soluzione *wash-fix* e incubare per 20 min a RT, agitando la(e) piastra(e) a velocità medio/alta su un agitatore per piastre.

Leggere l'assorbanza a 540 nm con il lettore di piastre.

B6.5. Criteri di accettabilità

I seguenti criteri devono essere rispettati affinché il saggio possa essere considerato valido:

- Al termine dell'incubazione le cellule nei pozzetti non trattati (controllo negativo, colonna 6) non devono mostrare segni di tossicità al microscopio ottico.
- Il coefficiente di variazione dell'assorbanza media di ciascun replicato, incluso il controllo negativo, non deve superare il 30%.
- La sopravvivenza media del controllo positivo deve essere inferiore al 30%.
- Non devono essere riscontrate interferenze con il sistema di saggio da parte del controllo positivo e delle NP alle dosi utilizzate. Per tale motivo i singoli valori di assorbanza del controllo positivo senza cellule (figura 1, colonna 12) e delle diverse concentrazioni di NP senza cellule (figura 1, colonne 2, 3, 4, 5) devono differire meno del 15% dall'assorbanza media della colonna del bianco (figura 1, colonna 1).

B7. Procedure di sicurezza

Tutte le procedure sopra descritte devono essere condotte in condizioni di sterilità e sotto una cappa a flusso laminare (*biological hazard standard*). Tutti i materiali e prodotti a contatto con le cellule devono essere sterili. Durante la manipolazione delle cellule e le procedure di saggio l'operatore deve sempre indossare guanti e camice. I rifiuti solidi e liquidi devono essere scartati secondo le procedure relative ai rifiuti biologici.

APPENDICE C
Procedure operative standard
per l'esecuzione del test del micronucleo
su linfociti umani congelati

C1. Introduzione

Sono qui descritte le procedure operative standard applicate nel laboratorio di Tossicologia Genetica per il test del micronucleo *in vitro* con particelle di Titanio sui linfociti umani. Per questo scopo i linfociti sono stati separati dai “buffy coat” di sacche di sangue ottenute dal centro trasfusionale di donatori anonimi. I principali riferimenti di questa procedura sono la linea guida OCSE TG 487, il protocollo di Michael Fenech (2007) e l’articolo Zijno et al. (2007).

C2. Scopo

Il test del micronucleo è un saggio di genotossicità che ha come scopo di individuare l’incremento di micronuclei in cellule trattate con un potenziale agente genotossico. I micronuclei sono frammenti di cromosomi oppure cromosomi interi, circondati da una membrana nucleare, presenti nel citoplasma delle cellule. Si originano in seguito a rotture cromosomiche oppure ad anomalie della divisione mitotica che provoca una errata segregazione cromosomica. Il loro incremento è quindi una manifestazione di un danno al DNA o al corredo cromosomico della cellula prodotto dall’agente in studio. Entrambi gli eventi sono legati a processi di trasformazione neoplastica e la presenza di micronuclei può quindi essere predittiva del potenziale cancerogeno dell’agente che li induce.

C3. Metodo

Dopo stimolazione dei linfociti per riattivare la loro proliferazione *in vitro*, le colture sono trattate con l’agente in studio e cresciute per un periodo sufficiente a permettere al danno cromosomico o agli effetti sulla divisione cellulare di originare micronuclei durante la mitosi. I micronuclei sono evidenziabili nelle cellule nella successiva interfase mediante osservazione dei preparati cellulari al microscopio ottico in campo chiaro oppure a fluorescenza.

Poiché i micronuclei sono prodotti durante la divisione cellulare possono essere rilevati solo nei linfociti che hanno completato la mitosi. L’aggiunta della citocalasina B alla coltura blocca la citochinesi e porta alla formazione di cellule binucleate consentendo di limitare l’analisi a queste cellule ossia alle sole che hanno terminato la mitosi e quindi le sole potenzialmente in grado di esprimere i micronuclei aumentando, in tal modo, la sensibilità del test.

C4. Materiali

C4.1. Apparecchiature e materiale monouso

- Pipettatore
- Micropipette
- Cappa chimica
- Cappa biologica
- Incubatore a CO₂
- Bilancia analitica
- Bilancia tecnica
- Centrifuga
- Citocentrifuga
- Microscopio ottico con obiettivo 20x e 100x
- Frigorifero
- Congelatore a -20°C

- Congelatore a -80°C
- Contenitore per azoto liquido
- Bagnetto termostato
- Pipette sterili 5, 10, 25 mL
- Puntali sterili
- Pasteur sterili
- Tubi da 15 e 50 mL
- Fiasche da 75 cm²
- Provette da congelamento
- Provette eppendorf
- Vetrini porta-oggetto 24x60
- Cytofunnel
- Kova Glasstic 10
- Vaschette colorazione vetrini tipo Hellendal
- Conta cellule manuale a due e quattro tasti

C4.2. Reagenti, mezzo di coltura e siero

- Terreno RPMI 1640
- Ficoll Histopaque 1,077
- Fetal Calf Serum
- Fitoemoagglutinina HA15
- PBS
- Trypan Blue
- DMSO
- Citocalasina B
- Metanolo
- Giemsa
- Fosfato di Sodio dibasico (Na₂HPO₄)
- Fosfato di potassio monobasico (KH₂PO₄)
- Ipoclorito di sodio

C5. Procedure

C5.1. Separazione e congelamento delle cellule mononucleate del sangue

- Sotto una cappa sterile, utilizzando tutte le procedure di sicurezza per la protezione individuale e lo smaltimento del materiale venuto a contatto con i campioni biologici, diluire 40 mL di buffy coat con 80 mL di terreno RPMI 1640 utilizzando due fiasche da 75 cm².
- Distribuire 12 mL di Ficoll Histopaque 1,077 in 6 tubi da 50 mL. Effettuare questa operazione preventivamente per portare a temperatura ambiente il Ficoll.
- Stratificare molto lentamente 24 mL di sangue diluito in ognuno dei 6 tubi.
- Centrifugare i tubi a 400g con accelerazione posta a 5 e freno a 0 per 30 minuti a temperatura ambiente
- Al termine della centrifugazione prelevare da ogni tubo da 50 mL lo strato cellulare presente all'interfaccia tra il Ficoll e il siero utilizzando una pipetta Pasteur sterile e trasferirlo in un tubo da 15 mL. Aggiungere RPMI fino al volume finale di 10 mL.
- Centrifugare i tubi per 10 minuti a 1000 rpm.
- Eliminare il sovrantante e raccogliere i pellet in un unico tubo da 15 mL e aggiungere 10 mL di RPMI.
- Sospendere bene e prelevare una piccola aliquota (almeno 100 µL) e diluire 1:10 con PBS in una eppendorf. Sospendere bene, prelevare 10 µL e aggiungerli in un'altra eppendorf a 10 µL di

Trypan Blue. Prelevare 10 μ L e caricarli su un vetrino per la conta cellulare (Kova Glasstic 10). Conta delle cellule vive (chiare) e morte (scure) presenti su 9 quadratini presi su una delle diagonali della camera, al microscopio ottico in contrasto di fase con obiettivo 20x.

Calcolo del numero di cellule vitali totali:

Numero di cellule vitali (chiare) su 9 quadratini x 2 (fattore di diluizione in Trypan Blue) x 10 (fattore di diluizione in PBS) x 10 (volume in mL) x 10⁴ (rapporto tra mL e volume della camera)

Calcolo della vitalità:

[Numero di cellule vitali (chiare)/Numero di cellule vitali (chiare)+Numero di cellule morte (scure)]x100

- Centrifugare i tubi per 10 minuti a 1000 rpm.
- Preparare in ghiaccio il terreno di congelamento così costituito:
- 50% Fetal calf serum, 40% di RPMI, 10% DMSO
- Scartare il sopranatante e aggiungere un volume di terreno di congelamento pari ad ottenere una sospensione equivalente a 20 x 10⁶ cellule vitali/mL. Mantenere il tubo in ghiaccio.
- Preparare un numero di provette da congelamento equivalenti al volume in mL della sospensione siglate con data e codice campione. Aliquotare 1 mL di sospensione cellulare in ogni provetta da congelamento
- Trasferire le provette da congelamento in congelatore a -80°C
- Dopo 48 ore trasferire le provette da congelamento in azoto liquido

C5.2. Scongelo e coltura linfociti

- Prelevare una provetta da congelamento dal contenitore di azoto liquido
- Scongelo rapidamente la provetta da congelamento in bagno termostato a 37°C
- Trasferire il contenuto in un tubo da 15 mL contenente 5 mL di terreno di scongelamento costituito da:
- 50% Fetal Calf Serum, 50%RPMI
- Centrifugare a 1000 rpm per 8 minuti
- Eliminare il sopranatante aggiungere 5 mL di RPMI. Sospendere bene prelevare 10 μ L di sospensione cellulare trasferirli in una eppendorf contenente 10 μ L di Trypan Blue. Caricare 10 μ L di sospensione in un vetrino per la conta cellulare (Kova Glasstic 10). Conta delle cellule presenti su 9 quadratini, presi su una delle diagonali della camera, al microscopio ottico in contrasto di fase con obiettivo 20x.

Calcolo del numero di cellule vitali totali:

Numero di cellule vitali (chiare) su 9 quadratini x 2 (fattore di diluizione in Trypan Blue) x 5 (volume in mL) x 10⁴ (rapporto tra mL e volume della camera)

Calcolo della vitalità:

[Numero di cellule vitali (chiare)/Numero di cellule vitali (chiare)+Numero di cellule morte (scure)]x100

- Centrifugare a 1000 rpm per 8 minuti
- Preparare il terreno di coltura:
- RPMI, Fetal Calf Serum 15%, Fitoemoagglutinina HA15 (Remel) ricostituita 2%.
- Scartare il sopranatante e aggiungere 5 mL di terreno di coltura.

- Trasferire la quantità di sospensione cellulare equivalente ad approssimativamente 1×10^6 di cellule vitali in tanti tubi da 15 mL quanti sono i punti sperimentali previsti. Aggiungere ad ogni tubo terreno fino ad 1 mL di coltura complessiva. Per esigenze sperimentali la quantità di cellule può essere ridotta a 7.5×10^5 in 750 μ L. In ogni esperimento devono essere previste almeno 3 dosi di trattamento, un controllo negativo e un controllo positivo. Ogni punto sperimentale deve essere duplicato.
- Mettere i tubi inclinati e con il tappo leggermente svitato in incubatore a 37°C, 5% CO₂, 95% umidità. Questo rappresenta il tempo 0 dell'esperimento.
- Nello studio descritto in questo rapporto i linfociti sono stati trattati con i vari tipi di sospensioni di Titanio al tempo 24 h e al tempo 43,5h. Altre modalità di trattamento incluse quelle che prevedono l'utilizzo dell'attivazione metabolica sono riportate nella linea guida OECD 487.
- Al tempo 44h le colture sono trattate con Citocalasina B aggiungendo, ad ogni coltura da 1 mL, 2,25 μ L di soluzione 2 mg/mL di Citocalasina B in DMSO (aggiustare il volume di soluzione di Citocalasina B in caso di colture da 750 μ L). Aliquote da 50 μ L di soluzioni Citocalasina B sono congelate a -20°C.
- Terminare la coltura dopo 72 ore.

C5.3. Preparazione dei vetrini, colorazione e analisi al microscopio

- Centrifugare i tubi a 1000 rpm per 8 minuti.
- Scartare il soprannatante, sospendere il pellet e aggiungere 250 μ L di PBS a ciascun tubo.
- Per ogni punto sperimentale siglare 2 vetrini con l'indicazione del codice esperimento e il punto sperimentale. Allestire i preparati cellulari sui vetrini utilizzando citocentrifuga Shandon caricando 100 μ L di sospensione in ogni cytofunnel. Citocentrifugare a 600 rpm per 5 minuti.
- Osservare i vetrini al microscopio ottico in contrasto di fase. Allestire un secondo e, se il primo vetrino non fosse di buona qualità, eventualmente un terzo vetrino aggiustando il volume (non meno di 70 μ L ma non più di 120 μ L) sulla base dell'osservazione del primo vetrino.
- Lasciare asciugare i vetrini 10 minuti quindi fissarli 10 minuti in metanolo assoluto. Lasciare evaporare il metanolo e conservare i preparati a temperatura ambiente.
- Procedere alla colorazione il giorno successivo. Preparare in una vaschetta per colorazione vetrini tipo Hellendal alta circa 60 mL di soluzione di Giemsa al 10% in tampone Sorensen 1/15 M (6 mL di Giemsa, 27 mL di soluzione Na₂HPO₄ 1/15M, 27 mL di soluzione KH₂PO₄ 1/15M).
- Immergere i vetrini nella vaschetta e lasciarceli per circa 4 ore.
- Al termine delle 4 ore sciacquare ogni singolo vetrino agitando vigorosamente in un becher contenente acqua distillata. Osservare i vetrini al microscopio con obiettivo 20x. Nel caso aggiustare la colorazione prolungando il periodo in Giemsa o ripetendo lo sciacquo in acqua distillata.
- Lasciare asciugare perfettamente i vetrini e procedere con l'analisi al microscopio di due vetrini per punto sperimentale. I criteri per l'analisi al microscopio sono riportati sull'articolo di Fenech (2007).
- Con l'obiettivo 100x eseguire l'analisi al microscopio partendo da uno dei due poli del cerchio occupato dalle cellule. Inizialmente, per avere informazioni sulla tossicità del trattamento, analizzare su ogni vetrino 400 cellule e rilevare il numero di linfociti mononucleati, binucleati e multinucleati (tri e tetranucleati) e calcolare il *replication index* secondo la formula:

$$RI = \frac{\text{Numero di binucleate} + 2 \times \text{Numero di multinucleate}}{\text{Numero di mononucleate} + \text{Numero di binucleate} + \text{Numero di multinucleate}}$$

- Procedere quindi all'analisi di 250 binucleate per il rilevamento di micronuclei.
- Per ogni punto sperimentale calcolare il RI sulla media dei 4 valori ottenuti (2 per ciascuna replica) e la Frequenza di micronuclei su 1000 binucleate sommando le frequenze per 250 binucleate ottenute su ciascuno dei 4 vetrini (2 per ciascuna replica).

- I criteri di accettabilità sperimentale sono riportati nella linea guida OCSE così come i criteri di valutazione degli effetti basati sulla significatività statistica, sulla presenza di una relazione dose effetto, sulla riproducibilità intra- e inter-esperimento e sul confronto rispetto ai propri controlli storici.

C6. Procedure di sicurezza

Tutte le procedure sopra descritte devono essere condotte in condizioni di sterilità e sotto una cappa a flusso laminare (*biological hazard standard*). Tutti i materiali e prodotti a contatto con le cellule devono essere sterili. I rifiuti solidi e liquidi devono essere scartati secondo le procedure relative ai rifiuti biologici. Durante la manipolazione delle cellule e le procedure di saggio l'operatore deve sempre indossare i necessari Dispositivi di Protezione Individuale (DPI):

- Guanti
- Camici
- Coprimaniche
- Occhiali di protezione
- Guanti criogenici.

*Serie Rapporti ISTISAN
numero di novembre 2015*

*Stampato in proprio
Settore Attività Editoriali – Istituto Superiore di Sanità*

Roma, novembre 2015