

UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI PARMA

Dottorato di ricerca in Scienze della Prevenzione

Ciclo XXVII

Genotossicità ed epigenotossicità di
nanomateriali ingegnerizzati

Coordinatore:

Chiar.mo Prof. Antonio Mutti

Tutor:

Chiar.mo Prof. Antonio Mutti

Chiar.ma Prof.ssa Annamaria Buschini

Dottorando: Dr. Alessio Perotti

Il ciarlatano studia le malattie negli organi malati, dove non trova che gli effetti, rimanendo ignorante per quello che riguarda le cause. Il vero scienziato studia le cause delle malattie, studiando l'uomo universale.

- Paracelsus (1493 – 1541)

Sommario

Abstract	5
Introduzione	7
Nanomateriali (NM)	9
Titanio.....	11
Cobalto	15
Solfuro di cadmio	18
Epigenotossicologia.....	20
Modificazioni istoniche	22
RNA non codificanti.....	25
Metilazione del DNA.....	26
Metilazione e NM.....	31
Strumenti di analisi epigenotossicologica – L’analisi del metiloma.....	32
Materiali e Metodi	36
Colture cellulari:	36
Nanomateriali utilizzati:	37
Vitalità cellulare – MTS Assay.....	39
Specie reattive dell’ossigeno – DCFH-DA	40
Genotossicità – Comet Assay	41
Epigenotossicità – Comet M.....	43
Epigenotossicità – Valutazione dell’attività trascrizionale delle DNMT mediante Real Time PCR.....	48
Analisi statistica.....	48
Risultati.....	50
Genotossicità.....	52
TiO ₂ NP:	52

Co ₃ O ₄ NP.....	55
CdS NP	59
Epigenotossicità	61
Ripetibilità	62
Sensibilità nei confronti di macrovariazioni di metilazione	64
Attività trascrizionale DNMT	67
Epigenotossicità NP	68
Discussione.....	69
Conclusioni e prospettive future.....	83
Bibliografia	85

Abstract

La rapida espansione del campo delle nanotecnologie ha implicato l'ingresso e la successiva diffusione di nanoparticelle (NP) a base di ossidi metallici in ambiente domestico e lavorativo, suscitando di conseguenza una problematica sanitaria rilevante. Gli individui esposti a NP non sono esclusivamente i consumatori finali di prodotti contenenti nanomateriali ma anche lavoratori che possono potenzialmente venire in contatto con NP durante tutte le fasi del ciclo produttivo. L'internalizzazione delle nanoparticelle nel citoplasma può indurre risposta infiammatoria, effetti citotossici, genotossici, epigenotossici e cancerogeni.

Questa tesi è incentrata su tre NP a base metallica, NP di biossido di titanio (TiO_2 NP), NP di cobalto (II, III) ossido (Co_3O_4 NP), *quantum dots* di solfuro di cadmio (CdS NP), il cui uso estensivo in processi industriali rende necessario caratterizzarne approfonditamente gli effetti. Gli effetti delle NP selezionate sono stati saggiati su linee cellulari in vitro rappresentative dei tessuti con più alto rischio associato all'esposizione: A549 (cellule umane di adenocarcinoma polmonare), HepG2 (cellule umane di carcinoma epatocellulare), HUVEC (*Human Umbilical Vein Endothelial Cells*), HAEC (*Human Aorta Endothelial Cells*) e cardiomiociti di ratto da espanto primario. Le linee cellulari sono state saggiate per l'induzione di citotossicità (MTS assay), genotossicità (comet assay), induzione di specie reattive dell'ossigeno (ROS – test in fluorescenza con DCFH-DA) ed effetti epigenotossici.

Al fine di valutare le possibili interazioni epigenetiche, questa tesi propone lo sviluppo e successiva applicazione di una nuova metodica basata su un sistema solido ed ampiamente usato come il comet assay. Il protocollo modificato del comet assay alcalino è in grado di rilevare macrovariazioni di metilazione globale in una popolazione di cellule attraverso la digestione con due enzimi di restrizione (HpaII, MspI). È stata saggiata la ripetibilità del metodo e la sua sensibilità nei confronti di variazioni nei livelli della metilazione globale usando due sostanze con azione nota sul metiloma: decitabina (agente demetilante) e cloruro di nichel (NiCl_2 – agente ipermetilante). In aggiunta, al fine di verificare se l'interazione con xenobiotici potesse avere effetti anche sui sistemi cellulari di mantenimento del metiloma si è provveduto a saggiare i livelli trascrizionali dei geni delle DNA metiltransferasi (DNMT) tramite RT-PCR real time. Il protocollo modificato del comet

assay è stato quindi utilizzato per verificare eventuale attività epigenotossica di Co_3O_4 NP e TiO_2 NP sulla linea cellulare A549.

Le NP a base di cobalto e titanio hanno mostrato una bassa citotossicità su tutte le linee saggiate, mentre le NP a base cadmio hanno mostrato una citotossicità più alta con valori di IC50 di circa $14\mu\text{g}/\text{ml}$.

Tutte le NP hanno causato l'induzione di genotossicità, a seguito dell'esposizione, in tutte le linee cellulari valutate. In particolare, la genotossicità indotta da Co_3O_4 NP e le TiO_2 NP è stata rilevata a concentrazioni che non presentavano citotossicità significativa. La maggioranza delle linee cellulari sembra recuperare lo stress genotossico indotto in tempi variabili caratteristici di ogni singola linea cellulare. La linea HAEC esposta a Co_3O_4 NP ha mostrato l'induzione di ROS e di frammentazione genomica, unitamente a una diminuzione dell'attività metabolica.

Delle due NP saggiate (Co_3O_4 NP e TiO_2 NP), solo le Co_3O_4 NP hanno mostrato effetti a carico del metiloma cellulare. L'esposizione a Co_3O_4 NP ha determinato nella linea A549 l'induzione di una lieve seppur significativa demetilazione globale. Questa evidenza, unitamente all'aumento dei livelli di ROS e l'induzione di genotossicità riportati, pone la necessità di riconsiderare il rischio associato all'esposizione a nanoparticelle a base di cobalto.

Introduzione

Negli ultimi anni i nanomateriali (NM) hanno rappresentato un argomento di forte impatto a causa delle loro caratteristiche peculiari. La rapida espansione delle nanotecnologie ha comportato la larga e rapida diffusione di materiali riconducibili alla classe delle nanoparticelle (NP) in numerosi campi applicativi come la chimica [1], l'elettronica [2] e l'ingegneria biomedica [3,4], con la loro conseguente diffusione in ambienti domestici e lavorativi. I nanomateriali ingegnerizzati sono stati trasformati in numerosi prodotti di consumo della vita di tutti i giorni [5], come i nanomateriali a base carboniosa (fullerene, nanotubi di carbonio), le particelle a base metallica (ossidi metallici, quantum dots) e i dendrimeri (nano polimeri ramificati). Le particelle in scala nanometrica sono ritrovabili in prodotti come creme cosmetiche (nanoparticelle di TiO_2), materiali isolanti (aerogel di silice), batterie elettriche ad alta densità (nanoparticelle di LiCoPO_4), nanocarrier di farmaci (nanoparticelle d'oro funzionalizzate) e supporti di memorizzazione di massa (*hard disk* a base di ossidi metallici semiconduttori), solo per citare alcuni esempi.

A causa delle loro dimensioni le NP sono in grado di penetrare il tratto respiratorio, superando la barriera ematopolmonare e venendo quindi in contatto potenzialmente con l'intero sistema cardiocircolatorio. Gli effetti sulla salute di metalli grezzi e di particelle grossolane sono ben conosciuti, tuttavia le informazioni sui possibili effetti innescati da nanoparticelle a base metallica sono ancora carenti. Bisogna considerare che alcune delle proprietà che rendono i NM unici per applicazioni tecnologiche (ridotta dimensione, composizione chimica, struttura, alto rapporto superficie/volume e forma) possono riflettersi in rischi per la salute umana attraverso l'induzione di effetti cito e genotossici, infiammatori e, addirittura, cancerogeni. Al diminuire delle dimensioni delle particelle aumenta il rapporto tra superficie per unità di massa (S/V), proprietà che rende i NM estremamente reattivi in ambiente cellulare. In più l'aumento del rapporto S/V permette ai NM di acquisire proprietà chimico-fisiche non normalmente possedute dallo stesso materiale non in scala nanometrica.

I lavoratori sono da considerarsi categoria esposta a nanomateriali sia durante la fase produttiva, la fase di utilizzo ed il riciclo o smaltimento di sostanze contenenti NM. Diventa pertanto necessario, in virtù del rischio occupazionale, ampliare le conoscenze delle risposte e delle conseguenze causate a livello cellulare dai suddetti materiali.

Sebbene si stiano accumulando in letteratura riscontri su possibili effetti delle NP a carico del materiale genetico della cellula, poco si conosce degli effetti di tali materiali a carico dell'epigenoma cellulare. Evidenze sperimentali mostrano come variazioni dell'epigenoma possano fungere da portali per l'acquisizione di un'instabilità genomica. Tale instabilità è riconosciuta essere un requisito fondamentale per l'inizio del processo di tumorigenesi, che potrà poi essere eventualmente proseguito e consolidato da modifiche più consistenti al genoma.

I cambiamenti epigenetici patologici sono ormai considerati come meccanismi aggiuntivi ad alterazioni geniche ed aberrazioni cromosomiche nell'interferire con l'espressione genica. Tra questi cambiamenti si annoverano l'ipometilazione globale del DNA (ritrovabile nella maggior parte dei tumori), l'ipermetilazione delle isole CpG adiacenti i promotori di geni oncosoppressori e l'ipometilazione di promotori di oncogeni, le alterazioni della cromatina e la perdita di imprinting genomico (LOI – *Loss Of Imprinting*).

Risulta evidente quindi come, in ambito tossicologico, sia necessario rivoluzionare i paradigmi fino ad ora consolidati nell'ambito della ricerca. All'usuale approccio tossicologico e genotossicologico è quindi necessario affiancare un nuovo approccio di tipo epigenotossicologico al fine di valutare la possibile influenza di fattori fisici e xenobiotici sull'eredità epigenetica dell'individuo.

È verosimile ipotizzare che l'interazione con xenobiotici porti con maggiore probabilità a macrovariazioni aspecifiche nei profili di metilazione della cellula. Per tale motivo, nell'ambito di questo progetto di dottorato si è scelto di focalizzare l'approccio epigenotossicologico a partire proprio dall'analisi delle macrovariazioni nei pattern di metilazione.

Nanomateriali (NM)

L'American Society for Testing and Materials International (ASTM International) definisce i nanomateriali come particelle di lunghezza variabile tra 1 e 100 nm a due o tre dimensioni [6].

Il volume di letteratura disponibile sugli effetti sulla salute dei NM è in aumento, anche a causa della progressiva e crescente immissione sul mercato di prodotti *end-user* (EUP) contenenti NM. Si stima che la produzione di nanoparticelle aumenterà dalle 2300 tonnellate prodotte nel 2008 fino a 58000 tonnellate entro il 2020 [7].

Sebbene si ponga particolare attenzione agli effetti dovuti all'esposizione a NM da parte dell'utente finale, il rischio sanitario maggiore si riscontra nelle categorie lavorative professionalmente esposte a NM alle varie fasi del processo produttivo, in quanto potenzialmente esposti a dosi e a forme (polveri libere inalabili/ingeribili, sospensioni liquide, etc.) del materiale completamente differenti rispetto ad un consumatore finale [8,9].

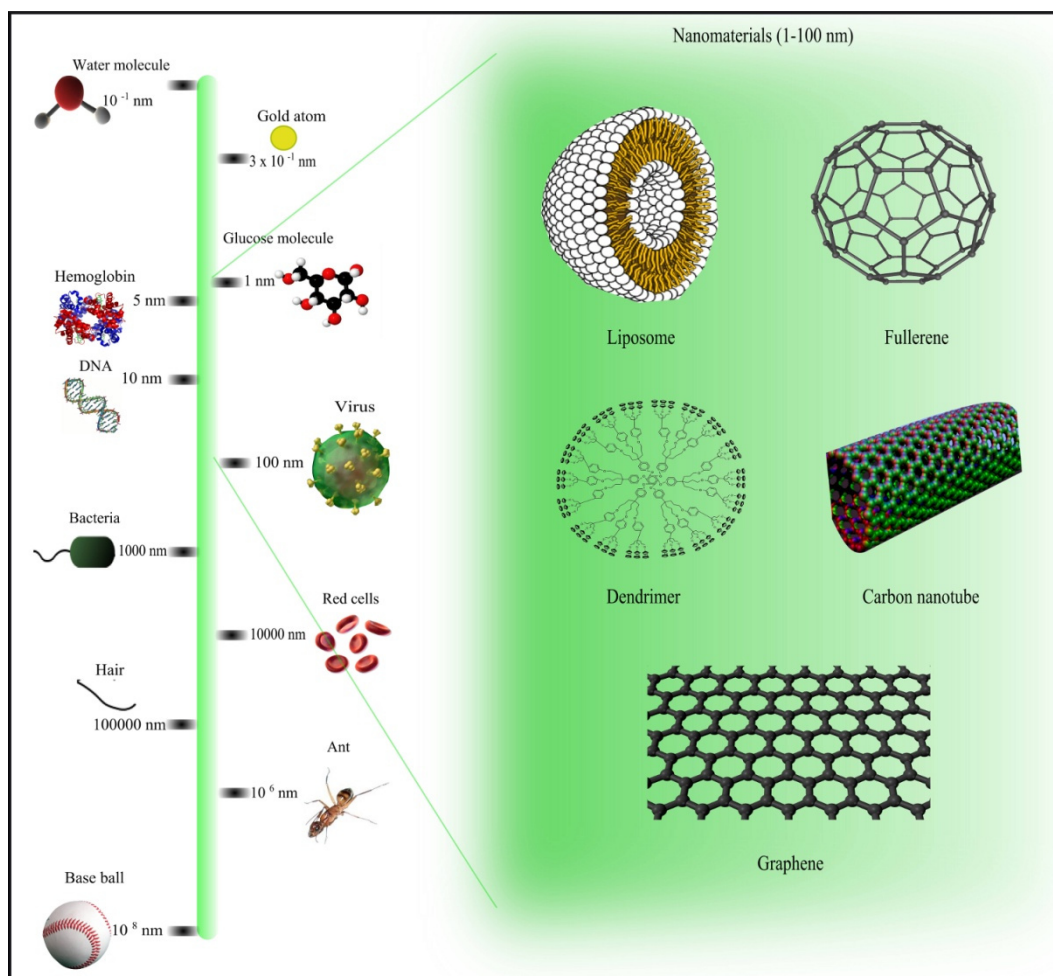


Figura 1 - comparazione dimensionale di NP [10]

Nonostante l'aumento delle conoscenze sull'azione dei composti in nano-scala, rimangono ancora severe lacune sugli effetti di questi composti a livello molecolare all'interno dell'ambiente cellulare. La caratterizzazione dettagliata dell'interazione tra i NM e il sistema cellula è una necessità imprescindibile, al fine di comprendere nel dettaglio i potenziali rischi che una nanoparticella comporta. Sebbene in ambito tossicologico l'analisi in vitro offra una caratterizzazione meno dettagliata degli effetti dei NM, bisogna considerare che gli studi in vivo richiedono una precisa ed esaustiva conoscenza delle cinetica e della tossicità del materiale, restituendo spesso risultati la cui interpretazione richiede un tempo ed uno sforzo maggiore. L'analisi tossicologica condotta su linee cellulari in vitro costituisce un approccio iniziale ed insostituibile al fine di comprendere come un agente interagisca con i vari distretti cellulari. Sebbene la dimensione media delle nanoparticelle sia considerata uno dei fattori preponderanti nel definire la tossicità delle stesse, sempre più evidenze si accumulano sulla necessità di prendere in considerazione anche altre proprietà. Alcune delle proprietà di cui tenere conto, in base alla letteratura esistente [11], includono:

- Numero di particelle e loro distribuzione dimensionale
- Concentrazione delle NP in relazione al tessuto bersaglio
- Trattamenti superficiali (*coating*)
- Grado di aggregazione (in grado di influenzare fortemente la deposizione delle NP nel tessuto del polmone)
- Carica superficiale e potenziale di attrazione elettrostatica
- Forma delle NP
- Metodi di sintesi delle NP (in grado di influenzare il grado di aggregazione)

Una classificazione dei NM presenta numerose complessità, a causa della loro incredibile varietà e dell'eterogeneità dei criteri di classificazione adottabili. Per i soli nanotubi di carbonio sono state presentate più di 5000 richieste di brevetto e più di 50000 tipologie di nanotubi sono state riportate come prodotte [8]. Una delle classificazioni più comuni classifica le nanoparticelle a seconda della composizione di partenza, distinguendole in:

- nanoparticelle a base carbonio, come fullereni, nanotubi a parete singola e multipla e grafene
- nanoparticelle a base metallica come NP d'oro e ossidi metallici

Nell'ambito di questa tesi è stato scelto di concentrarsi sulle NP appartenenti alla categoria delle NP a base metallica, selezionando tre tipologie di NP di ossidi metallici altamente rappresentativi della categoria: biossido di titanio (TiO_2 – Ti NP), ossido di cobalto (Co_3O_4 – Co NP) e solfuro di cadmio (CdS – Cd NP).

Titanio

Il titanio (Ti) è il ventiduesimo elemento più abbondante nella crosta terrestre, con una concentrazione media di 4400 mg/kg. A causa della sua grande affinità per l'ossigeno ed altri elementi raramente si presenta allo stato metallico in natura ma forma tipicamente composti con numero di ossidazione +4 (ma sono presenti anche composti a +3 e +2). Il biossido di titanio (TiO_2 - CAS-N° 13463-67-7), conosciuto anche come ossido di titanio (IV) o bianco di titanio, è l'ossido naturale del titanio. Si presenta come una polvere bianca inodore ed insolubile ($M = 79.9 \text{ g/mol}$) che proprio per il suo colore è stata ampiamente utilizzata come pigmento. In natura si ritrova sotto tre forme cristalline (anatasio, rutilio e brookite) di cui l'anatasio è la più reattiva chimicamente [12,13]. Ad oggi le TiO_2 NP sono prodotte ed utilizzate largamente per la loro alta stabilità e le loro proprietà foto catalitiche ed anticorrosive. Alcuni dati di letteratura attribuiscono l'alta attività catalitica, rispetto al particolato fine di titanio (Ti FP), all'aumentato rapporto superficie volume, mentre altri la attribuiscono alla prevalenza di anatasio nella composizione del particolato [12,13]. Alcuni degli usi delle TiO_2 NP comprendono catalizzatori nella fotocatalisi di fotoconduttori, trattamento di acque contaminate da sottoprodotti industriali pericolosi [14] e celle solari nano cristalline [15].

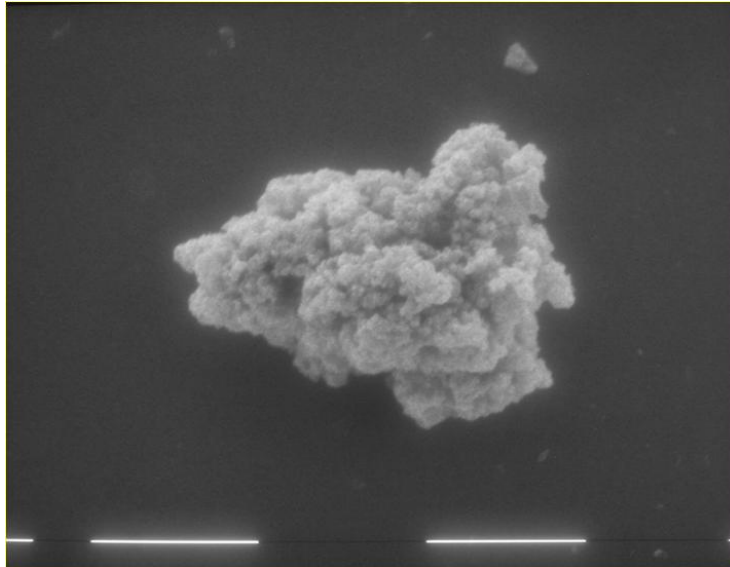


Figura 2 - Aggregato di nanoparticelle di biossido di titanio (TiO₂) visualizzate mediante microscopia TEM

Nel campo della nano medicina, le TiO₂ NP sono state proposte per l'utilizzo nell'*imaging* avanzato e nella nano terapeutica [15]. Ad esempio, le Ti NP sono state individuate come possibili foto sensibilizzatori da usare nella terapia fotodinamica [16]. Alcune delle caratteristiche fisico chimiche delle TiO₂ NP le rendono inoltre ideali per l'utilizzo in prodotti per la cura della pelle: nano preparazioni di TiO₂ NP sono state proposte come trattamento dell'acne vulgaris, dei condilomi acuminati ricorrenti, di dermatiti atopiche e lesioni della pelle iperpigmentate [5,17].

Il titanio si ritrova normalmente nei tessuti animali anche se solamente in tracce, non c'è prova che il titanio possa essere un elemento essenziale per gli esseri viventi. La *American Conference of Governmental Industrial Hygienists* ha assegnato un valore soglia di 10 mg/m³ come media pesata temporale (TWA) per una giornata lavorativa di 8 ore in una settimana lavorativa di 40 per le TiO₂ FP. I limiti di esposizione permessi (*Permitted Exposure Limits - PEL*) basati sulla TWA dell'*Occupational Safety & Health Administration* (OSHA) sono invece stati posti a 15 mg/m³. Nell'aprile 2011 lo "United States National Institute for Occupational Safety and Health" (NIOSH) ha proposto un limite di esposizione di 2,4 mg/m³ per le Ti FP e di 0,3 mg/m³ per le Ti NP come TWA riferita a un periodo di esposizione professionale di una giornata di 10 ore in una settimana lavorativa di 40. Tali valori risultano molto più bassi dei PEL indicati dall'OSHA [18]. L'esposizione del lavoratore avviene principalmente durante la manipolazione sia del particolato libero sia del prodotto contenente il particolato [19].

L'esposizione a TiO₂ NP può avvenire sia durante il processo produttivo che durante l'uso del prodotto finito e il tipo di esposizione può variare tra l'esposizione a aerosol, sospensioni ed emulsioni. Le vie di esposizione principali durante l'attività lavorativa che abbiano rilevanza tossicologica sono inalazione ed esposizione dermica, tra queste l'inalazione è quella che riveste il ruolo preponderante nell'esposizione professionale. Le NP inalate si distribuiscono lungo il tratto respiratorio a diverse concentrazioni a seconda della dimensione (Figura 3).

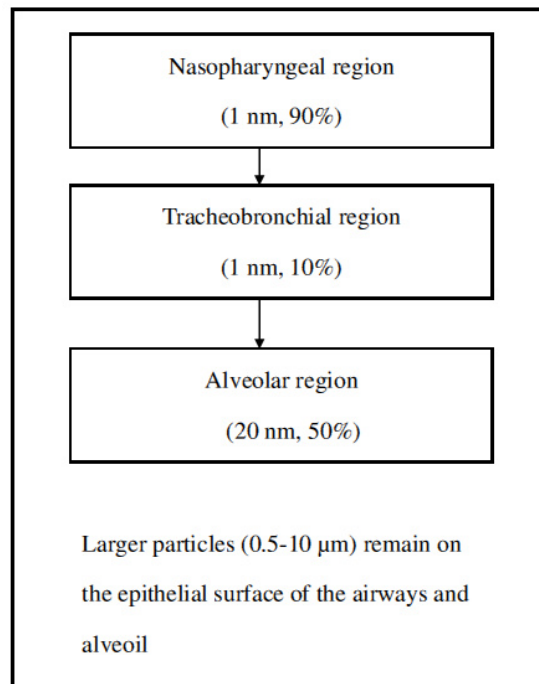


Figura 3 distribuzione delle Ti NP inalate lungo il tratto respiratorio [20]

Non ci sono dati disponibili relativi all'assorbimento post-inalazione in uomo, tuttavia sono disponibili studi in ratto. Muhlfeld et al. [21] riportano come una piccola frazione di NP di titanio inalate (20nm) si distribuisca dal lume delle vie respiratorie di ratti maschi adulti WKY/NCrl BR al tessuto interstiziale e da qui venga rilasciata nel torrente circolatorio. Dopo l'assorbimento iniziale, l'apparato circolatorio può distribuire le NP ai tessuti ed agli organi dell'intero organismo. Tra questi l'accumulo maggiore si riscontra in fegato e tessuto linfatico [22,23].

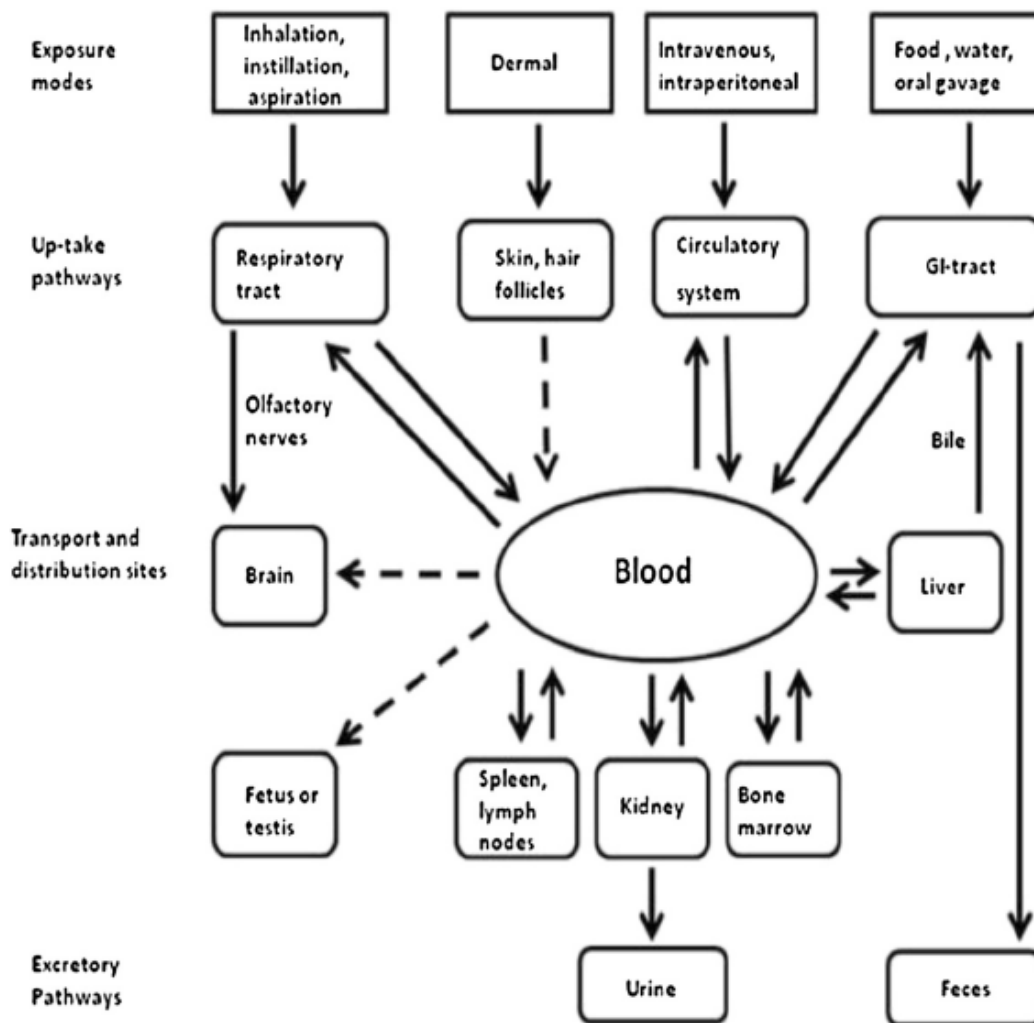


Figura 4 - Tossicocinetica e siti di accumulazione delle NP di TiO₂, le linee tratteggiate indicano incertezza dell'evidenza [20]

A causa del loro ampio uso in processi industriali e prodotti di consumo per le loro forti proprietà catalitiche, sono state sollevate preoccupazioni in merito ad una possibile interazione biologica che potrebbe rappresentare un rischio per la salute umana [5,11,24]. La letteratura disponibile conferma come le NP di titanio presentino una tossicità maggiore rispetto al Ti FP [22,25–27].

Non si ha a disposizione dati di letteratura sulla tossicità acuta negli esseri umani ma sono disponibili alcuni studi su modelli animali (Tabella1).

Le evidenze di letteratura che si concentrano sul tratto respiratorio prevalgono numericamente su tutte le altre vie di esposizione. Si sono registrati sia effetti locali che sistemici associati all'esposizione a TiO₂ NP, sono stati rilevati entrambi anche in merito ad aggravamenti di condizioni preesistenti. Le proprietà infiammatorie delle NP sono più

evidenti rispetto alle FP a parità di proprietà chimiche e concentrazione [20]. Vi sono prove della capacità delle NP, a seguito di un'esposizione acuta, di penetrare attraverso la barriera emato-polmonare o il tratto gastrointestinale accumulandosi in organi diversi come fegato, reni, milza o cervello. La distribuzione e l'accumulo delle NP a livello di organo può promuovere lesioni e risposta infiammatoria, tuttavia le dosi utilizzate in tali studi sono troppo alte per essere riscontrabili in esposizioni occupazionali realistiche [22,23,28].

Nell'ambiente lavorativo, tuttavia, la tossicità cronica è quella che comporta un rischio potenziale più elevato ed a cui viene riservato un maggiore riguardo. La letteratura a tuttora suggerisce che le Ti NP possano presentare una tossicità moderata. Sono stati riportate lesioni polmonari e infiammazione dopo esposizione cronica (12 settimane) di ratti (Fischer 344) a TiO_2 NP [27]. L'esposizione cronica a NP di titanio (5-6nm) per una durata di 90gg su ratti ICR somministrate per via intragastrica ha mostrato lesioni croniche spleniche, con alterazione delle specie cellulari circolanti e aumento delle citochine pro-infiammatorie [29].

Cobalto

Il cobalto è un metallo di transizione ben conosciuto per le sue proprietà ferromagnetiche. Nella crosta terrestre si ritrova solo in composizione con altri elementi chimici, ad eccezione di piccoli depositi trovati in leghe di ferro meteorico. Il cobalto metallico, ottenuto per fusione riduttiva, si presenta come un metallo lucido, duro ed argenteo. Alcuni composti di cobalto vengono utilizzati fin dall'antichità per la produzione di pigmenti blu. Ad oggi il cobalto è principalmente utilizzato in forma metallica per la preparazione di leghe magnetica ad alta durezza. Negli organismi viventi il cobalto in forma atomica costituisce il sito attivo degli enzimi della famiglia delle cobalammine, il cui esempio più comune è la vitamina B12; tuttavia, pur essendo classificato come un microelemento essenziale, non sono mai stati descritti nell'uomo sintomi effettivi della carenza di cobalto [30].

La tossicità del cobalto è nota da lungo tempo. Il cobalto presenta tossicità acuta in alte dosi e effetti di accumulo/cronici per esposizioni prolungate a basse dosi; gli effetti sono multi-organo ed includono effetti a carico della tiroide (inibizione della tirosina deiodinasi, mixedema e gozzo [31]), dei polmoni (asma e pneumoconiosi [32]), della pelle (dermatite allergica da contatto) e del sistema immunitario. Il meccanismo di tossicità del cobalto non è ancora completamente chiarito ma si pensa possa essere correlato alla sua alta affinità per i

gruppi sulfidrilici che potrebbe causare l'inibizione di enzimi chiave della respirazione mitocondriale [31], ai suoi effetti come antagonista dei canali del Ca^{2+} con conseguente inibizione dell'influsso di calcio e della segnalazione ad esso correlata [33], e alla generazione di specie reattive dell'ossigeno (ROS) a livello cellulare con conseguente danno ossidativo a proteine, lipidi e materiale genetico [34,35]. Probabilmente uno degli effetti più rilevanti del cobalto a livello cellulare è l'attivazione del fattore inducibile da ipossia (HIF-1 α) con la conseguente attivazione trascrizionale dei set genici di risposta all'ipossia bersagli di HIF-1 α . L'attivazione di tali geni può quindi portare all'inizio ed alla evoluzione del processo di tumorigenesi con l'attivazione di profili trascrizionali per l'angiogenesi, trasporto di glucosio, enzimi glicolitici, della proliferazione e checkpoint del ciclo cellulare [34,36].

Sotto forma di NP il cobalto si può presentare come ossido di cobalto (Co_3O_4 – Figura 5), composti organici metallici e biopolimeri [37,38].

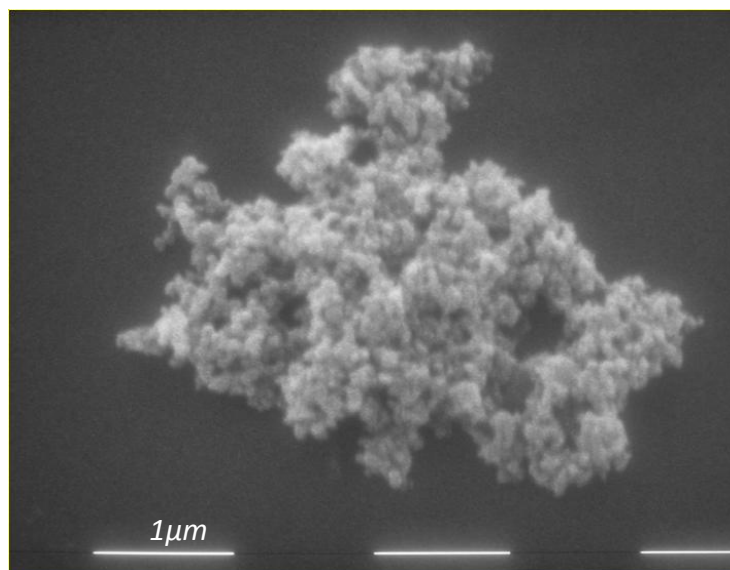


Figura 5 Aggregato di nanoparticelle di ossido di cobalto (Co_3O_4) visualizzate mediante microscopia TEM

Le applicazioni spaziano dal campo biomedico (formazione e coating di nano polimeri magnetici [39]), elettronico (NP colloidali di ferrite-cobalto per le supporti di memoria magnetica [40]) e clinico (agenti di contrasto nella risonanza magnetica in combinazione con oro [41], ferro e grafite [42] e platino [43]).

Nel settore occupazionale l'esposizione al cobalto ed ai suoi composti in forma di FP può portare a numerose patologie polmonari come polmonite interstiziale, fibrosi e asma [44–46]. La cancerogenicità del cobalto è stata valutata dallo IARC nel 1991 che, a fronte di non

esaustive evidenze nell'uomo ma di sufficienti dati in modelli animali, ha ritenuto di assegnarlo alla categoria 2A (probabilmente cancerogeno per l'uomo) [47]. Sebbene l'applicazione delle Co NP sia in crescita, gli studi sui loro effetti a livello biologico sono limitati, in particolare se paragonati a quelli relativi alla loro controparte in forma FP. Va anche aggiunto che la tossicocinetica dettagliata del cobalto è ancora in fase di caratterizzazione sia per le FP che per le NP.

In un primo tempo si è ipotizzato che la tossicità del cobalto si esprimesse esclusivamente tramite la sua forma ionica in conseguenza a processi di solubilizzazione. Era ipotesi diffusa quindi che fosse sufficiente valutare l'attività dei composti solubili al fine di determinare la tossicità dei composti a base di cobalto[46]. Tuttavia la letteratura dimostra come l'attività biologica delle NP di cobalto non sia esclusivamente mediata dalla forma ionica dissolta nella matrice biologica [46].

Per le vie di esposizione a Co NP vale quanto detto per le Ti NP, con l'inalazione e l'ingestione come vie di esposizione predominanti in contesto lavorativo.

Studi di letteratura, ed evidenze sperimentali osservate nell'ambito del progetto di dottorato descritto in questa tesi, hanno mostrato come le NP di cobalto entrino all'interno delle cellule rapidamente rimanendo confinate all'interno di vescicole endocitiche causando un rapido sviluppo di ROS [48]. Le evidenze sperimentali indicano che sia il Co FP che il Co NP esprimono un certo potenziale genotossico e cancerogeno sia in sistemi sperimentali in vivo che in vitro . In più, uno studio in vivo su ratti dimostra che Co NP veicolate per iniezione subdermale sono in grado di indurre neoplasie maligne di origine mesenchimale, mentre Co FP non ha mostrato un effetto simile a parità di dose [49]. Gli studi in vitro dimostrano che le Co NP sono in grado di indurre frammentazione del DNA, aberrazioni cromosomiche (aneuploidia, poliploidia e tetraploidia) e trasformazioni morfologiche in linee cellulari umane. La genotossicità del Co NP si è ancora una volta dimostrata maggiore del Co FP e del Co ionico. Le Co NP sono state riportate causare anche infiammazione e stress ossidativo in popolazioni di fibroblasti in vitro unitamente a effetti sull'ancoraggio e non-ancoraggio cellulare [50,51].

Solfuro di cadmio

Il cadmio (Cd) è un metallo del gruppo 12 rinomato per la sua alta tossicità, di cui sono riconosciuti gli effetti avversi nei confronti della salute umana [52–54]. Lo IARC lo ha classificato come un cancerogeno di classe I [55] già dal 1993 con successivi addendum nel 2012 [56].

A livello cellulare il cadmio non è un metallo essenziale ed è in grado, in parte anche alla somiglianza della sua forma ionica (Cd^{2+}) con lo ione calcio (Ca^{2+}), di perturbare le cascate segnalatorie cellulari con conseguenti effetti citotossici [57].

L'esposizione a cadmio e ai suoi composti è considerata un rischio occupazionale già da tempo in contesti lavorativi quali il settore minerario, quello dell'elettroplaccatura, produzione di batterie, plastica, pigmenti e componenti elettronici [58,59].

Una delle preoccupazioni maggiori legata al cadmio è la sua lunghissima emivita all'interno dei sistemi biologici (10-30 anni nell'uomo), in parte dovuta al basso tasso di escrezione e al conseguente accumulo nei tessuti [54,60]. Gli organi più colpiti includono polmoni, fegato reni e sistema muscoloscheletrico [54,59], ma sono stati esaminati di recente anche i suoi effetti neurotossici [61]. In particolare nel fegato e nei reni si ritrova circa un terzo del carico di Cd dell'organismo [57]. L'esposizione prolungata al Cd porta a disfunzione renale, glomerulopatia e tubulopatia con conseguente proteinuria. Con il tempo si instaura anche aminoaciduria, glicosuria, iperfosfaturia e calciuria. Quest'ultima condizione è la principale responsabile dei quadri di osteoporosi, osteomalacia e calcolosi delle vie urinarie presenti nei soggetti cronicamente esposti al cadmio. Le polveri e i fumi di cadmio sono inoltre chiamati in causa come induttori di enfisema polmonare e carcinoma polmonare. Altri quadri caratteristici sono l'atrofia delle mucose nasali e conseguente anosmia. Vi può inoltre essere anemia ferrocarenziale per riduzione dell'assorbimento di ferro, epatopatia e colorazione giallognola dello smalto dentale [59].

Negli anni l'esposizione lavorativa a Cd è stata fortemente regolamentata ma, con la comparsa sempre più frequente di nanocomposti a base Cd sul mercato si sta creando una lacuna di informazione sul possibile rischio tossicologico rappresentato da questa nuova classe di NP. Le nanoparticelle di Cd vengono utilizzate principalmente come punti quantici (o quantum dots – QD). In particolare i QD a base cadmio ricadono nella categoria II e IV di QD fluorescenti utilizzati come bio-sonde ad alte prestazioni. I QD sono nanocristalli singoli

di pochi nanometri di diametro (tipicamente sotto i 5 nm) utilizzati nel campo dell'imaging biomedico per le loro esclusive proprietà ottiche [62–64].

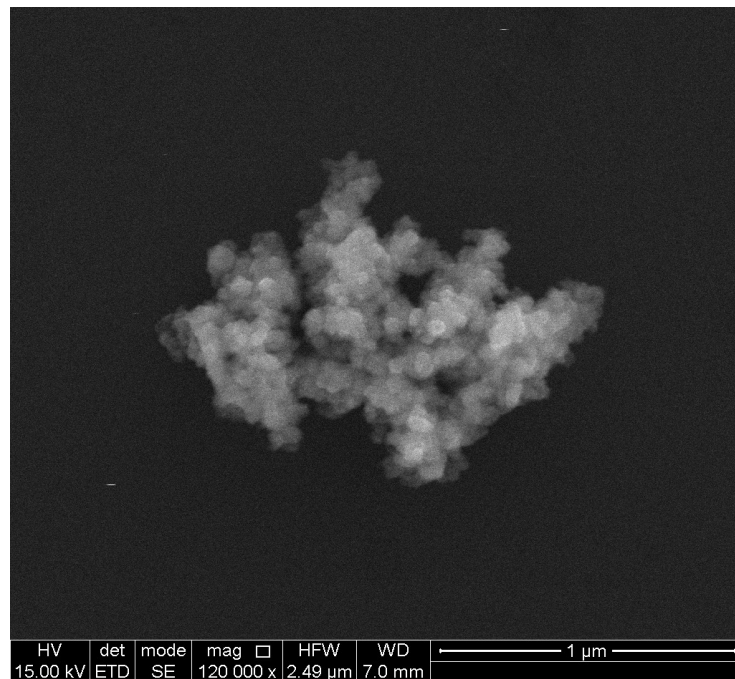


Figura 6 - Aggregato di nanoparticelle di solfuro di cadmio (CdS) visualizzate mediante microscopia TEM

Numerosi sono i composti di Cd utilizzati nella produzione di QD (CdSe, CdTe, CdS). Sebbene le vie di esposizione a QD non siano sostanzialmente diverse da quelle elencate per titanio e cobalto, la ridotta dimensione dei QD pone un ulteriore fattore di rischio nei confronti del lavoratore esposto, in quanto ad esempio, per l'inalazione di QD, la loro dimensione ne facilita grandemente l'arrivo agli alveoli con il successivo potenziale assorbimento e rilascio nel microcircolo [27,65]. Pochi sono i dati di letteratura disponibili sulla tossicità dei QD di CdS ma è noto che il potenziale tossico più alto si ritrova nelle NP di metallo *non coated*, in quanto è risaputo che il *coating* abbassa sensibilmente il potenziale tossico dei QD [65].

Nonostante le ridotte evidenze di letteratura sia sulle vie di esposizione, sia sull'assorbimento, si disegna un potenziale rischio dato che i QD hanno mostrato capacità di essere internalizzate in numerose tipologie cellulari attraverso meccanismi di tipo endocitico [66]. La letteratura suggerisce anche che possa sussistere un pericolo di bioaccumulo legato a questi NM in organi e tessuti, in quanto i QD hanno mostrato difficoltà di escrezione da parte di colture cellulari in vitro. Nonostante i QD a base Cd abbiano mostrato degradazione

a seguito di fotolisi o condizioni fortemente ossidanti, non vi sono dati sulla tossicità dei prodotti di degradazione di tali NM [67–71].

Epigenotossicologia

L'epigenetica (dal greco sopra la genetica), è la scienza che studia i cambiamenti ereditabili che regolano l'attività e l'espressione genica senza modificare la sequenza primaria del DNA. Le alterazioni epigenetiche regolano l'espressione genica principalmente tramite la modifica della condensazione locale della cromatina. Il livello della condensazione della cromatina è direttamente correlato all'accessibilità del materiale genetico da parte delle RNA polimerasi e, di conseguenza, è direttamente correlato alla trascrizione genica.

Fino a pochi anni fa l'analisi tossicologica di agenti potenzialmente cancerogeni veniva condotta secondo una prospettiva centrata sull'analisi dell'induzione di modificazioni a livello genoma. Era opinione diffusa che il pericolo maggiore a livello genomico rappresentato dall'interazione con xenobiotici fosse la mutazione o il danneggiamento fisico della molecola di DNA. In accordo con questa ipotesi, la maggior attenzione nell'analisi tossicologica è stata posta nei confronti degli effetti tossici e genotossici degli xenobiotici.

Tuttavia, sta emergendo la consapevolezza di come la programmazione epigenetica giochi un ruolo egualmente importante nel generare differenze fenotipiche individuali che possono influenzare la risposta a xenobiotici. Sta emergendo inoltre come l'epigenoma non sia un'entità statica ma dinamica e responsiva a numerosi percorsi di segnalazione cellulare evidenziando quindi la vulnerabilità di quest'ultimo nei confronti degli xenobiotici non solo in periodi dello sviluppo particolarmente delicati (ad esempio l'embriogenesi) ma altresì durante l'intero arco di vita dell'organismo. È quindi plausibile che esistano agenti che non presentano attività tossica o genotossica in grado di influenzare la funzione genica attraverso lo squilibrio dei meccanismi epigenetici anche in forma stabile ed a lungo termine, con conseguenze che potrebbero essere indistinguibili dagli effetti di danno fisico al DNA. L'organizzazione dell'epigenoma è stabile, seppur non invariabile, ed è in grado di essere ereditata transgenerazionalmente [72]; questa proprietà pertanto pone serie sfide per l'analisi tossicologica e del rischio.

L'organizzazione dell'epigenoma comincia all'atto del concepimento e prosegue durante l'embriogenesi generando un intricato profilo di espressione genica caratteristico degli

organismi superiori ed in particolare dell'uomo. Tali profili, a differenza della sequenza del genoma, sono tuttavia dinamici e responsivi a diversi stimoli ambientali a cui l'organismo si trova esposto durante lo sviluppo embrionale e nella prima infanzia. Nonostante la maggioranza dei profili dell'epigenoma venga stabilita durante l'embriogenesi e rimanga successivamente stabile, una frazione di queste modifiche rimane potenzialmente dinamica anche in età adulta [73]. È plausibile quindi che molte delle variabilità fenotipiche che si ritrovano in popolazioni umane possano essere un risultato di una programmazione epigenetica a lungo termine piuttosto che a differenze presenti nella sequenza genica stessa. Ad esempio differenze di espressione tra individui nei livelli di attività del citocromo p450 potrebbero essere il risultato sia di un diverso polimorfismo genetico come di una diversa programmazione epigenetica [72]. È possibile anche che la regolazione epigenetica alteri e/o mascheri l'effetto di polimorfismi epigenetici [72]. In più, la struttura dell'epigenoma è stabilita in modo tessuto-specifico e, pertanto, è necessario tenere conto di tali implicazioni nel valutare gli effetti cinetici, dinamici e tossicologici degli xenobiotici.

Risulta chiaro quindi come sia necessario aumentare l'attuale volume di conoscenze sull'azione dell'esposizione ambientale a molecole e composti a potenziale azione epigenotossica così come è necessario aumentare il numero di strumenti a nostra disposizione per meglio condurre tale analisi.

È noto come l'alterazione dei pattern epigenetici durante lo sviluppo prenatale e postnatale sia fattore di predisposizione nello sviluppo di patologie adulte [74–77]; pertanto, variazioni dovute ad esposizioni ambientali durante questi periodi critici, sono da considerarsi maggior fattore di rischio. I target principali di tali modifiche sono essenzialmente tre: la metilazione del DNA, la modificazione delle code istoniche e i piccoli RNA non codificanti (figura 7).

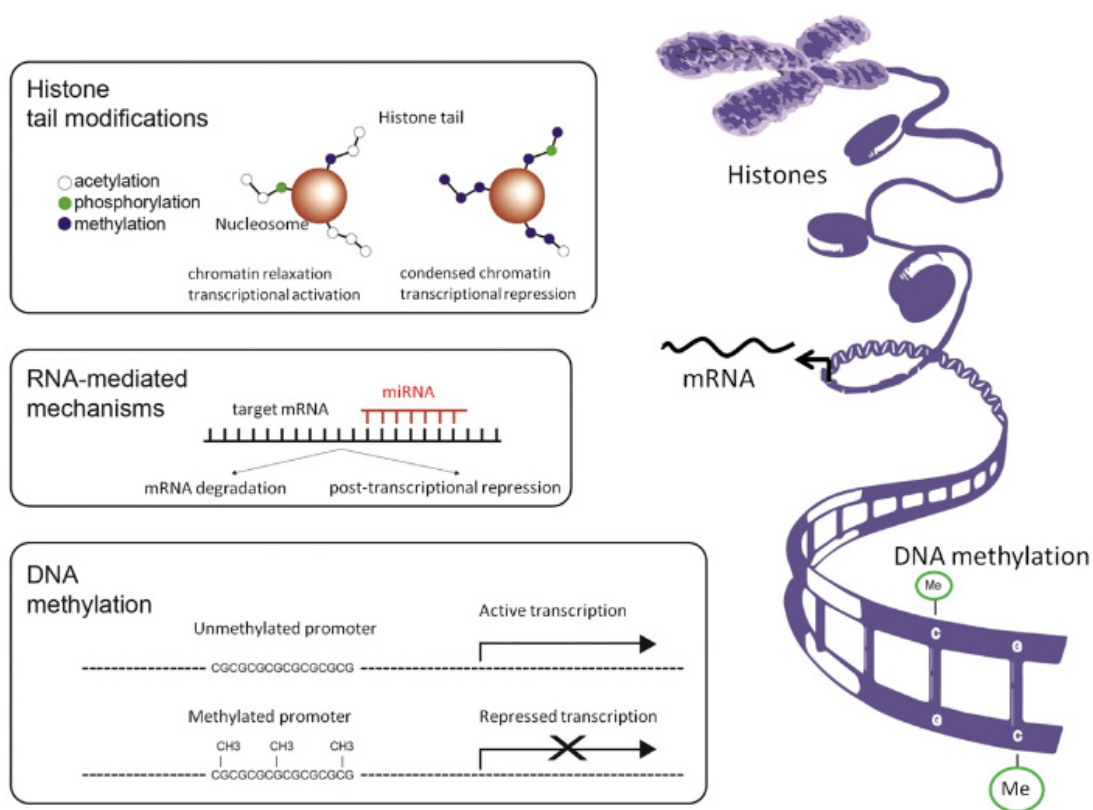


Figura 7 - Rappresentazione schematica dei principali fattori epigenetici, della loro organizzazione gerarchica e dei loro meccanismi d'azione [78].

Tutti e tre i sistemi sono strettamente interconnessi e in grado di influenzarsi a vicenda creando quindi una fitta rete di interazioni che è alla base della complessità degli organismi superiori. Di questi la metilazione del DNA è certamente la più studiata e meglio caratterizzata ed è anche per questo che si è scelto di focalizzarsi su quest'ultima nell'ambito di questa tesi per analizzare il potenziale epigenotossico delle NP prese in esame.

Modificazioni istoniche

L'ottamero istonico su cui si avvolge la molecola del DNA a formare il nucleosoma rappresenta l'unità base di organizzazione della cromatina. La modificazione delle code N-terminali delle proteine istoniche costituisce un articolato meccanismo di controllo della condensazione cromatinica. I cambiamenti conformazionali nelle proteine istoniche e nel posizionamento della molecola di DNA intorno all'ottamero istonico possono modificare l'accessibilità della regione genomica al macchinario trascrizionale, portando a silenziamento o attivazione genica. Le modificazioni istoniche conosciute sono numerose ed includono

acetilazione, metilazione, fosforilazione, ubiquitinazione, sumoilazione. Queste modificazioni si ritrovano in diverse configurazioni sulle code delle proteine istoniche “canoniche” (H2A, H2B, H3, H4) e delle proteine istoniche “varianti” (H3.1, H3.3 e HTZ.1) [79].

La lisina è un substrato chiave nella epigenetica degli istoni, essendo bersaglio esclusivo di numerose modificazioni quali acetilazione, metilazione, ubiquitinazione e sumoilazione. La metilazione e l’acetilazione prevedono l’aggiunta di piccole molecole mentre l’ubiquitinazione e la sumoilazione l’aggiunta di grossi complessi (due terzi della proteina istonica stessa) che possono portare, con il loro ingombro a cambiamenti ancora più profondi alla struttura della cromatina. Un altro grado di complessità viene aggiunto dalla possibilità di successive metilazioni di una stessa lisina (mono- di- o tri-metilazione) ognuna con conseguenze diversificate sulla trascrizione genica e sul compattamento della cromatina.

Tabella 1 - Modificazioni epigenetiche con effetti noti sulla struttura della cromatina [79]

Mark*	Transcriptionally relevant sites†	Transcriptional role‡
DNA methylation		
Methylated cytosine (meC)	CpG islands	Repression
Histone PTMs		
Acetylated lysine (Kac)	H3 (9, 14, 18, 56), H4 (5, 8, 13, 16), H2A, H2B	Activation
Phosphorylated serine/threonine (S/Tph)	H3 (3, 10, 28), H2A, H2B	Activation
Methylated arginine (Rme)	H3 (17, 23), H4 (3)	Activation
Methylated lysine (Kme)	H3 (4, 36, 79) H3 (9, 27), H4 (20)	Activation Repression
Ubiquitylated lysine (Kub)	H2B (123§/120¶) H2A (119¶)	Activation Repression
Sumoylated lysine (Ksu)	H2B (6/7), H2A (126)	Repression
Isomerized proline (Pisom)	H3 (30–38)	Activation/ repression

*The modification on either DNA or a histone.
†Well-characterized sites with regard to genomic location for DNA methylation or residues within histones for PTMs.
‡Whether the epigenetic mark is associated with activation or repression.
§Yeast (*Saccharomyces cerevisiae*).
¶Mammals.

Alcuni degli esiti funzionali di queste modifiche sono noti. Per esempio vi sono numerose evidenze di come l’acetilazione delle code istoniche, una delle modifiche più studiate, sia

comunemente associata con il rilassamento della cromatina e l'attivazione trascrizionale mentre la deacetilazione, al contrario, è associata ad uno stato di cromatina più condensato [80,81]. La sumoilazione sembra associata alla repressione ed è in grado di interferire mutualmente con l'acetilazione [79].

Al contrario, metilazione ed ubiquitinazione hanno effetti variabili, dipendenti dal residuo di posizionamento e dal contesto circostante. Per esempio la trimetilazione della lisina 4 dell'istone H3 (H3K4me3) occorre spesso nelle regioni pericentromeriche eterocromatizzate trascrizionalmente inerti, tuttavia se la modifica è posizionata al 5' di ORF geniche si osserva induzione della trascrizione [82].

Negli istoni H3 e H4 si può ritrovare metilazione anche dei residui di arginina che possono essere mono- o di-metilati ed, in alcuni casi, la metilazione può avvenire in maniera simmetrica o asimmetrica. La metilazione dell'arginina sembrerebbe tuttavia strettamente connessa con l'attivazione genica [79].

La fosforilazione di serina e treonina è coinvolta allo stesso modo nella modifica della condensazione cromatinica. La fosforilazione dell'istone H3 è quella maggiormente caratterizzata e, in particolare, la fosforilazione della serina 10 (H3S10ph) correla sia con l'attivazione della trascrizione che con la condensazione cromosomica in fase mitotica, concorrendo quindi simultaneamente a rilassamento e condensazione della cromatina [83].

Tutte le modificazioni istoniche sono rimovibili attraverso classi di enzimi appositamente deputati: le istone deacetilasi (HDAC), le serina/treonina fosfatasi, le ubiquitina proteasi (rimuovono le mono-ubiquitine da H2B), le deaminasi (convertono le arginine metilate in citrulline, di fatto demetilando) e le lisina demetilasi [84–86].

Le conseguenze funzionali di tali modifiche possono essere dirette, causando cambiamenti strutturali nella cromatina, o indirette, tramite il reclutamento di proteine effettrici. La struttura della coda N-terminale di H4 è un fattore critico per il contatto tra nucleosomi: per esempio si è osservato che l'acetilazione di H4K16 in un array di cromatina in vitro impediva la corretta condensazione della fibra a 30 nm [87].

Le modificazioni istoniche sono in grado di reclutare proteine effettrici stabilizzandone il legame alla molecola di DNA e facilitandone l'azione. L'istone deacetilasi 1 (HDAC1) è in grado di interagire con il cofattore enzimatico DNMT3L che è in grado di promuovere il reclutamento delle DNA metiltransferasi 3a e 3b e la metilazione della regione genomica corrispondente [88], stabilendo di fatto un legame tra le due modificazioni epigenetiche.

RNA non codificanti

Negli organismi superiori la trascrizione intergenica o antisenso dà origine a un alto numero di piccoli RNA e RNA lunghi e non codificanti (lncRNA). Queste molecole sono state ormai accettate come importante meccanismo di regolazione trascrizionale, traduzionale e della struttura della cromatina in cellule eucariotiche [89,90].

Il loro ruolo regolatorio passa prevalentemente attraverso il meccanismo della RNA interference (RNAi) [91–93]. RNA interference è un termine usato per descrivere una fitta rete di pathway di silenziamento mediante RNA che coinvolge piccoli RNA insieme ad un membro di due famiglie di proteine altamente conservate, Argonata (AGO) e PIWI. Questi complessi individuano geni bersaglio silenziandoli a livello trascrizionale e post-trascrizionale [94]. La RNAi più comune è attivata da lunghi RNA precursori a doppio filamento (dsRNA) che vengono processati in piccoli duplex di RNA interferenti (siRNA) di 22-23 nucleotidi dalla RNasi III ribonucleasi Dicer [95,96]. I siRNA vengono inglobati dalle proteine della famiglia AGO e guidano il riconoscimento da parte di quest'ultime di RNA complementari al filamento inglobato. Gli RNA complementari al siRNA del singolo complesso AGO vengono quindi marcati per la degradazione da parte del complesso AGO stesso, gli mRNA coinvolti subiscono inibizione traduzionale ed i geni corrispondenti sono soggetti a soppressione della trascrizione [91].

In aggiunta al loro ruolo nella degradazione di RNA bersaglio, gli siRNA sono in grado di modificare la compattazione della cromatina e l'espressione genica attraverso la modificazione delle code istoniche o la metilazione del DNA. In *Arabidopsis thaliana* e in *Caenorhabditis elegans* è stato dimostrato la metilazione di loci specifici a seguito di inibizione post-trascrizionale da RNAi [92,97,98].

Il complesso di AGO associato a siRNA può associarsi in un macrocomplesso di silenziamento trascrizionale indotto da RNA (RITS). Il macrocomplesso RITS è in grado di direzionarsi nel sito di trascrizione del gene complementare al siRNA contenuto nel complesso. Qui il complesso RITS si associa alla cromatina e ingloba il filamento di mRNA nascente; tramite una sub unità a funzione polimerasica, il complesso dà vita ad un dsRNA che induce un *feedback* positivo sostenendo il meccanismo di RNAi [94]. Nel contempo il complesso RITS

stimola la metilazione della lisina 9 dell'istone H3 (H3K9) promuovendo il silenziamento genico. Il complesso RITS stesso e la metilazione di H3K9 successivamente richiamano le DNMT che metilano la regione genica [99].

Metilazione del DNA

Allo stato attuale delle conoscenze, la metilazione del DNA rappresenta il marcatore epigenetico maggiormente studiato e caratterizzato. Fisicamente comporta l'aggiunta di un gruppo metile al carbonio 5 della citosina ed ha un fondamentale ruolo regolativo essendo strettamente correlato al silenziamento trascrizionale ed alla condensazione cromatinica. Negli eucarioti superiori (vertebrati e mammiferi), la metilazione del DNA avviene alla posizione 5 dell'anello pirimidinico di una citosina(C) mediante l'aggiunta di un gruppo metilico dal donatore S-adenosilmetionina con formazione di 5-metilcitosina. Solo le citosine che hanno una guanina adiacente a valle sono soggette a metilazione (Hou et al. 2011). Il gruppo metilico si posiziona nel solco maggiore all'esterno della doppia elica del DNA, per cui non interferisce con l'appaiamento delle basi dato che la 5-metilcitosina appaia con la guanina allo stesso modo di una citosina non modificata. Tuttavia il gruppo metilico funge da segnale riconosciuto da proteine specifiche che si legano a meCpG determinandone l'effetto sulla trascrizione.

Nell'uomo la reazione rientra nel ciclo metabolico delle unità monocarboniose ed è catalizzata da una famiglia di enzimi specifici, noti come DNA metiltransferasi (DNMT) o metilasi, di cui si conoscono almeno tre isoforme implicate: DNMT1, DNMT3a, DNMT3b.

DNMT3a e DNMT3b sono metiltransferasi definite de novo, che aggiungono gruppi metilici in nuove posizioni e non necessariamente a citosine contenute in sequenze CpG, rendendo di fatto possibile la continua variazione a cui è soggetto l'assetto del metiloma. La loro attività più intensa si registra soprattutto durante lo sviluppo embrionale ma rimangono comunque attive basalmente anche nei tessuti adulti [88,100].

DNMT1 invece viene definita come metiltransferasi di mantenimento, è in grado di riconoscere i siti emimetilati, come succede ad esempio dopo un evento di replicazione quando solo l'elica parentale presenta citosine modificate, attaccando un gruppo metile alla citosina del filamento neosintetizzato [100–102].

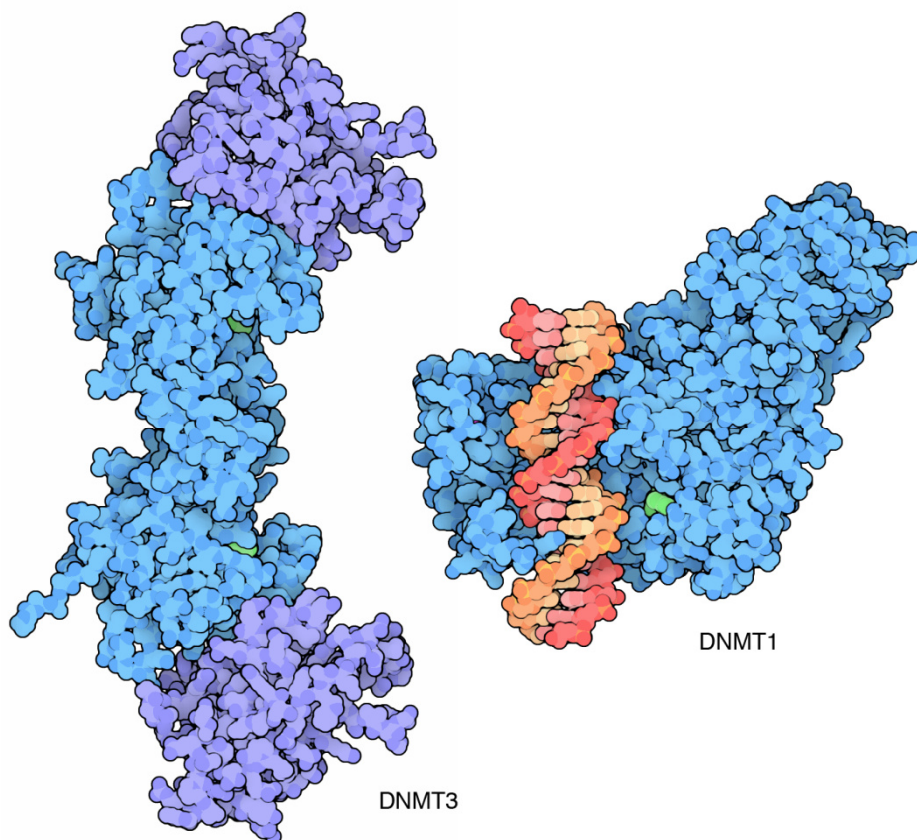


Figura 8 - Struttura delle DNMT1 e DNMT3a umane ottenute mediante analisi cristallografica a raggi x [103]

Le DNA metiltrasferasi strutturalmente contengono un dominio carbossi terminale catalitico ed una regione ammino terminale regolatrice (Figura 9). In particolare è noto il meccanismo di azione della DNA metiltransferasi 1 (DNMT1) o metilasi di mantenimento. L'enzima, localizzato sulla forca replicativa, si avvolge intorno al DNA ed esplora i bordi delle basi azotate all'interno del solco principale delle due catene, quella di neosintesi e quella parentale. L'enzima è in grado di distinguere tra filamenti non metilati e filamenti emimetilati. Quando la DNMT1 incontra una citosina non metilata all'interno di una regione emimetilata sposta il filamento in una regione più profonda della struttura enzimatica estrudendo la citosina da metilare e legandola all'interno del sito attivo dove avverrà la reazione di metilazione [103].

Dal punto di vista biochimico tutte le metilasi si servono di un cofattore che è il reale donatore del metile, la S-adenosilmetionina (SAM o AdoMet, Figura 9): il gruppo metilico è fortemente reattivo e facilmente trasferibile dalla molecola perché lo zolfo, atomo elettronegativo, non sopporta bene la carica positiva e il distacco del $-CH_3$ consente di recuperare un elettrone (Figura 9).

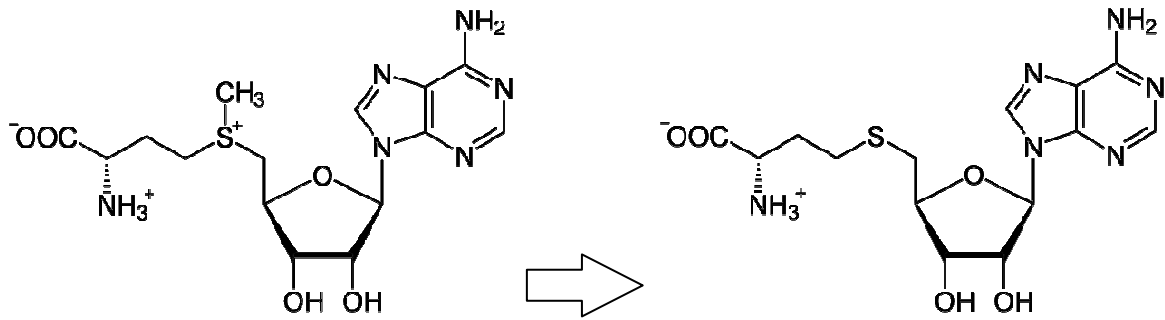


Figura 9 - Meccanismo di trasferimento del metile da S-adenosilmetionina (a sinistra) e di S-adenosilomocisteina (a destra)

Il meccanismo catalitico prevede la formazione di un legame covalente tra un residuo di cisteina nel sito attivo e il carbonio in posizione 6 (C6) della citosina nel DNA, questo comporta che un doppietto elettronico coinvolto nel doppio legame tra C5 e C6 fluisca verso il primo, con il conseguente attacco nucleofilo da parte di C5 sul gruppo metilico della SAM posizionata in un'apposita tasca. Una reazione di β -eliminazione consente il ripristino del doppio legame tra C5 e C6 e il rilascio del DNA con la citosina metilata (figura 10): si sviluppa infatti una tensione sterica tra il gruppo metilico appena aggiunto e gli amminoacidi adiacenti prolina e cisteina nel sito attivo, destabilizzando il complesso costituito da enzima e DNA, che viene liberato.

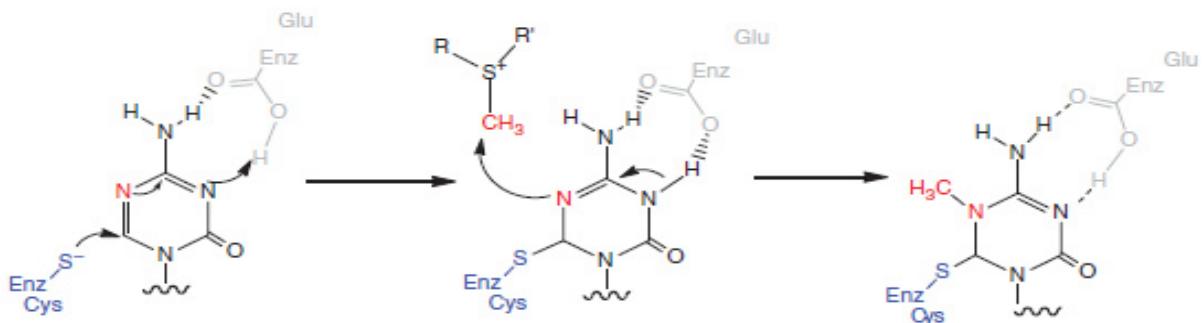


Figura 10 - Meccanismo di trasferimento del gruppo metilico dalla SAM al carbonio 5 della citosina catalizzato dalle DNMT

Nelle DNA metiltrasferasi si trova inoltre un residuo di acido glutammico molto conservato che contribuisce a tenere in posizione il nucleotide da metilare tramite un legame idrogeno con il gruppo amminico legato a C4 e protonando N3. Il meccanismo d'azione proposto prevede che l'enzima si associ al DNA in modo sequenza-aspecifico e scorra lungo la

molecola finché incontra il suo sito di riconoscimento, ad esempio nel caso di DNMT1 una sequenza CpG emimetilata: la citosina da metilare viene estrusa dalla doppia elica e chiusa nella tasca catalitica grazie a una modificazione conformazionale della proteina, si forma il cosiddetto complesso “chiuso” e dopo il trasferimento del $-CH_3$ dalla SAM alla base questo esso si destabilizza nella modalità descritta sopra e un nuovo cambiamento di conformazione induce la sua riapertura con il rilascio di substrato e S-adenosilomocisteina (figura 10).

La metilazione del DNA è una modifica post-replicativa, trasmissibile sia per mitosi che per meiosi ed è coinvolto in alcuni processi chiave quali la regolazione genica, la tumorigenesi, l'imprinting genomico, l'inattivazione del cromosoma X e la soppressione di elementi ripetitivi. È una caratteristica dei vertebrati, delle piante superiori e di alcuni funghi, ma è praticamente assente in molti degli organismi modello più studiati, compresi *S. cerevisiae*, *C. elegans* e *D. melanogaster* [72,74,75,104].

La metilazione si concentra soprattutto in aree del genoma lunghe 1-2 kb, ricche di citosina e guanina chiamate isole CpG. Le isole CpG sono preferenzialmente localizzate nelle regioni regolatorie preposte al controllo della trascrizione genica, in particolare nella regione 5'di molti geni. Si stima che il genoma dei mammiferi contenga circa 20000 isole CPG di cui, nell'uomo, il 50-70% del totale risulta metilato. Il grado di metilazione delle isole CpG varia con l'attività dei geni ed è inversamente associato ai livelli di trascrizione in mRNA, per cui l'ipometilazione si associa ad un aumento dell'espressione genica, mentre l'ipermetilazione a silenziamento genico.

La metilazione del DNA influisce sull'espressione genica per inibizione della trascrizione e agisce tramite due meccanismi principali:

1. mascherando il promotore e impedendo il legame dei fattori di trascrizione;
2. la regione metilata viene identificata e legata da alcune proteine, note come proteine MBP (Methyl-CpG-Binding Protein), che a loro volta reclutano fattori implicati nel rimodellamento della cromatina (istone-acetilasi, istone metilasi, enzimi di rimodellamento, etc) promuovendo l'eterocromatizzazione e rendendo la regione inattiva.

Gli schemi di metilazione del DNA sono dinamici durante lo sviluppo e la vita dei vertebrati, tuttavia è durante lo sviluppo embrionale che il metiloma della cellula subisce le

modificazioni maggiori, rendendo questa fase una delle più delicate e suscettibili di eventuali perturbazioni. All'atto della fecondazione il pronucleo paterno ed il pronucleo materno vanno incontro ad una ondata di demetilazione che coinvolge la quasi totalità del genoma (ad eccezione dei geni soggetti ad imprinting).

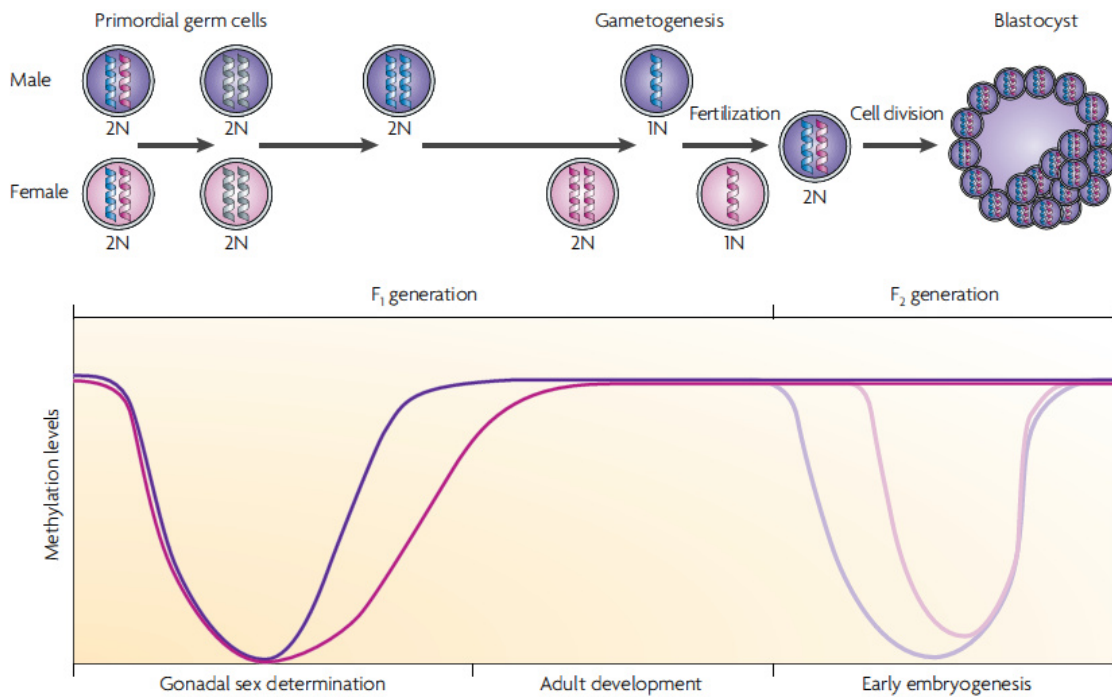


Figura 11 – Principali eventi di riprogrammazione epigenetica all'atto dello sviluppo gonadico e della fecondazione [74].

Successivamente, con il progredire dell'embriogenesi, nuovi schemi di metilazione sono stabiliti dalle DNMT de novo che sono direzionate sul DNA da cofattori proteici che legano sequenze specifiche di DNA contenenti dinucleotidi CpG non metilati, attraverso specifici domini MBD (Methyl Binding Domain). Una volta che i nuovi schemi di metilazione sono stati stabiliti, questi possono essere propagati attraverso cicli di replicazione del DNA ad opera delle metiltrasferasi di mantenimento [73,74].

Metilazione e NM

Gli studi iniziali che hanno tentato di valutare gli effetti dei NM ingegnerizzati si sono focalizzati principalmente sulla capacità di questi ultimi di indurre cambiamenti nel profilo di espressione genica, senza indagare se queste variazioni fossero da imputare a modificazioni epigenetiche. Più di recente si sono affiancati studi paralleli mirati a investigare le proprietà epigenetiche di tali composti: ad esempio la capacità di indurre cambiamenti nella metilazione del DNA, ripiegamento della cromatina o espressione dei miRNA [78,105,106].

Vi sono evidenze di come NP di manganese, argento e rame inducano cambiamenti dell'espressione dei geni legati al sistema dopaminergico in cellule PC12 di feocromocitoma di ratto [107]. Alterazioni del profilo di espressione genomica sono state riportate, sia in vitro che in vivo, in seguito al trattamento con NP a base di metalli, ossidi di metalli, fullereni e particelle bioluminescenti [108–112]. In cellule tumorali polmonari e cerebrali, esposte ad NP di argento (Ag NP), si è osservata l'aumento della trascrizione di numerosi geni di risposta al danno al DNA e diminuzione della trascrizione dei geni coinvolti nel ciclo cellulare (cyclina B e cyclina E) e nella riparazione del DNA (XRCC1 e 3, FEN1, RAD51C, RPA1) [113]. In cellule tumorali polmonari (A549) e cellule HeLa l'esposizione ad Ag NP è stata in grado di alterare la regolazione di più di 1000 geni inclusi metallotioneine, proteine heat shock e proteine istoniche [114,115].

Le nanoparticelle a base silice (SiO_2 NP) in cellule endoteliali normali umane inducono fortemente la trascrizione dell'eme-ossigenasi 1 (HO1), un importante marker di stress ossidativo [116]. In cheratinociti umani (HaCaT) le nanoparticelle d'oro hanno indotto produzione significativa di ROS e contemporaneo aumento della trascrizione di geni coinvolti nella risposta allo stress ed alla tossicità [117]. NP di zinco hanno indotto cambiamenti nella trascrizione genica di cellule RKO e CaCo2 in geni coinvolti nel metabolismo dei metalli e nel *folding* proteico [118], e di c-Myc e Bcl2 in cellule bronchiali epiteliali umane (16HBE) [119].

Vi è a tuttora un numero limitato di informazioni sui NM che finora sono stati riportati avere attività epigenotossica che coinvolga la metilazione del DNA. È stata riportata l'induzione di demetilazione globale in cellule HaCaT esposte a SiO_2 NP, in concomitanza con diminuzione della trascrizione dei geni per MDB2 e per le metilasi DNMT1 e DNMT3a; i livelli proteici sono risultati diminuiti in maniera concomitante [120]. Più di recente è stata dimostrata l'attività ipometilante, con concomitante diminuzione della trascrizione di proteine

citoplasmatiche, di SiO₂ NP nei confronti del gene PARP 1 in cellule HaCaT [121]. Il gene PARP 1 codifica per la proteina di riparazione del DNA polimerasi poli-ADP-ribosio 1, una proteina zinc-finger in grado di legare il DNA e che si attiva in presenza di rotture a singolo o a doppio filamento nella molecola del DNA. La funzione principale di PARP 1 è la riparazione del DNA attraverso l'individuazione della lesione e la prevenzione dello scambio dei cromatidi fratelli. PARP 1 poli-ADP-ribosila numerose proteine inclusi gli istoni, generando così rilassamento cromatinico localmente alla lesione e facilitando, di conseguenza, l'accesso alle proteine deputate alla riparazione del filamento. Tuttavia la proteina è anche legata alla morte cellulare, nel caso in cui occorra una massiccia attivazione di PARP 1 concomitante ad una severa deplezione del suo substrato NAD⁺. La conseguente deplezione di ATP porta ad un blocco energetico con conseguente morte cellulare [122].

Strumenti di analisi epigenotossicologica – L'analisi del metiloma

Le alterazioni dell'epigenoma nelle neoplasie umane, per le loro caratteristiche peculiari e per la loro insorgenza precoce, rappresentano biomarcatori efficaci nell'ambito della prevenzione e dell'intervento terapeutico. Negli ultimi anni sono emerse numerose tecnologie in grado di garantire un'analisi ad alto rendimento dei cambiamenti epigenetici dal livello di singoli loci, al livello di intero genoma.

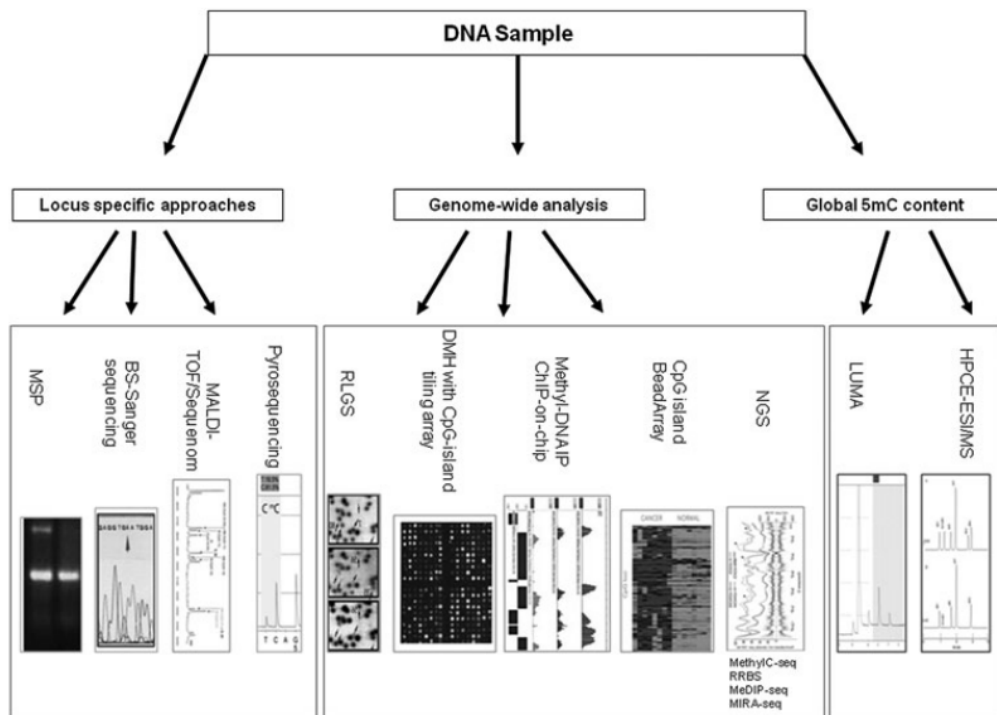


Figura 12 – Esempi di analisi della metilazione a diversi livelli. (5mC, 5-methylcytosine; BS, bisulfite; DMH, differential methylation hybridization; HPCE-ESI/MS, high-performance capillary electrophoresis–electron spray ionization/mass spectrometry; LUMA, luminometric methylation assay; MALDI- TOF, matrix-assisted laser desorption ionization–time of flight; MSP, methylation specific PCR; NGS, next- generation sequencing; RLGS, restriction landmark genomic scanning. [123])

Le tecniche di biologia molecolare disponibili, come ad esempio l’ibridazione mediante sonde, non sono in grado di discriminare la 5-metil-citosina dalla sua controparte non metilata, mentre l’amplificazione mediante PCR causa la perdita della metilazione negli ampliconi.

A causa dell’inadeguatezza delle tecniche di biologia molecolare “classica”, il DNA coinvolto nell’analisi necessita di essere modificato con metodi e sostanze che ne evidenzino la metilazione.

Questi metodi ricadono sotto tre categorie generali (tabella 2):

- digestione con endonucleasi di restrizione
- arricchimento mediante affinità
- conversione mediante bisolfito di sodio

Tabella 2 - Principali metodiche di analisi del metiloma differenziate per metodica di rilevazione della metilazione [124]

Pretreatment	Analytical step			
	Locus-specific analysis	Gel-based analysis	Array-based analysis	NGS-based analysis
Enzyme digestion	<ul style="list-style-type: none"> • HpaII-PCR 	<ul style="list-style-type: none"> • Southern blot • RLGS • MS-AP-PCR • AIMS 	<ul style="list-style-type: none"> • DMH • MCAM • HELP • MethylScope • CHARM • Mmass 	<ul style="list-style-type: none"> • Methyl-seq • MCA-seq • HELP-seq • MSCC
Affinity enrichment	<ul style="list-style-type: none"> • MeDIP-PCR 		<ul style="list-style-type: none"> • MeDIP • mDIP • mCIP • MIRA 	<ul style="list-style-type: none"> • MeDIP-seq • MIRA-seq
Sodium bisulphite	<ul style="list-style-type: none"> • MethylLight • EpiTYPER • Pyrosequencing 	<ul style="list-style-type: none"> • Sanger BS • MSP • MS-SNuPE • COBRA 	<ul style="list-style-type: none"> • BiMP • GoldenGate • Infinium 	<ul style="list-style-type: none"> • RRBS • BC-seq • BSPP • WGSBS

AIMS, amplification of inter-methylated sites; BC-seq, bisulphite conversion followed by capture and sequencing; BiMP, bisulphite methylation profiling; BS, bisulphite sequencing; BSPP, bisulphite padlock probes; CHARM, comprehensive high-throughput arrays for relative methylation; COBRA, combined bisulphite restriction analysis; DMH, differential methylation hybridization; HELP, HpaII tiny fragment enrichment by ligation-mediated PCR; MCA, methylated CpG island amplification; MCAM, MCA with microarray hybridization; MeDIP, mDIP and mCIP, methylated DNA immunoprecipitation; MIRA, methylated CpG island recovery assay; Mmass, microarray-based methylation assessment of single samples; MS-AP-PCR, methylation-sensitive arbitrarily primed PCR; MSCC, methylation-sensitive cut counting; MSP, methylation-specific PCR; MS-SNuPE, methylation-sensitive single nucleotide primer extension; NGS, next-generation sequencing; RLGS, restriction landmark genome scanning; RRBS, reduced representation bisulphite sequencing; -seq, followed by sequencing; WGSBS, whole-genome shotgun bisulphite sequencing.

L'attività di alcuni enzimi di restrizione è influenzata dalla metilazione di particolari nucleotidi della loro sequenza di riconoscimento. Alcuni enzimi sono inibiti dalla metilazione della loro sequenza di taglio (metilazione-sensibili) ed altri sono attivi esclusivamente se il loro sito di riconoscimento è metilato (metilazione-dipendenti). Uno dei metodi più consolidati è rappresentato dall'uso di coppie di isoschizomeri di cui uno sia metilazione-sensibile. Tra i più usati si ritrovano le coppie HpaII/MspI e SmaI/XmaI rispettivamente sensibili ed insensibili alla metilazione del sito di restrizione [125–127]. La metodica può essere utilizzata sia per l'analisi di singoli loci sia per l'analisi ad intero genoma

L'arricchimento per affinità sfrutta l'attività di anticorpi specifici anti-5-metilcitosina o proteine contenenti domini MDB (*Methyl Binding Domain*) che presentano particolare affinità per le isole CpG metilate. Tra le proteine più usate allo scopo si annoverano MeCP2, MBD1 ed MBD2. Le metodiche basate su questo principio arricchiscono la frazione metilata di DNA di un campione senza il vincolo del sito di riconoscimento specifico posto dalle metodiche di digestione enzimatica. A seguito dell'arricchimento sono applicabili numerose metodiche, tra quelle più utilizzate si ritrovano l'ibridazione del DNA arricchito su array e il sequenziamento.

La conversione mediante bisolfito si basa sul principio chimico per cui il trattamento con bisolfito di sodio deammina le citosine non metilate molto più rapidamente delle citosine metilate [128,129]. Tramite trattamento con bisolfito le citosine non metilate vengono

convertite ad uracili che ad un successivo sequenziamento verranno riconosciuti come timine. Questo genera di fatto una differenza genetica percepibile ed analizzabile mediante numerose metodiche (tabella 2). L'analisi che segue la conversione con bisolfito è necessariamente il sequenziamento, conferendo quindi al metodo una precisione di analisi a singolo nucleotide alandone, tuttavia, in maniera consistente i costi.

Materiali e Metodi

Colture cellulari:

A549: cellule tumorali epiteliali di carcinoma polmonare, crescono in aderenza in terreno RPMI-1640 completo (10% FBS – 1% L-Glu). Questa linea cellulare è stata isolata per la prima volta nel 1972 da D.J. Giard, et al. [130]. Sono state isolate attraverso la rimozione e successiva coltura di tessuto canceroso proveniente da un tumore espantato a un maschio caucasico di 58 anni.

La linea cellulare A549 è ben rappresentativa di questo distretto e, nel contempo, risulta essere ben caratterizzata e di facile gestione.

HepG2: linea cellulare di epatocarcinoma derivata da tessuto tumorale di un maschio caucasico di 15 anni [131]. Crescono in aderenza in terreno DMEM completo (10% FBS – 1% L-Glu).

Sono state scelte come rappresentative del distretto epatico, in quanto le poche evidenze di letteratura disponibili individuano nel fegato l'organo più suscettibile ad un eventuale accumulo dovuto all'esposizione a dosi croniche di quantum dots.

HAEC: Human aorta endothelial cells. Vengono mantenute criopreservate alla fine della coltura primaria e possono venire coltivate e propagate per circa 16 divisioni. Vengono coltivate in aderenza in terreno EGM-2MV Bullet Kit (Lonza, Basel, Switzerland) completo ed utilizzate per esperimenti al passaggio 3-7.

Le cellule endoteliali ricoprono un ruolo preponderante in un ampio range di processi fisiologici, come l'angiogenesi, come barriera selettiva del sangue ed in processi patofisiologici a carico delle arterie e nella tumorigenesi.

HUVEC: Human Umbilical Vein Endothelial Cells. Isolate da vena ombelicale normale umana vengono criopreservate al termine dell'isolamento primario e possono essere mantenute per circa 16 divisioni [132]. Vengono coltivate in aderenza in terreno EGM-2MV Bullet Kit (Lonza, Basel, Switzerland) completo ed utilizzate per esperimenti al passaggio 3-7.

Queste cellule vengono comunemente usate, per la loro natura altamente rappresentativa del tessuto endoteliale venoso, nella caratterizzazione di processi coinvolti nella patofisiologia dell'arteriosclerosi, angiogenesi e neovascolarizzazione in risposta all'ipossia nei tumori [133,134].

Cardiomiociti di ratto da espianto primario: ottenuti tramite sacrificio di ratti del ceppo Wistar, i cuori espiantati vengono perfusi secondo il metodo Langendorff e quindi i miociti vengono ottenuti dal ventricolo sinistro opportunamente sminuzzato e trattato [135]

Nanomateriali utilizzati:

Le nanoparticelle di biossido di titanio (<100 nm) e di ossido di cobalto (II, III) (<50 nm) sono state acquistate da Sigma Aldrich (Sigma Aldrich, St. Louis, MO), entrambe le nano polveri sono state provviste di caratterizzazione fisico-chimica ad opera della ditta stessa; i QD a base di solfuro di cadmio sono stati sintetizzati, caratterizzati e gentilmente forniti dall'IMEM dell'Università degli Studi di Parma

Tutte le nanoparticelle utilizzate sono state sospese acqua ultrapura alla concentrazione di 2 mg/ml) e sonicate in ghiaccio a 50W tramite un sonicatore a sonda (Heat Systems Ultrasonics Inc., Farmingdale, NY, USA) per minimizzare gli aggregati. Le NP sono state quindi stabilizzate tramite l'aggiunta di PBS 10X e sieroalbumina bovina (BSA – concentrazione finale 0.15%). Le NP sono state diluite nel terreno di coltura al momento dell'uso e, al fine di distribuire le particelle il più uniformemente possibile, i campioni sono stati sottoposti a tre cicli di sonicazione di 20'' immediatamente prima di ogni trattamento.

Le NP sono state caratterizzate strutturalmente e morfologicamente attraverso microscopia elettronica a trasmissione (TEM) tramite 200 kV analytical JEM 2200-FS (JEOL Inc., Peabody, MA, USA). Il comportamento e lo stato di aggregazione delle NP in medium diversi varia in maniera consistente in risposta alla forza ionica della sospensione ed alla carica di superficie delle NP. Per questo le NP di Ti e Co sono state ulteriormente caratterizzate tramite diffusione dinamica della luce (DLS) tramite 90Plus PALS instrument (Brookhaven Instruments Corporation, Holtsville, NY, USA) al fine di stimare il diametro idrodinamico degli agglomerati della sospensione in medium diversi.

Biossido di titanio (TiO_2):

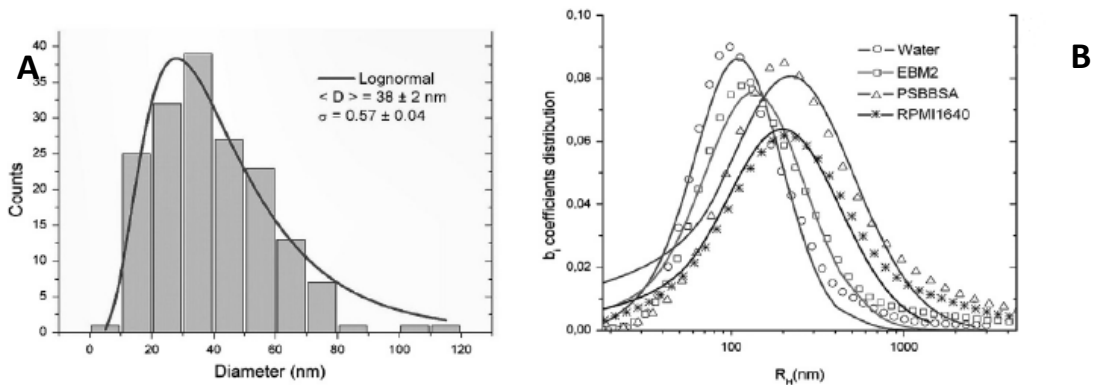


Figura 13 – A: Analisi di distribuzione dimensionale di TiO_2 NP; B: comparazione del diametro idrodinamico delle TiO_2 NP in differenti medium (acqua, EBM2, PBS + BSA, RPMI 1640) ottenuta tramite DLS [136]

Le nanoparticelle di titanio biossido hanno mostrato una forma sferica regolare con leggera aggregazione. La loro distribuzione si è mostrata abbastanza ampia e centrata su un diametro medio di 38 nm (figura 13-A).

La misurazione del diametro idrodinamico ha evidenziato una tendenza maggiore a formare aggregati (quindi con un diametro idrodinamico superiore) nei terreni di coltura rispetto a soluzione acquosa con uno spostamento dei picchi ottenuti tramite DLS verso valori più alti (figura 13-B).

Ossido di cobalto (Co_3O_4):

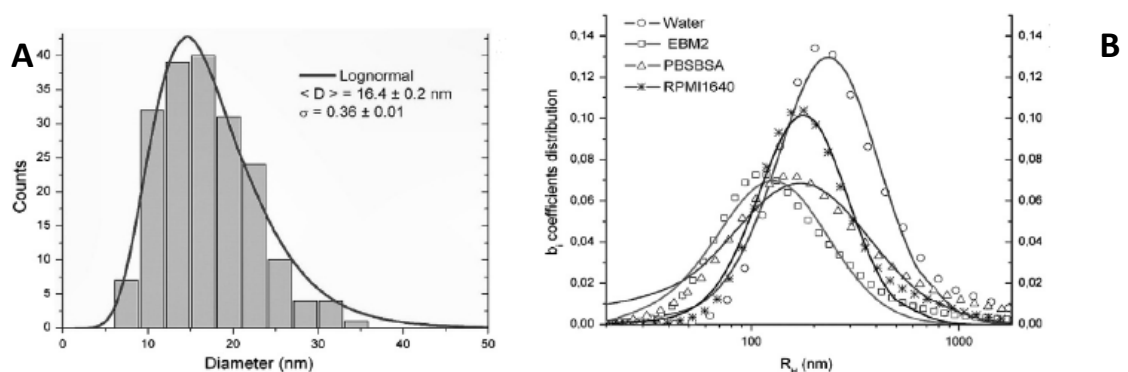


Figura 14 - A: Analisi di distribuzione dimensionale di Co_3O_4 NP; B: comparazione del diametro idrodinamico delle Co_3O_4 NP in differenti medium (acqua, EBM2, PBS + BSA, RPMI 1640) ottenuta tramite DLS [136]

L'analisi TEM sulle le Co NP ha evidenziato particelle con forma irregolare e non sferica, tendenti alla formazione di aggregati di circa 10 NP con una distribuzione dimensionale ad ampiezza ridotta e con diametro medio di circa 17 nm (figura 14-A).

Rispetto al titanio il cobalto tende più di frequente a formare aggregati come si evince dal diametro idrodinamico più alto in acqua (figura 14-B). La sospensione di Co NP in terreni di coltura ha determinato un allargamento della distribuzione dimensionale dei diametri idrodinamici (figura 14-B).

Solfuro di Cadmio (CdS):

L'analisi TEM dei QD di cadmio solfuro ha evidenziato NP di forma regolare e dimensioni ridotte con leggera aggregazione. La loro distribuzione dimensionale ha evidenziato un diametro medio di circa 5 nm.

Vitalità cellulare – MTS Assay

Il test MTS viene eseguito sulla linea cellulare HepG2, trattata con CdS QD. Questa tecnica colorimetrica è utilizzata per determinare il numero di cellule vitali in proliferazione (test di citotossicità a lungo termine). La soluzione reagente contiene 3- (4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5- (3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H- tetrazolium salt (MTS), e il reagente PES (fenazina etosulfato). PES, che ha un'elevata stabilità chimica, combinandosi con MTS, forma una soluzione stabile. Il sale di tetrazolio MTS (Owen's reagent) viene bioridotto dalle cellule in un prodotto colorato (formazano), solubile nel mezzo di coltura.

Le cellule vengono seminate in 100µl di terreno DMEM supplementato con 5% FBS e 1% L-Glu alla concentrazione di 5×10^4 cell/ml. Dopo 24h si procede al trattamento di 24h con le concentrazioni selezionate di composto. Ogni diluizione di NP viene sonicata al momento e aggiunta al terreno di coltura delle cellule. Dopo 24h di trattamento, vengono aggiunti 20µl di soluzione reagente per pozzetto (CellTiter 96® Aqueous One Solution Cell Proliferation Assay, Promega) e le cellule vengono successivamente incubate per 4h a 37°C, 5% CO₂. Al termine dell'incubazione, viene misurata l'assorbanza a 450nm con un lettore di piastre a 96 pozzetti (MULTISKAN EX, Thermo Electron Corporation, Vantaa, Finlandia). La quantità di

formazano, misurata come valore di assorbanza a 450nm, è direttamente proporzionale al numero di cellule vive in coltura [Cory et al., 1991; Riss et al., 2013].

Specie reattive dell'ossigeno – DCFH-DA

La formazione di specie reattive dell'ossigeno (ROS) intracellulari è stata saggiata in cardiomiociti di ratto e cellule A549, trattate con NP di Co e Ti, tramite saggio in fluorescenza con diclorofluoresceina diacetato (DCFH-DA). La DCFH-DA è un composto non polare e non fluorescente in grado di diffondere in ambiente intracitoplasmatico dove le esterasi cellulari rimuovono i residui acetato per generare il composto polare, non fluorescente diclorofluoresceina (DCF). L'interazione di DCF con i ROS intracellulari forma un prodotto di ossidazione altamente fluorescente. L'intensità di fluorescenza è direttamente proporzionale al livello di ROS presenti nel campione.

Sperimentalmente si procede isolando le cellule in aliquote da 1×10^5 cellule. Quest'ultime, dopo essere state lavate con PBS, vengono risospese in DCFH-DA $10 \mu\text{M}$ diluita in PBS 1x e incubate per 1h a 37°C . Quindi le cellule vengono risospese nel loro terreno di mantenimento e trattate con NP $5\text{-}50 \mu\text{M}$ per 1-4h. Terminato il trattamento le cellule vengono private del terreno di mantenimento e lisate mediante Sigma Lysis Solution (Sigma Aldrich, St. Louis, MO). Si misura quindi l'intensità di fluorescenza del lisato cellulare (x nm) mediante lettore di piastre a fluorescenza (TECAN).

Genotossicità – Comet Assay

Il comet assay o Single Cell Gel Electrophoresis (SCGE) è un metodo utilizzato per la misurazione del danno al DNA in singole cellule eucariotiche. È versatile, relativamente semplice da eseguire e sensibile. È diventato uno strumento nuovo nella tossicologia genetica, utile a valutare sia in vitro che in vivo il danno genotossico indotto da una serie di agenti fisici o chimici. Le peculiari caratteristiche di tale procedura hanno reso il test uno strumento di indagine in differenti campi (genotossicologia clinica, biomonitoraggio ambientale e umano). La tecnica sperimentale può essere applicata teoricamente a tutti i tessuti di origine umana, animale o vegetale da cui si possano ottenere sospensioni di cellule isolate. È una tecnica visiva a fluorescenza molto semplice che valuta l'integrità del DNA misurando il danno in relazione alla presenza, dopo elettroforesi, di DNA frammentato all'esterno del core del nucleo [137].

Tramite Comet Assay si è valutato il potenziale genotossico dei NM considerati nello studio (TiO_2 , Co_3O_4 , CdS) (tabella 3).

Tabella 3 - Concentrazioni e tempi di trattamento usati nella metodica di comet assay per ogni linea cellulare

Linea cellulare	NP saggiate	Concentrazioni saggiate	Tempi di trattamento
A549	TiO_2	50 $\mu\text{g}/\text{ml}$	1-4-24 h
	Co_3O_4	50 $\mu\text{g}/\text{ml}$	1-4-24 h
HUVEC	TiO_2	20 $\mu\text{g}/\text{ml}$	1-4-24-48 h
	Co_3O_4	20 $\mu\text{g}/\text{ml}$	1-4-24-48 h
HAEC	TiO_2	20 $\mu\text{g}/\text{ml}$	1-4-24-48 h
	Co_3O_4	20 $\mu\text{g}/\text{ml}$	1-4-24-48 h
Cardiomiociti di ratto	TiO_2	5-50 $\mu\text{g}/\text{ml}$	1-4 h
	Co_3O_4	5-50 $\mu\text{g}/\text{ml}$	1-4 h
HepG2	CdS	0,75-1,5 $\mu\text{g}/\text{ml}$	1-4-24 h

L'utilizzo della concentrazione più bassa per le linee HAEC ed HUVEC è stata ritenuta opportuna per compensare la fragilità delle cellule primarie, per cui la concentrazione maggiore risultava essere citotossica. Allo stesso modo per i cardiomiociti è stato eliminato il

trattamento di 24h perché non significativo considerando la brevissima emivita post-espianco delle cellule in questione che avrebbe generato una frammentazione dovuta alla progressiva degenerazione e/o apoptosi delle cellule in coltura.

La metodica utilizzata prevede che $5 \cdot 10^3$ cellule vengano seminate in piastre da 24 pozzetti in 1ml di terreno completo. Dopo 24h dalla semina le cellule vengono trattate con le diverse concentrazioni di composto in esame. Dopo 24h dal trattamento si elimina il terreno e si effettua un lavaggio con HBSS ed uno con tripsina (500mg/l). Le cellule vengono staccate, trasferite in eppendorf e centrifugate a 800g per 1'. Si procede, quindi, alla preparazione dei vetrini: il pellet viene risospeso in 90 μ l di Low Melting Agarose (LMA) 0.7% e distribuito su vetrini sgrassati precedentemente agarizzati con Normal Melting Agarose (NMA) 1% e immediatamente coperto con un coprioggetto. I vetrini sono mantenuti in frigorifero per 15'. Successivamente, vengono aggiunti altri 90 μ l di LMA per formare l'ultimo strato. I vetrini sono mantenuti in frigorifero per altri 15'. Le cellule vengono poi lisate overnight a 4°C in soluzione di lisi [NaCl 2,5 M, Na₂EDTA 100 mM, TRIS-HCl 10 mM, TRITON X-100 1% e DMSO 10% (pH 10)] preparata al momento dell'utilizzo. Le cellule lisate sono quindi sottoposte al processo di "unwinding" e ad elettroforesi. I vetrini vengono disposti parallelamente in una cella elettroforetica orizzontale e poi ricoperti con tampone (Na²EDTA 1 mM, NaOH 300 mM a pH > 13) mantenuto a 0°C. I campioni vengono lasciati in queste condizioni 20 minuti (pre-elettroforesi) per permettere lo srotolamento del DNA e poi sottoposti a 20 minuti di corsa elettroforetica a 0.78 V/cm² e 300 mA. Tutti i passaggi descritti vengono eseguiti in luce gialla per evitare ulteriori danni al DNA.

Terminata l'elettroforesi, i vetrini vengono rimossi e trattati con una soluzione di neutralizzazione (ciascun vetrino viene irrorato con 2 ml di TRIS-HCl 0.4M, pH 7.5). Successivamente, i vetrini vengono fissati per immersione per 3 minuti in etanolo precedentemente mantenuto a -20°C e lasciati asciugare per 24 ore.

A questo punto i vetrini possono essere sottoposti a lettura, previa colorazione. Immediatamente prima della lettura al microscopio, il DNA viene colorato direttamente sul vetrino con 75 μ l di etidio bromuro (10 μ g/ml). I vetrini vengono esaminati (ingrandimento 400X) mediante microscopio a fluorescenza (Leica DMLS), equipaggiato con filtro di eccitazione BP515-560 e filtro di sbarramento LP580, collegato con una telecamera monocromatica PULNIX PE-2020P.

L'analisi delle comete e la valutazione delle classi di danno vengono eseguite mediante l'utilizzo della microscopia a fluorescenza contemporaneamente all'ausilio di specifici software collegati ad analizzatori di immagini (Comet Assay III, Perceptive Instruments, UK). Il software registra numerosi parametri relativi all'intensità di fluorescenza emessa per ogni cometa. Il valore di ogni parametro è basato sull'immagine digitalizzata restituita dalla telecamera connessa al microscopio a fluorescenza e descrive quantità e distribuzione del DNA in una cometa

Ad ogni pixel dell'immagine digitalizzata viene assegnato un valore di grigio compreso tra 0 e 255, proporzionale all'intensità luminosa della regione della cometa corrispondente. Per ogni pixel è quindi calcolata l'intensità di fluorescenza integrata (IF) normalizzando il valore di grigio del singolo pixel per il valore medio di grigio presentato dai pixel del background. Il parametro utilizzato per analizzare le comete nell'ambito di questa tesi è stata l'intensità della coda percentuale (*Tail Intensity %* - TI%). La TI% viene calcolata tramite la definizione della posizione di inizio della testa della cometa e di punto mediano della testa della cometa. L'algoritmo presente nel software stima l'insieme dei pixel ascrivibili alla zona della "testa" e della "coda" e calcola l'intensità di fluorescenza totale per ognuna, sommando la IF di ogni pixel. Il valore di TI% è rappresentato dal rapporto percentuale tra l'IF della coda e l'IF totale della cometa ($[IF_{CODA}/IF_{TOT}]*100$). Ogni campione viene misurato in doppio cieco e per ogni campione viene valutato il danno in almeno 50 cellule. La TI% del singolo campione è rappresentata dalla mediana dei valori di TI% delle 50 comete misurate.

Il danno al DNA può essere valutato anche mediante analisi visiva al microscopio delle diverse classi di danno al DNA, associando uno specifico valore ad ognuna di tali classi. L'operatore assegna visivamente ogni cometa misurata ad una classe di danno arbitraria in base alla frammentazione osservata (figura x)

Epigenotossicità – Comet M

Le modificazioni epigenetiche introdotte da xenobiotici stanno diventando un punto focale nella ricerca tossicologica. Al fine di sviluppare un nuovo strumento di screening in grado di proporsi come metodica di analisi primaria nell'analisi di attività epigenotossica, nell'ambito di questo dottorato è stata sviluppata una metodica in grado di rilevare le macrovariazioni di

metilazione globale in una popolazione cellulare. Lo sviluppo della metodica ha avuto come punti chiave la facilità di esecuzione e il basso costo dell'analisi e beneficia dell'approccio a singola cellula per una possibile futura spendibilità in biomonitoraggio.

La tecnica si basa sul protocollo del Comet Assay a $pH > 13$ ed introduce un trattamento enzimatico al fine di rilevare le differenze di metilazione globale. È previsto l'utilizzo di 2 enzimi di restrizione separati (HpaII e MspI) tra di loro isoschizomeri. Entrambi riconoscono lo stesso sito di restrizione ma differiscono nelle condizioni di taglio: mentre MspI non risente della metilazione nel suo sito di taglio, l'attività di HpaII viene bloccata dalla metilazione di qualsiasi delle 2 citosine presenti nel suo sito di taglio

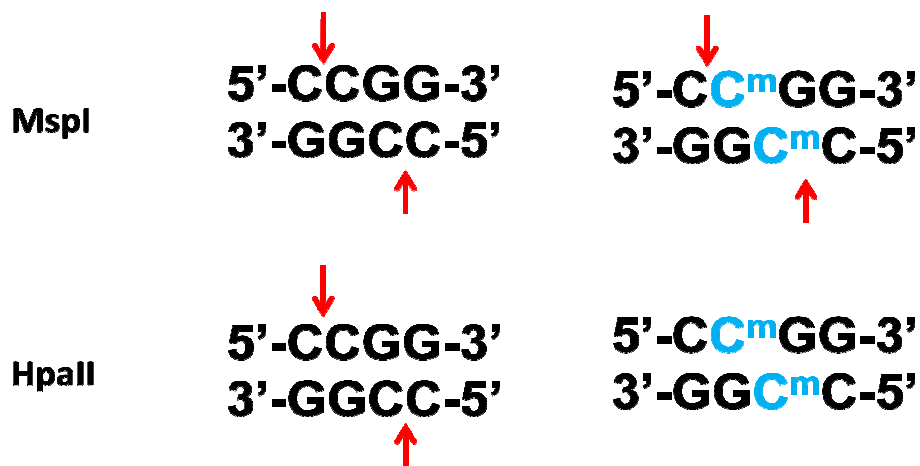


Figura 15 - Schema di taglio dei due isoschizomeri di restrizione; da notare come la metilazione nel sito di taglio inibisca l'attività di HpaII a livelli tali da farla considerare inattiva.

La frammentazione introdotta da HpaII diventa quindi inversamente proporzionale al livello di metilazione globale della cellula. Il trattamento con MspI viene utilizzato come controllo positivo, considerando la frammentazione indotta con questo enzima il massimo di frammentazione ottenibile (figura 13). I dati di intensità ricavati con HpaII vengono presentati in rapporto a quelli ottenuti con MspI ed è quindi il rapporto tra questi due enzimi che diventa misura della metilazione globale. Questo consente, di fatto, di escludere il contributo dato alla frammentazione totale dei nucleoidi da un eventuale attività genotossica dei composti saggiati.

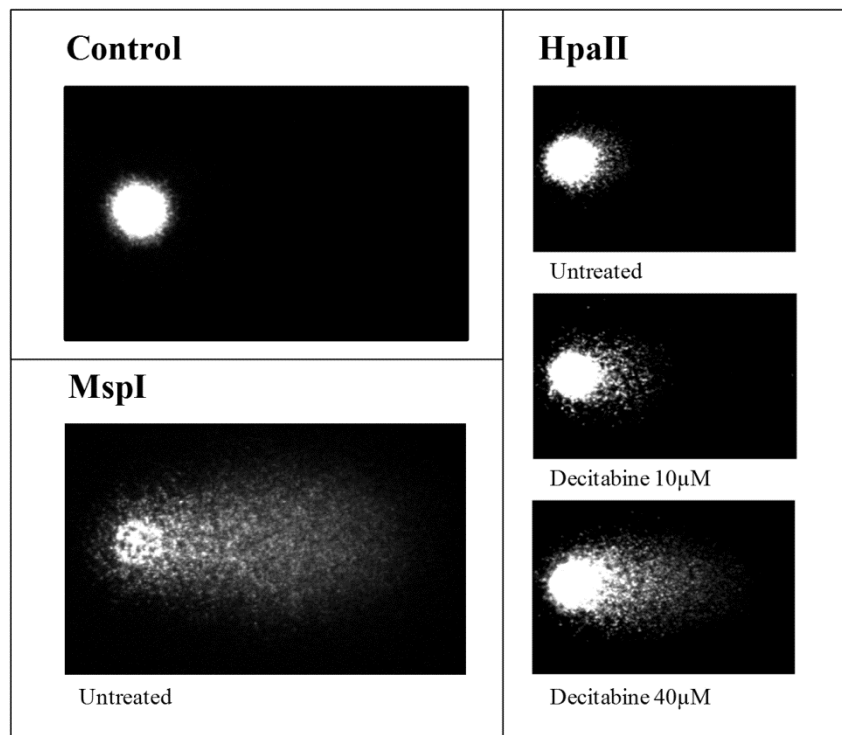


Figura 16 – Effetti della digestione enzimatica (HpaII o MspI) su nucleoidi di cellule A549 post-elettroforesi. Un nucleotide non digerito (control) è riportato come comparazione. Il pannello HpaII mostra nucleoidi non trattati o trattati con dosi crescenti di decitabina (trattamento di 24h) [126]

I dati di intensità ricavati con HpaII vengono valutati in rapporto a quelli ottenuti con MspI ed è quindi il rapporto tra questi 2 enzimi che diventa misura della metilazione globale:

$$(TI\%_{HpaII}/TI\%_{MspI}) * 100$$

Dal punto di vista pratico la metodologia prevede l'aggiunta di due passaggi al protocollo classico del comet assay pH>13 (Figura 14)

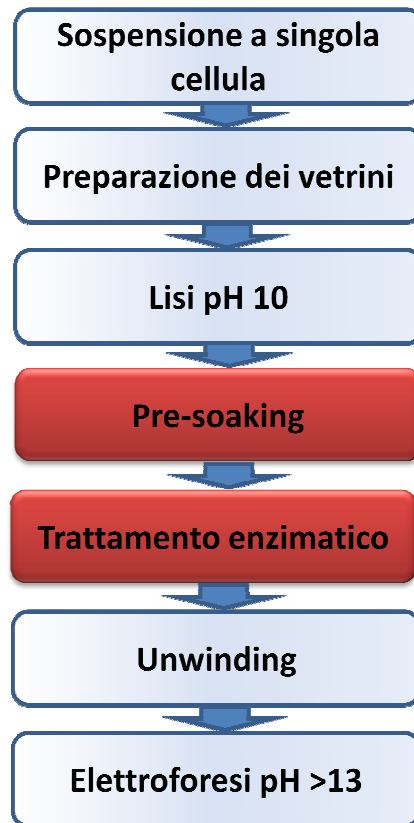


Figura 17 - Workflow del protocollo di comet M con evidenziati in rosso i due passaggi aggiuntivi

Definito il protocollo ottimale, si è proceduto alla verifica di ripetibilità del metodo tramite l'analisi di ripetibilità dei risultati su 10 comet M indipendenti su cellule A549. Quindi per verificare la sensibilità del metodo nei confronti di variazioni positive e negative del livello di metilazione globale si è eseguito il protocollo comet M su cellule A549 trattate con due sostanze ad azione nota sul metiloma: decitabina e cloruro di nichel.

La decitabina è un analogo della citosina ampiamente usato nel trattamento di vari tipi di leucemia, è diventata un farmaco di riferimento negli studi riguardanti la metilazione per la sua capacità di indurre una ipometilazione globale consistente. La decitabina viene incorporata nella doppia elica principalmente durante la replicazione del DNA ed esprime il suo ruolo bloccando le DNA metiltransferasi (in particolare DNMT1) sulla molecola del DNA. Quando la DNMT estrude la decitabina, riconosciuta come citosina, dal filamento per metilarla l'enzima si ritrova bloccato nella conformazione chiusa essendo impedito il trasferimento del gruppo metile dalla SAM alla decitabina a causa della sua conformazione sterica. L'enzima bloccato sul filamento viene successivamente degradato con una conseguente diminuzione dei livelli citoplasmatici di DNMT. La diminuzione dei livelli di

DNMT porta ad una demetilazione genomica globale che, in ambito clinico, viene utilizzata nel tentativo di riattivare i geni oncosoppressori delle cellule tumorali [138].

Il cloruro di nichel è una molecola tossica con proprietà tossiche, genotossiche e cancerogene ben caratterizzate [139]. Tuttavia, in anni recenti il nichel ha assunto il nuovo ruolo di contaminante epigenotossico. Numerosi studi hanno riportato la sua capacità di indurre eterocromatizzazione unitamente a forte ipermetilazione globale [105,106,140]. Gli ioni di Ni^{2+} inducono ipermetilazione del DNA e deacetilazione istonica dislocando e sostituendo gli ioni Mg^{2+} complessati con il backbone zucchero-fosfato del DNA, aumentando di conseguenza la condensazione cromatinica e generando etero cromatina [141]; questa condensazione locale può, in seguito, indurre ipermetilazione locale e globale [142].

Gli enzimi di restrizione FastDigest HpaII ed MspI insieme con il loro buffer di reazione esclusivo sono stati acquistati da Thermo Fisher (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA). Le sostanze ad azione nota sul metiloma, decitabina e cloruro di nichel ($NiCl_2$) sono state acquistate da Sigma Aldrich (St. Louis, MO). Entrambe sono state solubilizzate in PBS alla concentrazione desiderata ed utilizzate per il trattamento delle cellule.

Sperimentalmente si procede come descritto per il protocollo di comet assay fino alla fase di lisi. Terminata la fase di lisi delle membrane i vetrini vengono immersi in PBS 1x per 10 minuti al fine di rimuovere le tracce di lisi e preparare i vetrini per la fase di digestione enzimatica. Quindi i vetrini vengono disposti in piano e su ogni vetrino vengono distribuiti 100 μ l di soluzione enzimatica alternativamente contenente HpaII o MspI. I controlli vengono trattati con il solo buffer enzimatico. Dopo essere stati incubati 10 minuti a 37°C i vetrini vengono immediatamente disposti nella cella elettroforetica e sommersi con il tampone di corsa elettroforetica al fine di interrompere l'attività enzimatica. L'elettroforesi avviene immediatamente, in assenza del passaggio di unwinding previsto dal protocollo classico, per 45 minuti al fine di aumentare la dimensione delle code delle comete massimizzando la sensibilità di misurazione del danno indotto. Si procede quindi con il protocollo classico del comet assay per le fasi di neutralizzazione, fissazione e lettura.

Epigenotossicità - Valutazione dell'attività trascrizionale delle DNMT mediante Real Time PCR

Al fine di caratterizzare ulteriormente la risposta cellulare a sostanze ad azione epigenotossica si è scelto di analizzare i livelli trascrizionali dei tre enzimi DNA metiltransferasi (DNMT1, DNMT3a, DNMT3b), la classe di enzimi deputati del mantenimento dell'epigenoma cellulare. L'analisi dell'attività trascrizionale delle DNMT permette di descrivere in modo più accurato se l'interazione della cellula con xenobiotici si rifletta esclusivamente in una modifica del metiloma o se questa interazione possa determinare un'ulteriore squilibrio anche nei sistemi di mantenimento dell'omeostasi dello stesso.

Al fine di introdurre macrovariazioni nel metiloma della cellula sono state utilizzate le due molecole selezionate per la loro azione epigenotossica nota, decitabina e NiCl₂ (rispettivamente alla concentrazione di 20μM e 500μM) su cellule A549. Le concentrazioni sono state scelte all'interno del range di concentrazioni saggiate con la metodica del comet M come le concentrazioni in grado di generare il miglior rapporto dose/effetto.

Dopo 24h di trattamento, è stata eseguita un'estrazione totale di RNA dalle colture cellulari attraverso il RNeasy Mini Kit (QIAGEN, Hilden, Germany), seguita da retro trascrizione attraverso Takara PrimeScript 1st strand cDNA synthesis kit (Takara Bio Inc., Shiga, Japan), utilizzando primer poli-T al fine di isolare la sola frazione di RNA messaggero. La quantità dei messaggeri codificanti per i geni in esame è stata saggiata mediante PCR real time quantitativa utilizzando RT2 SYBR Green qPCR Master Mix (Thermo Scientific, Waltham, MA). La reazione di PCR, unitamente alla misurazione dei livelli di fluorescenza, è stata eseguita mediante termociclatore Applied Biosystems StepOne Real-Time PCR System (Life Technologies, Thermo Scientific, Waltham, MA). I primer per le 3 DNMT sono stati ricavati da Szemes et al [143].

Analisi statistica

Per analizzare differenze statistiche tra i campioni saggiati è stato utilizzato il pacchetto statistico SPSS 19 (SPSS Inc., Chicago, IL). I valori medi di esperimenti replicati sono stati usati in una analisi della varianza ad una via. Per valori significativi di F ottenuti ($p < 0,05$) è stato

eseguito confronto a coppie tra trattamenti attraverso test t di Student con correzione di Bonferroni.

Risultati

Il lavoro di questa tesi di dottorato si è articolato su due fronti paralleli. Il primo volto a saggiare la tossicità e la genotossicità dei NM presi in esame secondo una prospettiva tossicologica classica, il secondo mirato allo sviluppo ed applicazione di una nuova metodica per l'analisi dell'epigenotossicità dei NM nei confronti del metiloma cellulare e dei suoi sistemi di omeostasi.

L'osservazione al microscopio ottico suggerisce che per tutte le NP analizzate si formino gradualmente aggregati di NP al di sopra delle cellule adese. Gli aggregati sembrano essere internalizzati attraverso la membrana e localizzare nel citoplasma formando un anello perinucleare [136].

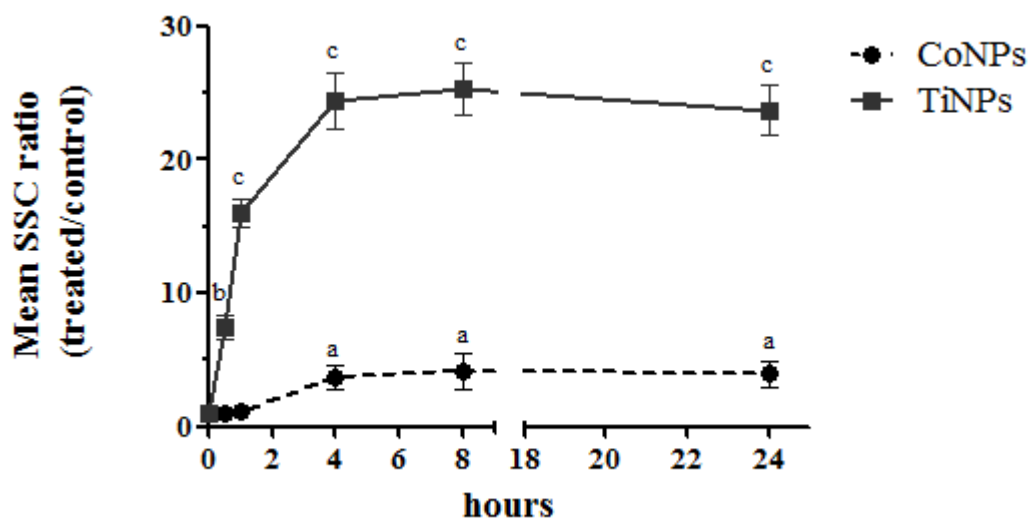


Figura 18 - Internalizzazione di NP di Co_3O_4 (A) e TiO_2 (B) misurata mediante citofluorimetria a flusso a concentrazione di $50\mu\text{g}/\text{ml}$ per entrambe le NP a tempi crescenti. Il dato di internalizzazione è misurato come rapporto (trattato/controllo) del side scatter medio. HAEC: linee continue; HUVEC: linee tratteggiate. a: $p < 0.05$; b: $p < 0.01$; c: $p < 0.001$ [136]

L'analisi dell'internalizzazione delle NP di Co e Ti eseguita in cellule A549 (figura 18) a concentrazione di $50\mu\text{g}/\text{ml}$ a tempi crescenti ha mostrato una internalizzazione rapida iniziale che raggiunge un plateau a 4h dall'esposizione. Le NP di titanio hanno mostrato un grado di internalizzazione maggiore rispetto al cobalto.

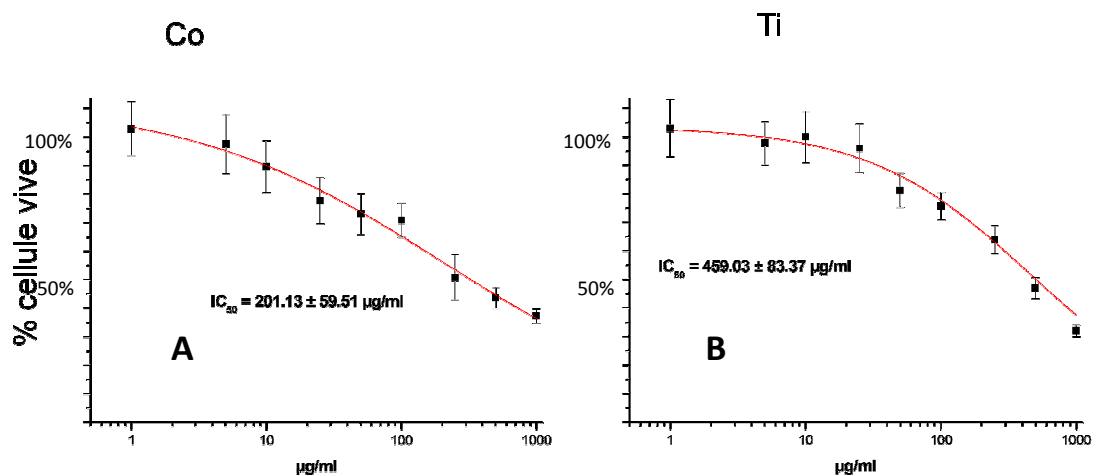


Figura 19 - Analisi della citotossicità eseguita mediante conteggio cellulare su cellule A549 trattate con Co₃O₄ NP (A) o con TiO₂ NP (B) a concentrazioni crescenti per 24h.

L'analisi della vitalità in cellule A549 (figura 19) è stata eseguita mediante conteggio cellulare e non ha evidenziato effetti citotossici significativi alle concentrazioni saggiate, con IC50 molto superiori a 100µg/ml.

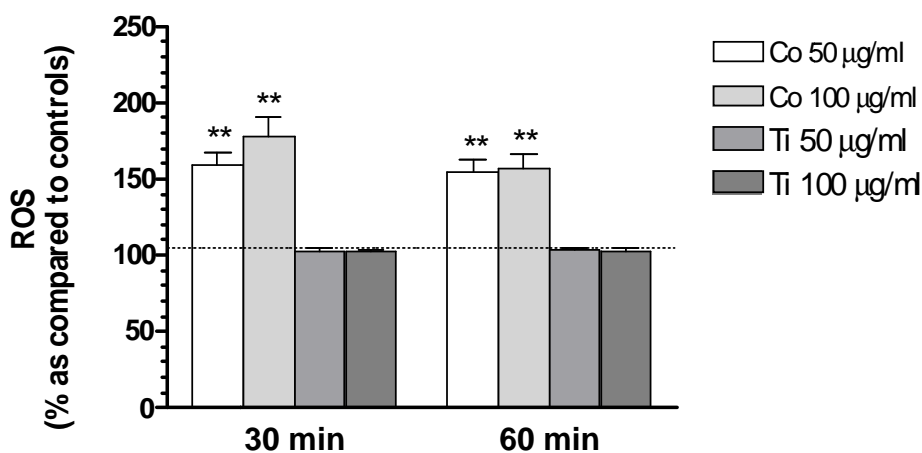


Figura 20 - livelli di ROS misurati tramite analisi in fluorescenza con DCFH-DA su cellule A549 trattate con Co₃O₄ NP e TiO₂ NP [50-100µg/ml] a tempi crescenti. **: p<0.01

L'analisi dei livelli di ROS citoplasmatici (figura 20) ha evidenziato un aumento significativo (p<0.01) nella linea A549 solo a seguito dell'esposizione a Co NP.

In uno studio recente Alinovi et al [136] hanno descritto l'internalizzazione delle NP di Ti e Co mediante citofluorimetria a flusso nelle linee cellulari HAEC ed HUVEC.

L'analisi citofluorimetrica ha evidenziato per entrambe le NP un uptake molto rapido nella prima mezzora con il raggiungimento di un plateau ad 1h di trattamento per il cobalto e sei ore per il titanio con ridotte differenze tra le due linee[136].

L'analisi della vitalità cellulare non ha mostrato variazioni significative a seguito di trattamento con Ti NP. L'esposizione a Co NP ha determinato un lieve ma significativo calo del numero di cellule in coltura alla dose di 100µg/ml. In più l'esposizione a cobalto ha determinato un significativo calo dei livelli di ATP a partire dalla concentrazione di 20µg/ml.

L'analisi dei livelli di specie reattive dell'ossigeno ha mostrato un aumento dei livelli di ROS solo per l'esposizione a NP di Co₃O₄ nelle linee HAEC ed HUVEC. Le TiO₂ NP non sembrano indurre aumento rilevabile delle specie reattive dell'ossigeno.

Genotossicità

TiO₂ NP:

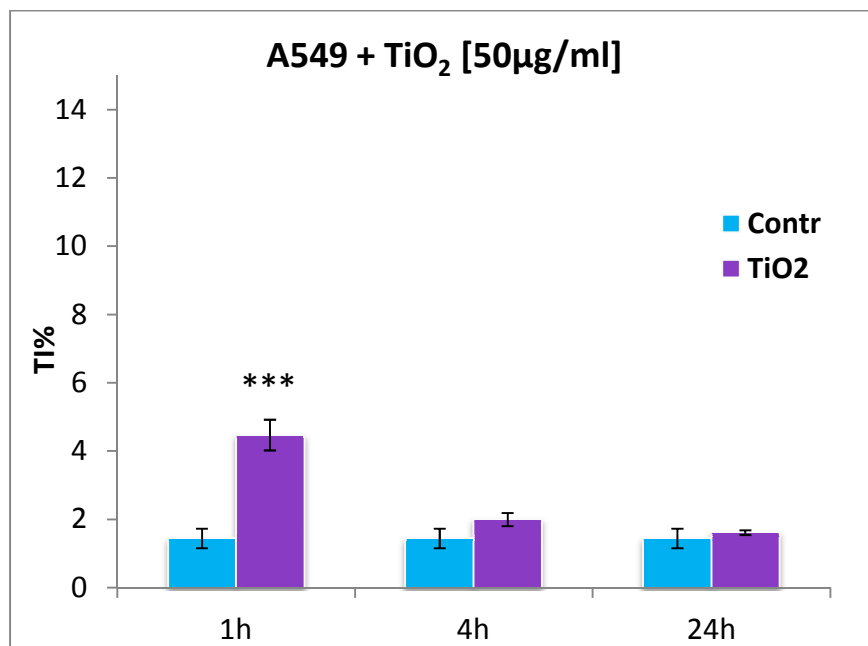


Figura 21 – Comet assay su linea cellulare A549 trattata con TiO₂ NP [50µg/ml] a tre tempi di trattamento (1-4-24h). (Contr: T1% di nucleoidi da cellule A549 non trattate) *** p<0.001

L'analisi della genotossicità delle TiO₂ NP sulla linea A549 (figura 21) è stata condotta mediante comet assay alla dose di 50µg/ml a tempi crescenti di trattamento (1-4-24h). Le NP mostrano una significativa induzione di genotossicità (p<0.001) dopo un'ora di trattamento. I

valori di frammentazione genomica ritornano a livelli paragonabili al controllo dopo 4 ore di trattamento.

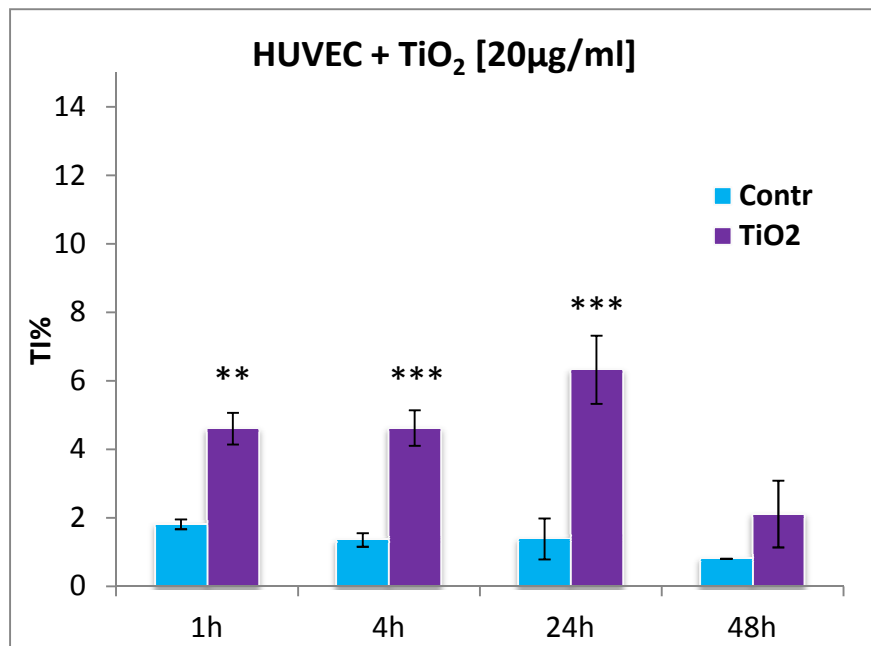


Figura 22 - Comet assay su linea cellulare HUVEC trattata con TiO₂ NP [20µg/ml] a quattro tempi di trattamento (1-4-24-48h). (Contr: TI% di nucleoidi da cellule HAEC non trattate) ** p<0.01

L'esposizione a NP di titanio ha determinato l'induzione di una lieve, seppur significativa risposta genotossica in tutte le linee cellulari normali analizzate. Sia HAEC che HUVEC mostrano un ritorno a livelli di frammentazione genomica comparabili al controllo nel tempo di trattamento più lungo (48h).

In particolare, le HUVEC (figura 22) mostrano una induzione di genotossicità a breve termine con un incremento della TI% significativo ($p < 0.01$) dopo un'ora di trattamento. Il valore di TI% si mantiene costante anche ai trattamenti di 4-24h per poi assumere livelli paragonabili al controllo nell'arco delle 48h di trattamento.

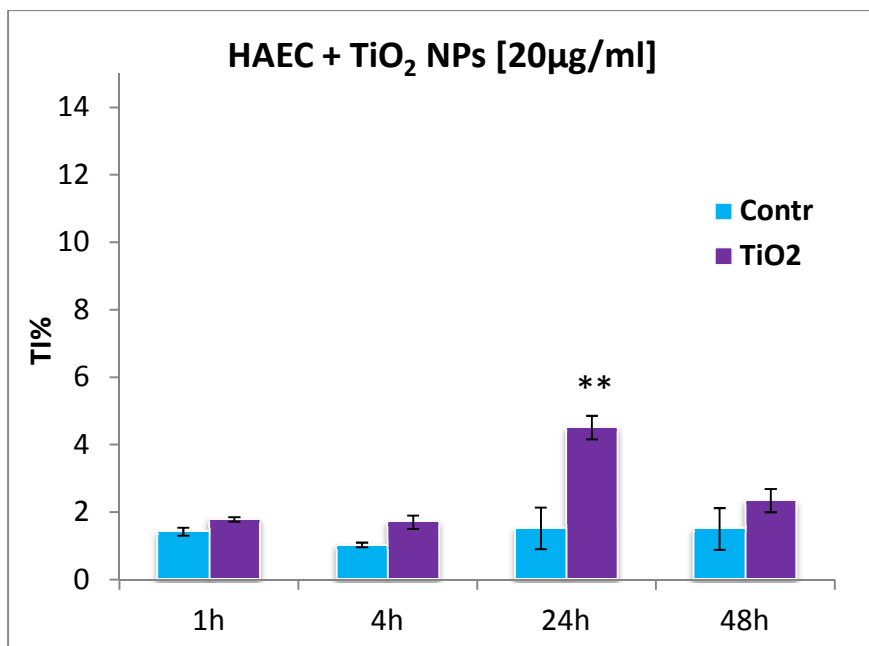


Figura 23 - Comet assay su linea cellulare HAEC trattata con TiO₂ NP [20µg/ml] a quattro tempi di trattamento (1-4-24-48h). (Contr: T1% di nucleoidi da cellule HUVEC non trattate) ** p<0.01, *** p<0.001

Le HAEC (figura 23), all'opposto sembrano mostrare una insorgenza di genotossicità con tempistiche più lunghe, con un picco di T1% significativamente più alto del controllo (p<0.01) dopo 24h di trattamento.

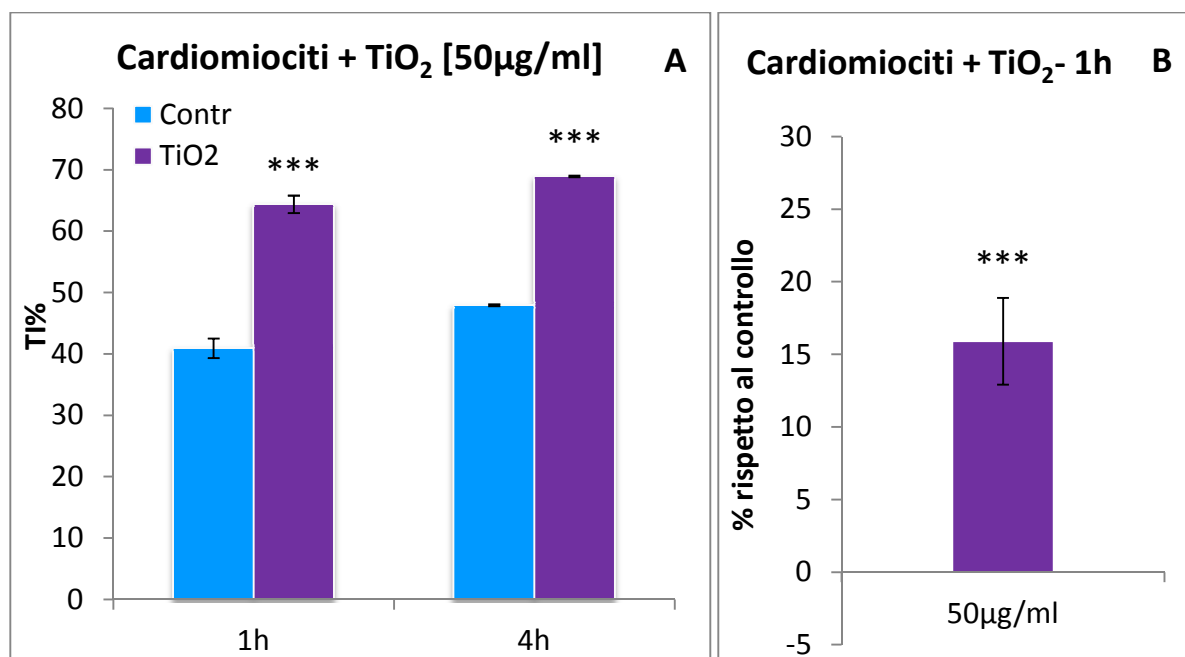


Figura 24 - A: comet assay su cardiomiociti da espianto trattati con Ti NP [50µg/ml] a due tempi di trattamento (1-4h); B: livelli di ROS misurati tramite analisi in fluorescenza con DCFH-DA su cardiomiociti trattati con Ti NP [50µg/ml] per 1h. (Contr: T1% di nucleoidi da cardiomiociti non trattati) *** p<0.001

L'analisi di genotossicità è stata eseguita anche su cardiomiociti di ratto post-espanto trattati con una concentrazione di Ti NP [50µg/ml] per due tempi di trattamento (1-4h) (figura 24 A). Il trattamento determina un aumento della T1% nei campioni trattati già dopo 1h di trattamento, aumento che si mantiene costante a 4h. Per meglio caratterizzare il danno indotto alle cellule è stata eseguita l'analisi dei livelli di ROS indotti da trattamento con Ti NP alla stessa dose dopo 1h di trattamento. L'analisi ha evidenziato un aumento significativo dei livelli di ROS intracellulari quantificabile intorno al 15-20% del valore del controllo (figura 24 B).

Co₃O₄ NP

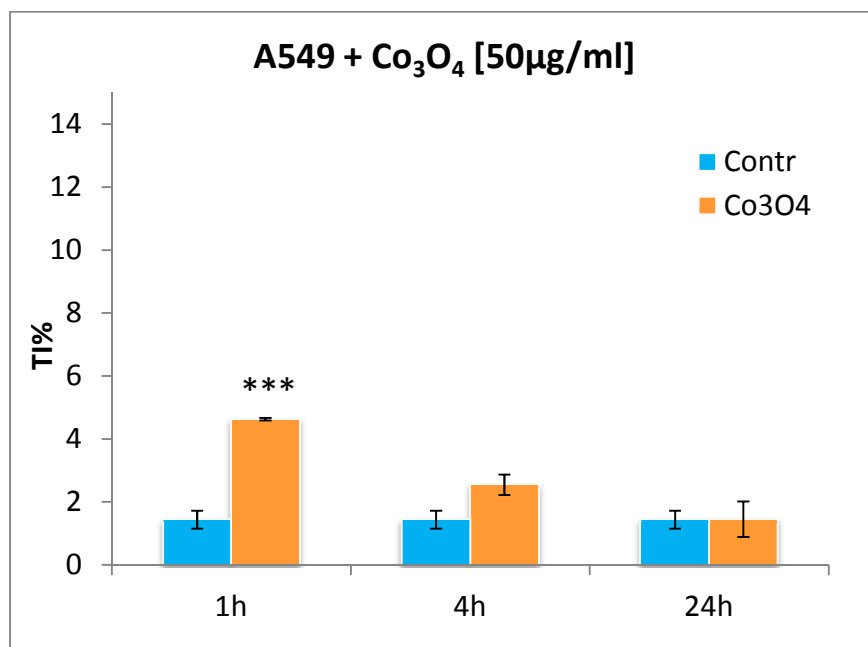


Figura 25 – Comet assay su linea cellulare A549 trattata con Co₃O₄ NP [50µg/ml] e tre tempi di trattamento (1-4-24h). (Contr: T1% di nucleoidi da cellule A549 non trattate) *** p<0.001

Si è saggiata l'induzione di frammentazione genomica mediante comet assay sulla linea cellulare A549 (figura 25) trattata con Co NP alla dose di 50µg/ml a tempi crescenti di trattamento (1-4-24h). Le NP di cobalto mostrano l'induzione di una significativa genotossicità (p<0.001) già dopo un'ora di trattamento similmente a quanto visto per il titanio. I valori di frammentazione genomica ritornano a livelli paragonabili al controllo da 4 ore di trattamento.

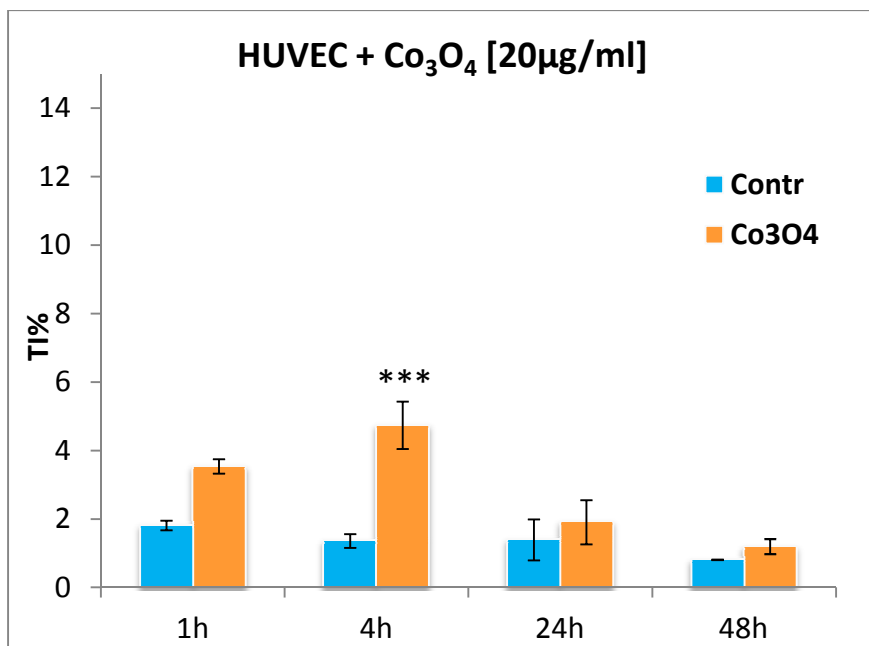


Figura 26 - Comet assay su linea cellulare HUVEC trattata con Co_3O_4 NP [20 $\mu\text{g}/\text{ml}$] a quattro tempi di trattamento (1-4-24-48h). (Contr: T1% di nucleoidi da cellule HUVEC non trattate) *** $p < 0.001$

L'esposizione a nanoparticelle di ossido di cobalto ha causato una risposta genotossica rilevabile in tutte le linee normali saggiate. Nella linea HUVEC (figura 26) si evidenzia un aumento della genotossicità lieve ma significativo ($p < 0.001$) a partire da 4h di trattamento. La frammentazione della linea HUVEC ritorna ad essere paragonabile al controllo già dopo 24h di trattamento

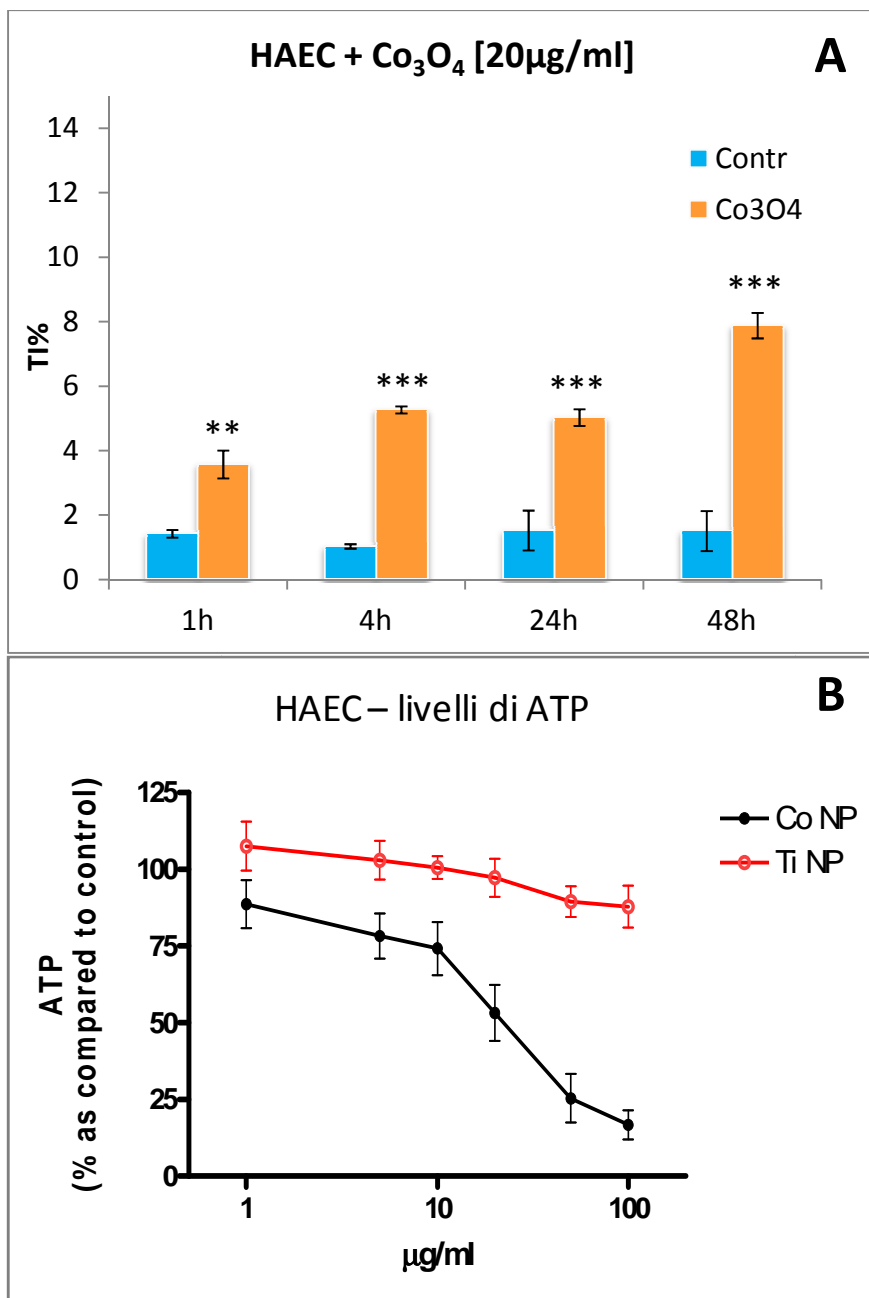


Figura 27 – A: Comet assay su linea cellulare HAEC trattata con Co₃O₄ NP [20µg/ml] a quattro tempi di trattamento (1-4-24-48h). (Contr: TI% di nucleoidi da cellule HAEC non trattate) ** p<0.01, *** p<0.001; B: livelli di ATP percentuali rispetto al controllo misurati mediante saggio in luminescenza su cellule HAEC trattate con Co NP e Ti NP a concentrazioni crescenti per 24 h [136]

La linea epiteliale di aorta (figura 27 A) ha mostrato un aumento tempo-dipendente della TI% a tutti i tempi saggiati. Parallelamente non è stato rilevato alcun aumento della mortalità cellulare alla concentrazione selezionata, tuttavia è stata evidenziata una significativa diminuzione dei livelli intracellulari di ATP (figura 27 B) già ad una concentrazione di 10µg/ml.

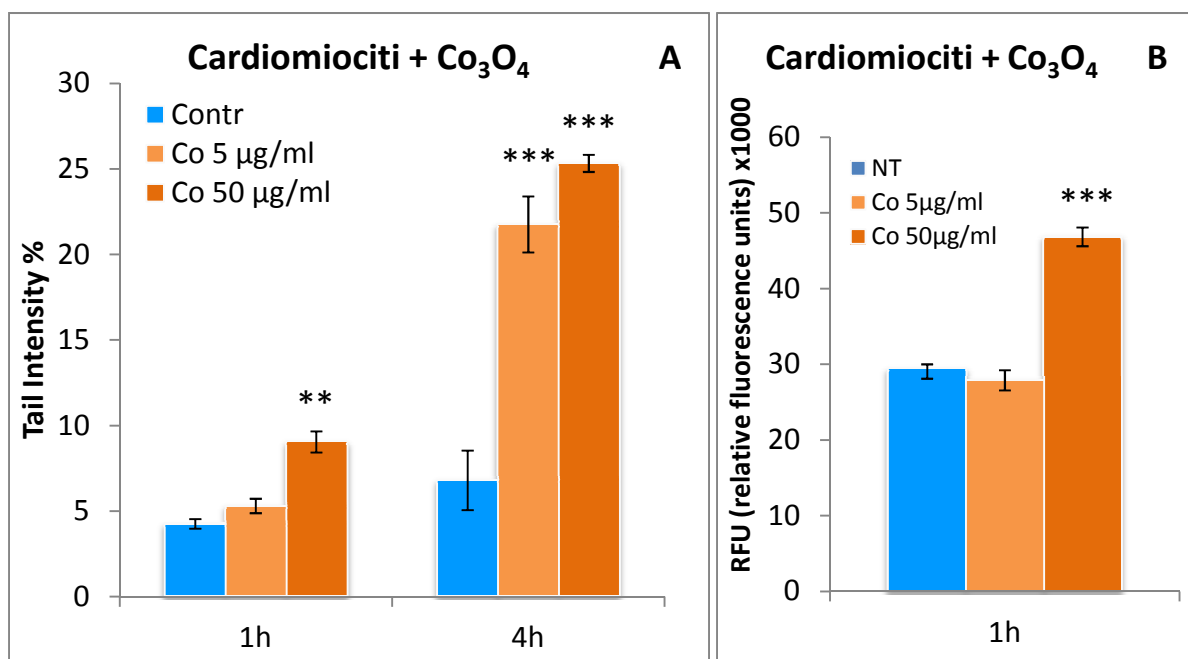


Figura 28 - A: comet assay su cardiomiociti da espianto trattati con Co₃O₄ NP [50µg/ml] a due tempi di trattamento (1-4h); B: livelli di ROS misurati tramite analisi in fluorescenza con DCFH-DA su cardiomiociti trattati con Ti NP [50µg/ml] per 1h. * p<0.05, ** p<0.01, *** p<0.001

Il trattamento di cardiomiociti di ratto da espianto primario con Co NP per 1-4h ha mostrato un aumento di genotossicità rilevabile a 4h di trattamento per la dose di 5µg/ml e a partire da 1h di trattamento per la dose di 50µg/ml (figura 28 A).

L'analisi dei livelli di ROS intracitoplasmatici eseguita mediante saggio in fluorescenza con diclorofluoresceina diacetato (DCFH-DA) su cardiomiociti trattati con Co NP per 1h ha mostrato un aumento percepibile di livelli di specie reattive dell'ossigeno solo per la dose di 50µg/ml (figura 28 B).

CdS NP

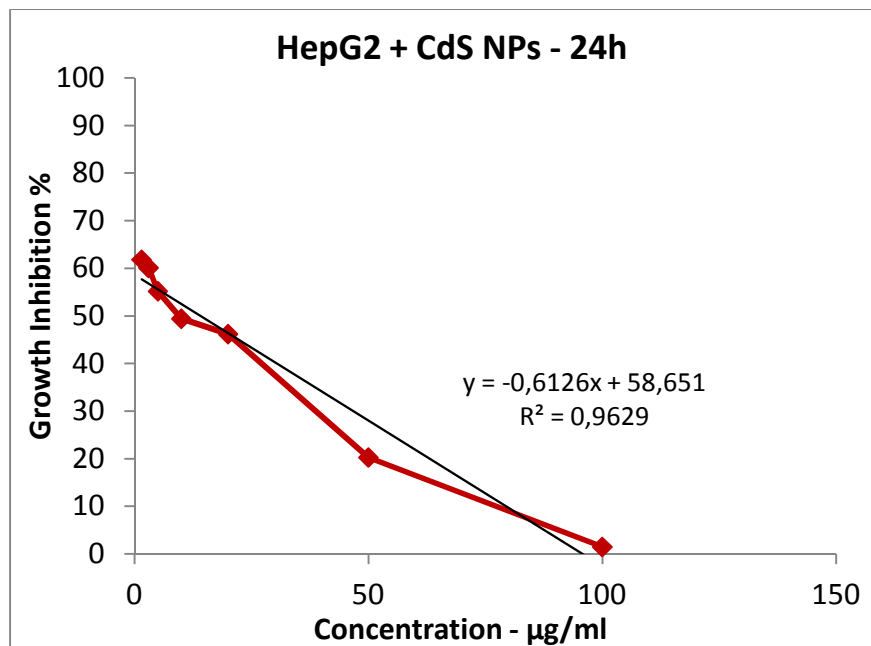


Figura 29 - Analisi della citotossicità eseguita mediante MTS assay su linea cellulare HepG2 trattata con CdS NP [0,5-1,5-3-5-10-20-50-100 µg/ml] per 24h.

La citotossicità delle nanoparticelle di cadmio solfuro (figura 29) è stata analizzata sulla linea cellulare di epatocarcinoma HepG2 a dosi crescenti di CdS NP [0,5-1,5-3-5-10-20-50-100 µg/ml] per 24h di trattamento. Le CdS NP hanno mostrato una inibizione della crescita con andamento dose-effetto. La tossicità di queste NP si dimostra sensibilmente più alta di quella delle NP di titanio e cobalto con un IC50 che si attesta ad un valore di circa 14µg/ml.

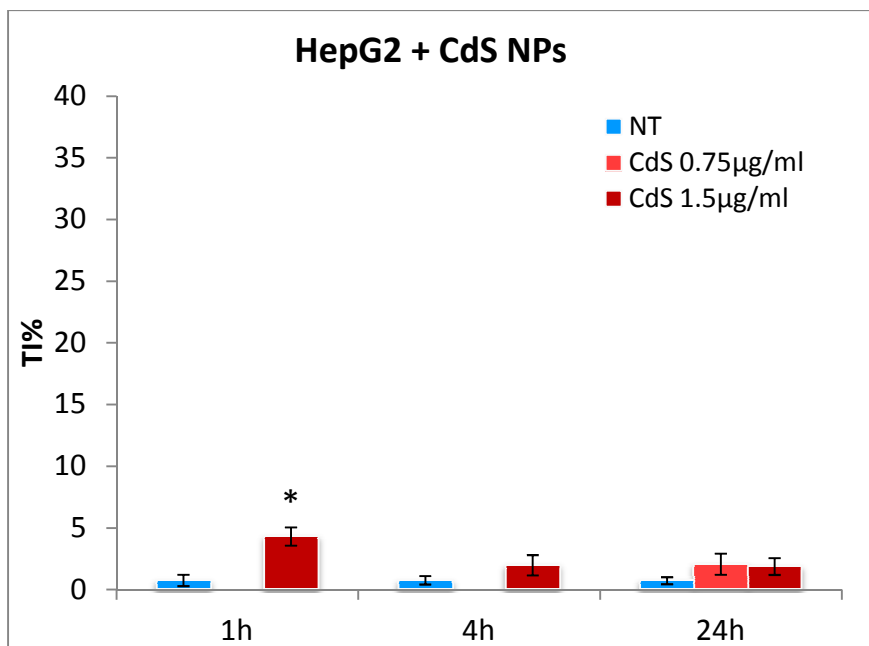


Figura 30 - Comet assay su linea cellulare HepG2 trattata con CdS NP [0,75-1,5 µg/ml] a tre tempi di trattamento (1-4-24h). * p<0.05.

L'analisi dell'induzione di genotossicità mediante comet assay sulla linea cellulare HepG2 (figura 18) trattata con Cd NP (figura 30) è stata eseguita inizialmente a due dosi di trattamento [0,75-1,5 µg/ml] per 24h. Le dosi sono state scelte al fine di limitare la mortalità cellulare al di sotto del 30% essendo questa una soglia di citotossicità richiesta per l'esecuzione del comet test. A 24h di trattamento nessuna delle due dosi saggiate ha mostrato induzione significativa di genotossicità, pertanto si è proseguito mantenendo la sola dose più alta [1,5 µg/ml] ed analizzando tempi di trattamento più brevi (1-4h). L'analisi ha mostrato l'induzione di una genotossicità lieve ad 1h di trattamento che già a 4h assume di nuovo livelli paragonabili al controllo.

Epigenotossicità

Al fine di rilevare le macrovariazioni di metilazione globale durante questo dottorato è stato sviluppato un protocollo modificato del comet assay (comet M), basato sulla metodica che prevede il trattamento separato con due enzimi di restrizione proposto da Wentzel et al [125]. Lo sviluppo della metodica è stato focalizzato a massimizzare la rapidità di esecuzione e la sensibilità e ripetibilità del dato al fine di un futuro utilizzo in studi di biomonitoraggio. Il primo passo per la validazione del metodo è stata la definizione del protocollo ottimale: sono state saggiate numerose concentrazioni enzimatiche, buffer di pre-trattamento, tempi di *unwinding* e tempi elettroforetici al fine di ottenere la massima risoluzione sulla coda delle comete (figura 16 e 31).

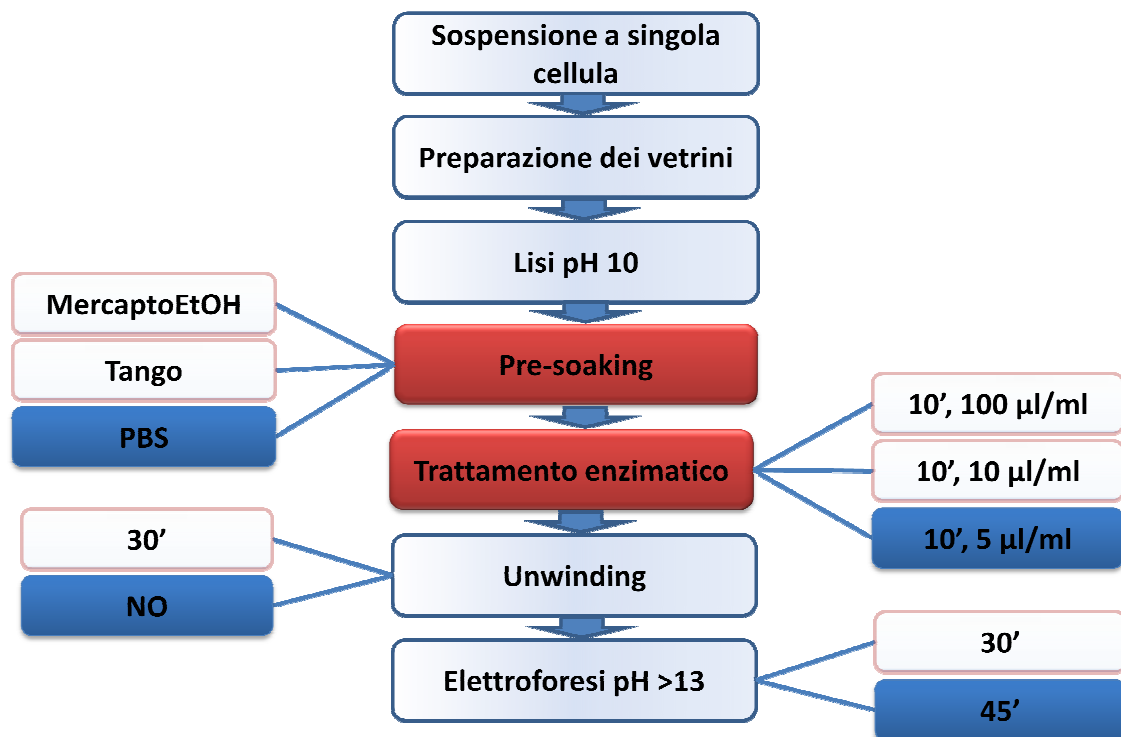


Figura 31 - messa a punto della metodica comet M con dettaglio delle condizioni di reazione saggiate; in rosso i passaggi aggiuntivi introdotti dal metodo al comet assay classico, in blu i parametri selezionati come ottimali per l'esecuzione del test.

Per la fase di *pre-soaking* sono stati saggiati tre buffer diversi. Il buffer contenente mercaptoetanolo proposto da Wentzel et al ha determinato una frammentazione eccessiva delle comete, anche nei campioni non digeriti successivamente con enzimi di restrizione, ed è stato, per questo ritenuto inadatto. Similmente il buffer Tango (33 mM Tris-acetato, 10

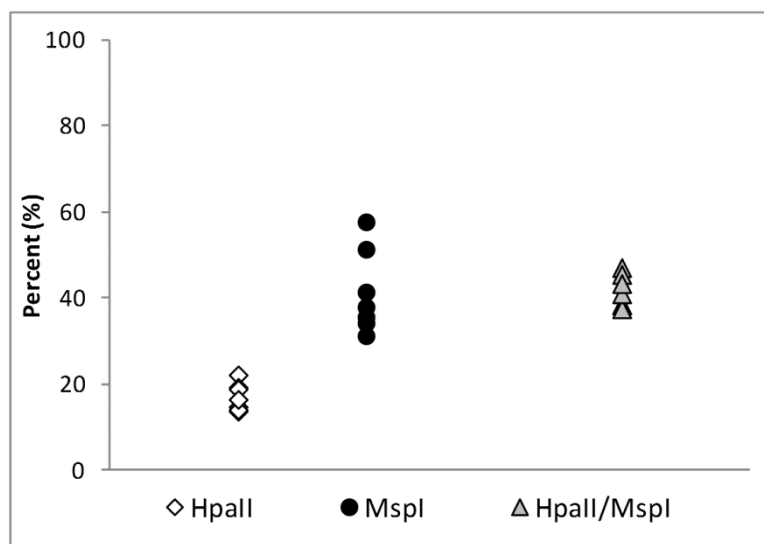
mM magnesio acetato, 66 mM potassio acetato, 0.1 mg/ml BSA), proposto dalla ditta produttrice degli enzimi di restrizione come buffer di reazione per HpaII ed MspI nelle versioni non Fast Digest, ha determinato un aumento di frammentazione. È stato quindi selezionato come ottimale un pretrattamento mediante immersione in PBS 1x per 10 minuti a temperatura ambiente come ottimale per la metodica.

L'individuazione della concentrazione enzimatica corretta ha richiesto prove ripetute al fine di individuare la corretta concentrazione enzimatica al fine di massimizzare la dimensione delle comete e, di conseguenza, la sensibilità del test senza tuttavia comprometterne la leggibilità dovuta a comete eccessivamente grandi e disperse.

La fase di *unwinding*, che permette il rilassamento del materiale genetico pre-elettroforesi, è stata eliminata perché generava eccessiva dispersione del materiale genetico contenuto nelle comete. L'aumento del tempo di elettroforesi a 45 minuti è stato selezionato al fine di produrre code più lunghe che permettessero una sensibilità maggiore del test.

Ripetibilità

Per verificare la ripetibilità del test, sono stati condotti 10 esperimenti indipendenti su cellule A549 (figura 32). La variabilità intra-sperimentale è risultata moderata sia per le TI% medie ottenute con la digestione con HpaII sia per quelle ottenute con MspI (MediaTI%_{HpaII}= 16,999; SD_{HpaII}= 2,930; MediaTI%_{MspI}=41,335; SD_{MspI}= 8,980; MediaTI%_{HpaII/MspI}=41,582; SD_{HpaII/MspI}= 3,498).



TI% _{HpaII} media	TI% _{MspI} media	TI% _{HpaII/MspI} media
13,685	35,591	38,449
22,125	57,688	38,352
19,233	51,317	37,479
14,690	31,222	47,052
18,816	41,388	45,463
14,015	34,221	40,954
16,430	37,921	43,327
16,999	41,335	41,582
17,473	42,156	42,030
16,808	39,937	42,555

Figura 32 - Distribuzione relativa delle TI% medie delle digestioni con HpaII ed MspI ottenute tramite comet M su cellule A549 non trattate e loro rapporto percentuale (TI%_{HpaII}/TI%_{MspI}*100. Il grafico e la tabella sottostante riportano i risultati di 10 esperimenti indipendenti [126]

Tuttavia il parametro finale selezionato per comparare i livelli di metilazione globale tra trattamenti è stato il rapporto percentuale tra le TI% derivanti dalle due digestioni enzimatiche separate (TI%_{HpaII}/TI%_{MspI}*100). Si suppone che i due parametri di HpaII e MspI co-varino in risposta alla frammentazione genomica basale presente nella popolazione pre-digestione enzimatica, per questo l'utilizzo del rapporto tra le due TI% offre un parametro più efficace in virtù del suo ridotto coefficiente di variabilità (CV) minimizzando

ulteriormente la variabilità intra-sperimentale ($CV_{HpaII} = 0,186$; $CV_{MspI} = 0,234$; $CV_{HpaII/MspI} = 0,091$).

Sensibilità nei confronti di macrovariazioni di metilazione

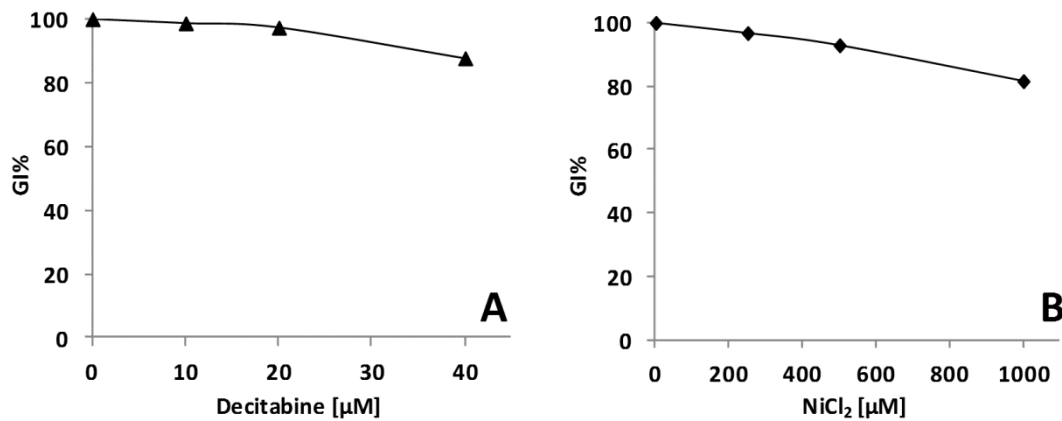


Figura 33 – Inibizione della crescita (GI%) misurata mediante MTS assay su cellule A549 trattate per 24h con dosi crescenti di (A) decitabina [0-10-20- 40mM] e (B) NiCl₂ [0-250-500-1000mM] [126].

Ottenuta una ripetibilità soddisfacente si è saggiata la sensibilità del metodo nei confronti delle macrovariazioni di metilazione globale. A tal fine la linea cellulare A549 è stata trattata con sostanze note per la loro interazione con il metiloma (decitabina e cloruro di nichel). La decitabina alle concentrazioni selezionate, precedentemente già riportate come sub-tossiche [144,145], non ha mostrato induzione di citotossicità (figura 33 A). Il cloruro di nichel ha mostrato una lieve inibizione della crescita alla dose di 1000μM (figura 33 B). Questa lieve inibizione non ha generato aumento della frammentazione genomica nei test successivi e, per questo, non risulta rilevante ai fini dell'esecuzione del saggio comet M.

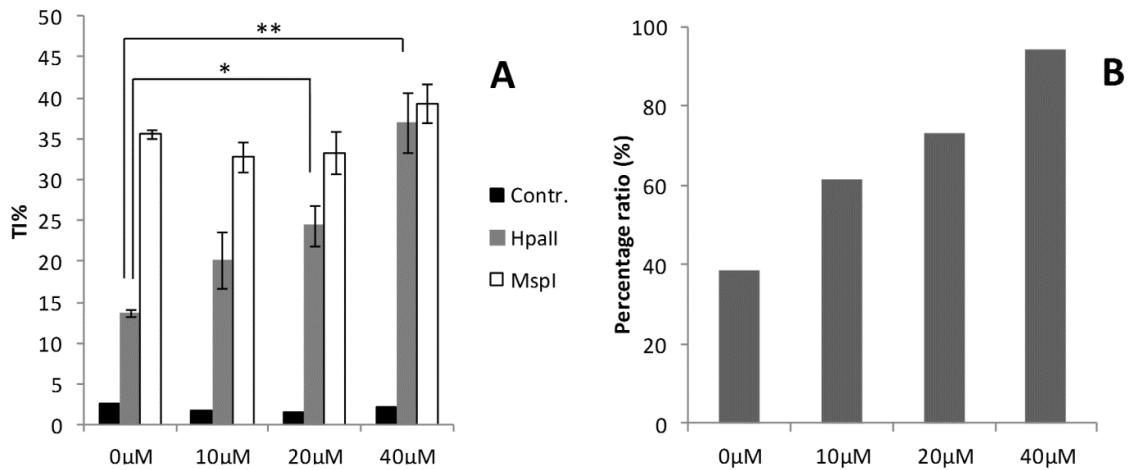


Figura 34 – Comet M su nucleoidi di cellule A549 trattate per 24h con dosi crescenti di decitabina. (A) TI% media delle medie di 100 nucleoidi individuali per trattamento (Contr.: nucleoidi non digeriti; HpaII: nucleoidi digeriti con HpaII per 10'; MspI: nucleoidi digeriti con MspI per 10'); (B) Rapporto percentuale combinato delle TI% medie ottenute attraverso digestione enzimatica (TI%[HpaII]/TI%[MspI]*100). * p<0.05, ** p<0.01. [126]

Si è quindi proceduto applicando il metodo comet M su cellule A549 trattate con concentrazioni crescenti di decitabina [10-20-40μM]. Il trattamento ha mostrato un significativo aumento nella frammentazioni ottenuta tramite digestione con HpaII (figura 34 A), supportando l'ipotesi di una demetilazione globale mediata da decitabina; a conferma del dato, il rapporto HpaII/MspI ha mostrato un aumento dose dipendente (figure 34 B).

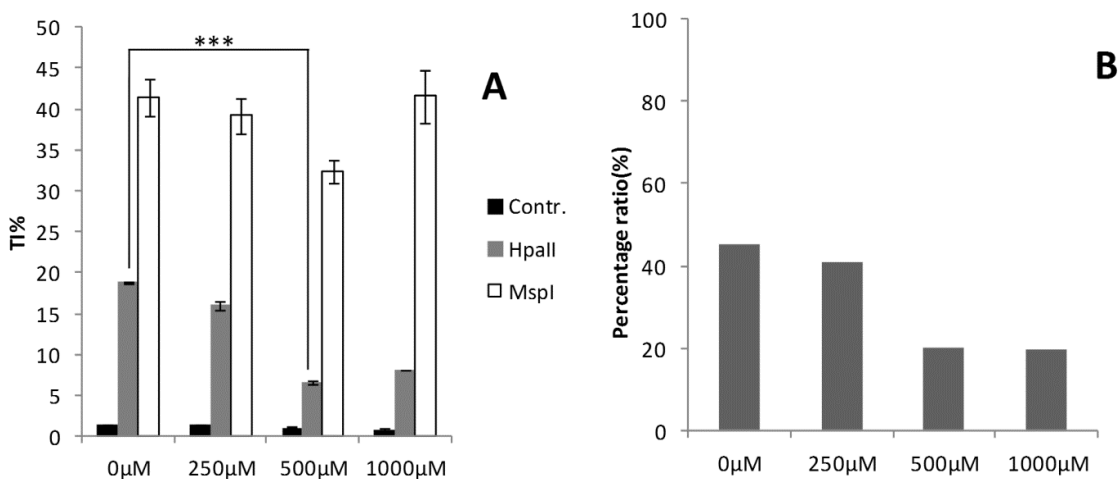


Figura 35 - Comet M su nucleoidi di cellule A549 trattate per 24h con dosi crescenti di decitabina. (A) TI% media di 100 nucleoidi individuali per trattamento (Contr.: nucleoidi non digeriti; HpaII: nucleoidi digeriti con HpaII per 10'; MspI: nucleoidi digeriti con MspI per 10'); (B) Rapporto percentuale combinato delle TI% medie ottenute attraverso digestione enzimatica (TI%[HpaII]/TI%[MspI]*100). * p<0.05, ** p<0.01. [126]

Risultati opposti sono stati ottenuti dal trattamento con nichel cloruro dove la digestione con HpaII ha generato una TI% che decresce con l'aumentare della concentrazione di NiCl₂, a partire dalla concentrazione di 500µM (figura 35 A e B).

Questi risultati evidenziano la capacità del protocollo di rilevare sia gli eventi di ipometilazione che quelli di ipermetilazione.

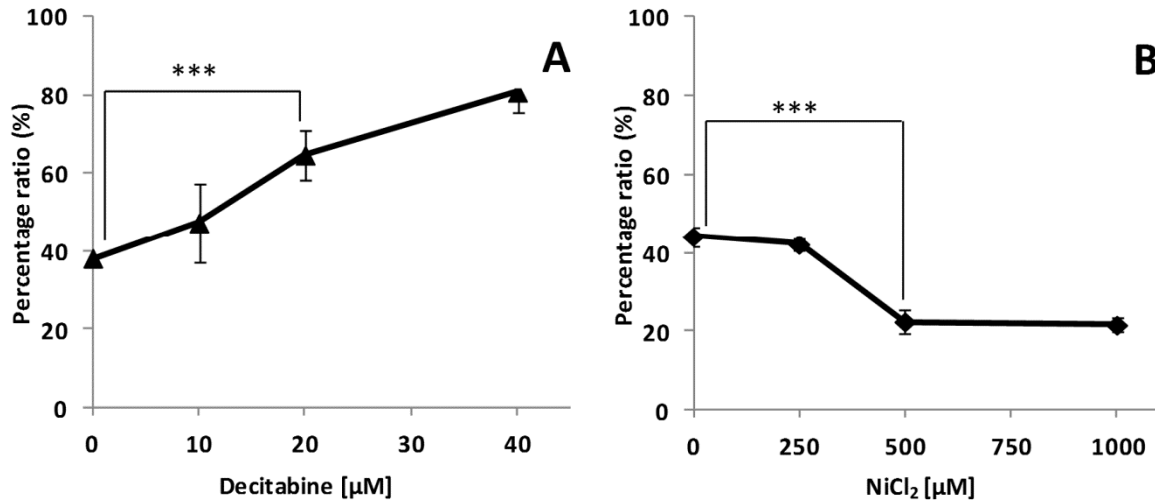


Figura 36 – Variabilità inter-sperimentale del comet M su cellule A549 (n.4 esperimenti indipendenti per ogni composto). Rapporto percentuale ottenuto tramite digestione enzimatica con HpaII ed MspI a seguito di trattamento con decitabina (A) e NiCl₂ (B). ***p<0.001.[126]

Per validare ulteriormente la ripetibilità del protocollo si è saggiata la variabilità inter-sperimentale di almeno 4 esperimenti indipendenti per decitabina e NiCl₂. Tutti gli esperimenti con trattamento con decitabina hanno mostrato l'andamento dose-effetto atteso con alta riproducibilità (figura 36 A). Similmente anche il trattamento con NiCl₂ si è dimostrato altamente riproducibile in tutti gli esperimenti eseguiti (figura 36 B).

Attività trascrizionale DNMT

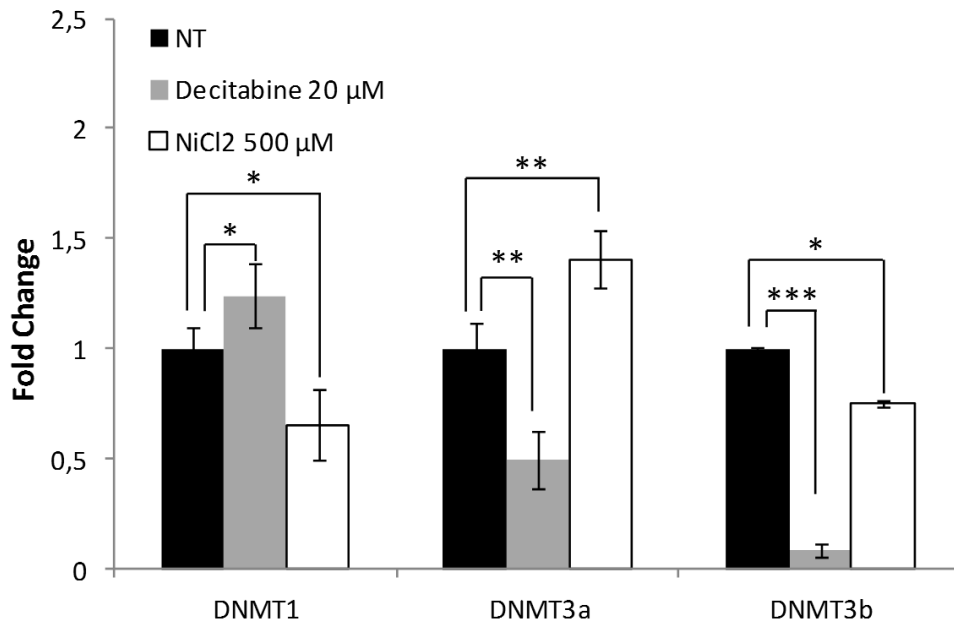


Figura 37 – analisi dei livelli trascrizionali dei geni per le DNA metiltransferasi (DNMT) in cellule A549 trattate con decitabina 20 μM e NiCl₂ 500 μM per 24 h; la quantificazione degli mRNA codificanti le DNMT è stata portata a termine mediante Real Time PCR. *p<0.05; **p<0.01; ***p<0.001.[126]

L'analisi real time dell'attività trascrizionale dei geni codificanti per le DNMT è stata condotta su cellule A549 trattate per 24h con decitabina [20 μM] o con NiCl₂ [500 μM]. Le due concentrazioni sono state scelte al fine di generare la risposta più significativa a fronte di minima citotossicità (figura 37).

Il trattamento con decitabina ha mostrato un aumento della trascrizione di DNMT1 ed una severa diminuzione della trascrizione di DNMT3a e DNMT3b. Il trattamento con NiCl₂ ha indotto una risposta apparentemente antitetica, con una diminuzione dell'attività trascrizionale di DNMT1 ed un aumento della trascrizione di DNMT3a. DNMT3b tuttavia, ha mostrato un'inibizione della trascrizione a seguito del trattamento con NiCl₂, sebbene con entità più modesta rispetto al trattamento con decitabina.

Epigenotossicità NP

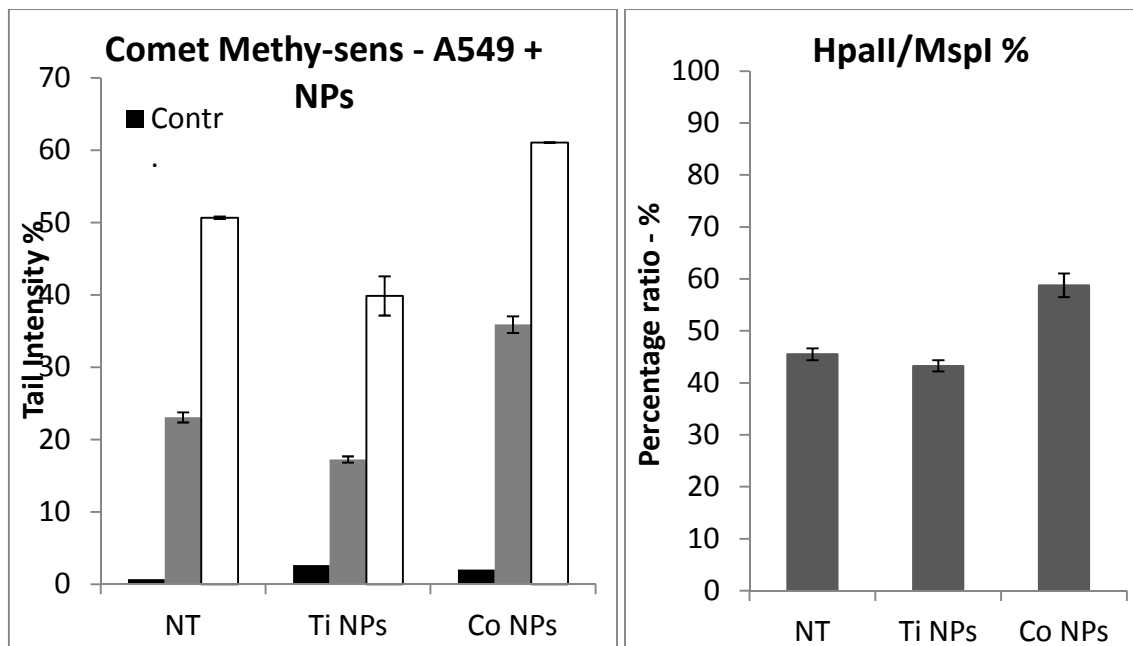


Figura 38 - Comet M su nucleoidi di cellule A549 trattate per 24h con [50 μ g/ml] di NP di TiO₂ e Co₃O₄. (A) TI% media di 100 nucleoidi individuali per trattamento (Contr.: nucleoidi non digeriti; HpaII: nucleoidi digeriti con HpaII per 10'; MspI: nucleoidi digeriti con MspI per 10'); (B) Rapporto percentuale combinato delle TI% medie ottenute attraverso digestione enzimatica (TI% [HpaII] / TI% [MspI] * 100). * p < 0.05, ** p < 0.01.

L'applicazione del metodo comet M al fine di saggiare macrovariazioni di metilazione indotte da NP è stata effettuata su cellule A549 trattate per 24h con NP di TiO₂ o Co₃O₄ alla concentrazione di [50 μ g/ml] per entrambe (figura 38). Il trattamento con Ti NP non ha determinato una variazione significativa del rapporto tra le due digestioni enzimatiche. Il trattamento con Co NP ha determinato un lieve aumento della frammentazione indotta da HpaII ed un conseguente aumentato rapporto HpaII/MspI indice di una lieve demetilazione globale indotta dalle nanoparticelle di cobalto ossido.

Discussione

Le caratteristiche peculiari delle nanoparticelle le hanno rese materiali di forte attrattiva nella produzione industriale. Inizialmente sono state impiegate solo per produzioni altamente specializzate; attualmente, l'abbassamento dei costi di produzione unitamente alla grande ricerca ingegneristica nel campo, le ha portate ad essere utilizzate ampiamente anche in numerosi prodotti *end-user*. Se questo ha necessariamente portato la necessità di considerare il rischio per la salute dell'utente finale, ha anche aumentato esponenzialmente il numero di lavoratori professionalmente esposti a questi composti. Mentre l'utilizzatore del prodotto finito si trova potenzialmente esposto ad una quantità definita di NP, prevalentemente immobilizzate in forme non libere, il lavoratore si trova potenzialmente esposto a tutte le forme, anche libere, di questi nano composti durante il processo produttivo. In aggiunta, la dose consistentemente più alta con cui i lavoratori si possono trovare in contatto pone la pressante necessità di considerare ancora più attentamente il rischio potenziale di esposizione professionale. Da qui la necessità di caratterizzare dettagliatamente i meccanismi di interazione dei nanomateriali di utilizzo industriale, partendo dal livello molecolare, passando per il livello cellulare fino ad arrivare al livello organo sistemico. Nell'analisi del rischio associato a questa classe di composti è necessario prendere in considerazione condizioni di concentrazione e trattamento al fine di caratterizzare esaustivamente possibili effetti di esposizione acuta e/o cronica.

Partendo da queste premesse l'analisi tossicologica in vitro diventa strumento di elezione in quanto passaggio primario nell'analizzare l'effetto di sostanze a tossicità ignota. Un corretto disegno sperimentale consente di individuare biomarcatori di suscettibilità e di esposizione efficaci da traslare all'analisi in vivo, al fine di indirizzarla e coadiuvarla.

Sebbene le evidenze di letteratura sugli effetti epigenotossici di xenobiotici sia tossici che non aumentano esponenzialmente ogni anno, rimane la necessità di trovare nuovi strumenti per valutare tale attività epigenotossica. Basandosi su questa evidenza, il lavoro di questa tesi di dottorato si è focalizzato sull'analisi epigenotossicologica attraverso l'utilizzo di una metodica relativamente nuova, basata su un sistema solido, comprovato ed ampiamente usato come il comet assay.

Il comet assay alcalino è una tecnica di analisi microelettroforetica che utilizza la frammentazione genomica come indice di attività genotossica [137]. È una metodica

semplice, versatile e robusta che ha rappresentato il punto di riferimento per decenni nell'analisi del danno al DNA. La sua intrinseca natura di analisi a singola cellula permette un'analisi accurata dello stress genotossico in una popolazione cellulare. È stato applicato con successo a numerosi tipi cellulari animali e vegetali [146–152]. Nel corso degli anni sono stati sviluppati numerosi protocolli modificati per permettere l'individuazione di specifici tipologie di danno. L'uso di enzimi "danno-specifici" è stato un contributo maggioritario alla forza ed al potenziale del comet assay, rendendolo una scelta ottimale in ambito di biomonitoraggio.

Ottimi esempi sono i protocolli di comet assay modificati con l'aggiunta di trattamento con FPG, ENDO III o OGG1 per la rilevazione del danno ossidativo [153–155] e il protocollo con il trattamento con UDG per la rilevazione degli uracili incorporati scorrettamente [156].

A partire dal 2006 due unità di ricerca separate hanno tentato di sviluppare varianti di comet assay in grado di rilevare i livelli di metilazione globale [125,157]. Entrambi i metodi hanno mostrato risultati promettenti ma non sono mai stati seguiti da studi ulteriori. Entrambi i metodi sono basati sull'utilizzo di due endonucleasi di restrizione: HpaII ed HhaI [157] o HpaII ed MspI [125].

Nell'ambito di questa tesi di dottorato si è inizialmente sviluppato un nuovo protocollo di comet assay, derivato dall'approccio di Wentzel et al. [125], per la valutazione dei cambiamenti globali nel metiloma cellulare (comet M). Si è quindi provveduto alla verifica della sua ripetibilità e la sua potenziale applicabilità in ambito epigenotossicologico. È stata valutata la sensibilità del nuovo protocollo attraverso l'uso di due sostanze ad azione nota sul metiloma: la decitabina (5'-aza-2'-deossicitidina), un agente demetilante noto che blocca le DNMT sulla molecola di DNA [138], e il cloruro di nichel (NiCl_2), un contaminante ambientale noto per indurre condensazione cromatinica con una conseguente ipermetilazione globale a concentrazioni sub-tossiche [106,140]. Questo permette di valutare la capacità del protocollo di rilevare eventi sia di ipermetilazione che di ipometilazione.

A questo approccio si affianca l'analisi dei livelli trascrizionali dei principali attori del mantenimento del metiloma cellulare, le DNA metiltransferasi. Questo perché è noto come cambiamenti nel profilo di metilazione cellulare si riflettano in modo anche profondo sull'attività trascrizionale delle DNMT [102,158].

Per validare ulteriormente le variazioni rilevate dal nostro protocollo e, nel contempo, per creare un sistema di analisi epigenotossicologica sinergico in grado di descrivere a più livelli lo stato di omeostasi epigenetica cellulare abbiamo quindi affiancato alla metodica del comet M l'analisi dei livelli trascrizionali delle DNMT mediante real time PCR [126].

I cambiamenti epigenetici sono stati definiti per primi come il risultato dell'interazione tra geni ed ambiente, che permette all'organismo di adattarsi a nuove condizioni ambientali [159]. La crescita esponenziale del numero di studi sugli effetti epigenetici di contaminanti ambientali ha ampliato l'orizzonte di ricerca sull'eziologia di patologie legate all'ambiente incluso il cancro [72,73,104]. I cambiamenti epigenetici causati da xenobiotici vengono attuati tipicamente a concentrazioni precedentemente considerate sub-tossiche forzando, di conseguenza, l'analisi tossicologica ad adottare una nuova prospettiva sui meccanismi di tossicità. Nonostante siano stati sviluppati numerosi strumenti per lo studio di questi fenomeni, rimane la necessità di metodiche semplici e adattabili per caratterizzare il danno epigenetico potenziale, in particolare a livello di singola cellula. Il comet assay è una tecnica ampiamente usata in biomonitoraggio che ha largamente provato la sua flessibilità accoppiata con la sua semplicità. Tra i numerosi punti di forza della metodica c'è la capacità di effettuare l'analisi su nuclei singoli ed isolati, il che permette la discriminazione di eventuali subpopolazioni con risposte differenziate all'interno del campione in esame.

Il primo protocollo di comet metilazione-sensibile basato sull'approccio a due enzimi di restrizione proposto da Wentzel et al [125], ha mostrato la sua capacità di rilevare differenze nella percentuale di DNA migrato in cellule esposte ad agenti demetilanti. Il protocollo modificato sviluppato durante questo dottorato (comet M) ha mostrato per la prima volta che *l'approccio a due enzimi* è efficace al fine di rilevare sia l'ipo- che l'iper-metilazione. L'applicazione del metodo comet M ha permesso la comprovata individuazione di significative variazioni nella metilazione del DNA di cellule A549 trattate con un agente demetilante, come la decitabina, o un noto agente ipermetilante, come il cloruro di nichel.

La decitabina è un analogo della citosina ampiamente usato nel trattamento di vari tipi di leucemia, è diventata un farmaco di riferimento negli studi riguardanti la metilazione per la sua capacità di indurre una ipometilazione globale consistente. La decitabina viene incorporata nella doppia elica principalmente durante la replicazione del DNA ed esprime il suo ruolo bloccando le DNA metiltransferasi (in particolare DNMT1) sulla molecola del DNA.

Quando la DNMT estrude la decitabina, riconosciuta come citosina, dal filamento per metilarla l'enzima si ritrova bloccato nella conformazione chiusa essendo impedito il trasferimento del gruppo metile dalla SAM alla decitabina a causa della sua conformazione sterica. L'enzima bloccato sul filamento viene successivamente degradato con una conseguente diminuzione dei livelli citoplasmatici di DNMT. La diminuzione dei livelli di DNMT porta ad una demetilazione genomica globale che, in ambito clinico, viene utilizzata nel tentativo di riattivare i geni oncosoppressori delle cellule tumorali [138].

Il cloruro di nichel è una molecola con proprietà tossiche, genotossiche e cancerogene ben caratterizzate [139]. Tuttavia, in anni recenti sono state associati nuovi effetti di natura epigenotossica all'esposizione a nichel. Numerosi studi hanno riportato la sua capacità di indurre eterocromatizzazione unitamente a forte ipermetilazione globale [105,106,140]. Gli ioni di Ni^{2+} inducono ipermetilazione del DNA e deacetilazione istonica dislocando e sostituendo gli ioni Mg^{2+} complessati con lo scheletro zucchero-fosfato del DNA, aumentando di conseguenza la condensazione cromatinica e generando eterocromatina [141]; questa condensazione locale può, in seguito, indurre ipermetilazione locale e globale [142].

Entrambi gli effetti indotti dalle due sostanze sono stati rilevati dal comet M ed è interessante notare come le variazioni nella metilazione siano state osservate a concentrazioni sub-tossiche e sub-genotossiche (figura 33).

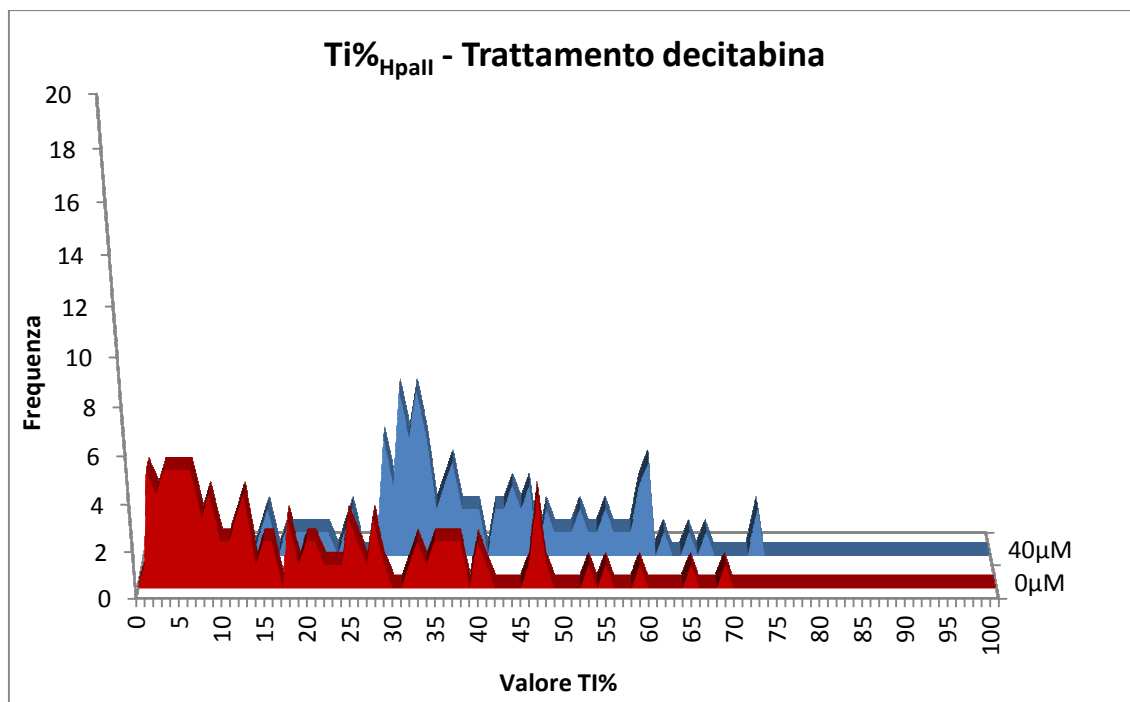


Figura 39 - Istogramma di distribuzione delle frequenze di valori di TI% per 100 nucleoidi, ottenute tramite un esperimento di Comet M su cellule A549 trattate con decitabina 40µM

Comet M ha rilevato una demetilazione dose-dipendente indotta da decitabina nella popolazione di A549 analizzata (figura 34) in accordo con precedenti dati di letteratura [138,160,161]. Se si analizzano ulteriormente le frequenze dei valori di TI% per il trattamento con decitabina 40µM (figura 39) si osserva un visibile spostamento delle frequenze verso valori di TI% più alti. Similmente, comet M su A549 trattate con NiCl₂ ha rilevato con successo l'ipermetilazione indotta da nichel a partire dalla concentrazione di 500µM (figura 35). Analizzando le frequenze dei valori di TI% per il trattamento con NiCl₂ a concentrazione 1000µM (figura 40) si osserva un deciso spostamento delle classi di TI% verso valori più bassi.

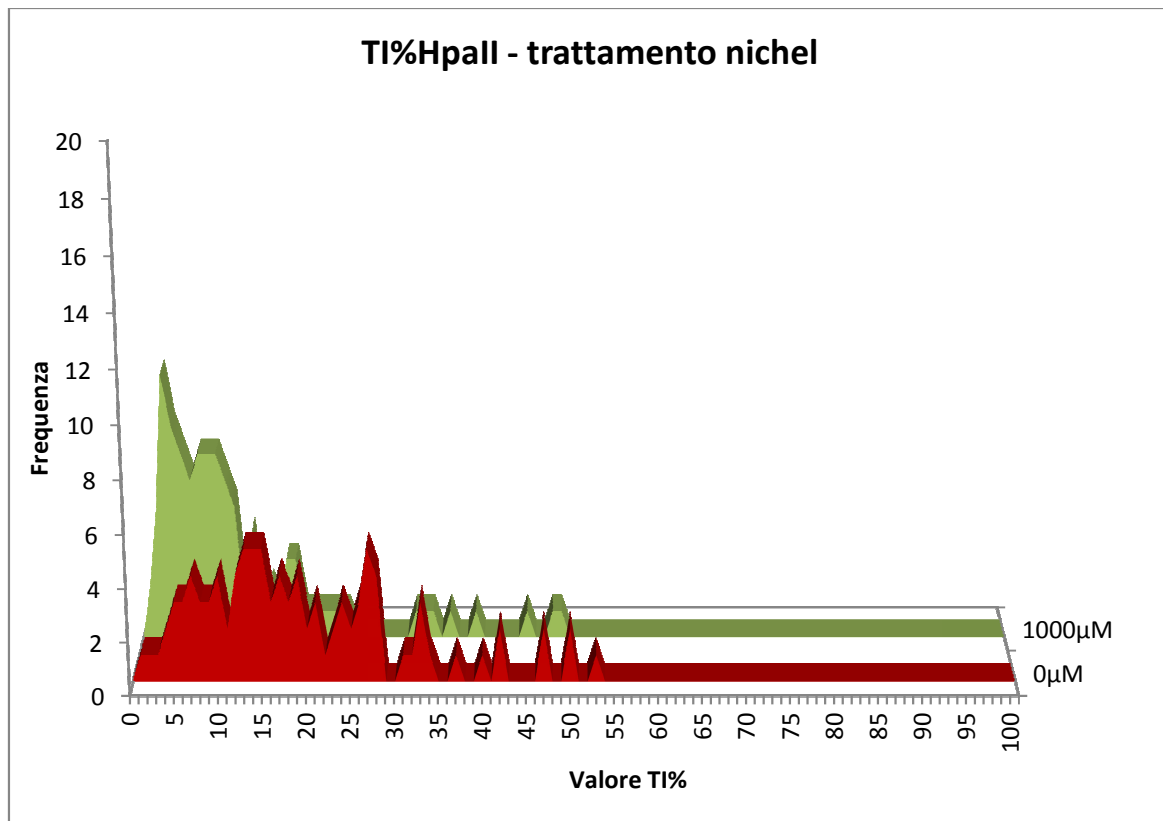


Figura 40 - Istogramma di distribuzione delle frequenze di valori di TI% per 100 nucleotidi, ottenute tramite un esperimento di Comet M su cellule A549 trattate con nichel cloruro 1000µM

La digestione enzimatica “metilazione-sensibile” ha restituito risultati riproducibili. Tra i parametri valutati, il rapporto tra le due TI% (HpaII/Mspl) offre un parametro con il più basso coefficiente di variabilità, assicurando una forte riproducibilità intra-esperimento (figura 32, 36).

I cambiamenti ai profili di metilazione genica indotti da xenobiotici producono una modificazione della trascrizione di proteine deputate al mantenimento del metiloma; questo ne fa nuovi putativi biomarker dell’interazione metiloma-xenobiotici.

Gli enzimi coinvolti nel mantenimento dei profili di metilazione sono le DNA metiltransferasi: una famiglia che comprende 3 membri principali (DNMT1, DNMT3a, DNMT3b). Dnmt1, definita metilasi di mantenimento, metila i filamenti di neosintesi in tratti di DNA emimetilato mentre DNMT3a e DNMT3b, definite metilasi *de novo*, sono in grado di metilare regioni genomiche prive di metilazione preesistente al fine di introdurre nuovi profili di metilazione.

Al fine di identificare se l’ipometilazione e l’ipermetilazione causata da xenobiotici fossero in grado di causare effetti anche sulla trascrizione genica delle metiltransferasi, è stata eseguita

l'analisi dei livelli trascrizionali dei geni codificanti le DNMT mediante real time PCR. Entrambi i trattamenti hanno indotto variazioni nei livelli trascrizionali delle DNMT (figura 37), mostrando un effetto simultaneo sui sistemi di mantenimento del metiloma e sulla struttura del DNA, rilevato mediante comet M.

I dati sono in accordo con studi precedenti che riportano come la decitabina induca un'aumentata trascrizione di DNMT1 come risultato della deplezione di DNMT1 citoplasmatica [162,163]. L'ingente riduzione degli mRNA codificanti per DNMT3a e DNMT3b, rilevati a seguito dell'esposizione a decitabina, non è così facilmente spiegabile. Gli effetti della decitabina sulle de novo metilasi hanno mostrato di essere caratteristici per ogni linea cellulare [164], con comportamenti differenti a seconda della tipologia cellulare utilizzata. Su A549 sono disponibili poche evidenze: Kim et al [165] hanno osservato una diminuzione dell'espressione di DNMT3a dopo 18h di trattamento.

In base alle conoscenze attualmente disponibili non vi sono dati di letteratura su DNMT3b. La proteina DNMT3b è stata segnalata come coinvolta nello sviluppo e sopravvivenza delle cellule tumorali [166]; tuttavia, il suo ruolo non pare essere essenziale alla progressione tumorale [167]. In aggiunta, non sono mai stati riportati eventi di deplezione di proteina DNMT3b citoplasmatica a seguito di esposizione a decitabina o al suo composto parentale, 5-azacitidina. Si può ipotizzare che la regolazione negativa delle DNMT de novo osservata nella nostra sperimentazione possa essere correlata ad un tentativo della cellula di prevenire l'introduzione di nuovi pattern di metilazione erronei, considerando le concentrazioni relativamente alte di decitabina utilizzate. Tuttavia, poiché oltre ai risultati da noi prodotti non esistono in letteratura altri dati relativi alla modulazione dell'attività trascrizionale delle metilasi in seguito ad eventi di ipo- o iper-metilazione, la relazione tra le modifiche epigenetiche del DNA e la trascrizione delle DNMT richiede ulteriore approfondimento.

Come per la decitabina, il trattamento con agente ipermetilante ha implicato un'alterazione della attività trascrizionale delle DNMT (figura 31). Esistono poche informazioni sull'influenza del nichel nei confronti della trascrizione dei geni delle DNMT: Ji et al [101] hanno riportato un'aumentata trascrizione di DNMT1 in cellule umane epiteliali bronchiali immortalizzate (16HBE) trasformate con nichel solfuro. L'analisi effettuata in questo progetto, al contrario, mostra una diminuzione della trascrizione di DNMT1 e DNMT3b con un parallelo aumento della trascrizione di DNMT3a indotta da NiCl₂ sulla linea polmonare tumorale umana (A549). Questo potrebbe suggerire uno scenario in cui l'aumentata eterocromatizzazione causata dal

nickel, richiama DNMT3a attraverso l'induzione di condensazione cromatinica ed il conseguente reclutamento del fattore ausiliario di DNMT3a DNMT3L [88,140]. La diminuzione parallela di DNMT1 e DNMT3b può essere spiegata come una risposta cellulare mirata a limitare l'introduzione di eccessiva metilazione o, più semplicemente, come una risposta cellulare generica conseguente all'induzione di stress. Sono necessari ulteriori approfondimenti al fine di caratterizzare ulteriormente il meccanismo alla base della epigenotossicità del nichel.

In ogni modo, la ipermetilazione rilevata, unitamente all'alterata attività trascrizionale delle DNMT rimane un segnale di un forte stress epigenotossico.

Nell'approcciare la caratterizzazione tossicologica in vitro delle NP occorre prendere in considerazione i principali punti critici che definiscono tali particelle, la loro attività e la loro manipolazione. Questo al fine di replicare il più possibile fedelmente l'interazione biologica che avviene a livello di organismo [168,169].

Nell'esposizione professionale uno dei primi fattori che deve essere preso in considerazione sono le potenziali vie di esposizione e, per quanto concerne l'esposizione a NP, le principali forme di contatto sono le nanoparticelle libere (nano polveri) e le sospensioni colloidali sotto forma di aerosol. Questo presuppone quindi l'inalazione come via principale di esposizione dell'organismo e, secondariamente, l'ingestione e il contatto cutaneo [25]. Per questo nell'ambito di questo progetto di dottorato si è scelto di orientare l'analisi iniziale sul tessuto polmonare utilizzando una linea polmonare tumorale ben conosciuta e caratterizzata: A549. L'interazione con gli alveoli polmonari non rappresenta solo un fattore di rischio per il polmone, in quanto è stato dimostrato come le NP inalate siano in grado di diffondere fino al microcircolo polmonare e da lì nel torrente circolatorio [22,23,28,48]. L'analisi dell'interazione con nanoparticelle ha quindi preso in considerazione il distretto circolatorio con l'utilizzo di linee cellulari endoteliali sia venose (HUVEC) che arteriose (HAEC), unitamente al tessuto cardiaco (cardiomiociti di ratto da espianto). Infine, si è scelto di considerare, anche se inizialmente per le NP di CdS, il tessuto epatico come potenziale tessuto a rischio, in quanto da studi precedenti su questo tipo di materiale, il fegato è stato riconosciuto come il principale organo di accumulo di NP [22,28,61].

Nell'analisi tossicologica, gli effetti di xenobiotici sul materiale genetico rivestono un ruolo importante al fine di definire il rischio genotossico/cancerogeno associato. Gli effetti genotossici, infatti, possono manifestarsi nel lungo periodo e sono difficili da caratterizzare esclusivamente in base ai loro outcome clinici. L'analisi genotossicologica in vitro riveste quindi un ruolo fondamentale nel definire biomarker di rischio spendibili in studi di biomonitoraggio.

Ad un'analisi generale tutte e tre le NP saggiate sono state in grado di produrre un aumento della frammentazione genomica nelle linee cellulari prese in esame. Tuttavia l'ammontare di questa genotossicità indotta e le tempistiche di insorgenza hanno dimostrato di essere particella- e cellulo-specifiche.

Le NP di titanio hanno mostrato la capacità di essere rapidamente internalizzate nella linea A549 (figura 18) con conseguente induzione di una lieve genotossicità in tempi precoci di trattamento (figura 21) in presenza di livelli di ROS paragonabili al controllo (figura 20). Il ritorno a livelli di frammentazione paragonabili al controllo, in assenza di citotossicità rilevabile, già da 4h di trattamento presuppone un possibile recupero del danno da parte della linea cellulare.

La rapidità della risposta genotossica viene confermata anche dalle cellule HUVEC, le quali mostrano un aumento della frammentazione genomica a partire da 1h di trattamento (figura 22). Tuttavia, in questa linea cellulare, la genotossicità cresce in maniera tempo-dipendente fino a 24h di trattamento per poi ritornare a livelli paragonabili al controllo nell'arco delle 48h di trattamento, determinando quindi una maggiore sensibilità della linea HUVEC nei confronti delle Ti NP.

La linea epiteliale di aorta HAEC (figura 23) invece mostra un'insorgenza di genotossicità che insorge a tempi di trattamento più lunghi, con un aumento di frammentazione rilevabile solo a 24h di trattamento e che normalizza nell'arco delle 48h.

L'interazione con i cardiomiociti da espianto ha invece determinato un aumento della genotossicità a partire da 1h di trattamento, aumento che si è mantenuto tale anche a 4h di trattamento (figura 24-A). All'aumento di genotossicità si è affiancato anche un aumento significativo dei ROS dopo 1h di trattamento (figura 24-B) La relativa breve emivita dei cardiomiociti post espianto non permette di discriminare se questo effetto in vitro sia dovuto ad un'interazione diretta delle NP in ambiente citoplasmatico o ad una interazione fisico meccanica della nano polvere con le cellule che ha innalzato i livelli di stress

preesistenti. Tuttavia i dati ottenuti sono stati incrociati in una recente pubblicazione [135] con dati in vivo che riportano lo stesso innalzamento di ROS anche in NP di titanio somministrato per instillazione intratracheale, unitamente a generazione di eventi aritmici sia in vivo che su singoli cardiomiociti in vitro.

Questi risultati lasciano quindi ipotizzare un'interazione diretta del titanio in ambiente cellulare che, sebbene non generi eventi di elevata entità, pone un serio rischio potenziale per l'esposizione a TiO₂ NP, particolarmente per il comparto cardiaco ed endoteliale venoso. L'esposizione a NP di cobalto ha mostrato, similmente al titanio, una rapida internalizzazione delle particelle all'interno delle cellule (figura), evidenza supportata da dati di letteratura [48].

Le cellule tumorali polmonari A549 esposte a Co NP mostrano un comportamento simile a quello riscontrabile per l'esposizione a Ti NP (figura 25), con un lieve aumento di genotossicità dopo 1h di trattamento ed un ritorno a livelli di frammentazione simili al controllo nell'arco delle 4h di trattamento. Tuttavia a seguito dell'esposizione a Co NP si rileva una lieve induzione di ROS sia dopo 30 minuti sia dopo 60 minuti post-esposizione.

Questo comportamento avanza l'ipotesi che il modello tumorale polmonare, a fronte della sua alta velocità di proliferazione e dei suoi meccanismi di regolazione sensibilmente differenti dal tessuto normale, possa presentare una risposta di stress aspecifica indipendente dalla natura delle particelle. Com'è noto le cellule tumorali hanno una buona tolleranza ai ROS, di cui si servono anche al fine di promuovere la progressione la segnalazione e la sopravvivenza tumorale [170]; questo spiegherebbe efficacemente l'insorgenza ed il relativo rapido recupero osservato nella linea A549 in assenza di citotossicità. L'apparente similarità della risposta potrebbe dipendere dalla rapidità del metabolismo della linea tumorale che potrebbe, pertanto, mascherare due meccanismi di risposta diversi. Al fine di escludere queste ipotesi sarà necessario, in futuro estendere l'analisi anche a linee cellulari polmonari rappresentative del tessuto sano.

L'esposizione della linea HUVEC alle Co NP ha determinato un aumento della genotossicità a partire dalle 4h di trattamento che ritorna normale a 24h (figura 26). Questo comportamento, unitamente alla induzione di ROS mostrata dalle Co NP in tutte le linee cellulari saggiate, può essere efficacemente spiegato da causata eventi genotossici indotti dall'aumento di ROS. Tuttavia, visto il ritorno a livelli di integrità genomica paragonabili al

controllo nelle 24h, l'interazione con Co NP sembrerebbe portare l'induzione di un danno recuperabile per questa tipologia cellulare.

La linea endoteliale aortica in seguito all'esposizione a Co NP ha mostrato un'induzione di genotossicità significativa a partire da 1h di trattamento (figura 27). La frammentazione genomica indotta aumenta in maniera tempo-dipendente nell'arco delle 48h senza mai ritornare a livelli del controllo. Analisi ulteriori hanno mostrato come l'esposizione a Co induca una significativa riduzione dei livelli citoplasmatici di ATP. La riduzione del metabolismo potrebbe efficacemente spiegare l'aumento di genotossicità tempo dipendente e, il meccanismo coinvolto in questa riduzione, potrebbe risiedere nella capacità del cobalto di indurre uno stato di pseudo ipossia.

La deplezione di ATP in cellule endoteliali ed epiteliali è ben documentata ed è stato dimostrato come questo induca un serio squilibrio nella funzione barriera del tessuto in questione [171].

È stato dimostrato come il cobalto ionico sia in grado di produrre un'attivazione diretta del fattore di trascrizione HIF-1 α tramite la sostituzione degli atomi di Fe presenti nella struttura dell'enzima, con la conseguente induzione di uno stato di pseudo-ipossia che è alla base del processo infiammatorio nel tessuto polmonare esposto a Co [34,38,47,172].

Tabella 4 - Geni target di HIF-1 α [36]

HIF-1 target genes	
Function	Gene (abbreviation)
Erythropoiesis/ iron metabolism	Erythropoietin (EPO) Transferrin (Tf) Transferrin receptor (Tfr) Ceruloplasmin
Angiogenesis	Vascular endothelial growth factor (VEGF) Endocrine-gland-derived VEGF (EG-VEGF) Leptin (LEP) Transforming growth factor- β 3 (TGF- β 3)
Vascular tone	Nitric oxide synthase (NOS2) Heme oxygenase 1 Endothelin 1 (ET1) Adrenomedullin (ADM) α_{1B} -Adrenergic receptor
Matrix metabolism	Matrix metalloproteinases (MMPs) Plasminogen activator receptors and inhibitors (PAIs) Collagen prolyl hydroxylase
Glucose metabolism	Adenylate kinase-3 Aldolase-A,C (ALDA,C) Carbonic anhydrase-9 Enolase-1 (ENO1) Glucose transporter-1,3 (GLU1,3) Glyceraldehyde phosphate dehydrogenase (GAPDH) Hexokinase 1,2 (HK1,2) Lactate dehydrogenase-A (LDHA) Pyruvate kinase M (PKM) Phosphofructokinase L (PFKL) Phosphoglycerate kinase 1 (PGK1) 6-phosphofructo-2-kinase/gructose-2,6-bisphosphate-3 (PFKFB3)
Cell proliferation/survival	Insulin-like growth factor-2 (IGF2) Transforming growth factor- α (TGF- α) Adrenomedullin (ADM)
Apoptosis	Bcl-2/adenovirus E1B 19kD-interacting protein 3 (BNip3) Nip3-like protein X (NIX)

Sebbene le NP di ossido di cobalto siano considerate poco solubili si è osservato sia nell'ambito di questo progetto, sia da evidenze di letteratura, come le NP di cobalto vengano internalizzate mediante un processo di tipo endocitico clatrina-dipendente [38]. La successiva localizzazione nel comparto lisosomiale espone le NP ad un ambiente acido che, seppur in minima parte, solubilizza le NP liberando ioni Co^{2+} in ambiente citoplasmatico [173] permettendo la putativa attivazione di HIF-1 α .

Si evidenzia come le cellule HUVEC mostrino una risposta più rapida all'esposizione a NP rispetto alle cellule di aorta HAEC. Questa differenza potrebbe essere riconducibile ad una diversa sensibilità nei confronti delle specie reattive dell'ossigeno.

L'analisi della risposta di cellule endoteliali deve necessariamente tenere conto l'eterogeneità del tessuto. Il tessuto vascolare di origine influenza in maniera ingente il fenotipo delle cellule endoteliali compreso il profilo trascrizionale di numerosi geni costitutivi e micro RNA e l'espressione proteica [174–178]. In più, vi sono evidenze di come la linea

HUVEC esprima maggiormente i geni di *scavenging* dei ROS [179] ma, nel contempo, sia particolarmente sensibile allo stress ossidativo [180]. Questo potrebbe spiegare la rapida insorgenza di genotossicità nella linea HUVEC seguita da un recupero a 4h di trattamento. La minor presenza di scavenger dei ROS unita ad un diverso fenotipo endoteliale della linea HAEC potrebbe spiegare come la deplezione dei livelli di ATP porti ad una genotossicità tempo dipendente che non viene recuperata.

L'esposizione a Co NP di cardiomiociti di ratto da espianto primario (figura 28) ha mostrato l'induzione di genotossicità ascrivibile all'aumento significativo dei livelli di ROS. Questo conferma il potenziale genotossico del cobalto che, almeno per i cardiomiociti, è rilevabile già dalla dose più bassa saggiata di 5µg/ml.

Le nanoparticelle di cobalto ossido si confermano quindi come potenziale fonte di ROS e la loro azione linea cellulare-specifica necessita di essere tenuta in debita considerazione nella valutazione della loro tossicità.

L'analisi delle NP di CdS è cominciata dall'analisi degli effetti sul comparto epatico, essendo riportato come il fegato sia l'organo di accumulo principale di questa categoria di NP [53,55,59,181].

L'analisi della citotossicità (figura 29) ha mostrato come questa categoria di NP presenti una tossicità sensibilmente più alta rispetto alle altre NP saggiate con un IC50 di circa 14µg/ml. L'analisi della genotossicità (figura 30), tuttavia ha evidenziato solo una lieve induzione di genotossicità ad 1h di trattamento, non più osservabile dopo 4h di trattamento. L'induzione di genotossicità moderata è stata rilevata a concentrazioni associate a valori di mortalità di circa il 30%. Questo lascia supporre come la tossicità di queste NP non passi attraverso l'induzione di genotossicità. I valori sensibilmente più bassi di IC50 potrebbero essere ascrivibili alla ridotta dimensione di queste NP riconducibili alla classe dei QD (<5nm) che ne favoriscono grandemente l'internalizzazione.

L'applicazione del protocollo comet M sulle NP di titanio biossido e cobalto ossido ha mostrato un'alterazione delle migrazioni ottenute con digestione enzimatica. Tuttavia il rapporto percentuale delle due digestioni evidenzia come solo le NP di Co₃O₄ sembrano indurre una lieve demetilazione nelle cellule A549 (figura 38 B). Il motivo di questa demetilazione potrebbe essere da ricercare nella capacità delle Co NP di indurre generazione di ROS in tutte le tipologie cellulari saggiate [136], confermata anche da dati di letteratura

[38,46]. L'aumento di specie reattive dell'ossigeno intracitoplasmatiche porta al danneggiamento della molecola di DNA, con conseguente riparazione da parte degli enzimi deputati. La riparazione del DNA ricade tra i fattori demetilanti noti, in quanto la sostituzione di basi e frammenti danneggiati introduce sequenze di basi geneticamente identiche ma contenenti citosine non metilate. Questo effetto demetilante della riparazione del DNA è anche uno dei fattori alla base della demetilazione indotta da decitabina [138]. Essendo stato eseguito il protocollo comet M su cellule trattate con Co NP per 24h è verosimile ipotizzare che la riparazione del danno genotossico evidenziato ad 1h di trattamento (figura 25) abbia introdotto una lieve demetilazione globale che non viene accompagnata da un'aumentata frammentazione genomica di natura genotossica.

Un'altra ipotesi per spiegare la lieve demetilazione registrata si basa sulla capacità del cobalto e delle NP di cobalto di indurre uno stato di pseudo-ipossia a livello cellulare, tramite l'attivazione del fattore di trascrizione HIF-1 α . L'induzione di uno stato di pseudo ipossia porta all'acetilazione istonica, con successivo rimodellamento della cromatina, per permettere la trascrizione dei geni sotto il controllo di HIF-1 α (tabella 4) [34,36,182]. L'acetilazione istonica, a sua volta è in grado di indurre demetilazione locale del DNA tramite regolazione trascrizionale negativa delle DNMT [72,73].

Conclusioni e prospettive future

Le modificazioni epigenetiche rappresentano uno dei fronti di indagine più recenti nella ricerca tossicologica. Il prevedere le possibili variazioni dell'epigenoma della cellula può assumere un ruolo molto importante in ambito di prevenzione, monitoraggio ed in ambito terapeutico. Uno degli scopi di questo progetto di dottorato era lo sviluppo di un innovativo approccio analitico combinato per la valutazione rapida della metilazione globale del DNA. L'approccio combinato si basa su due metodiche, il comet M e l'analisi Real Time RT-PCR dei geni per le DNMT, volte a caratterizzare sia l'interazione diretta di composti xenobiotici, sia la loro ricaduta sui sistemi di mantenimento dell'omeostasi del metiloma. La metodica comet M si è dimostrata in grado di rilevare macrovariazioni globali di metilazione con ottima riproducibilità e sensibilità. In parallelo, la misurazione dei livelli trascrizionali delle metiltransferasi ha evidenziato come l'interazione con composti ad azione epigenotossica abbia una ricaduta sui sistemi di mantenimento del metiloma. Lo squilibrio dei livelli trascrizionali potrebbe essere riconducibile sia a una possibile reazione della cellula volta a contrastare gli effetti indotti, sia un'interazione diretta degli xenobiotici con il sistema delle DNMT potenzialmente dannosa. In ogni caso l'attività trascrizionale delle DNMT rappresenta un ottimo biomarker di stress epigenotossico, potenzialmente applicabile a qualsiasi tessuto. Le caratteristiche dei metodi ne hanno permesso l'applicazione nell'analisi dei composti xenobiotici oggetto di questa tesi quali le nanoparticelle di titanio e cobalto, dimostrandone quindi la futura applicabilità anche su altri composti ed in altri ambiti.

L'analisi del rischio tossicologico associato all'esposizione a nanoparticelle ha evidenziato come quest'ultime siano capaci di entrare nell'ambiente citoplasmatico ed interagire con il materiale genetico di tutte le linee cellulari implicate nello studio.

L'analisi della frammentazione genomica mediante comet assay si è dimostrata quindi efficace nel valutare il potenziale genotossico delle NP in esame. L'indagine ha permesso di individuare distretti potenzialmente sensibili all'azione dei nanomateriali come il distretto arterioso e quello cardiaco. L'insorgenza di genotossicità in tutte le linee utilizzate, nonostante la recuperabilità del danno, testimonia la capacità delle NP di interagire col materiale genetico della cellula. Questa interazione, in soggetti professionalmente esposti a potenziale accumulo cronico, potrebbe comportare un danno genetico da accumulo che, nell'eventualità peggiore, è in grado di evolvere in eventi neoplastici. È pertanto auspicabile,

per il futuro, estendere l'analisi anche a popolazioni di lavoratori esposti e, nel contempo, ampliare il numero di linee cellulari in vitro includendo anche linee immortalizzate e linee normali.

L'analisi degli effetti epigenetici a carico del metiloma ha permesso di individuare le NP di Co_3O_4 come potenziale xenobiotico epigenotossico. L'induzione di lieve demetilazione, se prolungata nel tempo, può portare a instabilità genomica ed a successivi eventi patologici. Tali eventi coinvolgono sia l'individuo esposto (tumore) sia una possibile ricaduta sulle progenie (sindromi da perdita dell'imprinting).

Non sono stati individuati effetti epigenotossici legati all'interazione con TiO_2 NP.

In futuro sarà necessario estendere l'applicazione della metodica comet M anche alle linee cellulari HAEC ed HUVEC al fine di rilevare potenziali effetti a carico del metiloma anche su queste linee. Inoltre sarà necessario implementare anche l'analisi dei livelli trascrizionali dei geni codificanti per le DNMT in relazione all'esposizione a NM.

Gli effetti epigenetici sono da considerarsi un biomarcatore di cui è necessario tenere conto al fine di valutare esaustivamente il rischio lavorativo associato all'interazione con nanomateriali e l'analisi mediante comet M, associata all'analisi dei livelli trascrizionali delle DNMT, rappresenta un valido metodo da utilizzare in futuro al fine di impostare biomonitoraggi in ambito lavorativo.

Bibliografia

1. Zhao, Z.; Sun, Y.; Dong, F. Graphitic carbon nitride based nanocomposites: a review. *Nanoscale* **2014**.
2. Miao, J.; Miyauchi, M.; Simmons, T. J.; Dordick, J. S.; Linhardt, R. J. Electrospinning of nanomaterials and applications in electronic components and devices. *J. Nanosci. Nanotechnol.* **2010**, *10*, 5507–19.
3. Monaco, A. M.; Giugliano, M. Carbon-based smart nanomaterials in biomedicine and neuroengineering. *Beilstein J. Nanotechnol.* **2014**, *5*, 1849–63.
4. Makino, A.; Kimura, S. Solid Tumor-Targeting Theranostic Polymer Nanoparticle in Nuclear Medicinal Fields. *Sci. World J.* **2014**, *2014*, 424513.
5. Morganti, P. Use and potential of nanotechnology in cosmetic dermatology. *Clin. Cosmet. Investig. Dermatol.* **2010**, *3*, 5–13.
6. ASTM International *ASTM E2456-06(2012), Standard Terminology Relating to Nanotechnology*; West Conshohocken, PA, 2012.
7. Lewinski, N.; Colvin, V.; Drezek, R. Cytotoxicity of nanoparticles. *Small* **2008**, *4*, 26–49.
8. Yokel, R. a; Macphail, R. C. Engineered nanomaterials: exposures, hazards, and risk prevention. *J. Occup. Med. Toxicol.* **2011**, *6*, 7.
9. MacPhail, R. C.; Grulke, E. A.; Yokel, R. A. Assessing nanoparticle risk poses prodigious challenges. *Wiley Interdiscip. Rev. Nanomed. Nanobiotechnol.* **2013**, *5*, 374–87.
10. Panneerselvam, S.; Choi, S. Nanoinformatics: emerging databases and available tools. *Int. J. Mol. Sci.* **2014**, *15*, 7158–82.
11. Tsuji, J. S.; Maynard, A. D.; Howard, P. C.; James, J. T.; Lam, C.-W.; Warheit, D. B.; Santamaria, A. B. Research strategies for safety evaluation of nanomaterials, part IV: risk assessment of nanoparticles. *Toxicol. Sci.* **2006**, *89*, 42–50.
12. Sayes, C. M.; Wahi, R.; Kurian, P. A.; Liu, Y.; West, J. L.; Ausman, K. D.; Warheit, D. B.; Colvin, V. L. Correlating nanoscale titania structure with toxicity: a cytotoxicity and inflammatory response study with human dermal fibroblasts and human lung epithelial cells. *Toxicol. Sci.* **2006**, *92*, 174–85.
13. Warheit, D. B.; Webb, T. R.; Reed, K. L.; Frerichs, S.; Sayes, C. M. Pulmonary toxicity study in rats with three forms of ultrafine-TiO₂ particles: differential responses related to surface properties. *Toxicology* **2007**, *230*, 90–104.

14. Ni, M.; Leung, M. K. H.; Leung, D. Y. C.; Sumathy, K. A review and recent developments in photocatalytic water-splitting using TiO₂ for hydrogen production. *Renew. Sustain. Energy Rev.* **2007**, *11*, 401–425.
15. Yuan, Y.; Ding, J.; Xu, J.; Deng, J.; Guo, J. TiO₂ nanoparticles co-doped with silver and nitrogen for antibacterial application. *J. Nanosci. Nanotechnol.* **2010**, *10*, 4868–74.
16. Paramasivam, I.; Jha, H.; Liu, N.; Schmuki, P. A review of photocatalysis using self-organized TiO₂ nanotubes and other ordered oxide nanostructures. *Small* **2012**, *8*, 3073–103.
17. Wiesenthal, A.; Hunter, L.; Wang, S.; Wickliffe, J.; Wilkerson, M. Nanoparticles: small and mighty. *Int. J. Dermatol.* **2011**, *50*, 247–54.
18. NIOSH Occupational Exposure to Titanium Dioxide. *Curr. Intell. Bull.* **63** **2011**.
19. Warheit, D. B.; Donner, E. M. Rationale of genotoxicity testing of nanomaterials: regulatory requirements and appropriateness of available OECD test guidelines. *Nanotoxicology* **2010**, *4*, 409–13.
20. Shi, H.; Magaye, R.; Castranova, V.; Zhao, J. Titanium dioxide nanoparticles: a review of current toxicological data. *Part. Fibre Toxicol.* **2013**, *10*, 15.
21. Mühlfeld, C.; Geiser, M.; Kapp, N.; Gehr, P.; Rothen-Rutishauser, B. Re-evaluation of pulmonary titanium dioxide nanoparticle distribution using the “relative deposition index”: Evidence for clearance through microvasculature. *Part. Fibre Toxicol.* **2007**, *4*, 7.
22. Fabian, E.; Landsiedel, R.; Ma-Hock, L.; Wiench, K.; Wohlleben, W.; van Ravenzwaay, B. Tissue distribution and toxicity of intravenously administered titanium dioxide nanoparticles in rats. *Arch. Toxicol.* **2008**, *82*, 151–7.
23. Churg, A.; Stevens, B.; Wright, J. L. Comparison of the uptake of fine and ultrafine TiO₂ in a tracheal explant system. *Am. J. Physiol.* **1998**, *274*, L81–6.
24. Maynard, A. D.; Kuempel, E.D. Airborne Nanostructured Particles and Occupational Health. *J. Nanoparticle Res.* **2005**, *7*, 587–614.
25. Lu, X.; Zhu, T.; Chen, C.; Liu, Y. Right or left: the role of nanoparticles in pulmonary diseases. *Int. J. Mol. Sci.* **2014**, *15*, 17577–600.
26. Zhao, J.; Bowman, L.; Zhang, X.; Vallyathan, V.; Young, S.-H.; Castranova, V.; Ding, M. Titanium dioxide (TiO₂) nanoparticles induce JB6 cell apoptosis through activation of the caspase-8/Bid and mitochondrial pathways. *J. Toxicol. Environ. Health. A* **2009**, *72*, 1141–9.
27. Oberdörster, G. Pulmonary effects of inhaled ultrafine particles. *Int. Arch. Occup. Environ. Health* **2001**, *74*, 1–8.

28. Li, Y.; Li, J.; Yin, J.; Li, W.; Kang, C.; Huang, Q.; Li, Q. Systematic influence induced by 3 nm titanium dioxide following intratracheal instillation of mice. *J. Nanosci. Nanotechnol.* **2010**, *10*, 8544–9.
29. Sang, X.; Zheng, L.; Sun, Q.; Li, N.; Cui, Y.; Hu, R.; Gao, G.; Cheng, Z.; Cheng, J.; Gui, S.; Liu, H.; Zhang, Z.; Hong, F. The chronic spleen injury of mice following long-term exposure to titanium dioxide nanoparticles. *J. Biomed. Mater. Res. A* **2012**, *100*, 894–902.
30. Taylor, A.; Marks, V. Cobalt: a review. *J. Hum. Nutr.* **1978**, *32*, 165–77.
31. Barceloux, D. G. Cobalt. *J. Toxicol. Clin. Toxicol.* **1999**, *37*, 201–6.
32. Sauni, R.; Linna, A.; Oksa, P.; Nordman, H.; Tuppurainen, M.; Uitti, J. Cobalt asthma—a case series from a cobalt plant. *Occup. Med. (Lond)*. **2010**, *60*, 301–6.
33. Akbar, M.; Brewer, J. M.; Grant, M. H. Effect of chromium and cobalt ions on primary human lymphocytes in vitro. *J. Immunotoxicol.* **2011**, *8*, 140–9.
34. Maxwell, P.; Salnikow, K. HIF-1: an oxygen and metal responsive transcription factor. *Cancer Biol. Ther.* **2004**, *3*, 29–35.
35. Petit, A.; Mwale, F.; Tkaczyk, C.; Antoniou, J.; Zukor, D. J.; Huk, O. L. Induction of protein oxidation by cobalt and chromium ions in human U937 macrophages. *Biomaterials* **2005**, *26*, 4416–22.
36. Ke, Q.; Costa, M. Hypoxia-inducible factor-1 (HIF-1). *Mol. Pharmacol.* **2006**, *70*, 1469–80.
37. Wang, K.; Xu, J.-J.; Chen, H.-Y. A novel glucose biosensor based on the nanoscaled cobalt phthalocyanine-glucose oxidase biocomposite. *Biosens. Bioelectron.* **2005**, *20*, 1388–96.
38. Magaye, R.; Zhao, J.; Bowman, L.; Ding, M. Genotoxicity and carcinogenicity of cobalt-, nickel- and copper-based nanoparticles. *Exp. Ther. Med.* **2012**, *4*, 551–561.
39. Liu, X.; Marangon, I.; Melinte, G.; Wilhelm, C.; Ménard-Moyon, C.; Pichon, B. P.; Ersen, O.; Aubertin, K.; Baaziz, W.; Pham-Huu, C.; Bégin-Colin, S.; Bianco, A.; Gazeau, F.; Bégin, D. Design of covalently functionalized carbon nanotubes filled with metal oxide nanoparticles for imaging, therapy, and magnetic manipulation. *ACS Nano* **2014**, *8*, 11290–304.
40. Alcantara, G. B.; Paterno, L. G.; Fonseca, F. J.; Pereira-da-Silva, M. A.; Morais, P. C.; Soler, M. A. G. Dielectric properties of cobalt ferrite nanoparticles in ultrathin nanocomposite films. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2013**, *15*, 19853–61.
41. Bouchard, L.-S.; Anwar, M. S.; Liu, G. L.; Hann, B.; Xie, Z. H.; Gray, J. W.; Wang, X.; Pines, A.; Chen, F. F. Picomolar sensitivity MRI and photoacoustic imaging of cobalt nanoparticles. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2009**, *106*, 4085–9.

42. Seo, W. S.; Lee, J. H.; Sun, X.; Suzuki, Y.; Mann, D.; Liu, Z.; Terashima, M.; Yang, P. C.; McConnell, M. V; Nishimura, D. G.; Dai, H. FeCo/graphitic-shell nanocrystals as advanced magnetic-resonance-imaging and near-infrared agents. *Nat. Mater.* **2006**, *5*, 971–6.
43. Ho, D.; Sun, X.; Sun, S. Monodisperse magnetic nanoparticles for theranostic applications. *Acc. Chem. Res.* **2011**, *44*, 875–82.
44. Bhattacharya, K.; Cramer, H.; Albrecht, C.; Schins, R.; Rahman, Q.; Zimmermann, U.; Dopp, E. Vanadium pentoxide-coated ultrafine titanium dioxide particles induce cellular damage and micronucleus formation in V79 cells. *J. Toxicol. Environ. Health. A* **2008**, *71*, 976–80.
45. Lison, D. Toxicity of cobalt-containing dusts. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **2000**, *168*, 173–4.
46. Lison, D.; De Boeck, M.; Verougstraete, V.; Kirsch-Volders, M. Update on the genotoxicity and carcinogenicity of cobalt compounds. *Occup. Environ. Med.* **2001**, *58*, 619–25.
47. Cobalt in hard metals and cobalt sulfate, gallium arsenide, indium phosphide and vanadium pentoxide. *IARC Monogr. Eval. Carcinog. Risks Hum.* **2006**, *86*, 1–294.
48. Papis, E.; Rossi, F.; Raspanti, M.; Dalle-Donne, I.; Colombo, G.; Milzani, A.; Bernardini, G.; Gornati, R. Engineered cobalt oxide nanoparticles readily enter cells. *Toxicol. Lett.* **2009**, *189*, 253–9.
49. Hansen, T.; Clermont, G.; Alves, A.; Eloy, R.; Brochhausen, C.; Boutrand, J. P.; Gatti, A. M.; Kirkpatrick, C. J. Biological tolerance of different materials in bulk and nanoparticulate form in a rat model: sarcoma development by nanoparticles. *J. R. Soc. Interface* **2006**, *3*, 767–75.
50. Monteiller, C.; Tran, L.; MacNee, W.; Faux, S.; Jones, A.; Miller, B.; Donaldson, K. The pro-inflammatory effects of low-toxicity low-solubility particles, nanoparticles and fine particles, on epithelial cells in vitro: the role of surface area. *Occup. Environ. Med.* **2007**, *64*, 609–15.
51. Guildford, A. L.; Poletti, T.; Osbourne, L. H.; Di Cerbo, A.; Gatti, A. M.; Santin, M. Nanoparticles of a different source induce different patterns of activation in key biochemical and cellular components of the host response. *J. R. Soc. Interface* **2009**, *6*, 1213–21.
52. Thévenod, F. Cadmium and cellular signaling cascades: to be or not to be? *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **2009**, *238*, 221–39.
53. Satarug, S.; Moore, M. R. Adverse health effects of chronic exposure to low-level cadmium in foodstuffs and cigarette smoke. *Environ. Health Perspect.* **2004**, *112*, 1099–103.
54. Järup, L.; Akesson, A. Current status of cadmium as an environmental health problem. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **2009**, *238*, 201–8.
55. IARC Beryllium, cadmium, mercury, and exposures in the glass manufacturing industry. Working Group views and expert opinions, Lyon, 9-16 February 1993. *IARC Monogr. Eval. Carcinog. Risks Hum.* **1993**, *58*, 1–415.

56. IARC Arsenic, metals, fibres, and dusts. *IARC Monogr. Eval. Carcinog. Risks Hum.* **2012**, *100*, 11–465.
57. Choong, G.; Liu, Y.; Templeton, D. M. Interplay of calcium and cadmium in mediating cadmium toxicity. *Chem. Biol. Interact.* **2014**, *211*, 54–65.
58. Agency for Toxic Substances and Disease Registry (ATSDR) *Toxicological Profile for Cadmium*; U.S. Department of Health and Human Services, C. for D. C., Ed.; Atlanta, GA, 2005.
59. Nordberg, G. F. Historical perspectives on cadmium toxicology. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **2009**, *238*, 192–200.
60. Shaikh, Z. A.; Smith, J. C. Metabolism of orally ingested cadmium in humans. *Dev. Toxicol. Environ. Sci.* **1980**, *8*, 569–74.
61. Wang, B.; Du, Y. Cadmium and its neurotoxic effects. *Oxid. Med. Cell. Longev.* **2013**, *2013*, 898034.
62. Michalet, X.; Pinaud, F. F.; Bentolila, L. A.; Tsay, J. M.; Doose, S.; Li, J. J.; Sundaresan, G.; Wu, A. M.; Gambhir, S. S.; Weiss, S. Quantum dots for live cells, in vivo imaging, and diagnostics. *Science* **2005**, *307*, 538–44.
63. Qian, X.; Peng, X.-H.; Ansari, D. O.; Yin-Goen, Q.; Chen, G. Z.; Shin, D. M.; Yang, L.; Young, A. N.; Wang, M. D.; Nie, S. In vivo tumor targeting and spectroscopic detection with surface-enhanced Raman nanoparticle tags. *Nat. Biotechnol.* **2008**, *26*, 83–90.
64. Bruchez, M.; Moronne, M.; Gin, P.; Weiss, S.; Alivisatos, A. P. Semiconductor nanocrystals as fluorescent biological labels. *Science* **1998**, *281*, 2013–6.
65. Hardman, R. A Toxicologic Review of Quantum Dots: Toxicity Depends on Physicochemical and Environmental Factors. *Environ. Health Perspect.* **2006**, *114*, 165–172.
66. Fleischer, C. C.; Payne, C. K. Nanoparticle-cell interactions: molecular structure of the protein corona and cellular outcomes. *Acc. Chem. Res.* **2014**, *47*, 2651–9.
67. Li, K. G.; Chen, J. T.; Bai, S. S.; Wen, X.; Song, S. Y.; Yu, Q.; Li, J.; Wang, Y. Q. Intracellular oxidative stress and cadmium ions release induce cytotoxicity of unmodified cadmium sulfide quantum dots. *Toxicol. In Vitro* **2009**, *23*, 1007–13.
68. Li, H.; Li, M.; Shih, W. Y.; Lelkes, P. I.; Shih, W.-H. Cytotoxicity tests of water soluble ZnS and CdS quantum dots. *J. Nanosci. Nanotechnol.* **2011**, *11*, 3543–51.
69. Brayner, R.; Dahoumane, S. A.; Nguyen, J. N.-L.; Yéprémian, C.; Djediat, C.; Couté, A.; Fiévet, F. Ecotoxicological studies of CdS nanoparticles on photosynthetic microorganisms. *J. Nanosci. Nanotechnol.* **2011**, *11*, 1852–8.

70. Ma-Hock, L.; Brill, S.; Wohlleben, W.; Farias, P. M. A.; Chaves, C. R.; Tenório, D. P. L. A.; Fontes, A.; Santos, B. S.; Landsiedel, R.; Strauss, V.; Treumann, S.; Ravenzwaay, B. van Short term inhalation toxicity of a liquid aerosol of CdS/Cd(OH)₂ core shell quantum dots in male Wistar rats. *Toxicol. Lett.* **2012**, *208*, 115–24.
71. Marmiroli, M.; Pagano, L.; Savo Sardaro, M. L.; Villani, M.; Marmiroli, N. Genome-wide approach in *Arabidopsis thaliana* to assess the toxicity of cadmium sulfide quantum dots. *Environ. Sci. Technol.* **2014**, *48*, 5902–9.
72. Szyf, M. The dynamic epigenome and its implications in toxicology. *Toxicol. Sci.* **2007**, *100*, 7–23.
73. Smith, Z. D.; Meissner, A. DNA methylation: roles in mammalian development. *Nat. Rev. Genet.* **2013**, *14*, 204–20.
74. Jirtle, R. L.; Skinner, M. K. Environmental epigenomics and disease susceptibility. *Nat. Rev. Genet.* **2007**, *8*, 253–62.
75. Dolinoy, D. C.; Das, R.; Weidman, J. R.; Jirtle, R. L. Metastable epialleles, imprinting, and the fetal origins of adult diseases. *Pediatr. Res.* **2007**, *61*, 30R–37R.
76. Waterland, R. A.; Jirtle, R. L. Transposable elements: targets for early nutritional effects on epigenetic gene regulation. *Mol. Cell. Biol.* **2003**, *23*, 5293–300.
77. Strakovsky, R. S.; Zhang, X.; Zhou, D.; Pan, Y.-X. Gestational high fat diet programs hepatic phosphoenolpyruvate carboxykinase gene expression and histone modification in neonatal offspring rats. *J. Physiol.* **2011**, *589*, 2707–17.
78. Stocco, A.; Karlsson, H. L.; Coppedè, F.; Migliore, L. Epigenetic effects of nano-sized materials. *Toxicology* **2013**, *313*, 3–14.
79. Berger, S. L. The complex language of chromatin regulation during transcription. *Nature* **2007**, *447*, 407–12.
80. Shah, A.; Oldenburg, A.; Collas, P. A hyper-dynamic nature of bivalent promoter states underlies coordinated developmental gene expression modules. *BMC Genomics* **2014**, *15*, 1186.
81. Carrer, A.; Wellen, K. E. Metabolism and epigenetics: a link cancer cells exploit. *Curr. Opin. Biotechnol.* **2014**, *34C*, 23–29.
82. Tusi, B. K.; Deng, C.; Salz, T.; Zeumer, L.; Li, Y.; So, C. W. E.; Morel, L. M.; Qiu, Y.; Huang, S. Setd1a regulates progenitor B-cell-to-precursor B-cell development through histone H3 lysine 4 trimethylation and Ig heavy-chain rearrangement. *FASEB J.* **2014**.
83. Johansen, K. M.; Johansen, J. Regulation of chromatin structure by histone H3S10 phosphorylation. *Chromosome Res.* **2006**, *14*, 393–404.

84. Shi, Y.; Lan, F.; Matson, C.; Mulligan, P.; Whetstine, J. R.; Cole, P. A.; Casero, R. A.; Shi, Y. Histone demethylation mediated by the nuclear amine oxidase homolog LSD1. *Cell* **2004**, *119*, 941–53.
85. Christensen, J.; Agger, K.; Cloos, P. A. C.; Pasini, D.; Rose, S.; Sennels, L.; Rappsilber, J.; Hansen, K. H.; Salcini, A. E.; Helin, K. RBP2 belongs to a family of demethylases, specific for tri- and dimethylated lysine 4 on histone 3. *Cell* **2007**, *128*, 1063–76.
86. Yamane, K.; Toumazou, C.; Tsukada, Y.; Erdjument-Bromage, H.; Tempst, P.; Wong, J.; Zhang, Y. JHDM2A, a JmjC-containing H3K9 demethylase, facilitates transcription activation by androgen receptor. *Cell* **2006**, *125*, 483–95.
87. Shogren-Knaak, M.; Ishii, H.; Sun, J.-M.; Pazin, M. J.; Davie, J. R.; Peterson, C. L. Histone H4-K16 acetylation controls chromatin structure and protein interactions. *Science* **2006**, *311*, 844–7.
88. Deplus, R.; Brenner, C.; Burgers, W. a; Putmans, P.; Kouzarides, T.; de Launoit, Y.; Fuks, F. Dnmt3L is a transcriptional repressor that recruits histone deacetylase. *Nucleic Acids Res.* **2002**, *30*, 3831–8.
89. Moazed, D. Small RNAs in transcriptional gene silencing and genome defence. *Nature* **2009**, *457*, 413–20.
90. Cech, T. R.; Steitz, J. A. The noncoding RNA revolution—trashing old rules to forge new ones. *Cell* **2014**, *157*, 77–94.
91. Hammond, S. M.; Boettcher, S.; Caudy, A. A.; Kobayashi, R.; Hannon, G. J. Argonaute2, a link between genetic and biochemical analyses of RNAi. *Science* **2001**, *293*, 1146–50.
92. Hamilton, A. J.; Baulcombe, D. C. A species of small antisense RNA in posttranscriptional gene silencing in plants. *Science* **1999**, *286*, 950–2.
93. Jones, L.; Hamilton, A. J.; Voinnet, O.; Thomas, C. L.; Maule, A. J.; Baulcombe, D. C. RNA-DNA interactions and DNA methylation in post-transcriptional gene silencing. *Plant Cell* **1999**, *11*, 2291–301.
94. Holoch, D.; Moazed, D. RNA-mediated epigenetic regulation of gene expression. *Nat. Rev. Genet.* **2015**.
95. Bernstein, E.; Caudy, A. A.; Hammond, S. M.; Hannon, G. J. Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference. *Nature* **2001**, *409*, 363–6.
96. Elbashir, S. M.; Lendeckel, W.; Tuschl, T. RNA interference is mediated by 21- and 22-nucleotide RNAs. *Genes Dev.* **2001**, *15*, 188–200.
97. Matzke, M.; Matzke, A. J.; Kooter, J. M. RNA: guiding gene silencing. *Science* **2001**, *293*, 1080–3.

98. Fire, A.; Xu, S.; Montgomery, M. K.; Kostas, S. A.; Driver, S. E.; Mello, C. C. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* **1998**, *391*, 806–11.
99. Gao, Z.; Liu, H.-L.; Daxinger, L.; Pontes, O.; He, X.; Qian, W.; Lin, H.; Xie, M.; Lorkovic, Z. J.; Zhang, S.; Miki, D.; Zhan, X.; Pontier, D.; Lagrange, T.; Jin, H.; Matzke, A. J. M.; Matzke, M.; Pikaard, C. S.; Zhu, J.-K. An RNA polymerase II- and AGO4-associated protein acts in RNA-directed DNA methylation. *Nature* **2010**, *465*, 106–9.
100. Jurkowska, R. Z.; Jurkowski, T. P.; Jeltsch, A. Structure and function of mammalian DNA methyltransferases. *ChemBiochem* **2011**, *12*, 206–22.
101. Ji, W.; Yang, L.; Yuan, J.; Yang, L.; Zhang, M.; Qi, D.; Duan, X.; Xuan, A.; Zhang, W.; Lu, J.; Zhuang, Z.; Zeng, G. MicroRNA-152 targets DNA methyltransferase 1 in NiS-transformed cells via a feedback mechanism. *Carcinogenesis* **2013**, *34*, 446–53.
102. Li, D.; Bi, F.-F.; Cao, J.-M.; Cao, C.; Liu, B.; Yang, Q. Regulation of DNA methyltransferase 1 transcription in BRCA1-mutated breast cancer: a novel crosstalk between E2F1 motif hypermethylation and loss of histone H3 lysine 9 acetylation. *Mol. Cancer* **2014**, *13*, 26.
103. Goodsell, D. S. DNA Methylases. *RCSB Protein Data Bank* **2011**.
104. Hatziapostolou, M.; Iliopoulos, D. Epigenetic aberrations during oncogenesis. *Cell. Mol. Life Sci.* **2011**, *68*, 1681–702.
105. Fragou, D.; Fragou, A.; Kouidou, S.; Njau, S.; Kovatsi, L. Epigenetic mechanisms in metal toxicity. *Toxicol. Mech. Methods* **2011**, *21*, 343–52.
106. Hou, L.; Zhang, X.; Wang, D.; Baccarelli, A. Environmental chemical exposures and human epigenetics. *Int. J. Epidemiol.* **2012**, *41*, 79–105.
107. Wang, J.; Rahman, M. F.; Duhart, H. M.; Newport, G. D.; Patterson, T. A.; Murdock, R. C.; Hussain, S. M.; Schlager, J. J.; Ali, S. F. Expression changes of dopaminergic system-related genes in PC12 cells induced by manganese, silver, or copper nanoparticles. *Neurotoxicology* **2009**, *30*, 926–33.
108. Eom, H.-J.; Choi, J. Oxidative stress of CeO₂ nanoparticles via p38-Nrf-2 signaling pathway in human bronchial epithelial cell, Beas-2B. *Toxicol. Lett.* **2009**, *187*, 77–83.
109. Huang, C.-C.; Aronstam, R. S.; Chen, D.-R.; Huang, Y.-W. Oxidative stress, calcium homeostasis, and altered gene expression in human lung epithelial cells exposed to ZnO nanoparticles. *Toxicol. In Vitro* **2010**, *24*, 45–55.
110. Okuda-Shimazaki, J.; Takaku, S.; Kanehira, K.; Sonezaki, S.; Taniguchi, A. Effects of titanium dioxide nanoparticle aggregate size on gene expression. *Int. J. Mol. Sci.* **2010**, *11*, 2383–92.

111. Papis, E.; Gornati, R.; Prati, M.; Ponti, J.; Sabbioni, E.; Bernardini, G. Gene expression in nanotoxicology research: analysis by differential display in BALB3T3 fibroblasts exposed to cobalt particles and ions. *Toxicol. Lett.* **2007**, *170*, 185–92.
112. Rahman, M. F.; Wang, J.; Patterson, T. A.; Saini, U. T.; Robinson, B. L.; Newport, G. D.; Murdock, R. C.; Schlager, J. J.; Hussain, S. M.; Ali, S. F. Expression of genes related to oxidative stress in the mouse brain after exposure to silver-25 nanoparticles. *Toxicol. Lett.* **2009**, *187*, 15–21.
113. Asharani, P.; Sethu, S.; Lim, H. K.; Balaji, G.; Valiyaveetil, S.; Hande, M. P. Differential regulation of intracellular factors mediating cell cycle, DNA repair and inflammation following exposure to silver nanoparticles in human cells. *Genome Integr.* **2012**, *3*, 2.
114. Foldbjerg, R.; Irving, E. S.; Hayashi, Y.; Sutherland, D. S.; Thorsen, K.; Autrup, H.; Beer, C. Global gene expression profiling of human lung epithelial cells after exposure to nanosilver. *Toxicol. Sci.* **2012**, *130*, 145–57.
115. Xu, L.; Li, X.; Takemura, T.; Hanagata, N.; Wu, G.; Chou, L. L. Genotoxicity and molecular response of silver nanoparticle (NP)-based hydrogel. *J. Nanobiotechnology* **2012**, *10*, 16.
116. Napierska, D.; Rabolli, V.; Thomassen, L. C. J.; Dinsdale, D.; Princen, C.; Gonzalez, L.; Poels, K. L. C.; Kirsch-Volders, M.; Lison, D.; Martens, J. A.; Hoet, P. H. Oxidative stress induced by pure and iron-doped amorphous silica nanoparticles in subtoxic conditions. *Chem. Res. Toxicol.* **2012**, *25*, 828–37.
117. Schaeublin, N. M.; Braydich-Stolle, L. K.; Maurer, E. I.; Park, K.; MacCuspie, R. I.; Afrooz, A. R. M. N.; Vaia, R. A.; Saleh, N. B.; Hussain, S. M. Does shape matter? Bioeffects of gold nanomaterials in a human skin cell model. *Langmuir* **2012**, *28*, 3248–58.
118. Moos, P. J.; Olszewski, K.; Honegger, M.; Cassidy, P.; Leachman, S.; Woessner, D.; Cutler, N. S.; Veranth, J. M. Responses of human cells to ZnO nanoparticles: a gene transcription study. *Metallomics* **2011**, *3*, 1199–211.
119. Fu, J.; Dang, Z.; Deng, Y.; Lu, G. Regulation of c-Myc and Bcl-2 induced apoptosis of human bronchial epithelial cells by zinc oxide nanoparticles. *J. Biomed. Nanotechnol.* **2012**, *8*, 669–75.
120. Gong, C.; Tao, G.; Yang, L.; Liu, J.; Liu, Q.; Zhuang, Z. SiO₂ nanoparticles induce global genomic hypomethylation in HaCaT cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2010**, *397*, 397–400.
121. Gong, C.; Tao, G.; Yang, L.; Liu, J.; Liu, Q.; Li, W.; Zhuang, Z. Methylation of PARP-1 promoter involved in the regulation of nano-SiO₂-induced decrease of PARP-1 mRNA expression. *Toxicol. Lett.* **2012**, *209*, 264–9.
122. Kauppinen, T. M.; Swanson, R. A. The role of poly(ADP-ribose) polymerase-1 in CNS disease. *Neuroscience* **2007**, *145*, 1267–72.

123. Umer, M.; Herceg, Z. Deciphering the epigenetic code: an overview of DNA methylation analysis methods. *Antioxid. Redox Signal.* **2013**, *18*, 1972–86.
124. Laird, P. W. Principles and challenges of genomewide DNA methylation analysis. *Nat. Rev. Genet.* **2010**, *11*, 191–203.
125. Wentzel, J. F.; Gouws, C.; Huysamen, C.; Dyk, E. Van; Koekemoer, G.; Pretorius, P. J. Assessing the DNA methylation status of single cells with the comet assay. *Anal. Biochem.* **2010**, *400*, 190–4.
126. Perotti, A.; Rossi, V.; Mutti, A.; Buschini, A. Methy-sens Comet assay and DNMTs transcriptional analysis as a combined approach in epigenotoxicology. *Biomarkers* **2014**, 1–7.
127. Jelinek, J.; Liang, S.; Lu, Y.; He, R.; Ramagli, L. S.; Shpall, E. J.; Estecio, M. R. H.; Issa, J.-P. J. Conserved DNA methylation patterns in healthy blood cells and extensive changes in leukemia measured by a new quantitative technique. *Epigenetics* **2012**, *7*, 1368–78.
128. Hayatsu, H. Discovery of bisulfite-mediated cytosine conversion to uracil, the key reaction for DNA methylation analysis--a personal account. *Proc. Jpn. Acad. Ser. B. Phys. Biol. Sci.* **2008**, *84*, 321–30.
129. Wang, R. Y.; Gehrke, C. W.; Ehrlich, M. Comparison of bisulfite modification of 5-methyldeoxycytidine and deoxycytidine residues. *Nucleic Acids Res.* **1980**, *8*, 4777–90.
130. Giard, D. J.; Aaronson, S. A.; Todaro, G. J.; Arnstein, P.; Kersey, J. H.; Dosik, H.; Parks, W. P. In vitro cultivation of human tumors: establishment of cell lines derived from a series of solid tumors. *J. Natl. Cancer Inst.* **1973**, *51*, 1417–23.
131. Knowles, B. B.; Howe, C. C.; Aden, D. P. Human hepatocellular carcinoma cell lines secrete the major plasma proteins and hepatitis B surface antigen. *Science* **1980**, *209*, 497–9.
132. Park, H.; Zhang, Y.; Georgescu, S. P.; Johnson, K. L.; Kong, D.; Galper, J. B. Human umbilical vein endothelial cells and human dermal microvascular endothelial cells offer new insights into the relationship between lipid metabolism and angiogenesis. *Stem Cell Rev.* **2006**, *2*, 93–102.
133. Burns, M. P.; DePaola, N. Flow-conditioned HUVECs support clustered leukocyte adhesion by coexpressing ICAM-1 and E-selectin. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* **2005**, *288*, H194–204.
134. Kokura, S.; Wolf, R. E.; Yoshikawa, T.; Granger, D. N.; Aw, T. Y. Molecular mechanisms of neutrophil-endothelial cell adhesion induced by redox imbalance. *Circ. Res.* **1999**, *84*, 516–24.
135. Savi, M.; Rossi, S.; Bocchi, L.; Gennaccaro, L.; Cacciani, F.; Perotti, A.; Amidani, D.; Alinovi, R.; Goldoni, M.; Aliatis, I.; Lottici, P.; Bersani, D.; Campanini, M.; Pinelli, S.; Petyx, M.; Frati, C.; Gervasi, A.; Urbanek, K.; Quaini, F.; Buschini, A.; Stilli, D.; Rivetti, C.; Macchi, E.;

Mutti, A.; Miragoli, M.; Zaniboni, M. Titanium dioxide nanoparticles promote arrhythmias via a direct interaction with rat cardiac tissue. *Part. Fibre Toxicol.* **2014**, *11*, 63.

136. Alinovi, R.; Goldoni, M.; Pinelli, S.; Campanini, M.; Aliatis, I.; Bersani, D.; Lottici, P. P.; Iavicoli, S.; Petyx, M.; Mozzoni, P.; Mutti, A. Oxidative and pro-inflammatory effects of cobalt and titanium oxide nanoparticles on aortic and venous endothelial cells. *Toxicol. In Vitro* **2014**, *29*, 426–437.

137. Singh, N. P.; McCoy, M. T.; Tice, R. R.; Schneider, E. L. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp. Cell Res.* **1988**, *175*, 184–191.

138. Stresemann, C.; Lyko, F. Modes of action of the DNA methyltransferase inhibitors azacytidine and decitabine. *Int. J. Cancer* **2008**, *123*, 8–13.

139. Fletcher, G. G.; Rossetto, F. E.; Turnbull, J. D.; Nieboer, E. Toxicity, uptake, and mutagenicity of particulate and soluble nickel compounds. *Environ. Health Perspect.* **1994**, *102 Suppl*, 69–79.

140. Brocato, J.; Costa, M. Basic mechanics of DNA methylation and the unique landscape of the DNA methylome in metal-induced carcinogenesis. *Crit. Rev. Toxicol.* **2013**, *43*, 493–514.

141. Ellen, T. P.; Kluz, T.; Harder, M. E.; Xiong, J.; Costa, M. Heterochromatinization as a potential mechanism of nickel-induced carcinogenesis. *Biochemistry* **2009**, *48*, 4626–32.

142. Sun, H.; Shamy, M.; Costa, M. Nickel and epigenetic gene silencing. *Genes (Basel)*. **2013**, *4*, 583–95.

143. Szemes, M.; Dallosso, A. R.; Melegh, Z.; Curry, T.; Li, Y.; Rivers, C.; Uney, J.; Mägdefrau, A.-S.; Schwiderski, K.; Park, J. H.; Brown, K. W.; Shandilya, J.; Roberts, S. G. E.; Malik, K. Control of epigenetic states by WT1 via regulation of de novo DNA methyltransferase 3A. *Hum. Mol. Genet.* **2013**, *22*, 74–83.

144. Shin, D. Y.; Sung Kang, H.; Kim, G.-Y.; Kim, W.-J.; Yoo, Y. H.; Choi, Y. H. Decitabine, a DNA methyltransferases inhibitor, induces cell cycle arrest at G2/M phase through p53-independent pathway in human cancer cells. *Biomed. Pharmacother.* **2013**, *67*, 305–11.

145. Fojtova, M.; Piskala, A.; Votruba, I.; Otmar, M.; Bartova, E.; Kovarik, A. Efficacy of DNA hypomethylating capacities of 5-aza-2'-deoxycytidine and its alpha anomer. *Pharmacol. Res.* **2007**, *55*, 16–22.

146. Brendler-Schwaab, S. Y.; Schmezer, P.; Liegibel, U.; Weber, S.; Michalek, K.; Tompa, A.; Pool-Zobel, B. L. Cells of different tissues for in vitro and in vivo studies in toxicology: Compilation of isolation methods. *Toxicol. Vitr.* **1994**, *8*, 1285–1302.

147. Sasaki, Y. F.; Izumiyama, F.; Nishidate, E.; Ohta, T.; Ono, T.; Matsusaka, N.; Tsuda, S. Simple detection of in vivo genotoxicity of pyrimethamine in rodents by the modified alkaline single-cell gel electrophoresis assay. *Mutat. Res.* **1997**, *392*, 251–9.

148. Gichner, T.; Znidar, I.; Wagner, E. D.; Plewa, M. J. *Comet Assay in Toxicology*; Dhawan, A.; Anderson, D., Eds.; Royal Society of Chemistry: Cambridge, 2009; pp. 98–119.
149. Hughes, C. M.; Lewis, S. E.; McKelvey-Martin, V. J.; Thompson, W. A comparison of baseline and induced DNA damage in human spermatozoa from fertile and infertile men, using a modified comet assay. *Mol. Hum. Reprod.* **1996**, *2*, 613–9.
150. Rojas, E.; Valverde, M.; Lopez, M. C.; Naufal, I.; Sanchez, I.; Bizarro, P.; Lopez, I.; Fortoul, T. I.; Ostrosky-Wegman, P. Evaluation of DNA damage in exfoliated tear duct epithelial cells from individuals exposed to air pollution assessed by single cell gel electrophoresis assay. *Mutat. Res.* **2000**, *468*, 11–7.
151. Szeto, Y. T.; Benzie, I. F. F.; Collins, A. R.; Choi, S. W.; Cheng, C. Y.; Yow, C. M. N.; Tse, M. M. Y. A buccal cell model comet assay: development and evaluation for human biomonitoring and nutritional studies. *Mutat. Res.* **2005**, *578*, 371–81.
152. Øsnes-Ringen, O.; Azqueta, A. O.; Moe, M. C.; Zetterström, C.; Røger, M.; Nicolaisen, B.; Collins, A. R. DNA damage in lens epithelium of cataract patients in vivo and ex vivo. *Acta Ophthalmol.* **2013**, *91*, 652–6.
153. Collins, A. R.; Duthie, S. J.; Dobson, V. L. Direct enzymic detection of endogenous oxidative base damage in human lymphocyte DNA. *Carcinog.* **1993**, *14*, 1733–1735.
154. Li, Q.; Laval, J.; Ludlum, D. B. Fpg protein releases a ring-opened N-7 guanine adduct from DNA that has been modified by sulfur mustard. *Carcinogenesis* **1997**, *18*, 1035–8.
155. Smith, C. C.; O'Donovan, M. R.; Martin, E. a hOGG1 recognizes oxidative damage using the comet assay with greater specificity than FPG or ENDOIII. *Mutagenesis* **2006**, *21*, 185–90.
156. Duthie, S. J.; McMillan, P. Uracil misincorporation in human DNA detected using single cell gel electrophoresis. *Carcinogenesis* **1997**, *18*, 1709–14.
157. Wasson, G. R.; McGlynn, A. P.; McNulty, H.; O'Reilly, S. L.; McKelvey-Martin, V. J.; McKerr, G.; Strain, J. J.; Scott, J.; Downes, C. S. Global DNA and p53 region-specific hypomethylation in human colonic cells is induced by folate depletion and reversed by folate supplementation. *J. Nutr.* **2006**, *136*, 2748–53.
158. Li, Y.-Y.; Chen, T.; Wan, Y.; Xu, S. Lead exposure in pheochromocytoma cells induces persistent changes in amyloid precursor protein gene methylation patterns. *Environ. Toxicol.* **2012**, *27*, 495–502.
159. Waddington, C. H. *Organisers and Genes*; Cambridge University Press, Ed.; Cambridge, 1940.
160. Kehrmann, J.; Tatura, R.; Zeschnigk, M.; Probst-Kepper, M.; Geffers, R.; Steinmann, J.; Buer, J. Impact of 5-aza-2'-deoxycytidine and epigallocatechin-3-gallate for induction of human regulatory T cells. *Immunology* **2014**, *142*, 384–95.

161. Orta, M. L.; Mateos, S.; Cortés, F. DNA demethylation protects from cleavable complex stabilization and DNA strand breakage induced by the topoisomerase type I inhibitor camptothecin. *Mutagenesis* **2009**, *24*, 237–44.
162. Alcazar, O.; Achberger, S.; Aldrich, W.; Hu, Z.; Negrotto, S.; Sauntharajah, Y.; Triozzi, P. Epigenetic regulation by decitabine of melanoma differentiation in vitro and in vivo. *Int. J. Cancer* **2012**, *131*, 18–29.
163. Ghoshal, K.; Datta, J.; Majumder, S.; Bai, S.; Kutay, H.; Motiwala, T.; Jacob, S. T. 5-Aza-deoxycytidine induces selective degradation of DNA methyltransferase 1 by a proteasomal pathway that requires the KEN box, bromo-adjacent homology domain, and nuclear localization signal. *Mol. Cell. Biol.* **2005**, *25*, 4727–41.
164. Kastl, L.; Brown, I.; Schofield, A. C. Altered DNA methylation is associated with docetaxel resistance in human breast cancer cells. *Int. J. Oncol.* **2010**, *36*, 1235–41.
165. Kim, H. J.; Kim, J. H.; Chie, E. K.; Young, P. Da; Kim, I. A.; Kim, I. H. DNMT (DNA methyltransferase) inhibitors radiosensitize human cancer cells by suppressing DNA repair activity. *Radiat. Oncol.* **2012**, *7*, 39.
166. Beaulieu, N.; Morin, S.; Chute, I. C.; Robert, M.-F.; Nguyen, H.; MacLeod, a R. An essential role for DNA methyltransferase DNMT3B in cancer cell survival. *J. Biol. Chem.* **2002**, *277*, 28176–81.
167. Hagemann, S.; Kuck, D.; Stresemann, C.; Prinz, F.; Brueckner, B.; Mund, C.; Mumberg, D.; Sommer, A. Antiproliferative effects of DNA methyltransferase 3B depletion are not associated with DNA demethylation. *PLoS One* **2012**, *7*, e36125.
168. Anadón, A.; Martínez, M. A.; Castellano, V.; Martínez-Larrañaga, M. R. The role of in vitro methods as alternatives to animals in toxicity testing. *Expert Opin. Drug Metab. Toxicol.* **2014**, *10*, 67–79.
169. Barile, F. *Principles of Toxicology Testing, Second Edition*; CRC Press, 2013.
170. Sabharwal, S. S.; Schumacker, P. T. Mitochondrial ROS in cancer: initiators, amplifiers or an Achilles' heel? *Nat. Rev. Cancer* **2014**, *14*, 709–21.
171. Unno, N.; Menconi, M. J.; Salzman, A. L.; Smith, M.; Hagen, S.; Ge, Y.; Ezzell, R. M.; Fink, M. P. Hyperpermeability and ATP depletion induced by chronic hypoxia or glycolytic inhibition in Caco-2BBE monolayers. *Am. J. Physiol.* **1996**, *270*, G1010–21.
172. Simonsen, L. O.; Harbak, H.; Bennekou, P. Cobalt metabolism and toxicology--a brief update. *Sci. Total Environ.* **2012**, *432*, 210–5.
173. Ortega, R.; Bresson, C.; Darolles, C.; Gautier, C.; Roudeau, S.; Perrin, L.; Janin, M.; Floriani, M.; Aloin, V.; Carmona, A.; Malard, V. Low-solubility particles and a Trojan-horse type mechanism of toxicity: the case of cobalt oxide on human lung cells. *Part. Fibre Toxicol.* **2014**, *11*, 14.

174. Aird, W. C. Phenotypic heterogeneity of the endothelium: II. Representative vascular beds. *Circ. Res.* **2007**, *100*, 174–90.
175. Chi, J.-T.; Chang, H. Y.; Haraldsen, G.; Jahnsen, F. L.; Troyanskaya, O. G.; Chang, D. S.; Wang, Z.; Rockson, S. G.; van de Rijn, M.; Botstein, D.; Brown, P. O. Endothelial cell diversity revealed by global expression profiling. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2003**, *100*, 10623–8.
176. McCall, M. N.; Kent, O. A.; Yu, J.; Fox-Talbot, K.; Zaiman, A. L.; Halushka, M. K. MicroRNA profiling of diverse endothelial cell types. *BMC Med. Genomics* **2011**, *4*, 78.
177. Nguyen, V. P. K. H.; Hanna, G.; Rodrigues, N.; Pizzuto, K.; Yang, E.; Van Slyke, P.; Kim, H.; Chen, S. H.; Dumont, D. J. Differential proteomic analysis of lymphatic, venous, and arterial endothelial cells extracted from bovine mesenteric vessels. *Proteomics* **2010**, *10*, 1658–72.
178. Wang, W.; Deng, M.; Liu, X.; Ai, W.; Tang, Q.; Hu, J. TLR4 activation induces nontolerant inflammatory response in endothelial cells. *Inflammation* **2011**, *34*, 509–18.
179. Deng, D. X.-F.; Tsalenko, A.; Vailaya, A.; Ben-Dor, A.; Kundu, R.; Estay, I.; Tabibiazar, R.; Kincaid, R.; Yakhini, Z.; Bruhn, L.; Quertermous, T. Differences in vascular bed disease susceptibility reflect differences in gene expression response to atherogenic stimuli. *Circ. Res.* **2006**, *98*, 200–8.
180. Cai, H. Hydrogen peroxide regulation of endothelial function: origins, mechanisms, and consequences. *Cardiovasc. Res.* **2005**, *68*, 26–36.
181. Fowler, B. A. Monitoring of human populations for early markers of cadmium toxicity: a review. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **2009**, *238*, 294–300.
182. Alvarez, K.; de Andrés, M. C.; Takahashi, A.; Oreffo, R. O. Effects of hypoxia on anabolic and catabolic gene expression and DNA methylation in OA chondrocytes. *BMC Musculoskelet. Disord.* **2014**, *15*, 431.