

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI NAPOLI FEDERICO II



Dottorato di Ricerca in Analisi dei Sistemi Ambientali
(XXIV Ciclo)

Polo delle Scienze e delle Tecnologie
C.I.R.AM. - Centro Interdipartimentale di Ricerca "Ambiente"

**Valutazione degli effetti da esposizione a
nanoparticelle sulla plasticità fisiologica, nervosa
e comportamentale in *Octopus vulgaris***

Dottoranda
Anna Maria Grimaldi

Tutor:
Prof. Filippo Barattolo

Co-Tutor:
Dr. Graziano Fiorito
Prof. Suzana Herculano-Houzel

A.A. 2010/2011

Abstract

Il rapido sviluppo delle nanotecnologie ed il crescente utilizzo di nanomateriali nei prodotti commerciali ha suscitato negli ultimi decenni preoccupazioni da parte dell'opinione pubblica e della comunità scientifica relativamente ai possibili rischi per la salute e dell'impatto ambientale.

Essendo i sistemi acquatici il collettore finale della maggior parte degli inquinanti, è probabile che le nanoparticelle introdotte nell'ambiente giungano nei sistemi acquatici minacciando il benessere biotico.

Il presente studio prende in esame le risposte biologiche e gli effetti tossici, nonché la disponibilità all'assorbimento da parte del biota invertebrato al biossido di titanio in forma nanoparticolata ($n\text{TiO}_2$).

Il lavoro esplora l'ipotesi di tossicità nel mollusco cefalopode *Octopus vulgaris* a concentrazioni sub-letali di $n\text{TiO}_2$ per via diretta, attraverso iniezione, ed indiretta - attraverso *Mytilus galloprovincialis* esposti alla colonna d'acqua in cui è presente nanoparticolato.

La prima sezione dello studio è dedicata a valutare la risposta di immunità cellulare emolinfatica; la seconda gli effetti sul sistema nervoso, in termini di risposta comportamentale, del numero di cellule nervose e di espressione genica.

Un incremento del numero degli emociti è stato registrato già dopo 4 ore la somministrazione di nanoparticolato. Inoltre, $n\text{TiO}_2$ stimola un aumento dell'attività lisozimatica e della produzione di ossido nitrico nell'emolinfa, inducendo stress ossidativo ad una concentrazione $\geq 1,0$ mg / Kg.

I risultati mostrano una forte tendenza di $n\text{TiO}_2$ ad aggregarsi quando disperso in acqua di mare. L'esposizione a nanoparticolato attraverso la dieta interferisce con le normali performance predatorie e con i processi alla base del comportamento esplorativo. Si sono

inoltre riscontrate significative evidenze iperplastiche ed ipertrofiche del cervello ed alterazioni di espressione genica.

Nel complesso, i dati ottenuti dimostrano che il TiO_2 in concentrazioni sub-letali può indurre evidenti alterazioni biologiche sia in forma nanoparticolata, quando somministrato per iniezione, che in forma particolata, quando presente nella catena alimentare.

Ringraziamenti

Sono quasi alla fine e non mi sembra ancora vero!

Grazie Dr. Graziano Fiorito, in questi anni lei mi ha seguito, supportato, guidato, offrendomi l'opportunità di lavorare in un contesto stimolante ed insolito. Con la sua entusiastica supervisione, le sue idee ottimiste e in continua evoluzione, ha saputo destabilizzarmi e incoraggiarmi perché mettessi a frutto le mie motivazioni.

Grazie Prof. Filippo Barattolo, che confidando nelle mie capacità e nella mia onestà scientifica ha reso possibile che arrivassi fino a qui.

Grazie anche a te Paquale De Luca, che mi hai guidato e consentito di affacciarmi al fantastico mondo della biologia molecolare.

E un grazie speciale anche a te Suzana Herculano-Houzel, che con pazienza, ed incontenibile entusiasmo sei stata per me un'ottima "orientadora" a cui ispirarmi.

E poi infinitamente Grazie alla mia mamma e al mio papà, in questi anni avete saputo seguirmi con la discrezione che vi contraddistingue, essermi vicini senza pormi limiti, nonostante le vostre comprensibili preoccupazioni nel vedermi inseguire sogni forse oggi troppo impopolari e precari.

Grazie a te Carolina, che con i tuoi abbracci ai miei rientri a casa hai saputo coccolarmi e riempire di gioia la mia vita un po' nomade, accompagnata da quella valigia rosa con cui ti piace tanto giocare. Spero che io possa essere sempre un buon esempio di zia per te.

E grazie grazie grazie a tutti voi Amici e Amiche, sareste in troppi da nominare singolarmente, ma sono sicura che ognuno di voi saprà riconoscersi

Grazie Amici di sempre, che restate un punto fisso della mia vita

e Grazie a voi Amici incontrati strada facendo, che mi avete accompagnato in questi anni condividendo preoccupazioni, ansie, e soprattutto tante gioie e risate.

Anna Maria

Indice

Abstract; 2

Ringraziamenti; 4

1. Introduzione; 7

- 1.1 Nanoparticelle e Nanotecnologie; 7
- 1.2 Tossicità di nano-TiO₂; 15
- 1.3 Obiettivi; 16

2. nTiO₂ e Risposta immunitaria in *O. vulgaris*

- 2.1 Introduzione; 18
- 2.2 Materiali e Metodi; 18
 - 2.2.1 *Animali*; 18
 - 2.2.2 *Dispersione di nanoparticolato nTiO₂*; 18
 - 2.2.3 *Procedura sperimentale*; 19
 - 2.2.4 *Conteggio totale degli emociti*; 20
 - 2.2.5 *Dosaggio dell'attività lisozimatica*; 21
 - 2.2.6 *Dosaggio dell'ossido nitrico*; 21
 - 2.2.7 *Analisi statistica*; 22
- 2.3 Risultati ; 22
 - 2.3.1 *Conteggio totale degli emociti*; 22
 - 2.3.2 *Saggio dell'attività lisozimatica*; 23
 - 2.3.3 *Saggio dell'ossido nitrico*; 24
- 2.4 Discussione; 24

3. nTiO₂ e plasticità comportamentale

- 3.1 Introduzione; 27
- 3.2 Materiali e Metodi; 27
 - 3.2.1 *Animali*; 27
 - 3.2.2 *Somministrazione*; 27
 - 3.2.3 *Procedure comportamentali*; 28
 - 3.2.3.1 *Latenza d'attacco*; 28
 - 3.2.3.2 *Test di abituação*; 28
 - 3.2.3.3 *Test di evitamento*; 29
 - 3.2.4 *Analisi statistica dei dati*; 29
- 3.3 Risultati; 30
- 3.4 Discussione; 33

4. nTiO₂ e numero di cellule del sistema nervoso

- 4.1 Introduzione; 35
- 4.2 Materiali e Metodi; 35
 - 4.2.1 *Animali e somministrazione*; 35
 - 4.2.2 *Frazionamento isotropico*; 35
 - 4.2.3 *Analisi statistica*; 36
- 4.3 Risultati; 36
- 4.4 Discussione; 39

5. nTiO₂ ed espressione genica

5.1 Introduzione; 41

5.2 Materiali e Metodi; 41

5.2.1 Animali e somministrazione; 41

5.2.2 Estrazione dell' mRNA; 41

5.2.3 sintesi di cDNA; 42

5.2.4 Primer; 42

5.2.5 Real-time qPCR; 43

5.2.6 Analisi statistica; 44

5.3 Risultati; 46

5.4 Discussione; 52

6. Discussione; 52

Appendice; 60

1. Introduzione

1.1 Nanoparticelle e Nanotecnologie

Nel corso dell'ultimo decennio, l'esplosivo interesse nel campo delle nanotecnologie ha avviato numerose industrie alla commercializzazione dei nanomateriali con un ritmo tale da introdurre sul mercato un numero pari a 3-4 nuovi prodotti a settimana rispetto alle altre tecnologie d'avanguardia. Statistiche recenti rivelano più di mille nanoprodotti in commercio, con 605 prodotti in salute e fitness, 152 in prodotti per la casa, 98 in alimenti e bevande, 57 in articoli sportivi e 19 in prodotti per bambino/bambina. (Fig. 1.1, 1.2)

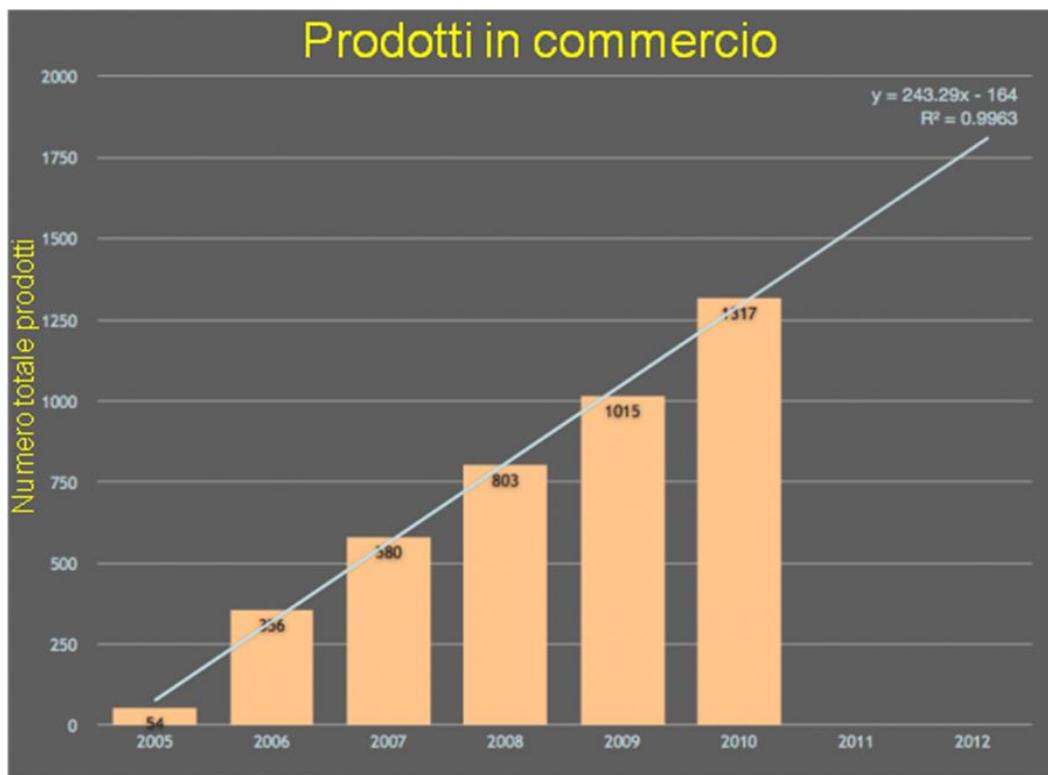


Fig. 1.1 Aumento della commercializzazione di prodotti che includono l'utilizzo di nanoparticelle dal 2005 al 2011 (modificato da www.nanotechproject.org).

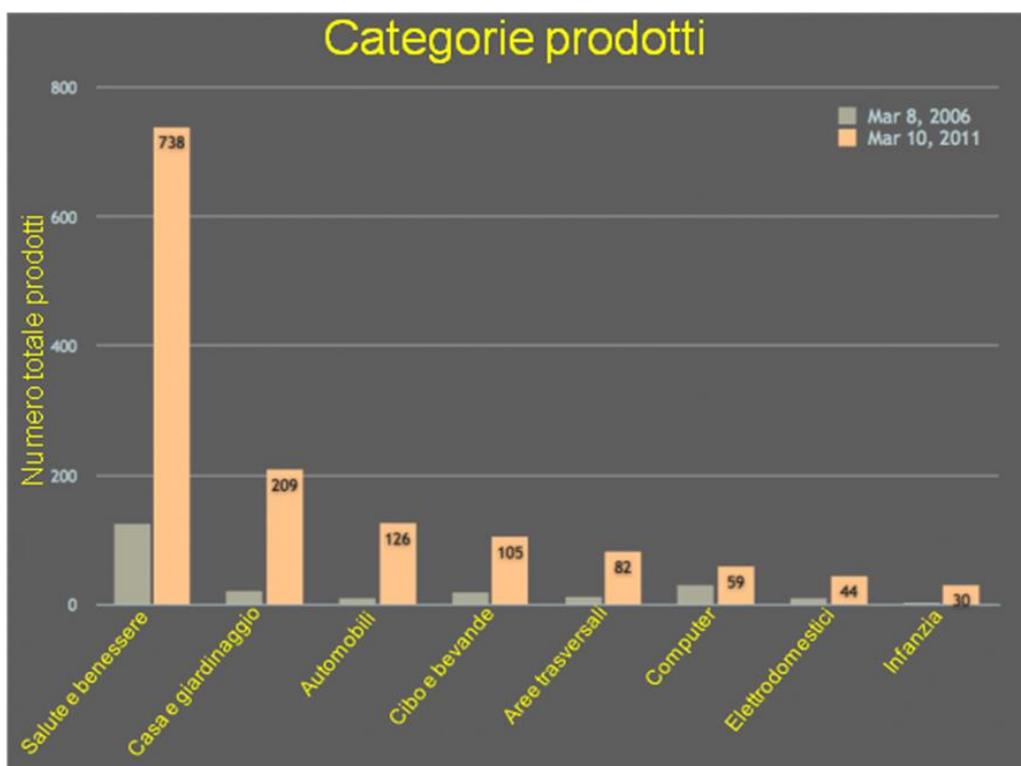


Fig. 1.2 Prodotti in commercio organizzati secondo categorie d'uso e relativo incremento degli ultimi 4 anni (modificato da www.nanotechproject.org).

Si stima che entro il 2020 la produzione di nanoparticelle per uso commerciale passerà dalle 2300 tonnellate attuali, a 58.000 tonnellate (Xia *et al.*, 2009). Nanomateriali ingegnerizzati sono utilizzati in tessuti, attrezzature sportive, applicazioni medicali e cosmetici (Bawarski *et al.*, 2008; Sgobba e Guldi, 2009; Staggers *et al.*, 2008).

I nanomateriali sono la diretta “derivazione” delle nanotecnologie.

Col termine nanotecnologie si definiscono tutte le tecnologie e le scienze, operanti su scala nanometrica.

Le origini delle nanotecnologie risalgono al Quarto secolo d.C. quando ai tempi dell'Impero Romano è da ascrivere la famosa coppa di Licurgo. La coppa presenta una colorazione cangiante dal verde opaco al rosso. Il colore verde della coppa si trasforma in rosso intenso quando la luce anziché essere riflessa attraversa il vetro stesso. Ciò è reso possibile dalla presenza di piccole quantità di particelle di oro e di argento colloidale

nella pasta del vetro che conferiscono un aspetto dicroico allo stesso, le prime di colore rosso rubino a luce trasmessa e le seconde di verde opaco in luce riflessa (Freestone *et al.*, 2007).

In epoca moderna la nascita delle nanotecnologie è fissata al 1959 quando il celebre fisico Americano Richard Feynman nel discorso tenuto al Californian Institute of Technology nell'ambito del convegno annuale dell'American Physical Society ed intitolato "There's Plenty of room at the bottom" propone la possibilità di manipolare gli atomi per costruire oggetti infinitamente piccoli. Anni dopo, nel 1975, a coniare il termine nanotecnologie fu Eric Drexler, definendola:

"una tecnologia a livello molecolare che ci potrà permettere di porre ogni atomo dove vogliamo che esso stia. Chiamiamo questa capacità nanotecnologia, perché funziona su scala del nanometro, 1 milionesimo di metro".

Prende inizio così l'epoca d'oro della nanotecnologia del progettare, sintetizzare e caratterizzare nanoparticelle attraverso un approccio "bottom up" con l'idea di costruire oggetti proiettati dal basso verso l'alto su scala molecolare.

In seguito, negli anni '80, è l'invenzione dei fullereni (1985) e dei nanotubi di carbonio a promuovere un balzo in avanti delle tecnologie tese a manipolare materiali a livello atomico per creare nano-oggetti.

L'elevata reattività chimica e biologica che contraddistingue le nanoparticelle rispetto alle specie chimiche parentali dipende principalmente dalla dimensione - perché in questo range di taglia gli effetti quantici iniziano ad essere predominanti - e dall'elevato rapporto superficie-volume. A ciò si aggiungono fattori quali forma, purezza, cristallinità,

funzionalizzazione della superficie, solubilità e stabilità (Stern & McNeil, 2008; Nel *et al.*, 2006). È noto che le particelle ultrafini siano più reattive delle particelle fini, ciò dipende non solo dalla maggiore efficienza di penetrazione per le loro piccole dimensioni; l'aumento del rapporto area di superficie-volume, fa sì che un gran numero di atomi siano esposti alla superficie, che sta alla base delle loro elevate proprietà catalizzatrici e di reattività.

Le potenzialità offerte dall'utilizzo delle nanoparticelle sono impressionanti ed attraenti. Tuttavia, l'ampio uso quotidiano delle nanoparticelle necessita di essere accompagnato da misure cautelari che garantiscano la sicurezza da esposizione a tali sostanze. In quest'ottica nasce la nanotossicologia, che studia la tossicità dei nanomateriali nei sistemi biologici in funzione delle loro proprietà chimico-fisiche.

L'uso di nanomateriali offre un ampio potenziale per l'evoluzione e il miglioramento di numerosi campi tecnologici. Nanomateriali sono infatti oggi già ampiamente utilizzati in applicazioni che spaziano dai medicinali ai cosmetici, dai pneumatici all'ottica, dall'abbigliamento all'elettronica.

Nonostante la notevole velocità di sviluppo delle nanoscienze, è riconosciuta una carenza di informazioni sui potenziali effetti dei nanomateriali per l'ambiente e la salute umana.

Negli ultimi decenni la ricerca scientifica ha fornito nuovi tasselli alla comprensione delle proprietà biologiche delle nanoparticelle. Grande attenzione è stata dedicata ai fullereni (C60), a nanotubi di carbonio, e agli ossidi di metallo come il TiO₂, ZnO, Fe₂O₃, Fe₃O₄, CuO, CeO₂, SiO₂ e Al₂O₃, e a nanoparticelle metalliche quali Au, Ag, Co, e Ni.

Un importantissimo fattore trainante dello sviluppo delle nanotecnologie è la comprensione dei processi biologici su livello di nanoscala (Whitesides, 2003). Gli organismi viventi sono costituiti di cellule, mediamente del diametro di 10 micron; tuttavia, i vari componenti cellulari hanno le dimensioni dei sub-micron e dei nanometri.

Questo confronto fornisce un' idea delle potenzialità di utilizzo delle nanoparticelle come piccolissimi strumenti all' interno del macchinario cellulare (Taton, 2002): nanoparticelle sono utilizzate come sonde per peptidi, anticorpi, acidi nucleici e per detectare prodotti di reazioni cellulari. La possibilità di monitorare interazioni ultrastrutturali ne fa degli strumenti ideali per numerosi applicazioni biologiche e diagnostiche.

Una lista di alcune delle recenti applicazioni dei nanomateriali in campo medico e biologico è riportato in Tabella 1.

Tabella 1.1 Campi biologici e medici di applicazione delle nanotecnologie (Salata, 2004; Gwinn & Vallyathan, 2006)

<ul style="list-style-type: none">- Sonde biologiche fluorescenti- Separazione e purificazione di molecole biologiche- Contrasto per MRI- Riconoscimento di proteine- Somministrazione di farmaci- Rilevamento di patogeni- Ingegneria dei tessuti- Terapia anticancro- Terapia genica- Studi di fagocinetica
--

Dal canto opposto, evidenze sperimentali mostrano che particelle di taglia nanometrica possono attraversare le membrane cellulari ed essere internalizzate da una varietà di cellule di mammifero (Lynch *et al.*, 2006; Rothen-Rutishauser *et al.*, 2006; Smart *et al.*, 2006), anche in condizioni non controllate e finalizzate a specifiche applicazione terapeutiche e diagnostiche. Infiammazione e fibrosi sono tra effetti osservati a livello

organico in seguito all'internalizzazione di nanoparticolato, mentre stress ossidativo stress, attività antiossidante e la citotossicità quelli osservati a livello cellulare (Oberdorster *et al.*, 2005).

La maggior parte degli studi tossicologici è stata effettuata *in vitro* su cellule di mammifero in cui l' esposizione a nanoparticelle è avvenuta attraverso il terreno di coltura cellulare. Al livello cellulare, i procarioti possono essere protetti dall' assorbimento di molti tipi di nanoparticelle in quanto non dispongono dei meccanismi per il trasporto di particelle colloidali a livello della parete cellulare (Moore, 2006), diversa è la situazione per gli eucarioti, in quanto possiedono processi di internalizzazione cellulare su scala nanometrica e micrometrica quali l'endocitosi e la fagocitosi (Moore, 2006).

L' assorbimento di nanotubi di carbonio (CNT) è stato osservato in un protozoo unicellulare, con successiva localizzazione degli stessi a livello mitocondriale (Zhu *et al.* 2006). Nanoparticelle di lattice sono state ritrovate in uova di pesce *Oryzias latipes* e in pesci adulti a livello delle branchie e dell' intestino, come nel cervello, nei testicoli, nel fegato e nel sangue (Kashiwada, 2006). Un altro studio ha riportato che particelle di C60 sono assorbite da *E. coli* gram-negativi 10 volte in più rispetto a *Bacillus subtilis* Gram-positivi (Lyon *et al.*, 2005).

Studi ecotossicologici mostrano tossicità da nanoparticolato in organismi acquatici, sia unicellulari che animali. Nanoparticelle di CNT hanno indotto inibizione della crescita dose-dipendente in un protozoo (Zhu *et al.* 2006) e causare tossicità respiratoria in trota iridea (Smith *et al.*, 2007). Le stesse nanoparticelle quando purificate non hanno mostrato alcun effetto su copepodi, mentre non purificate hanno causato un aumento della mortalità (Templeton *et al.*, 2006).

Tra le nanoparticelle di ossido di metallo, quelle maggiormente studiate in chiave tossicologica sono le nanoparticelle di biossido di titanio (TiO₂; Cattaneo *et al.*, 2009;

Kahru e Dubourguier, 2010), ed il motivo di ciò sta nel loro ampio utilizzo a fini industriali.

Il TiO_2 è un minerale naturale che può esistere in tre forme cristalline, rutilo, anatasio e brookite, e in una forma amorfa (Reyes-Coronado *et al.*, 2008). La produzione commerciale di nano- TiO_2 è stimata essere di 10000 tonnellate l'anno tra il 2011 e il 2014 e circa 2,5 milioni tonnellate entro il 2025 (Robichaud *et al.*, 2009).

L'anatasio mostra la più alta attività fotocatalitica e per questo viene utilizzato in applicazioni di catalisi e fotocatalisi. Il rutilo è conosciuto come pigmento bianco usato in vernici, carte, inchiostri, dentifrici. Nei cosmetici, la fase rutilo è usata come pigmento e addensante ed è utilizzato in molteplici altre applicazioni per le sue proprietà assorbimenti dei raggi ultravioletti (UV) (Mueller e Nowack, 2008). Infine, l'anatasio e il brookite sono utilizzati come elettrodi per celle solari (Jiang *et al.*, 2002).

Il diffuso uso di nanoparticolato di TiO_2 comporta una conseguente esposizione dell'ambientale a tali sostanze (Hall *et al.*, 2009). Attualmente, esistono ancora pochi dati riguardo le concentrazioni di nanoparticelle di TiO_2 nell'ambiente (Griffitt *et al.*, 2009). Evidenze sperimentali dimostrano che nanoparticelle di TiO_2 possano per esempio percolare nelle acque superficiali da vernici utilizzate per tinteggiare facciate esterne (Kaegi *et al.*, 2008). Secondo Boxall e collaboratori (2007) le concentrazioni di TiO_2 nanometriche derivanti dall'uso di prodotti commerciali sono pari a 24,5 $\mu\text{g/L}$ per l'acqua e 1030 $\mu\text{g/kg}$ per il suolo.

Il TiO_2 in forma nano è fotoinducibile, ossidante e quindi un potenziale generatore di specie reattive dell'ossigeno (ROS). È dimostrato che nanoparticelle di TiO_2 promuovano la produzione di ROS in presenza (Armelaio *et al.*, 2007) ed in assenza (Reeves *et al.*, 2008) di luce UV. Inoltre, creme solari a base di TiO_2 determinano danni ossidativi al DNA in colture di fibroblasti umani (Dunford *et al.*, 1995). Più recentemente è stato

dimostrato che nanoparticelle di TiO₂ sono causa di infiammazione, citotossicità, e instabilità genomica in mammiferi (Levine *et al.*, 2003; Li *et al.*, 2007; Wang *et al.*, 2009; Wang *et al.*, 2007; Warheit *et al.*, 2007), piante (Ghosh *et al.*, 2010; Lin e Xing, 2007, 2008) e microrganismi (Cherchi *et al.*, 2011; Ghosh *et al.*, 2010; Jiang *et al.*, 2009; Lin e Xing, 2007, 2008).

Gli effetti tossici da nanoparticelle di TiO₂ o da altri metalli sono solo in parte noti (Griffitt *et al.*, 2009); studi recenti hanno però dimostrato che la tossicità delle nanoparticelle è in generale dipendente da proprietà come la dimensione la forma e le proprietà di superficie delle particelle (Crane *et al.*, 2008; Navarro *et al.*, 2008).

1.2 Tossicità di nano-TiO₂

Recenti studi evidenziano la tossicità da nanoparticelle di TiO₂ in organi di vertebrati: polmone, fegato, milza, rene (ratto, Afaq *et al.*, 1998, Wang *et al.*, 2007), e branchie (pesci, Federici *et al.*, 2007). Inoltre, è stato dimostrato che particelle di TiO₂, di differente taglia, e indipendentemente dalla via di somministrazione, possono essere traslocate al sistema nervoso; nTiO₂ (5 nm) si accumulano e promuovono alterazioni morfologiche e stress ossidativo in cellule neuronali (Ma *et al.*, 2010). Long e collaboratori (2007) hanno mostrato *in vitro* che nTiO₂ (25nm) inducono la produzione di specie reattive dell'ossigeno a livello della microglia, interferiscono con la produzione energetica mitocondriale e danneggiano neuroni dopaminergici. Anche particelle di TiO₂ di taglia superiore (80nm) possono essere traslocate al bulbo olfattivo attraverso il nervo olfattivo dopo inalazione o istillazione intranasale in associazione alle quali sono state riscontrate lesioni all'ippocampo (Wang *et al.*, 2007a, b).

Hu e collaboratori (2010), avanzando l'ipotesi che nTiO₂ potessero interferire con le funzioni cognitive, hanno dimostrato come l'esposizione a nanoparticelle di TiO₂ in topo determini un deficit nelle capacità di memoria di riconoscimento spaziale attribuibile ad alterazione dell'omeostasi degli elementi in traccia, di sistemi enzimatici e di neurotrasmettitori.

L'insieme di questi risultati desta preoccupazione indicando un impatto dei nanomateriali sulle funzioni cerebrali per niente trascurabile.

In una recente rassegna, Menard e collaboratori (2011) hanno esaminato criticamente la letteratura attualmente disponibile sulla ecotossicità da nanoparticelle di TiO₂ su una pletera di organismi: alghe, piante acquatiche, invertebrati terrestri e di ambiente acquatico e pesci d'acqua dolce. La distribuzione dei dati è simile anche per altre tipologie di nanoparticelle (Cattaneo *et al.*, 2009; Kahru e Dubourguier, 2010. Nonostante gli

sforzi, è tutt'oggi limitata la conoscenza degli effetti tossici di nanoTiO₂ in specie terrestri e marine (Menard *et al.*, 2011).

Gli ambienti acquatici, ed in particolare i nostri mari, rappresentano il recettore ultimo di prodotti industriali e dei rifiuti: in quest'ottica, i potenziali effetti delle nanoparticelle sul biota acquatico rappresentano una problematica preoccupante e da non sottovalutare (Moore, 2006; Baun *et al.*, 2008).

Recenti studi, che indagano gli effetti da nanoparticelle, sottolineano il loro potenziale tossico per gli organismi acquatici, sia per quelli che vivono nella colonna d'acqua che nel compartimento sedimentario (Apte *et al.*, 2009; Blaise *et al.*, 2008; Federici *et al.*, 2007).

Test di tossicità *in vivo* di nTiO₂ sugli organismi marini sono stati eseguiti, a quello che ho potuto accertare, solo su tre invertebrati, *Mytilus galloprovincialis* (Canesi *et al.*, 2010), *Haliotis diversicolor supertexta* (Zhu *et al.*, 2011) e *Arenicola marina* (Galloway *et al.*, 2010).

Negli organismi acquatici, i percorsi potenziali e preferenziali per l'assunzione di nanoparticelle includono l'ingestione diretta o l'entrata per mezzo di confini epiteliali come branchie, organi olfattivi e parete corporea. Inoltre, i processi per l'internalizzazione cellulare su scala nanometrica (≤ 100 nm) e micrometrica (100-100,000 nm) delle particelle, quali endocitosi e fagocitosi, sono altamente sviluppati (Moore, 2006) e sono parte integrante di funzioni fisiologiche chiave come la digestione intracellulare e l'immunità cellulare.

1.3 Obiettivi

Questa tesi propone il polpo, *Octopus vulgaris*, come modello sperimentale per esplorare, *in vivo*, la relazione tra nanoparticolato presente nell'ambiente acquatico e gli effetti comportamentali e cellulari.

La prima parte del lavoro (capitolo 2) sarà dedicata ad indagare la risposta immunitaria in seguito a breve esposizione da nanoparticelle; la seconda (capitolo 3) invece, alla valutazione dei potenziali effetti sul sistema nervoso attraverso un'indagine a più livelli che comprende l'analisi della risposta comportamentale, degli effetti morfometrici e del numero di cellule nel cervello e in ultimo della risposta molecolare a media e lunga esposizione.

La risposta fisiologica, cellulare, e comportamentale nel polpo sarà esaminata in a due diverse vie di somministrazione: una prima più diretta ma anche più invasiva, quale l'iniezione; e una seconda più naturale ma meno canonica, mediante ingestione.

Si è pensato infatti di somministrare ai polpi $n\text{TiO}_2$ attraverso mitili bivalvi previamente esposti a nanoparticolato, così da mimare un' esposizione naturale ed il trasferimento di tali sostanze in un anello della catena trofica.

Le particelle in ambienti acquatico, e soprattutto in quello marino, in cui la forza unica è tale da indurne l'aggregazione, raramente esistono come entità singole, ma tendono ad aggregarsi sulla sostanza organica (Delay e Frimmel, 2011). Ciò ne migliora l'efficienza di cattura da parte dei bivalvi. Studi recenti, hanno infatti dimostrato che i bivalvi rappresentano un significativo target per diverse forme di nanoparticelle in ambiente acquatico (Ward *et al.*, 2009; Canesi *et al.*, 2010).

2. nTiO₂ e Risposta immunitaria in *O. vulgaris*

2.1 Introduzione

Sfruttando la relativa semplicità del sistema immunitario degli invertebrati ed il potenziale tossicologico del materiale in forma nanoparticolata, in questa prima sezione del presente progetto, ci si è posto l'obiettivo di valutare *in vivo*, nel polpo comune, *Octopus vulgaris*, gli effetti indotti dalla somministrazione di nTiO₂, in termini di risposta immunitaria e di stress ossidativo.

2.2 Materiali e Metodi

2.2.1 Animali

Sono stati utilizzati 36 polpi (peso corporeo: 200-600 g) provenienti dal Golfo di Napoli. Giunti in laboratorio, gli animali sono stati alloggiati in singole vasche di PVC alimentate da acqua di mare mediante un sistema a circuito aperto (temperatura 20 ± 2 ° C, 12 h ciclo luce/buio). Un breve periodo di acclimatizzazione (3 giorni) ha preceduto l'inizio degli esperimenti. Polpi con riconoscibili danni tissutali o con elevati tempi di risposta d'attacco alla quotidiana presentazione di un granchio (*readiness to attack*: parametro utilizzato per testare la risposta predatoria) durante la fase di acclimatizzazione sono stati esclusi dall' esperimento.

2.2.2 Dispersione di nanoparticolato nTiO₂

Biossido di titanio in forma nanoparticolata (P25, purezza dichiarata > 99,5%; Sigma Aldrich) è stato sospeso in una soluzione di fosfato (PB) a due diverse concentrazioni, 1 e 10g/mL. Tali soluzioni sono state preparate immediatamente prima di ogni esperimento

secondo Vamanu e colleghi (2008) mediante sonicazione (30 min a 100 W; 50% di on/off del ciclo di raffreddamento).

2.2.3 Procedura sperimentale

Gli animali sono stati suddivisi in tre gruppi: uno di controllo (CNT, n = 12) e due gruppi soggetti ad esposizione di nano particolato (TR₁, n = 12; TR₂, n = 12). Tutti i polpi sono stati iniettati con 1 mL di soluzione per ogni kg di peso corporeo. Il sito d' iniezione per tutti gli individui è stata la porzione prossimale del secondo braccio destro. Gli animali CNT sono stati iniettati con la sola soluzione di tampone fosfato, quelli trattati invece, con soluzione di nTiO₂ a diversa concentrazione ed in particolare: TR₁: 1 mg/kg di peso corporeo e TR₂: 10 mg/kg di peso corporeo.

In un primo set sperimentale (Fig. 2.1A) per ogni animale sono stati prelevati tre campioni di emolinfa: *i*) subito prima dell'iniezione, *ii*) 4 ore dopo il trattamento e *iii*) 24 ore dopo il trattamento. In un secondo set sperimentale (Fig. 2.1B), per ogni animale sono stati raccolti due campioni di emolinfa: *i*) subito prima dell'iniezione e , *ii*) 4 giorni dopo. Prima di ciascun prelievo gli animali sono stati anestetizzati per immersione in una soluzione in acqua di mare (55 mM MgCl₂, 1% etanolo) per 10 minuti.

I campioni di emolinfa sono stati prelevati da uno dei due cuori branchiali utilizzando una siringa sterile da 2 mL, dotata di un ago G 26°-1/2 (Malham *et al.*, 1995). Ad un'aliquota di emolinfa è stata aggiunta una soluzione di anticoagulante (1:10) per la determinazione del numero di emociti, la restante parte è stata subito centrifugata a 800 rpm per 5 minuti per la separazione della frazione corpuscolata dal siero. Il siero è stato poi conservato a -80 ° C fino al momento dei saggi biochimici.

In tutti gli esperimenti, i prelievi di emolinfa sono stati eseguiti con rapidità al fine di

minimizzare lo stress associato alle ripetute manipolazioni degli animali (Malham *et al.*, 1998).

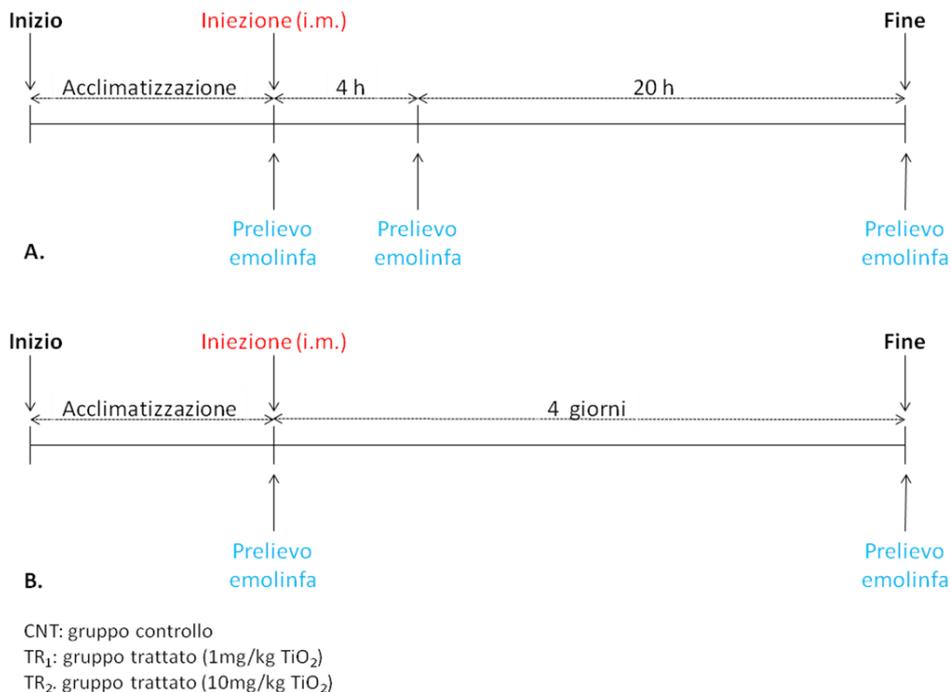


Fig. 2.1. Rappresentazione schematica del piano sperimentale.

2.2.4 Conteggio totale degli emociti

Il numero di emociti per mL di emolinfa è stato quantificato al microscopio ottico (20x) utilizzando una camera di Neubauer. Al fine di prevenire la coagulazione e mantenere l'integrità degli emociti, l'emolinfa prelevata è stato diluita (1:10) con un anticoagulante marino (soluzione sterile a pH 7.0; 450 mM NaCl, 100 mM glucosio, 3.41 mM citrato trisodico; 2.86 mM acido citrico; 0.83 mM glicole etilenico-bis (b-aminoethylether) N, N,% N, N-tetracetico% acido). Le conte cellulari sono state effettuate in duplicato, entro

30 minuti dal prelievo.

2.2.5. Dosaggio dell'attività lisozimatica

L'attività lisozimatica è stata misurata con il metodo turbidimetrico sviluppato da Parry e collaboratori (1965) in combinazione con lettura spettrofotometrica in micropiastre (Hutchinson e Manning, 1996).

In una piastra a 96 pozzetti, 150 μ L di substrato, *Micrococcus lysodeikticus* (0.75 g/L in tampone fosfato/citrato, pH 5.8), sono aggiunti a 50 mL di ciascun campione di emolinfa (dopo centrifuga: 13.000 rpm, 10 min, 4° C), mescolati, e letta l'assorbanza (450 nm) a temperatura ambiente al tempo 0 e dopo 5 minuti.

Un' unità di attività lisozimatica è definita come una riduzione della capacità di assorbimento di 0.001/min (Engstad *et al.*, 1992). Una curva standard è stata ottenuta utilizzando lisozima di pollo (Sigma, 5g/mL). Per ogni campione (processato in duplicato) altrettanti bianchi sono stati preparati sostituendo l'emolinfa con 50 mL di tampone.

2.2.6 Dosaggio dell'ossido nitrico

La concentrazione di ossido d'azoto (NO) è stata determinata spettrofotometricamente misurando l'accumulo dei suoi derivati stabili, nitrati e nitriti.

Tale determinazione è avvenuta mediante la conversione dei nitrati in nitriti catalizzata dal cadmio metallico (metodo non enzimatico) e la loro successiva quantificazione con reagente di Griess (Schmith, 1995).

Aliquote di siero di emolinfa previamente deproteinate (25 mL) ed incubate over night

con Cd (0,5 g) sono state analizzate spettrofotometricamente (540 nm) dopo l'aggiunta del reattivo di Griess (1% (w / v) sulphanilamide e 0,1% (w / v) di N-(1-naphthyl)-etilendiammina dicloridrato). I risultati sono stati espressi in equivalenti di ossido nitrico mM (1 μ M NO = pmol / mL NH₂).

2.2.7 Analisi statistica

Le analisi statistiche sono state condotte con SPSS 17.0 (SPSS Inc., Chicago, USA). I risultati sono espressi come media \pm errore standard (ES). Paired *t*-test sono stati usati per comparare nei vari gruppi sperimentali le risposte ottenute prima e dopo il trattamento con nTiO₂ ($p < 0.05$).

2.3 Risultati

2.3.1 Conteggio totale degli emociti

L'effetto sul numero totale degli emociti in circolazione in *O. vulgaris* a seguito dell'esposizione a nTiO₂ è mostrato in Fig. 2.2 Il numero totale degli emociti è significativamente aumentato dopo 4 ore dall'iniezione in entrambi i gruppi trattati (TR₁, $t = -1.842$, $p = 0.115$; TR₂, $t = -3.242$, $p < 0.018$) e solo nel gruppo esposto a maggiore concentrazione dopo 24 ore (TR₁, $t = -1.842$, $p = 0.115$; TR₂, $t = -3.493$, $p < 0.013$). Non si sono rilevati variazioni significative a 4 giorni.

Nel gruppo di controllo, si è evidenziata una significativa variazione della concentrazione emocitaria, a 4 giorni dall'iniezione ($t = -7.654$, $p = 0.017$; Fig. 2.2B).

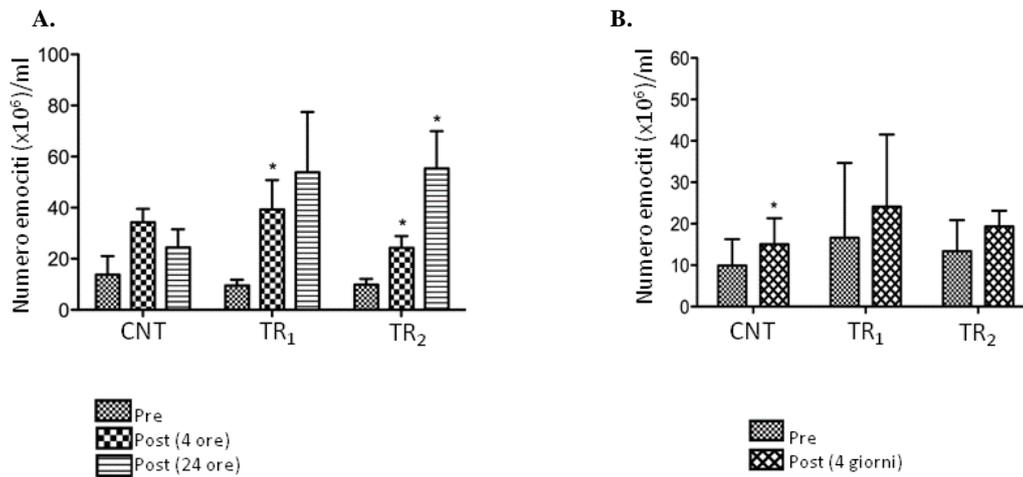


Fig.2.2 Numero degli emociti a 4 e 24 ore (A.) e a 4 giorni (B.) dall'iniezione nTiO₂ (TR₁: 1 mg/Kg nTiO₂, TR₂: 10 mg/Kg nTiO₂). Per i tre gruppi sperimentali in grafico sono riportati i valori della media ± ES (differenze significative indicate con asterisco: $p < 0.05$).

2.3.2 Saggio dell'attività lisozimatica

L' iniezione da nTiO₂ ha indotto un aumento dell'attività lisozimatica extracellulare dopo 4 e 24 ore solo in caso della minore concentrazione testata ($t = -4.405$, $p = 0.005$, $t = -2.488$, $p = 0.047$; Fig. 2.3A). Dopo 4 giorni dal trattamento nessuna significativa variazione è stata osservata (Fig. 2.3B).

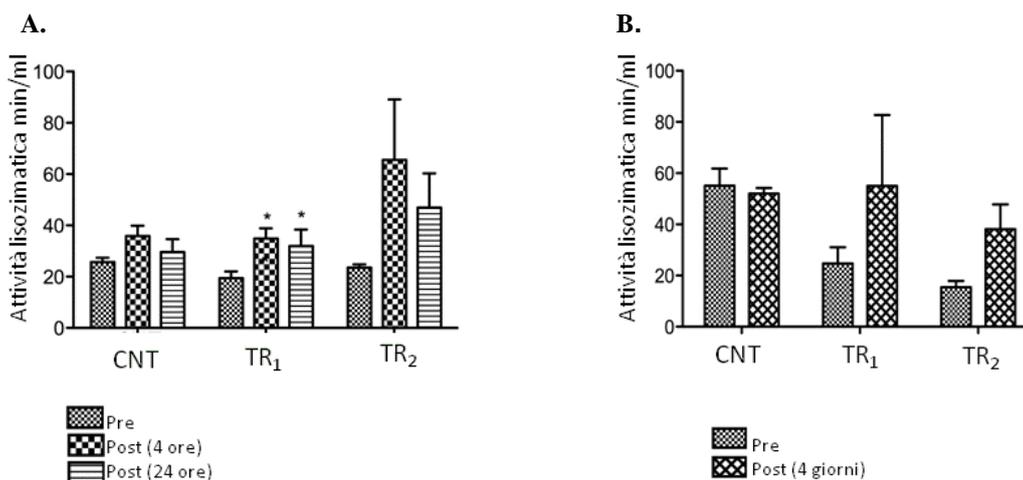


Fig. 2.3 Attività lisozimatica a 4 e 24 ore (A.) e a 4 giorni (B.) dall' iniezione di nTiO₂ (TR₁: 1 mg/Kg nTiO₂, TR₂: 10 mg/Kg nTiO₂). Per i tre gruppi sperimentali in grafico sono riportati i valori della media ± ES (differenze significative indicate con asterisco: $p < 0.05$).

2.3.3 Saggio dell'ossido nitrico

Un aumento significativo del contenuto di ossido nitrico nell' emolinfa è stato rilevato a 4 ore in risposta alla più elevata concentrazione di nTiO₂ somministrata ($t = -2.977$, $p = 0.025$; Fig. 2.4A). Un aumento del contenuto di ossido di azoto è stato registrato anche dopo 4 giorni nel gruppo TR₁ ($t = -7.436$, $p = 0.005$; Fig. 2.4B).

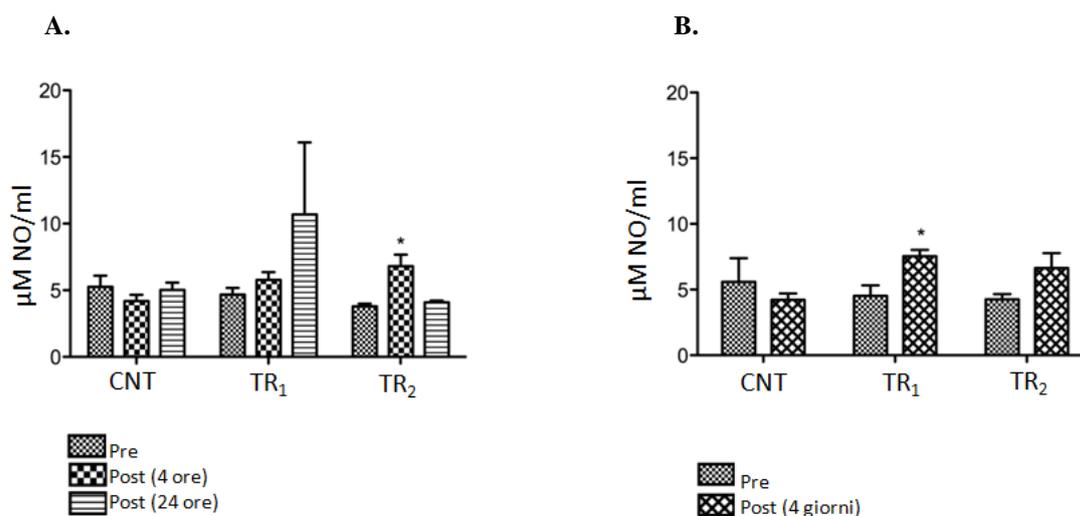


Fig. 2.4 Livelli emolinfatici di ossido nitrico a 4 e 24 ore (A.) e a 4 giorni (B.) dall'iniezione di nTiO₂ (TR₁: 1 mg/Kg nTiO₂, TR₂: 10 mg/Kg nTiO₂). Per i tre gruppi sperimentali in grafico sono riportati i valori della media ± ES (differenze significative indicate con asterisco: $p < 0.05$).

2.4 Discussione

I risultati di questo studio rappresentano un primo tentativo di individuare gli effetti da esposizione a nanoparticelle di TiO₂ su di un cefalopode.

In *O. vulgaris* la somministrazione di nTiO₂ – attraverso iniezione intramuscolare - ad una concentrazione ≥ 1.0 mg/Kg influenza il numero degli emociti, stimola un aumento dell'attività lisozima e della produzione di ossido nitrico.

Un aumento del numero degli emociti circolanti si è registrato 4 ore dopo la somministrazione di entrambe le concentrazioni di NP, e tale aumento si è mantenuto anche a 24 ore dopo l'iniezione per la maggiore dose somministrata.

Nei molluschi è stata evidenziata una grande variazione specie-specifica e inter-individuale della concentrazione emocitaria in funzione di fattori fisiologici (età e il ciclo riproduttivo) e fattori esogeni (stagionalità, agenti patogeni ed inquinanti) (Rodríguez Domínguez *et al.*, 2006). Malham e colleghi (2002) hanno riportato che l'esposizione all'aria per un tempo ridotto (5 minuti) induce una significativa riduzione del numero di emociti nel cefalopode *Eledone cirrhosa*. Inoltre, sempre in *E. cirrhosa* è stato dimostrato che il prelievo di emolinfa influisce sulla numerosità delle popolazione emocitaria in circolo (Malham *et al.*, 1998).

Sebbene i tempi e le modalità di campionamento siano state standardizzate al fine di minimizzare lo stress associato al prelievo di emolinfa, i nostri dati confermano il fatto che campionamenti ripetuti di emolinfa, così come la manipolazione degli animali e la loro permanenza fuori dall'ambiente acquatico possono alterare i parametri immunitari nel polpo. In uno dei 2 gruppi di controllo, infatti, un aumento del numero di emociti è stato osservato dopo 4 giorni dal primo prelievo di emolinfa. Tale variazione nel numero di emociti circolanti potrebbe essere interpretato come una risposta generalista transitoria allo stress da manipolazione o essere causato dai ripetuti prelievi di emolinfa, reazione dimostrata anche in vertebrati in seguito a più prelievi di sangue (Hoffmann e Lommel, 1984; Ralo *et al.*, 1985)

Il lisozima fa parte delle difese cellulari e umorali degli invertebrati, ed agisce contro una vasta gamma di agenti estranei. È stato identificato e caratterizzato in una varietà di invertebrati, ed infezioni e lesioni ne inducono la sintesi (Malham *et al.*, 1998). In questo lavoro si è osservato che nTiO₂ è in grado di aumentare la suscettibilità del polpo comune, stimolando la risposta immunitaria e aumentando i livelli dell'attività lisozimatica dell'emolinfa 4 ore e 24 ore dopo l'iniezione.

Inoltre, la somministrazione di nanoparticolato ha anche indotto un aumento del

contenuto di ossido nitrico nell' emolinfa, confermando l'insorgenza di stress ossidativo nei polpi esposti a nTiO₂. Risultati simili sono stati trovati da Zhu e colleghi (2011) in abalone, con induzione dello stress ossidativo in risposta ad una concentrazione di TiO₂ ≥ 1.0 mg/Kg. In aggiunta, a differenza degli altri parametri indagati, quella dell'ossido nitrico è la sola risposta che è stata possibile rilevare dopo 4 giorni nei gruppi trattati.

I risultati ottenuti non mostrano risposte strettamente dipendenti dai fattori dose e tempo. Questo potrebbe essere correlato alla tendenza delle nanoparticelle di aggregarsi quando disperse in soluzioni saline a pH fisiologico (Bihari *et al.*, 2008). Infatti, l'assorbimento biologico e la reattività della NP dipendono dal loro grado di dispersione e agglomerazione. Secondo alcuni autori (Apte *et al.*, 2009), gli agglomerati costituiscono la forma più rappresentativa e stabile delle nanoparticelle nei sistemi acquatici e, pertanto, potrebbe essere opportuno esporre gli organismi a nanoparticelle in questa forma. Anche se la dispersione di NP viene generalmente raggiunta per mezzo di solventi, si è preferito evitare il loro utilizzo in modo da imitare un' esposizione che fosse quanto più naturale, favorendo la dispersione delle nanoparticelle in soluzione solo mediante sonicazione.

3 nTiO₂ e plasticità comportamentale

3.1 Introduzione

Nella presente sezione si intende valutare i possibili effetti da esposizione di nTiO₂ nei processi di plasticità comportamentale testando le prestazioni dei polpi nel corso di test comportamentali classici (abituazione ed evitamento).

3.2 Materiali e Metodi

3.2.1 Animali

Quaranta polpi, provenienti dal Golfo di Napoli, sono stati utilizzati in questi esperimenti.

Dopo la cattura gli animali sono stati mantenuti nelle condizioni riportate al capitolo 2.

Un primo esperimento, in via preliminare, è stato condotto per sincerarsi che gli animali mangiassero cozze (*Mytilus galloprovincialis*), dal momento che nelle condizioni di mantenimento standard i polpi sono alimentati con granchi. A tale fine, 9 polpi, divisi in tre gruppi, sono stati quotidianamente alimentati con granchio (CNT_G, N=3), cozza (CNT_c, N=3) e cozza previamente esposte a nTiO₂ (TR, N=3) per un arco temporale complessivo di 28 giorni. Durante tutto il periodo sperimentale il comportamento animale è stato valutato mediante: a) latenza d'attacco giornaliera; b) Test di abituazione (Jar); c) test di evitamento (Avoidance) (Fig. 3.1).

Successivamente, sulla base dei risultati ottenuti, gli stessi esperimenti, sono stati condotti su di un secondo gruppo sperimentale numericamente più ampio (N=30). Tutti gli esperimenti sono stati condotti nella stessa stagione (giugno/luglio 2010 e 2011).

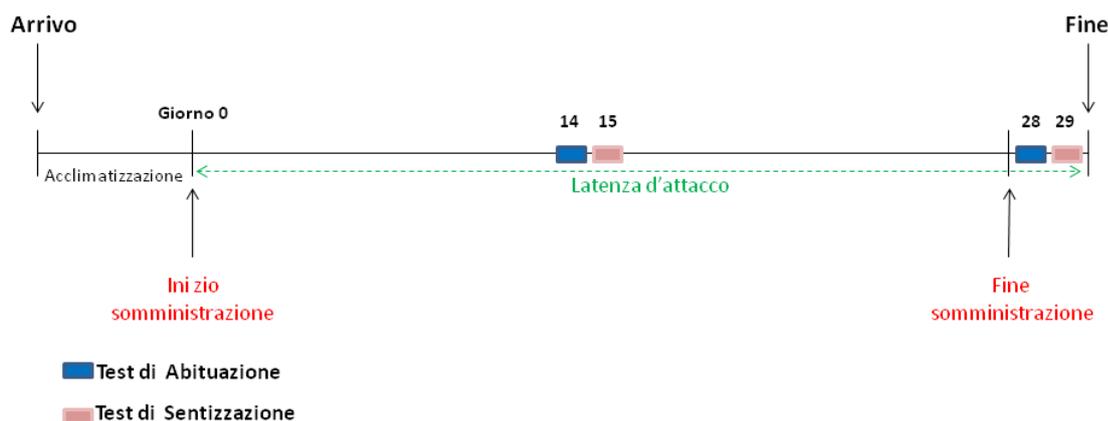


Fig. 3.1 Rappresentazione schematica del piano sperimentale.

3.2.3 Somministrazione

Una soluzione stock di nTiO₂ (0.1 mg/mL) in acqua di mare è stata preparata mediante sonicazione (30 min, 100 W, 50% di on/off del ciclo di raffreddamento), successivamente diluita fino (5 mg/L) e tenuta in agitazione per 30 minuti. Esemplari di *Mytilus galloprovincialis*, dopo essere stati immersi per 24 ore nella soluzione di nTiO₂, sono stati somministrati al polpo come cibo.

La soluzione di stock e di lavoro di nTiO₂ è stata preparata quotidianamente. Ogni polpo ha ricevuto in pasto una cozza al giorno, per un totale di 28 giorni, gli animali controllo sono stati alimentati con granchi o cozze non trattate.

3.2.4 Procedure comportamentali

3.2.4.1 Latenza d' attacco

Per tutto il periodo sperimentale, quotidianamente è stata testata la prontezza degli animali nell'attaccare un granchio vivo. Il granchio, legato ad un filo, è stato presentato in vasca, in posizione opposta rispetto all'animale e rimosso prima che potesse essere

catturato. Il granchio è stato tenuto in vasca per tempo massimo di 1 minuto.

3.2.4.2 Test di abituação

Un barattolo di vetro (altezza: 14 cm, diametro: 8 cm, peso: 289g) riempito d'acqua, chiuso ermeticamente con un tappo metallico e contenente un granchio vivo (*Carcinus mediterraneus*) è stato presentato in ciascuna vasca ospitante i polpi per un totale di 5 presentazioni. Il tempo di ciascuna presentazione era di 5 minuti, intervallato da 3 minuti di interprova.

La latenza di attacco (definita come il tempo dall'immersione del barattolo in vasca all'inizio dell'attacco dell'animale) è stata annotata in seguito all'analisi delle registrazioni video eseguite durante gli esperimenti.

3.2.4.3 Test di evitamento

Per ciascun polpo è stata testata la capacità di apprendimento individuale utilizzando un compito di evitamento. Uno stimolo neutro è stato introdotto in vasca e immediatamente rimosso all'attacco dell'animale. Sebbene lo stimolo introdotto fosse neutro, la rimozione brusca dello stimolo, e la mancanza di una ricompensa rappresenta comunque per l'animale un'esperienza traumatica.

Ogni test era costituito da 10 presentazioni intervallate da un tempo di interprova di 2 minuti. In caso di mancato attacco dell'animale, lo stimolo è stato tenuto in vasca per un tempo massimo di un minuto.

Per ogni prova il tempo di latenza di attacco (definito come il tempo dalla presentazione dello stimolo in vasca all'attacco dell'animale) è stato annotato dalle analisi delle

registrazioni video eseguite durante gli esperimenti.

3.2.5 Analisi statistica dei dati

Il test di Mann U-Whitman è stato utilizzato per confrontare a due a due le presentazioni degli animali appartenenti ai diversi gruppi sperimentali. I risultati sono presentati come media \pm ES. Le differenze sono state considerate significative con un livello di confidenza del 95% ($P < 0.05$).

3.3 Risultati

In nessun caso, nel corso di questi esperimenti, si è assistito ad evidenti alterazioni patologiche o a decessi indotti dalla somministrazione indiretta di NP. Tutti gli animali hanno assunto cozze, sebbene sono stati rinvenuti alcuni residui delle cozze stesse il giorno dopo somministrazione, senza alcuna distinzione tra cozze trattate e non.

L'analisi dei risultati dell'esperimento pilota ha messo in evidenza una risposta d'attacco alla presentazione quotidiana del granchio ($P = 0.021$; Fig. 3.2) significativamente ritardata negli animali alimentati con cozze previamente esposte a nanoparticolato rispetto agli altri due gruppi controllo.

I test di abituação ed evitamento, sebbene non forniscano risultati statisticamente differenti contribuiscono ad evidenziare trend diversi tra i tre gruppi sperimentali. Al test di abituação (Fig. 3.3) gli animali alimentati con cozze presentano una risposta sempre più ritardata rispetto ai gruppi controllo. Nel test di evitamento nei polpi dei due gruppi di controllo c'è traccia dell'esperienza del primo test quando ripetuto al giorno 29; al contrario, nessuna differenza emerge per gli animali trattati con nTiO₂ (Fig. 3.4).

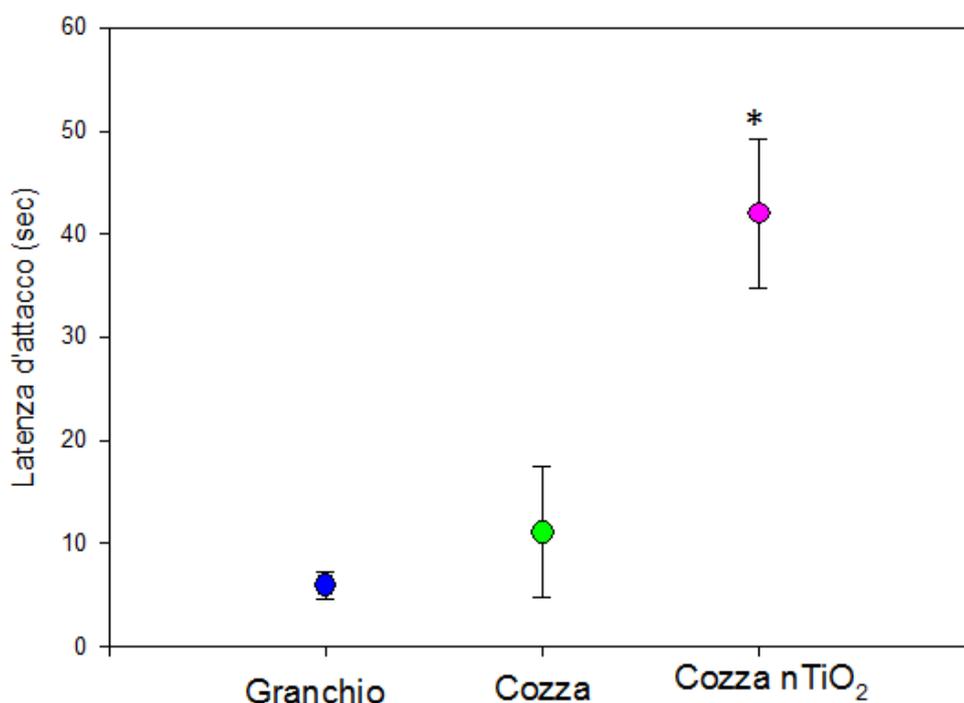


Fig. 3.2 Risposta predatoria alla presentazione quotidiana di una granchio, nei tre gruppi. In grafico è mostrata la somma delle latenze d'attacco (media ± ES; *, $P < 0.05$).

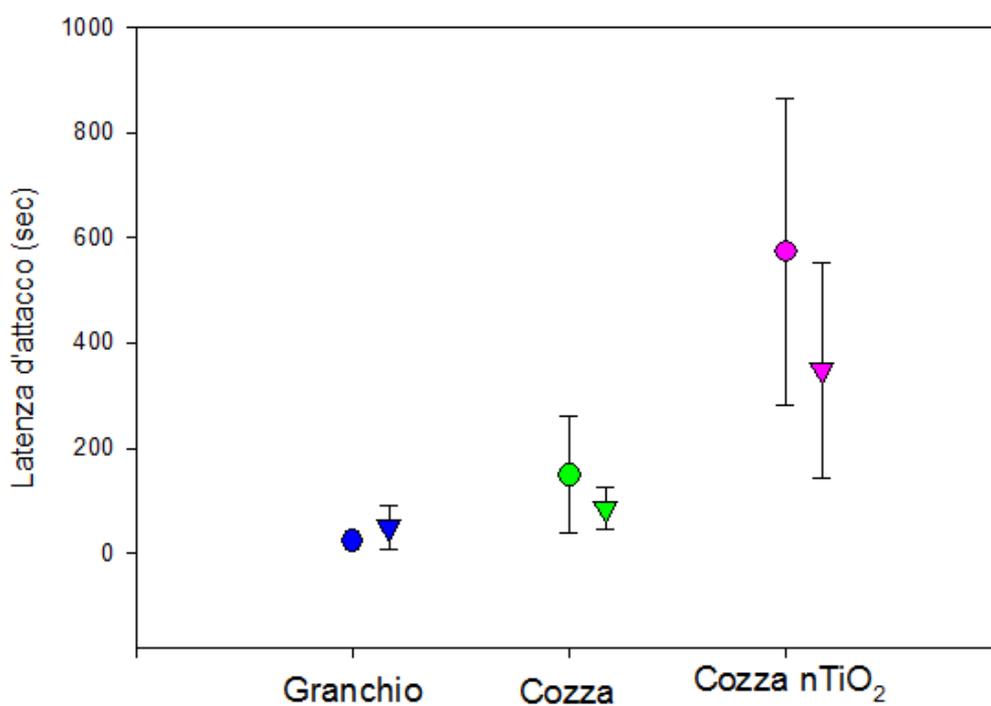


Fig. 3.3 Risposta al test di abituação, nei tre gruppi. In grafico è mostrata la somma delle latenze d'attacco (media ± ES). Un cerchietto (○) sta ad indicare la risposta al giorno 14, un triangolo (▽) quella al giorno 28.

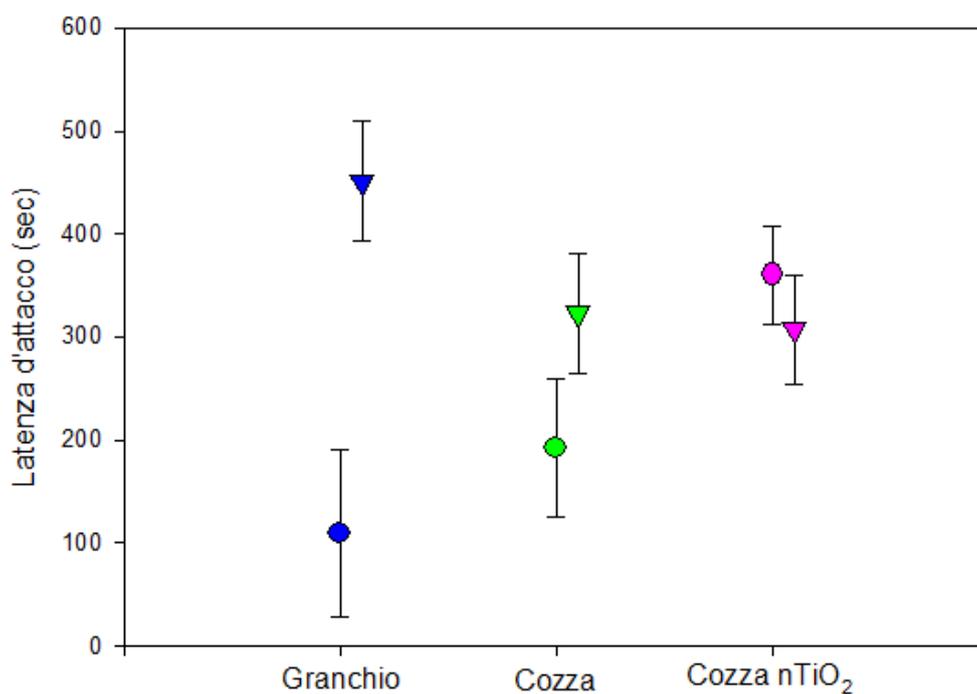


Fig. 3.4 Risposta al test di sensitizzazione, nei tre gruppi. In grafico è mostrata la somma delle latenze d'attacco (media \pm ES). Un cerchietto (O) sta ad indicare la risposta al giorno 14, un triangolo (∇) quella al giorno 28.

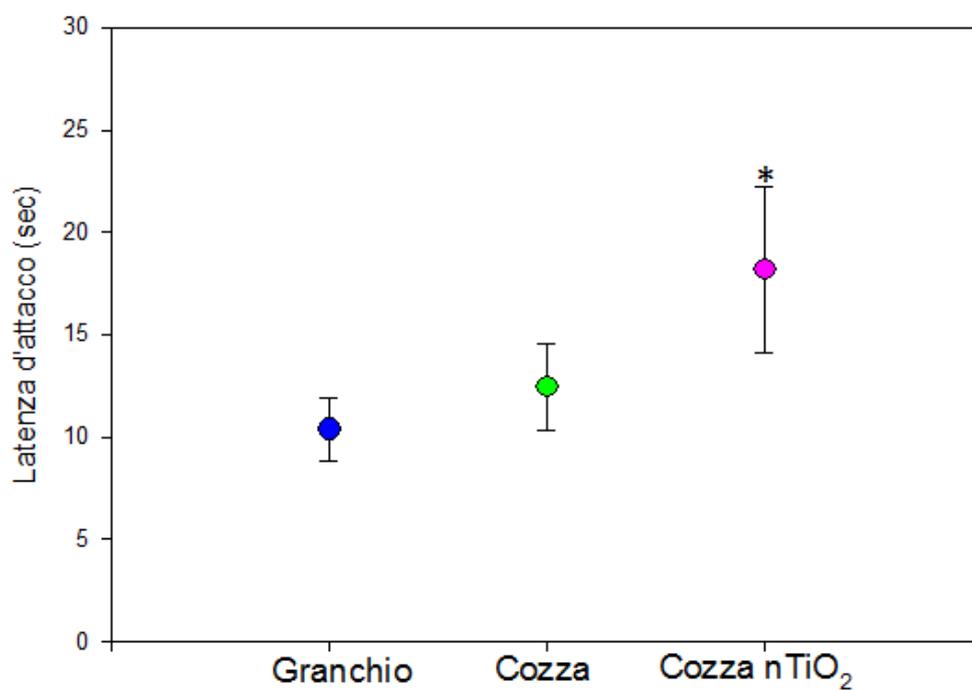


Fig. 3.5. Risposta predatoria alla presentazione quotidiana di una granchio, nei tre gruppi. In grafico è mostrata la somma delle latenze d'attacco (media \pm ES; *, $P < 0.05$).

Quando l'esperimento è stato ripetuto alla stagione successiva, impiegando un maggior numero di animali, nuovamente la latenza predatoria degli animali alimentati con cozze esposte a nanoparticolato è risultata significativamente più elevata ($P = 0.020$; Fig. 3.5).

L'andamento complessivo degli esperimenti di abituação e sensitizzazione risulta sovrapponibile a quello condotto in precedenza, con il peculiare dato che il 50% delle volte gli animali alimentati con cozze esposte a nano particolato non rispondono in alcun modo alla presentazione dello stimolo introdotto in vasca.

3.4 Discussione

L'esplorazione è la capacità di estrarre informazioni dall'ambiente circostante (Hutt, 1966). La conoscenza dell' ambiente circostante e delle sue variazioni è probabilmente uno dei primi compiti a cui ogni organismo deve far fronte. I polpi sono predatori generalisti ed individuano la loro preda visivamente e al tatto (Hanlon & Messenger, 1996), sono inoltre noti esprimere complessi repertori comportamentali che includono prestazioni apprese (e.g. Fiorito & Scotto, 1990), "personalità" (Mather & Anderson 1993), e "gioco" (Kuba *et al.*, 2003). Sono animali capaci di discriminare oggetti di forme differenti (e.g. Sutherland & Carr, 1963), dotati di memoria visiva (*review in* Wells, 1978) e capaci di apprendimento pavloviano (Papini & Bitterman, 1991).

La risposta ritardata all' attacco al granchio dei polpi alimentati con cozze esposte a nanoparticelle denota un chiaro malessere degli animali che interferisce con le normali performance predatorie.

Il mancato aumento della latenza in risposta alla presentazione del barattolo contenente il granchio nelle due presentazioni non manifesta l'istaurarsi di abituação negli animali alimentati con granchio e con cozza, che probabilmente è da attribuirsi all' assenza nel

disegno sperimentale di un rinforzo. In ogni caso, i sempre elevati tempi di risposta nei polpi la cui alimentazione prevedeva la presenza di nanoparticolato mette in luce un' anomalia comportamentale. Allo stesso modo, la ridotta latenza allo stimolo di disturbo (avoidance) indica un processo di sensibilizzazione in atto per i due gruppi controllo e non per quello esposto indirettamente a nTiO₂.

I risultati ottenuti mostrano che gli animali esposti indirettamente a nanoparticolato di nTiO₂ presentano manifeste alterazioni nei processi alla base dell'apprendimento non-associativo e del comportamento esplorativo.

4. nTiO₂ e numero di cellule nel sistema nervoso

4.1 Introduzione

Nella presente sezione si valuta se e in che misura l'esposizione a nanoparticolato di TiO₂ possa determinare alterazioni nel numero di cellule costituenti il cervello di *O. vulgaris*.

4.2 Materiali e Metodi

4.2.1 Animali e somministrazione

19 polpi (peso corporeo: 442 - 574g) pescati nel Golfo di Napoli sono stati impiegati per questi esperimenti. Dopo la cattura gli animali sono stati mantenuti secondo le condizioni riportate al capitolo 2. Gli animali, attribuiti ai gruppi controllo (CNT, N= 6) e trattato (TR=13), sono stati esposti per 28 giorni a nanoparticelle di TiO₂ mediante cibo (per maggiori dettagli si rimanda alla sezione 3.2.3).

Gli animali sono stati poi anestetizzati (3.5% MgCl₂ in acqua di mare; Messenger *et al.*, 1985), pesati, e sacrificati per il prelievo del cervello. Ogni cervello è stato sezionato nelle tre 3 principali strutture nervose di cui è composto - massa sopra-esofagea, (SEM), massa sotto-esofagea (SUB) e un paio di lobi ottici (OL) – e fissato in PAF (4% in acqua di mare).

4.2.2 Frazionamento isotropico

Il numero totale di cellule, nervose e non, è stato determinato mediante il metodo del frazionamento isotropico (Herculano-Houzel e Lent, 2005). Tale metodica elude la complessità di strutture eterogenee, quali quelle cerebrali, mediante dissociazione del

tessuto in una sospensione nucleare omogenea ed uniforme.

Ciascuna delle masse nervose prelevata e fissata (PAF 4%), è stata omogenizzata meccanicamente in una soluzione detergente (Triton X-100 in sodio citrato, 40mM), alla quale è stato poi aggiunto del colorante nucleare (DAPI 1% in PBS).

Il volume finale della sospensione è stato diluito empiricamente in funzione della densità della sospensione ottenuta. Per stimare la quantità di nuclei presenti, dalla soluzione omogeneamente miscelata e priva di bolle, sono stati prelevati 10 μ l, caricati in una camera di conteggio di Neubauer e osservati al microscopio a fluorescenza a 40x. Per ogni campione la conta è stata effettuata su 4 aliquote, solamente conte ripetute con un coefficiente di variazione < 0.15 sono state considerate valide. La densità nucleare finale della sospensione è stata ottenuta moltiplicando il valore medio delle conte ripetute per il volume finale della sospensione.

4.2.3 Analisi statistica

I dati sono stati analizzati con JMP9. Per valutare le differenze tra i due gruppi sperimentali è stato utilizzato Kruskal-Wallis test per dati non parametrici. I risultati sono presentati come media \pm ES. Le differenze sono state considerate significative con un livello di confidenza del 95% ($P < 0.05$)

4.3 Risultati

Al prelievo del cervello, in nessuna delle tre strutture nervose è stato possibile individuare alcuna variazione macroscopica.

Il metodo del frazionamento isotropico ha consentito una rapida e precisa identificazione del numero di cellule in tutte le strutture analizzate (Fig. 4.1).

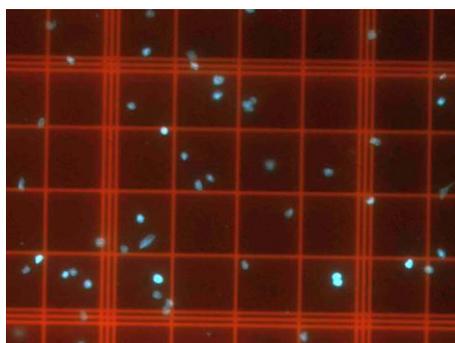


Fig. 4.1 Nuclei colorati con DAPI della massa sottoesofagea al microscopio ottico (40x).

Gli animali alimentati con cozze previamente esposte a nanoparticelle presentano complessivamente una massa dell'intero cervello che è maggiore rispetto al gruppo controllo (Fig. 4.2A). Lo stesso trend è conservato quando si esamina la massa delle singole strutture (Fig. 4.2B).

Sebbene non ci siano variazioni significative nella taglia corporea dei due gruppi sperimentali, i rapporti della massa del cervello in toto e delle singole strutture nervose rispetto alla massa corporea risultano significativamente maggiori (Tabella 2).

Anche nel numero di cellule, dell'intero cervello (Fig. 4.2C) come delle singole strutture (Fig. 4.2D) sono state riscontrate significative variazioni tra i due gruppi.

La densità cellulare, calcolata come numero di cellule per mg di tessuto, risulta diminuire significativamente nella massa sopraesofagea e nei lobi ottici per gli animali trattati, ma non nella massa sottoesofagea (Fig. 4.2E), il che significa che nelle prime due strutture l'incremento della massa e del numero di cellule è anche accompagnato da un aumento della taglia delle cellule.

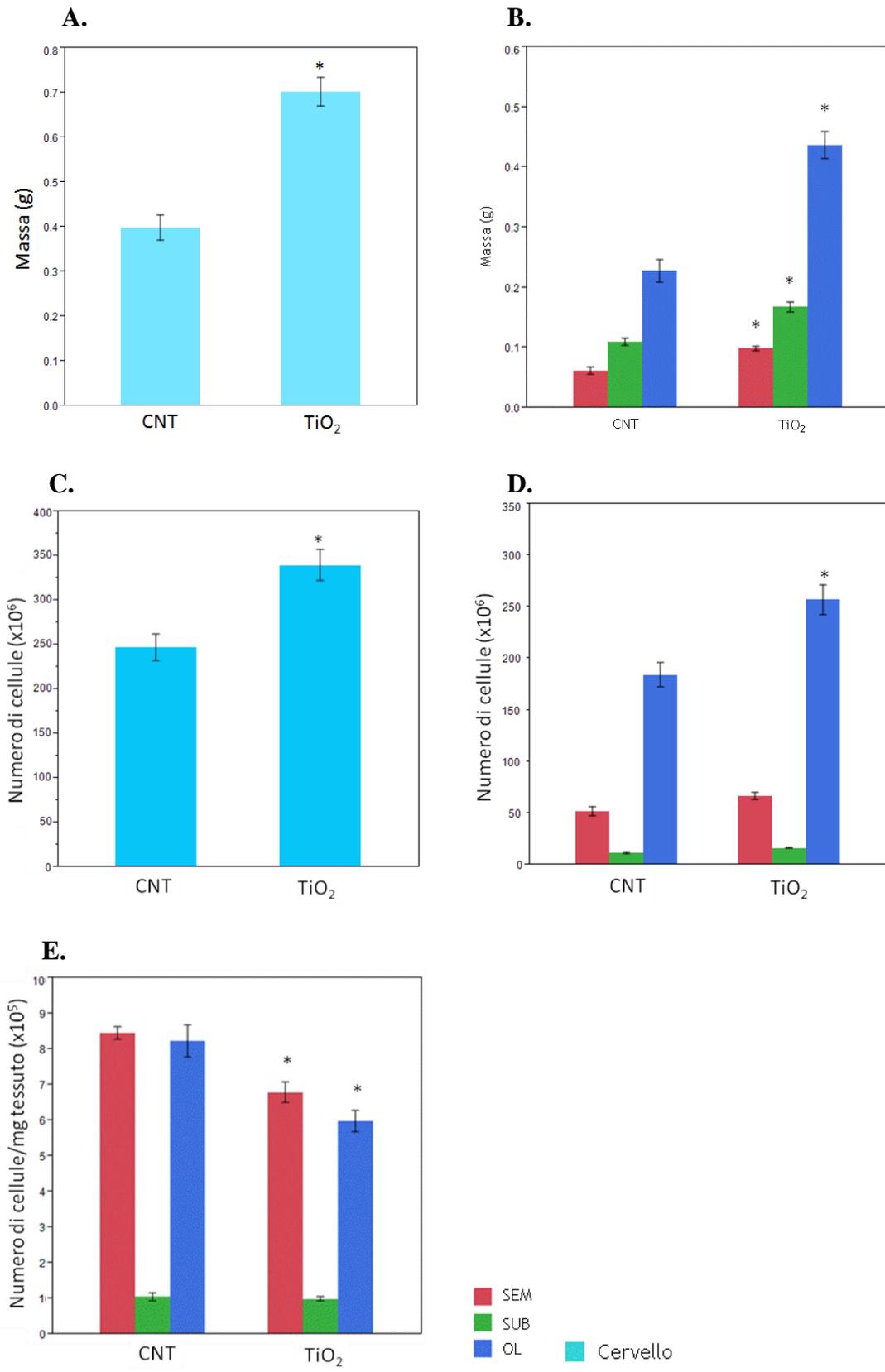


Fig. 4.2 Massa (A., B.), numero di cellule (C., D.) e della densità cellulare (E.) nel cervello intero e per ciascuna struttura nervosa nei due gruppi sperimentali (*, $P < 0.05$).

Tabella 4.1 Comparazione della massa corporea, del cervello e delle singole strutture che lo costituiscono nei due gruppi sperimentali

	Massa corporea (g)	Lunghezza dorsale mantello (mm)	Massa cervello (g)	$I_C = (M_C / M_{CO}) * 100$	$I_{SEM} = (M_{SEM} / M_{CO}) * 100$	$I_{SUB} = (M_{SUB} / M_{CO}) * 100$	$I_{OL} = (M_{OL} / M_{CO}) * 100$
CNT	499.0 ± 50.6	127.772 ± 6.218	0.398 ± 0.069	0.08 ± 0.013	0.012 ± 0.002	0.022 ± 0.003	0.046 ± 0.001
TR	526.8 ± 24.7	124.008 ± 6.327	0.702 ± 0.117	0.133 ± 0.023	0.019 ± 0.003	0.032 ± 0.006	0.083 ± 0.002
P	ns	ns	0.0007	0.0010	0.0007	0.0018	0.0025

I valori sono riportati come media ± DS

M_{CO} = massa corporea

M_C = massa cervello

I_C = indice organosomatico del cervello

I_{SEM} = indice organosomatico per la massa sopraesofagea

I_{SUB} = indice organo somatico per la massa sottoesofagea

I_{OL} = indice organo somatico per i lobi ottici

4.4 Discussione

La scelta degli animali da inserire nell'esperimento ha richiesto un grande sforzo nella fase di campionamento, affinché la variazione della taglia corporea tra gli individui potesse essere inferiore al 15%, per minimizzare le variazioni interindividuali nel numero di cellule.

La massa e il numero di cellule delle tre masse nervose dei controlli rientrano nei valori solitamente riscontrati per lo stesso range di taglia corporea per polpi provenienti dagli stessi siti del Golfo di Napoli (dati non mostrati).

La massa complessiva del cervello ed il suo numero di cellule degli animali trattati con nanoparticolato risultano maggiori rispettivamente di 1.76 e 1.37 volte rispetto al gruppo controllo, dati per nulla trascurabili se comparati con le variazioni di massa (3.1x) e di numero di cellule (2.2x) ottenuti per un range di taglia corporea ben più ampio (100-2000 g; Grimaldi & Herculano-Houzel, dati non pubblicati).

Gli animali esposti a TiO₂ presentano massa sopraesofagea, sottoesofagea e lobi ottici di dimensioni maggiori, con un leggero maggiore aumento nei lobi ottici, rispetto alle restanti strutture.

Le stesse strutture risultano anche essere costituite da un maggior numero di cellule, e anche le dimensioni cellulari risultano essere maggiori, con conseguente riduzione della densità, ad eccezione della massa sottoesofagea.

Gli effetti sembrano seguire la stessa distribuzione in massa e numero di cellule dei controlli, ma è come se i criteri biologici che sottendono la taglia e numero di cellule del cervello fossero amplificati dal trattamento con TiO₂ (Tabella 4.2).

I risultati ottenuti evidenziano significativi fenomeni iperplastici ed ipertrofici nel cervello di polpo, in concomitanza con esposizione da nanoparticelle attraverso la dieta.

Tabella 4.2 Sulla base delle variazioni (Δ) tra i due gruppi, si è calcolata la massa attesa (Δ massa attesa = Δ numero cellule x Δ taglia cellule) e confrontata con la variazione di massa osservata.

	Δ numero cellule	Δ taglia cellule	Δ massa attesa	Δ massa osservata
SEM	1.286	1.244	1.600	1.606
SUB	1.427	n.s.	1.427	1.511
OL	1.395	1.379	1.923	1.921

5. nTiO₂ ed Espressione genica in *O. vulgaris*

5.1 Introduzione

Quest'ultima parte dello studio è dedicata ad indagare l'impatto di nTiO₂ a livello molecolare. Per valutare gli effetti da esposizione a breve e medio termine di nTiO₂ il profilo di espressione genica di un set di 21 geni le tre masse costituenti il cervello è stato analizzato usando Rt qPCR.

5.2 Materiali e Metodi

5.2.1 Animali e somministrazione

Per questa sessione sperimentale, un totale di 20 *Octopus vulgaris* di entrambi i sessi (peso corporeo: 224 a 490 g) sono stati utilizzati. Gli animali, dopo essere stati casualmente divisi in tre gruppi sperimentali: *i.* controllo: (CNT; N = 6), *ii.* esposto a nTiO₂ per 3 giorni (N = 7; TR₃), e *iii.* esposto a nTiO₂ per 15 giorni (N = 7; TR₁₅) ed esposti a nanoparticolato di nTiO₂ mediante cibo, (per maggiori dettagli si rimanda alla sezione 3.2.3).

Al termine del periodo sperimentale gli animali sono stati anestetizzati (3.5% MgCl₂ in acqua di mare; Messenger *et al.*, 1985) e sacrificati per il prelievo del cervello. Le singole masse del cervello (SEM, SUB e OL), sono state collocate in eppendorf sterili da 2 mL contenenti 1 mL di Trizol (soluzione lisante; Invitrogen) e conservati a -80°C.

5.2.2 Estrazione dell'mRNA

I campioni sono stati omogenizzati mediante TissueLyser (Qiagen). Dai campioni appartenenti allo stesso gruppo sperimentale, per ciascuna delle tre masse del cervello di polpo, prelevando pari aliquote di tessuto omogenato sono stati ottenuti dei pool, utilizzati nelle fasi successive.

A ciascuno dei campioni così ottenuti è stato poi aggiunto cloroformio (200 μ L per mL di TRIZOL), che mediante centrifugazione a 12.000g per 10-15 minuti, ha permesso la separazione del campione in tre fasi: una fase acquosa contenente RNA, un' interfase, in cui si trova il DNA, ed una fase organica comprendente le proteine. Alla fase acquosa è stato aggiunto isopropanolo (500 μ L per mL di TRIZOL), il campione è stato poi incubato a temperatura ambiente per 10 minuti e centrifugato (12.000g per 10 minuti). Il pellet di RNA è stato risospeso in etanolo 75% (1 mL), riprecipitato mediante centrifugazione, e lasciato ad asciugare per consentire la completa evaporazione di etanolo. Il pellet asciutto è stato risospeso in 100 μ L di acqua DEPC e purificato utilizzando il kit RNAeasy (Quiagen).

La qualità dell' estrazione e la concentrazione dell'RNA totale così ottenuto è stata determinata mediante lettura spettrofotometrica (ND-1000, NanoDrop).

Un ulteriore controllo qualitativo dell'integrità dell'mRNA estratto è stato effettuato mediante elettroforesi capillare su RNA 6000 Nano Chip kit (Agilent) con Agilent Bioanalyzer 2100.

5.2.3 Sintesi di cDNA

La sintesi del cDNA è stata condotta utilizzando il kit Quantitect Reverse Transcription (Qiagen). Il protocollo prevede prima l'eliminazione di DNA genomico mediante l'incubazione di 1 μ g di campione di RNA per 2 minuti a 42°C con 2 μ L di gDNA Wipeout Buffer, e la successiva retrotrascrizione con master mix costituita da 1 μ L di Quantiscript Reverse Transcriptase, 4 μ L di Quantiscript RT Buffer 5x e RT Primer Mix 1 μ L. Il tutto è stato incubato per 15 minuti a 42°C e successivamente per 3 minuti a 95°C per inattivare la reazione.

Il cDNA ottenuto è stato diluito 1:20 con acqua sterile e conservato a -20°C per poi essere utilizzato sia per la PCR convenzionale che per la real-time PCR.

5.2.4 Primer

Per ciascun gene sono state disegnate coppie di primer con il programma Primer 3 (http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3_www.cgi), utilizzando sequenze specifiche per ciascun mRNA di *O. vulgaris*, secondo i seguenti parametri: 20 nucleotidi di lunghezza, prodotto di amplificazione di 100-150 bp e temperatura di melting di 58-60°C. Le sequenze dei primer utilizzate sono riassunte nella tabella 5.1. Il prodotto di ciascuna coppia di primer è stato verificato dopo PCR su gel di agarosio.

5.2.5 Real-time qPCR

L'analisi dell'espressione dei geni nel polpo è stata realizzata mediante Real Time qPCR, una delle tecniche più sensibili ed efficienti per la quantizzazione degli RNA messaggeri. Ogni reazione prevede una reazione finale di 25 µL: 5µL di forward e reverse primer per ciascun gene, 1.5 µL di cDNA (25 ng), 2 µL di acqua milliQ e 12,5 µL di Syber Green PCR Master Mix® (Applied Biosystems).

Tutte le real-time qPCR sono state condotte secondo il seguente programma: due step iniziali di 2 min a 50°C e 10 min a 95°C di attivazione, 40 cicli di 15 sec a 95°C e 1 min a 60°C per la fase di melting e di annealing/estensione, ed infine, una fase di dissociazione di 15 sec a 60°C seguiti da 15 sec a 95°C. Un controllo negativo, contenente solo acqua in sostituzione del template di cDNA, è stato incluso nella piastra per ogni coppia di primer. Tutti i campioni sono stati analizzati in triplicato.

Per ottimizzare le condizioni di funzionamento negli esperimenti di real time PCR, per ciascuna coppia di primer sono state eseguite delle prove con diluzioni di ciascuna coppia

0.25, 1.5, 5.0 μ M per ottenere un valore di C_t (ciclo soglia) paragonabile per ciascuna coppia di oligo da sottoporre ad analisi.

Inoltre per poter correttamente confrontare i dati di C_t dei diversi amplificati l'efficienza delle singole coppie di primer è stata calcolata per Real time PCR con cinque punti di diluizione (1:10, 1:25, 1:50, 1:100, 1:200).

In ciascun esperimento di real-time PCR come geni di controllo sono stati utilizzati due geni di riferimento selezionati positivamente in recenti lavori in *O. vulgaris* (Sirakov *et al.*, 2009): tubulina A e ubiquitina, la cui stabilità è stata poi verificata con NormFinder. L'espressione di ciascun mRNA è stata normalizzata su quella del controllo endogeno nello stesso campione. La quantità relativa (RQ) nei campioni trattati, rispetto al campione di controllo, è stata calcolata con il metodo del $2^{-\Delta\Delta C(T)}$ (Livak & Schmittgen, 2001).

5.2.6 Analisi statistica

I livelli di espressione dei diversi geni, nei tre diversi gruppi sperimentali e nelle 3 masse del sistema nervoso centrale sono stati analizzati ANOVA. Il livello di significatività accettato è stato fissato ad $P < 0.05$.

Tabella 5.1. Sequenze dei primer, ampliconi dei geni candidati e di geni di riferimento.

Gene	GenBank accession number	Primer	Sequenza Primer 5' - 3'	Amplicone (bp)
14-3-3 protein beta alpha (14-3-3)	non depositata	F	GACGAAATGGTGAAAGCAT	112
		R	CTCGACGAGCACCTATCACA	
aldehyde dehydrogenase family member (alh-6) (alh6)	non depositata	F	GCCTGGCTTGTTGTAATGT	160
		R	GTGTGCTTATTGCTGCTCCA	
collagen type xxi alpha 1 (ctxa1)	non depositata	F	CCCATCGGTGCTGATAAAGT	147
		R	ACCGTCATCTGGGCTGAATA	
elongation factor 1-gamma (ef1g)	non depositata	F	TGCATCTTGACACATGGGTAT	110
		R	GCTGGTTGAGAACAGCCAAT	
heat shock 70 (hs70)	non depositata	F	CCAACCAACAGACCCAAAC	148
		R	CTCTAGGTCTGGAGGGATG	
kinesin family member 3° (KF3A)	non depositata	F	GGGCTACTTACGCCGTACAA	130
		R	CGAAGCAGTACAAGCTGCTG	
pleckstrin homology domain protein (PHDP)	non depositata	F	CCCCTTAGGTGACTGTCAAG	116
		R	CAAATTCATTTTCGGCTGCT	
solute carrier family 6 (neurotransmitter glycine) member 5 (scf6)	non depositata	F	CAGTTGCTCTGGCTGGATT	147
		R	GGAGAGATGGTCCCATTTT	
solute carrier family member 15 (SCF15)	non depositata	F	GATGCTCTACGCTCCTTGGT	133
		R	TTGTTTTCGAACATCGTCCA	
transcription initiation factor small (Tifs)	non depositata	F	GCATTTGAGCAGCACCAAGTA	119
		R	TGTGGGGCTTTCATGTTGTA	
Octopressin Ov-OP	AB056454	F	TCCCAAAAAGTTCCACAAATCAA	123
		R	ATAGGGCAGCTTGCCAGAA	
Cephalotossin Ov-CT	AB056464	F	TCGTCCAACCTTTTGTCTGTG	118
		R	CCTGCTCTGACATGGGTGT	
Actin-beta Act	AB053937	F	TGATGGCCAAGTTATCACCA	103
		R	TGGTCTCATGGATACCAAGCA	
cAMP response element-binding CREB	FJ617443	F	ACAGTATGCCCAAGGCTCTG	122
		R	TTCCAGTGGTTGCCATAACA	
Glycine transporter Ov-Glyt	non depositata	F	TGGAACCTCAAGAACTGTGTTG	123
		R	ATTGGAGAGTCCGACAAGCG	
Dopamine transporter Ov-dat	FJ617441	F	GCCCTAGACGGCATCAAATA	109
		R	ATCCTGGTCCAAGGAAAAG	
Stathmin Ov-stm	GQ152874	F	TGGAGAGAAAAGGCCAAAGA	133
		R	CAATAGCCTCCTGGGTGAGA	
Tubulin A Ov-tubA	X15845	F	ACTGGTGTCCAACCTGGCTTC	105
		R	TGCTTAACATGCACACAGCA	
Tyrosine Hydroxylase Ov-TH	FJ617442	F	CTCATTGCAGACATGGCATT	128
		R	GCGTGAGTCGGAAACAGATT	
Ubiquitin/ribosomal protein S27a Ov-ub/S27A	FJ617440	F	TCAAAACCGCCAACCTAACC	113
		R	CCTTCATTTGGCTCTTCGTC	
Ubiquitin C-terminal hydroxylase Ov-uch	GQ148556	F	CGATTGTTGACGGATGAAA	112
		R	AAAAAGCCTTTAGCTGTGATGTT	

5.3 Risultati

I risultati qui riportati sono stati analizzati utilizzando la TubA come gene di riferimento, (stability value: 0.166; NormFinder).

L'analisi dei profili di espressione genica nelle diverse masse ha rivelato significative differenze tra i gruppi sperimentali (Fig. 5.1).

Indipendentemente dalla durata del trattamento, l'espressione di tutti i 20 geni analizzati risulta essere significativamente cambiata almeno in una delle masse costituenti il cervello in seguito all'esposizione di TiO₂. In dettaglio, a tre giorni di trattamento si registra variazione significativa dell'espressione di 16 geni nella massa sopraesofagea, 13 nella massa sottoesofagea e 12 nei lobi ottici; dopo 15 giorni i livelli d'espressione risultano leggermente variati: con 15 geni nella SEM e nei LO e 17 nella SUB.

I geni down-regolati in entrambe le condizioni di esposizione risultano essere numericamente prevalenti rispetto a quelli overespressi in tutte le strutture del sistema nervoso centrale. Inoltre, per 6 geni nella SEM (CREB, hs70, Ov-Glyt, Ov.stm, Ov-TH, Ov-uch) e 3 nei lobi ottici (CREB, scf15, Ov-TH) si è avuto una significativa inversione di tendenza dell'espressione, passando da una condizione di sovraespressione ad una di sottoespressione.

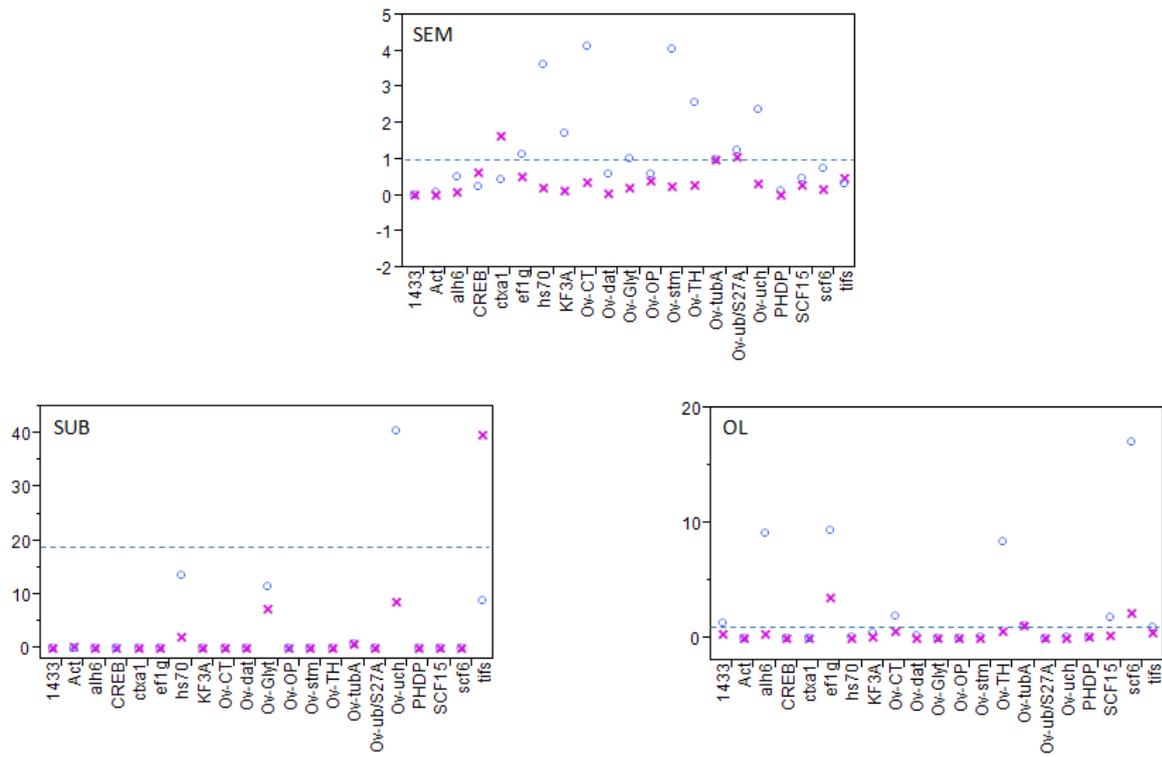


Fig. 5.1. Livelli di mRNA espressi nei due gruppi sperimentali esposti a TiO_2 per 3 giorni (o) e 15 giorni (x) (media). I livelli di espressione dei singoli geni sono normalizzati rispetto a tubulina A (TubA) e calcolati rispetto al gruppo controllo (linea tratteggiata).

Tabella 5.2 Distribuzione dell'espressione genica nelle tre masse nelle due condizioni di esposizione con relativa significatività statistica (* $P < 0.05$).

Struttura	SEM		SUB		OL	
	3 giorni	15 giorni	3 giorni	15 giorni	3 giorni	15 giorni
Gene						
14_3_3	↓*	↓*	↓	↓	↑	↓*
Act	↓*	↓	↓	↓*	↓*	↓
Alh6	↓*	↓*	↓	↓*	↓*	↓*
CREB	↑*	↓*	↓*	↓*	↑*	↓*
Ov-CT	↓	↑*	↓	↓*	↓	↓*
ctxa1	↑	↓*	↓*	↓	↑*	↑*
ef1g	↑	↓*	↓*	↓*	↓*	↓*
Ov-Glyt	↑*	↓*	↑*	↑*	↓	↓*
hs70	↑*	↓*	↑*	↑*	↓*	↓*
Ov-dat	↓*	↓*	↓*	↓*	↓*	↓*
KF3A	↑*	↓	↓*	↓*	↓	↓
Ov-ub/S27A	↑*	↑	↓	↓*	↓	↓
Ov-OP	↓	↓*	↓	↓*	↓	↓*
PHDP	↓*	↓	↓*	↓*	↑	↓
SCF15	↓*	↓*	↓*	↓*	↑*	↓*
scf6	↓*	↓*	↓	↓*	↑	↓*
Ov-stm	↑*	↓*	↓*	↓*	↓	↓*
Ov-TH	↑*	↓*	↓*	↓	↑*	↓*
Tifs	↓*	↓	↑	↑	↓*	↓
Ov-uch	↑*	↓*	↑*	↑*	↓*	↓*

5.4 Discussione

I geni scelti per questo studio sono stati selezionati a partire da geni la cui espressione risulta, in studi condotti su altri sistemi, in qualche modo modificata in risposta ad esposizione a nanoparticolato (Balasubramanian et al., 2010; Okuda-Shimazaki *et al.*, 2010; Liu *et al.*, 2010; Griffitt *et al.*, 2009; Shimizu *et al.*, 2009, Javanovic *et al.*, 2011). In tal modo sono state identificate nel trascrittoma di *O. vulgaris* (Brown & Fiorito, EST database, unpublished) 80 sequenze “candidate”. Di queste sequenze, sono state effettivamente utilizzate soltanto quelle che non hanno posto eccessivi problemi nell’allestimento delle condizioni di PCR dopo il preliminare disegno di primer mediante il software Primer 3, e a queste sono poi state aggiunte sequenze già note di *O. vulgaris* (i geni indicati nella tabella 5.2 con un accession number e il gene Ov-GlyT).

Tra le varie metodiche in uso per stabilire se composti inquinanti possono indurre alterazione dei sistemi biologici quella dei profili d’espressione negli ultimi anni è ampiamente utilizzata.

L’esposizione a TiO₂ ha indotto variazioni nei livelli di espressione nel cervello di *O. vulgaris* di geni coinvolti nel trasporto molecolare, nei meccanismi di segnali cellulari e di crescita e proliferazione cellulare (Tabella 5.3).

Un assunto centrale della tossicogenomica è che sostanze inducenti tossicità secondo uno stesso meccanismo producano risposte di espressione genica simile. In questo studio, assumendo che le concentrazioni teoriche somministrate quotidianamente siano le stesse, ciò che differenzia i due gruppi sottoposti a nano particolato è il tempo di esposizione. Le suddette condizioni sperimentali hanno prodotto differenti profili di espressione nelle tre strutture nervose, suggerendo una variazione d’espressione tissutale e in netta dipendenza dal fattore tempo di esposizione, in cui la sovra espressione, quando presente a 3 giorni si

inverte a 15 giorni, suggerendo l'istaurarsi di un' inversione della risposta cellulare a medio termine.

Tabella 5.3 Nella tabella sono riportate per ogni gene le categorie funzionali secondo Gene Ontology

Gene	Caratterizzazione ontologica
14_3_3	Binding protein; catalytic oxidoreductase
Act	Nucleotide binding, protein binding, structural constituent of cytoskeleton
Alh6	Catalytic oxidoreductase
CREB	Nucleic acid binding; protein binding; transcriptional regulator activity
Ov-CT	Molecular transducer activity
ctxa1	Structural molecule activity: extracellular matrix structural constituent
ef1g	Nucleotide binding; nucleic acid binding; catalytic hydrolase
Ov-Glyt	Trasporter activity: substrate-specific transporter activity
hs70	Protein binding; catalytic oxidoreductase
Ov-dat	Trasporter activity: neurotransmitter sodium symporter
KF3A	Nucleotide binding; protein binding; catalytic hydrolase
Ov-ub/S27A	Protein binding; zinc ion binding; transcription regulatory factor; structural molecule activity: structural constituent of ribosome
Ov-OP	Molecular trasducer activity: signal transducer activity
PHDP	Intracellular signal transduction: ion binding
SCF15	Transporter activity
scf6	Protein binding; transporter activity
Ov-stm	Protein binding; molecular transducer activity: signal transducer activity
Ov-TH	Iron ion binding
Tifs	Nucleotide binding, catalytic hydrolase; transcript regulator activity
Ov-uch	Protein binding, small protein activating enzyme activity

6. Discussione generale

I dati in letteratura relativi all'effetto da nanoparticelle su gli organismi acquatici sono piuttosto contrastanti: prove di ecotossicità su crostacei, pesci e alghe indicano un basso (mg/l) potenziale di pericolo da nanoparticelle (Oberdörster, 2004; Lovern e Klaper, 2006; Federici *et al.*, 2007; Warheit *et al.*, 2007; Lovern *et al.*, 2007; Smith *et al.*, 2007). Viceversa, in altri casi sono stati osservati danni ossidativi a livello del cervello (Oberdörster, 2004; Zhu *et al.* 2006) e delle branchie e del fegato di pesci (Zhu *et al.*, 2006) nonché di branchie e epatopancreas di molluschi bivalvi (Gagné *et al.*, 2008).

C'è dunque ancora molto da esplorare per acquisire ulteriori informazioni dell'impatto biologico delle nanoparticelle sul biota acquatico.

Conoscere il comportamento del nanoparticolato nei sistemi acquatici è di fondamentale importanza per comprenderne il destino nel compartimento acquatico. Le nanoparticelle possono restare liberamente sospese o flocculare in aggregati di dimensioni maggiori. La tendenza ad aggregarsi in ambienti di transizione e salati è favorita dall'aumentata forza ionica (Brant *et al.*, 2005, Domingos *et al.*, 2009, Jiang *et al.*, 2009).

Osservazioni fatte nel presente studio supportano questi risultati, la sonicazione ha garantito la dissoluzione del nanoparticolato in acqua di mare solo per un tempo limitato, nonostante la continua agitazione, dopo circa trenta minuti è stato possibile osservare in soluzione aggregati. Sebbene la concentrazione utilizzata nello studio, sia inferiore a quella stimata essere nell'ambiente, la tendenza mostrata negli esperimenti può essere predittiva per il comportamento naturale delle nanoparticelle negli ambienti marini.

Il fenomeno dell'aggregazione e la conseguente sedimentazione però non necessariamente riduce il rischio di ecotossicità, bensì cambia solo il target di organismi.

La tendenza della formazione di aggregati ha notevoli implicazioni per gli esperimenti di ecotossicità, rendendo difficile il raggiungimento di una stabile dispersione (Boxall *et al.*,

2007). In gran parte degli studi, per raggiungere dispersioni stabili, si fa uso di solventi organici. L'uso dei solventi nella preparazione delle sospensioni per esperimenti ecotossicologici è però spesso stato criticizzato perché queste stesse sostanze possono dare tossicità (Johnston *et al.*, 2010).

In questo studio, si è utilizzata la sola sonicazione per rompere gli aggregati, sebbene in alcuni casi è stato evidenziato come questo tipo di pre-trattamento potrebbe aumentare la tossicità rispetto a nanoparticelle non trattate (Zhu *et al.*, 2006, Oberdörster *et al.*, 2006).

nTiO₂ ad una concentrazione inferiore a 1 mg/L può causare tossicità respiratoria e/o disturbi nel metabolismo di alcuni metalli in traccia, come dimostrato per lo Zn ed il Cu, in *Oncorhynchus mykiss* dopo esposizione cronica (14 giorni; Federici *et al.*, 2007).

Heinlaan e colleghi (2008) hanno comparato gli effetti di nano-TiO₂ ottenuti in crostacei e batteri e non hanno riscontrato nessuno effetto tossico a concentrazione di 20g/L. Tuttavia in *Daphnia magna* sono stati riportati tossici acuti (48 h) con LC₅₀ per concentrazioni maggiori di 100 mg/L (Zhu *et al.*, 2010a; Wiench *et al.*, 2009). Dati che suggerirebbero una bassa tossicità acuta in ambiente acquatico. Tuttavia, estendendo i tempi di esposizione a 72 ore e 21 giorni, Zhu e collaboratori (2010a) riportano una drastica diminuzione del valore di LC₅₀ a 2.02 e 2.62 mg/L.

Sulla base di questi studi, l'ecotossicità di nTiO₂ appare dipendere dal tempo di esposizione e dalle specie, più che dalla concentrazione.

Tuttavia, tutti i suddetti test di ecotossicità sono stati condotti in sistemi di acqua dolce, gli effetti acuti e/o cronici di nTiO₂ sugli organismi marini rimangono poco indagati (Klaine *et al.*, 2008; Ward e Kach, 2009). E la mancanza di tali dati può limitare la valutazione completa del rischio ecologico di nTiO₂ rilasciate nell'ambiente acquatico.

In nessuna delle esposizioni a nTiO₂ e trattamenti investigati in *O. vulgaris* è stata osservata mortalità. Allo stesso modo, nTiO₂ ad una concentrazione di 10 mg/L non ha

avuto effetti apprezzabili sugli organismi d'acqua dolce, inclusi i batteri (*V. fischeri*), alghe verdi (*Pseudokirchneriella subcapitata* e *Chydorus sphaericus*), crostacei (*D. magna* e *T. platyurus*) e pesci (*D. rerio*) in test di tossicità acuta (48 o 96 ore) (Heinlaan et al., 2008; Velzeboer et al., 2008; Griffitt et al., 2008; Zhu et al., 2008a, b).

Tuttavia, la ricerca in cui si indagano gli effetti tossici da prodotti chimici convenzionali suggerisce che le risposte biochimiche di esposizione sono spesso più probabili della mortalità acuta (Rodriguez-Ariza et al. 1993).

Indipendentemente dalla via di somministrazione, i risultati ottenuti in questi esperimenti indicano che l'esposizione a nano particolato di TiO₂ induce una risposta fisiologica degli animali.

La relativa semplicità del sistema immunitario degli invertebrati fa di questi organismi dei sistemi viventi potenzialmente sensibili nel monitoraggio dell'inquinamento ambientale. Tra gli invertebrati, i cefalopodi, sono provvisti di un sistema immunitario non-specifico che coinvolge componenti cellulari e umorali. La loro risposta immunitaria si espleta soprattutto attraverso la fagocitosi del materiale estraneo mediata dagli emociti, la produzione di enzimi idrolitici (lisozima e antiproteasi), di intermedi reattivi dell'ossigeno (ROS) e di fattori umorali (opsonine e agglutinine).

Un aumento del numero degli emociti circolanti si è registrato a 4 ore dopo la somministrazione di entrambe le concentrazioni di NP, e tale aumento si è mantenuto anche a 24 ore dopo l'iniezione, per la maggiore dose somministrata.

Si è osservato che nTiO₂ è in grado di aumentare la suscettibilità del polpo stimolando la risposta immunitaria e aumentando i livelli dell'attività lisozimatica dell'emolinfa 4 ore e 24 ore dopo l'iniezione.

Inoltre, la somministrazione di nanoparticolato ha anche indotto un aumento del contenuto di ossido nitrico nell'emolinfa, confermando l'insorgenza di stress ossidativo

nei polpi esposti a nTiO₂. Risultati simili sono stati trovati da Zhu e colleghi (2011) in abalone, con induzione dello stress ossidativo in risposta ad una concentrazione di TiO₂ ≥ 1.0 mg/L. In aggiunta, a differenza degli altri parametri indagati, quella dell'ossido nitrico è la sola risposta che è stata possibile rilevare dopo 4 giorni nei gruppi trattati.

Sebbene inizialmente, nella pianificazione sperimentale si confidasse molto sull'esposizione via iniezione, le risposte biologiche riscontrate non sono troppo chiare, o almeno non sembrano dipendere né dalle concentrazioni somministrate né dal lasso di tempo intercorso tra l'esposizione e il prelievo di emolinfa, probabilmente l'approccio più invasivo, di per sé induce una risposta che potrebbe sommarsi o mascherare quella da nanoparticolato.

L'accumulo di nanoparticelle negli ambienti acquatici richiama l'importante questione del potenziale trasferimento delle nanoparticelle nella catena alimentare e relative conseguenze.

Canesi e collaboratori (2008, 2010a) hanno dimostrato che l'esposizione *in vitro* di emolinfa di *Mytilus galloprovincialis* a differenti tipologie di nanoparticolato (NCB, C60, n-TiO₂, n-SiO₂) stimola parametri immunitari, induce stress ossidativo e rilascio di enzimi idrolitici tra 1 e 10 mg/L e che tali effetti sono mediati dalla rapida attivazione della MAPK che gioca un ruolo chiave sia nella risposta immunitaria che infiammatoria.

Successivamente gli stessi autori (Canesi *et al.*, 2010b) hanno valutato gli effetti a breve termine *in vivo* della stessa tipologia di nanoparticelle a differenti concentrazioni (0.05–0.2–1–5 mg/L) per un minimo di esposizione di 4 ore ad un massimo di 24 ore, dimostrando significativi in funzione della tipologia di NP, della concentrazione e del tessuto. TiO₂ induce destabilizzazione della membrana lisosomiale degli emociti con maggiore danno nella ghiandola digestiva, un significativo aumento della lipofuscina lisosomiale, dei prodotti terminali della perossidazione lipidica con un effetto

drammatico alla concentrazione di 1mg/L ed un aumento dell'attività della catalasi, principale enzima coinvolto nella detossificazione da H₂O₂, e anche del GST, seppure in misura minore.

L'efficienza di cattura del particolato da parte dei bivalvi diminuisce asintoticamente al diminuire della taglia delle particelle. Potrebbe dunque sembrare che i bivalvi non siano a rischio di accumulo di nanoparticelle. Tuttavia, le particelle in ambienti acquatico, e soprattutto in quello marino, in cui la forza ionica è tale da indurre l'aggregazione, raramente esistono come entità singole, ma tendono ad aggregarsi sulla sostanza organica (Delay e Frimmel, 2011). Inoltre, In *Mytilus edulis*, microsfele di polistirene filtrate attraverso le branchie sono state ritrovate nell'intestino e nei tubuli digestivi e successivamente traslocate nell'emolinfa e negli emociti (Browne *et al.*, 2008). Questi dati suggeriscono il trasferimento di NP o aggregati di NP dal sistema digestivo all'emolinfa e agli emociti circolanti.

Sulla base di ciò si è ritenuto potesse essere interessante provare a tenere le cozze in una soluzione di nanoparticelle e successivamente darle in pasto ai polpi allo scopo di fornire informazioni relativi ad un anello della catena alimentare. In questo studio, sebbene non sia stato dimostrato un trasferimento di TiO₂ dalle cozze ai polpi, si è assistito però ad una serie di risposte biologiche alterate.

Il trasferimento trofico è stato riscontrato da *Daphnia magna* a *Danio rerio*. La concentrazione delle nanoTiO₂ non sembra però aumentare da un livello all'altro della catena alimentare all'altro (fattore di biomagnificazione < 1) per la natura non lipofila di nano-TiO₂ (Zhu *et al.*, 2010b).

Sebbene non sia stata determinata la quantità di nTiO₂ trasferita ai polpi alimentati con le cozze esposte a nanoparticelle i risultati ottenuti in mostrano una risposta anomala ai vari livelli di indagine.

Gli animali esposti indirettamente a nanoparticolato di nTiO₂ presentano manifeste alterazioni delle capacità predatorie e dei processi alla base dell'apprendimento non-associativo e del comportamento esplorativo. In letteratura si rinvengono alterazioni nel comportamento di nuoto e alimentare in *D. magna* ad esposizione di fullereni C₆₀ (0.26 mg/L), ma non di TiO₂ (2mg/L). Anche in *Arenicola* sono state riscontrati alterati comportamenti alimentari in associazione a nTiO₂ in funzione della concentrazione ma non dei tempi di esposizione (Galloway *et al.*, 2010). Anche in topo, in seguito alla somministrazione intragastrica di nTiO₂ è stata riscontrata un'alterazione del comportamento del riconoscimento spaziale (Hu *et al.*, 2010).

Il potere computazionale del cervello è generalmente correlato alla sua composizione numerica e cellulare nonché all'architettura del network. Nei vertebrati, per esempio, il numero dei neuroni della corteccia cerebrale è considerato il migliore fattore predittivo delle capacità cognitive tra le specie. Inoltre, variazioni nel numero dei neuroni accompagnano generalmente l'invecchiamento e disordini neurologici.

Se nanoparticelle di TiO₂ possono interferire con il corretto funzionamento del sistema nervoso, possono anche determinarne alterazioni morfologiche? E se sì a che livello? C'è una struttura nervosa che potrebbe risentirne in maniera maggiore e quale?

Fino a pochi anni fa, le metodiche utilizzate per valutare il numero di cellule nervose ne consentivano la determinazione su piccola scala e in strutture ben definite del cervello.

La recente implementazione del frazionatore isotropico (Herculano-Houzel e Lent, 2005), ha reso possibile la rapida e precisa quantificazione cellulare in un gran numero di campioni provenienti da un'ampia gamma di strutture nervose di vertebrati (ad esempio, Herculano-Houzel *et al.*, 2007; Sarko *et al.*, 2009).

L'uso di tale metodica per stimare possibili variazioni nel numero di cellule del cervello di *O. vulgaris* in seguito a somministrazione di nTiO₂ ha messo in evidenza

significativi fenomeni iperplastici, in associazione a ipertrofia di tutte e tre le masse del cervello. Solitamente processi degenerativi o di invecchiamento presuppongono una perdita cellulare. In questo studio si hanno dati relativi al numero totale di cellule costituenti il cervello, non si conoscono le proporzioni tra cellule nervose e non. Non si può escludere quindi che il notevole aumento numerico sia a carico di una tipologia cellulare differente da quella neuronale.

Hu e collaboratori (2010) riscontrano un significativo aumento nella massa del fegato, del rene e della milza, ma una diminuzione della massa del cervello di topo a partire dal decimo giorno di somministrazione di TiO_2 . Gli stessi autori hanno riscontrato inoltre alterazioni morfologiche delle cellule nervose. Un declino della proliferazione cellulare è stato riscontrato anche per cellule staminali neuronali (Liu *et al.*, 2010), ma con un effetto differente nei processi di differenziazione cellulare, con una diminuzione della componente gliare (dall'80 % al 60 %) e un aumento della frazione neuronale (dal 16.4 % al 32.1 %).

In ultimo anche l'analisi dei profili di espressione genica ha denotato un quadro alterato in tutte e tre le strutture nervose costituenti il cervello.

I risultati ottenuti mostrano che l'esposizione a $n\text{TiO}_2$ induce alterazione nell'espressione genica di neurotrasmettitori e trasportatori cellulari. Hu e collaboratori hanno riscontrato un'alterazione dell'omeostasi degli elettroliti, di enzimi e trasmettitori. Questo potrebbe spiegare e ricollegarsi alle alterazioni comportamentali riscontrate in octopus.

Shimizu e colleghi (2009) dimostrano che l'esposizione materna a TiO_2 causa variazione dell'espressione di geni associati allo sviluppo del cervello, alla morte cellulare, e alla risposta di stress ossidativo durante il periodo prenatale e quelli coinvolti nei processi infiammatori e di trasmissione nervosa negli stadi di sviluppo successivi.

L'esposizione a TiO_2 in *O. vulgaris* ha indotto variazioni nei livelli di espressione nel cervello di geni coinvolti nel trasporto molecolare, nei meccanismi di segnali cellulari e di crescita e proliferazione cellulare.

Il lavoro svolto mette in luce il potenziale tossico in concentrazioni sub-croniche del diossido di titanio in forma nanoparticolata, con evidenti alterazioni nella fisiologia, nel comportamento e nell'espressione genica proponendo un insolito organismo marino, quale *O. vulgaris*, aprendo la strada all'utilizzo del polpo in studi eco-tossicologici.

Appendice – Sequenze nucleotidiche dei geni utilizzati

in questo studio e non depositate.

14-3-3 - sequenza parziale (1244 pb)

GATACACTGTAGGCCCGCTATCGTTAAGACAGGAGGAACTATTTTTTTCTGT
CCGGCTGGCCTCCCAGCAATAGTTGAAATTTCTGTAGCAGTTTGTGATTCAC
TCTTTAATCACTCTAAATCGTCGTCTTCTTTCAATCATCAGAAATGTCGGATA
GGGAGCAAATGGTTTACAAGGCCAAATTGGCTGAACAGGCTGAAAGATATG
ACGAAATGGTGGAAAGCATGAAAGAGGTGGCCGACCAGGGGATTGAATTAT
CTGTGGAGGAAAGAAACCTTTTATCAGTTGCATATAAAAATGTGATAGGTGC
TCGTGAGCCTCCTGGAGAATTGTCAGCAGTCTAGAGCAAAAGGAAGAAGC
TAAAGGCAGTGAACAGCGAGTAAATTTGATTAGAGCCTACAGAGAAAAGATT
GAAGGTGAACTTCAAGATATTTGCAATGATGTTTTAGCTGTTTTGGATAAGAA
ACTTTTAACTAATGCTTCAACTGGAGAATCTAGAGTGTTTTATTACAAAATGA
AAGGTGATTACCATCGCTACTTGGCAGAATTTGCCACTGGGGAGGAGAGGA
AGGACGCTGCTGACAATAGTTTACTTGCCTACAAGGCGGCAAGTGAATATG
CCTTAAAGGACCTACCTCCCACCCACCCGATACGATTAGGCTTGGCACTCA
ATTTCTCTGTCTTCTATTATGAGATCTTCAATACACCTGACCGTGCTTGTCGA
TTGGCCAAGTGTGCATTTGATGAAGCAATTGCTGAGCTGGATACGCTGAGT
GAAGAGAGCTACAAAGATTCCACCCTTATAATGCAGCTACTGAGAGACAACC
TACTCTCTGGACATCAGATATGCAGGCTGAAGATTGTGAACATAAAGCTGA
GGGGCAACCAGAAGGTGAGACAGAGGAAGTGTCAAAACAGCAACCCATTT
AGTTGAATCTATTTGCACATGAAACAGAATAATAATAATAATGATAATAATA
AGAATAATAATAATAATAATAATAATAATAATATTGGTCTTCTTGTCACTCTC
TCTGGCCATGACTATTATCATTTTTCTTTGTACATTGTTCTGTATTGATATGT
TATCTGTATAAAAGTGACCAACCAACCATGTCCATTATTTTCATAGCGCTACC
AAAGGCCAGTCATGACCATATTATGAGTGGAAAGAGACATGCATGCTAGTGC
AAGCACACACACACACCCACACCCACATGCATACACCACATACATT

Tabella d' identità

	Accession number	<i>O. vulgaris</i>
<i>D. melanogaster</i>	NP_732311.1	74%
<i>A. mellifera</i>	XP_392479.1	76%
<i>B. mori</i>	NP_001091764.1	74%
<i>D. rerio</i>	NP_997770.1	75%
<i>M. musculus</i>	BAC36106.1	75%
<i>H. sapiens</i>	NP_006752.1	74%

Aldehyde dehydrogenase family member (alh-6) – sequenza parziale (688p b)

AGGATCACCAGAAGAACTTGCTAAATATTACTATGCCAATAGTGATATTATT
AAGAAGGCAATTGATGTCAGCCAGAAAGCCCGTCATGATTGGGCTCGTGTA
CCATTTGAAGAAAAAAGTAAAATCTTTCTAAAAGCTGCTGATCTTATTAGTAA
TGAATACCGAATGGATCTGATGGCATCAACCATGCTGGGGCAGGGTAAAAC
CATCATAACAGGCTGAAATAGACTGTGCTGCTGAATTAGCAGACTTTTACAGG
TTAATGTACAGTTCGGTCTGGAAATGTTCAAGTACCAACCAATCAGTCCAA
GTGATGTTGAATTAACAGAGTGCAATATCGTGGTACTGAGGGCTTTTGGGC
TGCGATAACCCCTTCAACTTCACAGCCATTGGAGCACATTTACCTGTGGCA
CCTGCCATTGTGGGAAACGTTTGTGTTGGAAACCATCAGACACTGCCATGT
TGTCTAACTGGATAGCTTTCCAGATCCTGCGAGAGGCTGGAGTACCACCAG
GTGTTATTAACTTTTTACCTGCTGATGGCCCAGTATTTGGAGATAACAATCACC
TCATCCCCTTATCTGTCTGGTATCAACTTTACTGGAAGTGTGAAGACGTTCA
AACATCTATGGAAGCAAGTTGCTGCCAATTTGGATACCTATCAAAGTTACCC
TCGGCTAATTGG

Tabella d' identità

	<i>Accession number</i>	<i>O. vulgaris</i>
<i>D. melanogaster</i>	<u>AAM11094.1</u>	61%
<i>A. mellifera</i>	<u>XP_623512.2</u>	62%
<i>C. elegans</i>	<u>NP_871951.1</u>	60%
<i>D. rerio</i>	<u>NP_957452.1</u>	75%
<i>M. musculus</i>	<u>AAH60650.1</u>	57%
<i>H. sapiens</i>	<u>AAH07581.1</u>	58%

collagen type xxi alpha 1 – sequenza parziale (1484 pb)

GACAGTTTATATAGTAAGCGTGTAGTCATATCGCCGCCATTCATCCAGTTAT
 CAGACGACCAGAAGTAGCAGACGATAATGTGGCTTACAAACGTCATTTTAAT
 AACTTTGGCTATTTCCACACTTGAAATGCTGCGATATTAAGGACGCGAAC
 TCTGACAACCTGGATGAGCTTTTAATTGAATTAGAACGAAAACGAAGTAACG
 ACGTTATAGAAGATGATGTTCTGGCTAAAAGTTGTGAAGGAAAGCCAGCCGA
 GATCGTGTATATCATCGATGACTCTCGCAGTATTCGTAAGAGCGATTTTCGAG
 AAGCAGATCGCCTTTGTCGTTGATGTCACAAAAACGTTTCCCATCGGTGCTG
 ATAAAGTGAGAGTCGGTGCTGTGACCTTTGGTGATAAAATTATTACAAAAAAT
 ACATTCCCATTGACGAAGTACACTGACGAAAAAAGCCTCTTGGCTGGACTAG
 CTAACATTATATTCAGCCCAGATGACGGTGGAAGCACAGAGACTGCCAAAG
 CTATTTTCATATGCACGTAAAAGTATATTCGTCGATTCCCAGCAGGTGTTGC
 GAAAATTGCCATTATACTCACCGACGGAGAGTCAACCGTAAAATACAAAACA
 CTTGCAGAAGCAAAGTTAGCAAAGAGTCTCGGCATAACTATAATTACGATTG
 GTGTCGGCAGCAAAGTTGATGAAGCGGAACTGATAGATGTCGCGAGTCCCG
 ACAGTTCTTTCACTGTGAACAGCTTTGACGCGTTGCAGCAAATTAAGTGAA
 AGCCTTTTTACGCTGGCAAATGGCGAGTGGGACCCTTTATACTTACCCGGA
 CAATTTCCGAGCTTACAAAATCCTCATTGCCGCAAATACAGCGGTGCAAAC
 GTGACAGTTGCATCATCTCCGCCGGCTTTCCAGTTTGGAGAACTAATAAAT
 CCAATGTGTTTCTGGAGAAATCCCTCTTGGAAAAGTCCCTGCTTTTGAATC
 CTCAACAGGAGAATGCTATTTTGAAGTAATGCAATTGCTCATCTTGTGGGA
 TCTGCTCAGTTAAGAGGTGCTTCTGTTGAAGATGCTACTCGTATCCTTCAGT
 GGATCAACTTTGCTGATAATGAGATCTTGCCTGCATCTTGCACATGGGTATA
 TCCATGTCTTGGCATTATTCAGTTCAACAAGCAGGAGACTGAAAAGGCCAAG
 GAACAAATCAAGAAAGTATTGGCTGTTCTCAACCAGCATCTACAAACACGTA
 CATTCTTAGTAGGTGAAAGAATCAGTCAAGCTGATATTACCGTATGTTGCAAT
 ATGTTGCAGCTCTACAAGTTGGTTCTAGACCCTGAATTCGTANAAATTACAT
 AAATGTCAATAGGTGGTTTACTACCATGATCAACCAGCCTCAAGTGAAATCT
 GTTATTGGGACTTTAACTCTCTGTACTAAGATGGCACAATTTGATGGTAAGAA
 GTATGCAGAAATCCACGGTCAGGG

Tabella d' identità

	Accession number	<i>O. vulgaris</i>
<i>L. stagnalis</i>	BAD16597.1	36%
<i>H. magnipapillata</i>	XP_002170770.1	30%
<i>D. rerio</i>	XP_002664126.2	33%
<i>R. norvegicus</i>	XP_001060689.2	35%
<i>M. musculus</i>	NP_081039.2	36%
<i>H. sapiens</i>	EAX04448.1	35%

Elongation factor 1 gamma – sequenza parziale (702 pb)

GCCTTTTTACGCTGGCAAATGGCGAGTGGGACCCTTTATACTTACCCGGACA
 ATTTCCGAGCTTACAAAATCCTCATTGCCGCAAATACAGCGGTGCAAACGT
 GACAGTTGCATCATCTCCGCCGGCTTTCCAGTTTGGAGAACTAATAAATCCA
 ATGTGTTTCTGGAGAAATCCCTCTTGGAAAAGTCCCTGCTTTTGAATCCTCA
 ACAGGAGAATGCTATTTTGAAGTAATGCAATTGCTCATCTTGTGGGATCTGC
 TCAGTTAAGAGGTGCTTCTGTTGAAGATGCTACTCGTATCCTTCAGTGGATCA
 ACTTTGCTGATAATGAGATCTTGCCTGCATCTTGCACATGGGTATATCCATGT
 CTTGGCATTATTCAGTTCAACAAGCAGGAGACTGAAAAGGCCAAGGAACAAA
 TCAAGAAAGTATTGGCTGTTCTCAACCAGCATCTACAAACACGTACATTCTTA
 GTAGGTGAAAGAATCAGTCAAGCTGATATTACCGTATGTTGCAATATGTTGCA
 GCTCTACAAGTTGGTTCTAGACCCTGAATTCCGTANAAATTACATAAATGTCA
 ATAGGTGGTTTACTACCATGATCAACCAGCCTCAAGTGAAATCTGTTATTGGG
 ACTTAACTCTCTGTACTAAGATGGCACAATTTGATGGTAAGAAGTATGCAGA
 AATCCACGGTCAGGG

Tabella d' identità

	Accession number	<i>O. vulgaris</i>
<i>S. purpuratus</i>	NP_001020382.1	61%
<i>D. rerio</i>	AAH66518.1	62%
<i>R. norvegicus</i>	NP_001004223.1	59%
<i>M. musculus</i>	BAB27948.1	59%

heat shock 70 kda protein – sequenza parziale (675 pb)

GGAGGACTTTGATAATACACTCATGAAATTCTTATGTACAGAATTCCTCAAAG
ACCAAGGAGTAGATGTGTCCAAAGACATCATGGCATTGCAACGACTTCGGG
AAGCATCAGAAAAGGCCAAGATTGAACTGAGTTCCTCCCTGCAGACTGAAAT
TAACCTTCCATATCTTACCATGGATTCTTCTGGTCCAAAACACATGAATTTGA
AATTATCACGAGCTAAATTCGAATCCCTTGTGGAAAGCTTGGTGAAAAGAAC
CATGGCTCCATGTCAGAAGGCTCTTCAAGATGCAGAAATAAAGAAATCTGAC
ATCGGTGATGTTATTCTAGTTGGCGGAATGACCCGTATGCCAAAAGTTCAAG
AAGTTGTCAAAGATCTGTTTGGTAAAAGTCCTAGTAAATCTGTGAACCCTGA
CGAAGCTGTTGCTATTGGAGCTGCCATTCAGGGTGGTGTGTTGGCAGGAGA
TGCACTGATGTTCTGTTATTGGATGTCACACCTCTTCTCTCGGCATTGAAA
CTCTTGGCGGTGTATTTACCAAACATCAACAGGAATACAACCATTCCAAC
AAAGAAGAGCCAGGTATTTTCTACTGCTGCTGATGGTCAAACCTCAAGTCGAA
ATNCAAGTCCACCAAGGTGAACGTGAAATGGCGAGAGACACAAAATTCTT

Tabella d' identità

	<i>Accession number</i>	<i>O. vulgaris</i>
<i>A. mellifera</i>	<u>NP_958483.2</u>	79%
<i>D. rerio</i>	<u>NP_958483.2</u>	79%
<i>R. norvegicus</i>	<u>NP_001094128.1</u>	78%
<i>M. musculus</i>	<u>NP_034611.2</u>	79%
<i>H. sapiens</i>	<u>NP_001153520.1</u>	79%

kinesin family member 3A - sequenza parziale (692 pb)

GAGCAGACAGGAAAGTAAAGCCACTTGATTGTGACGTCAGGACGCGCCAGC
 TTATCTGACATTTAGTGACACTGCATAATAGCAGAGGAAGGGCTACTTACGC
 CGTACAAAAGATGGTATCCGAGCAGTCATTTTATACGGTACCGCCGATATTT
 CTAATTTTACACTGACTGCACTTCAGTTGGAGTACCAGAAGCATCAGCAGC
 TTGTAAGTCTCGTTTTTAATCTGCTCAATTCATCGTGTTGATTTTTATCAACA
 CCTACATATTTTACTGTGAAACATAAATAGCGACCGTCTTTTCGTTACTTACAG
 GTTTATTTAGTATTGAAGGAAACAACAAGAAAATGCCTGAAAACAAGAATAC
 CAGCAGTTCATACCAAAGTCTCTTCAGTAACAACAAGTTGTACAACCAATT
 CCAGTCCTATAATAACCAGCAACAGCTCTGCCTCGGCTACTACAAGTAATCA
 TAGTTCTACTTCGCGTAGCAGCAGTAGCAACAACAGCAAAGACTCTGATAAT
 GTGCGAGTGGCCGTTTCGTTGTCGTCCGCTCAATGAGAAAGAACTGTGCGATT
 TCATGTCGTAATCTAGTGACTGTCGATGTCCTGCGGGGTACAGTGTCAGTG
 GAAAACCCCTCGGCAAGCCAAGAGGAACCCATAAAAATGTTTACTTTTCGACA
 CAGTTTTTTGGACCT

Tabella d' identità

	<i>Accession number</i>	<i>O. vulgaris</i>
<i>O. tankahkei</i>	<u>ADM26620.1</u>	99%
<i>H. magnipapillata</i>	<u>XP_002169489.1</u>	30%
<i>D. rerio</i>	<u>AAH92848.1</u>	61%
<i>R. norvegicus</i>	<u>NP_445829.1</u>	60%
<i>M. musculus</i>	<u>CAP19150.1</u>	60%
<i>B. impatiens</i>	<u>XP_003490795.1</u>	57%

pleckstrin homology domain protein - sequenza parziale (655 pb)

GGCTATGGTCTGTAAAGTATCGCTCGAATGGCCTGTGTTTTCCCTTGCTGTT
 GCGGGCGTTATGTTTACAGAGAACATGTGAACAGCGCTATGAACGGCATGC
 CTGAAGCCGATCCACTTACTTTTAAGCCACCAGACTGGAAAAATTATGTCCA
 AACTTTGGATGCCTTTACAAAAGGCCCGTAGGGCACCAGTCGACCAAGTG
 GTCGAAAAGATTTTTTATCCTAAAAGATGGTTACTTGCTATATTATCCAGAGA
 ATGAAAAGAAAGAGATTGATAAGCGACAACACCTAACATACATCCAAAGGG
 TATCGTCCCCTTAGGTGACTGTCAGGTGAATGCCACTCAAGATCCATCGCAT
 CAATTTGCTTTCATTGTCAGCAGTGCACAAATAAATGGTCGTATTATTTTAGC
 AGCCGAAAATGAATTTGAACGAAACCGATGGGTGCAAATGCTTAGAAAATCA
 AGCCAGGTTACATGGAAATGTTTACAGTTGGGCAACCTAATGATTAACAAT
 TAGAAACACAAGGCCAACAAATGGCTCATGATAAACAGACCTATTATGATCG
 GCTACAAAATGAAGTGATTGCATTGTGCGATACTAAACAAAGGGCAGATGAA
 CTGGAACGGTTTAATGAAGA ACTTGCTAAAG

Tabella d' identità

	Accession number	<i>O. vulgaris</i>
<i>A. mellifera</i>	<u>XP_395804.2</u>	30%
<i>D. rerio</i>	<u>XP_003200432.1</u>	45%
<i>R. norvegicus</i>	<u>NP_001121038.1</u>	48%
<i>M. musculus</i>	<u>EDL02678.1</u>	48%
<i>H. sapiens</i>	<u>EAW80998.1</u>	49%
<i>C. elegans</i>	<u>NP_508029.1</u>	34%
<i>C. quinquefasciatus</i>	<u>XP_001843084.1</u>	27%

solute carrier family 6 (neurotransmitter glycine) member 5 – sequenza parziale (786 pb)

TGGAAAATCTCATGGCGTTTCATTACTCCTACTATTACCCTGTTAGTGTGGCT
G TTCAGTATTAGCAAATTGAGCCCAGTAACATATGGAGACTATACATACCCA
ACATGGTCAGTTGTCCTTGGCTGGATTCTTGGAAATGGTATCACTGGTTCCTC
TACCTGCTGTGATGATTTCCCAAATATTCAAGACAAAGGGAACCTTTATTGA
GCGCGTAAAGAACTGATACACCCAGATCCAAAATGGGGACCATCTCTCCC
TCAGTACCGAGAACAATACATTGCATCTCTGAGTTTCAGTGAGAGACAACGA
ATGCTCCGTCACATCATGGAAAACGAGAAAGATGGACCTCATAACATGTCAG
TAATTGGAGAGCATGCAAAAATGTTGCAGCTGCAATTGGATTCTGTATGCTG
ATGAAAGAAAGAAACAGATGCACACAATCAAGCAAAAATCCAAATTTAAAAT
GTTAAGAAAATATCAAATACATTTATCTATATTTGTATATATGTGGATAAATAT
ATGAATGTAGAAGCAACACCTCAAGAATGATATCTAAACATCTTTAAATATAT
TTTAAACAAATTATATGTAACCAGTACAAGTTGGGTTCTTGCCTGCATCGTG
TGGTTACAAAGTACAGAAATCACAATGATCTCCTTGTCTGATCTGAGTTGC
CAGTACACAAAACAAAACAAGGATTTGGTCTAGATTTTTTCTGTATTTCTTC
TCCCAGCACAACTGAACTGCCTCATCCAGAATCAGTCAGTCAGCTGAGTG
AA

	Accession number	<i>O. vulgaris</i>
<i>D. rerio</i>	NP_001009557.1	39%
<i>R. norvegicus</i>	AAS49497.1	43%
<i>M. musculus</i>	NP_683733.2	43%
<i>H. sapiens</i>	NP_004202.2	43%

solute carrier family member 15 –sequenza parziale (709 pb)

AGTTACAAAGACGTTCAACAATGGCATTATTCCAGTGTACATCTGGTATTTCA
CTGCTTTGTGCAGTCCTGGTTACCAACTTTGGAGGAGAAAAGAAAGTATATT
CCATTATCAACACAGTGTTTAGTATGATGGGCATGTTTGGAATTAGTGCCTC
AAATTGTATTATGTGGTTATACACACCAGAAGTATATCCTACTAACCTAAGAA
ACATCGGTTTGGGAATTCTCGCGTTATGTGACAGTGTGGAAATATGGTTTC
ACCATATTTCCGTATTTTGATGCTCTACGCTCCTTGGTTACCTGGAACAATAT
TCGCTGTTGGATCTCTTACCAGCGTTTGTCTCTTGAACCTTTATGCCAGAACT
CAACGTTTACAGATGCCAAGTACAATGGACGATGTTCGAAAACAACCTAAAAG
CCCAGAAGCAGAAAAATAAAAACCCATCAAGCGAGGAAAATTCCCCAAATGA
AACCTTACTCAAGCATGATTCGAAAACAGTTATTAATATTTAAATTTAAGGT
GGGGGTGGGAATGCAAGGATGTCAAGTTTCTGTATGTCAAGTTTTTCGGGAC
ATTTGTAAGGAAAGCGATATTGATGTGGTCCTACAGCTGTTTCTGGGATATT
GTGGATGTCCCTTTGTCGGGGACAGTGTGAGATGGTTGAATAGAAAGTAAT
ATCGCATACGTCTATTTATAGAGGCTTGAC

Tabella d' identità

	Accession number	<i>O. vulgaris</i>
<i>A. mellifera</i>	<u>XP_393361.4</u>	34%
<i>R. norvegicus</i>	<u>NP_001101177.1</u>	34%
<i>M. musculus</i>	<u>NP_001034460.2</u>	34%
<i>H. sapiens</i>	<u>AAH26358.1</u>	34%
<i>A. aegypti</i>	<u>XP_001649205.1</u>	27%
<i>C. quinquefasciatus</i>	<u>XP_001864626.1</u>	28%

transcription initiation factor small – sequenza parziale (724 pb)

GGTTTAGTCCTTTTTGTGGACATTGTTTCTTTGAGTAATTCTATTGAAAACTA
TATTGAAAGTGTGTTTATTTTAAAAAGAATTCTTTACATCCAGCATTGTTCTGG
ATATAAGTGTGTTGTAGATACATACATATCAACTAGTTATGAGTGAAATTGGAC
ATGAAACCAAAGAGGTCGATTTAACGGCTGCTGGCCGAGGTGTATGGTTAG
TTAAAGTTCCCAAGTATTTGTCGGAGAAATGGAGGAAGGCTCCCTGTAGTTG
TGAGGTGGGAAAACCTGAAGATCACTAGATCAGGATGTTGAATTAGGTACCAC
TGACAAACTTGCAATCGAGGGCAAAGTGATCCAACGTGCAGAATGTGCGACC
TGTGGCCAATGACACATACATGAACTGAAACGTTTACAGCTTGTCTCAAAG
ATAAACCAGCACGTCAAGTGAAACAGCTGGATATGGTGGTTAACTATA
GACCAGTAACAGAGCACTCCTTCATGAAAGAACATGAGCAACGAAAGAAAG
TTGAAGGCAAGAATATCCGTAAGGAGAAGAATGAAGTTACCGATATGCTGTT
CAATGCATTTGAGCAGCACCAGTACTACAATGTCAAAGACTTGGTCCGTATT
ACCAAACAGCCCATTATTTACTTGAANGAAATTCTGAAAGAGATTTGTACATA
CAACATGAAAGCCCCACACAAAACATGTGGGAACTGAAGCCCGA

Tabella d' identità

	Accession number	<i>O. vulgaris</i>
<i>A. mellifera</i>	<u>XP_623868.1</u>	63%
<i>I. scapularis</i>	<u>XP_002414741.1</u>	59%
<i>R. norvegicus</i>	<u>NP_112304.2</u>	60%
<i>M. musculus</i>	<u>NP_081092.1</u>	60%
<i>H. sapiens</i>	<u>NP_004119.1</u>	59%
<i>D. rerio</i>	<u>NP_001096603.1</u>	60%
<i>C. quinquefasciatus</i>	<u>XP_001868006.1</u>	70%

Bibliografia

- Afaq F.; Abidi P.; Matin R.; Rahman Q., 1998. Cytotoxicity prooxidant effects and antioxidant depletion in rat lung alveolar macrophages exposed to ultrafine titanium dioxide. *J. Appl. Toxicol.* **18**: 307-312.
- Amaratunga, T., 1983. The role of cephalopods in the marine ecosystem. In: Caddy, I.F., (Ed.), *Advances in Assessment of World Cephalopods Resources*. FAO Fish. Tech. Pap., pp. 379-415.
- Apte S.C., Rogers N.J., Batley G.E., 2009. Ecotoxicology of manufactured nanoparticles. In: Lead J.R., (Ed.), *Environmental and human health impacts of nanotechnology*, pp. 267-305.
- Armelaio L., Barreca D., Bottaro G., Gasparotto A., Maccato C., Maragno C., 2007. Photocatalytic and antibacterial activity of TiO₂ and Au/TiO₂ nanosystems. *Nanotechnology* **18**: 37.
- Baalousha M., Lead. R., 2009. Overview of nanoscience in the environment. In: Lead J.R., (Ed.), *Environmental and human health impacts of nanotechnology*, pp. 1-29.
- Balasubramanian S.K., Jittiwat J., Manikandan J., Choon-Nam O., Yu L.E., Ong W-Y., 2010. Biodistribution of gold nanoparticles and gene expression changes in the liver and spleen after intravenous administration in rats. *Biomaterials* **31**: 2034–2042.
- Baun A., Sorensen S.N., Rasmussen R.F., Hartmann N.B., Koch, C.B., 2008. Toxicity and bioaccumulation of xenobiotic organic compounds in the presence of aqueous suspensions of aggregates of nano-C(60). *Aquat Toxicol*, **86**: 379-87.

- Bawarski W.E., Chidlowsky E., Bharali D.J., Mousa S.A. 2008. Emerging nanopharmaceuticals. *Nanomedicine* **4**: 273-282.
- Bihari P., Vippola M., Schultes S., Praetner M., Khandoga A.G., Reichel C.A., Coester, C., Tuomi, T., Rehberg, M., Krombach F., 2008. Optimized dispersion of nanoparticles for biological in vitro and in vivo studies. *Particle and Fibre Toxicology* **5**: 14.
- Blaise C., Gagné F., Férard J.F., Eullaffroy P., 2008. Ecotoxicity of selected nanomaterials to aquatic organisms. *Environ. Toxicol.* **223**: 591–598.
- Boxall A., Tiede K., Chaudhry, Q., 2007. Engineered nanomaterials in soils and water: how do they behave and could they pose a risk to human health. *Nanomedicine* **2**: 919-927.
- Brant, J., Lecoantet, H. & Wiesner, M. R., 2005. Aggregation and deposition characteristics of fullerene nanoparticles in aqueous systems. *Journal of Nanoparticle Research*, 7, 545-553.
- Browne, M.A., Dissanayake, A., Galloway, T.S., Lowe, D.M., Thompson, R.C., 2008.
- Canesi L., Ciacci C., Betti M., Fabbri R., Canonico B., Fantinati A., Marcomini A., Pojana G., 2008. Immunotoxicity of carbon black nanoparticles to blue mussel hemocytes. *Environ. Int.* **34**: 1114–1119.
- Canesi L., Fabbri R., Gallo G., Vallotto D., Marcomini A., Pojana G., 2010a. Biomarkers in *Mytilus galloprovincialis* exposed to suspensions of selected nanoparticles (Nano carbon black, C60 fullerene, Nano-TiO2, Nano-SiO2). *Aquatic Toxicology* **100**: 168-177.

- Canesi L., Ciacci C., Vallotto D., Gallo G., Marcomini A., Pojana G., 2010b. In vitro effects of suspensions of selected nanoparticles (C60 fullerene, TiO₂, SiO₂) on *Mytilus* hemocytes. *Aquat. Toxicol.* **96**: 151–158.
- Cattaneo, A.G., Gornati, R., Chiriva-Internati, M., Bernardini, G., 2009. Ecotoxicology of nanomaterials: the role of invertebrate testing. *Invertebrate Survival Journal*; **6**: 78-97.
- Cherchi C., Chernenko T., Diem M., Gu A. Z., 2011. Impact of nano titanium dioxide exposure on cellular structure of *Anaebaena variabilis* and evidence of internalization. *Environ Toxicol Chem.* **30**: 861-869.
- Crane M., Handy R.D., Garrod J., Owen R., 2008. Ecotoxicity test methods and environmental hazard assessment for engineered nanoparticles. *Ecotoxicology* **17**: 421–437.
- Delay M., Frimmel F.H., 2011. Nanoparticles in aquatic systems. *Anal Bioanal Chem.* DOI 10.1007/s00216-011-5443-z.
- Domingos, R. F., Tufenkji, N. & Wilkinson, K. J., 2009. Aggregation of Titanium Dioxide Nanoparticles: Role of a Fulvic Acid. *Environmental Science & Technology* **43**: 1282-1286.
- Donaldson K., Stone V., 2003. Current hypotheses on the mechanisms of toxicity of ultrafine particles. *Ann Ist Super Sanita* **39**: 405-410.
- Dunford R., Salinaro A., Cai L., Serpone N., Horikoshi S., Hidaka H., Knowland J., 1995. Chemical oxidation and DNA damage catalyzed by inorganic sunscreen ingredients. *Toxicol Lett* **80**: 61-67.

- Engstad R.E., Robertsen B., Frivold E., 1992. Yeast glucan induces increase in lysozyme and complement-mediated haemolytic activity in Atlantic salmon blood. *Fish and Shellfish Immunology* **2**: 287-297.
- Federici G., Shaw B.J., Handy R.D., 2007. Toxicity of titanium dioxide nanoparticles to rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): Gill injury, oxidative stress, and other physiological effects. *Aquatic Toxicology* **84**: 415-430.
- Fiorito G., & Scotto P., 1992. Observational learning in *Octopus vulgaris*. *Science* **256**: 545-547.
- Ford L.A., 1992. Host defense mechanisms of cephalopods. *Annu. Rev. Fish* **2**: 25-41.
- Freestone I., Meeks N., Sax M., Higgitt C. 2007. The lycurgus cup; A Roman Nanotechnology. *Gold Bulletin* **40**: 270-277.
- Gagné, F., Auclair, J., Turcotte, P., Fournier, M., Gagnon, C., Sauve, S. & Blaise, C., 2008. Ecotoxicity of CdTe quantum dots to freshwater mussels: Impacts on immune system, oxidative stress and genotoxicity. *Aquatic Toxicology* **86**: 333-340.
- Galloway T.S., Depledge M.H., 2001. Immunotoxicity in invertebrates: measurement and ecotoxicological relevance. *Ecotoxicology* **10**: 5-23.
- Galloway, T., Lewis, C., Dolciotti, I., Johnston, B. D., Moger, J. & Regoli, F., 2010. Sublethal toxicity of nano-titanium dioxide and carbon nanotubes in a sediment dwelling marine polychaete. *Environmental Pollution* **158**: 1748-1755.
- Ghosh M., Bandyopadhyay M., Mukherjee A., 2010. Genotoxicity of titanium dioxide TiO₂ nanoparticles at two trophic levels: Plant and human lymphocytes. *Chemosphere* **81**: 1253-1262.

- Griffitt R.J., Hyndman K., Denslow N.D., Barber D.S., 2009. Comparison of Molecular and Histological Changes in Zebrafish Gills Exposed to Metallic Nanoparticles *Toxicological Sciences* **107 (2)**: 404–415.
- Griffitt, R. J., Luo J., Gao J., Bonzango J.-C., and Barber D.S., 2008. Effects of particle composition and species on toxicity of metallic
- Gumbleton M., 2001. Caveolae as potential macromolecule trafficking compartments within alveolar epithelium. *Adv. Drug Deliver. Rev.* **49**: 281–300.
- Gurr, J. R., Wang, A. S., Chen, C. H. & Jan, K. Y., 2005. Ultrafine titanium dioxide particles in the absence of photoactivation can induce oxidative damage to human bronchial epithelial cells. *Toxicology* **213**: 66-73.
- Gwinn M. R., Vallyathan V., 2006. Nanoparticles: Health Effects-Pros and Cons. *Environ Health Perspect*; 114(12):1818-1825.
- Hall S., Bradley T., Moore J.T., Kuykindall T., Minella L., 2009. Acute and chronic toxicity of nano-scale TiO₂ particles to freshwater fish, cladocerans and green algae, and effects of organic and inorganic substrate on TiO₂ toxicity. *Nanotoxicology* **3**: 91-97.
- Handy R.D., Henry T.B., Scown T.M., Johnston B.D., Tyler C.R., 2008. Manufactured nanoparticles: their uptake and effects on fish—a mechanistic analysis. *Ecotoxicology* **17**: 421–437.
- Hanlon R.T., Messenger, J.B. 1996. *Cephalopod Behaviour*. Cambridge University Press.
- Heinlaan, M., Ivask, A., Blinova, I., Dubourguier, H. C. & Kahru, A., 2008. Toxicity of nanosized and bulk ZnO, CuO and TiO₂ to bacteria *Vibrio fischeri* and crustaceans *Daphnia magna* and *Thamnocephalus platyurus*. *Chemosphere*, **71**: 1308-1316.

- Herculano-Houzel S., Collins C.S., Wong P., Kaas J.H., 2007. Cellular scaling rules for primate brains. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **104**: 3562–3567
- Herculano-Houzel S., Lent R., 2005. Isotropic Fractionator: A Simple, Rapid Method for the Quantification of Total Cell and Neuron Numbers in the Brain. *The Journal of Neuroscience* **25(10)**: 2518 –2521.
- Hoffmann, R., Lommel, R., 1984. Effects of repeated blood sampling on some blood parameters in freshwater fish. *Journal of Fish Biology*; **24 (3)**: 245–251.
- Hu R., Gong X., Duan Y., Li N., Che Y., Cui Y., Zhou M., Liu C., Wang H., Hong F., 2010. Neurotoxicological effects and the impairment of spatial recognition memory in mice caused by exposure to TiO₂ nanoparticles. *Biomaterials*; **31**: 8043-8050.
- Hutchinson T.H., Manning M.J. 1996. Seasonal trends in serum lysozyme activity and total protein concentration in dab (*Limanda limanda* L.) sampled from Lyme Bay, U.K. *Fish and Shellfish Immunol.* **6**: 473-482.
- Isakovic A., Markovic Z., Todorovic-Markovic B., Nikolic N., Vranjes-Djuric S., Mirkovic M., Dramicanin M., Harhaji L., Raicevic N., Nikolic Z., Trajkovic V., 2006. Distinct cytotoxic mechanisms of pristine versus hydroxylated fullerene. *Toxicol. Sci.* **91**: 173–183.
- Jiang K.J., Kitamura T., Yin H., Ito S., Yanagida S., 2002. Dye-sensitized solar cells using brookite nanoparticle TiO₂ films as electrodes. *Chemistry Letters* **31**: 872-874.
- Jiang W., Mashayekhi H., Xing B. S., 2009. Bacterial toxicity comparison between nano- and micro-scaled oxide particles. *Environmental Pollution* **157**: 1619-1625.

- Jiang, J. K., Oberdorster, G. & Biswas, P., 2009. Characterization of size, surface charge, and agglomeration state of nanoparticle dispersions for toxicological studies. *Journal of Nanoparticle Research*, **11**: 77-89.
- Johnston, B. D., Scown, T. M., Moger, J., Cumberland, S. A., Baalousha, M., Linge, K., Van Aerle, R., Jarvis, K., Lead, J. R. & Tyler, C. R., 2010. Bioavailability of Nanoscale Metal Oxides TiO₂, CeO₂, and ZnO to Fish. *Environmental Science & Technology*, **44**: 1144-1151.
- Jovanovic'an B., Anastasova L., Rowe EW, Zhang Y., Clapp AR., Palic' D., 2011. Effects of nanosized titanium dioxide on innate immune system of fathead minnow (*Pimephales promelas* Rafinesque, 1820). *Ecotoxicol Environ Saf.*; **74(4)**:675-683.
- Kaegi R., Ulrich A., Sinnet B., Vonbank R., Wichser A., Zuleeg S., Simmler H., Brunner S., Vonmont H., Burkhardt M., Boller M., 2008. Synthetic TiO₂ nanoparticle emission from exterior facades into the aquatic environment. *Environmental Pollution* **156**: 233-239.
- Kahru A., Dubourguier H.C., 2010. From ecotoxicology to nanoecotoxicology. *From ecotoxicology to nanoecotoxicology* **269**: 105-119.
- Kashiwada, S., 2006. Distribution of nanoparticles in the see-through medaka (*Oryzias latipes*). *Environ. Health Perspect.*; **114**: 1697-1702.
- Klaine S.J., Alvarez P.J.J., Batley G.E., Fernandes T.F., Handy R.D., Lyon D.Y., Mahendra S., McLaughlin M.J., Lead J.R., 2008. Nanomaterials in the environment: behavior, fate, bioavailability, and effects. *Environmental Toxicology and Chemistry* **27**: 1825-1851.

- Kuba, M., Byrne, R. A., Meisel, D. V., & Mather, J. A., 2006. When do octopuses play? The effect of repeated testing, age and food deprivation on object play in *Octopus vulgaris*. *Journal of Comparative Psychology* **120**: 184-190.
- Levine K.E., Fernando R.A., Lang, M., Essader A., Wong B.A., 2003. Development and validation of a high-throughput method for the determination of titanium dioxide in rodent lung and lung-associated lymph node tissues. *Anal. Lett.* **36**: 563-576.
- Li J.G., Li Q.N., Xu G.Y., Li J., Cai X.Q., Liu R.L., 2007. Comparative study on the acute pulmonary toxicity induced by 3 and 20 nm TiO₂ primary particles in mice. *Environmental Toxicity and Pharmacology* **24**: 239–244.
- Lie O., Evensen O., Sorensen A., Froysadal L., 1989. Study on lysozyme activity in some fish species. *Dis. aquat. Org.* **6**: 1-5
- Lin D.H., Xing B.S., 2007. Phytotoxicity of nanoparticles: inhibition on seed germination and root growth. *Environmental Pollution* **150**: 243-250.
- Lin D.H., Xing B.S., 2008. Root uptake and phytotoxicity of ZnO nanoparticles. *Environmental Science & Technology* **42**: 5580–5585.
- Lin W., Huang Y.W., Zhou, X.D., Ma Y., 2006. In vitro toxicity of silica nanoparticles in human lung cancer cells. *Toxicol. Appl. Pharmacol* **217**: 252–259.
- Liu X., Ren X., Deng X., Huo Y., Xie J., Huang H., Jiao Z., Wu M., Liu Y., Wen T., 2010. A protein interaction network for the analysis of the neuronal differentiation of neural stem cells in response to titanium dioxide nanoparticles. *Biomaterials*; **31(11)**: 3063-70.
- Livak K.J., Schmittgen T.D., 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{-ΔΔC(T)} *Methods*; **25**:402-408).

- Long T.C., Tajuba J., Sama P., Saleh N., Swartz C., Parker J., Hester S., Lowry G.V., Veronesi B., 2007. Nanosize titanium dioxide stimulates reactive oxygen species in brain microglia and damages neurons in vitro. *Environ Health Perspect*, **115**: 1631-7.
- Lorenzon S., Francese M., Smith V.J., Ferrero E.A., 2001. Heavy metals affect the circulating haemocyte number in the shrimp *Palaemon elegans*. *Fish & Shellfish Immunology* **11**: 459–472.
- Lovern S.B., Klaper R., 2006. *Daphnia magna* mortality when exposed to titanium dioxide and fullerene (C60) nanoparticles. *Environ. Toxicol. Chem.* **25**: 1132–1137.
- Lovern, S.B., Strickler, J.R., Klaper, R., 2007. Behavioral and physiological changes in *Daphnia magna* when exposed to nanoparticle suspensions (titanium dioxide, nano-C60, and C60HxC70Hx). *Environ. Sci. Technol.* **41**: 4465–4470.
- Lu S., Duffin R., Poland C., Daly P., Murphy F., Drost E., MacNee W., Stone V., Donaldson K., 2009. Efficacy of simple short-term in vitro assays for predicting the potential of metal oxide nanoparticles to cause pulmonary inflammation. *Environ. Health Perspect* **117**: 241–247.
- Lyon, D.Y., Fortner, J.D., Sayes, C.M., Colvin, V.L., Hughes, J.B., 2005. Bacterial cell association and antimicrobial activity of a C60 water suspension. *Environ. Toxicol. Chem.* **24**: 2757-2762.
- Ma L., Liu J., Li N., Wang J., Duan Y., Yan J., Liu H., Wang H., Hong F., 2010. Oxidative stress in the brain of mice caused by translocated nanoparticulate TiO₂ delivered to the abdominal cavity. *Biomaterials* **31**: 99–105

- Malham S.K., Coulson C.L., Runham N.W., 1998. Effects of repeated sampling on the haemocytes and haemolymph of *Eledone cirrhosa* (Lam.). *Comp. Biochem. Physiol.* **121A**: 431–440.
- Malham S.K., Lacoste A., Cueff A., Jalabert F., Gélébart F., Poulet S.A., 2002. A first insight into stress-induced neuroendocrine and immune changes in the octopus *Eledone cirrhosa*. *Aquat. Living Resour.* **15**: 187–192.
- Malham S.K., Runham N. W., Secombes C.J., 1995. *Eledone cirrhosa* haemocytes: isolation and culture. In: Stolen J.S., Fletcher T.C., Smith S.A., Zelikoff J.T., Kaattori S.L., Anderson R.S., Soderhall K, Weeks-Perkins BA, editors (Ed.), *Techniques in fish immunology*. Fair Haven, NJ: SOS Publications, F.I.T.C. 4, pp. 233-240.
- Mather J. A., & Anderson R. C., 1993. Personalities of octopuses (*Octopus rubescens*). *Journal of Comparative Psychology*, **107**: 336–340.
- Menard A., Drobne D., Jemec A., 2011. Ecotoxicity of nanosized TiO₂. Review of in vivo data. *Environmental Pollution* **159**: 677-684.
- Messenger J.B., Nixon M., Ryan K.P., 1985. Magnesium chloride as an anaesthetic for cephalopods. *Comp. Biochem. Physiol. C, Comp. Pharmacol.* **82**: 203–205.
- Moore M.N., 2006. Do nanoparticles present ecotoxicological risks for the health of the aquatic environment? *Environ. Int.* **32**: 967–976.
- Mueller N.C., Nowack B., 2008. Exposure modeling of engineered nanoparticles in the environment. *Environmental Science and Technology* **42**: 4447-4453.

- Navarro,E., Baun A., Behra R., Hartmann N.B., Filser J., Miao A.J., Quigg E.A., Santschi, P.H., Sigg L., 2008. Environmental behavior and ecotoxicity of engineered nanoparticles to algae, plants, and fungi. *Ecotoxicology* **17**: 372-386.
- Nel A., Xia T., Madler L., Li N. 2006. Toxic potential of materials at the nanolevel. *Science* **311**: 622-627.
- Nixon M. and Young J.Z. 2003. *The Brains and Lives of Cephalopods*. Oxford University Press, Oxford.
- Oberdörster G., 2000. Toxicology of ultrafine particles: in vivo studies. *Philos. Trans. Royal Soc. Lond.* **358**: 2719–2740.
- Oberdörster G., Oberdörster E., Oberdörster J., 2005. Nanotoxicology: an emerging discipline evolving from studies of ultrafine particles. *Environ. Health Perspect.* **113**: 823–839.
- Oberdörster, E., Zhu, S. Q., Blickley, T. M., McClellan-Green, P. & Haasch, M. L., 2006. Ecotoxicology of carbon-based engineered nanoparticles: Effects of fullerene (C-60) on aquatic organisms. *Carbon*, 44, 1112-1120.
- Oberdörster G, Sharp Z, Atudorei V, Elder A, Gelein R, Kreyling W, Cox C., 2004. Translocation of inhaled ultrafine particles to the brain. *Inhal Toxicol*; **16**:437-445.
- Okuda-Shimazaki J., Takaku S., Kanehira K., Sonezaki S., Taniguchi A., 2010. Effects of Titanium Dioxide Nanoparticle Aggregate Size on Gene Expression. *Int. J. Mol. Sci.*, **11**: 2383-2392.
- Oubella R., Paillard C., Maes P., Auffret M., 1994. Changes in hemolymph parameters in the manila clam *Ruditapes philippinarum* (Mollusca: Bivalvia) following bacterial challenge. *J. Invertebr. Pathol.* **64**: 33-38.

- Papini M. R., Bitterman M. E., 1991. Appetitive conditioning in *Octopus cyanea*. *Journal of Comparative Psychology*, **105**: 107–114.
- Parry R.M., Chandan R.C., Shahani R.M. 1965. A rapid sensitive assay of muramidase. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **119**: 384-386.
- Pipe R.K., Coles J.A., 1995. Environmental contaminants influencing immune function in marine bivalve molluscs. *Fish Shellfish Immunol.* **5**: 581–595.
- Railo E. Nikinmaa M., Soivio A., 1985. Effects of sampling on blood parameters in the rainbow trout, *Salmo gairdneri* *Journal of Fish Biology*; **27(7)**: 725–732.
- Reeves J.F., Davies S.J., Dodd N.J.F., Jha A.N., 2008. Hydroxyl radicals (-OH) are associated with titanium dioxide (TiO₂) nanoparticle-induced cytotoxicity and oxidative DNA damage in fish cells. *Mutation Research* **640**: 113-122.
- Reyes-Coronado D., Rodríguez-Gattorno G., Espinosa-Pesqueira M.E., Cab C., de Coss R., Oskam G., 2008. Phase-pure TiO₂ nanoparticles: anatase, brookite and rutile. *Nanotechnology* **19**: 10-19.
- Robichaud, C.O., Uyar, A.E., Darby, M.R., Zucker, L., Wiesner, M., 2009. Estimates of upper bounds and trends in nano-TiO₂ production as a basis for exposure assessment. *Environmental Science and Technology* **43**, 4227-4233.
- Rodríguez-Ariza, A., Peinado, J., Pueyo, C., Lopez-Barea, J., 1993. Biochemical indicators of oxidative stress in fish from polluted littoral areas. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* **50**, 2568–2573.
- Rodríguez-Domínguez H., Soto-Búa M., Iglesias-Blanco R., Crespo-González C., Arias-Fernández C., García-Estévez J., 2006. Preliminary study on the phagocytic ability

- of *Octopus vulgaris* Cuvier, 1797 (Mollusca: Cephalopoda) haemocytes in vitro. *Aquaculture* **254**: 563–570.
- Rothen-Rutishauser, B.M., Schürch, S., Haenni, B., Kapp, N., Gehr, P., 2006. Interaction of fine particles and nanoparticles with red blood cells visualized with advanced microscope techniques. *Environ. Sci. Technol.* 40, 4353e4359.
- Salata O.V., 2004. Applications of nanoparticles in biology and medicine. *Journal of Nanobiotechnology*; **2(1)**:3.
- Sarko D., Catania K.C., Leitch D.B., Kaas J.H., Herculano-Houzel S., 2009. Cellular scaling rules of insectivore brains. *Frontiers in Neuroanatomy* **3**: 1-12
- Schmidt H.H.H.W., 1995 Determination of nitric oxide via measurement of nitrite and nitrate in culture media. *Biochemica* **2**: 22.
- Shimizu M., Tainaka H., Oba T., Mizuo K., Umezawa M., Takeda K., 2009. Maternal exposure to nanoparticulate titanium dioxide during the prenatal period alters gene expression related to brain development in the mouse. *Part Fibre Toxicological*; **29**:6-20.
- Sirakov M., Zarrella I., Borra M., Rizzo F., Biffal, E., Arnone. M.I., Fiorito, G., 2009. Selection and validation of a set of reliable reference genes for quantitative RT-PCR studies in the brain of the Cephalopod Mollusc *Octopus vulgaris*. *BMC Mol Biol.* **14**: 10-70.
- Smart S.K., Cassady A.I., Lu G.Q., Martin D.J., 2006. The biocompatibility of carbon nanotubes. *Carbon*, **44**: 1034-1047.
- Smith V.J., 1991. Invertebrate immunology: phylogenetic, ecotoxicological and biomedical implications. *Comparative Haematology International* **1**: 61-76.

- Smith V.J., Chisholm J.R.S., 1992. Non-cellular immunity in crustaceans. *Fish and Shellfish Immunology* **2**: 1–31.
- Smith, C.J., Shaw, B.J., Handy, R.D., 2007. Toxicity of single walled carbon nanotubes to rainbow trout, (*Oncorhynchus mykiss*): respiratory toxicity, organ pathologies, and other physiological effects. *Aquat. Toxicol.* **82**: 94-109.
- Staggers N., Mc Casky T., Brazelton N., Kennedy R. 2008. Nanotechnology: the coming revolution and its implications for consumers, clinicians, and informatics. *Nurs. Outlook* **56**: 268-274.
- Stern S.T., Mc Neil S.E. 2008. Nanotechnology safety concerns revisited. *Toxicol. Sci.* **101**; 4-21.
- Stoeger T., Reinhard C., Takenaka S., Schroepfel A., Karg E., Ritter B., Karg E., Maier K., Schulz H., Schmid O., 2006. Instillation of six different ultrafine carbon particles indicates a surface area threshold dose for acute lung inflammation in mice. *Environ. Health Perspect.* **114**: 328–333.
- Sutherland N., 1963. Shape discrimination and receptive fields. *Nature*, **197**: 118–122.
- Taton T.A., 2002. Nanostructures as tailored biological probes. *Trends Biotechnol* 2002, **20**:277-279.
- Templeton, R.C., Ferguson, P.L., Washburn, K.M., Scrivens, W.A., Chandler, G.T., 2006. Life-cycle effects of single-walled carbon nanotubes (SWNTs) on an estuarine meiobenthic copepod. *Environ. Sci. Technol.* **40**, 7387-7393.
- Thompson R. F., Spencer, W. A., 1966. Habituation: A model phenomenon for the study of neuronal substrates of behavior. *Psychological Review* **73**: 16-43.

- Tinkle S.S., Antonini J. M., Rich B. A., Roberts J. R., Salmen R., DePree K., Adkins E. J., 2003. Skin as route of exposure and sensitization in chronic beryllium disease. *Environ. Health Perspect.* **111**: 1202-1208.
- Vamanu C.I., Cimpan M. R., Høl P. J., Sørnes S., Lie S. A., Gjerdet N. R., 2008. Induction of cell death by TiO₂ nanoparticles: Studies on a human monoblastoid cell line. *Toxicology in Vitro* **22**: 1689–1696.
- Velzeboer, I., Hendriks, A.J., Ragas, A.M., Van de Meent, D., 2008. Aquatic ecotoxicity tests of some nanomaterials. *Environ. Toxicol. Chem.* **27**, 1942–1947.
- Wang H.H., Wick R.L., Xing B.S., 2009. Toxicity of nanoparticulate and bulk ZnO, Al₂O₃ and TiO₂ to the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Environmental Pollution* **157**: 1171–1177.
- Wang J.X., Zhou G.Q., Chen C.Y., Yu H.W., Wang T.C., Ma Y.M., 2007a. Acute toxicity and biodistribution of different sized titanium dioxide particles in mice after oral administration. *Toxicology Letters* **168**: 176–185.
- Wang, J. J., Sanderson, B. J., Wang, H., 2007b. Cyto- and genotoxicity of ultrafine TiO₂ particles in cultured human lymphoblastoid cells. *Mutation research* **628**: 99-106.
- Ward J.E., Kach D.J., 2009. Marine aggregates facilitate ingestion of nanoparticles by suspension-feeding bivalves. *Marine Environmental Research* **68**: 137-142
- Warheit D.B., Webb T.R., Reed K.L., Frerichs S., Sayes C.M., 2007. Pulmonary toxicity study in rats with three forms of ultrafine-TiO₂ particles: Differential responses related to surface properties. *Toxicity* **230**: 90–104.
- Wells, M. J., 1978. Octopus: Physiology and behavior of an advanced invertebrate. London: Chapman and Hall.

- Whitesides G.M., 2003. The 'right' size in Nanobiotechnology. *Nature Biotechnology* 2003, **21**:1161-1165.
- Wiench, K., Wohlleben, W., Hisgen, V., Radke, K., Salinas, E., Zok, S., Landsiedel, R., 2009. Acute and chronic effects of nano- and non-nano-scale TiO₂ and ZnO particles on mobility and reproduction of the freshwater invertebrate *Daphnia magna*. *Chemosphere*, **76**: 1356-1365.
- Xia T., Li N., Nel A. E. 2009. Potential Health Impact of Nanoparticles. *Annu. Rev. Public Health* **30**: 137-150.
- Yu-Lan H., Jian-Qing G., 2010. Potential neurotoxicity of nanoparticles. *International Journal of Pharmaceutics* **394**: 115-121.
- Zhao, X., Striolo, A., Cummings, P.T., 2005. C60 binds to and deforms nucleotides. *Biophysical journal*; **89**: 3856-62.
- Zhu X., Zhou J., Cai Z., 2011. The toxicity and oxidative stress of TiO₂ nanoparticles in marine abalone (*Haliotis diversicolor supertexta*). *Marine Pollution Bulletin* **63**: 334-338.
- Zhu X., Zhu L., Duan Z., Q, R., L, Y., Lang, Y., 2008a. Comparative toxicity of several metal oxide nanoparticle aqueous suspensions to Zebrafish (*Danio rerio*) early developmental stage. *J. Environ. Sci. Health A Tox. Hazard. Subst. Environ. Eng.*; **43**: 278-284.
- Zhu X., Zhu L., Lang Y., Chen Y., 2008b. Oxidative stress and growth inhibition in the freshwater fish *Carassius auratus* induced by chronic exposure to sublethal fullerene aggregates. *Environ. Toxicol. Chem.*; **27**: 1979–1985.

Zhu, S.Q., Oberdorster, E., Haasch, M.L., 2006. Toxicity of an engineered nanoparticle (fullerene, C-60) in two aquatic species, Daphnia and fathead minnow. *Marine Environmental Research*; **62**: S5-S9.

Zhu, X.S., Wang, JX., Zhang, XZ., Chang, Y., Chen, YS., 2010b. Trophic transfer of TiO₂ nanoparticles from daphnia to zebrafish in a simplified freshwater food chain. *Chemosphere*, **79**: 928-933.

Zhu, X., Chang, Y. & Chen, Y., 2010a. Toxicity and bioaccumulation of TiO₂ nanoparticle aggregates in *Daphnia magna*. *Chemosphere*, **78**: 209-15.