

Metodi *in vitro* e *in silico* per la valutazione del potenziale tossicologico dei nanomateriali

Sulla base delle competenze acquisite in progetti nazionali ed europei, saranno descritte le criticità e le metodologie più idonee per la valutazione del potenziale tossicologico *in vitro* e *in silico* dei nanomateriali

DOI 10.12910/EAI2017-045

di **Flavia Barone, Isabella De Angelis, Cristina Andreoli e Chiara Laura Battistelli**, Istituto Superiore di Sanità; **Caterina Arcangeli e Giorgio Leter**, ENEA

I nanomateriali, secondo la definizione adottata dalla Commissione Europea (Commission Recommendation 2011/696/EU), sono materiali di origine naturale, o prodotti da attività antropiche o ingegnerizzati contenenti particelle singole o in forma di aggregati o agglomerati e in cui almeno il 50% delle particelle, nella distribuzione dimensionale numerica, ha una o più dimensioni esterne comprese fra 1 e 100 nanometri. Essi sono caratterizzati da proprietà peculiari, derivanti da un elevato rapporto tra area superficiale e volume. Questo comporta una maggiore percentuale di atomi di superficie rispetto agli ato-

mi interni, conferendo ai nanomateriali una elevata reattività e proprietà chimico-fisiche e strutturali completamente diverse rispetto alle forme convenzionali degli stessi materiali. Tali proprietà sono ampiamente sfruttate in diversi ambiti applicativi: da quello medico (sviluppo di materiali biocompatibili per diagnostica, *imaging*, terapia e ingegneria tissutale) a quello industriale (settori elettronico, automobilistico, chimico, tessile, alimentare, farmaceutico, cosmetico).

Se da una parte lo sviluppo esponenziale dei nanomateriali apre nuovi orizzonti nel settore produttivo industriale e in campo biomedico,

dall'altra può presentare problemi di rischio per la salute degli operatori, dei consumatori e dell'ambiente. Nei settori della nanotossicologia e nanocotossicologia emerge l'esigenza sia di progettare e produrre nanomateriali biocompatibili, sia la necessità di evitare i potenziali effetti tossici derivanti dal loro impiego. Entrambi gli aspetti richiedono lo sviluppo e la cooperazione di differenti esperienze e competenze scientifiche e regolatorie. A tal fine, gli ultimi anni hanno visto l'impegno di organismi nazionali e internazionali per individuare procedure adeguate, finalizzate a garantire uno sviluppo responsabile dei nanomateriali.

Anche la Commissione Europea promuove l'armonizzazione e la standardizzazione delle metodologie e dei saggi da utilizzare per lo studio dei nanomateriali e ha finanziato numerosi progetti di ricerca nell'ambito dei Programmi Quadro FP7 e Horizon 2020. L'Istituto Superiore di Sanità (ISS) e l'ENEA hanno partecipato al progetto FP7 NANoREG - *A common European approach to the regulatory testing of nanomaterials* (2013-2017, www.nanoreg.eu) e l'ISS sta partecipando al progetto H2020 NanoReg2 - *Development and implementation of Grouping and Safe-by-Design approaches within regulatory frameworks* (2015-2018, www.nanoreg2.eu). Entrambi i progetti sono indirizzati a limitare le incertezze sulla sicurezza per la salute umana e l'ambiente dovute ad alcuni aspetti dei nanomateriali, sviluppando in un contesto regolatorio metodi

per la valutazione degli effetti e dei rischi ad essi legati. I risultati ottenuti forniranno la base per la stesura di un Libro Bianco di indirizzo politico, utilizzabile come strumento di riferimento per autorità regolatorie e industria.

Interazione dei nanomateriali con le soluzioni biologiche

La caratterizzazione chimico-fisica dei nanomateriali, condotta in ambiente secco, stabilisce le condizioni *ab initio* dei parametri necessari allo studio del loro possibile impatto sulla salute.

Quando particelle di dimensioni nanometriche sono disperse in una soluzione le loro caratteristiche chimico-fisiche subiscono delle modificazioni, dipendenti dall'interazione tra la superficie delle particelle con le molecole contenute

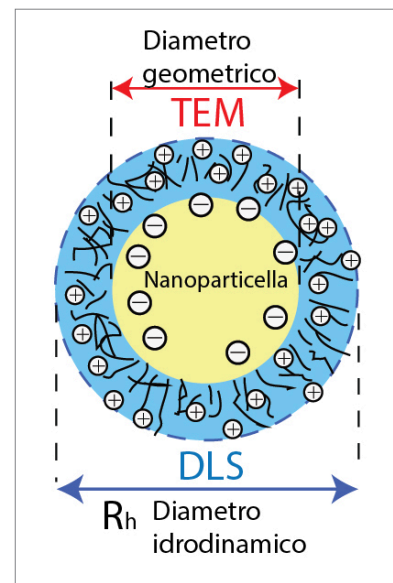
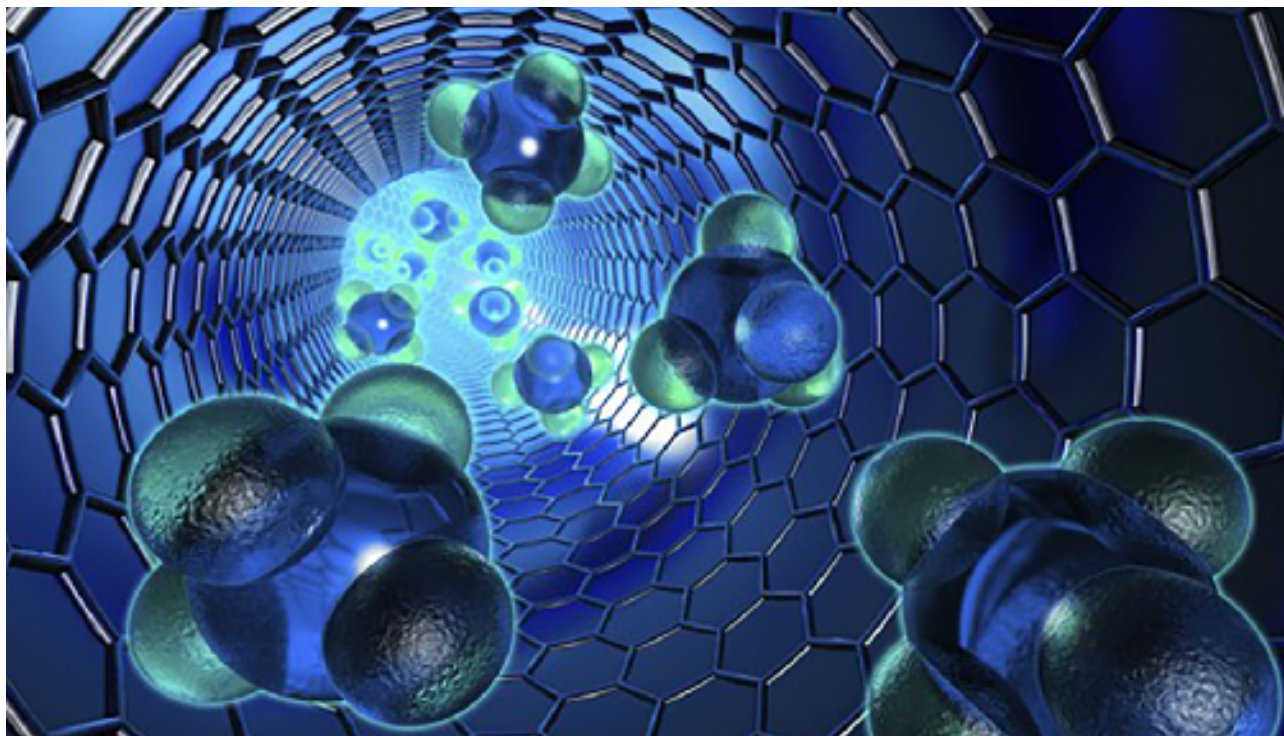


Fig. 1 Diametro idrodinamico; in rosso il diametro geometrico della nanoparticella pristina misurato con il microscopio elettronico a trasmissione (TEM) e il diametro idrodinamico R_h in blu, misurato in soluzione con il Dynamic Light Scattering (DLS)



nel mezzo, che possono influenzare la tossicità dei nanomateriali. In soluzione, le nanoparticelle (NP) tendono a formare degli aggregati di forme e dimensioni diverse modificando di fatto le loro dimensioni medie, la loro concentrazione e l'area superficiale totale, parametri cruciali per gli studi *in vivo* e *in vitro*. Una nanoparticella posta in soluzione forma un sistema colloidale per un tempo più o meno lungo. Una maggiore stabilità dei sistemi colloidali, previene il fenomeno di aggregazione delle particelle in quanto si originano repulsioni elettrostatiche che ne favoriscono la dispersione. Il parametro utilizzato per calcolare la stabilità colloidale è il potenziale Z che si riferisce al potenziale generato da un doppio strato di cariche elettriche. Quando il potenziale è basso, le forze attrattive prevalgono sulle repulsive e quindi si formeranno maggiori aggregati.

La conoscenza della reale concentrazione delle particelle alla quale il sistema biologico è esposto è importante per determinare la stima del rischio per la salute e può essere espressa sia come numerosità particellare sia come area superficiale totale e risente fortemente dal grado di aggregazione delle particelle. Negli esperimenti *in vitro* la variazione di tali parametri può influire sul maggiore o minore grado di endocitosi (internalizzazione delle particelle da parte delle cellule) dato importante per definire il modo di azione del nanomateriale. Anche la particella che non si aggrega subisce modifiche chimico-fisiche, in particolare la dimensione e la reattività chimica. La particella nella forma pristina (in ambiente secco) presenta un diametro geometrico che può essere misurato con la microscopia elettronica. In soluzione, invece, il

diametro è misurato come “diametro idrodinamico” (Figura 1) che tiene conto del diametro geometrico della nanoparticella e dello spessore delle molecole del mezzo che interagiscono con essa. Anche la carica elettrica superficiale può cambiare a causa dell'adsorbimento di molecole cariche opposte; dati sperimentali mostrano che gli effetti citotossici e genotossici sono potenziati se le nanoparticelle hanno una carica positiva [1].

Approcci *in vitro* per la valutazione della tossicità dei nanomateriali

I saggi *in vitro* sono particolarmente rilevanti nelle fasi iniziali della definizione della pericolosità di un nanomateriale. Inoltre, i dati *in vitro* possono contribuire alla interpretazione dei risultati *in vivo* per identificare i meccanismi di azione e per la categorizzazione dei nanomateriali.

I parametri più frequentemente studiati *in vitro* sono: citotossicità, apoptosi, stress ossidativo, genotossicità, processi infiammatori. Non esistono, ad oggi, saggi *in vitro* standardizzati o protocolli sperimentali specifici per la valutazione tossicologica dei nanomateriali e per l'estrapolazione dei risultati nella valutazione del rischio. Molte risorse sono al momento concentrate sulla ottimizzazione e validazione di metodi *in vitro* rilevanti per i nanomateriali, soprattutto a fini regolatori.

I requisiti essenziali per produrre dati robusti e significativi *in vitro* sono:

- accurata caratterizzazione del nanomateriale, inclusa la definizione delle proprietà chimico-fisiche, prima, durante e dopo il saggio;
- uso di sistemi di dosimetria reali-

stici e correlati ai possibili scenari di esposizione;

- utilizzo di più linee cellulari (possibilmente umane) rappresentative di possibili organi bersaglio e di un congruo intervallo di dosi (almeno 5 diverse concentrazioni);
- presenza di controlli interni (positivi e negativi) e possibilmente di nanomateriali di riferimento per la comparazione intra e interlaboratorio.

L'esperienza maturata in ISS nei saggi di citotossicità, nell'ambito di progetti nazionali e internazionali e con diversi nanomateriali, ha confermato che molti dei saggi colorimetrici convenzionalmente utilizzati per la valutazione della citotossicità (rilascio di Rosso Neutro, esclusione del Trypan Blue, misura dell'attività metabolica) devono essere applicati con cautela ai nanomateriali in quanto questi ultimi possono interferire con i componenti del saggio o con i sistemi di rilevamento ottico [2]. Nel progetto FP7 NANoREG è stato utilizzato da numerosi partecipanti un protocollo per il saggio dell'MTS che ha dato buoni risultati in termini di ripetibilità dei dati, utilizzando diversi nanomateriali e diverse linee cellulari.

Molto promettente è anche considerato il saggio della *Colony Forming Efficiency*, un saggio clonogenico basato sulla capacità delle cellule integre di formare colonie. Il saggio è *label-free* e può essere effettuato con qualsiasi cellula aderente in grado di formare colonie.

I saggi *in vitro* di genotossicità sono uno strumento importante per la comprensione dei meccanismi di tossicità e la valutazione dei rischi per la salute dei nanomateriali. Al momento nessun test risulta validato per i nanomateriali e al riguardo



l'OCSE ha proposto delle modifiche per alcuni di essi, per adeguarli alle peculiari caratteristiche dei nanomateriali. I possibili adattamenti sperimentali di questi saggi di genotossicità sono stati applicati nell'ambito di progetti nazionali ed internazionali in cui l'Istituto Superiore di Sanità e l'ENEA sono stati coinvolti per studiare l'attività citotossica e genotossica di nanomateriali di largo utilizzo. In particolare, sono stati applicati il test del micronucleo, per il quale esiste una linea guida standardizzata OCSE (TG487: *In Vitro Mammalian Cell Micronucleus Test*), e il saggio della Cometa. Il primo è considerato il test d'elezione per la valutazione della genotossicità dei nanomateriali per la sua capacità di identificare sia la clastogenicità indotta dalle specie reattive dell'ossigeno, uno dei principali meccanismi della genotossicità dei nanomateriali, sia i potenziali effetti aneugenici dovuti all'interazione fisica dei nanomateriali con il fuso e l'apparato mitotico. Il secondo è molto utilizzato per valutare la capacità dei nanomateriali di interagire con il DNA in quanto è un test molto sensibile nel rilevare danni al DNA in forma di rotture a singolo e doppio filamento, sia dirette sia mediate da processi di riparazione del DNA (siti abasici). Questo saggio è in grado di mettere in evidenza i danni al DNA derivanti dai processi di stress ossidativo tramite l'utilizzo di enzimi del processo di riparazione del danno ossidativo che, riconoscendo e rimuovendo purine e pirimidine ossidate, aumentano la specificità del danno rilevato. Entrambi i test si sono dimostrati utili per la valutazione della genotossicità dei nanomateriali e la comprensione dei possibili meccanismi di azione [3]. Il miglioramento dei protocolli sperimentali *in vitro*, che includono

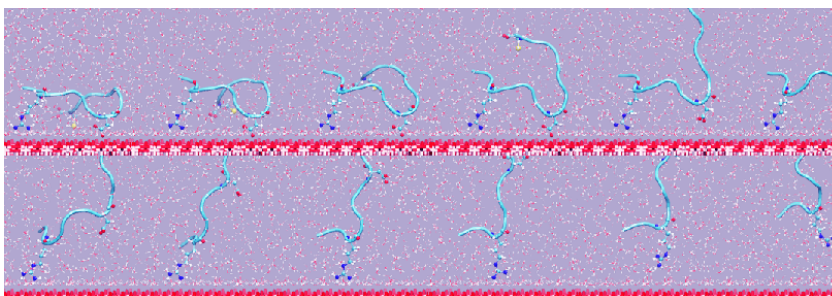


Fig. 2 Esempio di simulazione di dinamica molecolare per la comprensione dei meccanismi che avvengono all'interfaccia tra una molecola biologica (peptide) e un nanomateriale inorganico (superficie di ossido di titanio, TiO_2). La forza d'interazione tra il peptide e il nanomateriale può essere determinata "strappando" il peptide dal nanomateriale (dinamica molecolare guidata) e calcolando la forza richiesta per staccare il peptide. Nella figura è illustrato il percorso di dissociazione del peptide dal nanomateriale, dovuto alla rottura delle interazioni elettrostatiche a carico degli aminoacidi responsabili dell'ancoraggio al nanomateriale [adattato da Arcangeli et al. 2013 *Nanosci Nanotechnol Lett*, 5:1147]

oltre che le modalità di trattamento anche le condizioni di sospensione e caratterizzazione dei nanomateriali, sono state valutate nel progetto FP7 NANoREG che ha coinvolto numerosi laboratori europei, che hanno condiviso gli stessi protocolli e gli stessi nanomateriali, e che ha fornito risultati interessanti per la ripetibilità dei risultati.

Modelli predittivi in silico per la nanotossicologia e applicazioni in ambito regolatorio

Per fare fronte alla recente richiesta e necessità di predire la tossicità dei nanomateriali, negli ultimi anni sono stati utilizzati diversi metodi *in silico* [4]. Tali approcci includono metodi QSAR (quantitative structure-activity relationship), metodi del raggruppamento (*grouping*), delle categorie e del *read-across*.

I metodi QSAR sono basati su modelli statistici che mettono in relazione un set di descrittori di un composto chimico alla sua attività biologica. Tuttavia poiché esistono differenze sostanziali tra i nanomateriali e le sostanze chimiche che tradizionalmente sono oggetto di

questi modelli, i descrittori utilizzati sono spesso inadeguati e non tengono conto delle interazioni che avvengono all'interfaccia bio-inorganica. Infatti, indipendentemente dalla via di esposizione ai nanomateriali (inalatoria, orale, cutanea, intraperitoneale), il primo "organo" d'interazione è il fluido biologico (sangue, citoplasma) dove i nanomateriali adsorbono, in maniera selettiva, le proteine per formare un complesso chiamato protein-corona. Questo processo sembra essere governato da interazioni molecolari tra i gruppi chimici di superficie dei nanomateriali e quelli dei residui amminoacidici delle proteine. Grazie al rapido avanzamento nel campo della tecnologia HPC (High Performance Computing) e a seguito degli avanzamenti in quello della modellistica molecolare sono in corso studi volti alla creazione di modelli d'interfacce ibride per ottenere un nuovo set di descrittori. In particolare nel campo della modellistica molecolare, simulazioni di dinamica molecolare di interfacce bio-inorganiche sono state recentemente utilizzate sia per lo studio dei possibili effetti dei nanomateriali sulla struttura molecolare e

sulla funzionalità delle biomolecole (proteine, DNA e membrane) che per ricavare informazioni sulla stabilità del legame instaurato tra il nanomateriale e la componente biologica, considerando che le forze di interazione calcolate possono essere utilizzate come descrittori ([5] e Figura 2). Nonostante queste potenzialità, le simulazioni di sistemi ibridi per studi nanotossicologici sono ancora in una fase iniziale.

Il metodo *in silico* più utilizzato in ambito regolatorio è l'approccio del raggruppamento e del *read-across*. Questo metodo si avvale di informazioni relative a sostanze analoghe per predire le proprietà di sostanze di cui non sono presenti dati.

Negli ultimi anni si sono avviate, in ambito internazionale, numerose iniziative volte a favorire l'applicazione delle metodologie di raggruppamento e *read-across* ai nanomateriali per fini regolatori: progetti di ricerca EU

FP7 MARINA e Horizon2020 Nano-Reg2, documenti prodotti da Agenzie europee (ad es. https://echa.europa.eu/documents/10162/23036412/appendix_r6_nanomaterials_en.pdf/71ad76f0-ab4c-fb04-acba-074cf045eaaa). Esistono differenti modi di raggruppare i nanomateriali, a seconda delle informazioni disponibili e delle proprietà che devono essere predette. Nei diversi approcci proposti, gli elementi cruciali sono sempre i parametri chimico-fisici: le proprietà intrinseche per l'identificazione dei nanomateriali (come composizione, dimensione, forma); le proprietà dei nanomateriali che, in base al mezzo di dispersione, ne determinano il comportamento (come solubilità, idrofobicità); le proprietà per la valutazione del pericolo fisico, per l'uomo e per l'ambiente [6]. I dati relativi ai parametri chimico-fisici vengono utilizzati per definire la

tossicocinetica, l'(eco)tossicità ed il destino ambientale dei nanomateriali e quindi per elaborare una giustificazione per il raggruppamento che sia robusta e scientificamente valida.

La nanotecnologia è in rapida espansione e proprio per il numero elevato di nanoforme presenti, nell'ambito della valutazione del pericolo sarà fondamentale utilizzare approcci alternativi che permettano predizioni di proprietà per singoli nanomateriali oppure per gruppi di nanomateriali. L'applicabilità di tali metodologie richiede l'utilizzo di dati sperimentali di buona qualità e standardizzati che per i nanomateriali sono difficili da ottenere, proprio per le loro peculiarità: per questa ragione ad oggi l'applicabilità di tali metodologie risulta ancora nella fase iniziale.

*Per saperne di più:
flavia.barone@iss.it*

BIBLIOGRAFIA

1. E. Fröhlich (2012), "The role of surface charge in cellular uptake and cytotoxicity of medical nanoparticles", *Int J Nanomedicine*, 7: 5577-5591
2. F. Barone, I. De Angelis, B. De Berardis, A. Zijno, C. Andreoli, P. Degan, M.L. Polci, M. Alessandrelli, P. Di Prospero Fanghella (2015), "Implementazione di metodi validati e sviluppo di metodi *in vitro* per determinare le caratteristiche fisico-chimiche e la potenziale attività geno/tossicologica di micro e nanoparticelle di biossido di titanio", *Rapporti ISTISAN 15/34*, Istituto Superiore di Sanità, Roma
3. A. Zijno, I. De Angelis, B. De Berardis, C. Andreoli, M.T. Russo, D. Pietraforte, G. Scorza, P. Degan, J. Ponti, F. Rossi, Barone F (2015), "Different mechanisms are involved in oxidative DNA damage and genotoxicity induction by ZnO and TiO₂ nanoparticles in human colon carcinoma cells", *Toxicol In Vitro*, 29(7):1503-1512
4. Y. Mu, F. Wu, Q. Zhao, R. Ji, Y. Qie, Y. Hu, C. Pang, D. Hristozov, J. P. Giesy, B. Xing (2016), "Predicting toxic potencies of metal oxide nanoparticles by means of nano-QSARs", *Nanotoxicology*, 10(9): 1207-1214
5. C. Arcangeli, I. Borriello, G. Gianese, M. Celino, P. Morales (2013), "Organic functionalization of metal oxide surfaces: An atomic scale modeling approach", *Nanosci Nanotechnol Lett*, 5(11):1147-1154
6. A.G. Oomen, E.A Bleeker, P.M. Bos, F. van Broekhuizen, S. Gottardo, M. Groenewold, D. Hristozov, K. Hund-Rinke, M.A. Irfan, A. Marcomini, W.J. Peijnenburg, K. Rasmussen, A.S. Jimenez, J.J. Scott-Fordsmand, M. van Tongeren, K. Wiench, W. Wohlleben, R. Landsiedel (2015) "Grouping and Read-Across Approaches for Risk Assessment of Nanomaterials", *Int. J. Environ. Res. Public Health*, 12(10): 13415-13434