

# Studio comparativo della tossicità di biossido di titanio nelle forme nanoparticolata e bulk in cellule di neuroblastoma umano (SH-SY5Y)

U. De Simone<sup>1</sup>, C.A. Locatelli<sup>1</sup>, I. Condello<sup>2</sup>, V.M. Petrolini<sup>1</sup>, A. Giampreti<sup>1</sup>, T. Coccini<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Laboratorio di Tossicologia Clinica e Sperimentale, Centro Antiveneni di Pavia e Centro Nazionale di Informazione Tossicologica - Unità di Tossicologia, IRCCS Fondazione Salvatore Maugeri, Istituto Scientifico di Pavia, Italia; <sup>2</sup>Università degli Studi di Pavia, Italia

Le nanoparticelle (NP), nonostante trovino impiego in un'ampia gamma di applicazioni in campo ambientale e industriale, destano considerevoli preoccupazioni per quanto riguarda i loro effetti sulla salute in virtù proprio delle nuove proprietà chimico-fisiche che le caratterizzano. In un contesto ancora poco chiaro, sia dal punto di vista della loro pericolosità, sia dal punto di vista dei metodi per valutarne la sicurezza, l'approccio proposto per valutare la tossicità delle NP è quello di procedere 'caso per caso'. Tra le NP che attualmente richiamano maggiore attenzione in un contesto di dibattito pubblico e legislativo da parte della Commissione Europea rientra il biossido di titanio nella forma nanoparticolata (TiO<sub>2</sub>NP) la cui produzione e utilizzo risultano in vertiginoso aumento in virtù dei numerosi impieghi quali in prodotti dell'edilizia, purificazione dell'aria e dell'acque, coloranti alimentari, additivo nei cosmetici, agente antimicrobico.

Rischi per salute umana a seguito di esposizione ambientale a TiO<sub>2</sub>NP si configurano in ragione della loro capacità di essere assorbite dall'organismo, raggiungere organi secondari, quali il SNC, dove possono accumularsi ed indurre effetti tossici.

Lo scopo del presente studio è stato quello di valutare *in vitro* la neurotossicità di TiO<sub>2</sub>NP su una linea di cellule neuronali umane (SH-SY5Y) mediante una batteria integrata di test. Gli effetti biologici indotti da TiO<sub>2</sub>NP sono stati valutati dopo esposizione a dosi crescenti (1.5-250µg/ml) per brevi periodi (4,24,48h) mediante determinazione della funzione mitocondriale (MTT), integrità di membrana e morfologia cellulare (calceina-AM/PI), e dopo prolungata esposizione (10 giorni) a basse dosi (0.05-31µg/ml) valutando la crescita e la proliferazione cellulare (*clonogenic*). La tossicità del TiO<sub>2</sub>NP è stata confrontata con gli effetti indotti dalla forma *bulk*.

*Esposizione acuta:* i) TiO<sub>2</sub>NP e TiO<sub>2</sub> *bulk* inducevano alterazioni dose-dipendenti della funzionalità mitocondriale con effetti osservabili dopo 24h e più marcati per TiO<sub>2</sub>NP rispetto al *bulk*: TiO<sub>2</sub>NP riduceva la vitalità (25%) alla dose di 15 mg/ml mentre TiO<sub>2</sub> *bulk* alla dose di 62 µg/ml (riduzione del 17%).

Dopo 48h la mortalità indotta da TiO<sub>2</sub>NP era del 30-60% alle dosi di 15-250µg/ml, mentre quella indotta da TiO<sub>2</sub> *bulk* era del 20-30% alle dosi di 62-250 µg/ml.

ii) Danni alla membrana cellulare e alterazioni della morfologia cellulare (perdita della tipica forma piramidale) erano osservati solo alle dosi più elevate (125 e 250µg/ml) dopo 24 e 48 h per TiO<sub>2</sub>NP e solo dopo 48h per TiO<sub>2</sub> *bulk*. L'analisi quantitativa confermava quanto evidenziato nelle immagini a fluorescenza.

*Esposizione prolungata:* le cellule esposte per 10 giorni a TiO<sub>2</sub>NP mostravano una riduzione dose-dipendente delle dimensioni delle colonie a partire da 0.1 µg/ml e alterazione della morfologia delle colonie da 0.2 µg/ml. Il numero delle colonie risultava altresì ridotto in maniera dose-dipendente con un decremento del 12-46% alle dosi di 0.2-31 µg/ml. TiO<sub>2</sub> *bulk* alterava solo la morfologia delle colonie a partire da 0.2 µg/ml. Entrambe le forme di TiO<sub>2</sub> erano visibili intracellularmente mediante microscopia in campo chiaro alle dosi di 15 e 31µg/ml.

I risultati mostrano la sensibilità delle cellule neuronali umane a TiO<sub>2</sub>NP non solo dopo esposizione acuta (da ≥15 ppm), ma anche dopo esposizione prolungata a basse dosi (≥0.1 ppm) con effetti più marcati rispetto a quelli indotti da TiO<sub>2</sub> *bulk*.

Lo studio avvalorava l'importanza dei test *in vitro* nel processo di valutazione della tossicità di NP sulla base del confronto dati *in vitro-vivo*: le dosi critiche di TiO<sub>2</sub>NP *in vitro* erano comparabili con i livelli di Ti (0.05-0.3ppm) determinati in aree cerebrali di animali esposti a basse dosi di TiO<sub>2</sub>NP e a cui erano associati alterazioni a carico del SNC.

(Fondi: Ministero della Salute, Ricerca e Formazione, e Fondazione Cariplo-Rif.2011-2096).