

## Tossicità *in vitro* di nanoparticelle di argento (AgNP) e di biossido di titanio (TiO<sub>2</sub>NP) dopo breve e lunga esposizione in cellule di astrocitoma umano

U. De Simone<sup>1</sup>, C.A. Locatelli<sup>1</sup>, D. Lonati<sup>1</sup>, S. Vecchio<sup>1</sup>, T. Coccini<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Laboratorio di Tossicologia Clinica e Sperimentale, Centro Antiveleni di Pavia e Centro Nazionale di Informazione Tossicologica - Unità di Tossicologia, IRCCS Fondazione Salvatore Maugeri, Istituto Scientifico di Pavia, Italia

Le nanoparticelle di argento (AgNP) e di biossido di titanio (TiO<sub>2</sub>NP) sono annoverati tra i NM che attirano maggiore attenzione nel dibattito pubblico ciò a seguito di una continua e sempre più veloce immissione sul mercato di un'ampia gamma di prodotti con conseguente possibile impatto sulla salute umana. Evidenze sperimentali, seppur ancora limitate, indicano la capacità di entrambe queste NP di raggiungere il SNC, attraversando la barriera-emoencefalica una volta entrate nel circolo sanguigno o le terminazioni nervose della mucosa nasale (nervo olfattivo e trigemino), accumularsi e determinare alterazioni morfo-funzionali. Gli astrociti svolgono un ruolo chiave nel metabolismo cerebrale. È altresì noto che gli astrociti intervengono nell'accumulo e detossificazione di ioni metallici, e che un'alterazione di questi meccanismi contribuiscono alla patogenesi di malattie neurodegenerative.

In questo studio sono stati caratterizzati gli effetti neurotossici indotti da AgNP e TiO<sub>2</sub>NP, in una linea cellulare umana di astrociti (linea cellulare D384) mediante una batteria integrata di test *in vitro*. La risposta cellulare è stata valutata sia dopo breve esposizione (4-48 h; 1-100µg/ml) mediante MTT (funzionalità mitocondriale) e calceina-AM/PI (integrità di membrana e morfologia cellulare), che dopo lunga esposizione (7 giorni; 0.5-25µg/ml) mediante test clonogenico (crescita e la proliferazione cellulare).

**Funzionalità mitocondriale:** entrambe le NP inducevano effetti citotossici dose-dipendente sulle D384. Tuttavia, l'effetto di AgNP era precoce: si osservava già dopo 4h di esposizione una mortalità cellulare (25-85%) alle dosi comprese tra 25 e 100 µg/ml. Effetto che veniva esacerbato nei tempi successivi (24 e 48 h) con 100% di mortalità a 50-100 µg/ml. L'effetto di TiO<sub>2</sub>NP si evidenziava invece dopo 24h sempre a partire dalla dose di 25µg/ml (25% decremento di vitalità cellulare), con un effetto massimo (45% mortalità) dopo 48h alla dose di 100 µg/ml. **Integrità di membrana e morfologia cellulare:** anche su questo *endpoint* la citotossicità di AgNP era precoce e più marcata rispetto a TiO<sub>2</sub>NP. Infatti AgNP induceva danni alla membrana e alterazioni della morfologia cellulare dopo 4h alla dose di 50µg/ml. Effetto che era esacerbato dopo 24 e 48 h, come dimostrato anche dall'analisi semi-quantitativa che mostrava una mortalità cellulare del 60-100% dopo 24h e 95-100% dopo 48h alle dosi di 50-100µg/ml.

L'effetto di TiO<sub>2</sub>NP sull'integrità di membrana e la morfologia cellulare era visibile dopo 24h e alla dose di 100µg/ml: le cellule perdevano la loro tipica forma stellata e disposizione a monostrato. L'analisi semi-quantitativa indicava un 20% di mortalità dopo 48h alla dose di 100µg/ml. **Crescita e proliferazione cellulare:** le D384 trattate con basse dosi (0.5-25µg/ml) di AgNP e TiO<sub>2</sub>NP mostravano una riduzione delle dimensioni e del numero di colonie, e alterazioni della morfologia delle colonie dose-dipendente. In particolare, già la dose più bassa (0.5µg/ml), per entrambe le NP, induceva alterazioni della morfologia. Si osservava anche un decremento del numero delle colonie che tuttavia risultava più marcato per AgNP (25% e 90% riduzione a 1 e 25 µg/ml) rispetto a TiO<sub>2</sub>NP (15% e 40% riduzione a 0.5 e 25 µg/ml). Il presente studio ha dimostrato che gli astrociti umani esposti a AgNP o TiO<sub>2</sub>NP erano suscettibili sia dopo breve che dopo esposizione prolungata a basse dosi. Le dosi critiche (25ppm dopo esposizione acuta per entrambe le NP, e 0.5 e 1 ppm dopo lunga esposizione a TiO<sub>2</sub>NP e AgNP) erano paragonabili ai livelli di Ag e Ti misurati nei tessuti cerebrali di animali trattati con AgNP e TiO<sub>2</sub>NP e a cui erano associati evidenti effetti a carico del SNC. La corrispondenza dei dati *in vitro-vivo* avvalorava la validità dei test *in vitro* nel processo di valutazione della tossicità di NP.

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