

# Obblighi di informazione per la registrazione REACH: caratterizzazione chimico-fisica e saggi di cito/genotossicità di particelle di TiO<sub>2</sub> in forma micro e nano

Maria Alessandrelli<sup>2</sup>, Cristina Andreoli<sup>1</sup>, Flavia Barone<sup>1</sup>, Isabella De Angelis<sup>1</sup>, Barbara De Berardis<sup>1</sup>, Paola Di Prospero Fanghella<sup>2</sup>, Pietro Pistolese<sup>3</sup>, Maria Letizia Polci<sup>2,3</sup>, Maria Teresa Russo<sup>2</sup>, Andrea Zijno<sup>1</sup>



<sup>1</sup>Dipartimento ambiente e connessa prevenzione primaria e <sup>2</sup>Centro nazionale sostanze chimiche, Istituto Superiore di Sanità; <sup>3</sup>Ministero della Salute

## Razionale

Nel contesto della vigente legislazione comunitaria per la gestione dei prodotti chimici, il regolamento REACH istituisce l'obbligo di fornire informazioni sulle sostanze fabbricate e utilizzate in qualsiasi forma. I registranti, in ottemperanza agli obblighi del REACH, sono tenuti ad includere nei dossier di registrazione informazioni sulla preparazione del campione, sul tipo di particelle, sullo stato di agglomerazione/aggregazione, sul sistema di misura utilizzato per la distribuzione dimensionale e sui saggi utilizzati per la valutazione delle proprietà (eco)tossicologiche. Detti obblighi di informazione sulle proprietà intrinseche dei materiali implicano la valutazione dell'appropriatezza dei metodi di saggio da utilizzare per le sostanze in nanoforma e, ove pertinente, la proposta di specifiche strategie di test.

## Obiettivi

- Valutare protocolli di dispersione per la caratterizzazione chimico-fisica mediante microscopia elettronica e l'adeguatezza di due diverse microscopie elettroniche per la determinazione di alcune caratteristiche morfologiche di particelle di TiO<sub>2</sub> di varie forme e dimensioni, alla luce di quanto raccomandato dall'OECD e dall'ECHA.
- Valutare l'adeguatezza di metodi di saggio validati e/o alternativi, utilizzati per gli studi in vitro di cito- e geno-tossicità di sostanze chimiche, alle nanoparticelle (NP) di TiO<sub>2</sub>.

Questo studio è stato finanziato dal Ministero della salute (Accordo di collaborazione DGPREV 0005460-P-01/03/2011)

## Materiali e metodi

### Preparazione delle sospensioni di particelle

Le particelle sono state caratterizzate nei terreni di coltura (DMEM o RPMI) delle linee cellulari utilizzate nei test tossicologici. Le polveri di ciascun tipo di particelle sono state pesate e risospese nel mezzo di coltura in modo da ottenere una concentrazione di 1,5 mg/ml. Le sospensioni ottenute sono state diluite in maniera tale da ottenere una concentrazione finale di 50 µg/ml sonicate per 16 minuti con sonificatore a sonda (Vibracell, 750 W, 20 kHz, 20% di ampiezza) in condizioni di temperatura controllate.

### Caratterizzazione mediante microscopia elettronica

Per ridurre la formazione di artefatti nella preparazione dei campioni da analizzare mediante microscopia elettronica (EM) ed ottenere una migliore distribuzione delle particelle sugli appositi substrati necessari per effettuare l'analisi, 1 ml di ciascuna sospensione ottenuta è stato filtrato su membrane in policarbonato, 47 mm di diametro e porosità 0.05 µm. La morfologia e la "primary size" delle particelle sono determinate mediante microscopia elettronica a trasmissione, TEM (FEI Company, 120 KV, 15000x). Per l'analisi al TEM i filtri ottenuti sono stati rivestiti di un film di carbonio, trasferiti su retine ed il policarbonato dissolto mediante cloroformio. La distribuzione dimensionale e l'"aspect ratio" delle particelle sono stati valutati mediante un microscopio elettronico a scansione, SEM/EDX, (FEI Company, 15 KV, 15000 x) munito di uno spettrometro a raggi X e di un sistema di analisi semi-automatico (Particle Analysis, EDAX) che consente di ottenere per ciascuna di esse una serie di parametri morfologici (diametro medio, diametro di feret, aspect ratio, shape factor) e la composizione elementare. Per l'analisi SEM i filtri sono stati rivestiti con un sottile film di Au mediante sputtering e montati sui portacampioni.

### Saggio di citotossicità

L'effetto citotossico delle NP di TiO<sub>2</sub> è stato valutato mediante il saggio del Rosso Neutro (NRU) sulla linea cellulare di topo Balb/3T3, eseguito in accordo con il protocollo messo a punto dall' Interagency Coordination Committee on the Validation of Alternative Methods (ICCVAM).

Dopo 24 ore dal piastramento nelle piastre da 96 pozzetti, le cellule sono state trattate con diverse concentrazioni di TiO<sub>2</sub> (12.5, 25, 50 and 100 µg/cm<sup>2</sup>), sia in forma micro che in forma nano, e con diverse strutture cristalline, per 48 ore. Per il trattamento le particelle sono state risospese nel mezzo di coltura e sonicate in un bagno a ultrasuoni per 45 minuti. Al termine del trattamento è stato effettuato il saggio del Rosso Neutro e le piastre lette a 540 nm con un lettore Elisa.

### Saggi di genotossicità

La genotossicità è stata valutata su cellule mononucleari di sangue periferico coltivate in vitro.

Il test del micronucleo è stato condotto secondo la linea guida OCSE TG 487, utilizzando due differenti protocolli sperimentali di trattamento con il TiO<sub>2</sub> (50-200 µg/ml).

Protocollo A: i linfociti sono stati trattati 24 ore dopo la stimolazione, la Cyt B è stata aggiunta dopo 20 ore e le cellule raccolte 48 ore dopo il trattamento.

Protocollo B: i linfociti sono stati trattati 43.5 ore dopo la stimolazione, la Cyt B è stata aggiunta dopo mezz'ora e le cellule raccolte 28 ore dopo il trattamento.

L'induzione di rotture a singolo e doppio filamento sul DNA è stata valutata con il saggio della cometa dopo trattamento per 24 ore con 10-200 µg/ml di TiO<sub>2</sub> nano e microparticellare in forma anatase, rutile e mix. Il test della cometa è stato condotto secondo il protocollo descritto in dettaglio in Andreoli et al. (Mut Res 1997,377:95-104) e le indicazioni del Comet assay interest group (<http://www.cometassay.com/>).

## Risultati- 1: Caratterizzazione delle nanoparticelle di TiO<sub>2</sub>

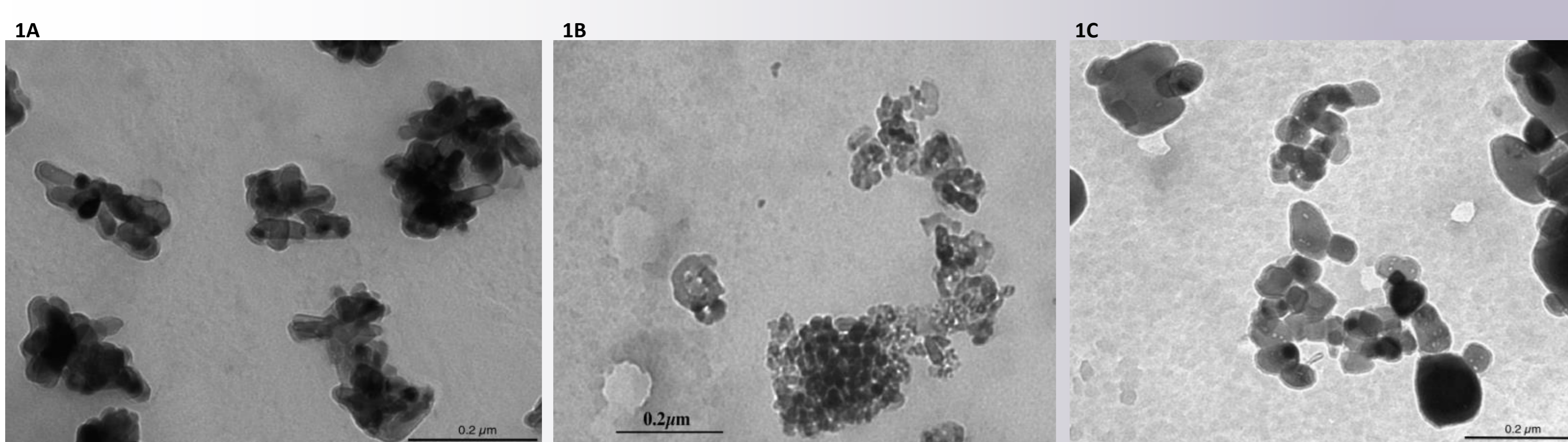


Figura 1. Immagini TEM delle NP di TiO<sub>2</sub>: 1A) Rutile; 1B) Anatase; 1C) Anatase/Rutile

Particle	Primary size	Mean Diameter in DMEM	Mean Diameter in RPMI	Aspect ratio
Rutile NPs	30x100 nm	175 nm	226 nm	2-8
Anatase NPs	20-60 nm	329 nm	210 nm	1-6
Anatase/Rutile NPs	46-262 nm	229 nm	328 nm	1-12
Rutile<5 µm	50-3000 nm	738 nm	413 nm	1-14
Anatase	50-270 nm	359 nm	658 nm	1-12

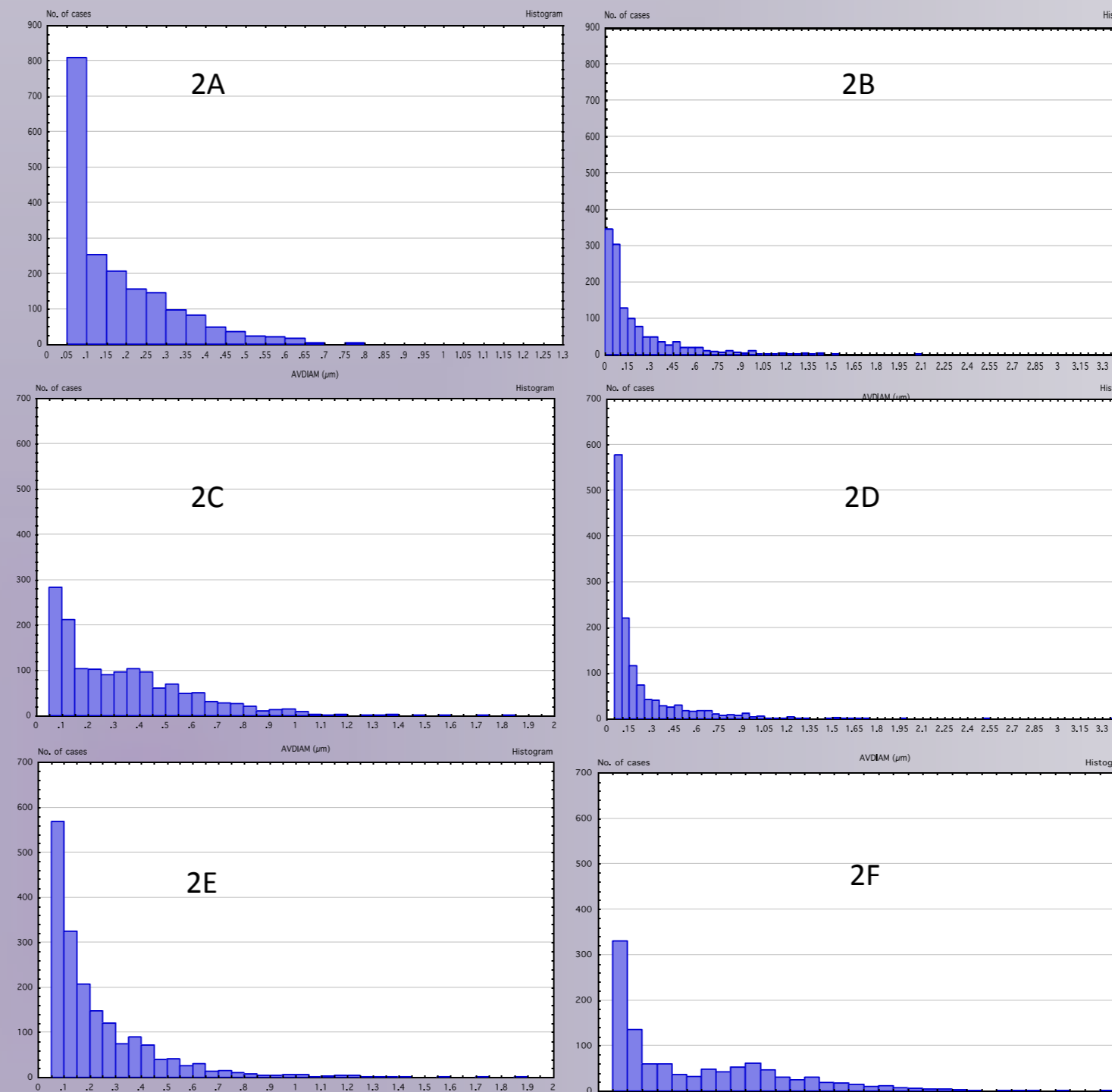


Figura 2. Distribuzione dimensionale delle NP nei due differenti mezzi di coltura: 2A) Rutile NP in DMEM; 2B) Rutile NP in RPMI; 2C) Anatase NP in DMEM; 2D) Anatase NP in RPMI; 2E) Anatase/Rutile NP in DMEM; 2F) Anatase/Rutile NP in RPMI

## Discussione-1

L'uso di membrane filtranti nella preparativa per la microscopia elettronica può comportare una perdita delle particelle inferiori ai 50 nm. E' quindi necessario valutare tale perdita recuperando l'eluato e trasferendolo su un wafer di silicio. È stata stimata una perdita di particelle inferiori ai 50 nm pari circa al 3% e quindi non significativa per la determinazione della distribuzione dimensionale dato l'elevato numero di particelle analizzate.

La microscopia elettronica fornisce importanti informazioni sulla morfologia, dimensioni e stato di agglomerazione delle particelle. L'uso di sistemi di analisi semi-automatica consente di analizzare un elevato numero di particelle, di compiere un'analisi statistica significativa su una grande quantità di dati morfologici ottenuti per ciascuna di esse e nello stesso tempo di determinare l'abbondanza di particelle in ciascun intervallo granulometrico della distribuzione dimensionale. Tuttavia la microscopia elettronica non può fornire informazioni sul comportamento idrodinamico delle NP, soprattutto nei mezzi biologici utilizzati per i test tossicologici. Si raccomanda quindi l'utilizzo di almeno due differenti tecniche per la valutazione delle caratteristiche chimico-fisiche delle nanoparticelle.

Il nostro studio sembra indicare un differente comportamento delle NP di TiO<sub>2</sub> nel DMEM e nel RPMI. Altre tecniche analitiche, come la sedimentazione delle particelle mediante centrifugazione (Centrifugal Particle Sedimentation), possono fornire utili informazioni per comprendere lo stato di agglomerazione delle NP nei mezzi di coltura.

## Risultati- 2: Saggio di citotossicità

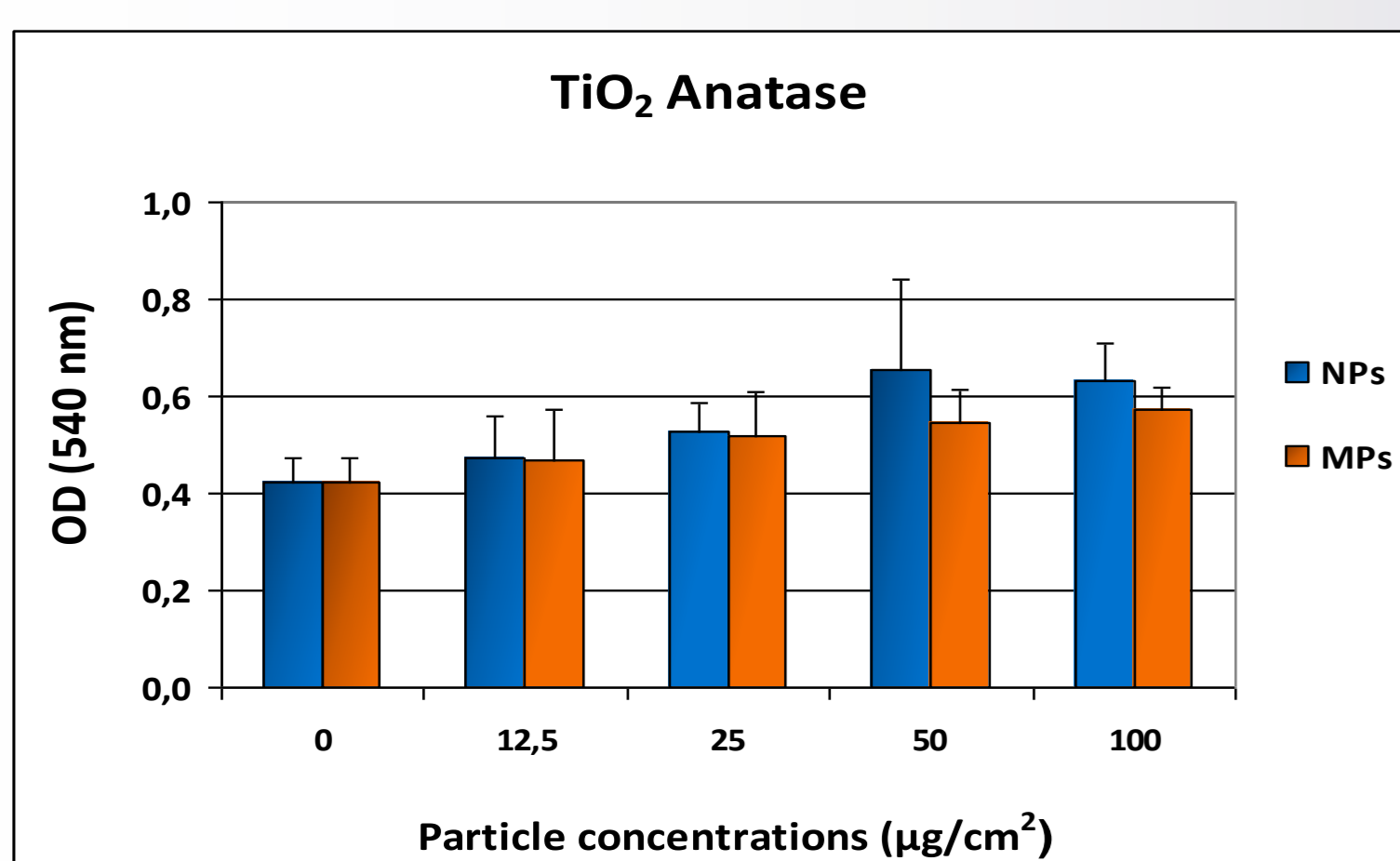


Figura 3: citotossicità delle particelle di TiO<sub>2</sub>, in micro e nanoforma, determinata con il saggio NRU su cellule Balb/3T3 in piastre da 96 pozzetti. Controllo positivo Sodio Lauril Solfato I (SLS) (5-100 µg/ml; IC50 30 µg/ml). I risultati sono la media di 3 diversi esperimenti eseguiti in sestuplicato.

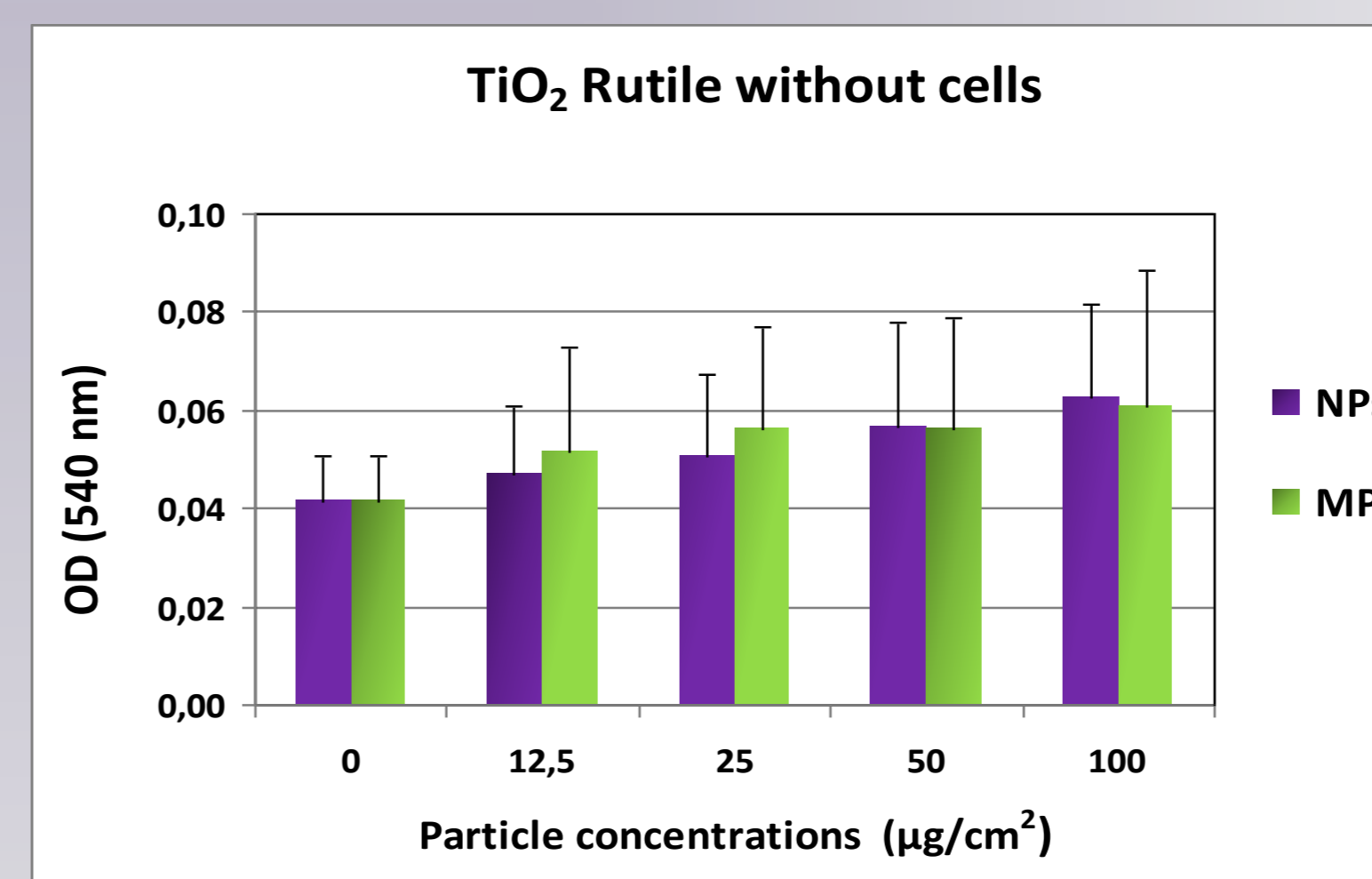
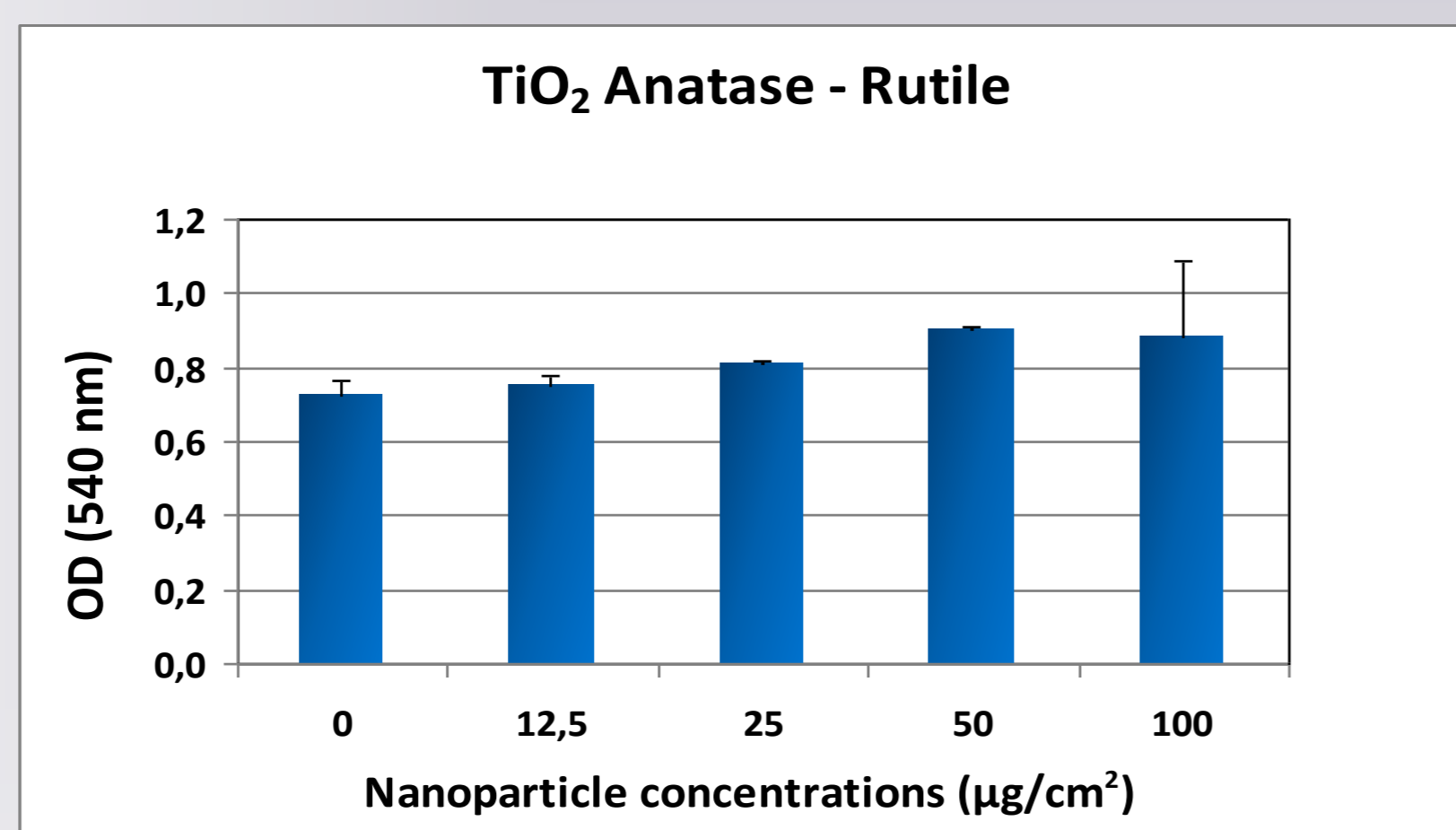
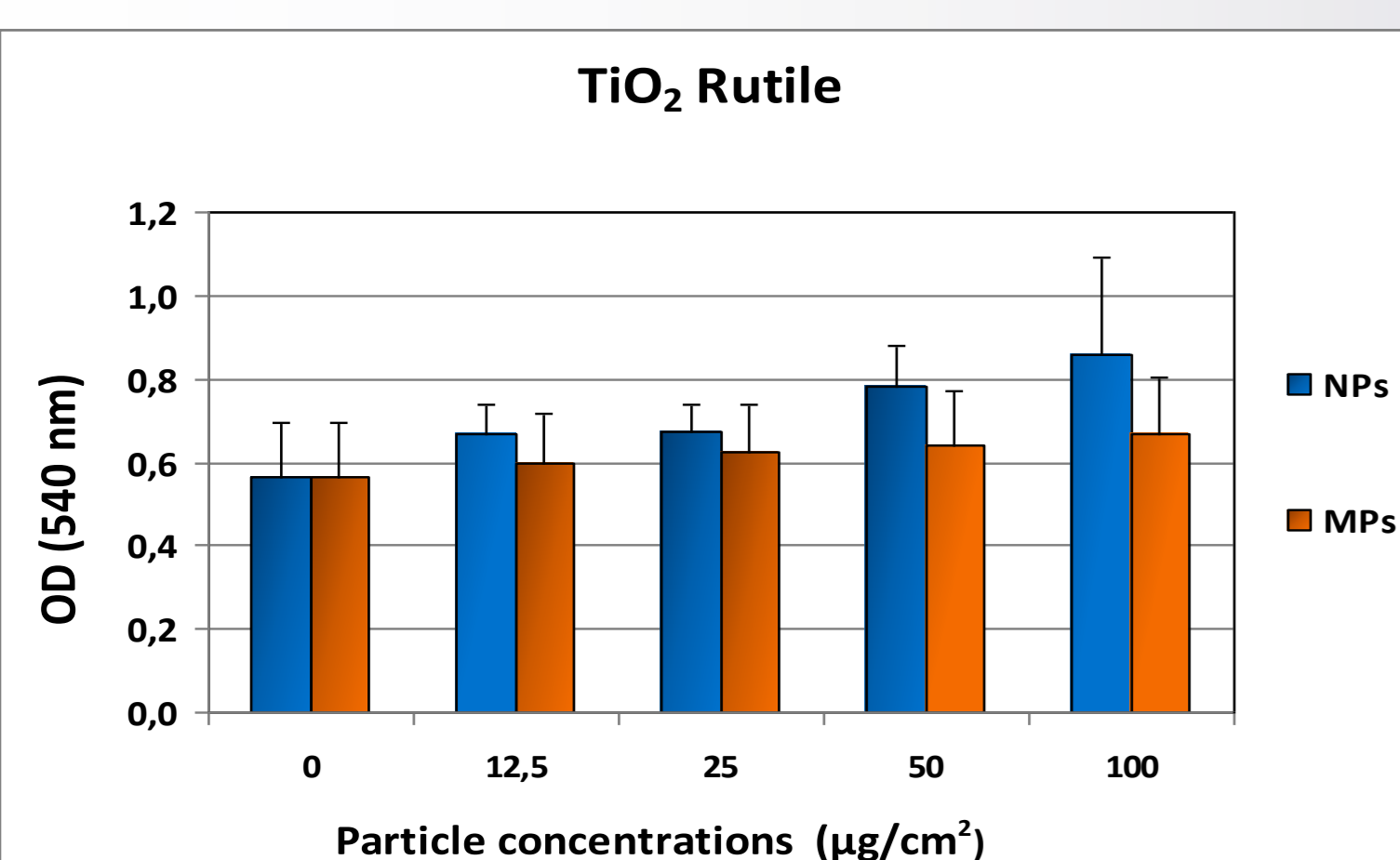


Figura 4: valori di Densità Ottica misurati nelle piastre da 96 pozzetti senza cellule ma trattate con TiO<sub>2</sub> Rutile (in micro e nano forma) e processate come per la determinazione del NRU. Risultati analoghi sono stati ottenuti anche con il TiO<sub>2</sub> Anatase e la struttura cristallina mista Rutile-Anatase.

## Discussione-2

Come riportato in Figura 3, **non è stata osservata tossicità** per ognuna delle concentrazioni e tipologie di NP oggetto di studio. Viceversa, è stato indicato un aumento dose dipendente dei valori dell'assorbanza probabilmente a causa della forte adesione delle NP sul fondo dei pozzetti. Dall'analisi dei risultati ottenuti utilizzando il saggio del Rosso Neutro per testare la vitalità cellulare dopo esposizione a NP di TiO<sub>2</sub>, si conclude che le NP utilizzate manifestano una notevole interferenza con le procedure di saggio. Il protocollo sperimentale, effettuato secondo le SOP definite da ICVAM, ha presentato un'interferenza dei controlli delle particelle con il sistema di saggio superiore ai limiti di accettabilità previsti dal protocollo stesso.

Il presente studio mostra che il saggio del **Rosso Neutro**, nelle condizioni sperimentali applicate, **non è risultato completamente adeguato a determinare la citotossicità di particelle di TiO<sub>2</sub>** ed è consigliabile pertanto utilizzare sia gli accorgimenti raccomandati dall'appendice R7-1 della Linea guida ECHA sugli obblighi di informazione e valutazione della sicurezza chimica sia saggi diversi per confermare i dati relativi all'endpoint o all'effetto considerato.

## Risultati- 3: Saggi di genotossicità

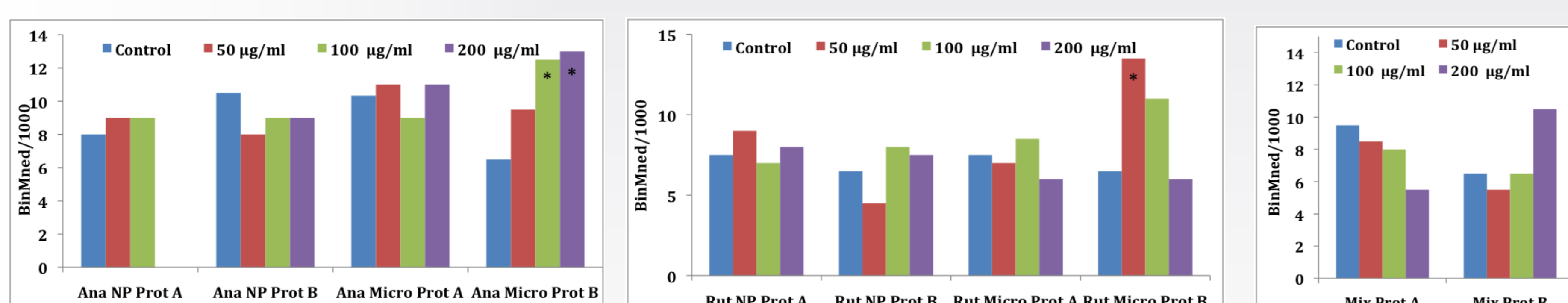


Figure 5: Test del micronucleo. Media di 2 esperimenti indipendenti con TiO<sub>2</sub> Anatase e Rutile nano e microparticellare, e con il mix Rutile-Anatase, utilizzando i due diversi protocolli sperimentali (A e B).

Il trattamento con il Titanio ha prodotto un debole incremento di micronuclei solo con la forma **micro** sia dell'**anatase** che del **rutile**. Non si è, invece, osservato nessun aumento di micronuclei dopo trattamento con la forma **nano** dell'**anatase**, del **rutile** e del **mix**. Sono tuttavia in corso ulteriori analisi per chiarire l'effettivo significato biologico degli aumenti osservati in assenza di una chiara relazione dose effetto. Sulla base delle presenti osservazioni il protocollo B sembra essere più efficace per il rilevamento dell'induzione di Mn con il Titanio.

## Discussione- 3

Le cellule mononucleari di sangue periferico si sono dimostrate un ottimo sistema per il rilevamento degli effetti genotossici delle particelle di Titanio come dimostrato in questo studio nel quale la genotossicità è stata valutata attraverso due differenti approcci che evidenziano due differenti tipi di danno al DNA.

Il test del micronucleo è stato condotto sulle cellule linfocitarie secondo quanto indicato nella linea guida OCSE 487 tenendo conto delle peculiari caratteristiche delle nanoparticelle sull'utilizzo della Cyt B nel test come è anche emerso dal recente workshop OCSE sulla genotossicità dei nanomateriali.

I due protocolli hanno mostrato una differente sensibilità sottolineando l'importanza della scelta del corretto intervallo di trattamento.

Il saggio della cometa ha confermato essere un test molto sensibile, in grado di mettere in evidenza la presenza di rotture al DNA anche a dosi molto basse di trattamento. Inoltre, poiché l'analisi del danno avviene a livello di singole cellule, questo saggio è in grado di evidenziare la presenza di sottopopolazioni cellulari maggiormente suscettibili al danno. Ulteriori analisi sono in corso per confermare la presenza e la natura di queste sottopopolazioni cellulari.

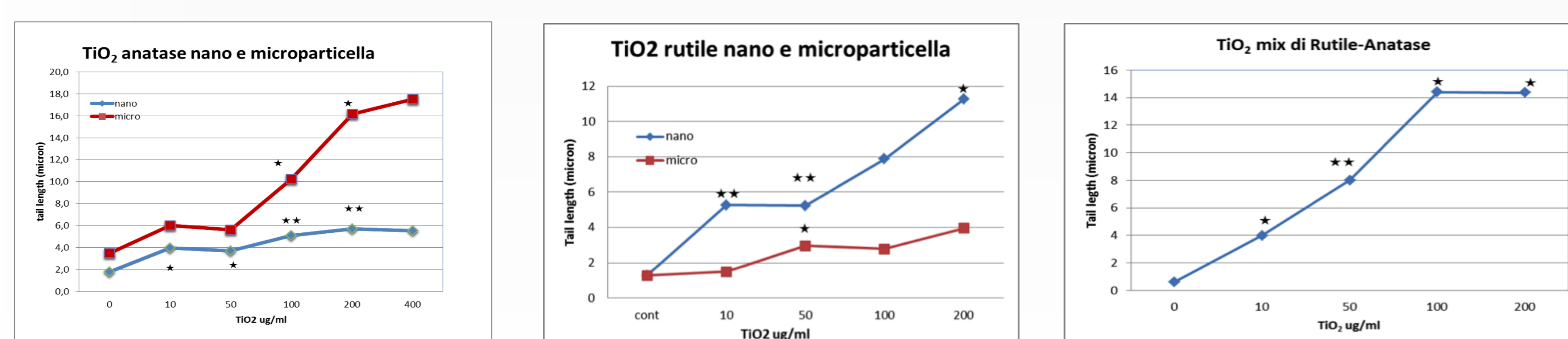


Figure 6: Saggio della cometa. Valori di Tail length dopo 24 ore di trattamento con TiO<sub>2</sub> Anatase, Rutile nano e microparticellare, e con il mix Rutile-Anatase.

Un lieve, ma significativo aumento delle rotture a singolo e doppio filamento sul DNA, indicato dal valore di lunghezza della coda della cometa (tail length), è stato osservato dopo trattamento con le nanoparticelle di TiO<sub>2</sub> anatase, rutile e mix a partire dalle dosi più basse testate.