

Stato dell'arte e prospettive della valutazione tossicologica di nanomateriali ingegnerizzati

Francesca Pacchierotti

ENEA, CR Casaccia
Laboratorio di Tossicologia

Il concetto che le nanoparticelle possano avere specifiche proprietà tossiche deriva da studi classici sulla tossicologia delle fibre e sugli effetti attribuiti alla frazione ultrafine del particolato atmosferico.



Pericolo (hazard) e rischio (risk) non sono la stessa cosa

Gli approcci usati per la caratterizzazione del pericolo sono:

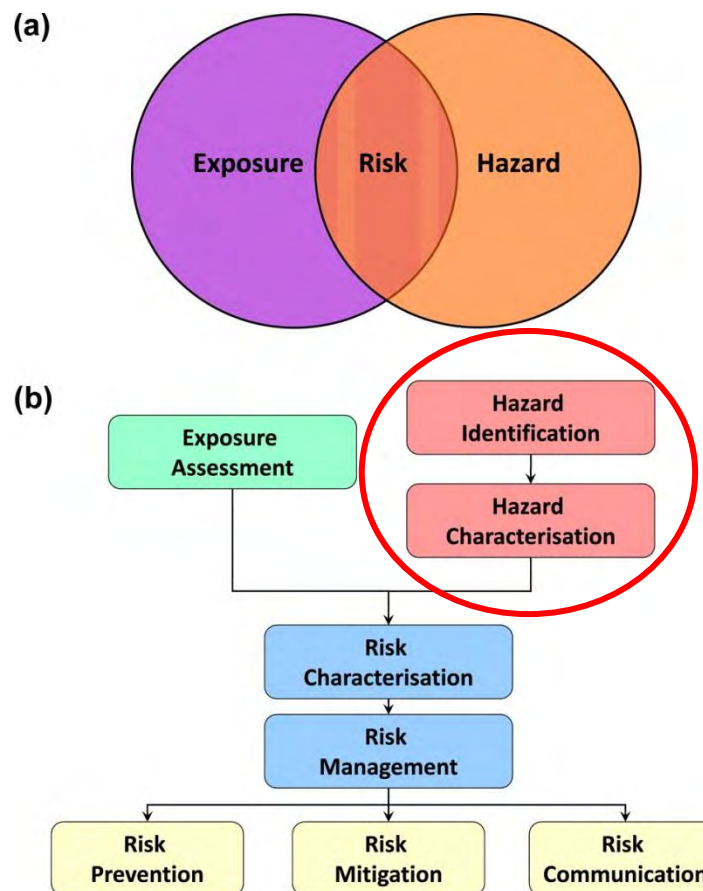
Test validati di tossicità

Relazioni struttura-attività

Studi di farmacocinetica

Studi su meccanismi d'azione

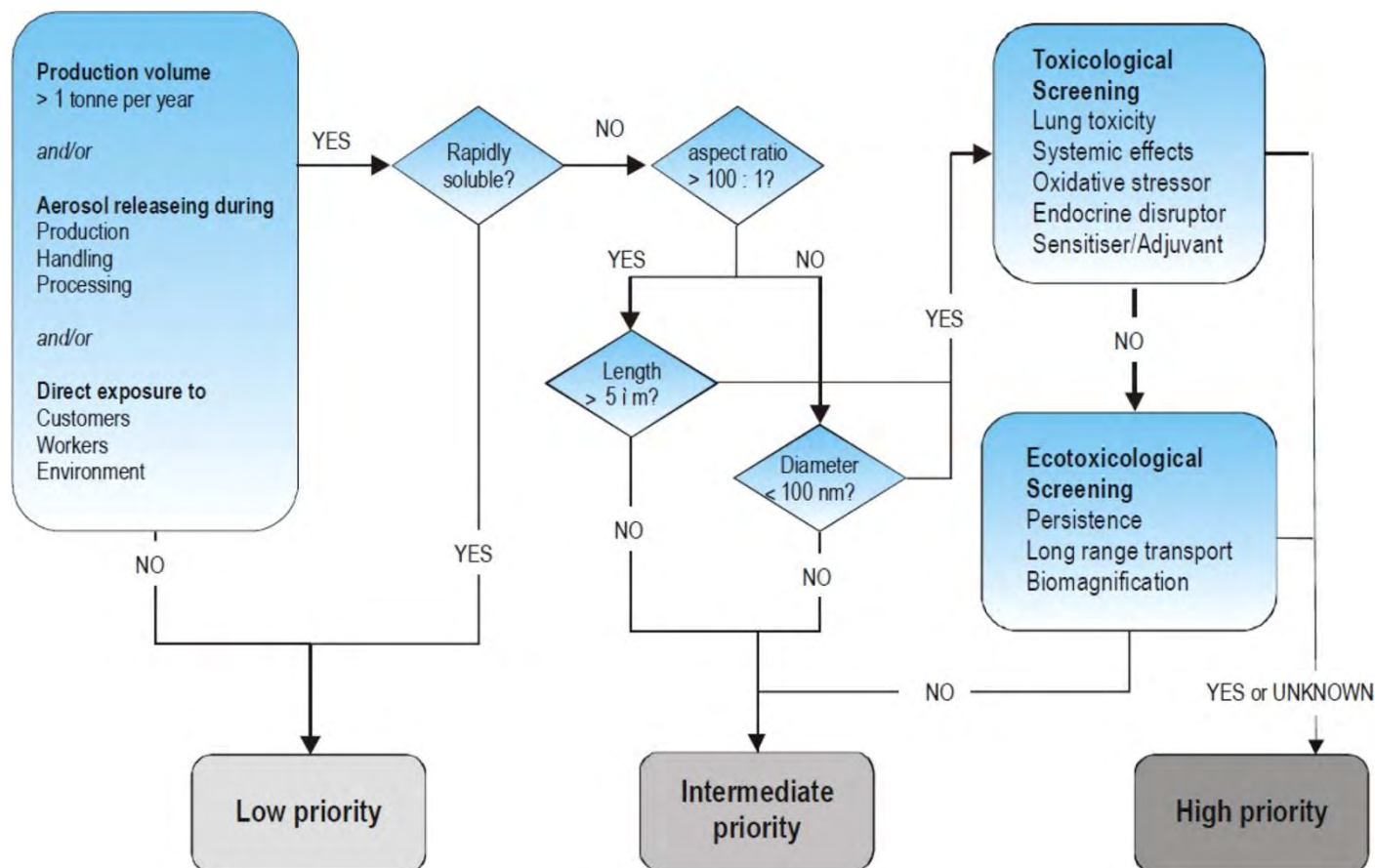
Modelli di estrapolazione vitro-vivo



(a) Risk as a function of hazard and exposure, if there is no hazard or no exposure, there will be no risk. (b) Risk assessment and risk management regarding possible adverse substances or materials.

- ❑ Selezione dei materiali da valutare
- ❑ Caratterizzazione delle proprietà fisico-chimiche
- ❑ Dispersione dei materiali in studio
- ❑ Selezione delle dosi
- ❑ Selezione dei modelli sperimentali, bersagli ed effetti
- ❑ Sviluppo di metodi alternativi all'uso di animali

- ❑ La varietà dei nanomateriali è molto ampia e aumenta considerando funzionalizzazioni e metodi di produzione
- ❑ Le caratteristiche chimico-fisiche influenzano la tossicità
- ❑ Le risorse sono limitate
- Quali criteri per stabilire le priorità di analisi
 - Potenziale impatto sulla salute > volumi di produzione ed usi
 - Potenziale tossicità > dati sperimentali
 - Studi di verifica di ipotesi sull'impatto delle caratteristiche FC
 - sistematicamente testati gli effetti di variazioni delle proprietà chimico-fisiche
 - hanno la maggiore capacità di generare informazioni utili allo sviluppo di prodotti intrinsecamente sicuri ("safe by design")
 - richiedono materiali molto omogenei con caratteristiche precise anche prodotti ad hoc



Preliminary scheme (decision tree) for the hazard characterization of ENMs.

- Le variabili sono molte
- I metodi per misurarle sono diversi e spesso generano dati diversi
- Non c'è ancora consenso su metodi e variabili
- La caratterizzazione è necessaria sia del materiale secco che di quello nel mezzo di dispersione, prima, durante e dopo il test
- Le risorse sono limitate
- Pochi laboratori sono attrezzati per condurre e interpretare una caratterizzazione approfondita
- Il livello di caratterizzazione FC andrebbe valutato sulla base dell'obiettivo dello studio
 - Caratterizzazione approfondita: studi di verifica di ipotesi sull'impatto delle proprietà FC
 - Caratterizzazione di base a fini di riproducibilità e confronto

ENM Libraries

Compositions

Metal Oxides

TiO₂, CeO₂, ZnO
CuO, NiO, Cr₂O₃

Metals

Au, Ag, Pt, Co

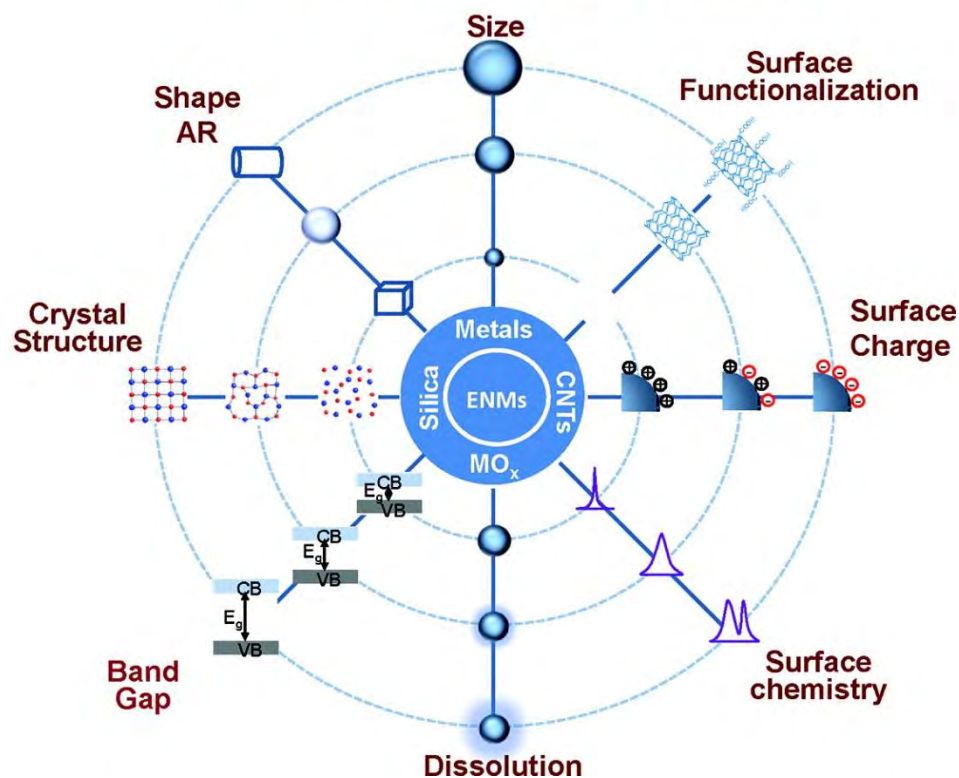
Carbon Nanotubes

SWCNT, MWCNT

Silica

Amorphous
Fumed,
Crystalline,
Mesoporous

Combinatorial variation of properties



Use of compositional and combinatorial ENM libraries, including metals, metal oxides, carbon nanotubes, and silica-based nanomaterials, to perform mechanism-based toxicological screening that links material composition and systematic variation of specific properties to biological outcome.

- ❑ I nanomateriali in sospensione tendono ad agglomerarsi e/o aggregarsi.
- ❑ Questi fenomeni influenzano la tossicità.
- ❑ Anche le procedure e i mezzi di dispersione possono influenzare la tossicità (interazione materiale-mezzo, produzione di composti tossici dal veicolo ...)
- Il grado di dispersione e il modo di ottenerla dipendono dall'obiettivo dello studio
 - Massima dispersione > studio mirato alla verifica di ipotesi sull'impatto delle caratteristiche FC
 - Dispersione simile a quella di uno scenario reale di esposizione > preferibile, anche se lo scenario reale è ancora poco noto perché mancano informazioni circa il comportamento di nanomateriali nelle matrici ambientali e biologiche

- ❑ Gli studi tossicologici sinora hanno probabilmente utilizzato dosi superiori a quelle dei possibili scenari di esposizione umana
- ❑ Gli scenari reali sono ancora poco noti (mancanza di strumenti e approcci adeguati).
- ❑ Pochi studi sinora hanno valutato gli effetti di esposizioni ripetute o croniche.
- ❑ Manca ancora un consenso sulla metrica da usare per esprimere le dosi usate negli esperimenti di tossicologia (specifiche proprietà FC possono diversamente influenzare i diversi effetti biologici)
- In assenza di scenari di esposizione noti il disegno degli studi tossicologici deve prevedere un ampio intervallo di dosi che permettano di individuare NOAEL e LOAEL
 - > meno sostanze e migliori curve dose-effetto.

□ Modelli sperimentali e bersagli

- L'esposizione umana a nanomateriali può avvenire per inalazione, ingestione o contatto con la pelle > tutti gli organi coinvolti in queste vie devono essere considerati potenziali bersagli
- Studi di biodistribuzione devono essere condotti per identificare ulteriori organi bersaglio e per interpretare i risultati dei test in vivo (gli effetti sistemici possono essere causati da fenomeni di traslocazione dei nanomateriali, ma anche causati a distanza da mediatori chimici)
- Le tecniche di rilevamento delle nanoparticelle come tali a livello di organi e tessuti devono essere ottimizzate

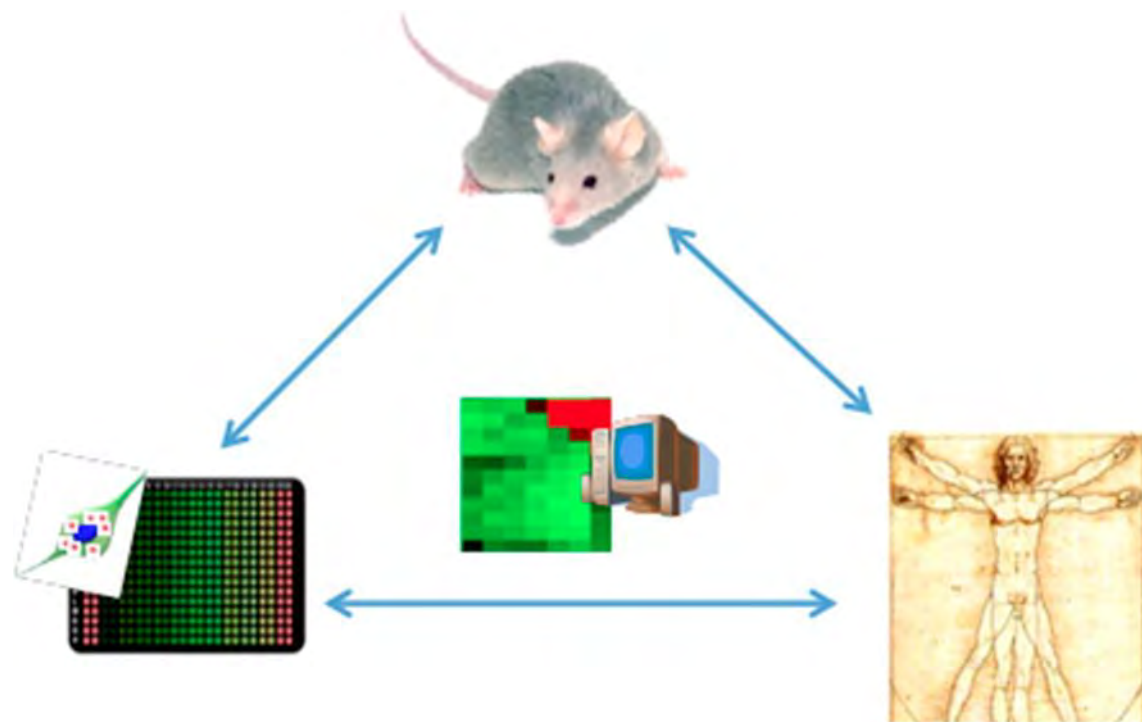
□ Effetti

- La citotossicità in vitro può essere usata per uno screening iniziale e per la determinazione del range di dosi sub-tossiche da valutare per altri effetti
- Lo stesso effetto andrebbe valutato mediante test indipendenti (possibile interferenza dei materiali in studio con i test tossicologici in vitro)
- Lo stress ossidativo ed i fenomeni infiammatori devono essere sempre valutati alla luce delle conoscenze sugli effetti della frazione ultrafine del particolato atmosferico

- ❑ Difficoltà di riprodurre in vitro:
 - i fenomeni infiammatori
 - i fenomeni di traslocazione
 - la contrattilità polmonare e cardiaca
 - le esposizioni croniche o cumulative
- ❑ I test in vitro sono comunque utili per valutare l'impatto delle caratteristiche FC sulla tossicità, per improntare e validare modelli struttura-attività (studi in silico), per una iniziale valutazione dell'uptake intracellulare
- ❑ Nuova generazione di modelli sperimentali in vitro più complessi e pluricellulari
- ❑ Attualmente i test in vivo non sono eliminabili, ma questo può essere un obiettivo a lungo termine

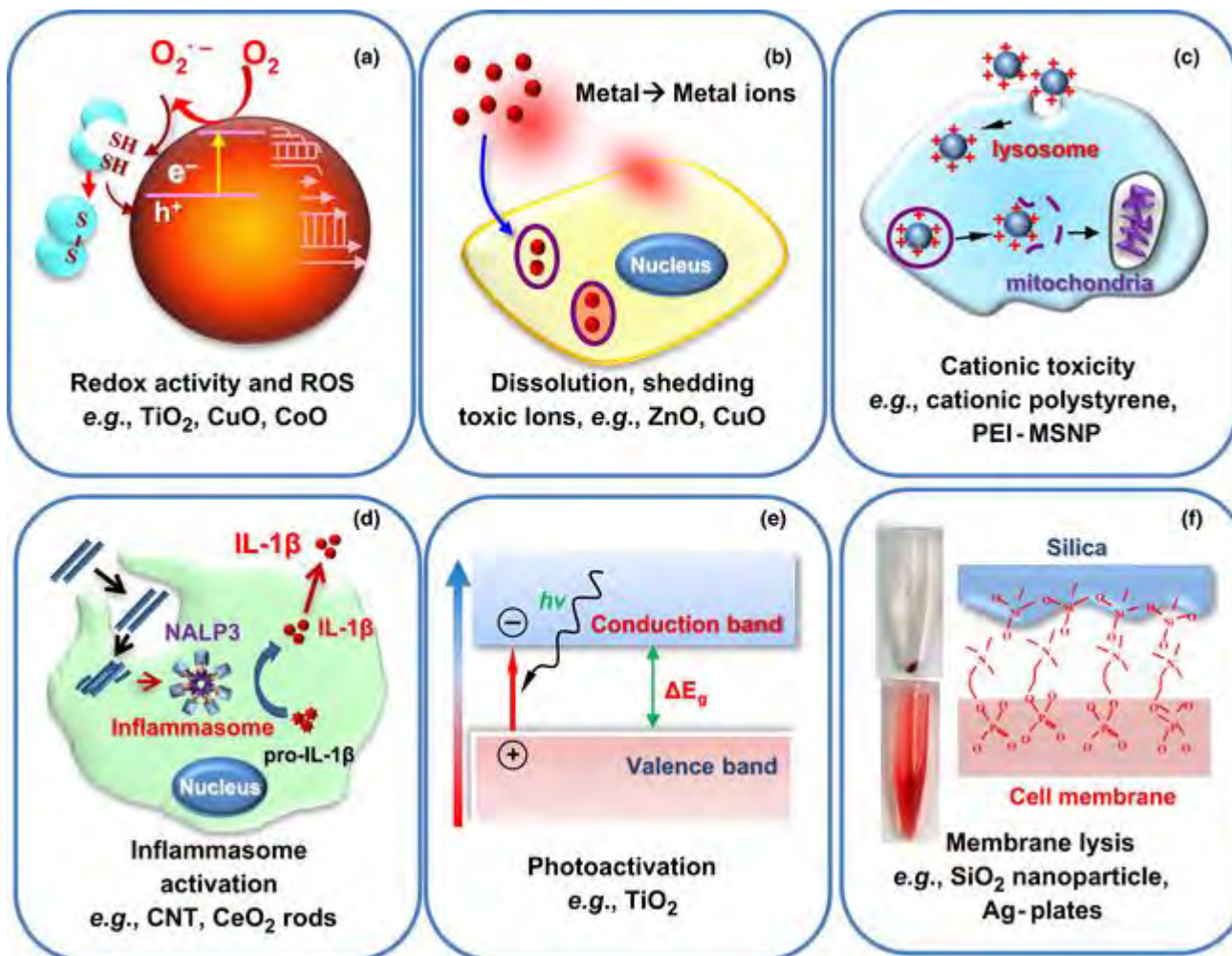
Il paradigma dell'approccio alla valutazione tossicologica sta cambiando

Dalla descrizione di CIO' che accade alla caratterizzazione di COME si esplicano gli effetti avversi



- > Sviluppo tecnologico
- > Importanza dei modelli in vitro
- > Comprensione dei meccanismi di tossicità o “pathways of toxicity”

Alcuni possibili meccanismi di "nanotossicità"



Criticità

- > grande varietà di materiali da testare
- > limitazioni all'uso di animali da laboratorio

Strategia di valutazione della tossicità polmonare di NM aerodispersi

1. HC HT Test in vitro basati su meccanismi di tossicità per “ranking, grouping and prioritization”
2. Test a breve termine di instillazione tracheale in roditori per validazione dei risultati in vitro e correlazione dei Meccanismi di Tossicità con patologia polmonare
3. Test di esposizione cronica inalatoria per l'estrapolazione alle condizioni di esposizione umana

Per le sostanze sottoposte a classificazione e regolamentazione la tossicità e la genotossicità devono essere valutate mediante test validati seguendo linee guida ufficiali OCSE

L'OCSE coordina un programma finalizzato alla eventuale revisione delle linee guida in relazione alla loro applicazione ai nanomateriali

Novembre 2013: Workshop on the Genotoxicity of Manufactured Nanomaterials

> Molti dati sono inconclusivi per:

mancanza di caratterizzazione fisico-chimica

applicazione di metodologie non standardizzate

mancanza di un nanomateriale controllo positivo

mancanza di un'interpretazione dei risultati basata sui meccanismi molecolari

mancanza di conferme in vivo degli effetti in vitro

> I dati sinora raccolti indicano la necessità di alcune modifiche

> Non tutte le modifiche necessarie sono state ancora chiarite e pertanto non è stato avviato un percorso ufficiale di revisione delle Linee Guida, ma sarà pubblicato un documento di raccomandazioni (Guidance Document)

> Alcuni test sono inadeguati (Ames test)

> E' possibile che la strategia di testing vada rivista, ma questo non rientra tra i compiti di OCSE

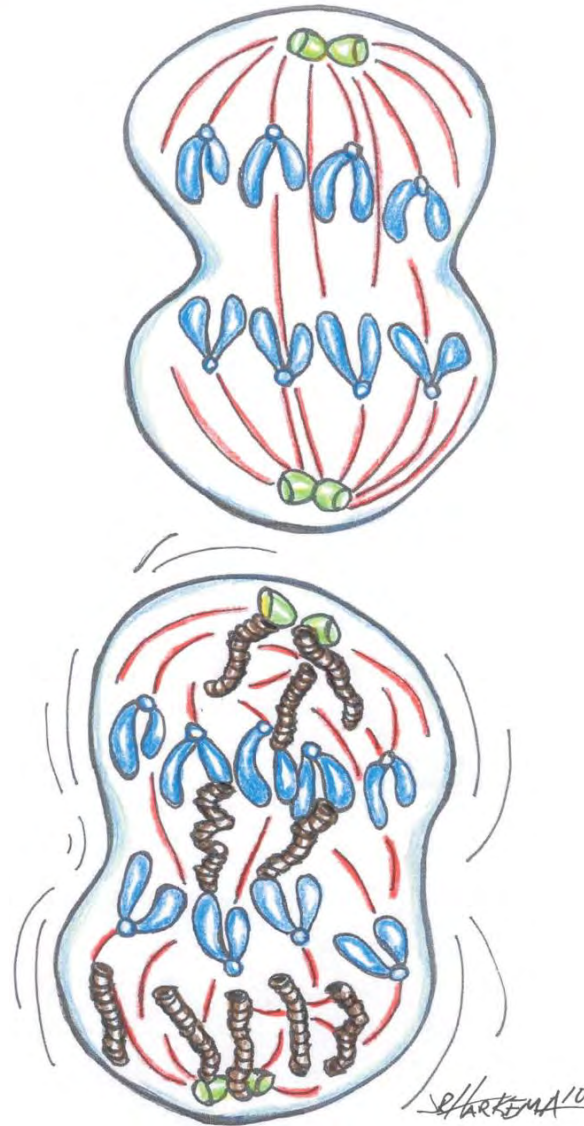
I nanotubi possono interagire e formare ibridi con biomolecole

Al momento della divisione cellulare la membrana nucleare si dissolve

I nanotubi penetrati all'interno delle cellule possono entrare in contatto diretto con i cromosomi e l'apparato mitotico

Nanotubi di carbonio a singola parete inducono errori di segregazione cromosomica in cellule in coltura

Sargent et al Mutat Res.
2012;745:28.



Hubbs A F et al. *Toxicol Pathol* 2010;39:301-324

- ❑ Nonostante le ricerche condotte i dati sono ancora insufficienti per ottenere stime di rischio che possano informare le procedure di regolamentazione dei nanomateriali
- ❑ Gli studi proseguono in modo sempre più coordinato con un'attenzione crescente alle finalità di regolamentazione e armonizzazione a livello internazionale
- ❑ Nei centri di ricerca più avanzati sono in corso programmi di screening mediante tecniche “high-content, high-throughput”, che interpretano la nuova tossicologia basata sui meccanismi d'azione e potranno contribuire all'obiettivo della classificazione dei nanomateriali e allo sviluppo di modelli struttura-attività
- ❑ Il prossimo obiettivo dovrà essere quello di individuare il set più appropriato di test per la identificazione e caratterizzazione della tossicità, ottimizzando l'uso degli animali
- ❑ Seguendo un approccio pragmatico, sono state proposte alcune strategie per ottenere dai dati disponibili un “approximate risk assessment” contrapposto al “comprehensive risk assessment”

