

POTENZIALE FATTORE DI RISCHIO EMERGENTE PER LA SALUTE RIPRODUTTIVA E LE MALFORMAZIONI CONGENITE: I NANOMATERIALI

Roberta Tassinari, Federica Aureli, Marilena D'Amato, Gabriele Moracci, Andrea Raggi,
Francesco Cubadda, Francesca Maranghi
Dipartimento di Sanità Pubblica Veterinaria e Sicurezza Alimentare, Istituto Superiore di Sanità, Roma

Introduzione

La Commissione Europea definisce un nanomateriale come: “un materiale naturale, derivato (accidentalmente) o fabbricato contenente particelle, allo stato libero o sotto forma di aggregato o di agglomerato, in cui, per almeno il 50% delle particelle nella distribuzione dimensionale numerica, una o più dimensioni esterne siano comprese tra 1 e 100 nm” e “in casi specifici e laddove le preoccupazioni per l’ambiente, la salute, la sicurezza e la competitività lo giustificano, la soglia del 50% della distribuzione dimensionale numerica può essere sostituita da una soglia compresa fra l’1 e il 50%” (1). I nanomateriali sono pertanto formati da parti funzionali distinte, le nanoparticelle, che hanno una o più dimensioni esterne nell’ordine di grandezza fino a 100 nm.

Nanoscienze e nanotecnologie sono campi in forte espansione con vaste ricadute industriali e sugli aspetti della vita quotidiana, in quanto i nanomateriali trovano applicazioni che incoraggiano sviluppi tecnologici impensabili solo alcuni anni addietro.

Le dimensioni “nano” e la struttura ingegnerizzata determinano proprietà diverse dallo stesso materiale non in nano-forma, attribuibili soprattutto all’elevato rapporto fra area superficiale e volume, quali l’aumentata reattività e la maggiore tendenza a formare legami. Ciò determina: i) differenti interazioni con la fisiologia umana e con l’ambiente (le nanoparticelle possono avere dimensioni simili alle strutture sub-cellulari); ii) diverse o specifiche proprietà tossicologiche delle sostanze in nano-forma rispetto ai corrispondenti materiali convenzionali non nanostrutturati (*bulk material*); iii) rischio potenziale per la salute umana e l’ambiente difficile da estrapolare sulla base dei dati attualmente disponibili ottenuti mediante testing tossicologico “tradizionale”.

In relazione all’esposizione alimentare, i nanomateriali possono essere considerati un rischio emergente: alcuni di essi sono prodotti di nuova sintesi e rappresentano pertanto un “potenziale pericolo di nuova identificazione per il quale si può verificare una significativa esposizione”, mentre altri sono prodotti già conosciuti (sebbene mai valutati in nano-forma) per i quali aumenta in maniera significativa la produzione e l’utilizzo, quindi rappresentano “un potenziale pericolo noto per i quali si verifica inaspettatamente una nuova e aumentata esposizione”(2). Esempi di questo secondo caso sono il diossido di silicio e di titanio, additivi alimentari autorizzati per i quali solo recentemente è divenuta chiara l’esistenza di un’ampia distribuzione dimensionale, inclusa una frazione sulla nanoscala, conseguenza delle tecniche di produzione impiegate (3, 4).

Le attuali incertezze nella valutazione del rischio dei nanomateriali e delle loro possibili applicazioni derivano principalmente dalla limitatezza dei dati tossicologici e di esposizione al momento disponibili. Specificamente, tali incertezze risiedono sia nella difficoltà di

caratterizzare e quantificare i nanomateriali nei prodotti di uso comune in cui sono sempre più largamente impiegati, negli alimenti e nei mangimi, nelle matrici biologiche, sia nella scarsità di informazioni disponibili sulla tossicocinetica e sugli effetti tossicologici in generale. Insufficienti dati tossicologici e limitata conoscenza dei livelli d'uso correnti e della potenziale esposizione della popolazione generale ostacolano la fase di caratterizzazione del rischio. Si ritiene che il modello di valutazione del rischio tradizionale (identificazione del pericolo, caratterizzazione del pericolo, valutazione dell'esposizione e caratterizzazione del rischio) possa essere applicato anche ai nanomateriali ma che debba prendere in considerazione alcune loro proprietà specifiche (es. composizione chimica, dimensioni delle particelle primarie/secondarie, forma fisica e morfologia, concentrazione di massa particellare, area superficiale specifica, chimica superficiale, carica superficiale, potenziale redox, reattività chimica, ecc.) in aggiunta a quelle dei materiali equivalenti non in nano-forma che possono modificarne l'attività biologica (5).

L'esposizione ai contaminanti chimici può rappresentare un fattore di rischio ambientale per la salute riproduttiva e per l'insorgenza di malformazioni congenite. Le cause delle malformazioni congenite possono essere ad eziologia multifattoriale, sia di natura genetica che ambientale (6). Un fattore di rischio ambientale può provocare effetti sulla salute riproduttiva e sul nascituro attraverso diverse modalità d'azione, in particolare con: i) azione mutagenica pre-concezionale (per esposizione materna o paterna); ii) azione teratogena post-concezionale (per esposizione materna); iii) effetti mediati dall'interferenza endocrina (per esposizione materna), e infine iv) azione epigenetica (per esposizione materna o paterna). Non è possibile al momento stabilire se i nanomateriali possano esercitare una o più di queste azioni, tuttavia nel caso di nanomateriali inorganici e biopersistenti alcune evidenze emerse in tempi recenti unite al forte incremento produttivo e, di conseguenza, alla crescente esposizione, dovrebbero indurre a considerare con attenzione i nanomateriali nella valutazione del rischio per la riproduzione e lo sviluppo.

La popolazione generale può essere esposta ai nanomateriali come risultato di scenari diversi, attraverso l'ambiente di vita e lavoro, l'uso di prodotti cosmetici e attraverso la dieta. Particelle nel range dimensionale "nano", di origine sia antropogenica che naturale, possono fare ingresso come contaminanti a vari livelli della catena alimentare, ad esempio come residui negli alimenti di prodotti agro-chimici o di farmaci veterinari contenenti nanoparticelle oppure sotto forma di contaminanti ambientali che derivano dalla produzione, utilizzo e smaltimento di altri prodotti ottenuti con nanotecnologie, quali prodotti elettronici, medicali, cosmetici, ecc. Uno scenario diverso è rappresentato dall'uso intenzionale che origina dall'applicazione delle nanoscienze e delle nanotecnologie al settore agroalimentare. I materiali a contatto con gli alimenti rappresentano al momento la maggiore applicazione. L'aggiunta di nanomateriali nei polimeri utilizzati nei contenitori alimentari possono ridurre la loro permeabilità e l'ingresso di ossigeno e prolungare la *shelflife* dell'alimento. In linea di principio le nanoparticelle presenti nei materiali a contatto non dovrebbero migrare negli alimenti; un esempio è il nitrato di titanio, autorizzato per l'utilizzo nelle bottiglie di PET. Esempi di nanoparticelle proposte/utilizzate in ambito alimentare sono le particelle di nano-argento per impedire la proliferazione batterica, mantenere la freschezza dei cibi e la loro conservazione o i silicati inclusi in bottigliette di birra in polietilene per impedire la dispersione dei gas (7). Inoltre, come già accennato, alcuni additivi alimentari autorizzati contengono una frazione in nanoforma (es. E551 diossido di silicio, antiagglomerante; E171 diossido di titanio, colorante) (3, 4). I diversi scenari si possono combinare dando luogo a pattern espositivi complessi.

Nell'ambito della sicurezza alimentare, a livello dell'Autorità Europea per la Sicurezza Alimentare (*European Food Safety Authority*, EFSA), è emersa la necessità di generare nuovi dati che tengano conto delle caratteristiche dei nanomateriali in grado di modularne l'attività

biologica con meccanismi ed effetti non ancora chiariti (8). La valutazione del rischio dei nanomateriali presenta, fra le priorità, lo studio della cinetica, della biodistribuzione e della genotossicità. Inoltre diverse agenzie internazionali (*Agency for Toxic Substances and Disease Registry*, ATSDR; *US Environmental Protection Agency*, US EPA) considerano prioritario lo studio delle malformazioni congenite e i disordini a carico dell'apparato riproduttivo (9). Considerando lo scenario delineato e le diverse raccomandazioni, appare prioritaria la valutazione degli effetti tossicologici dei nanomateriali sullo sviluppo e sul sistema riproduttivo sia maschile che femminile e le possibili ricadute nelle generazioni future.

Effetti sullo sviluppo e sul sistema riproduttivo: l'esempio del titanio in nano-forma

Gli studi *in vitro* e *in vivo* concernenti la tossicità dello sviluppo e del sistema riproduttivo di nanomateriali non sono molto numerosi. Tuttavia, i pochi studi presenti in letteratura hanno evidenziato che le nanoparticelle possono attraversare la barriera placentare e raggiungere l'embrione/feto, con modalità e concentrazioni dipendenti dalle dimensioni e dalla carica superficiale delle nanoparticelle (10).

Negli ultimi anni, le nanoparticelle di diossido di titanio (TiO₂) sono state sempre più utilizzate ad esempio nei cosmetici, nelle creme solari, come dispositivi per il *drug delivery* e in prodotti di uso comune (dalle vernici, agli inchiostri, alla carta). Il TiO₂ non nano-strutturato è considerato un composto inerte e praticamente atossico per l'uomo e l'ambiente e per questo è autorizzato nell'Unione Europea come additivo alimentare (E171).

Dati di letteratura evidenziano alcuni effetti delle nanoparticelle di TiO₂ sulle gonadi maschili e femminili. La somministrazione sub-cutanea (100 µL, concentrazione 1 mg/mL) di anatasio (25-70 nm) a topine gravide, nei giorni di gravidanza (GD) 3, 7, 10 e 14 causa la deposizione di aggregati di biossido di titanio (TiO₂) (100-200 nm) nelle cellule testicolari dei maschi a 4 giorni e 6 settimane dalla nascita; inoltre a 6 settimane dalla nascita si osservano effetti istopatologici e alterazione della spermatogenesi nei maschi F1 (11). Studi *in vitro* con nanoparticelle di TiO₂ (25-70 nm) evidenziano la riduzione della vitalità e proliferazione della linea cellulare spermatica TM3 (12). La somministrazione orale (10 mg/kg pc/die) per 90 giorni a topi adulti femmina indica che le nanoparticelle-TiO₂ (anatasio, 5-6 nm) possono accumularsi nelle ovaie inducendo effetti istopatologici, alterazione dei livelli sierici degli ormoni sessuali e riduzione della fertilità (6). Altri studi hanno messo in luce che nanoparticelle di TiO₂ (75% anatasio e 25% rutilo, 21 nm) possono provocare effetti genotossici nel feto e danno al DNA a seguito di somministrazione orale (acqua da bere) a 500 mg/kg pc per 10 giorni dal GD 8,5 al 18,5 (14). Inoltre l'esposizione durante la vita uterina può provocare effetti a lungo termine; infatti a seguito di somministrazione intranasale a topine gravide, (GD 14, 50 mg/animale) di dimensioni respirabili (< 10 µm) si verifica nella F1 un aumento della suscettibilità alle allergie (15).

Tali evidenze mostrano l'opportunità di approfondire lo studio di questi *endpoint* e l'esigenza, in particolare, di indagare gli effetti tossicologici sul sistema riproduttivo ed endocrino delle nanoparticelle di TiO₂ a seguito di esposizione orale, a dosi comparabili con l'esposizione umana attesa.

In questo contesto, nei laboratori del Reparto di Tossicologia alimentare e veterinaria dell'Istituto Superiore di Sanità è stato recentemente condotto uno studio che prevedeva la somministrazione per via orale di nanoparticelle di TiO₂ (anatasio), per 5 giorni consecutivi, a ratti adulti maschi e femmina (7 sesso/gruppo), di dosi (controllo, solo veicolo acqua distillata, 1

e 2 mg/kg pc/die) (16) coerenti con la potenziale esposizione umana attraverso gli alimenti (4). Lo studio ha previsto una fase iniziale di caratterizzazione delle nano particelle – analisi mediante TEM (*Transmission Electron Microscope*) e SEM (*Scanning Electron Microscope*) – e della sospensione impiegata per la somministrazione agli animali.

La tossicità generale, il peso e il consumo di mangime sono stati controllati giornalmente. Per verificare la biodistribuzione e il potenziale bioaccumulo delle nanoparticelle nei gruppi di trattamento rispetto al controllo, è stata prelevata la milza dei ratti e misurata la concentrazione di titanio mediante uno spettrometro di massa con sorgente al plasma dotato di cella di reazione dinamica (ICP-DRC-MS: *Inductively Coupled Plasma-Dynamic Reaction Cell-Mass Spectrometer*) mentre l'analisi con microscopio elettronico a scansione (SEM-EDX, *Energy Dispersive X-ray*) è stata utilizzata per valutare la presenza di nanoparticelle o loro aggregati nel tessuto.

Gli effetti a carico del sistema riproduttivo-endocrino sono stati indagati mediante l'analisi istopatologica degli organi bersaglio (testicoli, utero, ovaie, milza, surreni, tiroide) e l'analisi dei livelli di biomarcatori biochimici su siero degli animali trattati e dei controlli (testosterone [T], estradiolo [E], triiodotironina [T3]).

La fase di caratterizzazione ha evidenziato uno spettro granulometrico compreso tra 10 nm e 1,6 µm; il 13% delle nanoparticelle-TiO₂ mostrava diametro inferiore a 100 nm. È stato messo in luce che aggregati di nanoparticelle-TiO₂ si depositano nella milza (SEM-EDX) senza determinare un significativo aumento della concentrazione del titanio totale (ICP-DRC-MS) nei gruppi trattati rispetto al gruppo di controllo.

In assenza di tossicità generale, l'analisi istopatologica ha mostrato i seguenti effetti nelle femmine:

- *ovaie*: aumento di apoptosi delle cellule della granulosa significativa in entrambi i gruppi di trattamento, indicatore di effetto diretto sull'organo;
- *tiroide*: aumento dell'altezza dell'epitelio follicolare significativa in entrambi i gruppi di trattamento, indicatore di funzionalità tiroidea;
- *surreni*: aumento dei nuclei picnotici sia nella corticale che nella midollare con diminuzione del rapporto tra l'area della corticale l'area della midollare, significativi solo alla dose alta, indicatore di funzionalità;
- *milza*: aumento significativo del rapporto tra l'area della polpa bianca e l'area della polpa rossa solo alla dose alta, indicatore di effetto sulla componente immunitaria della milza.

Nei maschi sono stati riscontrati i seguenti effetti:

- *tiroide*: aumento della desquamazione nel lume follicolare significativa in entrambi i gruppi di trattamento e di follicoli con forma irregolare significativa solo alla dose alta, indicatore di un effetto diretto e di funzionalità;
- *surreni*: aumento significativo dei nuclei picnotici nella midollare solo alla dose alta, indicatore di effetto diretto sull'organo.

I biomarcatori sierici hanno mostrato un aumento significativo dei livelli di T nei maschi e una diminuzione significativa nelle femmine solo alla dose alta. Il T3 risulta diminuito in maniera significativa nei maschi in entrambi i gruppi di trattamento (16).

Conclusioni

L'esempio delle nanoparticelle di TiO₂ evidenzia alcune criticità negli studi presenti in letteratura, concernenti i test tradizionali per la valutazione degli effetti sulla riproduzione e sullo sviluppo indotti dai nanomateriali.

Gli studi *in vivo* disponibili ad oggi generalmente prevedono somministrazioni di breve durata (1-10 giorni), alti livelli di dose e con vie di somministrazione scarsamente rilevanti per l'esposizione della popolazione generale (es. intraperitoneale, intravenosa, sottocutanea), generalmente dettati dall'esigenza di ottenere informazioni sulla cinetica e biodistribuzione tissutale del nanomateriale oggetto dello studio. Gli studi disponibili in letteratura inoltre spesso sono carenti di informazioni chiave riguardanti la tossicità materna e il passaggio transplacentare della nanoparticella, informazioni essenziali per la corretta interpretazione dei dati nel campo della tossicologia dello sviluppo. D'altro canto gli studi *in vitro* su sistemi cellulari umani utilizzano concentrazioni molto elevate, circostanza che potrebbe non consentire di evidenziare correttamente i meccanismi di azione, in quanto questi possono essere diversi in funzione delle dosi utilizzate.

I dati ottenuti nel presente studio indicano, per la prima volta, che nanoparticelle di TiO₂ quando somministrate per via orale a ratti adulti – anche per un breve periodo di esposizione - a dosi comparabili con l'esposizione umana causano, in assenza di tossicità generale e di evidente deposizione nei tessuti (misurata come titanio mediante ICP-DRC-MS), effetti genere-specifici sui sistemi endocrino e riproduttivo; in particolare si potrebbe ipotizzare un meccanismo delle nanoparticelle di TiO₂ a livello endocrino direttamente sulle ovaie e sul metabolismo del testosterone.

Ulteriori studi sono in corso con differenti nanomateriali per chiarire bersagli e meccanismi d'azione, considerando che la caratterizzazione degli effetti legati alla rete endocrino-riproduttiva merita ulteriori approfondimenti per la valutazione della sicurezza dei nanomateriali.

I dati discussi evidenziano che l'esposizione a nanomateriali dovrebbe essere maggiormente studiata quale potenziale fattore di rischio ambientale per la salute riproduttiva e per l'induzione di malformazioni congenite in entrambi i sessi. In particolare, alcuni nanomateriali potrebbero avere effetti sul sistema riproduttivo ed endocrino e, considerando il ruolo chiave di una corretta omeostasi ormonale nella gravidanza per il regolare sviluppo embrionale, risulta importante caratterizzare meccanismi ed effetti sulla diade madre-bambino. Inoltre, i nanomateriali potrebbero causare effetti avversi sulle gonadi femminili e maschili, causando ad esempio sottili cambiamenti genetici/epigenetici potenzialmente trasmissibili alle generazioni future. In ultimo è stato evidenziato, almeno per alcuni nanomateriali, il passaggio attraverso la barriera placentare: di conseguenza non si possono escludere effetti avversi sull'embriogenesi attraverso l'interazione con il DNA e/o altre macromolecole fetali.

Dunque, nell'ambito della valutazione della tossicità dello sviluppo e riproduttiva, per salvaguardare la salute riproduttiva e quella delle generazioni future, è necessario sviluppare dei test adeguati, considerando le caratteristiche specifiche della nanoparticella, la loro cinetica e utilizzando vie di esposizione e livelli di dose rilevanti per l'essere umano.

Ringraziamenti

Si ringraziano Paolo Coluccio, Barbara De Berardis, Antonio Di Virgilio, Agostino Eusepi, Andrea Martinelli, Daniele Passeri, Marco Rossi e Mauro Valeri per la preziosa collaborazione durante le varie fasi dello studio.

Bibliografia

1. European Commission. Commission Recommendation of 18 October 2011 on the definition of nanomaterial. *Official Journal of the European Union* L275/38, 20/10/2011.

2. European Food Safety Authority. *Definition and description of “emerging risks” within the EFSA’s mandate. (EFSA/SC/415 Final)*. Parma: EFSA; 2007. Disponibile all'indirizzo: <http://www.efsa.europa.eu/en/scdocs/doc/escoemriskdefinition.pdf>; ultima consultazione 12/11/13.
3. Dekkers S, Krystek P, Peters RJB, Lankveld DPK, Bokkers BGH, Van Hoeven-Arentzen PH, *et al.* Presence and risks of nanosilica in food products. *Nanotoxicology* 2011;5(3):393-405.
4. Weir A, Westerhoff P, Fabricius L, Hristovski K, Von Goetz N. Titanium dioxide nanoparticles in food and personal care products. *Environ Sci Technol* 2012;46(4):2242-50.
5. European Food Safety Authority (EFSA). The Potential Risks Arising from Nanoscience and Nanotechnologies on Food and Feed Safety. *The EFSA Journal* 2009;958:1-39.
6. Blue GM, Kirk EP, Sholler GF, Harvey RP, Winlaw DS. Congenital heart disease: current knowledge about causes and inheritance. *Med J Aust* 2012;197(3):155-9.
7. Xu R, Manias E, Snyder AJ, Runt J. Low permeability biomedical polyurethane nanocomposites. *J Biomed Mater Res A* 2003;64(1):114-9.
8. European Food Safety Authority (EFSA). Guidance on the risk assessment of the application of nanoscience and nanotechnologies in the food and feed chain. *The EFSA Journal* 2011;9(5):2140.
9. Bianchi F. The study of congenital anomalies in contaminated sites of interest for environmental remediation. *Epidemiol Prev* 2011;35(5-6 Suppl 4):199-204.
10. Kulvietis V, Zalgevičienė V, Didziapetrienė J, Rotomskis R. Transport of nanoparticles through the placental barrier. *Tohoku J Exp* 2011;225(4):225-34.
11. Takeda K, Suzuki K-I, Ishihara A, Kubo-Irie M, Fujimoto R, Tabata M, *et al.* Nanoparticles transferred from pregnant mice to their offspring can damage the genital and cranial nerve systems. *Journal of Health Science* 2009;55:95-112.
12. Komatsu T, Tabata M, Kubo-Irie M, Shimizu T, Suzuki K-I, Nihei Y, *et al.* The effects of nanoparticles on mouse testis Leydig cells in vitro. *Toxicol In Vitro* 2008;22(8):1825-31.
13. Gao G, Ze Y, Li B, Zhao X, Zhang T, Sheng L, *et al.* Ovarian dysfunction and gene-expressed characteristics of female mice caused by long-term exposure to titanium dioxide nanoparticles. *J Hazard Mater* 2012;243:19-27.
14. Trouiller B, Reliene R, Westbrook A, Solaimani P, Schiestl RH. Titanium dioxide nanoparticles induce DNA damage and genetic instability in vivo in mice. *Cancer Res* 2009;69(22):8784-9.
15. Fedulov AV, Leme A, Yang Z, Dahl M, Lim R, Mariani TJ, *et al.* Pulmonary exposure to particles during pregnancy causes increased neonatal asthma susceptibility. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2008;38(1):57-67.
16. Tassinari R, Cubadda F, Moracci G, Aureli F, D’Amato M, Valeri M, De Berardis B, Mantovani A, Passeri D, Rossi M, Maranghi F. Oral, short-term exposure to titanium dioxide nanoparticles in Sprague-Dawley rat: focus on reproductive and endocrine systems and spleen. *Nanotoxicology* 2013. [Epub ahead of print]