
capitolo 5

Effetti sulla salute dei nanomateriali ingegnerizzati

Delia Cavallo (coordinatore), *INAIL, Dipartimento di Medicina del Lavoro - ex ISPESL*
Carla Fanizza, *INAIL, Dipartimento di Installazioni di Produzione e Insediamenti Antropici - ex ISPESL*
Luca Fontana, *Università Cattolica del Sacro Cuore di Roma*
Ivo Iavicoli, *Università Cattolica del Sacro Cuore di Roma*
Francesca Larese Filon, *Università di Trieste*
Andrea Magrini, *Università di Roma "Tor Vergata"*
Antonio Pietrojusti, *Università di Roma "Tor Vergata"*
Lorenzo Sacchi, *INAIL, Dipartimento di Medicina del Lavoro - ex ISPESL*
Cinzia Lucia Ursini, *INAIL, Dipartimento di Medicina del Lavoro - ex ISPESL*

Premessa

La produzione e l'utilizzo crescente di nanomateriali (NM) ingegnerizzati in ambito occupazionale con conseguente potenziale esposizione per un numero sempre più ampio di lavoratori addetti e i pochi dati disponibili sui rischi per la salute di tali composti evidenziano la necessità di implementare le conoscenze riguardanti i possibili effetti biologici (sia a livello molecolare-cellulare sia a livello di organo e di apparato) indotti da tale esposizione. Poiché la produzione, la diffusione e l'utilizzo dei NM ingegnerizzati in diversi settori sono piuttosto recenti e la valutazione dell'esposizione nei soggetti esposti presenta diverse difficoltà, non sono ancora disponibili studi epidemiologici ed informazioni riguardanti gli effetti tossici dei NM su popolazioni esposte. La quasi totalità degli studi disponibili è stata effettuata o su sistemi in *vitro* o su animali da laboratorio (principalmente topi) e le informazioni relative agli effetti su organi e apparati sono a volte estrapolate dai risultati ottenuti a livello cellulare.

Gli studi prodotti negli ultimi anni hanno evidenziato potenziali effetti citotossici e genotossico-ossidativi a livello cellulare ed effetti respiratori, cutanei, immunologici, neurotossici, cardiovascolari, causati da NM.

La maggior parte degli studi sugli effetti cellulari dei NM utilizza concentrazioni abbastanza elevate di tali composti ed evidenzia principalmente effetti citotossici. I pochi studi attualmente disponibili sugli effetti delle esposizioni a basse dosi di NM ingegnerizzati evidenziano effetti genotossici, ossidativi ed infiammatori che

potrebbero essere implicati nell'instaurarsi di un processo di cancerogenesi. La maggior parte di questi riguarda nanotubi di carbonio e particelle di ossidi metallici che possono indurre danno al DNA, sia direttamente sia indirettamente, tramite l'induzione di stress ossidativo. Gli effetti cellulari dei NM sono influenzati dalle dimensioni, dalla elevata area di superficie e dalle proprietà chimico-fisiche (quali contaminanti metallici o cariche di superficie) che ne determinano la reattività e lo stato di aggregazione. Tali proprietà rendono complesso lo studio degli effetti e del loro meccanismo d'azione.

Esistono alcune evidenze sperimentali che le nanoparticelle (NP) ingegnerizzate possano penetrare nella circolazione sistemica e raggiungere vari organi ed apparati. Le principali vie di assorbimento sembrano essere costituite dal polmone, dalla mucosa nasale, dalla cute e dall'apparato gastroenterico, con conseguente accumulo in molti tessuti quali rene, muscoli, milza e femore (Singh et al., 2006). Relativamente agli effetti a livello di organo e di apparato, la maggior parte degli studi riguarda gli effetti sui sistemi respiratorio, nervoso e cardiovascolare, osservati *in vivo* su topi e ratti, mentre pochi dati sono attualmente disponibili riguardo i sistemi immunitario e cutaneo.

Diversi studi hanno mostrato come i NM ingegnerizzati, in particolare i nanotubi di carbonio e le NP contenenti metalli, possano indurre stress ossidativo e processi di infiammazione polmonare. La maggior parte degli studi riguarda i nanotubi di carbonio (CNT), i cui effetti negativi sul sistema respiratorio sembrano essere in relazione con la tossicità su differenti popolazioni cellulari, la capacità di determinare fibrosi, l'attività asbesto-simile, il bioaccumulo e i livelli potenzialmente bassi di biodegradazione di tali NM. In particolare sono state osservate alcune somiglianze tra le proprietà patogenetiche dei nanotubi di carbonio a parete multipla e quelle delle fibre di asbesto riconducibili a risposte infiammatorie e stress ossidativo.

Gli studi *in vivo* sugli effetti delle NP sul sistema nervoso centrale (SNC) riguardano principalmente le NP metalliche ed evidenziano effetti neurotossici dovuti principalmente ad induzione di stress ossidativo. È noto che le NP, assorbite principalmente attraverso la via inalatoria, hanno la capacità di dislocare dal sito di penetrazione per poi raggiungere il SNC attraverso un meccanismo di trasporto trans-sinaptico o direttamente captate nel SNC attraverso le terminazioni nervose della mucosa nasale (nervo olfattivo e nervo trigemino) e tracheobronchiale (afferenze del nervo vago). Le NP inalate, inoltre, attraversano la barriera respiratoria e tramite il torrente circolatorio possono raggiungere il SNC attraversando la barriera emato-encefalica (BEE) nei casi in cui questa, come avviene in alcune condizioni patologiche, non è completamente funzionante.

Gli studi sui possibili effetti delle NP ingegnerizzate sull'apparato cardiovascolare riguardano prevalentemente osservazioni *in vivo* su topi e ratti esposti a nanotubi di carbonio (CNT) ed evidenziano effetti sullo sviluppo di ateromi, trombosi arteriosa e aggregazione piastrinica, anche se alcuni presentano criticità per dosi utilizzate, via di somministrazione e basso numero di animali impiegati. Altri studi hanno valutato i possibili effetti dei CNT sull'infiammazione sistemica, che è ormai considerata uno dei fattori principali predisponenti all'aterosclerosi, evidenziando una significativa attivazione da parte dei nanotubi di carbonio a parete multipla (MWCNT) e dei nanotubi di carbonio a parete singola (SWCNT) - ma in particolare dei MWCNT - dei parametri di infiammazione sistemica quali granulociti, IL-6, CXCL1, IL-5, CCL11, CCL22, e dei biomarcatori di attivazione dei neutrofili.

I pochi dati riguardanti gli effetti a livello immunologico suggeriscono la possibilità che le NP, una volta raggiunta la circolazione sistemica, interagiscano con le proteine circolanti o presenti sulla superficie delle cellule determinando una risposta autoimmunitaria, oppure che interferiscano con i processi di opsonizzazione, e quindi con la clearance di materiale estraneo (es. microorganismi) normalmente eliminato in virtù di tale processo, o ancora che attivino il complemento, attivazione che può essere benefica o dannosa, a seconda delle circostanze.

L'esposizione cutanea a NP può determinare effetti locali sulla cute o essere una via d'ingresso di questi materiali nel circolo sistemico. Sull'argomento è comunque necessario compiere ulteriori studi, con indagini specifiche sulle varie tipologie di NP, perché diversi materiali possono avere diffusione ed effetti diversi sulla cute in relazione alle dimensioni ed alla composizione chimica. Attualmente le informazioni maggiori provengono dall'industria farmaceutica, che ha studiato l'effetto delle NP di ossido di zinco (ZnO) e di biossido di titanio (TiO₂) utilizzate per la formulazione di creme protettive, mentre pochissime informazioni sono disponibili per le altre tipologie di NP.

La figura 5.1 mostra la biocinetica delle NP. Molte vie di assorbimento e traslocazione sono già state accertate, mentre altre vie sono ancora ipotetiche e necessitano di ulteriori studi (Oberdoster et al., 2005).

In questo capitolo vengono riportati i principali studi attualmente disponibili sugli effetti biologici indotti dai NM ingegnerizzati sia a livello molecolare-cellulare (approfondendo principalmente quelli genotossici e citotossici che permettono di capire il meccanismo d'azione di tali materiali) (figura 5.2) sia a livello di organo e apparato (riportando gli effetti immunologici, cutanei, respiratori, sul sistema nervoso centrale e cardiovascolare).

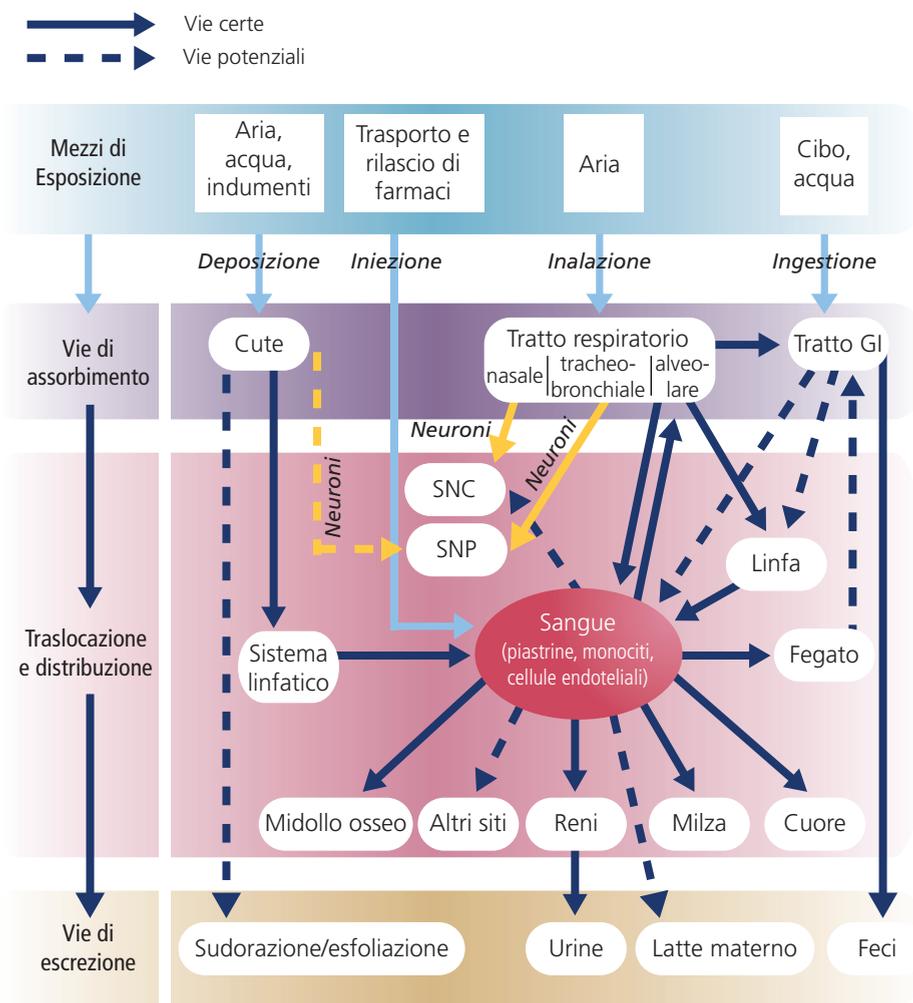


Figura 5.1 Biocinetica delle NP. SNC, sistema nervoso centrale. SNP, sistema nervoso periferico. (Tratta da Oberdoster et al., 2005).

Verranno presi in considerazione NM quali nanotubi di carbonio a parete singola (SWCNT) e multipla (MWCNT), fullereni, NP contenenti metalli (metalli e ossidi di metalli) e quantum dot, considerati rappresentativi di quelli già presenti in commercio, o che saranno presenti a breve, sui quali effettuare studi di tossicologia, e presenti nella lista pubblicata dall'OECD (Organisation for Economic Co-operation and Development), riportata nel Capitolo 1.

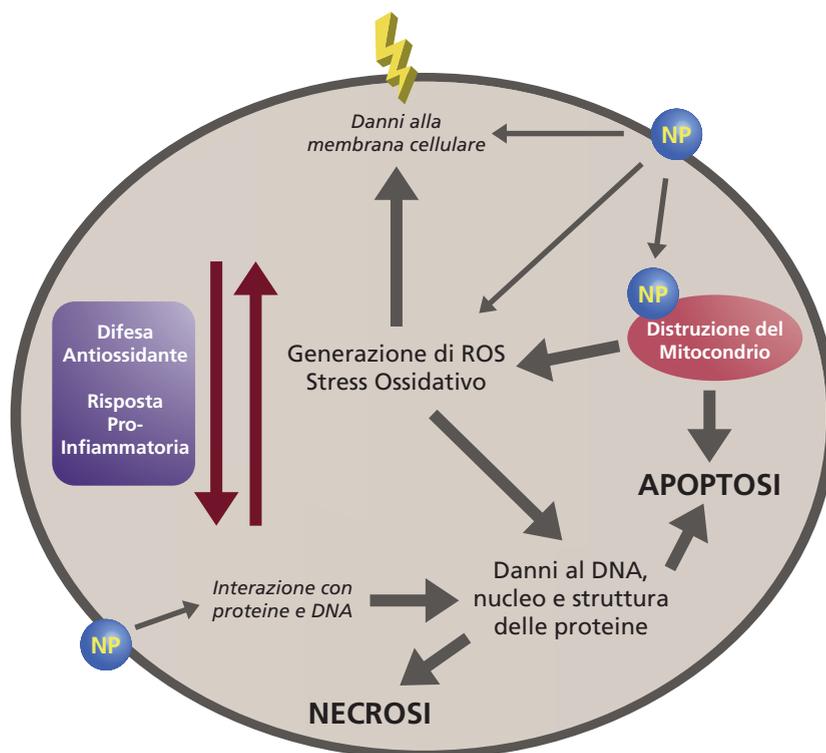


Figura 5.2 Effetti citotossici e genotossici delle NP

5.1. Effetti genotossici ed ossidativi

La maggior parte degli studi sugli effetti dei NM utilizza esposizioni a concentrazioni molto elevate. Più recentemente diversi studi che utilizzano basse concentrazioni di NM ingegnerizzati hanno evidenziato danno al DNA, effetti ossidativi ed infiammatori che potrebbero essere implicati nell'instaurarsi di un processo di cancerogenesi (Singh et al., 2009), anche se permangono molte incertezze ed i risultati sono ancora contrastanti. Tra questi studi, la maggior parte riguarda nanotubi di carbonio e particelle di ossidi metallici che possono provocare danno al DNA sia direttamente sia indirettamente, tramite l'induzione di stress ossidativo. Gli effetti genotossici indotti dai NM sono influenzati dalle dimensioni, dalla elevata area di superficie e dalle proprietà chimico-fisiche (quali contaminanti metallici o cariche di superficie) che ne determinano la reattività e lo stato di aggregazione. Tali proprietà conferiscono ai NM capacità genotossiche imprevedibili che ne rendono complesso lo studio degli effetti e del meccanismo d'azione (Yang et al., 2008). A seconda delle dimensioni e dello

stato di aggregazione, i NM possono entrare nella cellula attraverso diffusione passiva, endocitosi mediata da recettori di membrana o endocitosi mediata da proteine di membrana, quindi possono penetrare nel nucleo mediante diffusione attraverso la membrana nucleare (se sufficientemente piccoli), trasporto attraverso i complessi dei pori nucleari o in seguito al dissolvimento della membrana nucleare durante la divisione cellulare (se di dimensioni maggiori o in aggregati). Una volta nel nucleo, possono interagire con il DNA o con le proteine istoniche inducendo danno al materiale genetico in modo diretto, oppure indirettamente attraverso l'inibizione delle proteine nucleari implicate nei processi di replicazione e trascrizione. Il danno genotossico può essere anche indotto indirettamente attraverso l'interazione con altre proteine cellulari, come quelle implicate nei processi di divisione cellulare, attraverso l'induzione di radicali liberi dell'ossigeno, l'induzione di fenomeni infiammatori, oppure per alterazione della funzione di proteine implicate nella risposta riparativa al danno al DNA. La tabella 5.1 riassume i principali meccanismi d'azione ipotizzati dagli studi attualmente disponibili sugli effetti genotossici e citossici dei NM.

5.1.1. Nanomateriali a base di carbonio

Nanotubi di carbonio (CNT)

Lo studio degli effetti genotossici da nanotubi di carbonio (CNT) è di notevole importanza data la somiglianza con l'asbesto, del quale è nota la capacità di indurre danno al materiale genetico e carcinogenesi mediata dalla elevata biopersistenza, generazione locale di radicali liberi e conseguente prolungata risposta infiammatoria. Gli studi sugli effetti genotossici ed ossidativi attualmente disponibili sui nanotubi di carbonio a parete singola (SWCNT) o multipla (MWCNT) sono alquanto contraddittori probabilmente in relazione alla variabilità del materiale utilizzato (purezza, dimensioni, forma, presenza di contaminanti metallici, funzionalizzazione), del mezzo di dispersione, della presenza di cariche di superficie, delle condizioni espositive che non sempre vengono dettagliatamente descritti. I NM fibrosi possono indurre genotossicità sia per interazione diretta con il DNA (SWCNT sono stati osservati nel nucleo) o con il fuso mitotico sia indirettamente tramite stress ossidativo e risposte infiammatorie (Migliore et al., 2010). Studi *in vivo* su ratti e topi hanno indicato che SWCNT possono indurre stress ossidativo e risposta infiammatoria (Folkman et al. 2009, Jacobsen et al. 2009). Induzione di infiammazione, fibrosi e granuloma del polmone in topi esposti a MWCNT è stata riportata in uno studio pilota da Poland et al. (2008) e in studi a più lungo termine tali nanotubi sembrano promuovere anche lo sviluppo di mesotelioma (Sakamoto 2009, Takagi 2008). Mentre in altri studi non sono stati evidenziati effetti ossidativi o infiammatori in topi e ratti esposti a MWCNT (Mitchell et al. 2007, Elgrabli et al., 2008).

La maggior parte degli studi *in vitro* effettuati finora sui nanotubi di carbonio riguarda quelli a parete singola SWCNT ed evidenzia stress ossidativo e danno al DNA in diversi tipi cellulari. In particolare sono stati osservati generazione di radicali liberi, accumulo di prodotti di perossidazione e riduzione dell'attività antiossidante in cheratinociti umani (Shvedova et al., 2003a), induzione di specie reattive dell'ossigeno (ROS) in cellule polmonari di ratto (Sharma CS et al., 2007), generazione di ROS e danno al DNA in cellule mesoteliali umane (Pacurari et al., 2008) e danno al DNA in cellule bronchiali umane (BEAS-2B) (Lindberg et al., 2009). Lindberg, in particolare, ha valutato in BEAS-2B gli effetti indotti dall'esposizione a nanotubi di carbonio commerciali (SWCNT >50%, altri CNT ~ 40%) per tempi di 24, 48 e 72 ore, mediante *comet test* e test del micronucleo (MN). Un aumento dose-dipendente del danno al DNA, con effetti più evidenti per le esposizioni più lunghe, è stato evidenziato con il *comet test*, mentre il test del micronucleo ha mostrato un effetto evidente solo dopo 48 ore di esposizione. La genotossicità trovata in questo studio può essere dovuta alla natura fibrosa dei materiali utilizzati e alla presenza di metalli (Co e Mo). Anche per lo studio di Pacurari et al., (2008) – effettuato su cellule mesoteliali umane esposte a SWCNT contenenti contaminanti metallici (Ni, Y e Fe) e nel quale si è evidenziata generazione di ROS e danno al DNA, valutato mediante *comet test* – è stato ipotizzato che l'induzione di danno al DNA, imputabile in parte allo stress ossidativo, potrebbe essere dovuta non solo alla presenza di metalli come impurezze, ma anche alla capacità dei SWCNT di generare ROS.

Secondo alcuni studi (Jacobsen et al., 2008; Zeni et al., 2008), i SWCNT ad elevata purezza non sembrano causare rotture al DNA o aumentare la frequenza di mutazioni, mentre in altri è stata osservata l'induzione di danno al DNA. In particolare Jacobsen et al. (2008) – in uno studio che utilizza l'*Fpg comet test* per valutare il danno diretto e ossidativo al DNA in cellule epiteliali polmonari murine esposte a SWCNT ad elevata purezza – non hanno riscontrato rotture al DNA ma induzione di danno ossidativo. Mentre un danno al DNA in fibroblasti polmonari di hamster cinese (V79) esposte a SWCNT puri è stato osservato mediante *comet test* da Kisin et al. (2007).

In uno studio che utilizzava sia SWCNT che MWCNT commerciali si sono evidenziate induzione di ROS e diminuzione del potenziale di membrana in macrofagi di ratto e cellule polmonari umane, mentre SWCNT purificati con trattamento acido non inducevano effetti; tale risultato suggerisce che la responsabilità degli effetti biologici possa essere ascritta ai metalli in traccia associati ai nanotubi commerciali (Pulskamp et al., 2007).

Il potenziale genotossico dei MWCNT purificati è stato riportato da Muller et al. (2008a), che hanno utilizzato due approcci complementari basati sul test del MN effettuato *in vivo* (dopo somministrazione intratracheale) e *in vitro* (su cellule polmonari di ratto). Tale studio ha dimostrato che i MN derivano sia da eventi clastogenici sia da eventi

aneugenici. Inoltre i MWCNT possono indurre mutazioni puntiformi che possono essere responsabili della loro carcinogenicità (Zhu et al., 2007). Comunque, un recente studio di Wirtzner et al. (2009) ha rilevato che agglomerati di MWCNT (*baytubes*) non mostrano attività genotossica (induzione di aberrazioni cromosomiche) in cellule V79.

Fullereni

I fullereni vengono considerati meno tossici dei nanotubi di carbonio. Diversi studi hanno dimostrato che i fullereni hanno proprietà antiossidanti e che non evidenziano effetti cito-genotossici significativi mentre altri hanno evidenziato l'induzione di danno ossidativo, rotture al DNA, incremento di MN, mutagenicità e aberrazioni cromosomiche (Singh et al., 2009). In particolare l'esposizione orale a basse dosi di C₆₀ induce la formazione di elevati livelli di 8-ossi-7,8-diidro-2'-deossiguanosina (8-oxodG) nel fegato e nei polmoni di ratto (Folkmann et al., 2009). Dispersioni colloidali di fullereni C₆₀ in acqua hanno mostrato effetti genotossici su linfociti umani valutati mediante *comet test* (Dhawan et al., 2006). Inoltre un recente studio ha dimostrato che l'esposizione a C₆₀ induce la formazione di MN in cellule polmonari A549 e danno al DNA su polmoni di topo (Totsuka et al., 2009).

La discrepanza dei risultati finora ottenuti sugli effetti genotossici dei fullereni sembra essere dovuta a fattori quali la durata dell'esposizione, la preparazione e il tipo cellulare, e il confronto dei dati, non essendo stata effettuata alcuna caratterizzazione chimico-fisica, risulta di difficile attuazione.

5.1.2. Nanoparticelle di metalli e ossidi metallici

Gli ioni dei metalli di transizione (cadmio, cromo, cobalto, rame, ferro, nichel, titanio e zinco), rilasciati da certe NP, possono indurre la produzione del radicale idrossilico ($\cdot\text{OH}$), una delle principali specie che danneggiano il DNA. Inoltre il Fe(II) può causare la produzione di H₂O₂ dall'O₂ molecolare. Nanoparticelle di metalli quali argento e cobalto hanno mostrato effetti genotossici tra cui aumentata espressione e fosforilazione di p53, rotture della catena del DNA e aberrazioni cromosomiche. Anche NP di oro hanno mostrato capacità di indurre danni al DNA indirettamente, attraverso una risposta ossidativa che dipende dal tipo cellulare e dalle dimensioni delle particelle. Le NP di ossidi metallici (TiO₂, ZnO, SiO₂, Fe_xO_x) attraversano la membrana cellulare e si concentrano nella regione perinucleare inducendo indirettamente un danno genotossico tramite la promozione di stress ossidativo (Sharma et al., 2009; Park et al., 2008a) e risposta infiammatoria, oppure possono entrare nel nucleo (TiO₂ e SiO₂), dove formano aggregati con le proteine nucleari della trascrizione e replicazione, inibendole e quindi inducendo danni al materiale genetico. Uno studio in vitro di Kar-

Isson et al., (2008) ha confrontato gli effetti genotossici di particelle di ossidi di metalli (CuO, TiO₂, ZnO, CuZnFe₂O₄, Fe₃O₄, Fe₂O₃) con quelli di NP di carbonio e di MWCNT su cellule A549 mediante comet test e dosaggio dei ROS con 2',7'-diclorofluoresceina diacetato (DCFH-DA). Tutte le particelle, ad eccezione degli ossidi di rame, causavano danno al DNA dopo 4 ore di esposizione; quelle di CuO si sono rivelate le più potenti, seguite da TiO₂. Le particelle di CuO, inoltre, hanno causato il danno ossidativo più elevato, mostrandosi come l'unica specie in grado di indurre un incremento intracellulare di ROS.

Le particelle di TiO₂ inducono scambi tra cromatidi fratelli (SCE), aumento della frequenza di MN, danno al DNA, aumento della frequenza delle mutazioni del gene per l'ipoxantina-guanina fosforibosil transferasi (HPRT) e induzione di delezioni dell'ordine di kilobasi in fibroblasti transgenici di topo (MEF) (Singh et al., 2009). Comunque non tutti gli studi sono concordi sulla genotossicità di tali materiali. Inoltre la risposta cellulare indotta da NP di TiO₂ dipende dalle dimensioni e dalla forma e purtroppo gli studi disponibili non sempre forniscono informazioni sufficienti per poter confrontare i risultati ottenuti. La IARC ha classificato le particelle di TiO₂ nel gruppo dei possibili cancerogeni per l'uomo (Gruppo 2B) sulla base di sufficienti evidenze sperimentali su animali. Induzione di carcinoma polmonare è stata evidenziata in topi e ratti in seguito ad inalazione o instillazione tracheale di particelle di TiO₂ (Pott e Roller, 2005 e Baan et al., 2006) ed effetti genotossici (induzione di MN e danno al DNA) ed ossidativi (induzione di 8-idrossi-2 deossiguanosina) in topi esposti a NP di TiO₂ presenti nell'acqua da bere (Trouiller et al., 2009). Nanoparticelle di ossidi di ferro vengono generalmente ricoperte con polietilenglicole (PEG), destrano o dendrimeri (*dendrimers*), per migliorare la solubilità e la biocompatibilità, oppure con molecole complesse quali anticorpi, peptidi, ormoni o farmaci, che ne migliorano le applicazioni cliniche; tuttavia la stabilità di queste sostanze di rivestimento è ancora sconosciuta.

5.1.3. Quantum dot (QD)

Molto preliminari sono le informazioni attualmente disponibili sugli effetti genotossici dei QD, che si compongono di un nucleo di elementi metallici, tra cui alcuni altamente tossici (Cd, Te, Se e Pb), da un rivestimento protettivo (*cap/shell*), costituito prevalentemente da ZnS, e da gruppi funzionali o di "coating" (gruppo carbossilico, gruppo amminico e polietilenglicole), che li rendono sufficientemente idrofilici, ne migliorano la biocompatibilità e bioattività e li rendono più stabili, riducendone l'eventuale tossicità (Singh et al., 2009). I QD che penetrano attraverso i pori della membrana nucleare possono interagire con le proteine istoniche del DNA inducendo

rotture della catena, attivazione di geni quali p53 e condensazione cromatinica. L'aggiunta di gruppi di rivestimento (es. ZnS) sembra avere un effetto protettivo poiché riduce la cito-genotossicità, come evidenziato in studi recenti, anche se la stabilità a lungo termine del rivestimento protettivo non è stata adeguatamente testata. Se il QD è trattenuto nell'organismo per un periodo di tempo molto lungo, il rivestimento protettivo può essere degradato in condizioni fotolitiche e ossidative, con conseguenti penetrazione attraverso i pori della membrana nucleare ed induzione di effetti cito-genotossici (Landsiedel et al., 2009). Numerosi studi dimostrano gli effetti protettivi che il solfuro di zinco conferisce ai QD riducendone la tossicità. Anche il processo di preparazione e quello di purificazione del materiale costituiscono fattori importanti che potrebbero influenzare la genotossicità dei QD. Alcune evidenze dimostrano l'interazione dei QD con il nucleo cellulare, ma pochi studi si sono focalizzati in modo specifico sulla genotossicità di tali materiali.

5.1.4 Conclusioni

In conclusione, ad oggi sono disponibili informazioni relativamente limitate sulla genotossicità dei NM ingegnerizzati. La maggior parte degli studi *in vitro* effettuati finora ha utilizzato il *comet test* – che valuta l'induzione di danno diretto o ossidativo al DNA e che ha fornito risultati positivi per i fullereni, i SWCNT e MWCNT, le particelle di TiO₂, i QD con CdSe/ZnS, le NP d'oro – e il test del MN – che valuta effetti sia clastogeni sia aneugenici e che ha fornito risultati positivi per le particelle di TiO₂, SiO₂, CoCr, ossido di zinco, TiO₂ + irradiazione UV-vis (Landsiedel et al., 2009; Lindberg et al., 2009). Gli studi *in vivo* eseguiti prevalentemente su topi e ratti riguardano principalmente i nanotubi di carbonio, che possono indurre stress ossidativo, infiammazione, fibrosi e granuloma del polmone in topi (Poland et al., 2008), i fullereni, che inducono stress ossidativo e danno al DNA in ratti (Folkmann et al., 2009, Totsuka et al., 2009), e, più recentemente, le NP di TiO₂, che inducono effetti genotossici ed ossidativi in topi (Trouiller et al., 2009).

I risultati di molti studi sono contraddittori principalmente a causa della mancanza di informazioni dettagliate sulle caratteristiche chimico-fisiche dei materiali utilizzati e sul processo di produzione, ma anche sui mezzi di dispersione e i trattamenti utilizzati per la dispersione che possono influenzare l'uptake cellulare, l'interazione con le macromolecole biologiche e quindi la tossicità. È necessario inoltre effettuare ulteriori studi di genotossicità con l'utilizzo simultaneo di più test, tenendo in considerazione la capacità dei NM di interagire con i fluidi biologici, con i mezzi di dispersione, con i coloranti ed altri reagenti in grado di influenzare i risultati. Inoltre, dato che la maggior parte degli studi di genotossicità effettuati finora *in vitro* ha preso in considera-

zione tempi brevi di esposizione, sarebbe auspicabile avviare studi sugli effetti dovuti a esposizioni a tempi più lunghi.

Tabella 5.1 Meccanismi d'azione dei NM		
Nanomateriali	Meccanismi d'azione	
Nanotubi di carbonio	<i>SWCNT</i>	Diminuzione della capacità di adesione cellulare, riduzione della proliferazione cellulare, induzione di apoptosi. Stress ossidativo e danno al DNA
	<i>MWCNT</i>	Penetrazione nella cellula e riduzione della vitalità cellulare e rilascio di IL-8. Generazione di ROS. Infiammazione, fibrosi e granuloma del polmone e sviluppo di mesotelioma.
Fullereni	Considerati meno tossici dei CNT. Produzione di ROS, induzione di danno al DNA, mutagenicità e induzione di aberrazioni cromosomiche e micronuclei.	
Nanoparticelle di metalli e ossidi di metalli	<i>TiO₂, ZnO, SiO₂ e Fe_xO_x</i>	Induzione di danno al DNA tramite produzione di ROS e risposta infiammatoria.
	<i>Al₂O₃</i>	Produzione di ROS Risposta pro-infiammatoria
	<i>TiO₂</i>	Induzione produzione di ROS, SCE, aumento della frequenza dei micronuclei e carcinoma polmonare. Deplezione di glutatione e stress ossidativo come risultato della foto attività e proprietà redox. Distruzione della membrana.
	<i>ZnO</i>	Produzione di ROS. Dissoluzione e rilascio di cationi tossici. Danno lisosomiale. Infiammazione.
	<i>Ag</i>	Dissoluzione e rilascio di Ag ⁺ , inibizione enzimi respiratori e produzione di ATP. Produzione di ROS. Distruzione dell'integrità di membrana e dei processi di trasporto.
	<i>Ag e Co</i>	Aumentata espressione e fosforilazione di p53, rotture della catena di DNA e aberrazioni cromosomiche.
	<i>CdSe</i>	Dissoluzione e rilascio di ioni Cd e Se tossici.
	<i>Fe₃O₄</i>	liberazione Fe ²⁺ . Interferenza con il trasporto degli ioni della membrana cellulare.
	<i>CuO</i>	Induzione di danno al DNA e stress ossidativo
Quantum dot	Penetrazione nel nucleo della cellula attraverso la membrana e induzione di rotture della catena del DNA, attivazione di p53 e condensazione cromatinica. La presenza di ZnS riduce la cito-genotossicità.	

5.2 Effetti citotossici

Gli studi attualmente disponibili sugli effetti citotossici dei NM sono numerosi e mostrano un'ampia variabilità tra le diverse NP per quanto concerne l'abilità di causare effetti tossici (Tabella 5.1). Tale variabilità è influenzata dalle dimensioni, dalla elevata area di superficie e dalle proprietà chimico-fisiche (contaminanti metallici o cariche di

superficie) che ne determinano lo stato di aggregazione, la penetrabilità, la reattività e che rendono complesso lo studio degli effetti e del loro meccanismo d'azione.

5.2.1. Nanomateriali a base di carbonio

Nanotubi di carbonio a parete singola (SWCNT)

Cui et al. (2005) trattarono cellule embrionali umane del rene con SWCNT e riscontrarono una diminuzione dose e tempo-dipendente della capacità di adesione delle cellule, una riduzione della proliferazione cellulare, un aumento nell'induzione dell'apoptosi e un'alterata regolazione del ciclo cellulare. Manna et al. (2005) utilizzando quattro diversi tipi cellulari – cheratinociti umani, cellule di carcinoma della cervice uterina (HeLa), cellule alveolari umane (A549), cellule di carcinoma polmonare (H1299) – osservarono stress ossidativo ed una diminuzione dose-dipendente della vitalità cellulare.

Alcuni studi evidenziarono che i SWCNT funzionalizzati provocano effetti citotossici inferiori rispetto a quelli purificati. Shi Kam et al. (2004) dimostrarono che nanotubi a parete singola funzionalizzati con gruppi carbossilici, biotina e fluoresceina non evidenziavano significativa tossicità nella linea cellulare HL60 (linea leucemica umana) e nella linea cellulare Jurkat T (linfociti T helper derivati da cellule leucemiche umane) dopo un'ora di esposizione. Sayes et al. (2006a) valutarono la citotossicità di tre differenti campioni di SWCNT in una linea cellulare di fibroblasti umani. In questo studio vennero utilizzati tre campioni di SWCNT funzionalizzati – SWCNT-fenil-SO₃H, SWCNT-fenil-(COOH)₂, SWCNT-fenil-SO₃Na – e un campione di nanotubi stabilizzato con un tensioattivo (Pluronic F108). Gli autori rilevarono che i nanotubi diventavano meno citotossici all'aumentare del livello di funzionalizzazione sulla parete laterale. Inoltre, i SWCNT funzionalizzati sulla parete laterale apparivano meno citotossici di quelli stabilizzati con tensioattivo.

Diverse ipotesi sono state proposte per spiegare la citotossicità indotta dai SWCNT. Una di queste è legata all'uso di catalizzatori metallici nella produzione dei nanotubi. Uno studio condotto sui cheratinociti umani (HaCaT) (Shvedova et al., 2003a) esposti a SWCNT rilevava una citotossicità dose e tempo-dipendente. L'esposizione a concentrazioni elevate per lunghi periodi di tempo provocava un aumento dello stress ossidativo, una riduzione dei livelli di glutatione ed alterazioni ultrastrutturali e morfologiche a livello del nucleo e dei mitocondri. Gli autori, inoltre, notarono che l'aggiunta di un chelatore dei metalli si accompagnava a una diminuzione della citotossicità; ciò lasciava supporre che i residui del ferro utilizzato come catalizzatore potessero giocare un ruolo importante nell'induzione della citotossicità osservata.

L'aggregazione delle particelle sembra essere un fattore importante nella citotossicità delle NP, ma i risultati di studi condotti da autori diversi mostrano risultati discordanti.

Lo scopo del lavoro di Wick et al., (2007) era determinare come l'agglomerazione possa influenzare la citotossicità dei SWCNT. Gli autori utilizzarono quattro differenti soluzioni di nanotubi: la materia prima coinvolta nella produzione dei nanotubi, gli agglomerati di nanotubi risultanti dal processo di sintesi, fasci di nanotubi ed il pellet di nanotubi ottenuto dalla centrifugazione degli agglomerati. L'aggregazione si verificava in tutte le frazioni di nanotubi, eccetto nei fasci di nanotubi che erano ben dispersi. I fasci di nanotubi non provocavano effetti negativi nelle cellule e ciò confermava l'ipotesi che agglomerati di SWCNT provocassero effetti citotossici. I risultati di uno studio precedente (Tian et al., 2007), nel quale si utilizzavano soluzioni di nanotubi a parete singola non purificati e soluzioni in cui i metalli erano stati rimossi, mostrava una citotossicità più bassa con i nanotubi non purificati. Gli autori proponevano che la più bassa citotossicità dei nanotubi non purificati fosse un risultato della loro aggregazione in particelle più grandi e quindi meno tossiche. Ciò contraddiceva il ragionamento di Wick et al. (2007), secondo il quale gli agglomerati di nanotubi sarebbero citotossici per la loro rigidità e per le maggiori dimensioni, che li portano ad emulare gli effetti indotti dalle fibre di amianto. Nonostante i risultati contrastanti ottenuti possano essere legati all'uso di due differenti linee cellulari, l'effetto dell'aggregazione dei nanotubi di carbonio non risulta accertato.

Nanotubi di carbonio a parete multipla (MWCNT)

Studi sui MWCNT hanno dato risultati simili a quelli ottenuti per i SWCNT. Nei cheratinociti umani (HEK) esposti a concentrazioni crescenti (da 0.1, 0.2, 0.4 mg/ml) di MWCNT (Monteiro-Riviere et al., 2005) è stata riscontrata, tramite microscopia elettronica a trasmissione, la presenza di nanotubi in vacuoli all'interno del citoplasma, liberi nel citoplasma e vicino al nucleo. La percentuale di cellule contenenti nanotubi aumentava da 56% a 24 h a 84% dopo 48 h di esposizione alla dose più elevata. Inoltre, i MWCNT provocavano una diminuzione dose e tempo-dipendente della vitalità cellulare ed un aumentato rilascio di citochina IL-8 alle concentrazioni più elevate. Mentre lo studio svolto da Shvedova et al. (2003a) sui SWCNT proponeva che la citotossicità potesse essere dovuta alla presenza di metalli catalizzatori, la mancanza di particelle di catalizzatori in queste soluzioni di MWCNT suggeriva che gli stessi nanotubi di carbonio fossero potenzialmente pericolosi. Gli autori ipotizzarono che la citotossicità dei nanotubi fosse dovuta all'adesione degli stessi alla membrana cellulare o alla loro internalizzazione. Sato et al. (2005) trovarono aggregati di MWCNT nel citoplasma delle cellule monocitarie umane THP-1. Bottini et al. (2006) osservarono una citotossicità dose e tempo-dipendente nei linfociti T e nelle cellule Jurkat leucemiche. Inoltre, sia i nanotubi puri sia quelli ossidati inducevano apoptosi dose e tempo-dipendente nei linfociti T. Gli autori notarono che i MWCNT puri erano meno citotossici

di quelli ossidati. De Nicola et al. (2008) presentarono una valutazione tossicologica di differenti tipi di nanotubi sulle cellule Jurkat tumorali linfocitiche umane. I risultati indicavano che i nanotubi inducevano apoptosi, accelerando la transizione alla necrosi secondaria, aumentando d'intensità l'apoptosi indotta da agenti di danneggiamento, ed inducendo una iperpolarizzazione della membrana di plasma. Chiaretti et al. (2008) studiarono gli effetti dei MWCNT sulla proliferazione di tre differenti linee cellulari. La linea cellulare umana di adenocarcinoma della mammella MCF-7 mostrava una significativa inibizione della proliferazione per tutte le condizioni esaminate, mentre le cellule muscolari lisce arteriose umane primarie hSMC dimostravano una riduzione della crescita cellulare solo per le più alte concentrazioni di MWCNT dopo 72 ore d'incubazione. Invece, nessuna modificazione della crescita si osservava nella linea cellulare cancerosa coloretale umana Caco-2. Questi sorprendenti risultati si accordano allo studio di Pulskamp et al. (2007) che non hanno determinato alcuna tossicità acuta nella vitalità cellulare e nell'apoptosi in due linee cellulari, quella dei macrofagi alveolari del ratto NR8383 e quella epiteliale polmonare umana A549. Inoltre, il trattamento con MWCNT in entrambe le linee cellulari non induceva alcun rilascio di mediatori infiammatori, ma produceva un incremento delle specie reattive dell'ossigeno intracellulari (ROS), dipendente dalla dose e dal tempo. Anche il buckypaper di nanotubi in carbonio a parete multipla diminuiva la proliferazione delle linee cellulari umane cancerose coloretali (Caco-2), della mammella (MCF-7) già menzionate nel paragrafo precedente, ma si rivelava particolarmente efficace in quelle leucemiche promielotiche HL-60, come scoperto da Bellucci et al. (2009), che allo stesso tempo non riscontravano alcun effetto inibitorio di questo film di nanotubi multiparete nella proliferazione e nella viabilità di due linee di cellule primarie normali, quali le cellule muscolari lisce arteriose umane primarie hSMC ed i fibroblasti dermici (HF). Jia et al. (2005) evidenziarono una diminuzione della vitalità cellulare dose e tempo-dipendente dopo esposizione dei macrofagi alveolari a MWCNT purificati al 95%. Mentre questi autori trovarono un andamento dose-dipendente della citotossicità, Flahaut et al. (2006) trovarono una diminuzione della vitalità nelle cellule endoteliali del cordone ombelicale umano (HUVEC) con diluizioni delle loro soluzioni di MWCNT. Benché gli autori abbiano concluso che i nanotubi utilizzati non fossero tossici, si rilevò tuttavia che la vitalità cellulare sembrava diminuire per esposizioni a concentrazioni decrescenti di nanotubi con un'elevata area superficiale. Questo risultato veniva attribuito dagli autori all'aggregazione dei nanotubi o alla loro aumentata interazione con le cellule per l'elevata dispersione alle concentrazioni più basse. Il lavoro di Muller et al. (2005) dimostrava che i MWCNT più corti sono più tossici di quelli più lunghi. In questo studio sono stati utilizzati macrofagi peritoneali esposti a MWCNT purificati ed a MWCNT purificati e frantumati con un mulino a vibrazione (che

riduce la lunghezza dei nanotubi, ma non ha nessuna influenza sulle altre caratteristiche del materiale). La citotossicità e l'espressione del TNF- α dei MWCNT purificati erano significativamente più basse di quelle dei MWCNT purificati e frantumati. Inoltre, i MWCNT purificati e frantumati si mostravano simili all'amianto e al nerofumo sia nella regolazione dell'espressione del TNF- α sia per la capacità di indurre una citotossicità dose-dipendente.

Fullereni

Dai numerosi studi condotti è emerso che la risposta citotossica indotta dai fullereni dipende dal tipo cellulare impiegato. Infatti, nessun effetto citotossico si riscontra in linee cellulari di macrofagi, mentre in altri tipi cellulari si evidenzia un effetto citotossico dose-dipendente. Fiorito et al. (2006) non trovarono risposte citotossiche indotte dai fullereni purificati nei macrofagi murini. Gli autori osservarono che i C₆₀ avevano un basso assorbimento cellulare, non stimolavano il rilascio di ossido nitrico e non inducevano apoptosi in confronto alla grafite ed ai SWCNT. Jia et al. (2005), dopo aver incubato per 6 ore macrofagi alveolari con C₆₀ (226 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$), non riscontrarono una significativa tossicità. Porter et al. (2006) studiarono gli effetti dei C₆₀ nei monociti/macrofagi umani e non riscontrarono una significativa citotossicità, ma a livello subcellulare osservarono che i C₆₀ tendevano ad accumularsi nella cellula (nei lisosomi, nel citoplasma, lungo la membrana nucleare e dentro il nucleo). Sayes et al. (2004) incubarono fino a 48 ore quattro differenti derivati dei fullereni – una forma di aggregato del C₆₀; C₃; Na*₂₋₃[C₆₀O₇₋₉(OH)₁₂₋₁₅]⁽²⁻³⁾⁻; C₆₀(OH)₂₄ – con fibroblasti del derma umano e cellule umane del tumore epatico. Tra le concentrazioni utilizzate solo la più elevata (2400 ppb) risultava citotossica. L'aggiunta di gruppi funzionali sulla superficie, per incrementarne la solubilità, provoca la diminuzione della citotossicità *in vitro*. Infatti, tra i quattro tipi di fullereni utilizzati il C₆₀ purificato risultava il più tossico, mentre il C₆₀ più ricco di gruppi ossidrilici [C₆₀(OH)₂₄] non mostrava effetti citotossici. In uno studio più approfondito, condotto su fibroblasti del derma umano, cellule umane del tumore epatico ed astrociti umani normali, Sayes et al. (2005) dimostrarono che l'apoptosi cellulare indotta dall'esposizione a C₆₀ era dovuta alla perossidazione dei lipidi di membrana da parte dei radicali dell'ossigeno. Infatti, l'aggiunta di un antiossidante, l'acido L-ascorbico, preveniva sia il danno ossidativo sia la tossicità indotta dai fullereni. Rouse et al. (2006) studiarono gli effetti indotti dai fullereni funzionalizzati con amminoacidi nei cheratinociti umani (HEK). Dopo 24 e 48 ore di esposizione furono riscontrati una diminuzione dose-dipendente della vitalità cellulare ed un aumento della fagocitosi delle particelle in cellule esposte a concentrazioni superiori a 0.004 mg/ml.

5.2.2. Nanoparticelle di metalli e ossidi metallici

Lanone et al. (2009) valutarono gli effetti citotossici di 24 diverse NP con diametro aerodinamico equivalente su due linee cellulari polmonari umane le A549 e le THP-1. I NM a base di rame e zinco apparivano più tossici di tutti i composti testati. Ossidi misti di rame e di zinco erano tossici come il rame o lo zinco di per sé. Nanomateriali a base di ossidi di titanio, alluminio, cerio, argento, nichel e zirconio mostravano una tossicità da moderata a bassa, mentre per il carburo di tungsteno non fu osservata nessuna tossicità. L'esposizione a NM di cobalto induceva tossicità nelle cellule THP-1 solamente nel caso di miscele nichel-cobalto-manganese; nessuna tossicità fu riscontrata invece per il solo cobalto.

Braydich-Solle et al. (2005) testarono NP di argento (Ag di 15 nm), di molibdeno (MoO_3 di 30 nm) e di alluminio (Al 30 nm), utilizzando come controllo positivo l'ossido di cadmio, su cellule staminali spermatogoniche di ratto (C18-4). Lo studio dimostrò una tossicità dose-dipendente per tutte le particelle testate, mentre i corrispondenti sali solubili non mostravano effetti significativi. Le NP di argento erano le più tossiche, mentre quelle di triossido di molibdeno erano le meno tossiche. Per quanto riguarda l'apoptosi, dimostrarono che il numero di cellule apoptotiche aumentava in modo dose-dipendente a basse concentrazioni e che con l'aumentare della concentrazione diverse cellule diventavano necrotiche. Per le NP di molibdeno un piccolo numero di cellule apoptotiche fu osservato a partire dalla concentrazione di 25 $\mu\text{g/ml}$, e poche cellule necrotiche a partire da 50 $\mu\text{g/ml}$. La maggior parte delle cellule appariva intatta all'osservazione al microscopio ottico a contrasto di fase.

Lin et al. (2006a) valutarono la citotossicità di NP di ossido di cerio (20 nm) nelle A549. La vitalità cellulare diminuiva significativamente in funzione della dose e del tempo di esposizione. I risultati di tale studio dimostrarono che l'esposizione a concentrazioni da 3.5 a 23.3 $\mu\text{g/ml}$ di NP di ossido di cerio produceva nelle A549 stress ossidativo.

5.2.3. Quantum dot (QD)

Studi effettuati su QD di CdSe ricoperti con ZnS dimostrarono l'efficacia del guscio di ZnS nel ridurre la citotossicità di questi materiali. Infatti, i QD non ricoperti rilasciano ioni cadmio e il cadmio induce la morte cellulare attraverso lo stress ossidativo e il danno mitocondriale. È stato inoltre valutato da diversi autori l'effetto di un ulteriore rivestimento di superficie sulla citotossicità dei QD. Shiohara et al. (2004) studiarono la citotossicità di tre QD di Cd/Se/ZnS rivestiti con acido mercaptoundecanoico (MUA)

con diversa emissione spettrale (verde, giallo e rosso) in tre differenti linee cellulari. Lo studio rivelò che il rivestimento con MUA non è adatto perché aumenta la tossicità dei QD. Hoshino et al. (2004) dimostrarono che il trattamento con il solo rivestimento dei QD, l'acido mercaptoundecanoico (100 µg/ml), causava acuta citossicità nelle cellule murine del linfoma a cellule T (EL-4).

Ryman-Rasmussen et al. (2007) utilizzarono cheratinociti primari umani neonatali (HEK) per determinare la citotossicità e il potenziale infiammatorio di QD di CdSe con il guscio di ZnS. I QD erano solubili e di due diverse dimensioni QD 565 (4.6 nm) e QD 655 (6 nm per 12 nm), ricoperti con tre differenti rivestimenti: polietilenglicole (PEG), PEG-ammine ed acidi carbossilici. La citotossicità fu osservata per QD 565 e QD 655 ricoperti con acido carbossilico e PEG-ammine dopo 48 ore di esposizione, ed una bassa citotossicità fu osservata per i QD ricoperti con polietilenglicole. Voura et al. (2004) trattarono cellule di melanoma (B16F10) con QD di CdSe/ZnS rivestiti con acido diidrossilipoico e non notarono differenze rilevabili nella crescita di cellule di controllo e trattate con i QD. Hanaki et al. (2003) trattarono cellule renali della scimmia verde africana (VERO) con concentrazioni di 0.24 mg/ml di QD di CdSe/ZnS rivestiti con MUA e con albumina di siero ovino e non trovarono effetti indotti dai QD sulla vitalità cellulare.

Lovric et al. (2005) trovarono che i quantum dot di tellurio di cadmio ricoperti con acido mercaptopropionico e β-mercaptoetilammina erano citotossici alla concentrazione di 10 µg/ml in colture cellulari di feocromocitoma di ratto; al contrario, QD di tellurio di cadmio non ricoperti erano tossici alla concentrazione di 1 µg/ml. La morte cellulare era caratterizzata da condensazione della cromatina e sviluppo di blebs sulla membrana cellulare, aspetti caratteristici dell'apoptosi. La citotossicità era più pronunciata a parità di carica nei QD più piccoli alla stessa concentrazione. Le dimensioni dei QD influenzano anche la distribuzione subcellulare: cationi di QD più piccoli si localizzano nel nucleo, mentre cationi più grandi si localizzano nella matrice citoplasmatica. I meccanismi coinvolti nella morte cellulare erano attribuiti alla presenza di Cd libero.

5.2.4 Conclusioni

In conclusione i dati disponibili mostrano effetti citotossici ed apoptotici per i nanotubi di carbonio (prevalentemente per quelli a parete a singola non funzionalizzati) ma molto sembra dipendere dallo stato di aggregazione, dalla presenza di metalli catalizzatori, dalla presenza di gruppi di funzionalizzazione, dal grado di purezza, dalla lunghezza e dal diametro. Per quanto riguarda i fullereni, questi sembrano essere meno citotossici anche se la risposta dipende dal tipo cellulare: non sono citotossici per i macrofagi mentre lo sono per altri tipi di cellule. Per le NP metalliche c'è un'ampia variabilità nella risposta dipendente dal tipo di metallo: effetti sono stati

osservati per NM a base di argento, rame, zinco, molibdeno, alluminio. Mentre per i QD gli effetti osservati sono da mettere in relazione con le dimensioni e con il tipo di rivestimento presente.

Nel complesso dagli studi disponibili emerge un'ampia variabilità negli effetti citotossici osservati che dipende dalle specifiche caratteristiche dei NM utilizzati di cui è necessario tener conto. Inoltre dato che nei diversi studi vengono solitamente utilizzate elevate quantità di NM è auspicabile che vengano eseguiti ulteriori studi che utilizzino i NM più diffusi, e quindi più rilevanti dal punto di vista delle possibili esposizioni, e a concentrazioni inferiori.

5.3. Effetti respiratori

Studi *in vitro* e *in vivo* hanno riportato che il polmone rappresenta il principale organo bersaglio degli effetti tossici delle NP. Inoltre, la più importante via di assorbimento delle NP è quella respiratoria.

5.3.1. Assorbimento

Sebbene le prime vie aeree costituiscano una robusta barriera al passaggio delle NP, lo stesso non può dirsi per gli alveoli, che costituiscono l'area di scambi gassosi tra il polmone ed il sangue. A questo livello, infatti, lo spessore della separazione tra i due compartimenti si riduce a soli 5 μm . Poiché la maggior parte delle NP ingegnerizzate è presente in ambito occupazionale e ambientale sotto forma di aerosol o sospensioni colloidali, l'esposizione polmonare conseguente ad inalazione nelle vie aeree costituisce la via di esposizione umana più comune per questo materiale (Maynard et al., 2004). L'interazione delle NP ingegnerizzate con il parenchima polmonare può variare a seconda che le NP abbiano una forma sferica o allungata. Le NP di forma sferica si depositano in regioni polmonari diverse in base alle dimensioni e alla struttura fisica (Oberdoster et al., 2005). Una volta depositatesi negli alveoli, le NP di forma sferica sono traslocate nell'interstizio polmonare, probabilmente con meccanismo di transitosi, e da qui nella circolazione sistemica. Berry et al. (1997) hanno descritto per primi la traslocazione delle NP d'oro attraverso l'epitelio alveolare instillando nei ratti per via intratracheale NP d'oro del diametro di 30 nanometri. Diversamente dalle NP sferiche, per quelle di aspetto simil-fibroso, come i nanotubi di carbonio, un ruolo chiave ha, per la traslocazione polmonare, la loro capacità di eludere la sorveglianza dei macrofagi (fagocitosi frustrata) e di potere così introdursi nella circolazione generale. Questa capacità di elusione macrofagica sembra essere più spiccata per le fibre di lunghezza maggiore.

5.3.2. Nanomateriali a base di carbonio

Nanotubi di carbonio (CNT)

Numerosi Autori hanno studiato gli effetti citotossici dei SWCNT e dei MWCNT su linee cellulari polmonari umane e non. Per quanto riguarda i MWCNT è stato osservato mediante l'MTT test che l'esposizione a 5 µg/ml di queste sostanze determina nei macrofagi alveolari murini RAW 264.7, nei macrofagi umani THB-1 e nella linea cellulare di carcinoma polmonare umano A549 effetti citotossici simili a quelli dell'asbesto (Soto et al., 2007). Risultati simili erano stati precedentemente ottenuti su cellule RAW 264.7 e su macrofagi alveolari esposti a SWCNT e MWCNT (Murr et al., 2005; Jia et al., 2005). Effetti citotossici di minore entità sono stati osservati esponendo cellule A549 a concentrazioni crescenti di SWCNT (da 1.56 a 800 µg/ml). Gli effetti citotossici maggiori sono stati osservati mediante il test dell'alar blue, il test di incorporazione del rosso neutrale e l'MTT alle concentrazioni di 400 ed 800 µg/ml ed in assenza di siero (Davoren et al., 2007). Altri Autori hanno evidenziato invece che sulla stessa linea cellulare e su macrofagi alveolari di ratto NR8383 l'esposizione a 5, 10, 50 e 100 µg/ml di MWCNT e di SWCNT purificati non ha determinato effetti tossici (Pulskamp et al., 2007). In particolare nessun effetto tossico è stato riscontrato con il test WST-1 sebbene l'MTT test abbia evidenziato una diminuzione dose-dipendente della vitalità cellulare. Questa discordanza è stata spiegata da alcuni Autori con la capacità dei CNT di interferire con l'MTT test (Worle-Knirsch et al., 2006; Monteiro-Riviere e Inman 2006). Numerosi studi comunque hanno dimostrato la tossicità di queste NP mediante altri test di vitalità cellulare. In cellule RAW 264.7, trattate con concentrazioni di SWCNT comprese tra 12.5 e 30 µg/ml, è stata osservata un'importante diminuzione del numero delle cellule mediante la conta cellulare (Dutta et al., 2007). In cellule A549 e in cellule di epitelio bronchiale umano BEAS-2B il test clonogenico ha mostrato una significativa riduzione delle dimensioni delle colonie cellulari con dosi di SWCNT comprese tra 0 e 400 µg/ml (Herzog et al., 2007). Infine, cellule di mesotelioma umano MSTO211H trattate con concentrazioni di SWCNT non purificati comprese tra 0 e 30 µg/ml ha provocato un'importante riduzione della proliferazione cellulare (Wich et al., 2006).

I lavori presenti in letteratura dimostrano che la citotossicità dei CNT sarebbe correlata alla presenza di impurezze metalliche. Infatti, l'esposizione delle cellule BEAS-2B a SWCNT contenenti il 30% di ferro o il 20% di nichel ha determinato effetti citotossici quali diminuzione della vitalità cellulare, riduzione dei livelli di glutazione ed aumentata produzione dei radicali idrossilici (Shvedova et al., 2007b). Analoghi effetti sono stati riscontrati in cellule A549, BEAS-2B (Herzog et al., 2007, Shvedova et al., 2004) e in cellule RAW 264.7 (Kagan et al., 2006) esposte a SWCNT contenenti ferro a dif-

ferenza di SWCNT purificati che hanno manifestato minimi effetti tossici (Herzog et al., 2007; Kagan et al., 2006). Infatti, i CNT purificati non sono potenti induttori dei radicali liberi dell'ossigeno (ROS) o dei mediatori dell'infiammazione. L'esposizione di cellule RAW 264.7 a SWCNT purificati non ha determinato la produzione intracellulare di ROS o dell'ossido nitrico (NO) (Kagan et al., 2006; Shvedova et al., 2005). Analogamente, in cellule A549 e NR8383 trattate con 5 - 100 µg/ml di MWCNT e di SWCNT purificati non vi è stata produzione di NO, IL-8 e TNF-α mentre, le NP non purificate hanno indotto la produzione di ROS (Pulskamp et al., 2007). Infine, Wang L. et al. (2008) hanno osservato che in fibroblasti polmonari, l'esposizione a SWCNT ha determinato un aumento della produzione di collagene e della proliferazione cellulare del 70%. Questi risultati confermerebbero le reazioni fibrogene dovute ai CNT osservate negli studi *in vivo*.

Pochi sono gli studi *in vivo* che hanno riportato effetti tossici dei CNT sul sistema respiratorio. Per quanto riguarda i SWCNT, in ratti maschi l'instillazione intratracheale di 1 e 5 mg/kg di questi CNT ha determinato un'infiammazione polmonare transitoria seguita dalla formazione non dose-dipendente di granulomi multifocali (Warheit et al., 2004). In topi maschi trattati con concentrazioni di 0.1 e 0.5 mg di SWCNT purificati e non, è stata invece osservata la comparsa dose-dipendente di granulomi interstiziali (Lam et al., 2004). Risultati simili sono stati ottenuti da Shvedova et al. (2005) che, esponendo mediante aspirazione faringea, topi femmine a SWCNT (0-40 µg) hanno osservato l'instaurarsi di un processo infiammatorio acuto e transitorio e la formazione dose-dipendente sia di granulomi epitelioidi sia di fibrosi interstiziale progressiva. Nell'ambito degli studi *in vivo* sono particolarmente importanti gli esperimenti di tossicità inalatoria. Nei topi C57BL/6 il confronto tra esposizione inalatoria (5 mg/m³, per 5 ore al giorno e per 4 giorni) ed aspirazione faringea (5-20 µg) di SWCNT ha evidenziato che entrambi i modelli sperimentali provocano un'importante risposta infiammatoria acuta che, con lo stress ossidativo, conduce allo sviluppo di una polmonite granulomatosa multifocale, seguita da una significativa fibrosi interstiziale (Shvedova et al., 2008b).

Tuttavia, l'esposizione inalatoria è molto più efficace nell'indurre i suddetti effetti tossici. Lo stress ossidativo indotto dai SWCNT è uno dei più importanti meccanismi che contribuiscono alla tossicità polmonare. Il trattamento di topi C57BL/6, privi dell'enzima NADPH ossidasi, con 40 µg di SWCNT ha determinato l'accumulo di polimorfonucleati, un incremento delle cellule apoptotiche, delle citochine pro-infiammatorie, la diminuzione delle citochine anti-infiammatorie, del TGF-β e del collagene (Shvedova et al., 2008c). Sulla base di questi risultati gli Autori hanno concluso che i ROS generati dalla NADPH ossidasi svolgono un ruolo di primaria importanza nella regolazione della risposta polmonare ai SWCNT. Negli stessi animali, alimentati con una

dieta carente in vitamina E, la somministrazione di 40 µg di SWCNT ha determinato una notevole diminuzione degli antiossidanti polmonari inducendo una risposta infiammatoria acuta decisamente più rilevante (Shvedova et al., 2007a).

Per quanto riguarda i MWCNT, Muller et al. (2005), dopo instillazione intratracheale di 0.5, 2 e 5 mg di MWCNT in ratti Sprague-Dawley, hanno osservato un'importante reazione infiammatoria acuta. Due mesi dopo il trattamento, agglomerati di MWCNT depositati nelle vie aeree hanno provocato la comparsa di granulomi ricchi di collagene con alveolite. Simili risultati sono stati ottenuti in topi C57BL/6 che, dopo aspirazione faringea di MWCNT, hanno sviluppato un'infiammazione polmonare tempo e dose-dipendente (Sriram et al., 2007). Tuttavia, nello stesso modello animale l'inalazione (per 7 e 14 giorni e per 6 ore al giorno) di concentrazioni di MWCNT comprese tra 0.3 e 5 mg/m³ non ha determinato la comparsa di alcun danno polmonare o risposta infiammatoria (Mitchell et al., 2007). Recentemente è stato ipotizzato che la tossicità acuta polmonare osservata in ratti Wistar dopo instillazione intratracheale di 2 mg di MWCNT sia correlata alla presenza di difetti strutturali dei composti (Fenoglio et al., 2008; Muller et al., 2008b). In topi eterozigoti per il gene p53 la somministrazione intraperitoneale di 3 mg di MWCNT ha determinato dopo sei mesi dal trattamento la comparsa di mesotelioma (Takagi et al., 2008). Tuttavia, l'elevata dose di esposizione utilizzata ha sollevato dubbi sulla capacità dei MWCNT di determinare lesioni asbesto-simili (Shvedova et al., 2009). Poland et al. (2008), utilizzando una dose di esposizione più bassa, hanno osservato in topi esposti mediante iniezione intraperitoneale, a 50 µg di MWCNTs "lunghi" l'induzione di un'importante risposta infiammatoria della parete addominale con la presenza di cellule giganti da corpo estraneo. Questi effetti non sono stati invece evidenziati negli animali trattati con MWCNT "corti".

Fullereni

Macrofagi alveolari esposti a fullereni hanno manifestato effetti citotossici a concentrazioni molto elevate (226 µg/cm²) (Jia et al., 2005).

La citotossicità dei fullereni è correlata al loro grado di solubilizzazione ed è inversamente proporzionale al numero di gruppi idrossilici e carbossilici presenti sulla superficie della nanoparticella (Sayes et al., 2004). Infatti, in uno studio *in vitro* eseguito su cellule dell'epitelio polmonare è stato osservato che gli effetti tossici dei fullereni non solubili sono 3-4 volte maggiori rispetto a quelli provocati dai fullereni solubili (Sayes et al., 2007a). L'instillazione intratracheale, in ratti, di fullereni solubili e non, a dosi comprese tra 0.2 e 3 mg/kg, ha evidenziato che entrambi i composti inducono una risposta infiammatoria transitoria che si manifesta un giorno dopo il trattamento. Inoltre, a distanza di tre mesi, nei ratti esposti a 1.5 e 3 mg/kg, è stato osservato un incremento della perossidazione lipidica (Sayes et al., 2007a). L'esposizione inalatoria a 2.22 mg/m³

di fullereni per 3 ore al giorno per dieci giorni consecutivi in ratti maschi Fischer 344 non ha determinato alcuna lesione evidenziabile all'analisi istopatologica del tratto respiratorio (Baker et al., 2008).

5.3.3. Nanoparticelle metalliche

Numerosi studi *in vitro* ed *in vivo* hanno indagato i possibili effetti citotossici e la biocompatibilità delle NP metalliche.

In cellule BEAS-2B l'esposizione a dosi crescenti (da 5 a 40 µg/ml) di NP di biossido di Ti (TiO₂) ha determinato la loro penetrazione nel citoplasma e la loro localizzazione nella regione perinucleare. Inoltre, alla dose maggiore la vitalità cellulare si è ridotta del 40% rispetto al controllo e si è osservato un aumentato stress ossidativo dose-dipendente che secondo gli Autori sarebbe responsabile degli effetti citotossici osservati (Park et al., 2008b). Effetti simili sono stati osservati in cellule A549 esposte a concentrazioni di NP di TiO₂ comprese tra 3 e 400 µg/cm² (Singh et al., 2007). Sayes et al. (2006b) hanno riportato effetti citotossici nella stessa linea cellulare ma solo a concentrazioni relativamente elevate (100 µg/ml), dimostrando che l'induzione della risposta infiammatoria e della citotossicità sono dose e tempo-dipendenti. Livelli di citotossicità significativamente inferiori sono stati osservati a concentrazioni comprese tra 0.25 e 100 µg/ml in condizioni sperimentali simili (Simon-Deckers et al., 2008). Karlsson et al. (2009) non hanno invece osservato alcun effetto citotossico o danno mitocondriale a concentrazioni di 40 e 80 µg/ml. Questi risultati discordanti potrebbero essere spiegati dalle differenti caratteristiche delle NP quali le dimensioni, la struttura cristallina, la composizione chimica e l'area di superficie.

Anche in ratti, l'instillazione intratracheale di 1 e 5 mg/kg di differenti tipi di NP di TiO₂ ha determinato effetti polmonari riconducibili alla diversa composizione chimica e struttura cristallina delle NP (Warheit et al., 2007). Attraverso l'analisi del BAL si è visto che le NP di Ti inducono un'importante risposta infiammatoria e significativi effetti citotossici. In uno studio simile, topi maschi ICR trattati con 0.1 e 0.5 mg di TiO₂, hanno manifestato importanti alterazioni morfologiche ed istologiche del tessuto polmonare come la rottura dei setti alveolari, la proliferazione e l'iperplasia dei pneumociti di tipo II, l'accumulo di macrofagi, l'apoptosi delle cellule epiteliali e l'induzione di lesioni enfisematose (Chen et al., 2006). Negli stessi animali un'esposizione a 5, 20 e 50 mg/kg di NP di TiO₂ ha determinato l'induzione delle citochine proinfiammatorie di tipo Th1 e Th2, proliferazione delle cellule B ed un'aumentata produzione delle IgE. Inoltre, nei polmoni sono state osservate la formazione di lesioni granulomatose e la deposizione di proteine proinfiammatorie (Park et al., 2009). Ratti maschi di tipo Crl:CD(SD), esposti intratrachealmente a 1.5 e 5 mg/kg di particelle di TiO₂ di

diverse dimensioni e stato di aggregazione, hanno manifestato, dopo una settimana e a parità di dose somministrata, una risposta infiammatoria superiore nelle NP rispetto alle particelle di dimensioni maggiori (Kobayashi et al., 2009). Dopo un mese, le risposte infiammatorie osservate nei diversi gruppi di animali sono risultate invece simili. Gli Autori hanno ipotizzato che le risposte infiammatorie possano essere determinate dalle diverse superfici d'area delle particelle impiegate ($1.58 \text{ m}^2/\text{kg}$ per le NP e $0.05 \text{ m}^2/\text{kg}$ per le particelle fini).

Gli effetti citotossici delle NP di argento (Ag) sono stati osservati nelle cellule germinali murine, nelle cellule epatiche di ratto, nel glioblastoma umano e nei fibroblasti polmonari umani IMR-90. In quest'ultima linea cellulare il trattamento con queste NP ha provocato una significativa riduzione del contenuto intracellulare di ATP, un importante danno mitocondriale ed un notevole incremento dose dipendente della produzione dei ROS (Asharani et al., 2009). Secondo gli Autori le NP di Ag altererebbero la normale funzionalità della catena respiratoria mitocondriale inducendo conseguentemente un accumulo di ROS e l'arresto della sintesi dell'ATP. Tuttavia, in uno studio su cellule A549, in cui si sono confrontati gli effetti di diverse NP metalliche, quelle di Ag indurrebbero effetti citotossici significativamente inferiori rispetto al Ti e sarebbero dotate di tossicità analoga all'alluminio, allo zinco (Zn) e all'Ag (Park et al., 2007).

Ratti Sprague-Dawley esposti mediante inalazione (per 6 ore al giorno e per 90 giorni) a NP di Ag alle concentrazioni di 0.7×10^6 , 1.4×10^6 e 2.9×10^6 particelle/cm³, hanno mostrato la presenza di piccole lesioni granulomatose e l'insorgenza di un'infiammazione alveolare cronica dose dipendente (Sung et al., 2008). Anche in uno studio analogo degli stessi Autori con simili concentrazioni di NP di Ag (0.6×10^6 , 1.4×10^6 e 3×10^6 particelle/cm³), si è osservato, mediante esame istopatologico del tessuto polmonare, la presenza di un infiltrato infiammatorio cellulare, di un'infiammazione alveolare cronica e di piccole lesioni granulomatose (Sung et al., 2009).

Gli studi in letteratura riportano come le NP di ferro (Fe) siano dotate di scarso potere citotossico. Infatti, concentrazioni di NP di Fe pari a 0.24, 2.4, 24, 240 e 2400 ppb su cellule A549 hanno determinato solo deboli effetti sull'attività mitocondriale, sul contenuto di DNA e sulla produzione del glutatione da parte delle cellule (Cha et al., 2007). Altri studi sulla stessa linea cellulare (A 549) hanno invece riportato l'assenza di effetti citotossici significativi (Karlsson et al., 2009; Karlsson et al., 2008).

Le NP di rame (Cu) sono capaci di indurre in cellule A549 maggiori effetti genotossici, citotossici, una maggiore depolarizzazione della membrana mitocondriale e un importante aumento dello stress ossidativo rispetto alle particelle dello stesso metallo di dimensioni micrometriche (Karlsson et al., 2009; Karlsson et al., 2008). Anche in cellule epiteliali della laringe umana HEp-2 l'esposizione a dosi di NP di Cu comprese

tra 4 - 400 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ha fornito risultati analoghi ai precedenti (Fahmy et al., 2009). Infatti, le cellule esposte hanno mostrato effetti citotossici dose-dipendenti che secondo gli Autori sarebbero correlati alla presenza di un importante stress ossidativo cellulare.

In cellule BEAS-2B esposte a concentrazioni crescenti (5, 10, 20 e 40 $\mu\text{g}/\text{ml}$) di NP di cerio (Ce) (Park et al., 2008b) si è osservato un incremento della morte cellulare, della produzione dei ROS e l'induzione dei geni correlati allo stress ossidativo. L'aumento dei ROS intracellulari sarebbe responsabile dell'attivazione della caspasi-3 e del conseguente innesco dell'apoptosi mediante la quale le NP di Ce realizzerebbero il loro effetto citotossico. Il coinvolgimento dei ROS nella citotossicità delle NP di Ce è stato confermato da uno studio dello stesso gruppo di ricerca condotto su cellule BEAS-2B esposte a 1 mg/l (Eom et al., 2009).

In cellule A549, esposte per 24 ore a diverse concentrazioni di NP di Zn, è stato possibile rilevare un'apoptosi importante ed un notevole incremento dello stress ossidativo intracellulare (Park et al., 2007). In uno studio effettuato esponendo diverse linee cellulari a concentrazioni di NP di Zn comprese tra 0.001 $\mu\text{g}/\text{ml}$ e 30 mg/ml, le cellule L2 dell'epitelio polmonare di ratto hanno manifestato un maggior danno cellulare (Sayes et al., 2007b). Inoltre, le NP di Zn hanno indotto diversi effetti citotossici. Nello stesso studio è stato eseguito anche un esperimento *in vivo*, con instillazione intratracheale di 1 e 5 mg/kg di NP di Zn a ratti CrI:CD(SD)IGS BR cui è seguita la comparsa di una risposta infiammatoria estremamente cospicua ma reversibile che si è risolta a distanza di un mese dall'esposizione (Sayes et al., 2007b).

In cellule A549, esposte per 24, 48 e 72 ore a dosi crescenti (10, 50 e 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$) di NP di SiO_2 , è stato possibile osservare una riduzione dose e tempo-dipendente della vitalità cellulare, un incremento dei livelli di ROS, della produzione della malondialdeide e della lattato deidrogenasi (LDH) (Lin et al., 2006b). *In vivo*, la somministrazione intravenosa (2 volte la settimana per 4 settimane) di 10 e 30 mg/kg di NP di silice a topi BALB/c non ha provocato alcun danno respiratorio (Nishimori et al., 2009).

5.3.4. Conclusioni

Nel complesso gli studi *in vitro* suggeriscono come le NP ingegnerizzate siano in grado di esercitare sui sistemi biologici analizzati effetti citotossici non trascurabili. Infatti, le cellule dall'apparato respiratorio murino, di ratto, ed umano trattate con SWCNT e MWCNT, con differenti NP metalliche o di silice mostrano una diminuzione della vitalità cellulare, del numero e delle dimensioni delle colonie cellulari, della proliferazione cellulare, un incremento della produzione dei ROS e dello stress ossidativo extra ed intracellulare.

Gli studi in vivo invece evidenziano come l'esposizione alle NP provochi la comparsa di un'importante risposta infiammatoria polmonare acuta, la formazione di lesioni granulomatosi ed enfisematose, la deposizione di collagene con conseguente fibrosi interstiziale e l'induzione di un significativo stress ossidativo. Inoltre, per quanto riguarda i MWCNT rimane ancora da accertare la possibilità che queste NP siano in grado di generare lesioni simili a quelle provocate dall'asbesto.

I suddetti effetti sul sistema respiratorio hanno suggerito di limitare l'utilizzo industriale e le possibili applicazioni pratiche delle NP (Svhedova et al., 2009). Tuttavia, i differenti tipi di NP mostrano gradi di tossicità piuttosto variabili, rendendo impossibile generalizzazioni. Ulteriori studi sono pertanto necessari per definire la reale tossicità di questi NM. A tal fine sarà fondamentale prevedere una accurata caratterizzazione chimico-fisica delle NP che saranno oggetto di studio.

5.4. Effetti cutanei

L'esposizione cutanea a NP (NP) può determinare effetti locali sulla cute, sia irritativi che allergici, o essere una via d'ingresso nel circolo sistemico di questi materiali. Pochi sono i dati per ora disponibili sui rischi cutanei di NP ma i primi risultati sperimentali permettono di ipotizzare un loro effetto sulla cute e la loro possibilità di penetrazione negli strati cutanei, anche se ad oggi vi è la necessità di maggiore ricerca su questo argomento con indagini specifiche sulle varie tipologie di NP, perché diversi materiali possono avere diffusione ed effetti diversi sulla cute. È noto, infatti che gli effetti cutanei sono diversi se vi è esposizione a nanotubi di carbonio oppure a NP metalliche, che si comportano diversamente a seconda delle loro dimensioni e del tipo di metallo considerato. Peraltro le informazioni maggiori ci derivano dall'industria farmaceutica che ha studiato molto l'effetto delle NP di ZnO e di TiO₂ utilizzate per la formulazione di creme protettive mentre pochissime informazioni sono disponibili per le altre tipologie di NP.

5.4.1. Assorbimento

La cute, con un'estensione di circa 1,5 m² nell'adulto, costituisce una barriera difficilmente superabile dalle NP (Argyle et al., 2009). Ciò è dovuto alla sostanziale impermeabilità dello strato superficiale della cute (epidermide), mentre lo strato sottostante (derma) ha una ricca irrorazione sanguigna e contiene abbondanti macrofagi tissutali, vasi linfatici, cellule dendritiche, e cinque differenti tipi di terminazioni nervose di tipo sensitivo. Pertanto, qualora le NP ingegnerizzate riuscissero ad avere accesso al derma esse verrebbero trasportate nel circolo ematico e convogliate nel

sistema linfatico e nei linfonodi, potendo, a questo punto, provocare una risposta immunitaria. Kim et al. (2004) hanno dimostrato che NP iniettate nel derma migrano verso i linfonodi regionali, possibilmente tramite macrofagi e cellule del Langerhans. Gli studi riguardanti la penetrazione cutanea delle NP (Alvarez-Roman et al., 2004; Baroli et al., 2007; Bennat et al., 2000; Ryman-Rasmussen et al., 2006; Larese et al., 2009) hanno dato risultati discrepanti, probabilmente a causa dell'impiego di tecniche e metodologie diverse, e specialmente dell'assenza di protocolli standardizzati. Le flessioni meccaniche, detergenti irritanti e sostanze chimiche possono aumentare l'assorbimento cutaneo. Sebbene finora non vi siano prove sperimentali convincenti che le NP ingegnerizzate possano oltrepassare l'epidermide e quindi raggiungere il derma, esistono indizi indiretti a supporto di questa possibilità. È stato dimostrato che i nanotubi di carbonio sono in grado di danneggiare i cheratinociti umani, che sono la componente cellulare dell'epidermide (Shvedova et al., 2003a; Monteiro-Riviere et al., 2005): poiché il passaggio trans-epidermico è molto probabile in caso di danno anatomico, esposizioni ripetute a NP ingegnerizzate potrebbero determinare in una prima fase il danno dell'epidermide e successivamente il passaggio nel derma delle medesime NP. Questa possibilità ha importanti risvolti non solo in ambito occupazionale, ma anche nella popolazione generale se si considera che le NP sono presenti in molti prodotti cosmetici come veicoli per creme o negli shampoo, detergenti o creme solari.

Effetto irritativo

Per alcuni NM è stato evidenziato un effetto di tipo irritativo-infiammatorio (Crosera et al., 2009). In particolare i nanotubi di carbonio possono svolgere un'azione irritativa sulla cute e sulla congiuntiva per il loro effetto meccanico: Kishore et al. (2009) riportano effetti irritativi reversibili di alcuni nanotubi sulla congiuntiva mentre non osservano effetti sulla cute dell'animale. Per quanto riguarda i quantum dot, invece, Ryman-Rasmussen et al. (2007) riportano un loro effetto citotossico ed irritativo in esperimenti *in vitro* su cheratinociti in cui si osserva liberazione di citochine. Anche le NP d'argento possono svolgere un effetto citotossico su colture di cheratinociti *in vitro* ma non vi sono ad oggi dati su soggetti professionalmente esposti o su utilizzatori (Zanette et al., 2009).

Effetto allergico

Attualmente non vi sono dati sulla potenziale allergicità delle NP ma alcune informazioni possono fare ipotizzare un aumentato rischio nelle condizioni di esposizione a NP metalliche. Visto che le NP possiedono una maggior superficie biodisponibile, è ipotizzabile che esercitino una maggior interazione con i sistemi immunitari cutanei

e l'induzione di una risposta allergica da contatto nel caso di NP contenenti metalli allergenici come cobalto, nichel e cromo. Non vi sono tuttavia ad oggi dati che confermino tale ipotesi e ulteriori studi in questo campo risultano necessari. Presumibilmente non ci dovrebbe essere risposta allergica verso quelle NP contenenti metalli non allergenici (Oro, Argento). Alcuni dati preliminari, invece, suggeriscono che i fullereni possano avere un ruolo nell'inibizione della risposta allergica IgE mediata sia in sistemi *in vitro* che *in vivo* inibendo il rilascio di istamina (Ryan et al., 2007).

5.4.2. Nanomateriali a base di carbonio

Nanotubi di carbonio e fullereni

Vi sono pochi dati sugli effetti cutanei dei nanotubi di carbonio (CNT). Per i fullereni Rouse et al. (2007) hanno dimostrato la capacità di penetrazione attraverso la cute intatta e particolarmente nelle zone di flessione e Ryan et al. nel 2007 hanno ipotizzato un loro ruolo nell'inibizione della risposta allergica IgE mediata.

I dati attualmente disponibili sui possibili effetti cutanei dei CNT si basano essenzialmente su studi *in vitro* effettuati su cheratinociti e fibroblasti. Shvedova et al. (2003a) hanno dimostrato che i nanotubi di carbonio a parete singola (SWCNT) causano stress ossidativo su cheratinociti umani immortalizzati (HaCat) con perdita della vitalità e alterazioni macroscopiche. In uno studio su cheratinociti esposti a dosi crescenti di SWCNT, l'aumento di rilascio dell'interleuchina-8 (IL-8), osservato dopo 24 e 48 ore alla dose più elevata (0.05 mg/ml) suggerisce una reazione irritativa dose-dipendente (Zhang et al., 2007), mentre in uno studio effettuato su fibroblasti umani esposti a SWCNT con diversi gradi di funzionalizzazione si è evidenziata una citotossicità che diminuisce con il grado di funzionalizzazione (Sayes et al., 2006a). Inoltre la superficie esposta risulterebbe essere proporzionale alla loro potenziale tossicità. Altri studi hanno dimostrato un effetto irritativo-infiammatorio dei nanotubi di carbonio multi-parete (MWCNT) sui cheratinociti (Monteiro-Riviere et al., 2005; Witzmann and Monteiro-Riviere et al., 2006) ed effetti citotossici su fibroblasti della pelle (Ding et al., 2005).

5.4.3. Nanoparticelle di metalli ed ossidi metallici

Nanoparticelle metalliche

I prodotti a base di NP d'argento presentano molteplici applicazioni, specialmente per l'attività antimicrobica dell'argento, ben documentata e considerata priva di tossicità. Cheratinociti e fibroblasti in coltura sono stati impiegati per studiare gli eventuali effetti tossici di NP d'argento rilasciate da capi di vestiario contenenti nanoargento (Leaper, 2006). I risultati di questi studi hanno dimostrato che gli estratti di bendaggi

ricoperti con NM d'argento inibiscono la proliferazione di cheratinociti e ne alterano la morfologia (Paddle-Ledinek et al., 2006). Poon and Burd (2004) hanno inoltre dimostrato che cristalli di nanoargento risultano tossici nei confronti sia di cheratinociti sia di fibroblasti. Alcuni Autori hanno suggerito che la penetrazione cutanea di nanoargento sia maggiore nella cute lesa, rispetto alla cute integra (Larese et al., 2009). I meccanismi di eliminazione di NP dopo assorbimento per via transdermica non sono ancora del tutto noti, ma esistono evidenze sulla capacità di NP di distribuirsi per via sistemica attraverso i vasi linfatici sottocutanei (Gopee et al., 2007).

Nanoparticelle d'oro sono utilizzate per applicazioni medicali in quanto ritenute sicure (Connor et al., 2005) ma Wang S. et al. (2008) hanno dimostrato un loro effetto citotossico su cheratinociti umani *in vitro*.

Papageorgiou et al. (2007), paragonando gli effetti citotossici e genotossici di NP e microparticelle di una lega cobalto/cromo in fibroblasti umani in coltura, hanno riportato che le NP inducono un maggior danno al DNA ed esibiscono maggior citotossicità, rispetto alle microparticelle.

Nanoparticelle di ossidi metallici: biossido di titanio (TiO₂) e ossido di zinco (ZnO)

Queste sono le NP più diffuse ed utilizzate nelle creme schermanti solari in quanto bloccano i raggi UV in modo efficiente ma non presentano il colorito biancastro tipico delle creme che utilizzavano particelle in dimensioni micromiche. Tan et al. (1996) hanno valutato le biopsie di soggetti che avevano applicato per 2-6 settimane una crema con TiO₂ confermando la presenza del metallo nella cute esposta. Successivamente, però, altri autori hanno dimostrato che il TiO₂ si localizza solo nello strato corneo e non penetra in profondità (Schulz et al., 2002; Mavon et al., 2007) anche se una piccola quantità si può trovare nei follicoli piliferi (Lademann et al., 1999). Il progetto europeo NANODERM del 2007 ha studiato per esteso l'effetto cutaneo concludendo che il TiO₂ è sicuro, non penetrando negli strati profondi dell'epidermide. Simili i risultati degli studi sull'ossido di zinco, che resta in superficie e penetra solo a livello dello strato corneo (Cross et al., 2007).

A fronte di tali dati, che negano la penetrazione in profondità nella cute di queste NP, ci sono le informazioni più recenti che evidenziano la capacità di alcune NP di penetrare la cute nelle condizioni di flessione (Rouse et al., 2007) o quando la cute è lesa (Larese et al., 2009); ciò rende probabile che, nelle condizioni di ripetute applicazioni di queste creme, nel tempo possa verificarsi una penetrazione di NP. La stessa Newman, nella recente review (2009), suggerisce la necessità di ulteriori studi per capire se nelle condizioni reali vi sia un aumentato assorbimento di tali metalli a livello cutaneo.

La penetrazione di queste NP a livello degli strati profondi dell'epidermide aprirebbe

nuovi quesiti sulla loro sicurezza in quanto le piccole dimensioni e l'elevata superficie potrebbero determinare sulle cellule e sul sistema immunitario effetti diversi rispetto ai materiali con granulometria maggiore. Le piccole dimensioni possono aumentare la capacità di interagire a livello intercellulare e a livello del DNA e l'elevata superficie aumenta la loro capacità di svolgere azione immunitaria e di agire come apteni inducendo reazioni allergiche o autommuni (Newman et al., 2009) ma gli studi attuali sono ancora troppo pochi per dare un giudizio definitivo su tali sostanze.

È noto, però, che in sistemi *in vitro*, le NP di TiO₂ hanno effetti citotossici e infiammatori anche se a concentrazioni relativamente elevate (Cai et al., 1992; Wamer et al., 1997; Dunford et al., 1997; Sayes et al., 2006b). Effetto citotossico *in vitro* è stato dimostrato anche per le NP di ZnO (Huang et al., 2009, Yuan et al., 2009).

L'aspetto più importante è relativo alla capacità del TiO₂ e ZnO di essere fotocatalizzatori, e di essere usati nelle celle fotovoltaiche per produrre elettroni. A livello cellulare, tale capacità porta alla formazione di radicali liberi dell'ossigeno (ROS) e all'effetto lesivo sul DNA. Dunford et al. (1997) hanno dimostrato che le particelle di biossido di titanio, dopo esposizione a raggi ultravioletti UVA e UVB, determinano la rottura della catena del DNA in culture di fibroblasti. Uchino, nel 2002, ha confermato la capacità del TiO₂ di generare radicali idrossilici e Hidaka et al., nel 2006, hanno studiato i danni al DNA indotti da TiO₂ e ZnO dopo esposizione a UV, trovando un aumento di alterazioni nel DNA cellulare. Dati opposti sono stati riportati nello studio di Dufour et al. (2006), nel quale vengono messe a confronto le alterazioni cromosomiche indotte su cellule ovariche di hamster dopo trattamento con UV con o senza NP di ZnO, senza trovare significative differenze fra le due esposizioni. Gli autori concludono che le aberrazioni cromosomiche possano essere correlate all'azione dei raggi UV e non all'esposizione a ZnO.

Un'altra recente review pubblicata da studiosi della L'Oreal (Nohynek et al., 2009) analizza il rischio legato all'uso di NP negli schermi per raggi ultravioletti UV, concludendo che le evidenze scientifiche suggeriscono come i NM usati ad oggi nelle formulazioni cosmetiche e negli schermi solari non presentino rischi per la cute o per la salute mentre svolgono azione protettiva contro gli effetti negativo della radiazione UV, compreso il cancro.

Tuttavia alcuni studi effettuati evidenziano un possibile effetto biologico delle NP diverso da quello studiato per prodotti in dimensioni tradizionali e per tale motivo sono necessari anche studi che simulino le reali condizioni di utilizzo per stabilire con certezza la sicurezza d'uso di questi tipi di NP (Newman et al., 2009).

Oggi si ritiene che tutte le creme con schermi solari contengano anche NP e l'Unione Europea sta predisponendo un'etichettatura specifica per questi prodotti nell'ambito delle nuove direttive sull'uso dei cosmetici, anche se l'orientamento scientifico è quello

di avere maggiori dati a disposizione prima della distribuzione di nuovi prodotti, secondo il concetto "no data, no market" (http://www.framingnano.eu/newsletters/FramingNanoNewsletter5_morenews.htm#nanocosmetics).

La Food and Drug Administration nel 1999 aveva approvato l'immissione in commercio dei cosmetici contenenti NP senza nuova etichettatura ed ora sta rivedendo le sue posizioni e nel 2007 un gruppo di lavoro ha proposto una serie di linee guida per le nuove immissioni in commercio, che prevedano nuovi test per la sicurezza e maggiori informazioni scientifiche da fornire prima di autorizzare la commercializzazione dei nuovi cosmetici contenenti NP.

5.4.4. Quantum dot

Alcuni studi hanno evidenziato risposte citotossiche ed irritative quali rilascio di citochine in colture di cheratinociti esposte a quantum dot (Ryman-Rasmussen et al., 2007; Zhang et al., 2008).

5.4.5. Conclusioni

In conclusione vi sono evidenze in letteratura che le NP possano svolgere un'azione irritativa sui cheratinociti e che possano parzialmente penetrare lo strato corneo della cute e l'epidermide: i dati disponibili sono troppo pochi per poterne trarre conclusioni definitive. Non vi sono dati significativi sull'uomo anche se dal 1997 numerose formulazioni cosmetiche contengono NP, specie quelle con azione di schermo solare. Sono necessarie ulteriori ricerche sistematiche per meglio definire il rischio cutaneo dell'esposizione a NP.

5.5. Effetti sul sistema nervoso centrale

Differenti tipologie di NP ingegnerizzate sono attualmente impiegate per il trasporto selettivo di farmaci o per lo sviluppo di agenti farmacologici, terapeutici e diagnostici correlati a diverse patologie del Sistema Nervoso Centrale (SNC) (Uwatoku et al., 2003; Bianco et al., 2005; Olivier, 2005; Silva, 2006). Tuttavia, in letteratura sono presenti diversi studi, sia *in vitro* sia *in vivo*, che hanno osservato la capacità da parte delle NP (NP) di provocare effetti neurotossici. Di seguito viene riportato lo stato attuale delle conoscenze degli effetti sul SNC correlati all'esposizione ai NM al fine di verificare se l'impiego delle nanotecnologie possa rappresentare un rischio per questo sistema d'organo.

5.5.1. Assorbimento

Le NP, assorbite principalmente attraverso la via inalatoria, hanno la capacità di dislocare dal sito di penetrazione e possono raggiungere il SNC con modalità differenti. L'assorbimento trans-nasale ha una sua peculiare rilevanza, in quanto costituisce l'unica porta di connessione diretta tra l'ambiente esterno ed il sistema nervoso centrale. La possibilità che NP ingegnerizzate possano raggiungere rapidamente il sistema nervoso centrale attraverso questa via di esposizione è suggerita da uno studio *in vivo* eseguito in ratti esposti per via inalatoria a NP carboniose di circa 35 nm di diametro (Oberdörster et al., 2005). Gli autori di questo studio sono stati in grado di reperire il materiale nel sistema nervoso centrale, a livello del bulbo olfattivo, a breve distanza di tempo dall'esposizione. Tale risultato suggerisce indubbiamente l'utilizzazione della via di accesso trans-nasale. In seguito all'esposizione per via inalatoria, le NP viaggiano con un meccanismo di trasporto trans-sinaptico nel SNC, con modalità analoghe a quelle descritte per il polio virus, e possono quindi essere direttamente captate nel SNC attraverso le terminazioni nervose della mucosa nasale (nervo olfattivo e nervo trigemino) e tracheobronchiale (afferenze del nervo vago) (Oberdörster G et al., 2004; Muller et al., 2004, Kreuter et al., 2004)

Le NP inalate inoltre attraversano la barriera respiratoria e tramite il torrente circolatorio possono raggiungere il SNC attraversando la barriera emato-encefalica (BEE) quando questa risulta danneggiata, come nel caso di ipertensione o di encefalomielite.

Di tutte le barriere endoteliali, la BEE è la più serrata al fine di ridurre i trasporti paracellulari. La BEE sana costituisce un meccanismo di difesa che protegge il SNC dall'esposizione a sostanze veicolate dal sangue, ma caratteristiche intrinseche delle NP legate alle cariche di superficie e/o stati morbosi come ipertensione ed encefalomieliti possono alterare l'integrità della BEE e favorirne l'attraversamento da parte delle NP, determinando la loro distribuzione e tossicità nel SNC (Muldoon et al., 1999).

Comunque le NP veicolate dal sangue sembrerebbero avere la capacità intrinseca di alterare le proprietà delle membrane delle cellule endoteliali e/o distruggere le giunzioni occludenti (*tight junctions*) della BEE.

È noto infatti che le NP sono in grado di indurre stress ossidativo e produzione di specie reattive dell'ossigeno (ROS) che, attaccando le membrane cellulari endoteliali, causerebbero danni e disfunzioni della BEE. Oltre alle proprietà fisiche delle membrane plasmatiche endoteliali e alla dimensione delle NP, le cariche elettrostatiche della superficie delle NP giocano un ruolo importante nel trasporto non endocitosico attraverso la BEE (Hagenbuch e Meier, 2003).

Specifici studi (Lockman et al., 2004) hanno dimostrato che le NP con carica neutra

o bassa concentrazione anionica delle cariche di superficie, non alterano l'integrità della BEE, mentre alte concentrazioni anioniche o cationiche delle cariche di superficie delle NP inducono disfunzione della BEE.

5.5.2. Nanomateriali a base di carbonio

Sebbene la quasi totalità degli studi compiuti per valutare la neurotossicità dei NM, sia *in vitro* sia *in vivo*, abbiano utilizzato le NP metalliche, in letteratura sono presenti alcuni lavori che hanno indagato gli effetti sul SNC derivanti dall'esposizione a NM di origine non metallica.

Chen et al. (2008) hanno indagato la risposta delle cellule endoteliali umane della microvascolatura cerebrale conseguente all'esposizione a dosi crescenti di NP di carbonio. Il trattamento con queste NP ha determinato delle modificazioni del potenziale di membrana mitocondriale, ha indotto lo stress ossidativo ed ha diminuito l'espressione delle proteine delle giunzioni occludenti ma l'entità di questi effetti citotossici è stata decisamente inferiore rispetto all'esposizione delle cellule alle NP di alluminio. Inoltre, a differenza delle NP metalliche, la diminuzione della vitalità cellulare è stata osservata esclusivamente alla dose di esposizione maggiore (10 mM).

Recentemente gli effetti neurotossici dei nanotubi di carbonio (CNT) sono stati indagati su colture cellulari derivate dal midollo spinale e dai gangli spinali di embrioni di pollo esposte a nanotubi di carbonio a parete singola (SWCNT) (Belyanskaya et al., 2009). Il principale effetto citotossico osservato, sia nelle colture neurogliali del SNC che del sistema nervoso periferico (SNP), è stato un'importante diminuzione del contenuto di DNA. Questo effetto è risultato maggiore nelle cellule trattate con SWCNT altamente aggregati rispetto a quelle esposte a SWCNT dispersi. Inoltre, la diminuzione dell'espressione della vimentina, una proteina specifica delle cellule gliali, indica che la diminuzione del contenuto di DNA è dovuta soprattutto all'azione delle NP su questo tipo di cellule. Infine, l'analisi della conduttanza ionica e del potenziale di membrana a riposo dimostra che i SWCNT sono capaci di influenzare questi parametri nei neuroni derivati dal SNP, mentre le proprietà elettrofisiologiche dei neuroni derivati dal SNC non vengono modulate dall'esposizione a questo nanomateriale. Quindi, nel complesso i risultati dimostrano che l'esposizione delle colture neurogliali, sia del SNC sia del SNP, ai SWCNT determina degli importanti effetti citotossici nel tessuto nervoso, in particolare a carico delle cellule gliali.

La somministrazione a pesci della specie persico trota (*Micropterus salmoides*) di 0.5 ppm di fullereni (nC₆₀) ha evidenziato la presenza di un meccanismo di trasporto trans-sinaptico che permette al nanomateriale di raggiungere mediante il nervo olfattorio il SNC (Oberdörster E, 2004). L'analisi del tessuto cerebrale degli animali

trattati con i fullereni ha mostrato un aumento importante dei prodotti della perossidazione lipidica che sarebbe conseguente all'induzione dello stress ossidativo da parte delle NP.

Le stesse identiche modalità di penetrazione all'interno del SNC sono state dimostrate nei ratti esposti a NP di nero di carbone il cui diametro era pari a 36 nm (Oberdörster G, 2004). Infatti, i risultati di questo studio hanno mostrato un significativo accumulo del nanomateriale a livello del bulbo olfattorio.

Studi successivi hanno dimostrato che queste NP non sono solo in grado di raggiungere il SNC mediante il suddetto meccanismo di trasporto ma determinano anche importanti alterazioni della normale funzionalità del tessuto cerebrale. L'esposizione di topi maschi BALB/c a NP di nero di carbone di diverse dimensioni (14 nm e 95 nm) ha comportato una profonda modificazione dell'espressione genica delle citochine proinfiammatorie (IL-1 β e TNF- α) e delle chemochine (CCL2 e CCL3) a livello del bulbo olfattorio (Tin-Tin-Win-Shwe et al., 2006). In particolare, il trattamento con le NP di 14 nm ha indotto un'attivazione delle cellule della microglia, le quali conseguentemente hanno aumentato in maniera rilevante la produzione delle suddette citochine proinfiammatorie e delle chemochine. Questo meccanismo sarebbe alla base della risposta infiammatoria osservata nel bulbo olfattorio.

Lo stesso gruppo di ricerca ha indagato nel medesimo modello animale gli effetti provocati dall'esposizione a questo nanomateriale sui livelli extracellulari dei neurotrasmettitori nel bulbo olfattorio (Tin-Tin-Win-Shwe et al., 2008). Analogamente allo studio precedente, l'instillazione intranasale di NP di nero di carbone (14 nm) ha indotto un aumento dei livelli di IL-1 β e TNF- α . Inoltre, nel bulbo olfattorio sono stati riscontrati livelli extracellulari di glutammato e di glicina significativamente maggiori rispetto ai controlli. In base a questi dati gli Autori hanno ipotizzato che le NP, una volta raggiunto il bulbo olfattorio, causerebbero il rilascio dei neurotrasmettitori nel fluido extracellulare, i quali a loro volta attiverebbero le cellule immunitarie della microglia innescando di conseguenza la produzione da parte di quest'ultime delle citochine proinfiammatorie che, in ultima analisi, sarebbero responsabili del danno neurotossico.

5.5.3. Nanoparticelle metalliche

La NP di biossido di titanio (TiO₂) sono state oggetto di alcuni studi in vitro che ne hanno indagato i possibili effetti tossici su diverse cellule del SNC. Recentemente è stato dimostrato che l'esposizione delle cellule microgliali murine N9 a dosi di NP di TiO₂ è in grado di indurre effetti citotossici rilevanti (Li et al., 2009). Infatti, è stata osservata un'importante riduzione della vitalità delle cellule N9 e la presenza di alte-

razioni morfologiche che mostrano apoptosi anche a basse dosi di esposizione (16 µg/mL). Questo tipo di risposta cellulare sarebbe uno dei meccanismi responsabili dei potenziali effetti avversi delle NP sul SNC.

Invece, in un esperimento realizzato da Long et al., (2006), l'esposizione della linea cellulare di microglia murina immortalizzata BV2 a dosi non citotossiche di Degussa P25, una miscela di NP di TiO₂, composta per il 70% da anatasio e per il 30% da rutilio, ha determinato un rapido e prolungato rilascio di radicali liberi dell'ossigeno (ROS). Per valutare le possibili conseguenze di questo risultato sulle cellule del SNC, lo stesso gruppo di ricerca (Long et al., 2007) ha esposto alle medesime concentrazioni di Degussa P25 le cellule BV2, i neuroni mesencefalici di ratto N27 ed una coltura primaria di cellule embrionali del corpo striato di ratto Sprague-Dawley. Le NP di TiO₂ hanno indotto nelle cellule della microglia un aumento significativo della produzione del perossido di idrogeno (H₂O₂) ed hanno influenzato i meccanismi molecolari correlati al controllo del ciclo cellulare, dell'infiammazione e dell'apoptosi. Al contrario, l'esposizione al Degussa P25 non ha determinato alcun effetto citotossico nei neuroni dopaminergici isolati di ratto N27, neanche dopo 72 ore di esposizione. Tuttavia, l'analisi della neurotossicità di questo nanomateriale nelle colture cellulari embrionali del corpo striato, che contenevano cellule microgliali, ha evidenziato una significativa diminuzione della vitalità cellulare anche a basse dosi di esposizione (5 ppm). Sulla base di questi risultati gli Autori hanno concluso che i potenti effetti neurotossici delle NP di TiO₂, osservati nelle colture cellulari complesse di tessuto nervoso, sono mediati dalla produzione dei ROS da parte della microglia.

In aggiunta alla citotossicità mediata dai ROS di origine microgliale è stata avanzata l'ipotesi che le NP siano in grado di indurre la morte delle cellule nervose utilizzando un processo di "eccito-tossicità". A questo proposito, in uno studio condotto da Alekseenko et al. (2008), sono stati indagati i meccanismi di captazione e rilascio del glutammato, uno dei principali neurotrasmettitori eccitatori, e la formazione dei ROS all'interno dei sinaptosomi isolati dal cervello di ratti Wistar. L'esposizione dei sinaptosomi a ferritina, che contiene una particella di 7 nm di diametro di fosfato di ossido ferrico, ha indotto un blocco della captazione del glutammato. Inoltre, i risultati di questo lavoro hanno mostrato un incremento dei livelli di ROS nelle colture cellulari. Gli Autori hanno suggerito che l'incremento dello stress ossidativo provocato dall'esposizione alle NP possa inibire la captazione del glutammato da parte dei sinaptosomi. Conseguentemente, l'eccessiva concentrazione extracellulare del glutammato comporta un'esposizione prolungata dei neuroni a questo neurotrasmettitore eccitatorio, che sarebbe alla base del danno cellulare e della morte dei neuroni per "eccito-tossicità".

Un ulteriore meccanismo molecolare in grado di danneggiare la normale funzionalità

del SNC sarebbe rappresentato dalla capacità delle NP di interferire con le correnti neuronali voltaggio-dipendenti del potassio. Infatti, l'esposizione di neuroni ippocampali della regione CA1, isolati da ratti Wistar, a NP di rame ha permesso di osservare nelle cellule trattate un'efficace inibizione della corrente rettificatrice ritardata del potassio (I_K) (Xu et al., 2009).

Un altro aspetto interessante degli effetti citotossici dei nanomateriali sul SNC riguarda il rapporto tra le NP e la barriera emato-encefalica (BEE). Chen et al., (2008) hanno esposto cellule endoteliali umane della microvascolatura cerebrale (HBMEC) a dosi crescenti di NP di ossido di alluminio. I risultati hanno mostrato come il trattamento con le NP determini una significativa riduzione della vitalità cellulare, l'alterazione del potenziale di membrana mitocondriale, l'aumento dello stress ossidativo e la diminuzione dell'espressione delle proteine delle giunzioni occludenti (*tight junctions*). Quindi, secondo gli Autori l'integrità della BEE rappresenta uno dei principali obiettivi delle NP di alluminio che esplicherebbero la loro azione tossica alterando le funzioni mitocondriali.

Gli astrociti sono degli importanti mediatori degli effetti neurotossici e contribuiscono in maniera fondamentale alla modulazione della permeabilità della BEE. Per questo motivo, l'influenza dei NM sulla BEE può essere indagata anche esponendo queste cellule gliali alle NP al fine di verificare se tale trattamento ne modifichi la normale morfologia e funzionalità o le capacità di adesione e crescita cellulare. In un esperimento, condotto su astrociti isolati dalla corteccia cerebrale di ratti Sprague-Dawley, l'esposizione a NP di ossido di ferro (Fe_3O_4 o $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$) ha dimostrato che negli astrociti immaturi la somministrazione delle NP inibisce le capacità di adesione e la conseguente crescita cellulare. Al contrario, negli astrociti maturi questo nanomateriale non altera la morfologia o la crescita cellulare, mentre determina un importante aumento dell'attività mitocondriale (Au et al., 2007).

Effetti citotossici ancora più rilevanti sono stati dimostrati nelle cellule di astrocitoma umano U87 esposte a concentrazioni crescenti di NP di TiO_2 (< 25 nm), di ossido di manganese (< 50 nm) e di ossido di zinco (< 100 nm) (Lai et al., 2008). I risultati di questo lavoro hanno evidenziato che NP di TiO_2 sono in grado di indurre una significativa riduzione della sopravvivenza cellulare, che l'incremento della morte cellulare è dose-dipendente e che i maggiori effetti citotossici sono causati dalle NP di ossido di zinco, mentre quelle di ossido di manganese sono risultate le meno tossiche. Per quanto riguarda la risposta cellulare, i dati dello studio mostrano che, in seguito al trattamento con le NP di TiO_2 , le cellule U87 esibiscono tre diverse modalità di morte cellulare: apoptosi, necrosi e apoptosi-necrosi.

Gli effetti delle NP di TiO_2 sul SNC sono stati valutati anche mediante diversi studi *in vivo*. Nei topi BALB/c esposti per 60 giorni, mediante trattamento topico, a NP di

TiO₂ di diverse dimensioni (10 nm, 25 nm, Degussa P25 (21 nm) e 60 nm), l'analisi della tossicità e della distribuzione tissutale ha mostrato che, tra i differenti NM impiegati, il solo Degussa P25 era in grado di raggiungere il tessuto cerebrale (Wu et al., 2009).

Lo studio istopatologico del SNC non ha rivelato la presenza di alterazioni patologiche. Questo risultato conferma in parte i dati presenti in letteratura secondo i quali le NP sarebbero in grado di attraversare la BEE e raggiungere, seppure in quantità modeste, il SNC (Kreyling et al., 2002; Lockman et al., 2004; Oberdörster et al., 2004).

Risultati simili ai precedenti sono stati ottenuti in topi CD 1 (ICR) ai quali è stata somministrata per via orale, in un'unica soluzione, una dose di 5 g/kg di particelle di TiO₂ di diverse dimensioni (25 nm, 80 nm e 155 nm). Nei gruppi esposti alle NP è stato osservato un accumulo delle stesse nel SNC e la presenza, nella regione ippocampale, di deboli lesioni cerebrali consistenti in vacuoli e degenerazione grassa del tessuto nervoso (Wang et al., 2007).

Negli stessi animali di laboratorio sono stati invece rilevati importanti effetti neurotossici in seguito alla somministrazione, mediante iniezione intraperitoneale, di NP di TiO₂ in forma di anatasio (Ma et al., 2010). In particolare, nei gruppi di animali esposti alle dosi maggiori di nanomateriale la produzione degli anioni superossido e del perossido di idrogeno risultava significativamente maggiore. Il conseguente stress ossidativo ha comportato un aumento della perossidazione lipidica, un rilascio di ossido nitrico, una riduzione dell'acido glutammico e dei livelli di attività dell'acetilcolinesterasi e degli enzimi antiossidanti. Inoltre, gli Autori hanno osservato anche delle importanti modificazioni morfologiche delle cellule nervose, che assumevano forme filamentose o si trasformavano in cellule infiammatorie.

In uno studio condotto da Shimizu et al., (2009) è stato dimostrato che l'esposizione materna di topi ICR femmine gravide a NP di TiO₂ provoca nella progenie un'importante modificazione dell'espressione dei geni associati all'apoptosi, allo stress ossidativo ed allo sviluppo del SNC.

Infine, anche il trattamento di topi CD 1 (ICR) con NP di TiO₂ di 80 nm (come rutilio) e di 155 nm (come anatasio), somministrate mediante instillazione intranasale, ha provocato dei significativi effetti avversi sul SNC (Wang JX et al., 2008). Le NP possono raggiungere il SNC mediante un meccanismo di trasporto trans-sinaptico dopo essere state assorbite dalle terminazioni nervose della mucosa nasale e si accumulano particolarmente nel bulbo olfattorio e nell'ippocampo (Bodian e Howe, 1941a; Bodian e Howe, 1941b; Tjälve et al., 1995; Oberdörster et al., 2004). I risultati di questo studio hanno evidenziato che l'esposizione alle NP di TiO₂ determina un aumento dello stress ossidativo, della risposta infiammatoria ed un significativo incremento dei livelli cerebrali del Tumor Necrosis Factor alfa (TNF- α) e dell'interleuchina 1-beta. I

suddetti effetti tossici sono risultati lievemente maggiori nel gruppo di animali esposto all'anatasio suggerendo quindi l'ipotesi che la struttura cristallina del nanomateriale svolga un ruolo di primaria importanza nell'induzione della risposta.

Analogamente allo studio precedente, l'instillazione intranasale in topi CD 1 (ICR) di NP di Fe_2O_3 (21 nm) ha indotto degli effetti neurotossici rilevanti quali l'aumento dello stress ossidativo e la presenza di segni morfologici di danno cellulare in alcune regioni del SNC degli animali trattati (Wang et al., 2009). Infatti, gli Autori hanno osservato degenerazione neurodendritica, alterazioni della membrana cellulare ed incremento dei lisosomi nel bulbo olfattorio e dilatazione del reticolo endoplasmatico rugoso ed incremento dei lisosomi nell'ippocampo.

Il raggiungimento del SNC, attraverso il meccanismo di trasporto trans-sinaptico è stato dimostrato anche per le NP di ossido di manganese (30 nm) somministrate per via inalatoria a ratti Fischer 344 (Elder et al., 2006). Gli Autori hanno rilevato la presenza del nanomateriale in diverse regioni cerebrali ma, analogamente agli studi precedenti, è stato osservato un accumulo preferenziale delle NP nel bulbo olfattorio. Inoltre, nelle regioni in cui si verifica il deposito del nanomateriale, si riscontra un incremento dei livelli di $\text{TNF-}\alpha$ e della proteina acida gliofibrillare, la quale è un indicatore specifico di reattività o di danno degli astrociti. L'aumentata espressione genica di queste proteine indicherebbe la presenza di una risposta infiammatoria nei tessuti interessati.

La produzione di ROS sarebbe alla base anche della neurotossicità osservata nei topi maschi C57BL/6N esposti a NP di argento, il cui diametro era di 25 nm (Rahman et al., 2009). Infatti, nelle diverse regioni cerebrali (nucleo caudato, corteccia frontale ed ippocampo) degli animali trattati è stato possibile osservare un'importante induzione dello stress ossidativo e la presenza di un danno ossidativo del DNA. Inoltre, i risultati hanno mostrato che le NP di argento sono capaci di modulare l'espressione di molteplici geni coinvolti sia nello stress ossidativo sia nella produzione di agenti antiossidanti. La produzione dei ROS, associata alla modulazione genica, influenzerebbe in maniera negativa il sistema immunitario causando di conseguenza l'apoptosi cellulare e gli importanti effetti neurotossici rilevati.

In uno studio realizzato su ratti Fischer 344 sono stati indagati gli effetti, sulla BEE e sul sistema vascolare del cervello, conseguenti ad un'esposizione a NP di alluminio (Chen et al., 2008). La somministrazione intravenosa di NP di alluminio, il cui diametro era compreso tra gli 8 e i 12 nm, ha indotto una diminuzione dell'espressione delle proteine di giunzione occludente ed ha causato una marcata frammentazione dell'occludina e della claudina-5 che sono gli elementi fondamentali che regolano la normale integrità della BEE.

Risultati simili sono stati ottenuti in ratti maschi Sprague-Dawley in cui lo stesso tipo

di nanomateriale è stato somministrato attraverso iniezione intraperitoneale (Song et al., 2008). L'analisi ultrastrutturale della BEE ha dimostrato che le NP di alluminio provocano un danneggiamento della membrana cellulare, degli organelli citoplasmatici e delle giunzioni occludenti dell'endotelio capillare cerebrale. Inoltre, analogamente allo studio precedente, è stata osservata un'importante riduzione dell'espressione dell'occludina e della F-actina. Gli Autori hanno suggerito che la neurotossicità delle NP di alluminio è correlata alla capacità di questo nanomateriale di influenzare la permeabilità e di alterare l'integrità della BEE.

È probabile che l'inclusione di NP nei fluidi dei compartimenti corporei alteri le funzioni del SNC in condizioni normali e/o le sue risposte a stress addizionali come ad esempio l'ipertermia. NP contenenti metalli (Cu, Ag, Al con diametro di 50-60 nm) sembrerebbero infatti determinare disfunzioni del SNC in animali normali e aggravare patologie causate dall'ipertermia (Sharma HS e Sharma A, 2007). L'esposizione a NP ha mostrato di produrre anche significative modificazioni delle funzioni motorie, maggiormente evidente nei ratti esposti a NP di Ag rispetto a Cu e Al (Sharma HS e Sharma A, 2007). L'influenza delle NP metalliche sulla BEE è stata investigata anche in ratti Sprague-Dawley esposti a NP di rame, alluminio e argento con diametro compreso tra 50 e 60 nm (Sharma et al., 2010). In questo studio le NP sono state somministrate attraverso iniezione intravenosa, iniezione intraperitoneale e perfusione corticale. I risultati hanno mostrato che l'integrità della BEE è profondamente alterata dall'esposizione ai NM, che gli effetti avversi più rilevanti sono stati ottenuti con il trattamento intravenoso e con la perfusione corticale e che le NP maggiormente tossiche sono state quelle di rame e di argento. Il meccanismo mediante il quale le NP causano una modificazione della permeabilità della BEE consisterebbe nell'induzione dello stress ossidativo che, a sua volta, provocherebbe il rilascio di sostanze neurochimiche, citochine e ROS in grado di danneggiare le cellule endoteliali (Sharma HS e Sharma A, 2007; Sharma et al., 2009). Conseguenza della rottura della BEE ad opera delle NP è il passaggio di macromolecole nel SNC, che spesso si associa con la formazione di edema angiogenico (Sharma 2006a, b; Sharma et al. 2006c). La cronica somministrazione di NP metalliche induce la formazione di edema in misura maggiore a livello cerebrale piuttosto che nel midollo spinale, e l'azione edemigena sembra essere più spiccata da parte di NP di Ag rispetto a Cu o Al.

È probabile che l'edema negli animali trattati con NP determini conseguenze neuropatologiche e modificazioni in senso neurodegenerativo.

Infine il danno alla BEE conseguente all'azione delle NP consente l'ingresso di numerose sostanze tossiche che normalmente non verrebbero in contatto con il microambiente del SNC e che sono in grado di produrre alterazioni cellulari morfologiche e funzionali (Sharma 2004, Sharma 2006a-b).

Nei neuroni di animali esposti alle NP si osservano alterazioni intracellulari come condensazione citoplasmatica e cromatolisi, danno alle membrane nucleari e addensamento del carioplasma con nucleoli eccentrici.

5.5.4. Conclusioni

Nel complesso le NP possono raggiungere il SNC mediante due diversi meccanismi che sono rispettivamente il trasporto trans-sinaptico lungo il nervo olfattorio, conseguente all'esposizione per via inalatoria o per instillazione intranasale, e la captazione attraverso la BEE, che avviene in seguito alla somministrazione dei NM per via intravenosa, intraperitoneale, orale o percutanea (Lai et al., 2000; Borm et al., 2006). La facilità con la quale le NP attraversano la BEE rappresenta il motivo principale per cui, negli ultimi anni, esse sono state impiegate in maniera intensiva nel settore biomedico al fine di realizzare il trasporto selettivo dei farmaci all'interno del SNC o per sviluppare agenti terapeutici e diagnostici nei confronti di alcune patologie neurodegenerative (Uwatoku et al., 2003; Bianco et al., 2005; Olivier, 2005; Silva, 2006). Tuttavia, le attuali conoscenze relative ai possibili effetti tossici dei NM ingegnerizzati sul tessuto nervoso sono ancora estremamente limitate e frammentarie. Ciononostante, in letteratura sono presenti alcuni studi *in vitro* ed *in vivo* che hanno evidenziato la capacità delle NP di provocare, in cellule neuronali e gliali di derivazione animale ed umana ed in diversi modelli animali, dei significativi effetti neurotossici. Il principale meccanismo mediante il quale i NM esibiscono la loro tossicità, anche a livello del SNC, è rappresentato dall'induzione di un importante stress ossidativo. Inoltre, le NP sarebbero in grado di alterare la normale integrità della BEE e modularebbero l'espressione di molteplici geni coinvolti nella risposta infiammatoria e nell'apoptosi.

Pertanto, appare evidente che un utilizzo sicuro delle nanotecnologie richieda una migliore e più approfondita conoscenza dei meccanismi molecolari che sottendono agli effetti neurotossici finora evidenziati.

Infine, sono auspicabili ulteriori studi che verifichino gli eventuali effetti neurotossici provocati dagli altri NM ingegnerizzati, oltre a quelli metallici finora principalmente indagati, quali NP di carbonio e quantum dot.

5.6. Effetti cardiovascolari

L'interesse scientifico rivolto alla valutazione dei possibili effetti cardiovascolari delle NP ingegnerizzate deriva dalla conoscenza della stretta associazione tra elevati livelli del particolato atmosferico di dimensioni nanometriche (particelle ultrafini) ed eventi

cardiovascolari quali l'ictus, l'infarto del miocardio, l'aritmia e la morte improvvisa (Mossman et al., 2007). Al di là del fatto che alcune componenti chimiche delle particelle ultrafini sono analoghe a quelle delle NP ingegnerizzate, la dimensione nanometrica di per sé costituisce un elemento aggiuntivo in termini di tossicità potenziale: è infatti ormai documentato che l'effetto citotossico del medesimo materiale chimico è molto più spiccato se la stessa massa di materiale viene somministrata in forma nanometrica o in particelle di dimensioni maggiori (Donaldson et al., 2001). Molto probabilmente questa peculiare proprietà tossica delle NP deriva dall'elevato rapporto tra la loro superficie totale e la loro massa, che si traduce in una superficie di contatto molto più elevata con il materiale biologico.

I meccanismi potenziali attraverso cui le NP ingegnerizzate potrebbero determinare effetti sfavorevoli sull'apparato cardiovascolare sono essenzialmente due:

- A. Un effetto indiretto secondario alla biopersistenza in ambito polmonare: questo fatto potrebbe determinare l'instaurarsi di un persistente processo infiammatorio cronico locale, con rilascio nella circolazione generale di mediatori quali le citochine, in grado a loro volta di causare una persistente infiammazione sistemica di lieve entità. Numerosi studi hanno consentito di stabilire al di là di ogni dubbio che la presenza di infiammazione cronica è un forte fattore di predisposizione all'aterosclerosi e ai conseguenti eventi acuti (infarto del miocardio ed ictus) correlabili con questo processo degenerativo (Ross, 1999).
- B. Un effetto diretto conseguente alla loro capacità di oltrepassare il parenchima polmonare, giungendo a contatto con cellule (es. cellule endoteliali e piastrine) e prodotti solubili (es. proteine della coagulazione) rilevanti ai fini del possibile instaurarsi del danno cardiovascolare

5.6.1. Nanotubi di carbonio

Le NP ingegnerizzate più studiate ai fini della valutazione del possibile effetto cardiovascolare sono i nanotubi di carbonio. In particolare, sono stati investigati i possibili effetti di questi NM su alcune vie fisiopatologiche di induzione del danno cardiovascolare quali l'ipercoagulabilità, la formazione di ateromi, l'induzione di uno stato infiammatorio sistemico, la disfunzione/danno endoteliale (incluso il danno ossidativo) e le alterazioni dell'attività cardiovascolare regolata dal sistema nervoso autonomo. In questa revisione saranno analizzati separatamente gli effetti sui singoli meccanismi d'azione; alcuni studi che hanno preso in considerazione più di un possibile meccanismo saranno pertanto citati più volte.

Per quel che riguarda le alterazioni della coagulazione, è stato rilevato, in uno studio *in vitro* condotto da Radomski et al. (2005), che sia i nanotubi di carbonio a parete

singola (SWCNT) sia quelli a parete multipla (MWCNT) possono determinare un incremento dell'aggregazione piastrinica: tale situazione costituisce un rischio per l'instaurarsi di un danno di tipo ischemico nell'uomo, come è dimostrato dall'efficacia anti-aterosclerotica di terapie volte ad inibire l'attivazione piastrinica (Ben-Dor et al., 2009). Un dato rilevante è che questo lavoro è stato eseguito su piastrine umane, e pertanto la sua trasferibilità in ambito clinico è maggiore rispetto a quella di altri studi *in vitro* eseguiti su cellule animali. Un punto di debolezza (peraltro comune alla quasi totalità delle sperimentazioni tossicologiche attualmente disponibili sul nanomateriale ingegnerizzato) è costituita dalle alte dosi utilizzate, che sono di vari ordini di grandezza maggiori rispetto a quelle di esposizione umana ipotizzabile in ambito occupazionale o nell'ambiente. Il dato di Radomski è stato solo in parte confermato da un successivo studio in vivo eseguito mediante un'unica esposizione polmonare (somministrazione intratracheale) di MWCNT in topi Swiss (Nemmar et al., 2007): le alterazioni piastriniche, controllate più volte in questi animali nell'arco di 24 ore, sono risultate di lieve entità e tendevano a scomparire nei controlli eseguiti a più di 6 ore dall'esposizione. Va notato, peraltro, che in quest'ultimo studio sono stati indagati solo i MWCNT (che nello studio di Radomski avevano un effetto inferiore a quello dei SWCNT), e che non sono stati valutati i possibili effetti a lungo termine da esposizione cronica. Pertanto, si può concludere che sulla base dei dati disponibili, gli effetti sull'aggregazione piastrinica non sono particolarmente marcati, ma che ulteriori studi sono auspicabili per precisare la presenza e l'entità di questa potenziale via di danno cardiovascolare. È interessante notare come entrambi gli autori degli studi su citati (Ben-Dor et al., 2009; Nemmar et al., 2007) abbiano eseguito, nell'ambito dello stesso lavoro, uno studio parallelo *in vivo* per valutare la trasferibilità del dato ottenuto *in vitro* o *ex vivo* sulla formazione di un trombo arterioso *in vivo*. In particolare, hanno valutato se la somministrazione di nanotubi di carbonio fosse in grado di accelerare ed amplificare la formazione di trombi nell'arteria carotidea di ratto preventivamente sottoposta a danno fisico o chimico: a fronte degli effetti relativamente modesti sull'aggregazione piastrinica, in entrambi i modelli sperimentali è stato riscontrato un indiscutibile effetto dei nanotubi di carbonio sulla formazione acuta di trombi carotidei. Questo dato sembra indicare che altre componenti del complesso processo della coagulazione oltre alle piastrine possano essere coinvolti dopo esposizione a nanotubi di carbonio.

In effetti, questa ipotesi sembra trovare riscontro nei recenti dati di Erdely et al. (2009), che hanno rilevato un marcato aumento del PAI-1 totale e attivo (una proteina che svolge un ruolo chiave nell'inibizione della cascata fibrinolitica) in topi esposti per via polmonare a nanotubi di carbonio. Anche in questo caso, però, gli effetti sono stati valutati in un modello sperimentale acuto (a 4 ore dall'esposizione) e sono

pertanto necessarie conferme su un modello cronico, che è quello più plausibile per quel che riguarda l'esposizione nell'uomo. La formazione di placche aterosclerotiche, indotte da esposizioni polmonari ripetute a SWCNT in topi geneticamente predisposti a danno aterosclerotico, è stata rilevata da Li et al. (2007). Lo studio è importante perché dimostra la possibile instaurazione del danno dopo esposizioni ripetute, che è la condizione più verosimilmente trasferibile all'uomo, e poiché le dosi utilizzate sono relativamente di bassa entità. Va comunque rilevato che i topi oggetto dell'esperimento, oltre ad essere di un ceppo geneticamente predisposto all'aterosclerosi, dovevano essere nutriti con una dieta iperlipidica per potere andare incontro all'aterosclerosi: infatti, nel corso di una dieta standard, l'entità dell'aterosclerosi non differiva tra i topi cimentati con i SWCNT e quelli cimentati con soluzione salina. Appaiono pertanto opportuni ulteriori studi, anche se già sulla base di tali dati potrebbe ipotizzarsi un analogo rischio in lavoratori che abbiano di base un elevato rischio cardiovascolare e che siano cronicamente esposti a SWCNT. Per esempio, lavoratori obesi con forte familiarità per malattia cardiovascolare potrebbero essere riconducibili al modello di predisposizione genetica (forte familiarità) e cofattore ambientale (dieta iperlipidica nel caso del modello sperimentale di ratto e obesità nel modello umano). Per quel che riguarda la possibilità di un'attivazione di uno stato infiammatorio sistemico, Salvador-Morales et al. (2006) hanno riscontrato in uno studio *in vitro* che i nanotubi di carbonio, in particolare i SWCNT, sono in grado di attivare la via classica del complemento (che è coinvolta nella maggior parte dei processi infiammatori nell'uomo), mentre dati parzialmente contraddittori sono stati riportati in due studi *in vivo* già citati (Erdely et al., 2009; Li et al., 2007). Infatti, Erdely et al. (2009) hanno notato un incremento di parametri quali la conta dei neutrofili e varie mediatori solubili di infiammazione (IL-6, CXCL1, IL-5, CCL11, CCL22, CXCL2, S110a8, IL8r β e Mac-1), oltre che l'espressione di geni pro-infiammatori in aorta. Per contro, Li et al. (2007) non hanno notato differenze tra casi e controlli nei livelli ematici di MCP1, IL-12, IL-6, TNF- α e IFN- γ . Va notato comunque, che i due studi avevano un disegno differente: valutazione in un modello acuto nello studio Erdely e in un modello cronico in quello di Li. Sembra pertanto ipotizzabile che l'esposizione a nanotubi di carbonio determini uno stato infiammatorio acuto, che però non viene probabilmente mantenuto nel tempo.

L'assenza di citotossicità su colture di cellule endoteliali è stata riportata da Flahaut et al. (2006), che con l'utilizzo di metodiche standard quali il *red neutral assay* e l'MTT test non hanno evidenziato alcun danno dopo 24 ore di esposizione a varie misture di nanotubi di carbonio. Per contro, nel citato modello *in vivo* di Erdely et al. (2009), è stata rilevata un'attivazione delle cellule endoteliali dell'aorta, documentata da un'aumentata espressione della selectina E, che è una molecola di adesione, espressa

solo sulle cellule endoteliali attivate, e che gioca un ruolo chiave nei processi iniziali dell'instaurarsi del danno aterosclerotico. L'interpretazione dei dati di questi due studi potrebbe essere che, sebbene i nanotubi di carbonio non inducano un danno cellulare evidente sull'endotelio, possano nondimeno causare una disfunzione endoteliale, che è altrettanto importante ai fini della genesi della malattia aterosclerotica. Va considerato, a margine dello studio di Flahaut, che l'MTT test utilizzato nello studio può rivelarsi tecnicamente inadeguato per la valutazione della citotossicità dei nanotubi di carbonio (Wörle-Knirsch et al., 2006).

La possibilità di un danno ossidativo sulle cellule dell'apparato cardiovascolare è suggerita dai dati di uno studio di Simeonova et al. (2007), che ha riscontrato *in vitro* che i SWCNT determinano ossidazione delle LDL nelle cellule endoteliali aortiche. Poiché la fagocitosi da parte dei macrofagi delle particelle ossidate induce la formazione delle cosiddette *foam cells*, rilevabili nelle fasi iniziali della malattia aterosclerotica, questo dato è di enorme interesse ai fini del rapporto esposizione a nanotubi/aterosclerosi. Ulteriore supporto a questo meccanismo fisiopatologico è fornito dai dati dello studio di Li et al. (2007) che ha riscontrato un danno ossidativo al DNA mitocondriale dell'aorta, oltre che una deplezione di sostanze naturali antiossidanti quali il glutathione ridotto dopo esposizione cronica a SWCNT.

Infine, uno studio *in vivo* molto recente di Legramante et al. (2009) ha dimostrato che la somministrazione ripetuta di SWCNT per via intratracheale può determinare alterazioni della regolazione da parte del sistema nervoso autonomo dell'attività cardiaca. In particolare, nello studio sono state riscontrate alterazioni del controllo del sistema baro-riflesso. Questo sistema fisiologico consente un continuo adattamento della frequenza cardiaca a variazioni della pressione arteriosa, in modo da mantenere costante la perfusione degli organi: nell'individuo sano quando, per varie circostanze, la pressione cardiaca tende a scendere si verifica un incremento della frequenza e l'opposto accade in caso di rialzo della pressione. Quando si verifica un'alterazione di questo meccanismo omeostatico ci si trova in una condizione di aumentato rischio cardiovascolare; infatti vari studi hanno dimostrato che soggetti con malfunzionamento del controllo baro-riflesso hanno un aumentato rischio di morte improvvisa da cause cardiache, nonché di recidiva infartuale e di aritmie (La Rovere et al., 1998). I risultati di Legramante et al. sono rilevanti in quanto ottenuti in un modello di somministrazione sub-cronico (il dato è stato valutato a distanza di 2 settimane dalla prima somministrazione di SWCNT) e suggeriscono che la valutazione dell'attività baro-riflessa potrebbe essere inclusa tra i parametri da controllare in soggetti sottoposti ad esposizione cronica di SWCNT.

In conclusione l'insieme delle evidenze sperimentali attualmente disponibili suggerisce che l'esposizione a nanotubi di carbonio può attivare molte delle vie fisiopatologiche

note di danno cardiovascolare. Peraltro i dati vanno interpretati con estrema cautela, sia perché ottenuti in condizioni acute (mentre l'esposizione attesa per l'uomo è generalmente cronica), sia perché sono state utilizzate quantità elevate di materiale (mentre l'esposizione attesa per l'uomo è di quantità molto più modeste). Di particolare rilevanza appare comunque la possibilità che la somministrazione di tali materiali determini, in soggetti predisposti, non solo la formazione di placche aterosclerotiche dopo somministrazione cronica, ma anche la formazione acuta di trombi. È noto infatti che nell'uomo eventi ischemici drammatici quali infarto del miocardio ed ictus si determinano nel contesto di una condizione cronica come la malattia aterosclerotica, sulla quale, in opportune circostanze (ad esempio la presenza di placche aterosclerotiche instabili), si può innescare la formazione acuta di trombi, che causano la completa occlusione del vaso arterioso interessato. Pertanto, la possibilità che l'esposizione a nanotubi di carbonio possa avere un ruolo in entrambi tali processi costituisce un elemento degno di particolare approfondimento. Allo stato attuale delle conoscenze, sembra possibile ipotizzare che le vie fisiopatologiche attraverso cui i nanotubi di carbonio possono indurre la malattia aterosclerotica possano essere ricercate nella disfunzione endoteliale e nel danno ossidativo di elementi chiave delle cellule dei vasi arteriosi quali il DNA mitocondriale, mentre per la formazione della trombosi acuta potrebbe avere maggiore rilevanza l'attivazione di proteine della cascata coagulativa piuttosto che l'effetto diretto sulle piastrine. Più improbabili appaiono altri meccanismi, quali l'induzione di un persistente stato infiammatorio cronico sistemico, dato che gli studi fin qui condotti sembrano indicare un effetto transitorio e di entità relativamente modesta. Non va infine trascurato il possibile coinvolgimento di fini processi di regolazione nervosa, che possono determinare alterazioni irreversibili di importanti meccanismi di controllo neurogeno dell'attività cardiovascolare.

5.6.2. Conclusioni

Appare mandatorio, prima di giungere ad una qualsiasi conclusione sui possibili effetti cardiovascolari delle NP ingegnerizzate, che vengano condotti ulteriori studi in grado di rispecchiare nel modo più fedele le condizioni espositive attese nell'attività lavorativa e nell'ambiente in genere.

5.7. Effetti immunologici

Pochi dati, prevalentemente derivati da studi in vitro, sono attualmente disponibili in letteratura, relativi ad effetti sul sistema immunitario. Tali dati suggeriscono la possi-

bilità che le NP, una volta raggiunta la circolazione sistemica, interagiscono con le proteine circolanti o presenti sulla superficie delle cellule determinando l'esposizione di residui amminoacidici normalmente non esposti (epitopi criptici) con la possibilità di una risposta autoimmunitaria (Labarre et al., 2005). Altro possibile meccanismo di danno è costituito dall'interferenza con i processi di opsonizzazione e quindi con la clearance di materiale estraneo (es. microorganismi) normalmente eliminato in virtù di tale processo (Moghim e Patel 1998).

5.7.1. Nanotubi di carbonio

Studi in vivo hanno mostrato una serie potenziale di effetti sul sistema immunitario dei nanotubi di carbonio. Koyama et al. (2006) hanno valutato la risposta immunitaria in topi nei quali era stato eseguito un impianto sottocutaneo di nanotubi di carbonio a parete singola (SWCNT) o multipla (MWCNT) per un periodo massimo di 3 mesi. Gli autori hanno rilevato che questi materiali sono in grado di attivare il complesso di istocompatibilità maggiore sia di classe 1 sia di classe 2 entro due settimane dall'impianto. Questo tipo di risposta potrebbe essere alla base del peculiare quadro istopatologico (formazione di granulomi), rilevato dopo esposizione polmonare. Mitchell et al. (2007) in uno studio inalatorio condotto su topi hanno riscontrato una soppressione della risposta antigenica dipendente dai linfociti T, associata ad un incremento della proteina interleuchina-10 (IL-10), che è un indicatore di alterata funzione immunitaria. Il significato funzionale di queste alterazioni rimane di incerta interpretazione, stante le complesse inter-relazioni tra le varie componenti del sistema immunitario. Appare tuttavia verosimile la compatibilità di tale reperto con una ridotta abilità a combattere le infezioni, come del resto rilevato in precedenti studi ambientali ed epidemiologici, che hanno mostrato una ridotta capacità di eradicazione spontanea delle infezioni dopo esposizione a particolato ambientale ultrafine.

Un effetto sull'immunità innata, in particolare sulla capacità dei macrofagi polmonari di fagocitare il germe *Lysteria monocytogenes*, è stata riscontrata da Shvedova et al. (2008a) dopo esposizione polmonare a SWCNT in topi successivamente infettati con il suddetto germe. Anche se l'esatto meccanismo attraverso cui i SWCNT possono esercitare questo effetto rimane da chiarire, i risultati di questo studio sono tuttavia di rilievo in termini di possibile aumentata recettività alle infezioni nei lavoratori esposti cronicamente a questo materiale. In contrasto con i dati degli studi precedenti, Dumortier et al. (2006), in uno studio in vitro non hanno riscontrato alcun effetto da parte dei nanotubi di carbonio sui linfociti di classe B e T e sui macrofagi. Va comunque considerato che i nanotubi di carbonio utilizzati in questo studio erano funzionalizzati mediante l'aggiunta di gruppi idrosolubili; tale processo modifica

profondamente le caratteristiche chimico-fisiche di questi NM ed ha in genere un effetto di attenuazione sulle loro caratteristiche di citotossicità.

Una via indiretta per mezzo della quale le NP ingegnerizzate possono interagire con il sistema immunitario è attraverso una loro interazione con la storia naturale di malattie a componente immunitaria quali l'amiloidosi. La forma primaria di questa malattia è determinata da un'alterazione monoclonale delle plasmacellule (cellule coinvolte normalmente nell'immunità di tipo umorale) che producono il deposito fibrillare extracellulare caratteristico della malattia. In un recente esperimento, Linse et al. (2007) hanno rilevato che una tappa cruciale nella formazione delle fibrille, la formazione del nucleo critico, è fortemente incrementata, con modalità dose-dipendente, dalla presenza di MWCNT. Esiste quindi la possibilità che il decorso di alcune patologie autoimmunitarie possa essere slatentizzato o accelerato dall'interazione con NP ingegnerizzate.

5.7.2. Conclusioni

I dati disponibili sono da considerarsi del tutto insufficienti per esprimere un giudizio di tossicità delle NP ingegnerizzate sul sistema immunitario, anche alla luce delle dosi elevate utilizzate. Essi costituiscono però uno stimolo per ulteriori approfondimenti della tematica.

Bibliografia

- Alekseenko AV, Waseem TV, Fedorovich SV. Ferritin, a protein containing iron nanoparticles, induces reactive oxygen species formation and inhibits glutamate uptake in rat brain synaptosomes. *Brain Res.* 2008;1241:193-200.
- Argyle V, Robinson B. Are nanoparticles safe? *Chemistry in New Zealand.* 2006;12-5. Available from url: http://www.nzic.org.nz/CiNZ/articles/Argyle_70_1.pdf
- Asharani PV, Low Kah Mun G, Hande MP, Valiyaveetil S. Cytotoxicity and genotoxicity of silver nanoparticles in human cells. *ACS Nano.* 2009;3(2):279-90.
- Au C, Mutkus L, Dobson A, Riffle J, Lalli J, Aschner M. Effects of nanoparticles on the adhesion and cell viability on astrocytes. *Biol Trace Elem Res.* 2007;120:248-56.
- Baan R, Straif K, Grosse Y, Secretan B, El Ghissassi F, Coglianò V. Carcinogenicity of carbon black, titanium dioxide, and talc. *Lancet Oncol.* 2006;7(4):295-329.
- Baker GL, Gupta A, Clark ML, Valenzuela BR, Staska LM, Harbo SJ, et al. Inhalation toxicity and lung toxicokinetics of C60 fullerene nanoparticles and microparticles. *Toxicol Sci* 2008;101(1):122-31.
- Baroli B, Ennas MG, Loffredo F, Isola M, Pinna R and Lopez-Quintela MA. Penetration of Metallic Nanoparticles in Human Full-Thickness Skin. *J Invest Dermatol.* 2007;127(7):1701-12.
- Bellucci S, M Chiaretti, A Cucina, GA Carru, AI Chiaretti. Multiwalled carbon nanotube buckypaper: toxicology and biological effects in vitro and in vivo. *Nanomedicine.* 2009; 4:531-540, ISSN: 1743-5889.
- Belyanskaya L, Weigel S, Hirsch C, Tobler U, Krug HF, Wick P. Effects of carbon nanotubes on primary neurons and glial cells. *Neurotoxicology.* 2009;30:702-11.
- Bellucci S, M Chiaretti, A Cucina, GA Carru, AI Chiaretti. Multiwalled carbon nanotube buckypaper: toxicology and biological effects in vitro and in vivo. *Nanomedicine.* 2009; 4:531-540, ISSN: 1743-5889.
- Ben-Dor I, Kleiman NS, Lev E. Assessment, mechanisms, and clinical implications of variability in platelet response to aspirin and clopidogrel therapy. *Am J Cardiol.* 2009;104: 227-33.
- Bennat C, Müller-Goymann CC. Skin penetration and stabilization of formulations containing microfine titanium dioxide as physical UV filter. *Int J Cosmet Sci.* 2000;22:271-83.
- Berry JP, Arnoux B, Stanislas G, Galle P, Chretien J. A micro analytic study of particles transport across the alveoli: role of blood platelets. *Biomedicine.* 1997;27(9-10):354-7.
- Bianco A, Kostarelos K, Prato M. Applications of carbon nanotubes in drug delivery. *Curr Opin Chem Biol.* 2005;9:674-679.
- Bodian D, Howe HA. Experimental studies on intraneural spread of poliomyelitis virus. *Bull Johns Hopkins Hosp.* 1941a;68:248-267.
- Borm PJ, Robbins D, Haubold S, Kuhlbusch T, Fissan H, Donaldson K, Schins R, Stone V, Kreyling W, Lademann J, Krutmann J, Warheit D, Oberdorster E. The potential risks of nanomaterials: a review carried out for ECE-TOC. Part Fibre Toxicol. 2006;3:11-46.
- Bottini M, Bruckner S, Nika K, Bottini N, Bellucci S, Magrini A, Bergamaschi A, Mustelin T. Multi-walled carbon nanotubes induce T lymphocyte apoptosis. *Toxicol Lett.* 2006; 160(2):121-6.
- Braydich-Stolle L, Hussain S, Schlager JJ, Hofmann MC. In vitro cytotoxicity of nanoparticles in mammalian germline stem cells. *Toxicol Sci.* 2005;88:412-9.
- Cai R, Kubota Y, Shuin T, Sakai H, Hashimoto K, Fujishima A. Induction of cytotoxicity by photoexcited TiO₂ particles. *Cancer Res.* 1992;52:2346-8.
- Castranova, V., Koyama, S., Kim, Y-A., Endo, M. and Simeonova, P.P. Cross-talk between lung and systemic circulation during carbon nanotube respiratory exposure. Potential biomarkers. *Nano Letters.* 2009;9(1):36-43.
- Cha KE, Myung H. Cytotoxic effects of nanoparticles assessed in vitro and in vivo. *J Microbiol Biotechnol.* 2007;17(9):1573-8.
- Chen HW, Su SF, Chien CT, Lin WH, Yu SL, Chou CC, et al. Titanium dioxide nanoparticles induce emphysema-like lung injury in mice. *FASEB J.* 2006;20(13):2393-5.
- Chen L, Yokel RA, Hennig B, Toborek M: Manufactured aluminum oxide nanoparticles decrease expression of tight junction proteins

- in brain vasculature. *J Neuroimmune Pharmacol.* 2008;3(4):286-95. .
- Chiaretti M, Mazzanti G, Bosco S, Bellucci S., Cucina A, Le Foche F, Carru G A, Mastrangelo S, Di Sotto A, Masciangelo R, Chiaretti A M, Balasubramanian C, De Bellis G, Micciulla F, Porta N, Deriu G, Tiberia A. Carbon nanotubes toxicology and effects on metabolism and immunological modification in vitro and in vivo. *Journal of Physics Condensed Matter.* 2008;20:474203.
 - Connor EE, Mwamuka J, Gole A, Murphy CJ, Wyatt MD. Gold Nanoparticles Are Taken Up by Human Cells but Do Not Cause Acute Cytotoxicity. *Small.* 2005;1:325-7.
 - Crosera M., Bovenzi M., Maina G., Adami G., Zanette C., Florio C., Larese Filon F. Nanoparticle dermal absorption and toxicity: a review of the literature. *Inter Arch Occup Environ Health.* 2009;25. [Epub ahead of print] .
 - Cross SE, Innes B, Roberts M, Tsuzuki T, Robertson TA, McCormick P. Human skin penetration of sunscreen nanoparticles: In-vitro assessment of a novel micronized Zinc Oxide formulation. *Skin Pharmacol. Physiol.* 2007;20:148-54.
 - Cui D, Tian F, Ozkan CS, Wang M, Gao H. Effect of single wall carbon nanotubes on human HEK293 cells. *Toxicol. Lett.* 2005; 155:73-85.
 - Davoren M, Herzog E, Casey A, Cottinerau B, Chambers G, Byrne HJ, et al. In vitro toxicity evaluation of single walled carbon nanotubes on human A549 lung cells. *Toxicol in Vitro.* 2007;21(3):438-48.
 - De Nicola M, Bellucci S, Traversa E, De Bellis G, Micciulla F, Ghibelli L. Carbon nanotubes on Jurkat cells: effects on cell viability and plasma membrane potential. *Journal of Physics Condensed Matter.* 2008;20:474204.
 - Dhawan A, Taurozzi JS, Pandey AK, Shan W, Miller SM, Hashsham SA, Tarabara VV. Stable colloidal dispersions of C60 fullerenes in water: evidence for genotoxicity. *Environ Sci Technol.* 2006;40(23):7394-401.
 - Ding L, Stilwell J, Zhang T, Elboudwarej O, Jiang H, Selegue JP, Cooke PA, Gray JW, Chen FF. Molecular characterization of the cytotoxic mechanism of multiwall carbon nanotubes and nano-onions on human skin fibroblast. *Nano Lett.* 2005;5:2448-64.
 - Donaldson K, Stone V, Clouter A, Renwick L and MacNee W. Ultrafine particles. *Occup Environ Med.* 2001;58:211-6.
 - Dufur EK, Kumaravel T, Nohynek GJ, Kirkland D, Toutain H. Clastogenicity, photoclastogenicity or pseudo-photo-clastogenicity: genotoxic effects of zinc oxide in the dark, in preirradiated or simultaneously irradiated Chinese hamster ovary cells. *Mutat Res.* 2006;(607) 215-24.
 - Dumortier H, Lacotte S, Pastorin G, Marega R, Wu W, Bonifazi D, Briand J-P, Prato M, Muller S, Bianco A. Functionalized carbon nanotubes are non-cytotoxic and preserve the functionality of primary immune cells. *Nano Lett.* 2006;6(7):1522-8.
 - Dunford R, Salinaro A, Cai L, Serpone N, Horikoshi S, Hidaka H, Knowland J. Chemical oxidation and DNA damage catalysed by inorganic sunscreen ingredients. *FEBS Lett.* 1997;418:87-90.
 - Dutta D, Sundaram SK, Teeguarden JG, Riley BJ, Fifield LS, Jacobs JM, et al. Adsorbed proteins influence the biological activity and molecular targeting of nanomaterials. *Toxicol Sci.* 2007;100(1):300-15.
 - Elder A, Gelein R, Silva V, Feikert T, Opanashuk L, Carter J, Potter R, Maynard A, Ito Y, Finkelstein J, Oberdörster G. Translocation of inhaled ultrafine manganese oxide particles to the central nervous system. *Environ Health Perspect.* 2006; 114:1172-8.
 - Elgrabli D, Abella-Gallart S, Robidel F, Rogerieux F, Boczkowski J, Lacroix G. Induction of apoptosis and absence of inflammation in rat lung after intratracheal instillation of multiwalled carbon nanotubes. *Toxicology.* 2008;253(1-3):131-6.
 - Eom HJ, Choi J. Oxidative stress of CeO2 nanoparticles via p38-Nrf-2 signaling pathway in human bronchial epithelial cell, Beas-2B. *Toxicol Lett.* 2009;187(2):77-83.
 - Erdely A, Hulderman T, Salmen R, Liston A, Zeidler-Erdely PC, Schwegler-Berry D, Castranova V, Koyama S, Kim YA, Endo M, Simeonova PP. Cross-talk between lung and systemic circulation during carbon nanotube respiratory exposure. Potential biomarkers. *Nano Lett.* 2009;9(1):36-43.
 - Fenoglio I, Greco G, Tomatis M, Muller J, Raymundo-Piñero E, Béguin F, et al. Structu-

- ral defects play a major role in the acute lung toxicity of multiwall carbon nanotubes: physicochemical aspects. *Chem Res Toxicol*. 2008;21(9):1690-7.
- Fiorito S, Serafino A, Andreola F, Bernier P. Effects of fullerenes and single-wall carbon nanotubes on murine and human macrophages. *Carbon*. 2006; 44:1100-5.
 - Flahaut E, Durrieu MC, Remy-Zolghadri M, Bareille R, Baquei C. Investigation of CCVD carbon nanotubes towards human umbilical vein endothelial cells. *Carbon*. 2006; 44: 1093-9.
 - Folkmann JK, Risom L, Jacobsen NR, Wallin H, Loft S, Møller P. Oxidatively damaged DNA in rats exposed by oral gavage to C60 fullerenes and single-walled carbon nanotubes. *Environ Health Perspect*. 2009;17(5):703-8.
 - Gopee NV, Roberts DW, Webb P, Cozart CR, Siitonen PH, Warbritton AR, Yu WW, Colvin VL, Walker NJ, Howard PC. Migration of intradermally injected quantum dots to sentinel organs in mice. *Toxicol Sci*. 2007;98(1): 249-57.
 - Hagenbuch B, Meier P J: The superfamily of organic anion transporting polypeptides. *Biochimica et biophysica acta*. 2003;1609 (1): 1-18
 - Herzog E, Casey A, Lyng FM, Chambers G, Byrne HJ, Davoren M. A new approach to the toxicity testing of carbon-based nanomaterials. The clonogenic assay. *Toxicol Lett*. 2007; 174(1-3):49-60.
 - Hidaka H, Kobayashi H, Kolke T, Sato T, Serpone N. DNA damage photoinduced by cosmetic pigments and sunscreen agents under solar exposure and artificial UV illumination. *J Oleo Sci*. 2006;55:249-61.
 - Hillyer JF, Albrecht RM. Gastrointestinal per-sorption and tissue distribution of differently sized colloidal gold nanoparticles. *J Pharm Sci*. 2001;90:1927-36.
 - Hoshino A, Fujioka K, Oku T, Suga M, Sasaki YF, Ohta T, Yasuhara M, Suzuki K, Yamamoto K. Physicochemical Properties and Cellular Toxicity of Nanocrystal Quantum Dots Depend on Their Surface Modification. *Nano Lett*. 2004;4:2163-9.
 - Huang CC, Aronstam RS, Chen DR, Huang YW. Oxidative stress, calcium homeostasis, and altered gene expression in human lung epithelial cells exposed to ZnO nanoparticles. *Toxicol In Vitro*. 2010;24(1):45-55.
 - Jacobsen NR, Pojana G, White P, Møller P, Cohn CA, Korsholm KS, Vogel U, Marcomini A, Loft S, Wallin H. Genotoxicity, cytotoxicity, and reactive oxygen species induced by single-walled carbon nanotubes and C(60) fullerenes in the FE1-Mutatrade mark Mouse lung epithelial cells. *Environ Mol Mutagen*. 2008;49(6):476-87.
 - Jacobsen NR, Møller P, Jensen KA, Vogel U, Ladefoged O, Loft S, Wallin H. Lung inflammation and genotoxicity following pulmonary exposure to nanoparticles in ApoE-/- mice. *Part Fibre Toxicol*. 2009;6:2.
 - Jia G, Wang H, Yan L, Wang X, Pei R, Yan T, et al. Cytotoxicity of carbon nanomaterials: single-wall nanotube, multi-wall nanotube, and fullerene. *Environ Sci Technol*. 2005; 39(5):1378-83.
 - Kagan VE, Tyurina YY, Tyurin VA, Konduru NV, Potapovich AI, Osipov AN, et al. Direct and indirect effects of single walled carbon nanotubes on RAW 264.7 macrophages: role of iron. *Toxicol Lett*. 2006;165(1):88-100.
 - Karlsson HL, Cronholm P, Gustafsson J, Möller L. Copper oxide nanoparticles are highly toxic: a comparison between metal oxide nanoparticles and carbon nanotubes. *Chem Res Toxicol*. 2008;21(9):1726-32.
 - Karlsson HL, Gustafsson J, Cronholm P, Möller L. Size-dependent toxicity of metal oxide particles—a comparison between nano- and micrometer size. *Toxicol Lett*. 2009;188(2): 112-8.
 - Kim S, Lim YT, Soltesz EG, De Grand AM, Lee J, Nakayama A, Parker JA, Mihaljevic T, Lawrence RG, Dor DM, Cohn LH, Bawendi MG, Frangioni JV. Near-infrared fluorescent type II quantum dots for sentinel lymph node mapping. *Nat Biotechnol*. 2004;22:93-7.
 - Kishore AS, Surekha P, Murthy B. Assessment of the dermal and ocular irritation potential of multi-walled carbon nanotubes by using in vitro and in vivo methods. *Toxicol Letters*. 2009;15;191(2-3):268-74.
 - Kisin ER, Murray AR, Keane MJ, Shi XC, Schwegler-Berry D, Gorelik O, Arepalli S, Castranova V, Wallace WE, Kagan VE, Shvedova

- AA. Single-walled carbon nanotubes: genotoxic and cytotoxic effects in lung fibroblast V79 cells. *J Toxicol Environ Health A*. 2007;70(24):2071-9.
- Kobayashi N, Naya M, Endoh S, Maru J, Yamamoto K, Nakanishi J. Comparative pulmonary toxicity study of nano-TiO₂ particles of different sizes and agglomerations in rats: Different short- and long-term post-instillation results. *Toxicology*. 2009;264(1-2):110-8.
 - Koyama S, Endo M, Kim Y-A, Hayashi T, Yanagisawa T, Osaka K, Koyama H, Haniu H, Kuroiwa N. Role of systemic T-cells and histopathological aspects after subcutaneous implantation of various carbon nanotubes in mice. *Carbon*. 2006;44:1079-92.
 - Kreuter J: Influence of the surface properties on nanoparticle-mediated transport of drugs to the brain. *J Nanosci Nanotechnol*. 2004 ;4:484-8.
 - Kreyling WG, Semmler M, Erbe F, Mayer P, Takenaka S, Schulz H. Translocation of ultra-fine insoluble iridium particles from lung epithelium to extrapulmonary organs is size dependent but very low. *J Toxicol Environ Health Part A*. 2002;65:1513-30.
 - La Rovere MT, Bigger Jr JT, Marcus FI, Mortara A, Schwartz PJ. Baroreflex sensitivity and heart rate variability in the prediction of total cardiac mortality after myocardial infarction. *Lancet*. 1998;351:478-84.
 - Labarre D, Vauthier C, Chauvierre C, Petri B, Muller R, Chehimm MM. Interactions of blood proteins with poly(isobutylcyanoacrylate) nanoparticles decorated with a polysaccharidic brush. *Biomaterials*. 2005;26:5075-81.
 - Lademann J, Weigmann HJ, Rickmeyer C, Barthelmes H, Schaefer H, Mueller G, Sterry W. Penetration of Titanium Dioxide in sunscreen formulation into the horny layer and the follicular orifice. *Skin Pharmacol Appl Skin Physiol*. 1999;12:247-56.
 - Lai JC, Minski MJ, Chan AW, Lim L. Interrelations between manganese and other metal ions in health and disease. *Met Ions Biol Syst*. 2000;37:123-56.
 - Lai JC, Lai MB, Jandhyam S, Dukhande VV, Bhushan A, Daniels CK, Leung SW. Exposure to titanium dioxide and other metallic oxide nanoparticles induces cytotoxicity on human neural cells and fibroblasts. *Int J Nanomedicine*. 2008;3:533-45.
 - Lam CW, James JT, McCluskey R, Hunter RL. Pulmonary toxicity of single-wall carbon nanotubes in mice 7 and 90 days after intratracheal instillation. *Toxicol Sci*. 2004;77(1):126-34.
 - Landsiedel R, Kapp MD, Schulz M, Wiench K, Oesch F. Genotoxicity investigations on nanomaterials: methods, preparation and characterization of test material, potential artifacts and limitations—many questions, some answer. *Mutat Res*. 2009;681(2-3):241-8.
 - Lanone S, Rogerieux F, Geys J, Duponta A, Maillot-Marechal E, Boczkowski J, Lacroix G, Hoet P. Comparative toxicity of 24 manufactured nanoparticles in human alveolar epithelial and macrophage cell lines. *Particle and Fibre Toxicology*. 2009;6:14.
 - Larese Filon F, Boeninger M, Maina G, Adami G, Spinelli P, Damian A. Skin absorption of inorganic lead and the effects of skin cleansers. *J Occup Environ Med*. 2006;48:692-9.
 - Larese Filon F, D'Agostin F, Crosera M, Adami G, Renzi N, Bovenzi M, Maina G. Human skin penetration of silver nanoparticles through intact and damaged skin. *Toxicol*. 2009; 255:33-7.
 - Leaper DJ. Silver dressing: their role in wound management. *Int Wound J*. 2006; 3:282-94.
 - Legramante JM, Valentini F, Magrini A, Palleschi G, Sacco S, Iavicoli I, Pallante M, Moscone D, Galante A, Bergamaschi E, Bergamaschi A, Pietroiusti A. Cardiac autonomic regulation after pulmonary exposure to carbon nanotubes. *Hum Exp Toxicol*. 2009;28:369-75.
 - Li X, Xu S, Zhang Z, Schluesener HJ. Apoptosis induced by titanium dioxide nanoparticles in cultured murine microglia N9 cells. *Chinese Sci Bull*. 2009; 54:3830-6.
 - Li Z, Hulderman T, Salmen R, Chapman R, Leonard SS, Young S-H, Shvedova A, Luster MI, Simeonova PP. Cardiovascular effects of pulmonary exposure to single-wall carbon nanotubes. *Environ Health Persp*. 2007; 115:377-82.
 - Lin W, Huang Y, Zhou X, Ma Y. Toxicity of ce-

- rium oxide nanoparticles in human lung cancer cells. *Int J Toxicol*. 2006;25:451-7.
- Lin W, Huang YW, Zhou XD, Ma Y. In vitro toxicity of silica nanoparticles in human lung cancer cells. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2006;217(3):252-9.
 - Lindberg HK, Falck GC, Suhonen S, Vippola M, Vanhala E, Catalán J, Savolainen K, Norppa H Genotoxicity of nanomaterials: DNA damage and micronuclei induced by carbon nanotubes and graphite nanofibres in human bronchial epithelial cells in vitro. *Toxicol Lett*. 2009;186(3):166-73.
 - Linse S, Cabaleiro-Lago C, Xue W-F, Lynch I, Lindman S, Thulin E, Radford SE, Dawson KA. Nucleation of protein fibrillation by nanoparticles. *PNAS*. 2007;8691-7.
 - Lockman PR, Koziara JM, Mumper RJ, Allen DD: Nanoparticle surface charges alter blood-brain barrier integrity and permeability. *J Drug Target* . 2004;12:635-41.
 - Long TC, Saleh N, Tilton RD, Lowry GV, Veronesi B. Titanium dioxide (P25) produces reactive oxygen species in immortalized brain microglia (BV2): implications for nanoparticle neurotoxicity. *Environ Sci Technol*. 2006;40:4346-52.
 - Long TC, Tajuba J, Sama P, Saleh N, Swartz C, Parker J, Hester S, Lowry GV, Veronesi B. Nanosized titanium dioxide stimulates reactive oxygen species in brain microglia and damages neurons in vitro. *Environ Health Perspect*. 2007;115:1631-7.
 - Lovric J, Cho SJ, Winnik FM, Maysinger D. Unmodified cadmium telluride quantum dots induce reactive oxygen species formation leading to multiple organelle damage and cell death. *Chem Biol*. 2005;12:1227-34.
 - Ma L, Liu J, Li N, Wang J, Duan Y, Yan J, Liu H, Wang H, Hong F. Oxidative stress in the brain of mice caused by translocated nanoparticulate TiO₂ delivered to the abdominal cavity. *Biomaterials*. 2010;31:99-105.
 - Manna S, Sarkar S, Barr J, Wise K, Barrera E, Jejelowo O, Rice-Ficht A, Ramesh G. Single-Walled Carbon Nanotube Induces Oxidative Stress and Activates Nuclear Transcription Factor-KB in Human Keratinocytes. *Nano Lett*. 2005;5:1676-84.
 - Mavon A, Miquel C, Lejeune O, Payre B, Morretto P. In vitro percutaneous absorption and in vivo stratum corneum distribution of an organic and mineral sunscreen. *Skin Pharmacol. Physiol*. 2007;20:10-20.
 - Maynard AD, Baron PA, Foley M, Shvedova AA, Kissin ER, Castranova V. Exposure to carbon nanotube material: aerosol release during the handling of unrefined single-walled carbon nanotubes. *J Toxicol Environ Health A*. 2004;67:87-107.
 - Migliore L, Saracino D, Bonelli A, Colognato R, D'Errico MR, Magrini A, Bergamaschi A, Bergamaschi E. Carbon nanotubes induce oxidative DNA damage in RAW 264.7 cells. *Environ Mol Mutagen* 2010; 51(4):294-303.
 - Mitchell LA, Gao J, Wal RV, Gigliotti A, Burchiel SW, McDonald JD. Pulmonary and systemic immune response to inhaled multiwalled carbon nanotubes. *Toxicol Sci*. 2007;100(1):203-14.
- Moghimi SM, Patel HM. Serum-mediated recognition of liposomes by phagocytic cells of the reticuloendothelial system. The concept of tissue specificity. *Adv Drug Delivery Rev*. 1998; 32:45-61.
- Monteiro-Riviere NA, Nemanich RJ, Inman AO, Wang YY, Riviere JE. Multi-walled carbon nanotubes interactions with human epidermal keratinocytes. *Toxicology Letters* 2005; 155:377-84.
 - Monteiro-Riviere NA, Inman AO. Challenges for assessing carbon nanomaterial toxicity to skin. *Carbon*. 2006;44(6):1070-8.
 - Mossman BT, Borm PJ, Castranova V, Costa DL, Donaldson K, Kleeberger SR. Mechanisms of action of inhaled fibers, particles and nanoparticles in lung and cardiovascular disease. *Particle and Fibre Toxicology*. 2007;4:1-6.
 - Muldoon LL, Pagel MA, Kroll RA, Roman-Goldstein S, Jones RS, Neuwelt EA: A physiological barrier distal to the anatomic bloodbrain barrier in a model of transvascular delivery. *Am J Neuroradiol*. 1999;20:217-22.
 - Muller RH, Keck CM: Drug delivery to the brain – realization by novel drug carriers. *J Nanosci Nanotechnol*. 2004;4:471-83.
 - Muller J, Huaux F, Moreau N, Misson P, Heilier JF, Delos M, Arras M, Fonseca A, Nagy JB,

- Lison D. Respiratory toxicity of multi-wall carbon nanotubes. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2005; 207:221-31.
- Muller J, Decordier I, Hoet PH, Lombaert N, Thomassen L, Huaux F, Lison D, Kirsch-Volders M. Clastogenic and aneugenic effects of multi-wall carbon nanotubes in epithelial cells. *Carcinogenesis.* 2008a;29(2):427-33.
 - Muller J, Huaux F, Fonseca A, Nagy JB, Moreau N, Delos M, et al. Structural defects play a major role in the acute lung toxicity of multi-wall carbon nanotubes: toxicological aspects. *Chem Res Toxicol.* 2008b;21(9):1698-1705.
 - Murr LE, Garza KM, Soto KF, Carrasco A, Powell JG, Ramirez DA, et al. Cytotoxicity assessment of some carbon nanotubes and related carbon nanoparticle aggregates and the implication for anthropogenic carbon nanotube aggregates in the environment. *Int J Environ Res Publ Health.* 2005;2(1):31-42.
 - NANODERM. Quality of skin as a barrier to ultra-fine particles. Final Report. 2007. (Project Number: QLK4-CT-2002-02678) Available from url:<http://www.uni-leipzig.de/~nanoderm/>
 - Nemmar A, Hoet PHM, Vandervoort P, Dinsdale D, Nemery B, Hoylaers MF. Enhanced peripheral thrombogenicity after lung inflammation is mediated by platelet-leukocyte activation: role of P-selectin. *J Thromb Haemost.* 2007;5:1217-26.
 - Newman MD, Stotland M and Ellis JI. The safety of nanosized particles in titanium dioxide – and zinc oxide – based sunscreens. *J Am Acad Dermatol.* 2009;61:685-692.
 - Nishimori H, Kondoh M, Isoda K, Tsunoda S, Tsutsumi Y, Yagi K. Histological analysis of 70-nm silica particles-induced chronic toxicity in mice. *Eur J Pharm Biopharm.* 2009;72(3):626-9.
 - Nohynek GJ, Antignac E, Re T and Toutain H. Safety assessment of personal care products/cosmetics and their ingredients. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2009;doi: 10.1016/j.taap.2009.12.001.
 - Oberdörster E. Manufactured nanomaterials (fullerenes, C60) induce oxidative stress in the brain of juvenile largemouth bass. *Environmental Health Perspectives.* 2004, 112(10):1058-62.
 - Oberdörster G, Sharp Z, Elder AP, Gelein R, Kreyling W, Cox C. Translocation of inhaled ultrafine particles to the brain. *Inhal Toxicol.* 2004;16:437-45.
 - Oberdörster G, Oberdorster E, Oberdorster J. Nanotoxicology: an emerging discipline evolving from studies of ultrafine particles. *Environ Health Perspect* 2005;113:823-839.
 - Oberdörster G. Safety assessment for nanotechnology and nanomedicine: concepts of nanotoxicology. *J Internal Med* 2010;267:89-105.
 - Olivier JC. Drug transport to brain with targeted nanoparticles. *NeuroRX.* 2005; 2:108-19.
 - Pacurari M, Yin XJ, Zhao J, Ding M, Leonard SS, Schwegler-Berry D, Ducatman BS, Sbarra D, Hoover MD, Castranova V, Vallyathan V. Raw single-wall carbon nanotubes induce oxidative stress and activate MAPKs, AP-1, NF-kappaB, and Akt in normal and malignant human mesothelial cells. *Environ Health Perspect.* 2008;116(9):1211.
 - Paddle-Ledinek JE, Nasa Z, Cleland HJ. Effect of different wound dressings on cell viability and proliferation. *Plast Reconstr Surg.* 2006;117:110S-8S.
 - Papageorgiou I, Brown C, Schins R, Singh S, Newson R, Davis S, Fisher J, Ingham E, Case CP. The effect of nano- and micron-sized particles of cobalt-chromium alloy on human fibroblasts in vitro. *Biomaterials.* 2007;28:2946-58.
 - Park EJ, Yi J, Chung KH, Ryu DY, Choi J, Park K. Oxidative stress and apoptosis induced by titanium dioxide nanoparticles in cultured BEAS-2B cells. *Toxicol Lett.* 2008a;180(3):222-9.
 - Park EJ, Choi J, Park YK, Park K. Oxidative stress induced by cerium oxide nanoparticles in cultured BEAS-2B cells. *Toxicology.* 2008b; 245(1-2):90-100.
 - Park EJ, Yoon J, Choi K, Yi J, Park K. Induction of chronic inflammation in mice treated with titanium dioxide nanoparticles by intratracheal instillation. *Toxicology.* 2009;260(1-3):37-46.
 - Park S, Lee YK, Jung M, Kim KH, Chung N, Ahn EK, et al. Cellular toxicity of various inhalable metal nanoparticles on human alveolar epithelial cells. *Inhal Toxicol.* 2007;19 Suppl 1:59-65.

- Poland CA, Duffin R, Kinloch I, Maynard A, Wallace WA, Seaton A, et al. Carbon nanotubes introduced into the abdominal cavity of mice show asbestos-like pathogenicity in a pilot study. *Nat Nanotechnol.* 2008;3(7):423-8.
- Poon VK and Burd A. In vitro cytotoxicity of silver: implication for clinical wound care. *Burns.* 2004;30:140-7.
- Porter A, Muller K, Skepper J, Midgley P, Weland M. Uptake of C60 by human monocyte macrophages, its localization and implications for toxicity: Studied by high resolution electron microscopy and electron tomography. *Acta Biomaterialia.* 2006;2:409-19.
- Pott F and Roller M. Carcinogenicity study with nineteen granular dusts in rats. *Eur J Oncol.* 2005;10:249-81.
- Pulskamp K, Diabaté S, Krug HF. Carbon nanotubes show no sign of acute toxicity but induce intracellular reactive oxygen species in dependence on contaminants. *Toxicol Lett.* 2007; 10;168(1):58-74.
- Radomski A, Jurasz P, Alonso-Escolano D, Drews M, Morandi M, Malinski T, Radomski MD. Nanoparticle-induced platelet aggregation and vascular thrombosis. *Br J Pharmacol.* 2005; 146:882-93.
- Rahman MF, Wang J, Patterson TA, Saini UT, Robinson BL, Newport GD, Murdock RC, Schlager JJ, Hussain SM, Ali SF. Expression of genes related to oxidative stress in the mouse brain after exposure to silver-25 nanoparticles. *Toxicol Lett.* 2009;187:15-21.
- Ross R. Atherosclerosis: an inflammatory disease. *N Engl J Med.* 1999;340:115-26.
- Rouse JG, Yang J, Barron AR, Monteiro-Riviere NA. Fullerene-based amino acid nanoparticle interactions with human epidermal keratinocytes. *Toxicol in Vitro.* 2006; 20:1313-20.
- Rouse JG, Yang J, Ryman-Rasmussen JP, Barron AR, Monteiro-Riviere NA. Effects of mechanical flexion on the penetration of fullerene amino acid-derivatized peptide nanoparticles through skin. *Nano Lett.* 2007;7:155-60.
- Ryan JJ, Bateman HR, Gomez G, Norton SK et al. Fullerene nanomaterials inhibit the allergic response. *J Immunol.* 2007;1;665-72.
- Ryman-Rasmussen JP, Riviere JE, Monteiro-Riviere NA. Penetration of intact skin by quantum dots with diverse physicochemical properties. *Toxicol. Sci.* 2006;91:159-65.
- Ryman-Rasmussen JP, Riviere JE, Monteiro-Riviere NA. Surface coatings determine cytotoxicity and irritation potential of quantum dot nanoparticles in epidermal keratinocytes. *J Invest Dermatol.* 2007;127:143-53.
- Sakamoto Y, Nakae D, Fukumori N, Tayama K, Maekawa A, Imai K, Hirose A, Nishimura T, Ohashi N, Ogata A. Induction of mesothelioma by a single intrascrotal administration of multi-wall carbon nanotube in intact male Fischer 344 rats. *J Toxicol Sci.* 2009; 34(1):65-76.
- Salvador-Morales C, Flahaut E, Sim E, Sloan J, Green MLH, Sim RB. Complement activation and protein adsorption by carbon nanotubes. *Mol Imm.* 2006;43:193-201.
- Sato Y, Yokoyama A, Shibata KI, Akimoto Y, Ogino S, Nodasaka Y, et al. Influence of length on cytotoxicity of multi-walled carbon nanotubes against human acute monocytic leukemia cell line THP-1 in vitro and subcutaneous tissue of rats in vivo. *Mol BioSyst.* 2005; 1:176-82.
- Sayes C, Fortner J, Guo W, Lyon D, Boyd A, Ausman K, Tao Y, Sitharaman B, Wilson J, Hughes J, West J, Colvin V. The differential cytotoxicity of water-soluble fullerenes. *Nano Letters.* 2004; 4(10):1881-7.
- Sayes C, Gobin A, Ausman K, Mendez J, West J, Colvin V. Nano-C60 cytotoxicity is due to lipid peroxidation. *Biomaterials.* 2005;26(36):7587-95.
- Sayes CM, Liang F, Hudson JL, Mendez J, Guo W, Beach JM, Moore VC, Doyle CD, West JL, Billups WE, Ausman KD, Colvin VL. Functionalization density dependence of single-walled carbon nanotubes cytotoxicity in vitro. *Toxicol Lett.* 2006a;161:135-42.
- Sayes CM, Wahi R, Preetha AK, Liu Y, Jennifer LW, Kevin DA, David BW, Vicki LC. Correlating nanoscale titania structure with toxicity: a cytotoxicity and inflammatory response study with human dermal fibroblasts and human lung epithelial cells. *Toxicol Sci.* 2006b;92:174-85.
- Sayes CM, Marchione AA, Reed KL, Warheit DB. Comparative pulmonary toxicity assessments of C60 water suspensions in rats:

- few differences in fullerene toxicity in vivo in contrast to in vitro profiles. *Nano Lett.* 2007a;7(8):2399-406.
- Sayes CM, Reed KL, Warheit DB. Assessing toxicity of fine and nanoparticles: comparing in vitro measurements to in vivo pulmonary toxicity profiles. *Toxicol Sci.* 2007b;97(1):163-80.
 - Schulz J, Hohenberg H, Pflücker F, Gartner E, Will, T, PfeiVer S, Wepf R, Wendel V, Ges-Barlag H, Wittern KP. Distribution of sunscreens on skin. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 2002;54 (Suppl 1):S157-63.
 - Sharma CS, Sarkar S, Periyakaruppan A, Barr J, Wise K, Thomas R, Wilson BL, Ramesh GT. Single-walled carbon nanotubes induces oxidative stress in rat lung epithelial cells. *J Nanosci Nanotechnol.* 2007;7(7):2466-72.
 - Sharma HS: Pathophysiology of the blood-spinal cord barrier in traumatic injury. In Sharma HS and Westman J (Eds.), *The Blood-Spinal Cord and Brain Barriers in Health and Disease.* Elsevier Academic Press, San Diego, Ca. 2004;437-518.
 - Sharma HS: Hyperthermia influences excitatory and inhibitory amino acid neurotransmitters in the central nervous system. An experimental study in the rat using behavioural, biochemical, pharmacological, and morphological approaches. *Journal of Neural Transmission.* 2006a;113(4):497-519.
 - Sharma HS: Hyperthermia induced brain oedema: current status and future perspectives. *Indian J Med Res.* 2006b;123(5):629-52.
 - Sharma HS, Ali SF, Schalger j, Hussain S: Effects of nanoparticles on the blood brain barrier. *Int J Neuroprotec Neuroregen.* 2006c;2(3):78.
 - Sharma HS and Sharma Aruna: Nanoparticles aggravate heat stress induced cognitive deficits, blood-brain barrier disruption, edema formation and brain pathology. *Progress in Brain Research.* 2007;162:245-73.
 - Sharma HS, Ali SF, Hussain SM, Schlager JJ, Sharma A. Influence of engineered nanoparticles from metals on the blood-brain barrier permeability, cerebral blood flow, brain edema and neurotoxicity. An experimental study in rat and mice using biochemical and morphological approaches. *J Nanosci Nanotechnol.* 2009; 9:5055-72.
 - Sharma HS, Hussain S, Schlager J, Ali SF, Sharma A. Influence of nanoparticles on blood-brain barrier permeability and brain edema formation in rats. *Acta Neurochir Suppl.* 2010;106:359-64.
 - Sharma V, Shukla RK, Saxena N, Parmar D, Das M, Dhawan A. DNA damaging potential of zinc oxide nanoparticles in human epidermal cells. *Toxicol Lett.* 2009;185(3):211-8.
 - Shi Kam NW, Jessop TC, Wender PA, Dai H. Nanotube molecular transporters: internalization of carbon nanotube-protein conjugates into Mammalian cells. *J Am Chem Soc.* 2004;126:6850.
 - Shimizu M, Tainaka H, Oba T, Mizuo K, Umezawa M, Takeda K. Maternal exposure to nanoparticulate titanium dioxide during the prenatal period alters gene expression related to brain development in the mouse. *Part Fibre Toxicol.* 2009; 6:20-7.
 - Shiohara A, Hoshino A, Hanaki K, Suzuki K, Yamamoto K. On the cytotoxicity of quantum dots. *Microbiol Immunol.* 2004;48 (9):669-75.
 - Shvedova AA, Castranova V, Kisin ER, Schwegler-Berry D, Murray AR, Gandelsman VZ, Maynard A, Baron P. Exposure to carbon nanotube material: assessment of nanotube cytotoxicity using human keratinocyte cells. *J Toxicol Environ Health A.* 2003a;24;66(20): 1909-26.
 - Shvedova AA, Kisin ER, Murray AR, Schwegler-Berry D, Gandelsman VZ, Baron P. Exposure of human bronchial epithelial cells to carbon nanotubes caused oxidative stress and cytotoxicity. Proceedings of the Society for Free Radical Research Meeting, European Section. 2003 Jun 26–29; Ioannina, Greece; 2004.
 - Shvedova AA, Kisin ER, Mercer R, Murray AR, Johnson VJ, Potapovich AI, et al. Unusual inflammatory and fibrogenic pulmonary responses to single-walled carbon nanotubes in mice. *Am J Physiol.* 2005;289 (5):L698-L708.
 - Shvedova AA, Kisin ER, Murray AR, Gorelik O, Arepalli S, Castranova V, et al. Vitamin E deficiency enhances pulmonary inflammatory response and oxidative stress induced by single-walled carbon nanotubes in C57BL/6 mice. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2007a;221(3): 339-48.

- Shvedova AA, Sager T, Murray A, Kisin E, Porter DW, Leonard SS. Critical issues in the evaluation of possible effects resulting from airborne nanoparticles. Philadelphia: Informa Healthcare. In N. Monteiro-Riviere & L. Train (Eds.), *Nanotechnology: Characterization, Dosing and Health Effects*. 2007b, pp. 221-32.
- Shvedova AA, Fabisiak JP, Kisin ER, Murray AR, Roberts JR, Tyurina YY, Antonini JM, Feng WH, Kommineni C, Reynolds J, Barchowsky A, Castranova V, Kagan VE. Sequential exposure to carbon nanotubes and bacteria enhances pulmonary inflammation and infectivity. *Am J Resp Cell Mol Biol*. 2008a;38:579-90.
- Shvedova AA, Kisin E, Murray AR, Johnson VJ, Gorelik O, Arepalli S, et al. Inhalation versus aspiration of single walled carbon nanotubes in C57BL/6 mice: inflammation, fibrosis, oxidative stress and mutagenesis. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2008b;295:L552-65.
- Shvedova AA, Kisin ER, Murray AR, Kommineni C, Castranova V, Fadeel B, et al. Increased accumulation of neutrophils and decreased fibrosis in the lung of NADPH oxidase-deficient C57BL/6 mice exposed to carbon nanotubes. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2008c;231(2):235-240.
- Shvedova AA, Kisin ER, Porter D, Schulte P, Kagan VE, Fadeel B, et al. Mechanisms of pulmonary toxicity and medical applications of carbon nanotubes: Two faces of Janus? *Pharmacol Ther*. 2009;121(2):192-204.
- Silva GA. Neuroscience nanotechnology: progress, opportunities and challenges. *Nat Rev Neurosci*. 2006;7:65-74.
- Simeonova P. Nanoparticle exposure and systemic-cardiovascular effects. Experimental data. In: *Nanotechnology-toxicological issues and environmental safety*. Springer Netherlands Editor. 2007;53-64
- Simon-Deckers A, Gouget B, Mayne-L'hermite M, Herlin-Boime N, Reynaud C, Carrière M. In vitro investigation of oxide nanoparticle and carbon nanotube toxicity and intracellular accumulation in A549 human pneumocytes. *Toxicology*. 2008;253(1-3):137-46.
- Singh N, Manshian B, Jenkins GJS, Griffith SM, Williams PM, Maffei TGG, Wringht CJ, Doak SH. NanoGenotoxicology: the DNA damaging potential of engineered nanomaterials. *Biomaterials*. 2009:1-24.
- Singh R, Pantarotto D, Lacerda L, Pastorin G, Klumpp C, Prato M, Bianco A, Kostarelos K. Tissue distribution and blood clearance rates of intravenously administered carbon nanotube radiotracers. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2006;103:3357-62.
- Singh S, Shi T, Duffin R, Albrecht C, Van Berlo D, Höhr D, et al. Endocytosis, oxidative stress and IL-8 expression in human lung epithelial cells upon treatment with fine and ultrafine TiO₂: role of the specific surface area and of surface methylation of the particles. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2007;222(2):141-151.
- Song Y, Xue Y, Liu X, Wang P, Liu L. Effects of acute exposure to aluminum on blood-brain barrier and the protection of zinc. *Neurosci Lett*. 2008; 445:42-6.
- Soto K, Garza KM, Murr LE. Cytotoxic effects of aggregated nanomaterials. *Acta Biomaterialia*. 2007;3(3):351-8.
- Sriram K, Porter D, Tsuruoka S, Endo M, Jefferson A, Wolfarth W. Neuroinflammatory responses following exposure to engineered nanomaterials. *Toxicologist* 2007; A1390.
- Sung JH, Ji JH, Park JD, Yoon JU, Kim DS, Jeon KS, et al. Subchronic inhalation toxicity of silver nanoparticles. *Toxicol Sci*. 2009; 108(2):452-61.
- Takagi A, Hirose A, Nishimura T, Fukumori N, Ogata A, Ohashi N, et al. Induction of mesothelioma in p53+/- mouse by intraperitoneal application of multi-wall carbon nanotube. *J Toxicol Sci*. 2008;33(1):105-16.
- Tan MH, Commens CA, Burnett L, Snitch PJ. A pilot study on the percutaneous absorption of microfine titanium dioxide from sunscreens. *Australas. J Dermatol*. 1996;37:185-7.
- Tian FR, Cui DX, Schwarz H, Estrada GG, Kobayashi H. Cytotoxicity of single-wall carbon nanotubes on human fibroblasts. *Toxicol In Vitro*. 2007;20(7):1202-12.
- Tin-Tin-Win-Shwe, Yamamoto S, Ahmed S, Kakeyama M, Kobayashi T, Fujimaki H. Brain cytokine and chemokine mRNA expression in mice induced by intranasal instillation with ultrafine carbon black. *Toxicol Lett*. 2006; 163:153-160.
- Tin-Tin-Win-Shwe, Mitsushima D. Yamamoto

- S, Fukushima A, Funabashi T, Kobayashi T, Fujimaki H. Changes in neurotransmitter levels and proinflammatory cytokine mRNA expressions in the mice olfactory bulb following nanoparticle exposure. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2008;226:192-8.
- Tjälve H, Menare C, Borg-Neczak K. Uptake and transport of manganese in primary and secondary olfactory neurons in pike. *Pharmacol Toxicol.* 1995;77:23-31.
 - Totsuka Y, Higuchi T, Imai T, Nishikawa A, Nohmi T, Kato T, Masuda S, Kinoshita N, Hiyoshi K, Ogo S, Kawanishi M, Yagi T, Ichinose T, Fukumori N, Watanabe M, Sugimura T, Wakabayashi K. Genotoxicity of nano/microparticles in in vitro micronuclei, in vivo comet and mutation assay systems. *Part Fibre Toxicol.* 2009;6(1):23.
 - 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.
 - Uchino H, Minamikawa-Tachino R, Kristian T, Perkins G, Narazaki M, Siesjo BK, Shibasaki F. Differential neuroprotection by cyclosporin A and FK506 following ischemia corresponds with differing abilities to inhibit calcineurin and the mitochondrial permeability transition. *Neurobiol Dis.* 2002;10:219-233.
 - Uwatoku T, Shimokawa H, Abe K, Matsumoto Y, Hattori T, Oi K. Application of nanoparticle technology for the prevention of restenosis after balloon injury in rats. *Circ Res.* 2003;92:e62-9.
 - Voura EB, Jaiswal JK, Mattoussi H, Simon SM. Tracking metastatic tumor cell extravasation with quantum dot nanocrystals and fluorescence emission-scanning microscopy. *Nat Med.* 2004;10:993-8.
 - Wamer WG, Yin JJ, Wei RR. Oxidative damage to nucleic acids photosensitized by titanium dioxide. *Free Radic Biol Med.* 1997;23:851-8.
 - Wang JX, Zhou G, Chen C, Yu H, Wang T, Ma Y, Jia G, Gao Y, Li B, Sun J, Li Y, Jiao F, Zhao Y, Chai Z. Acute toxicity and biodistribution of different sized titanium dioxide particles in mice after oral administration. *Toxicol Lett.* 2007;168:176-85.
 - Wang L, Castranova V, Rojanasakul Y, Lu Y, Scabilloni J, Mercer RR. Direct fibrogenic effects of dispersed single walled carbon nanotubes on human lung fibroblasts. *Toxicologist.* 2008;102:A1499.
 - Wang JX, Liu Y, Jiao F, Lao F, Li W, Gu Y, Li Y, Ge C, Zhou G, Li B, Zhao Y, Chai Z, Chen C. Time-dependent translocation and potential impairment on central nervous system by intranasally instilled TiO₂ nanoparticles. *Toxicology.* 2008;254:82-90.
 - Wang S, Lu W, Tovmachenko O, Rai US, Yu H, Ray PC. Challenge in understanding size and shape dependent toxicity of gold nanomaterials in human skin keratinocytes. *Chem Phys Lett.* 2008;463:145-9.
 - Wamer WG, Yin JJ, Wei RR. Oxidative damage to nucleic acids photosensitized by titanium dioxide. *Free Radic Biol Med.* 1997;23:851-8.
 - Wang B, Feng WY, Zhu MT, Wang Y, Wang M, Gu YQ, Ouyang H, Wang H, Li M, Zhao Y, Chai Z, Wang H. Neurotoxicity of low-dose repeatedly intranasal instillation of nano- and submicron-sized ferric oxide particles in mice. *J Nanoparticle Res.* 2009;11:41-53.
 - Warheit DB, Laurence BR, Reed KL, Roach DH, Reynolds GA, Webb TR. Comparative pulmonary toxicity assessment of single wall carbon nanotubes in rats. *Toxicol Sci.* 2004;77(1):117-25.
 - Warheit DB, Borm PJ, Hennes C, Lademann J. Testing strategies to establish the safety of nanomaterials: conclusions of an ECETOC workshop. *Inhal Toxicol.* 2007;19(8):631-43.
 - Weiss CK, Kohnle MV, Landfester K, Hauk T, Fischer D, Schmitz-Wienke J, Mailänder V. The first step into the brain: uptake of NiO-PBCA nanoparticles by endothelial cells in vitro and in vivo, and direct evidence for their blood-brain barrier permeation. *Chem Med Chem.* 2008;3(9):1395-403.
 - Wick P, Manser P, Spohn P, Bruinink A. In vitro evaluation of possible adverse effects of nanosized materials. *Phys Status Solidi.* 2006;243(13):3556-60.
 - Wick P, Manser P, Limbach LK, Dettlaff-Weglikowska U, Krumeich F, Roth S, Stark WJ, Bruinink A. The degree and kind of agglomeration affect carbon nanotube cytotoxicity. *Toxicol Lett.* 2007;168:121-31.

- Wirnitzer U, Herbold B, Voetz M, Ragot J. Studies on the in vitro genotoxicity of baytubes, agglomerates of engineered multi-walled carbon-nanotubes (MWCNT). *Toxicol Lett.* 2009; 186(3):160-5.
- Witzmann FA and Monteiro-Riviere NA. Multi-walled carbon nanotube exposure alters protein expression in human keratinocytes. *Nanomedicine.* 2006;2:158-68.
- Worle-Knirsch JM, Pulskamp K, Krug HF. Oops they did it again! Carbon nanotubes hoax scientists in viability assays. *Nano Lett.* 2006;6(6):1261-8.
- Wu J, Liu W, Xue CB, Zhou SC., Lan FL, Bi L, Xu H, Yang X, Zeng FD. Toxicity and penetration of TiO₂ nanoparticles in hairless mice and porcine skin after subchronic dermal exposure. *Toxicol Lett.* 2009;191:1-8.
- Xu LJ, Zhao JX, Zhang T, Ren GG, Yang Z. In vitro study on influence of nano particles of CuO on CA1 pyramidal neurons of rat hippocampus potassium currents. *Environ Toxicol.* 2009; 24:211-7.
- Yang H, Liu C, Yang D, Zhang H, Xi Z. Comparative study of cytotoxicity, oxidative stress and genotoxicity induced by four typical nanomaterials: the role of particle size, shape and composition. *J Appl Toxicol.* 2009;29(1): 69-78.
- Yuan JH, Chen Y, Zha HX, Song LJ, Li CY, Li JQ, Xia XH. Determination, characterization and cytotoxicity on HELF cells of ZnO nanoparticles. *Colloids Surf B Biointerfaces.* 2009;Oct 27. [Epub ahead of print]
- Zanette C, Florio C, Crosera M, Adami G, Bovenzi M, Filon Larese F. Cytotoxicity of silver nanoparticles on human HaCat keratinocytes OEESC2009, Occupational and Environmental Exposure of the Skin to Chemicals. 2009 Jun 14 – 17; Edimburg, Uk.
- Zeni O, Palumbo R, Bernini R, Zeni L, Sarti M, Scarfi MR. Cytotoxicity investigation on cultured human blood cells treated with single-wall carbon nanotubes. *Sensors.* 2008;8:488-99.
- Zhang LW, Zeng L, Barron AR, Monteiro-Riviere NA. Biological interactions of functionalized single-wall carbon nanotubes in human epidermal keratinocytes. *Int J Toxicol.* 2007;26:103-13.
- Zhang LW, Yu WW, Colvin VL, Monteiro-Riviere NA. Biological interactions of quantum dot nanoparticles in skin and in human epidermal keratinocytes. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2008;228:200-11.
- Zhu L, Chang DW, Dai L, Hong Y DNA damage induced by multiwalled carbon nanotubes in mouse embryonic stem cells *Nano Lett.* 2007;7(12):3592-7.

