



Università degli Studi di Padova
Dipartimento Territorio e Sistemi Agro-Forestali

SCUOLA DI DOTTORATO DI RICERCA IN TERRITORIO, AMBIENTE, RISORSE E SALUTE
INDIRIZZO: MEDICINA AMBIENTALE, NUTRIZIONE E INQUINAMENTO
CICLO XXIII

**STUDI DI TOSSICITÀ DI NANOMATERIALI E VALUTAZIONE DEI
MECCANISMI D'AZIONE IN SISTEMI CELLULARI EUCARIOTICI**

Direttore della Scuola: Ch.mo Prof. Mario Aristide Lenzi

Coordinatore d'indirizzo: Ch.mo Prof. Bruno Saia

Supervisore: Ch.mo Prof. Lucia Celotti

Dottorando: Caterina Fede

31 Dicembre 2010

INDICE

1.a Riassunto	pag. 1
1.b Abstract	pag. 7
2. Introduzione	pag. 13
2.1 Le nanotecnologie	pag. 15
2.1.1 Applicazioni dei nanomateriali	pag. 16
2.2 Nanomateriali	pag. 20
2.2.1 Quantum dots	pag. 21
2.2.2 Liposomi	pag. 22
2.2.3 Micelle polimeriche	pag. 23
2.2.4 Dendrimeri	pag. 24
2.2.5 Nanoparticelle a base di carbonio	pag. 24
2.2.6 Nanoparticelle polimeriche	pag. 26
2.2.7 Nanoparticelle ceramiche e metalliche	pag. 27
2.3 Nanoparticelle commerciali di silice Ludox®	pag. 32
2.4 Vie di assorbimento	pag. 34
2.4.1 Assorbimento per via respiratoria	pag. 35
2.4.2 Assorbimento gastro-intestinale	pag. 36
2.4.3 Assorbimento cutaneo	pag. 37
2.5 Uptake e destino intracellulare delle NP	pag. 37
2.6 Nanotossicologia	pag. 43
2.7 Regolamentazione sull'utilizzo di nanomateriali	pag. 47
3. Scopo	pag. 51
4. Materiali e metodi	pag. 55
4.1 Materiali	pag. 57
4.2 Linee cellulari	pag. 60
4.3 Preparazione delle nanoparticelle Ludox®	pag. 61
4.4 Trattamenti cellulari con NP Ludox®	pag. 61
4.5 Saggio di vitalità cellulare MTS	pag. 63
4.6 Saggio di vitalità clonogenico	pag. 64
4.7 Studi di apoptosi	pag. 66
4.7.1 Rilevazione di apoptosi tramite colorazione DAPI	pag. 66
4.7.2 Saggio di attivazione della caspasi-3	pag. 67
4.8 Valutazione della produzione di ROS	pag. 68

4.9 Rilevamento di doppie rotture al DNA tramite immunofluorescenza	pag. 72
4.10 Analisi di espressione genica mediante tecnica microarray	pag. 75
4.10.1 Estrazione dell'RNA totale	pag. 76
4.10.2 Quantificazione spettrofotometrica dell'RNA totale	pag. 77
4.10.3 Analisi qualitativa dell'RNA	pag. 78
4.10.4 Marcatura dei campioni ed ibridazione su microarray	pag. 78
4.10.5 Analisi dei dati di espressione	pag. 79
4.11 Analisi del ciclo cellulare mediante citofluorimetria a flusso	pag. 80
4.12 Analisi statistica	pag. 81
5. Risultati e discussione	pag. 83
5.1 Caratterizzazione chimica delle nanoparticelle	pag. 85
5.2 Trattamenti cellulari con nanoparticelle Ludox®	pag. 90
5.3 Test di vitalità con saggio MTS	pag. 92
5.4 Test di vitalità con saggio clonogenico	pag. 94
5.5 Confronto tra i saggi di vitalità cellulare	pag. 99
5.6 Induzione di apoptosi	pag. 100
5.7 Analisi della produzione di ROS indotta da NP Ludox®	pag. 102
5.8 Danni al DNA indotti da NP Ludox®	pag. 108
5.9 Alterazione dell'espressione genica	pag. 114
5.10 Analisi del ciclo cellulare	pag. 120
6. Conclusioni	pag. 123
7. Abbreviazioni	pag. 129
8. Bibliografia	pag. 133
Pubblicazioni	pag. 149
Partecipazioni a congressi	pag. 149

1.a Riassunto

Le nanoparticelle (NP) sono strutture particolate, di varia forma e di diversa composizione, con dimensioni comprese tra 1 e 100 nm. Si distinguono in NP di origine naturale (prodotte da combustioni come nei vulcani), NP di origine antropogenica (prodotte da motori diesel o inceneritori industriali) e NP artificiali (ottenute attraverso le nanotecnologie). Queste strutture possiedono proprietà fisico-chimiche innovative uniche, dipendenti dalle loro dimensioni nanometriche e soprattutto dall'elevato rapporto area superficiale/volume, che conferiscono una nuova reattività chimica e nuove proprietà ottiche, magnetiche, catalitiche ed elettrochimiche (Sanvincens et al., 2008). Queste caratteristiche hanno reso le NP negli ultimi decenni di notevole interesse nello sviluppo tecnologico e di largo impiego in campo medico-diagnostico (Sanvincens et al., 2008), in campo biotecnologico (Abu-Salah et al., 2010; Karn et al., 2009) e nell'industria cosmetica, alimentare e dei materiali (Liu et al., 2009). Tuttavia, la crescente esposizione a particelle nanometriche necessita di studi che ne caratterizzino le proprietà e i potenziali effetti citotossici. Nonostante esse siano applicate in un numero così vasto di campi che sembra essere destinato ad aumentare, il loro comportamento all'interno della cellula resta ancora da accertare; sembra che possano indurre *in vitro* alterazione dell'espressione genica e morte cellulare e che siano in grado di causare danni al DNA sia in modo diretto che indiretto, inducendo stress ossidativi o risposte infiammatorie (Singh et al., 2009). Sebbene si siano fatte numerose ipotesi sui possibili effetti dannosi delle NP per l'organismo, tuttavia non è ancora chiaro quale sia l'esatto meccanismo con il quale queste nanostrutture interagiscano con le cellule e con le strutture subcellulari. Questo lavoro di Dottorato di Ricerca si colloca all'interno del progetto promosso e finanziato da ECSIN (*European Centre for the Sustainable Impact of Nanotechnology*) volto a valutare la tossicità indotta da nanostrutture prodotte a livello industriale. In particolare è stata condotta un'indagine *in vitro* sulla citotossicità di nanoparticelle commerciali Ludox[®] (prodotto a marchio registrato della W. R. Grace & Co) in sistemi cellulari umani. Queste NP colloidali di silice amorfa sono ampiamente utilizzate in vari campi industriali, ad esempio nella produzione di inchiostri per la stampa e vernici, nell'industria tessile e in quella alimentare per la chiarificazione di bevande. In particolare sono state utilizzate le formulazioni AS30 e SM30, rispettivamente di 20 e 7 nm di diametro.

Prima di tutto le due soluzioni acquose di nanoparticelle sono state caratterizzate in collaborazione con il Dipartimento di Scienze Chimiche dell'Università di Padova, attraverso la misura del potenziale ζ , indicatore della stabilità della sospensione colloidale, attraverso analisi al microscopio elettronico a trasmissione per visualizzarne forma e dimensione, e infine con la misura del diametro mediante analisi al dynamic light scattering. Inoltre si è indagato sulla possibile interazione delle nanoparticelle con le componenti del terreno di coltura cellulare e con le proteine del siero: studi di spettrofotometria e analisi al dynamic light scattering hanno dimostrato che anche a concentrazioni basse (0,01 mg/ml), le NP Ludox[®] aggregano in presenza anche di piccole percentuali di siero (3%). L'interazione con le

proteine del siero con conseguente formazione di aggregati di dimensioni maggiori avviene subito dopo la preparazione della soluzione di NP in terreno con siero e aumenta con l'aumentare del tempo di incubazione. Questo fenomeno non si verifica quando le NP vengono mantenute in sospensione acquosa o in terreno di coltura privo di siero.

Dati i numerosi studi di tossicità condotti su colture di fibroblasti polmonari (Mroz et al., 2007; Foldbjerg et al., 2010) e l'alto rischio di esposizione alle nanoparticelle a livello polmonare (Gwinn et al., 2006; Nel et al., 2006), per questo lavoro sono state selezionate una linea cellulare umana, CCD-34 Lu, derivata da fibroblasti di polmone neonatali, e due linee umane tumorali: A549, di carcinoma polmonare, e HT-1080, di fibrosarcoma.

Gli effetti dell'esposizione a varie concentrazioni di nanoparticelle Ludox[®] sulla vitalità cellulare sono state innanzitutto analizzate mediante il saggio colorimetrico MTS e il saggio clonogenico, dopo incubazione a diversi tempi: 24, 48 e 72 h in terreno di coltura addizionato al 3% di siero. La vitalità cellulare è stata misurata anche incubando le cellule per 2 h in assenza di siero, nella condizione in cui le NP non vanno incontro a fenomeni di aggregazione. I risultati ottenuti hanno evidenziato innanzitutto che le due NP di silice saggiate danno una tossicità dose e tempo dipendente in tutte e tre le linee cellulari. Inoltre, è stato verificato che le NP di diametro inferiore e area superficiale maggiore (Ludox[®] SM30) possiedono generalmente una maggiore attività citotossica in accordo con studi di letteratura (Lin et al., 2006; Napierska et al., 2009), probabilmente perché, essendo più piccole, possono penetrare più facilmente nelle membrane e inoltre, a parità di peso, ne vengono somministrate alle cellule un numero maggiore rispetto alle NP AS30. Sono stati poi confrontati i risultati dei saggi di vitalità cellulare trattando le cellule in presenza di siero nel terreno di coltura o in assenza di siero per tempi brevi (2 h): sia il saggio clonogenico che il test MTS hanno messo in evidenza che le cellule hanno una vitalità superiore quando il trattamento con le NP Ludox[®] avviene in terreno con il 3% di siero. Questo probabilmente è determinato dal fatto che le NP, formando aggregati reversibili ed instabili con le proteine del siero, risultano meno tossiche, probabilmente perché non sono in grado di penetrare nella membrana cellulare date le maggiori dimensioni. Infine, la linea cellulare normale CCD-34 Lu è risultata più sensibile al trattamento con le NP rispetto alle due linee tumorali, che mostrano un calo significativo della vitalità cellulare solo a dosi di NP che risultano pressoché letali per la linea normale (~0,02 mg/ml).

Date le numerose evidenze sperimentali e cliniche che le nanoparticelle possono causare danni a livello cellulare e avere effetti tossici (Nel et al., 2006), in questo lavoro è stata analizzata la produzione di specie reattive dell'ossigeno (ROS) da parte delle cellule, come conseguenza dell'incubazione con Ludox[®] AS30 e SM30. In accordo con i risultati dei test di vitalità, si è osservato che la linea normale CCD-34 Lu produce alti livelli di ROS a concentrazioni di NP a cui le linee cellulari tumorali risultano insensibili (~0,03 mg/ml). Per

tutte e tre le linee cellulari prese in esame si è comunque riscontrata una produzione di ROS dose-dipendente dopo 2 h di incubazione in terreno di coltura in assenza di siero.

Dati precedenti hanno dimostrato che la formazione e l'accumulo di specie reattive dell'ossigeno possono causare notevoli danni a livello cellulare e sono in grado di indurre doppie rotture a livello del DNA (Mroz et al., 2007; Mroz et al., 2008). Per questo motivo è stata analizzata tramite immunofluorescenza l'induzione di DSBs (double strand breaks) al DNA per mezzo di un marcatore di tale lesione, ovvero i foci dell'istone H2AX fosforilato. La fosforilazione di questa variante istonica è necessaria per la segnalazione del danno e il conseguente reclutamento di proteine di riparazione del DNA nel sito di rottura. La fosforilazione dell'istone H2AX non è esclusivamente indotta dalla presenza di doppie rotture al DNA, ma è altamente correlabile ad esse, come dimostrato da diversi studi di induzione di stress ossidativo e di esposizione a radiazioni ionizzanti (Hamer et al., 2003). I risultati ottenuti in questo lavoro hanno evidenziato che solo la linea cellulare di fibrosarcoma umano HT-1080 è risultata positiva per la presenza di foci di riparazione dopo trattamento con nanoparticelle Ludox[®] AS30 e SM30, alle concentrazioni di 0,02-0,04-0,06 mg/ml, mentre le cellule CCD-34 Lu e A549 sono risultate negative per tutti i tempi e le dosi di trattamento analizzate.

Per valutare poi se il trattamento con NP Ludox[®] induce morte cellulare per apoptosi, tutte e tre le linee cellulari prese in esame sono state analizzate al microscopio a fluorescenza dopo fissazione con il colorante nucleare DAPI per evidenziare la morfologia nucleare e l'eventuale presenza di corpi apoptotici. Si è così potuto evidenziare un aumento dell'indice apoptotico in seguito al trattamento con nanoparticelle soprattutto per quelle di diametro inferiore (SM30, 0,04 mg/ml), principalmente nella linea cellulare tumorale HT-1080 e in misura minore anche nella linea cellulare A549. Le cellule CCD-34 Lu sono invece risultate negative a conferma di dati riportati in letteratura che dimostrano che questa linea di fibroblasti polmonari umani normali non va incontro ad apoptosi ma presenta differenti modalità di risposta all'attività citotossica di diversi agenti. Questi dati sono stati poi confermati nelle due linee tumorali tramite il saggio fluorimetrico di attivazione della caspasi 3, una cistein-proteasi coinvolta nelle fasi iniziali dell'apoptosi.

Per valutare poi gli eventuali effetti genotossici causati dall'incubazione con NP Ludox[®] si è valutata l'alterazione dell'espressione genica tramite il kit della Agilent[®] "Whole Human Genome Oligo Microarray". Con la tecnologia dei microarray a DNA è possibile misurare il livello di espressione di migliaia di geni contemporaneamente, sfruttando i principi di base dell'ibridazione degli acidi nucleici. Un tipico esperimento di microarray si divide in quattro fasi distinte: 1) marcatura del campione; 2) ibridazione sul supporto solido; 3) acquisizione dell'immagine; 4) estrazione dei dati grezzi ed analisi statistica dei valori misurati. L'intensità del segnale rilevata in ogni spot dell'array è in definitiva una misura indiretta della concentrazione di quel target (in questo caso RNA messaggero) nella cellula. Tramite

l'esperimento di microarray è possibile quindi capire non solo quali sono i geni espressi nelle condizioni esaminate, ma anche se la loro espressione è alterata rispetto al campione di controllo (Kronick, 2004). I risultati preliminari raggiunti in questo lavoro riguardano la linea cellulare A549 incubata con nanoparticelle Ludox[®] AS30 e SM30 alla concentrazione di 0,02 mg/ml, con un trattamento di 2 h senza siero, seguito poi da un ripristino in terreno completo di 3 h (per le NP AS30 e SM30) o di 22 h (solo per le NP AS30). Il numero di geni la cui espressione risulta significativamente alterata rispetto al controllo è più alto nel campione trattato con le NP SM30 (354 geni) rispetto al campione trattato con le NP AS30 (222 dopo 3 h dalla fine del trattamento e 118 dopo 22 h). In entrambi i casi comunque un numero maggiore di geni alterati risulta sovra-espresso rispetto a quelli sotto-espressi, se confrontati con il campione di controllo. Inoltre, il livello di espressione genica risulta maggiormente alterato quando l'analisi viene condotta dopo 3 ore di incubazione in terreno normale rispetto a 22 h. Indagando i livelli di espressione dei principali geni alterati e le vie metaboliche cellulari in cui questi sono coinvolti, si è potuto osservare che i principali pathways alterati sono il controllo del ciclo cellulare, le vie regolate da p53, la via di signalling delle MAPK e la regolazione dell'organizzazione del citoscheletro cellulare. Nonostante lo studio dei profili di espressione genica abbiano messo in evidenza un'alterazione dell'espressione di geni del ciclo cellulare dopo trattamento con NP Ludox[®], l'analisi del ciclo cellulare tramite citofluorimetria a flusso in tutte e tre le linee cellulari prese in esame non ha portato in evidenza alcuna alterazione imputabile alle NP in nessuna delle condizioni di trattamento studiate.

I risultati di questo lavoro costituiscono uno studio preliminare condotto *in vitro* degli effetti citotossici provocati in cellule umane dalle nanoparticelle di silice Ludox[®], che costituiscono un modello di nanoparticelle commerciali. Le NP negli ultimi decenni hanno trovato un impiego sempre più vasto in svariati campi, dall'edilizia al settore tessile ed alimentare, imponendo allo stesso tempo l'esigenza di fornire informazioni esaurienti per una valutazione dell'impatto dei nanomateriali sulla salute umana e una conseguente regolamentazione del loro utilizzo.

1.b Abstract

Nanoparticles (NPs) are particulate structures of various shapes and different composition with size ranging 1 and 100 nm. They are divided in NPs of natural origin (produced by combustion as in volcanoes), NPs of anthropogenic origin (produced by diesel engines or industrial incinerators) and artificial NPs (obtained through nanotechnology). These structures possess unique and innovative physical and chemical properties, dependent on their nanoscale dimensions and especially on the high ratio surface area/volume, that give to the NPs a new chemical reactivity and new optical, magnetic, catalytic and electrochemical properties (Sanvincens et al., 2008). In the last decades, these characteristics have made the NPs of considerable interest in technological development and wide used in medicine and diagnostics (Sanvincens et al., 2008), in biotechnology (Abu-Salah et al., 2010; Karn et al., 2009) and in cosmetics, food and materials (Liu et al., 2009). However, the increasing exposure to nanoscale particles requires studies that characterize the properties and potential cytotoxic effects. Although they are applied in a vast number of fields that seem to be destined to increase, their behavior inside the cell remains undetermined. It seems that NPs may lead to *in vitro* alteration of gene expression and cell death and that they are able to induce DNA damage both directly and indirectly, causing oxidative stress and inflammatory responses (Singh et al., 2009). Although many suppositions have been made about the possible harmful effects of nanoparticles on the body, it is not clear yet what is the exact mechanism by which these nanostructures interact with cells and subcellular structures. My Ph.D. work is part of the project funded by ECSIN (*European Centre for the Sustainable Impact of Nanotechnology*) that aims to assess the toxicity induced by nanostructures produced at industrial scale. In particular, a research was carried out on *in vitro* cytotoxicity of commercial Ludox[®] nanoparticles (a trademark product of W. R. Grace & Co) in human cell systems. These colloidal amorphous silica NPs are widely used in various industrial fields, such as in the production of printer's inks and paints, in textile industry, and in food industry for the fining of drinks. In particular the formulations that have been used are AS30 and SM30, 20 and 7 nm in diameter respectively.

First of all, the two aqueous solutions of nanoparticles were characterized in collaboration with the Department of Chemistry, University of Padua, by measuring the ζ potential, an indicator of the stability of colloidal suspension, by analyzing the form and the size with the transmission electron microscope, and finally with the analysis of the diameter by dynamic light scattering. It was also investigated the interaction of nanoparticles with the components of cell culture medium and serum proteins: studies of spectroscopy and analysis by dynamic light scattering have shown that even at low concentrations (0.01 mg/ml), Ludox[®] NPs aggregate in presence of even small percentages of serum (3%). The interaction with serum proteins resulting in large aggregates takes place immediately after preparing the solution of NPs in medium with serum and increases with incubation time. This phenomenon does not occur when the NPs are retained in aqueous suspension or in culture medium without serum.

Because of the many toxicological studies conducted on cultured lung fibroblasts (Mroz et al., 2007; Foldbjerg et al., 2010) and the high risk of exposure to nanoparticles in the lungs (Gwinn et al., 2006; Nel et al., 2006), I selected a human cell line, CCD-34 Lu, derived from neonatal lung fibroblasts, and two human tumoral cell lines, A549 from a lung cancer and fibrosarcoma's cells HT-1080, were selected for this work. Initially the exposure's effects to various concentrations of Ludox[®] nanoparticles on cell viability were tested using the MTS colorimetric assay and the clonogenic assay. Cell viability was measured by incubating the cells in culture medium supplemented with 3% of serum for different times (24, 48 and 72 h) and for only 2 h in absence of serum to avoid the aggregation phenomena. The results showed that the two tested silica NPs give a dose and time-dependent toxicity in all the three cell lines. In addition, it was found that NPs with smaller diameter and greater surface air (Ludox SM30[®]) have generally a higher cytotoxic activity in agreement with literature studies (Lin et al., 2006; Napierska et al., 2009). Probably the smaller NPs can more easily penetrate the membranes and, at the same weight, they are also administered to the cells in a bigger amount than the AS30 NPs. The results of cell viability tests were compared by treating the cells in presence or in absence of serum in culture medium for a short time (2 h): both the clonogenic and the MTS assays showed that cells have a higher viability when the treatment occurs in medium with 3% of serum. I hypothesize that the NPs, forming reversible and unstable aggregates with serum proteins, are less toxic, probably because they are unable to penetrate the cell membrane because of their larger size. Finally, the normal cell line CCD-34 Lu was more sensitive to treatment with NPs than the two tumor cell lines, which show a significant decrease in cell viability only at doses that resulted almost lethal to normal cells (~0.02 mg/ml).

Given the many clinical and experimental evidences that nanoparticles can damage cells and cause toxic effects (Nel et al., 2006), the production of reactive oxygen species (ROS) by cells after incubation with Ludox[®] AS30 and SM30 was analyzed. In agreement with the results of viability tests, it was observed that the normal line CCD-34 Lu produces high levels of ROS at concentrations of NPs at which the tumor cell lines were unaffected (~0.03mg/ml). For all the three cell lines, however, it was found a dose-dependent production of ROS after 2 h of incubation in culture medium without serum.

Previous data have shown that the formation and accumulation of reactive oxygen species may cause serious damages to cells and are able to induce double breaks to DNA (Mroz et al., 2007; Mroz et al., 2008). For this reason, the induction of DSBs (double strand breaks) has been analyzed by the presence of foci of the phosphorylated form of the histone H2AX (γ H2AX) in the nucleus of treated cells. The phosphorylation of this histone is necessary for the signalling of the damage and the consequent recruitment of proteins of DNA repair in the breaking point. The histone H2AX phosphorylation is not exclusively induced by the presence of DNA double strand breaks, but it is highly correlated to them, as demonstrated by

several studies of induction of oxidative stress and exposure to ionizing radiation (Hamer et al., 2003). The results obtained in this work have revealed that only the fibrosarcoma human cell line HT-1080 was positive for the presence of foci after treatment with Ludox[®] nanoparticles AS30 and SM30, at concentrations of 0.02-0.04-0.06 mg/ml, whereas CCD-34 Lu and A549 cells were negative for all times and doses of treatment analysed.

To assess whether the treatment with Ludox[®] NPs induces cell death by apoptosis, the cells were analysed by means of fluorescence microscopy after staining with the nuclear dye DAPI to detect the nuclear morphology and the presence of apoptotic bodies. An increase of apoptotic index was found following the treatment with nanoparticles, especially those with a smaller diameter (SM30, 0.04 mg/ml), and mainly in tumour cell line HT-1080. CCD-34 Lu cells are proved negative instead, in agreement with data showing that the normal fibroblasts does not meet to apoptosis but present different ways of response to cytotoxic activity of various agents. These data were then confirmed in the two cancer lines through the fluorimetric assay of caspase-3 activation, a cistein-protease involved in the initial stages of apoptosis.

Finally to assess the possible genotoxic effects caused by incubation with Ludox[®] NPs, the gene expression alteration is assessed through Agilent[®]'s kit "Whole Human Genome Oligo Microarray". With DNA microarray technology it is possible to measure the expression levels of thousands of genes simultaneously, using the basic principles of hybridization of nucleic acids. A typical microarray experiment is divided into four distinct phases: 1) marking of the sample; 2) hybridization on a solid support; 3) image acquisition; 4) extraction of raw data and statistical analysis of measured values. The signal intensity detected in each spot of the array is ultimately an indirect measure of the concentration of that target (in this case mRNA) in the cell. Through the microarray analysis it is possible therefore to understand not only which genes are expressed in the examined conditions, but also if their expression is altered compared to the control sample (Kronick, 2004). The preliminary results achieved in this work relate to the A549 cell line incubated with Ludox[®] nanoparticles AS30 and SM30 at a concentration of 0.02 mg/ml, with a treatment of 2 h without serum, followed by a recovery in complete medium for 3 h (for SM30 and AS30 NPs) or 22 h (only for AS30 NPs). The number of genes whose expression is significantly altered compared to the control is higher in the sample treated with SM30 NPs (354 genes) compared to the sample treated with AS30 NPs (222 at 3 h after the end of treatment and 118 at 22 h). In both cases a greater number of altered genes are over-expressed in relation to those under-expressed when compared with the control sample. Furthermore, the level of gene expression is more altered when the analysis is conducted after 3 h of incubation in normal medium compared to 22 h. Investigating the expression levels of the main altered genes and the cellular pathways in which they are involved, it was observed that the main altered pathways are cell cycle control, the ways regulated by p53, the signaling pathway of the MAPK and the organization of the cell

cytoskeleton. Although the study of gene expression profiles has revealed an alteration of the expression of genes in the cell cycle after treatment with Ludox[®] NPs, cell cycle analysis by flow cytometry in all the three cell lines examined did not bring out any change due to the NPs in any of the treatment conditions studied.

The results obtained during my Ph.D. thesis constitute a preliminary study conducted *in vitro* on human cells about the cytotoxic effects caused by Ludox[®] silica nanoparticles, which are a model of commercial nanoparticles. In recent decades the NPs have found an increasingly wide use in various fields, from construction to textiles and food, imposing at the same time the need to provide exhaustive information for an assessment of the impact of nanomaterials on human health and the consequent regulation of their use.

2. Introduzione

2.1 LE NANOTECNOLOGIE

Il termine nanotecnologia fu utilizzato per la prima volta dall'ingegnere statunitense Kim Eric Drexler, che lo utilizzò nel suo libro del 1986 "*Engines of Creation: The Coming Era of Nanotechnology*". Con il termine nanotecnologia si intendono il controllo, la manipolazione, lo studio, la realizzazione e la caratterizzazione di strutture e dispositivi su scala nanometrica, ossia con dimensioni comprese tra 1 e 100 nanometri (Figura 1; McNeil, 2005).

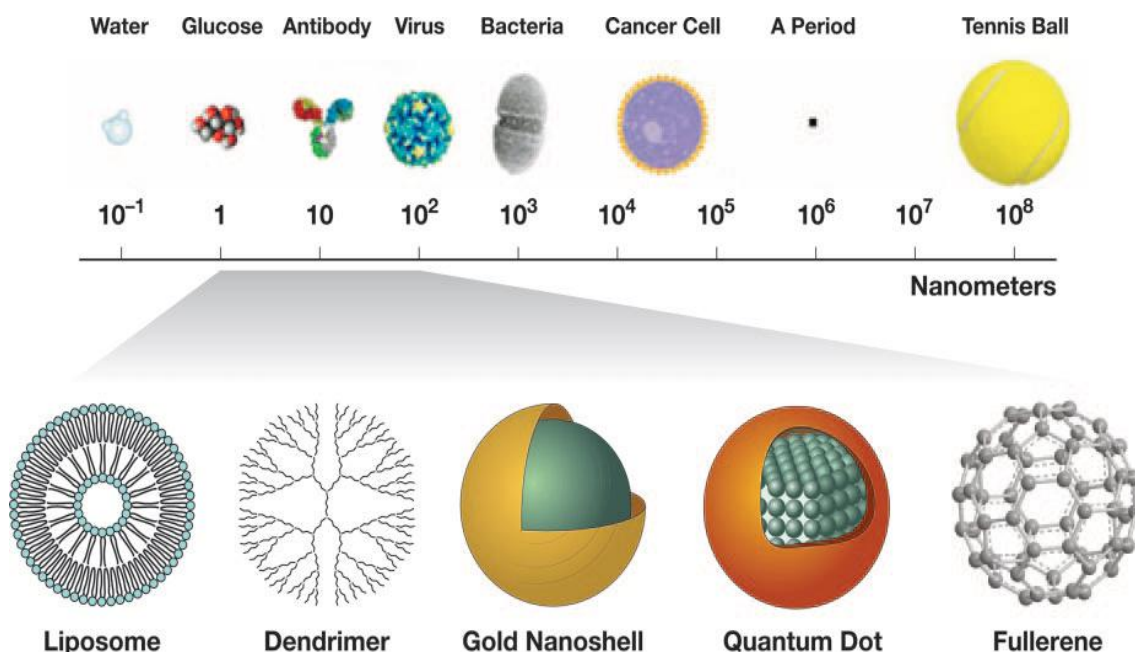


Figura 1: confronto fra le dimensioni di nanoparticelle, strutture biologiche ed oggetti comuni.

Le nanoparticelle possiedono, grazie alle loro dimensioni e soprattutto all'elevato rapporto area superficiale/volume, proprietà fisico-chimiche innovative uniche (Roco, 2003), che conferiscono una nuova reattività chimica e nuove proprietà ottiche, magnetiche, catalitiche ed elettrochimiche (Sanvincens et al., 2008). Lo studio e l'utilizzo di queste nuove caratteristiche è uno dei principali obiettivi della nanotecnologia al fine di offrire nuove soluzioni e supporti tecnologici per applicazioni in diverse aree quali i bioprocessi a livello industriale, la medicina molecolare, e la produzione di svariati prodotti commerciali anche di larga diffusione in cui sono presenti nanomateriali, quali alimenti, cosmetici, detersivi, tessuti per l'abbigliamento, sistemi informatici ed elettronici (Medina et al., 2007).

2.1.1 APPLICAZIONI DEI NANOMATERIALI

Le applicazioni dei nanomateriali in campo industriale sono molto vaste ed in rapido sviluppo: negli ultimi quattro anni i beni di consumo sul mercato che contengono nanomateriali hanno avuto un incremento del 379% (Figura 2), che è destinato a crescere ancora con la stessa rapidità.

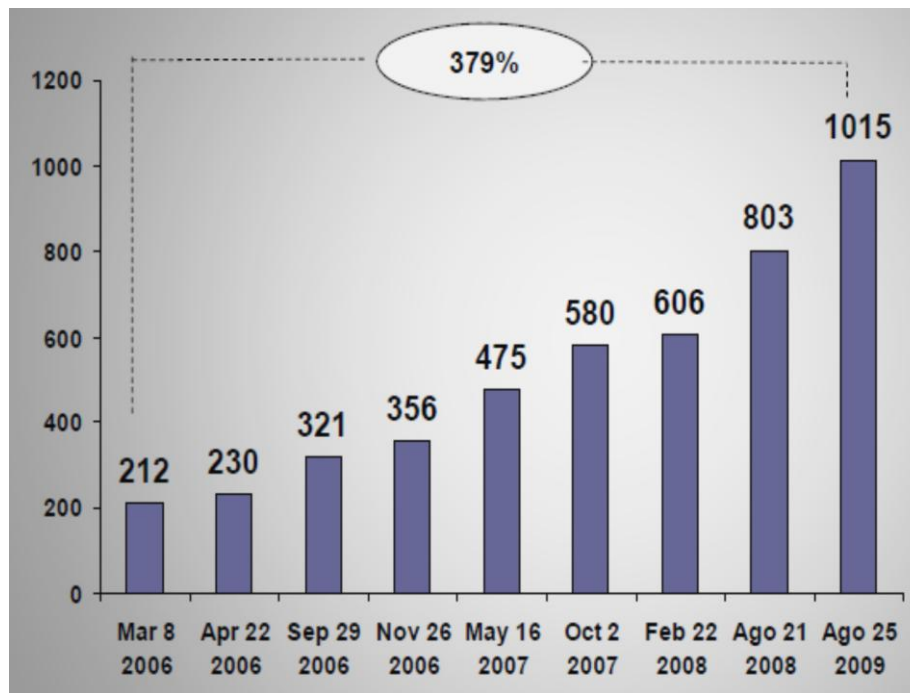


Figura 2: numero di beni di consumo sul mercato, dall'anno 2006 all'anno 2009, contenenti nanoparticelle (www.nanotechproject.org).

Nella tabella 1 sottostante sono elencati alcuni esempi di nanomateriali artificiali, o "ingegnerizzati", che trovano impiego in campo industriale nella fabbricazione di prodotti di largo consumo (<http://www.nanocompositech.com>). I nanomateriali trovano impiego ad esempio nell'industria tessile in prodotti come propilene, nylon e altri polimeri per garantirne protezione microbica a lungo termine (Lines, 2008). Nanoparticelle di ossido di cerio vengono utilizzate per la produzione di marmite catalitiche più efficienti, poichè se aggiunte al carburante permettono di migliorare il rendimento del motore, favorendo un risparmio sui consumi, e permettendo l'ossidazione graduale dei depositi di carbonio accumulati nei motori. Altro caso di utilizzo industriale è quello delle nanoparticelle di argilla o biossido di silicio che vengono inserite nelle pellicole e nei contenitori di plastica per alimenti per rendere gli imballaggi più resistenti e ridurre la permeabilità al vapore acqueo, all'ossigeno e alle radiazioni UV provenienti dai raggi solari. In campo alimentare vengono utilizzate anche NP

di biossido di titanio per rivestire le tavolette di cioccolato e ricoprire il colore bianco del burro di cacao in superficie. Nel settore della cosmesi, infine, nanoparticelle di ossidi metallici (ossido di zinco, biossido di titanio) vengono inserite all'interno di creme solari per assorbire raggi ultravioletti, rimanendo trasparenti alla luce visibile.

Nanomateriale	Applicazione	Indicazioni d'uso
nanoparticelle	industria cosmetica	filtri solari che sfruttano le proprietà assorbenti e schermanti
nanocomposti (nanocariche di silicati lamellari e nanotubi di carbonio)	settore ottico, elettronico e magnetico	rinforzi per aumentare le proprietà meccaniche dei composti
nanocoating	settore edile	rivestimenti di superfici per renderli resistenti all'usura, antigraffio e idrorepellenti
nanocomposti a matrice metallica e ceramica	Utensili	utensili più resistenti alle sollecitazioni e all'usura, aumento della precisione
nanoparticelle metalliche	Vernici	incrementare e aumentare le proprietà ottiche delle vernici
nanotubi di carbonio	settore tecnologico	dispositivi di emissione di elettroni (FED, field emission displays) per display di schermi e tv
nanoparticelle	settore dei trasporti	additivi per carburanti
membrane nanostrutturate	industria idrica	membrane per la purificazione delle acque

Tabella 1: Esempi di applicazioni commerciali di nanomateriali.

Tra i materiali più utilizzati è da ricordare l'argento: solo nell'anno 2008 si sono registrati 259 prodotti (di cui 33 in campo alimentare) contenenti nanoparticelle d'argento (www.nanotechproject.org). Tra le notevoli caratteristiche del nanoargento sono da annoverare le proprietà antimicrobiche, grazie alle quali questo nanomateriale viene largamente utilizzato in ambito medico e per la produzione di beni di consumo (Figura 3), come tessuti ed elettrodomestici, ad esempio lavatrici che rilasciano ioni argento: questi ioni altamente reattivi rilasciati all'interno di batteri sono in grado di indurre cambiamenti

conformazionali alla parete e sulla membrana batterica provocandone la morte (Rai et al., 2009).



Figura 3: esempi di prodotti di uso comune che contengono nanoparticelle d'argento: elettrodomestici (lavatrice, forno a microonde, aspirapolvere), biberon per bambini, dentifrici, prodotti per computer, prodotti tessili (maglieria intima e scarpe) e materiali per l'edilizia, (pavimenti in parquet) (www.nanosilver.it).

Grazie al suo rapido sviluppo negli ultimi decenni, la nanotecnologia sta avendo un notevole impatto anche in ambito medico: le notevoli applicazioni sono definite nell'insieme come nanomedicina, termine coniato dal *National Institute of Health* (USA), e riguardano il trattamento, la diagnosi e il monitoraggio di sistemi biologici (Moghimi et al., 2005). Alcune applicazioni sono indirizzate al *drug delivery* (Quintana et al., 2002; Compagnin et al., 2009) e al *gene delivery*, alla bio-rilevazione di patogeni e proteine, alla produzione di sonde biologiche fluorescenti, all'ingegneria tissutale, alla separazione e purificazione di cellule e

molecole biologiche (Sanvincens et al., 2008). Le caratteristiche chimico-fisiche delle NP usate in diagnostica, quali le ridotte dimensioni, la carica, la funzionalizzazione e la stabilità di superficie, assicurano l'indirizzamento e l'accumulo selettivo del marker nel sito d'interesse e ne agevolano molto l'analisi. È stato dimostrato che nanoparticelle paramagnetiche di ossido di ferro usate in combinazione con le tecniche di MRI (magnetic resonance imaging) (Lanza et al., 2003) sono molto efficienti nella discriminazione tra cellule sane e cancerose. Nella tabella 2 riportata di seguito sono elencati alcuni tipi di nanosistemi commerciali usati in campo bio-medico.

NP	Applicazioni	Indicazioni terapeutiche	Compagnia
Liposomi	Drug delivery	Cancro	Liplasome Pharma (Lyngby, Denmark), Schering-Plough Corp (Kenilworth, NJ, USA)
	Drug delivery	vaccino anti-influenzale	Berna Biotech AG (Basel, Switzerland)
	Drug delivery	infezione funginea	Enzon (Bridgewater, NJ, USA), Gilead Science
Dendrimeri	applicazioni terapeutiche	HIV, cancro, infiammazioni	Starpharma (Melbourne, Australia)
Nanotubi di carbonio	diagnosi <i>in vivo</i>	monitoraggio di funzioni respiratorie	Nanomix (Emeryville, CA, USA)
	Imaging	sonda per microscopia	Carbon Nanoprobes Inc (Seattle, WA, USA)
Quantum dots	diagnosi <i>in vivo</i>	Western blotting	Evident Technologies (New York, NY, USA),
	Imaging	citofluorimetro, bio-detection	Quantum Dot Corp. (Hayward, CA, USA),
NP magnetiche	diagnosi <i>in vivo</i>	Cancro	Immunicon (Huntingdon Valley, PA, USA)
	Imaging, applicazioni terapeutiche	cancro, anemie, malattie cardiovascolari	Advanced Magnetics (Cambridge, MA, USA)
	applicazioni terapeutiche	Cancro	Nanospectra Biosciences Inc (Houston, TX, USA)
NP d'oro	diagnosi <i>in vitro</i>	HIV	Amersham/GE (Little Chalfont, UK)
	diagnosi <i>in vitro</i> , Immaging	Labelling reagents (PCR, RNA, Western blotting)	Nanoprobes Inc. (Yaphank, NY, USA)

Tabella 2: Esempi di applicazioni biomediche di nanomateriali.

Per ottenere nanomateriali utilizzabili in campo medico e biotecnologico ed in particolare per il *drug delivery* sono fondamentali i seguenti requisiti: l'utilizzo di materiali biocompatibili che possono essere assemblati con processi semplici, la possibilità di ottimizzare quei parametri biofisicochimici dei nanoveicoli che possono influire sulle proprietà farmacocinetiche e sull'accumulo cellulare del farmaco veicolato, la produzione di grandi quantità di nanosistemi da poter utilizzare in clinica (Farokhzad et al., 2009), e la dimensione dei nanoveicoli che deve essere compresa tra i 10 e i 100 nm per una veicolazione efficace senza che le nanoparticelle vengano eliminate attraverso escrezione renale (quando hanno grandezza inferiore ai 10 nm), o vengano catturate dal sistema reticolo-endoteliale (per dimensioni superiori ai 100 nm) (Davis et al., 2008). I nanoveicoli possono anche essere ingegnerizzati con ligandi specifici per recettori sovraespressi sulla superficie delle cellule endoteliali, permettendo così un indirizzamento attivo alla vascolarizzazione tumorale, e possono essere rivestite con PEG (polietilenglicole) per aumentarne l'emivita nel circolo sanguigno sfuggendo all'eliminazione da parte di monociti e macrofagi (Owens et al., 2006). Oggi sono di largo impiego anche le nanostrutture per il *gene delivery* e il silenziamento genico, con il notevole vantaggio di proteggere il materiale genetico dall'azione degradativa delle nucleasi cellulari e degli enzimi lisosomiali e di evitare l'utilizzo di vettori virali che sono meno sicuri poichè possono dar luogo a fenomeni inaspettati ed incontrollabili di ricombinazione, oltre a provocare una risposta immunologica eccessiva.

Considerati i numerosi e polivalenti campi in cui vengono applicate le nanoscienze e le nanotecnologie, si ritiene sempre più diffusamente che esse siano di impulso e di beneficio allo sviluppo di molte aree della ricerca scientifica e delle sue applicazioni, attraendo considerevoli e sempre maggiori investimenti messi a disposizione dai governi e dalle industrie (Cannistraro, 2004).

2.2 NANOMATERIALI

Le nanostrutture sono dei composti artificiali di dimensioni nanometriche innovative nella tecnologia dei materiali grazie alle loro proprietà chimico-fisiche associate alle dimensioni. Proprio per queste proprietà, le nanostrutture sono entrate a far parte della classe dei cosiddetti "nuovi materiali" e si sono dimostrate particolarmente adatte per il miglioramento e lo sviluppo di prodotti commerciali e utilizzati nel campo della biomedicina e della genomica. Le nanoparticelle (NP) hanno diversa forma, composizione ed origine: in base a quest'ultima si distinguono in NP di origine naturale (prodotte da combustioni come nei vulcani), NP di

origine antropogenica (prodotte da motori diesel o inceneritori industriali) e NP artificiali (ottenute attraverso le nanotecnologie).

Qui di seguito è riportata una tabella riassuntiva delle nanostrutture maggiormente diffuse delle quali ho poi descritto le caratteristiche principali.

Nanoparticella	Composizione	Geometria	Dimensioni
Metalliche			
Ferrose	Fe	sferica	10-20 nm
Oro	Au	sferica	<50 nm
Ossidi			
Titanato	TiO ₂	sferica	
Silice	SiO ₂	sferica, sferica porosa	>5 nm
Semi-metalliche			
Quantum dots	CdSe, GaAs	sferica	2-10 nm
Carbonio e organiche			
Nanotubi	C (<i>sp</i> ²)	(multi-)tubolare cava	2 x <5000 nm
Fullereni	C (<i>sp</i> ²)	sferica cava	0.7 nm (C ₆₀)
Dendrimeri	Sintesi/organiche	sferica	<15 nm
Liposomi	Fosfolipidi	(multi-)sferica cava	50-100 nm

Tabella 3: tabella esemplificativa di alcune nanoparticelle catalogate secondo la loro chimica, la loro geometria e le dimensioni caratteristiche.

2.2.1 QUANTUM DOTS

I quantum dots (QDs) sono nanocristalli colloidali inorganici, fluorescenti e semiconduttori con dimensioni che variano da 2 a 100 nm (Sanvincens et al., 2008). Essi possiedono un *core* centrale costituito da un centinaio di atomi del II-VI gruppo della tavola periodica (ad esempio CdSe, PbSe) o del gruppo III-V gruppo (ad esempio GaAs, GaN). Molti di questi metalli racchiusi nel *core* sono tossici anche a basse concentrazioni, poiché la degradazione dei QDs, promossa ad esempio da un ambiente ossidativo, provoca il rilascio di ioni metallici pesanti. Per evitare la degradazione del *core* e la conseguente tossicità, può essere aggiunto un rivestimento (ZnS) o gruppi funzionali e macromolecole che conferiscono ai QDs ulteriori attività (Lewinski et al., 2008). I QDs possiedono inoltre la proprietà di assorbire la luce per poi riemetterla ad una lunghezza d'onda superiore, in funzione della loro dimensione, coprendo la scala di quasi tutti i colori (Figura 4). Rispetto ai markers fluorescenti convenzionali, i QDs possiedono un'elevata sensibilità, un'elevata resistenza chimica e una fluorescenza molto stabile che comporta una notevole resistenza al fotobleaching: per questi

motivi sono eccellenti marcatori per saggi e agenti di contrasto nelle analisi di *imaging* (Medintz et al., 2005).

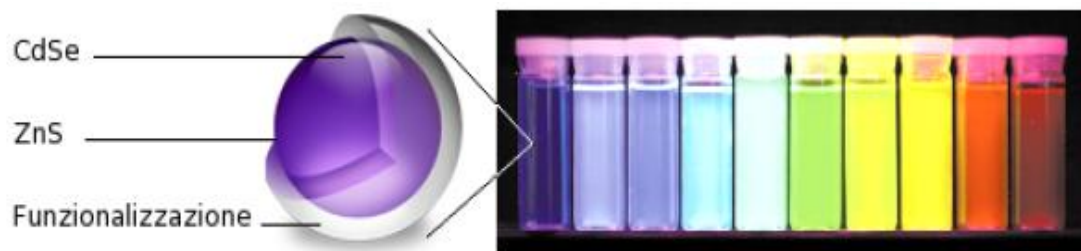


Figura 4: schema di una particella semiconduttrice (Quantum dot) e immagine di soluzioni contenenti QDs irradiate con luce UV, che fluorescono a lunghezze d'onda dipendenti dalla loro dimensione.

2.2.2 LIPOSOMI

I liposomi sono vescicole fosfolipidiche di forma sferica che possiedono una struttura molto simile alle membrane biologiche, con una fase acquosa centrale circondata da un doppio strato lipidico idrofobico (Figura 5-A). I liposomi sono suddivisi in tre principali categorie in base alle dimensioni e alla lamellarità. I SUV (*small unilamellar vescicles*) hanno diametro compreso tra i 25 e i 50 nm e sono circondati da un unico strato lipidico; i LUV (*large unilamellar vescicles*) sono gruppi eterogenei di vescicole monostrato ma di dimensioni maggiori rispetto ai SUV; gli MLV (*multi-lamellar vescicles*), infine, sono formati da numerosi strati lipidici separati tra loro da una soluzione acquosa.

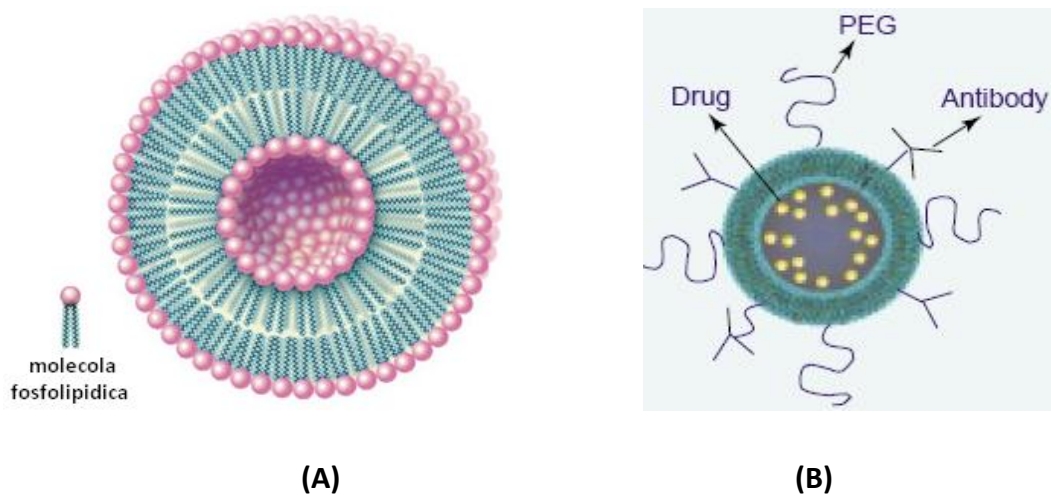


Figura 5: struttura schematica di un liposoma (A) e di un liposoma contenente farmaci e rivestito con ligandi e polietilenglicole (PEG) (B).

Questo tipo di nanostruttura è di notevole interesse poichè, grazie alla sua natura anfipatica, è in grado di trasportare molecole idrofiliche inserite nel *core* interno acquoso, o sostanze idrofobiche intrappolate all'interno della membrana lipidica (Barratt, 2002). Inoltre, la superficie può essere funzionalizzata con l'aggiunta di ligandi e/o polimeri in grado di aumentare la specificità in caso di *drug delivery* (Figura 5-B), come ad esempio il PEG (polietilenglicole), un polimero in grado di minimizzare l'interazione dei nanosistemi con le componenti del siero e del sistema immunitario, e di aumentarne la stabilità.

Per queste loro proprietà fisico-chimiche, i liposomi sono una diffusa tipologia di carrier e presentano un'ottima capacità di circolare, penetrare e diffondere negli ambienti cellulari (Torchilin, 2005). Recentemente, ad esempio, è stata sviluppata una nuova generazione di liposomi, i cosiddetti "*stealth liposomes*", particolarmente interessanti in campo applicativo poichè presentano lunghi tempi di circolazione nel sangue e sono in grado di evadere in maniera quasi completa il sistema immunitario (Moghimi et al., 2003).

2.2.3 MICELLE POLIMERICHE

Le micelle polimeriche sono composte da un *core* idrofobico, che serve a contenere la molecola da trasportare, ed un guscio (*shell*) idrofilico costituito da catene polimeriche non biodegradabili che stabilizzano la micella in ambiente acquoso (Figura 6).

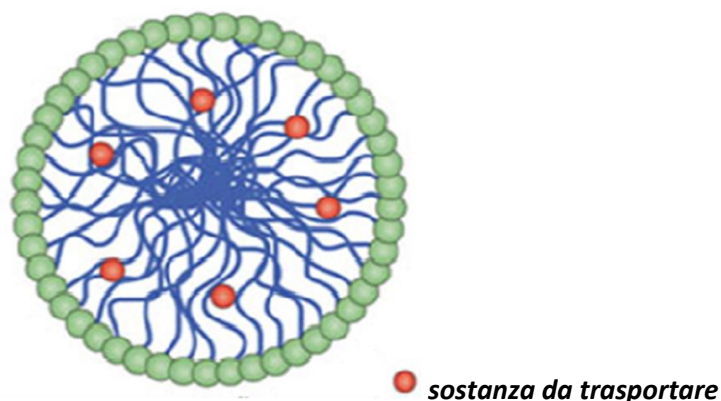


Figura 6: struttura di una micella (Orive et al., 2009).

Il *core* è formato da polimeri biodegradabili o solubili resi idrofobici per coniugazione con sostanze idrofobiche oppure da piccole catene idrofobiche, che possono essere attaccate ad un'estremità del polimero centrale (*Block Copolymer*) o distribuite casualmente nella struttura polimerica (*Random Copolymer*). Tali micelle sono più stabili termodinamicamente in soluzioni fisiologiche rispetto a micelle surfattanti e pertanto si dissociano meno facilmente *in*

vivo. Un problema del loro utilizzo nel *drug delivery* rimane il possibile rilascio del farmaco da veicolare prima del raggiungimento del sito bersaglio (Jones et al., 1999).

2.2.4 DENDRIMERI

I dendrimeri sono composti oligomericici o polimerici sintetici con dimensioni inferiori ai 15 nm, altamente ramificati, simmetrici e geometricamente ordinati, costituiti da un *core* centrale e numerosi gruppi terminali (Figura 7), che ne determinano le particolari caratteristiche e permettono di disporre di un gran numero di gruppi funzionali attivi, utilizzabili anche per la coniugazione chimica di molecole di farmaco.

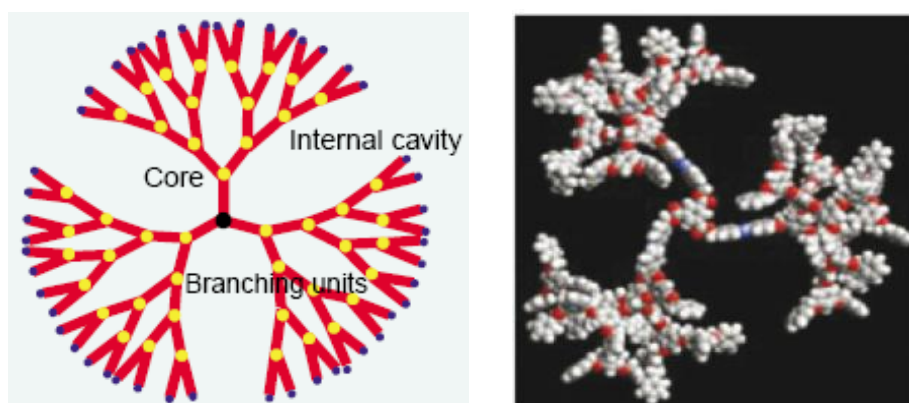


Figura 7: struttura di un dendrimero.

Essi si formano tramite una sequenza di reazioni ripetute partendo da un *core* polifunzionale centrale (Tomalia et al, 2002), e sono molto importanti nelle applicazioni biologiche per la possibilità di controllare in maniera precisa la loro forma e le loro dimensioni.

2.2.5 NANOPARTICELLE A BASE DI CARBONIO

Le nanoparticelle composte principalmente da atomi di carbonio sono definite soprattutto in base alla geometria e sono schematizzate nella figura 8 sottostante. Quelle più utilizzate e sviluppate sono i fullereni, i nanotubi a parete singola (SWCNTs) e quelli a parete multipla (MWCNTs).

Questi nanomateriali posseggono interessanti proprietà fisico-chimiche quali la bassa densità, l'ottima resistenza meccanica, la stabilità termo-chimica e la conducibilità elettrica, che permettono il loro utilizzo in diverse applicazioni biomediche dopo una funzionalizzazione con gruppi polari che rendono solubili tali particelle in soluzioni acquose (Polizu et al., 2006).

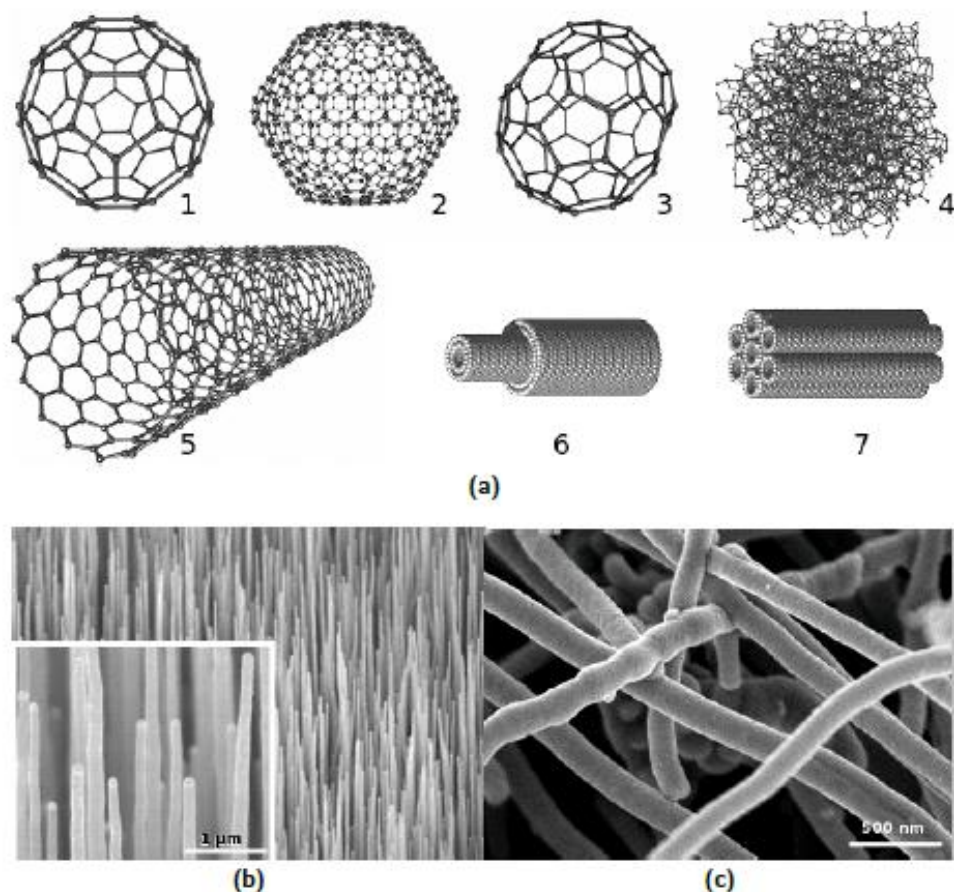


Figura 8: a) strutture di nanoparticelle di carbonio: fullereni C_{60} (1), C_{540} (2), C_{70} (3), carbonio amorfo black (4), nanotubi a parete singola (5), a più pareti concentriche (6) e a fasci (7) (immagine adattata da chemicool.com).

b) Immagine di nanotubi di carbonio cosiddetta "a foresta" (immagine da nano-labs.com).

c) Nanotubi di carbonio a parete multipla disposti casualmente.

I **fullereni** sono stati scoperti nel 1985 e sono nanostrutture costituite solamente da atomi di carbonio che assumono una conformazione simile a quella di una sfera vuota, di un ellissoide o di un tubolare. Assieme al diamante e alla grafite, i fullereni sono possibili forme allotropiche in cui catene di molecole di carbonio si legano tra loro. Il più piccolo fullerene (0,7 nm) è il C_{60} (fullerite) composto da 60 atomi di carbonio con struttura a icosaedro troncato costituito da esagoni e pentagoni, ai cui vertici si posiziona ciascun atomo di carbonio e i cui bordi rappresentano i legami.

Per quanto riguarda la tossicità di questo tipo di nanostrutture, in letteratura sono riportati dati contrastanti: alcuni autori hanno dimostrato che i fullereni possiedono proprietà antiossidanti e sono tossici sui batteri (Gharbi et al., 2005), altri invece sostengono che il C_{60} è tossico per l'uomo (Kolosnjaj et al., 2007).

I **nanotubi di carbonio** (CNTs) sono stati scoperti nel 1985 dal chimico americano Richard E. Smalley, e hanno dimensioni comprese tra 0,7 e 10 nm. Possono essere visti analogamente al fullerene come una delle forme allotropiche del carbonio, ma questa nanostruttura tende al rilassamento e assume una conformazione “arrotolata” su se stessa dando origine a una configurazione di tipo cilindrica.

I nanotubi si suddividono in due categorie (Pagona et al., 2006):

- a parete singola (SWCNT, Single-Wall Carbon NanoTube), cioè costituiti da un singolo foglio grafítico avvolto su se stesso e racchiuso alle due estremità da due calotte emisferiche; il loro diametro è generalmente al di sotto dei 2 nm e non supera i 10 nm (Figura 9-A);
- a parete multipla (MWCNT, Multi-Wall Carbon NanoTube), formati invece da più fogli avvolti coassialmente l'uno sull'altro (Figura 9-B), con un diametro che varia dai 2 ai 50 nm. Nei MWCNTs ogni singolo nanotubo mantiene distinte le sue proprietà, rendendo difficile prevedere il comportamento risultante dato dalla somma dei diversi nanotubi.

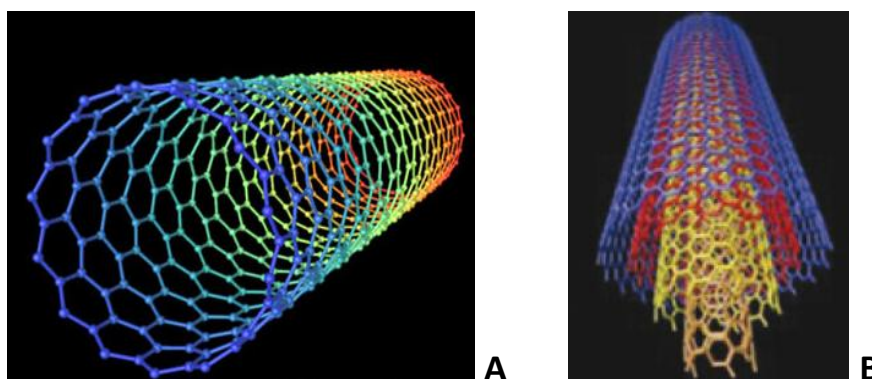


Figura 9: struttura di un nanotubo di carbonio: A) SWCNT e B) MWCNT.

I nanotubi di carbonio possiedono notevoli proprietà meccaniche ed elettriche e sono efficienti conduttori di calore, caratteristiche che li rendono molto utilizzati nel campo dell'elettronica. Inoltre i CNTs mostrano una sensibilità elevatissima nella rilevazione molecolare, in quanto il loro legame superficiale con altre molecole determina una perturbazione nelle proprietà elettriche dei nanotubi che può essere misurata sperimentalmente (Mazzola, 2003).

2.2.6 NANOPARTICELLE POLIMERICHE

Le nanoparticelle polimeriche sono particelle colloidali solide che possono essere preparate con polimeri naturali (eparina, destrano, collagene, chitosano) o polimeri sintetici

(polietilenglicole, acido poliglutamico, acido polilattico). Hanno struttura sferica e dimensioni variabili tra 10 e 100 nm e in base al metodo di sintesi possono essere distinte in:

- nanosfere, costituite da una matrice porosa polimerica che è in grado di intrappolare al suo interno e sulla superficie molecole di farmaco per il *drug delivery*;
- nanocapsule, ovvero sistemi vescicolari nei quali la molecola da trasportare è confinata nella cavità circondata dalla membrana polimerica con un modello simile ai liposomi (Singh et al., 2009).

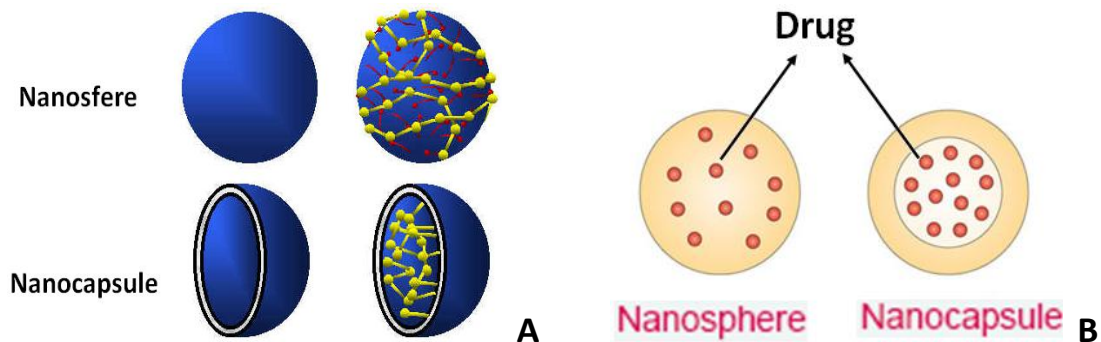


Figura 10: (A) rappresentazione schematica di nanosfere e nanocapsule. (B) utilizzo di nanosfere e nanocapsule per il *drug delivery*: il farmaco è fisicamente e uniformemente disperso nella matrice (nanosfere) o è incorporato all'interno del *core* (nanocapsule).

Le nanoparticelle polimeriche hanno ricevuto notevoli attenzioni in campo biomedico per la loro stabilità, biocompatibilità, biodegradabilità e per la loro facilità di funzionalizzazione (Tong et al., 2007). Inoltre, in base al metodo di preparazione, si possono controllare le caratteristiche di rilascio del farmaco (Panyam et al., 2003).

2.2.7 NANOPARTICELLE METALLICHE E CERAMICHE

Nell'ultimo decennio le nanoparticelle hanno avuto un importante sviluppo e le loro caratteristiche le rendono particolarmente utili in diversi settori che spaziano da quello elettronico, aerospaziale, tessile, energetico, automobilistico, informatico, alimentare, cosmetico fino ad arrivare a quello biomedico e diagnostico (vedi paragrafo 2.1.1). Le loro proprietà fisico-chimiche sono dipendenti anche dal materiale di cui esse sono composte.

Le **nanoparticelle metalliche** sono generalmente costituite da un *core* di materiale inorganico rivestito da polimeri come il destrano, che hanno la funzione di inibire l'aggregazione e rafforzarne la stabilità.

Un esempio di nanoparticelle metalliche sono quelle di *ossido di ferro* (Figura 11), che hanno dimensioni variabili da 15 a 60 nm, e che vengono molto utilizzate in campo biomedico per

riconoscere particolari target molecolari (Gupta et al., 2005). In combinazione con le tecniche di MRI (Magnetic Risonance Imaging), le nanoparticelle paramagnetiche di ossido di ferro vengono utilizzate per l'*imaging* e sono già sfruttate *in vivo* in modelli murini per diagnosticare metastasi di linfonodi in tumori prostatici e per visualizzare placche aterosclerotiche (Weissleder et al., 1990).

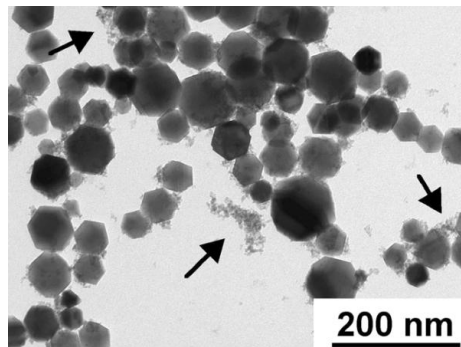


Figura 11: nanoparticelle di ossido di ferro di due dimensioni: con diametro fino a 45 nm e struttura cristallina ben definita e regolare, oppure piccole e amorfe (indicate dalle frecce) con diametro di 3-8 nm.

Di largo impiego sono le *nanoparticelle d'oro*: sono anch'esse nanostutture metalliche, di forma sferica, con un *core* dielettrico e un rivestimento costituito da un sottile guscio d'oro (Figura 12-A). Queste NP possiedono molte proprietà ottiche e chimiche sfruttate nell'*imaging* in campo biomedico (Huang et al., 2007) e in altre applicazioni di tipo terapeutico (Thomas et al., 2003), come ad esempio lo sviluppo di vaccini a DNA (Figura 12-B). Nonostante sembri che l'oro sia inerte negli ambienti fisiologici, la tossicità a lungo termine di questo tipo di nanoparticelle rimane una questione ancora irrisolta.

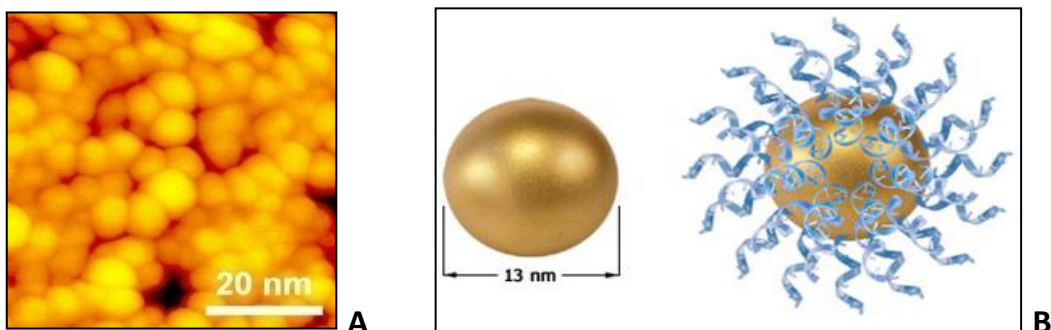


Figura 12: (A) immagine di NP d'oro di 5 nm ottenuta con un microscopio a scansione. (B) struttura di una NP d'oro singola e coniugata con frammenti di DNA usata nei vaccini a DNA.

Un altro esempio di nanoparticelle metalliche sono le *nanoparticelle d'argento*, che possiedono proprietà antimicrobiche: gli ioni d'argento altamente reattivi rilasciati all'interno di batteri sono infatti in grado di indurre cambiamenti conformazionali alla parete e sulla membrana batterica provocandone la morte (Rai et al., 2009) (vedi paragrafo 2.1.1).

Le *nanoparticelle ceramiche* sono nanostrutture inorganiche con superficie porosa, composte da sostanze biocompatibili ma non biodegradabili, tra cui le più diffuse sono la silice, il titanio e l'alluminio (Figura 13).

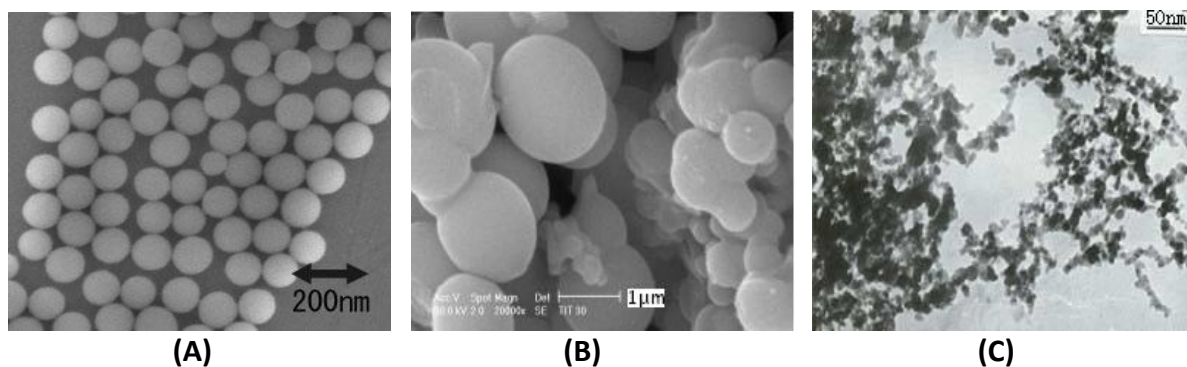


Figura 13: nanoparticelle ceramiche: (A) di silice, (B) di titanio e (C) di alluminio.

Rispetto alle particelle polimeriche presentano numerosi vantaggi tra cui la semplicità di sintesi, la stabilità e la possibilità di essere sintetizzate con dimensione, forma e porosità desiderate, a seconda dell'utilizzo per cui vengono progettate (Roy et al., 2003). In studi recenti sono state usate per veicolare farmaci nelle terapie tumorali, modificando la loro superficie con diversi gruppi funzionali, anticorpi monoclonali o altri ligandi per indirizzarle al sito desiderato.

Le *nanoparticelle di biossido di titanio* (TiO_2) vengono usate efficacemente nell'industria cosmetica per la creazione di creme solari protettive: questo nanomateriale è infatti in grado di assorbire efficacemente i raggi ultravioletti del sole (Nohynek et al., 2008; Newman et al., 2009). Questa proprietà è stata recentemente sfruttata anche per proteggere la plastica dalle lacerazioni, dallo scolorimento e da altri tipi di danni causati dal sole: fra le potenziali applicazioni si possono citare gli articoli sportivi, i mobili da esterno, i rivestimenti in plastica, per proteggere le piante nelle serre, ed i tessuti. Questo tipo di NP possiede infine proprietà fotocatalitiche che ne permettono l'impiego come disinfettanti ambientali e di acque contaminate.

Le *nanoparticelle di silice* sono nanosfere composte da un reticolo amorfo di silicio e ossigeno con un diametro compreso tra 5 e 500 nm (Figura 14).

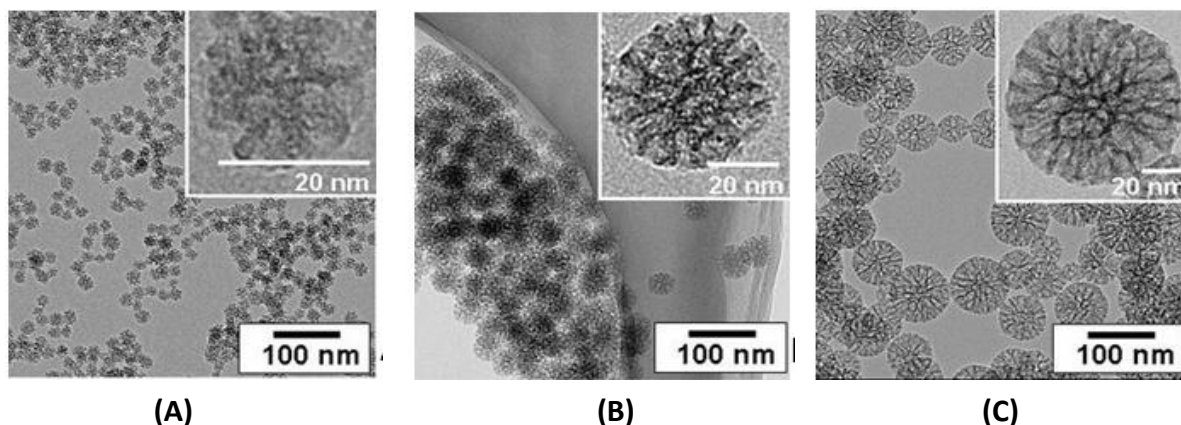


Figura 14: immagini al microscopio TEM di nanoparticelle di silice del diametro di 20 nm (A), 45 nm (B) e 80 nm (C).

Queste particelle di silice sferiche vengono sintetizzate solitamente tramite una reazione di idrolisi e condensazione di tetraalcoossilani in miscele di etanolo, acqua e ammoniaca (Figura 15). Questa procedura venne utilizzata per la prima volta da Kolbe nel 1956, ma fu solo nel 1968 che Stöber sviluppò un sistema di reazioni chimiche che controllassero la crescita delle particelle sferiche variando alcuni parametri di reazione (Tabatabaei et al., 2006), come la concentrazione iniziale di ammoniaca, acqua e tetraalcoossilano, la temperatura di reazione che è proporzionale al diametro della NP, l'aggiunta di sali, che porta alla formazione di NP più grandi, e l'uso di additivi che causano un effetto sulla stabilità delle NP.

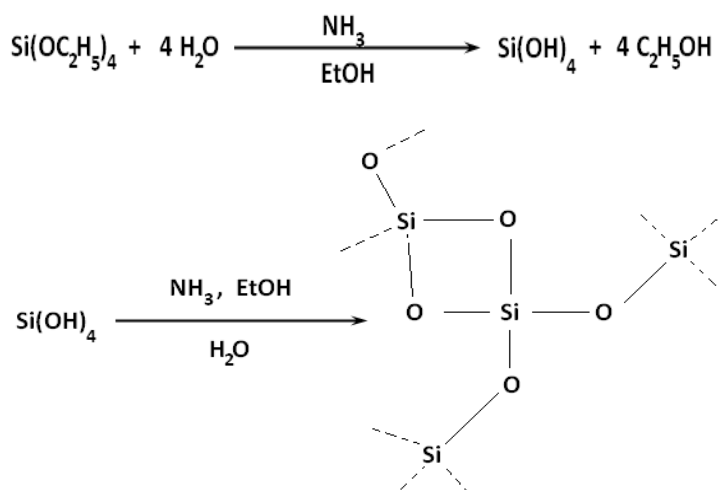


Figura 15: schema di reazione della sintesi di Stöber per la sintesi di nanoparticelle di silice.

Il diametro delle particelle dipende anche dalla tipologia dei reagenti adoperati e dai loro rapporti stechiometrici (Figura 16).

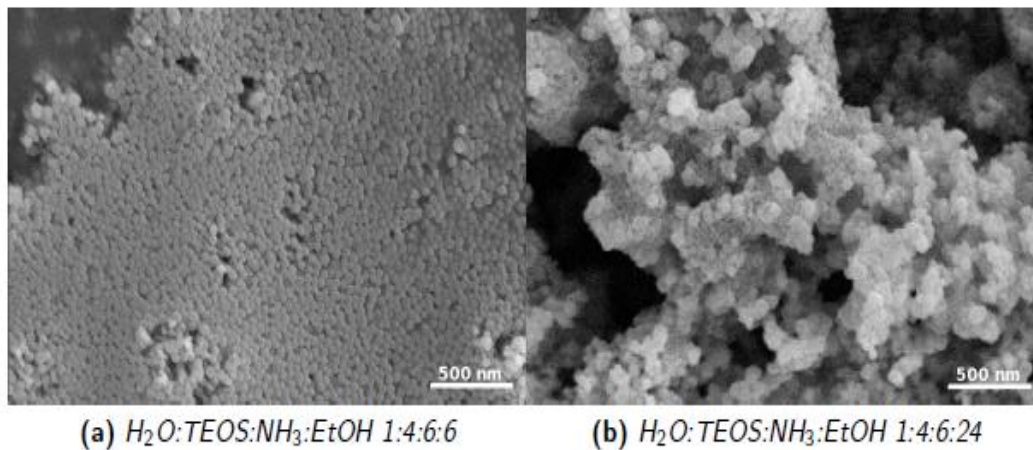


Figura 16: immagini al microscopio elettronico a scansione di nanoparticelle di silice ottenute tramite differenti rapporti di solventi (Tabatabaei et al, 2006).

Grazie alla loro estrema stabilità e semplicità di modificazione strutturale, le NP di silice hanno trovato impiego in diverse applicazioni come additivi di detersivi, cosmetici, alimenti e vernici: ad esempio sono utilizzate per la produzione di creme solari grazie alla loro capacità di assorbire i raggi UV e di emettere a lunghezze d'onda della luce visibile rimanendo inalterate, oppure sono usate dall'industria alimentare per rimuovere proteine indesiderate (Lundqvist et al., 2004), fenoli e tannini, o per ridurre il sedimento e per chiarificare bevande come succhi di frutta, vino e birra.

Vista l'estrema stabilità, biocompatibilità e semplicità di modificazione strutturale, negli ultimi anni, l'uso delle NP di SiO_2 è stato esteso anche all'ambito biomedico e biotecnologico come biosensori, biomarcatori e carrier per farmaci e DNA grazie all'utilizzo di NP mesoporose che offrono un'elevata superficie per l'assorbimento e il trasporto di farmaci e proteine (Hudson et al., 2008). Questo tipo di nanomateriale viene recentemente utilizzato nella terapia antitumorale, coniugando alla superficie delle nanoparticelle rivestimenti di biopolimeri e anticorpi per il riconoscimento di target cellulari specifici (Salata, 2004).

Nel laboratorio dove ho svolto il mio progetto di Dottorato di Ricerca stiamo studiando la possibilità di sfruttare nanoparticelle di silice organicamente modificata (ORMOSIL NP, ORganically MODified SILica nanoparticles, sintetizzate presso il Dipartimento di Scienze Chimiche, Università di Padova) come nanosistemi per la veicolazione della *meta*-tetra(idrossifenil)clorina (mTHPC, nome commerciale Foscan[®], fornita dalla Biolitec), un fotosensibilizzatore idrofobico di seconda generazione con un'elevata attività antitumorale ed

approvato in Europa per il trattamento palliativo di tumori della testa e del collo in stadio avanzato, con lo scopo di migliorare la terapia fotodinamica (PDT) dei tumori, evitando così alcuni dei possibili svantaggi associati ai convenzionali metodi di veicolazione dei farmaci (Compagnin et al., 2009).

La silice (SiO_2) è quindi un materiale biocompatibile e abbastanza versatile in termini di modificazioni chimiche, tuttavia non è biodegradabile e per questa ragione tende ad accumularsi nell'organismo. Studi recenti sulla tossicità di particelle amorfe di silice dimostrano come la vitalità cellulare *in vitro* sia dose e dimensione dipendente. Particelle inferiori ai 20 nm di diametro inducono la morte cellulare più rapidamente (osservabile già dopo poche ore) e a concentrazioni inferiori rispetto a NP di dimensioni maggiori (Napierska et al., 2009).

2.3 NANOPARTICELLE COMMERCIALI DI SILICE LUDOX[®]

Per le enormi possibilità di impiego che caratterizzano le nanoparticelle di silice, molte ditte industriali ne prevedono la produzione e la commercializzazione. Tra queste si inserisce la ditta americana W. R. Grace & Co., che produce e distribuisce le nanoparticelle di silice Ludox[®] utilizzate nel mio lavoro (www.grace.com).

Tipologia	area superficiale [m ² /g]	pH stabilizzazione	densità @25 °C [g/ml]	concentrazione [% p/p]
AM-30	220	8.9	1.21	30
AS-30	230	9.1	1.21	30
AS-40	135	9.1	1.29	40
CL	230	4.5	1.23	30
CL-X	130	9.1	1.36	45
HS-30	220	9.8	1.21	30
HS-40	220	9.8	1.21	40
LS	220	9.8	1.30	40
SM-30	345	10.0	1.21	30
SK	230	4.0-7.0	-	25
TM-40	140	9.0	1.30	40
TM-50	140	9.0	1.40	50
TMA	140	4.0-7.0	1.30	34

Tabella 4: principali tipologie di nanoparticelle Ludox[®] e alcune loro caratteristiche (www.grace.com; www.sigma-aldrich.com).

Le NP Ludox[®] sono particelle sferiche, non porose, composte da ossido di silicio amorfo e commercializzate come sospensioni monodisperse colloidali in una fase acquosa stabilizzata elettrostaticamente. Ne esistono svariati tipi che si differenziano per densità, area superficiale e pH di stabilizzazione, i principali sono riportati nella tabella 4. Le formulazioni usate in questo lavoro sono le nanoparticelle AS-30 e SM-30.

Le dimensioni delle NP Ludox[®] variano dai 5 ai 100 nm di diametro, in particolare le NP SM30 e AS30 hanno un diametro di circa 7 e 20 nm rispettivamente (vedi paragrafo 5.1).

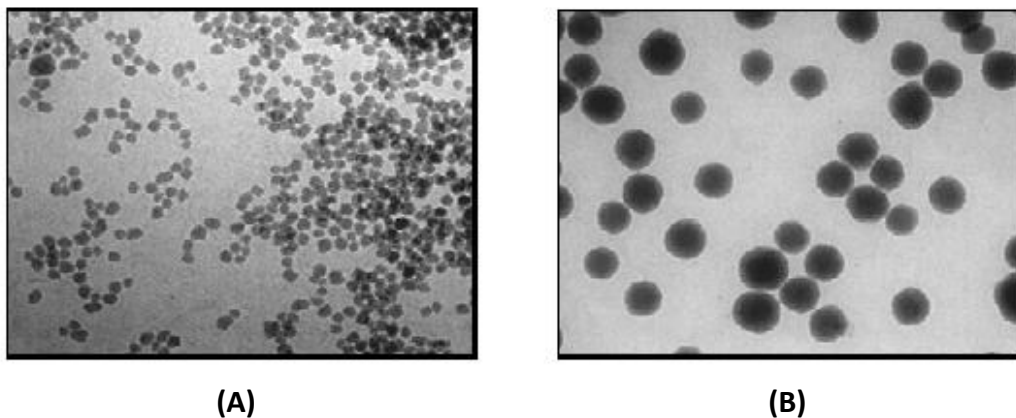


Figura 17: immagini al microscopio elettronico a trasmissione di sospensioni di nanoparticelle di silice di 7 nm (A) e 20 nm (B).

Queste NP presentano una carica negativa, sono stabilizzate da un controione in soluzione basica e vengono conservate a temperatura ambiente, dopo un processo multifase di sintesi e un passaggio di evaporazione per concentrare la soluzione risultante (% p/p). Quest'ultimo step è però dipendente dalle dimensioni delle NP, poichè il processo di evaporazione può conferire proprietà gelatinose alla soluzione, in maniera proporzionale al diametro delle NP.

I settori in cui queste nanoparticelle sono sfruttate sono svariati, dal campo tessile a quello dell'igiene, dal settore manifatturiero a quello alimentare. Qui di seguito riporto alcuni esempi di utilizzo in prodotti di uso comune o in diversi campi industriali:

- nel settore dell'industria refrattaria, le NP Ludox[®] SK vengono impiegate per legare materiali granulari e fibrosi di natura ceramica e cementizia; le NP sono combinate con ceramiche e ossidi per creare stampi necessari alla fabbricazione di componenti metallici ad alta precisione, essendo in grado di conferire compattezza e possedendo un basso coefficiente di espansione termica;
- nell'industria dei materiali le Ludox[®] trovano impiego come sigillanti di superfici di materiali porosi quali legno, cemento e lattice, oppure conferiscono proprietà anticorrosive;

- le NP Ludox[®] HS e AS sono principalmente utilizzate per legare componenti catalitici inorganici ed aumentarne l'efficienza: grazie alla loro ampia area superficiale sono ottimi substrati reattivi al legame con catalizzatori ma inerti nel processo produttivo;
- nella produzione di inchiostri per la stampa e vernici, le NP Ludox[®] sono utilizzate per migliorare l'assorbimento al substrato e donare opacità o brillantezza ai colori;
- queste NP trovano impiego anche come additivi ad agenti pulenti, detergenti lucidanti e anti-scivolo;
- nell'industria tessile alcune formulazioni aumentano la resistenza dei tessuti e riducono lo slittamento della fibra durante la lavorazione: la concentrazione ottimale di NP dipende dal tipo di tessuto e dall'effetto che si vuole ottenere; di solito la percentuale è dello 0,1-2% rispetto al peso secco dei tessuti;
- nell'industria edile vengono combinate con fibre di alluminio all'interno del cemento, conferendo enormi capacità di resistenza alle alte temperature e prevenendo la formazione delle crepe;
- nel settore alimentare vengono utilizzate da più di cinquant'anni nella produzione del vino, rimuovendo tannini e fenoli, nella produzione della birra per i processi di chiarificazione, e in quella dei succhi di frutta per ridurre la torbidità ed eliminare il gusto amaro. In questi processi le bevande vengono trattate con una combinazione di nanoparticelle di silice colloidale e gelatina. Le tipologie di NP Ludox[®] prevalentemente usate in questo campo sono quattro: SM-30, HS-30, T-40 e X-30.

2.4 VIE DI ASSORBIMENTO

Il corpo umano può venire a contatto con i nanomateriali di origine sintetica soprattutto mediante tre vie principali: l'inalazione attraverso le vie respiratorie, l'ingestione attraverso il tratto gastrointestinale e l'assorbimento attraverso la via cutanea (Oberdöster et al., 2005). Inoltre, nel caso di nanostrutture utilizzate per il *drug delivery* in campo biomedico, un'altra via coinvolta è l'iniezione diretta nel circolo sanguigno. Parametri quali la dimensione, la composizione chimica, la struttura superficiale, la solubilità, la forma e lo stato di aggregazione possono modificare l'assorbimento e la traslocazione delle nanoparticelle dal punto di entrata fino al sito target all'interno del corpo umano (Nel et al., 2006).

Le nanostrutture, una volta inalate, ingerite o somministrate topicamente possono giungere fino alla circolazione sanguigna ed essere quindi trasportate ed accumulate a livello di vari organi. Studi condotti *in vivo* su animali hanno messo in rilievo che le nanoparticelle possono

localizzarsi a livello della circolazione sanguigna e del sistema nervoso centrale (SNC), inducendo reazioni infiammatorie a livello polmonare e problemi a livello cardiocircolatorio (Dailey et al., 2006), oltre ad accumularsi in vari organi quali fegato, milza, linfonodi e midollo osseo (Singh et al., 2007).

Qui di seguito sono descritte le principali vie di assorbimento aspecifiche in cui vengono coinvolte le nanoparticelle di uso commerciale, tra cui sono incluse le NP Ludox[®] usate in questo lavoro.

2.4.1 ASSORBIMENTO PER VIA RESPIRATORIA

Una delle principali vie attraverso cui volontariamente o accidentalmente entriamo in contatto con nanostrutture è rappresentata dai polmoni. L'efficienza di deposizione delle nanoparticelle inalate dipende principalmente dal loro diametro e dalle caratteristiche aerodinamiche: infatti dimensioni e forma sono importanti per determinare quale compartimento del sistema respiratorio risulterà prevalentemente esposto tra le vie aeree superiori, le vie aeree inferiori o gli alveoli. Le particelle, in generale, si depositano efficientemente nell'intero tratto respiratorio, dalla cavità nasale agli alveoli, tramite meccanismi diffusionali (Geiser et al., 2007): le nanoparticelle di piccole dimensioni hanno la possibilità di procedere più profondamente nell'albero respiratorio, di depositarsi e di essere assorbite dall'epitelio polmonare entrando in circolo, mentre quelle di diametro superiore vengono fermate più facilmente a livello della cavità respiratoria superiore ed espulse tramite meccanismi di clearance muco-ciliare (Nel et al., 2006) (Figura 18).

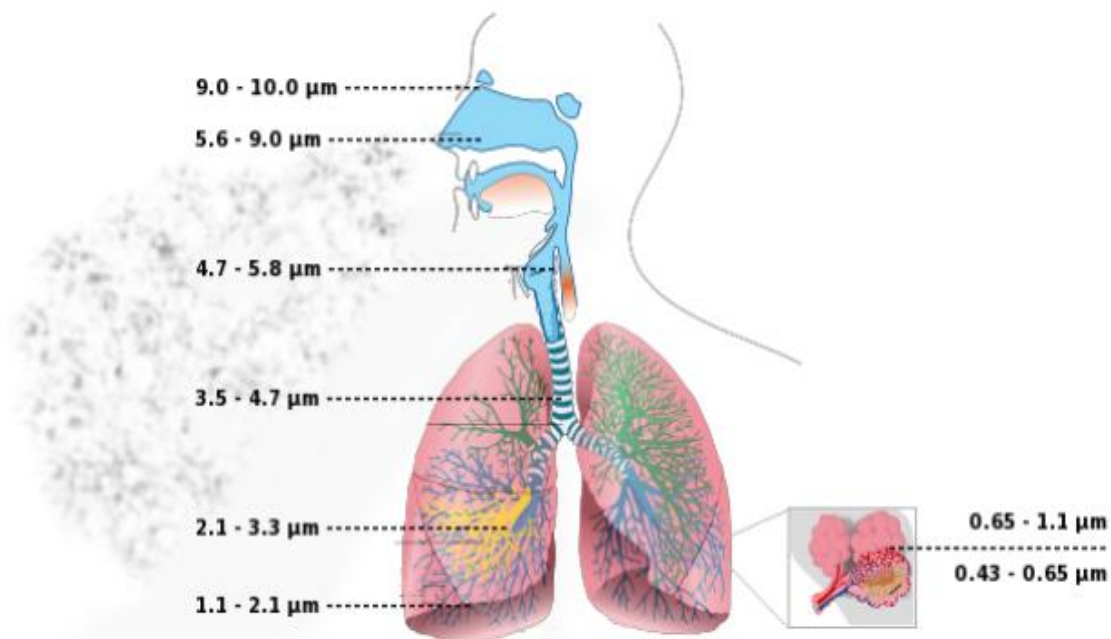


Figura 18: schema della deposizione di particelle sottili a livello dell'apparato respiratorio umano in base alla loro dimensione (immagine adattata da www.nanodiagnosics.it).

La clearance polmonare dipende non solo dalla massa totale di nanoparticelle inalate ma anche dalla loro dimensione e dall'area superficiale (Oberdöster et al., 1994). Il trasporto muco-ciliare è fondamentale per la clearance delle vie respiratorie superiori, mentre a livello alveolare le nanoparticelle traslocano tramite trans-citosi attraverso l'epitelio del tratto respiratorio raggiungendo l'interstizio polmonare, dove in seguito possono essere fagocitate da macrofagi alveolari oppure entrare nel circolo sanguigno direttamente o tramite via linfatica (Hoet et al., 2004).

Recentemente, alcuni studi hanno dimostrato che è possibile la traslocazione di NP inalate a siti extrapolmonari, come il sistema circolatorio, il cuore, il fegato e il cervello (Gwinn et al., 2006), anche se il meccanismo attraverso cui avviene la traslocazione non è stato del tutto chiarito.

2.4.2 ASSORBIMENTO GASTRO-INTESTINALE

Le nanoparticelle e le microparticelle (dai 100 ai 3000 nm) sono ingerite in quantitativi stimati tra 10^{12} e 10^{14} particelle al giorno per persona (stime eseguite in UK): principalmente si tratta di NP espulse dal tratto respiratorio tramite clearance muco-ciliare oppure di NP ingerite direttamente nel tratto gastro-intestinale, essendo esse presenti, come i silicati e le NP di biossido di titanio (TiO_2), in prodotti alimentari, nell'acqua, o in cosmetici, dentifrici, vernici e farmaci (Lomer et al., 2002; Oberdöster et al., 2005).

Una volta ingerite, le nanoparticelle vengono veicolate allo stomaco e sottoposte ai normali processi digestivi, che possono essere in grado di attaccarle: recentemente è stato dimostrato che NP di rame di 23,5 nm vengono degradate *in vivo* a livello dello stomaco di ratto originando rame in forma ionica (Chen et al., 2006). Nel tratto enterico, la cinetica di assorbimento è complessa e può avvenire per diffusione attraverso lo strato di muco, per contatto con gli enterociti, o per traslocazione: minore è il diametro delle nanoparticelle e più veloce sarà il processo complessivo di assorbimento (Jani et al., 1990). Se le NP resistono alla digestione gastrica, possono traslocare dal lume del tratto intestinale attraverso le cellule-M delle placche del Peyer (Hussain et al., 2001) e, una volta raggiunto il tessuto sub-mucosale, possono raggiungere sia i follicoli linfatici, inducendo così una risposta immunitaria, sia i capillari, arrivando in questo modo a diversi organi periferici (Hoet et al., 2004).

La traslocazione delle particelle ingerite dal lume intestinale al sangue e al circolo sistemico può essere influenzata da proprietà chimico-fisiche delle NP come dimensione, forma, composizione e carica: studi sia sul ratto che sull'uomo hanno dimostrato che particelle di TiO_2 di dimensione 150-500 nm, una volta ingerite, possono traslocare al circolo sistemico e accumularsi a livello di fegato e milza (Jani et al., 1994), mentre evidenze sperimentali permettono di affermare che particelle di dimensioni anche superiori possono essere assorbite con meccanismi di "persorption" all'interno di vacuoli e attraversare così l'epitelio intestinale

per localizzarsi a livello di fegato e altri organi (Hagens et al., 2007). Le evidenze di assorbimento non sono però univoche, in quanto altri studi mostrano che nanoparticelle metalliche ultrafini, una volta ingerite, non sono traslocate in maniera significativa al circolo sistemico e da qui agli altri organi (Geiser et al., 2005).

2.4.3 ASSORBIMENTO CUTANEO

Le possibilità di trasporto delle nanoparticelle attraverso la cute indenne sono tuttora controverse, soprattutto per particelle di dimensioni superiori a 1 μm , mentre si hanno numerose evidenze sperimentali sulla possibilità di trasporto trans-dermico in caso di cute lesionata, in maniera dipendente da alcune variabili fisiche come forma delle NP, dimensione e carica superficiale.

Alcuni studi hanno dimostrato ad esempio la penetrazione di NP di TiO_2 dalle creme solari attraverso lo stato corneo e l'orifizio dei follicoli piliferi (Gwinn et al., 2006), e il superamento della barriera dell'epidermide da parte di NP molto piccole, come alcuni quantum dots di circa 7 nm di diametro (Ryman-Rasmussen et al., 2006): una volta raggiunto il derma le nanoparticelle possono raggiungere i vasi linfatici, trasportate dai macrofagi e dalle cellule dendritiche, e dal circolo linfatico si suppone che queste nanostrutture possano accedere al circolo sanguigno ed essere distribuite a tutto il corpo (Gwinn et al., 2006).

2.5 UPTAKE E DESTINO INTRACELLULARE DELLE NP

In letteratura sono disponibili ancora poche informazioni sui meccanismi coinvolti nell'uptake delle NP da parte delle cellule, tuttavia sembra che il meccanismo d'internalizzazione e quindi il destino intracellulare di un nanosistema sia influenzato da numerosi fattori:

- dalle proprietà chimico-fisiche del materiale con il quale esso è costruito (composizione chimica, dimensioni, forma e geometria, carica superficiale, stato di aggregazione, rivestimento superficiale) (Chithrani et al., 2007);
- dalle condizioni sperimentali adottate dagli esperimenti *in vitro*;
- dalle caratteristiche delle cellule utilizzate e quindi soprattutto dalla linea cellulare e dallo stato di differenziazione.

In particolar modo, le caratteristiche superficiali delle nanoparticelle risultano un fattore cruciale, poichè, oltre a determinare la biocompatibilità, giocano un ruolo fondamentale nell'adesione cellulare (Gupta et al., 2005). Si è dimostrato che l'adesione tra cellule, matrice extracellulare e particelle è regolata soprattutto dalle integrine, una famiglia proteica di recettori coinvolti nell'adesione superficiale. La matrice citoscheletrica interagisce non solo con le integrine ma anche con proteine responsabili dei processi di internalizzazione cellulare, tra cui soprattutto l'endocitosi, che è il principale meccanismo d'ingresso delle NP.

In generale, una sostanza può entrare all'interno della cellula attraverso diffusione semplice o attraverso processi endocitici quali fagocitosi, macropinocitosi, endocitosi mediata da clatrina e endocitosi mediata da caveole.

La **diffusione semplice** è l'unico dei processi sovraelencati che non richiede energia, ma sfrutta semplicemente la presenza di un gradiente di concentrazione: solitamente sfruttano questo processo solo molecole di dimensioni molto ridotte e apolari, che diffondono attraverso il doppio strato fosfolipidico.

Con il termine **endocitosi** si indica invece l'internalizzazione da parte di una cellula di macromolecole e soluti all'interno di vescicole membranose originatesi dall'invaginazione della membrana plasmatica (Figura 19).

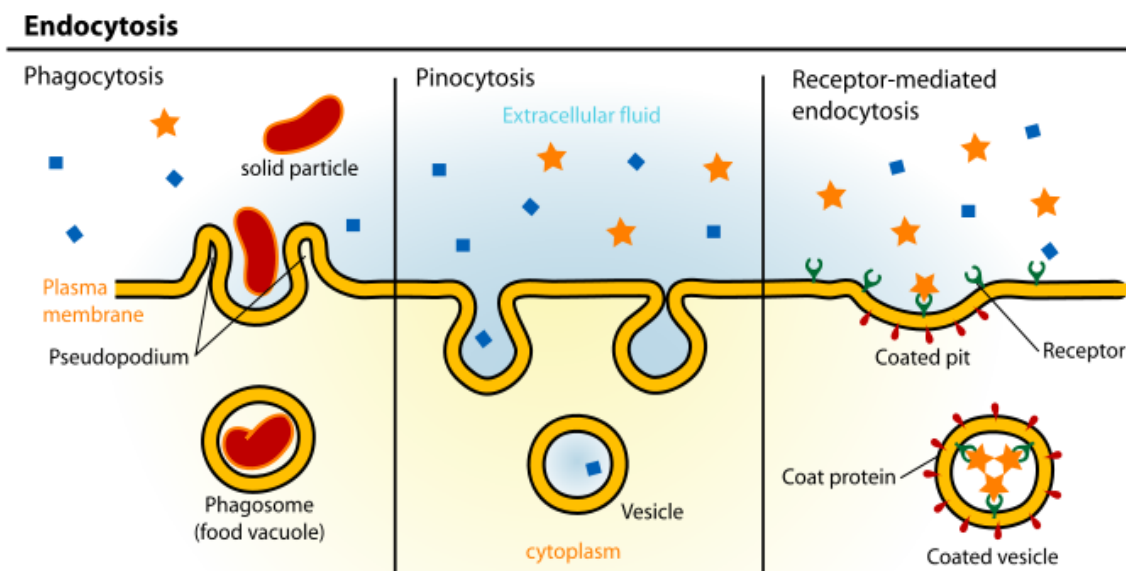


Figura 19: schema dei diversi tipi di endocitosi.

La *fagocitosi* è possibile solo per alcuni tipi cellulari specializzati detti fagociti, quali i macrofagi, i monociti e i neutrofilo, che sono in grado di rimuovere materiale di dimensioni anche maggiori di $0,5 \mu\text{m}$ (batteri, lieviti e detriti), attraverso un'interazione specifica tra i recettori della cellula fagocitica e i ligandi sulla superficie della particella, che porta a una conseguente invaginazione della membrana, favorita dalla proteina actina, e alla formazione di vescicole (i fagosomi) contenenti il materiale da eliminare.

La *macropinocitosi* consiste nella formazione di vescicole (i macropinosomi) di grandi dimensioni e di forma irregolare, generati anch'essi da un'invaginazione actina-dipendente della membrana plasmatica (Swanson et al., 1995). Il destino intracellulare dei

macropinosomi è fortemente dipendente dal grado di specializzazione della cellula: nei macrofagi, ad esempio, si fondono con i lisosomi, mentre in altri tipi cellulari costituiscono una popolazione di vescicole distinte che non interagiscono con i compartimenti endocitici, ma che promuovono il riciclo del contenuto verso la membrana plasmatica.

L'*endocitosi mediata da clatrina* (CME) è il percorso endocitico più frequente e viene normalmente utilizzato dalla cellula per il continuo apporto di nutrienti, antigeni e fattori di crescita (Takei et al., 2001). La CME è un tipo di endocitosi mediata da recettori: la fase iniziale consiste nel riconoscimento, da parte della cellula, della sostanza da internalizzare tramite l'interazione con specifici recettori di membrana. La porzione citoplasmatica del recettore legato al suo ligando ha un'elevata affinità per la clatrina, una proteina citoplasmatica. Quando sulla membrana plasmatica si trova un numero sufficiente di recettori legati al ligando specifico e alla clatrina, questi tendono ad unirsi in un'unica regione per diffusione laterale: le molecole di clatrina formano così, legandosi tra loro, una sorta di rete che induce una flessione localizzata della membrana, formando la cosiddetta coated pit (fossetta rivestita). Questa si approfondisce ulteriormente fino a chiudersi in se stessa, separandosi dalla membrana cellulare e formando una vera e propria vescicola rivestita. Queste vescicole si spostano verso le regioni più interne del citoplasma e ad un certo punto della loro progressione perdono il rivestimento clatrinico: la clatrina disassemblata viene riciclata, le vescicole nude si fondono tra loro dando luogo agli endosomi, all'interno dei quali il basso valore di pH favorisce la dissociazione tra i ligandi e i recettori, e infine il materiale endocitato può essere accumulato all'interno della cellula, oppure andare incontro a degradazione lisosomiale o a transitosi.

L'*endocitosi mediata da caveole* è attiva soltanto in alcuni tipi di cellule, soprattutto endoteliali, muscolari e adipose. Le caveole prendono il nome dalla proteina che le origina, la caveolina, e consistono in piccole invaginazioni della membrana plasmatica ricche in glicosfingolipidi e colesterolo, e associate a particolari tipi di molecole, quali ad esempio proteine segnale (Shin et al., 2007). L'*endocitosi mediata da caveole* è una via di internalizzazione definita non-acida e non-digestiva, in quanto nelle caveole non si va incontro ad acidificazione del contenuto e in quanto non si ha la fusione delle vescicole con i lisosomi: il materiale endocitato può essere trasferito direttamente nell'apparato del Golgi o nel reticolo endoplasmatico.

Gli esempi presenti in letteratura riguardo all'uptake delle nanostrutture mostrano come la cellula riesca ad utilizzare contemporaneamente anche più meccanismi diversi e come le caratteristiche delle nanostrutture influiscano notevolmente sul loro destino intracellulare. Oltre alle caratteristiche superficiali, che hanno un ruolo fondamentale nell'adesione cellulare, la carica superficiale è un'altra proprietà fondamentale nel determinare l'uptake cellulare delle nanoparticelle: la membrana plasmatica presenta infatti una carica netta negativa per la

presenza della fosfatidilserina nel foglietto interno ed inoltre la distribuzione degli ioni a cavallo della stessa membrana cellulare determina una polarizzazione positiva verso l'ambiente esterno. Le nanoparticelle anioniche sono quindi endocitate in quantità minore rispetto a quelle cationiche. L'influenza della presenza di cariche sulla superficie delle NP è stata comprovata anche da Roser (Roser et al., 1998), che ha dimostrato sperimentalmente come l'internalizzazione di NP, rivestite di albumina e caricate positivamente, da parte di monociti e macrofagi, risulta maggiore rispetto a quella del medesimo tipo di particelle ma prive di carica. In un'altra pubblicazione invece (Foged et al., 2005) è stato dimostrato come non ci sia un aumento dell'efficienza di internalizzazione da parte di cellule dendritiche di nanoparticelle in polistirene caricate positivamente. L'evidente contraddizione presentata dai due diversi lavori supporta la tesi che non esistono regole fisse per i meccanismi utilizzati per l'uptake delle NP, ma semplicemente esiste una forte dipendenza dalle caratteristiche chimico-fisiche dei materiali e dal tipo di sistema cellulare utilizzato per gli esperimenti *in vitro*. Ad esempio si è osservato come, a seconda del tipo cellulare con cui entrano in contatto le NP, vari la loro capacità di penetrare all'interno delle cellule: studi effettuati su macrofagi alveolari isolati da ratto dimostrano come NP di silice vengano rapidamente internalizzate grazie all'eccezionale capacità di tali cellule di fagocitare particelle esterne; al contrario, per le cellule di carcinoma polmonare umano (A549) la velocità di uptake risulta notevolmente inferiore (Jin et al., 2007). Inoltre queste cellule di origine polmonare possono essere coinvolte in meccanismi di internalizzazione diversi: tramite diffusione semplice nel caso di microsfele fluorescenti di polistirene (Geiser et al., 2005), oppure tramite endocitosi mediata da clatrina, ad esempio per NP magnetiche rivestite di silice (Kim et al., 2006) (Figura 20).

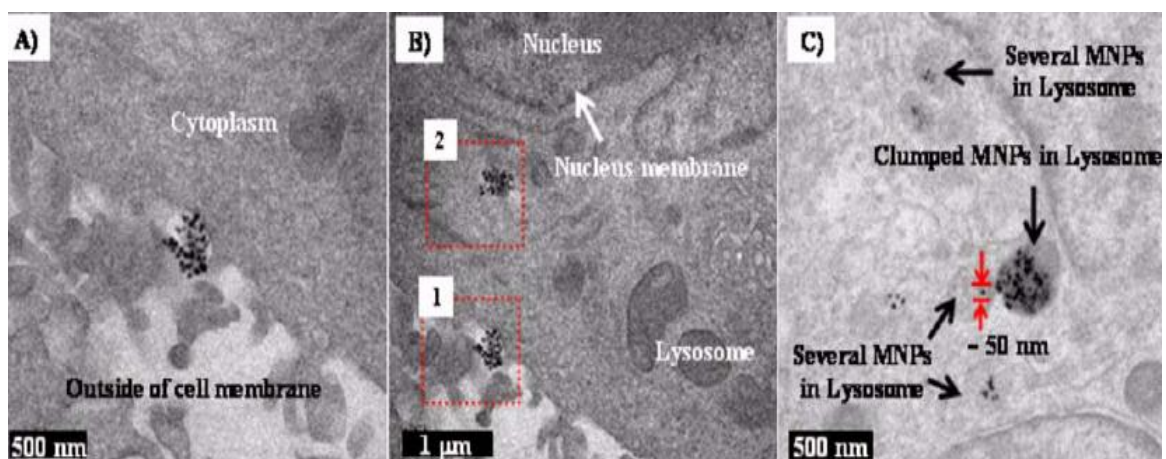


Figura 20: immagini ottenute al TEM dell'ingresso di NP magnetiche rivestite di silice in cellule umane polmonari A549. **A)** invaginazione della membrana plasmatica, **B)** ingresso nella cellula, **C)** localizzazione a livello dei lisosomi (Kim et al., 2006).

Numerosi lavori in letteratura si occupano dello studio di localizzazione di nanoparticelle marcate con un fluoroforo o caricate con una sostanza fluorescente, mediante l'acquisizione di immagini al microscopio: il lavoro pubblicato da Savic e colleghi dimostra come micelle di dimensioni nanometriche siano in grado di penetrare a livello di organelli citoplasmatici quali reticolo endoplasmatico (ER), Golgi, lisosomi e mitocondri, ma non a livello del nucleo (Savic et al., 2003). Anche lo studio di localizzazione effettuato presso il mio laboratorio su NP di silice ORMOSIL (Compagnin et al., 2009) ha permesso di concludere che la distribuzione in cellule di carcinoma gastroesofageo umane (KYSE-510) avviene prevalentemente a livello del Golgi e del reticolo endoplasmatico (Figura 22).

In un altro lavoro, invece, per vedere se le NP sono effettivamente in grado di raggiungere il nucleo, è stato effettuato un legame con polietilammine fluorescenti (PEI). Questo complesso PEI-NPs è in grado di attaccarsi a componenti della membrana cellulare ed entrare per endocitosi all'interno della cellula: qui si muove all'interno di vescicole verso il comparto nucleare, all'interno del quale viene infine rilasciato (Godbey et al., 1999). Per definire le dimensioni massime che una nanoparticella deve avere per penetrare all'interno del nucleo attraverso il complesso del poro nucleare (NPC, nuclear pore complex) sono state scelte nanoparticelle d'oro di dimensioni differenti (22, 26 e 36 nm). L'esperimento ha dimostrato che le NP più piccole sono in grado di entrare da sole nel nucleo (Figura 21-A e B), mentre quelle più grandi (fino a un massimo di circa 39 nm) penetrano nei pori nucleari mediante il complesso dell'importina (Figura 21-C) (Panté et al., 2002).

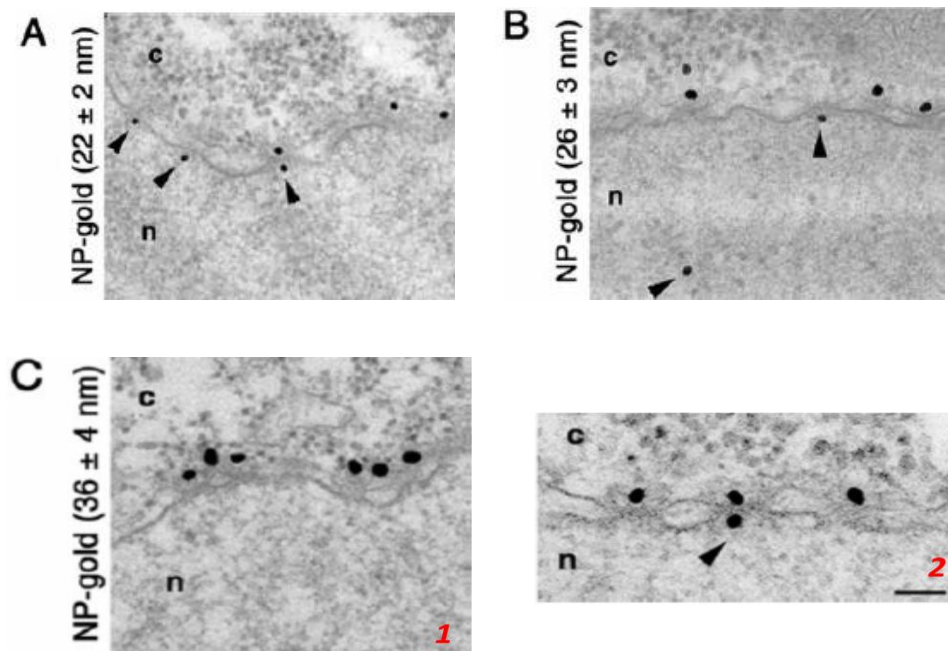


Figura 21: ingresso nucleare di NP d'oro del diametro di : **A)** 22 nm, **B)** 26 nm e **C)** 36 nm (mediante il complesso dell'importina, C-1 e C-2). n = nucleo, c = citoplasma.

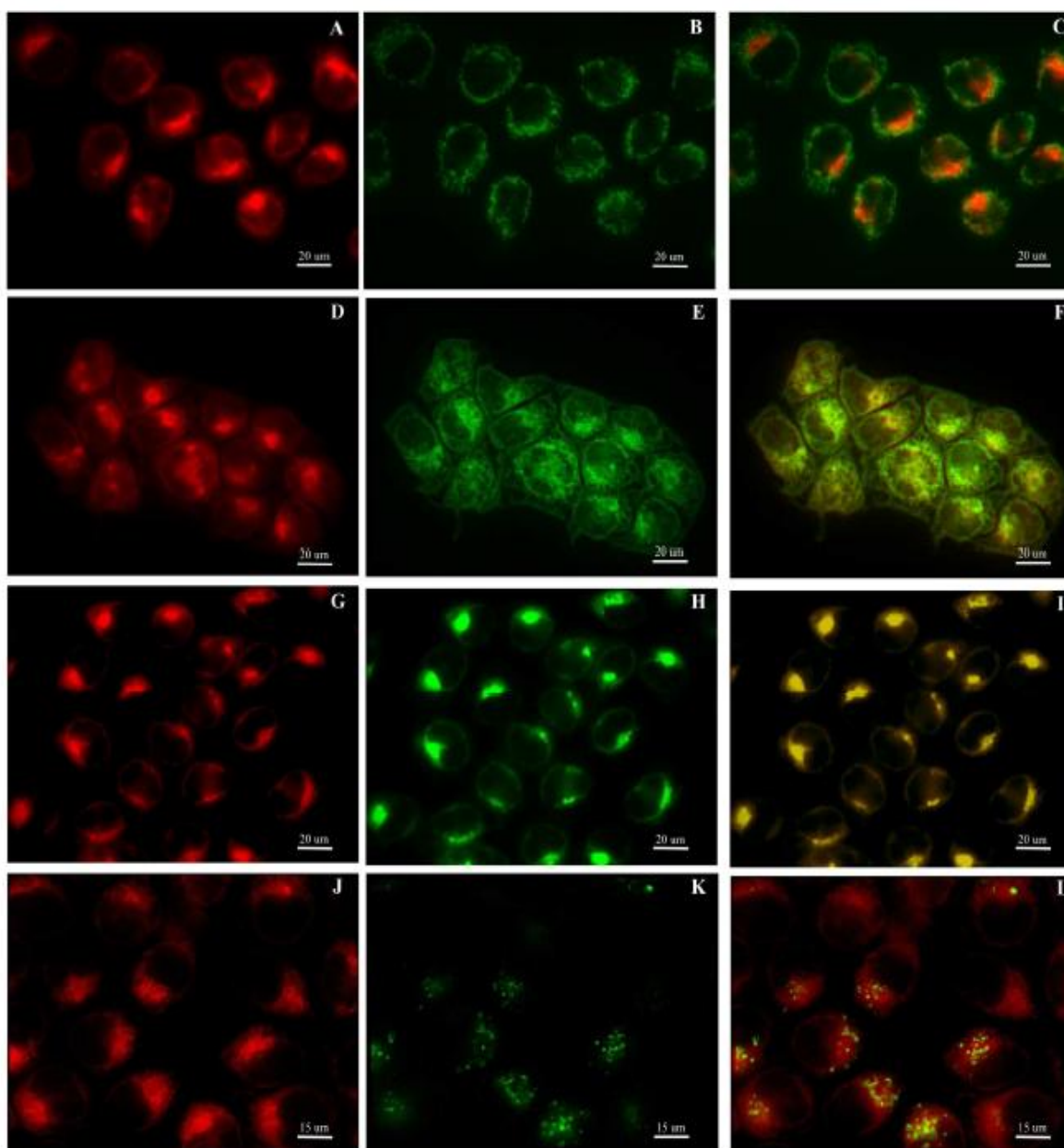


Figura 22: Localizzazione del fotosensibilizzatore mTHPC veicolato in NP ORMOSIL in cellule KYSE-510 trattate per 24 h. La fluorescenza rossa della mTHPC (A, D, G e J) colocalizza con la fluorescenza verde delle sonde ER-Tracker Green (E) e NBD C6-ceramide (H), usate rispettivamente per marcare il reticolo endoplasmatico e l'apparato del Golgi, mentre non colocalizza col LysoTracker Green (K) o Rodamina 123 (B), utilizzate per marcare rispettivamente i lisosomi ed i mitocondri. Le sovrapposizioni delle immagini delle fluorescenze mTHPC-sonde sono visibili in (C), (F), (I) e (L), dove il colore giallo indica la presenza di co-localizzazione tra la clorina e la sonda usata (Compagnin et al., 2009).

2.6 NANOTOSSICOLOGIA

L'esposizione umana a particolato nanostrutturato è oggetto di crescente attenzione in risposta al diffuso rilascio di nanoparticelle da sorgenti antropogeniche e al rapido sviluppo delle nanotecnologie (Figura 23).

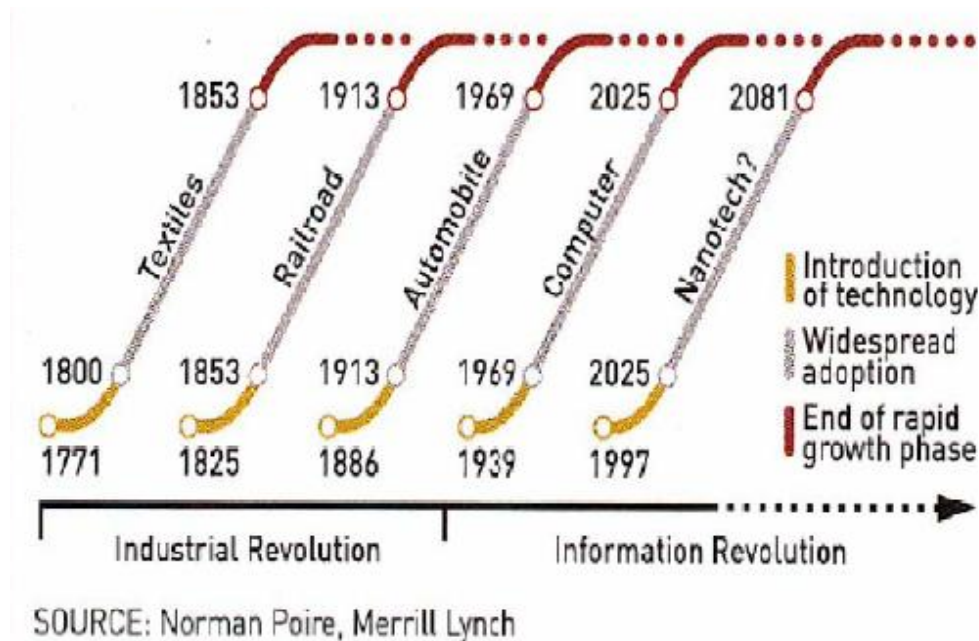


Figura 23: sviluppo delle nanotecnologie nel XXI secolo.

Molti studi hanno rivelato che le proprietà innovative uniche che rendono le nanostrutture così interessanti per l'industria e la biomedicina, come la loro piccola dimensione, l'estesa area superficiale, la composizione chimica, la solubilità e la geometria, possono contribuire al loro potenziale profilo tossicologico verso i sistemi biologici, l'organismo umano (consumatori, pazienti e lavoratori) e l'ambiente (Medina et al., 2007). Quindi, mentre da un lato le nanotecnologie si vanno straordinariamente sviluppando nella prospettiva degli attesi benefici, dall'altro si pone con maggiore insistenza il problema della loro sicurezza (Service, 2005). Dato che per le nanostrutture non sono più applicabili i convenzionali parametri della tossicologia tradizionale, è sorta una nuova disciplina, denominata nanotossicologia, che si occupa dello studio della sicurezza delle nanotecnologie ed ha lo scopo di determinare i rischi associati all'esposizione a nanomateriali, esplorare le vie di entrata delle nanostrutture nell'organismo umano ed indagare i meccanismi molecolari relativi alla tossicità. Nonostante le aree di applicazioni delle NP siano in continuo aumento (vedi paragrafo 2.1.1), la quantità di studi che caratterizzano la loro potenziale tossicità e gli effetti citotossici sono ancora

limitati: la mancanza di concordanza degli studi in letteratura è dovuta principalmente alla variabilità di linee cellulari, protocolli e materiali che sono impiegati. È necessario, quindi, standardizzare le varie condizioni sperimentali al fine di poter comparare gli studi condotti da differenti gruppi di ricerca (Lewinsky et al., 2008).

È in questo contesto che si inserisce questo progetto di ricerca finanziato da ECSIN (European Center for the Sustainable Impact of Nanotechnology), un centro internazionale di studi per la valutazione dell'impatto delle nanotecnologie sull'ambiente e sulla salute umana, e di valutazione degli aspetti etici e sociali riflessi. ECSIN intende creare i presupposti per essere favorevole all'innovazione invece di frenarla, fornendo un supporto scientifico e tecnico allo scopo di promuovere un più celere, sicuro e mirato sviluppo di nanomateriali, facilitare l'analisi del rischio e generare dati utili per gli organi normativi, promuovendo una più efficace articolazione tra definizione delle norme e sviluppo scientifico e tecnico. ECSIN ha anche promosso la nascita della prima Società Italiana di Nanotossicologia (SIN), presentata a Pavia l'8 Ottobre 2010, che si propone come punto di riferimento per la valutazione dell'impatto delle nanotecnologie sull'ambiente e la salute dal punto di vista della ricerca scientifica, dell'innovazione industriale e della legislazione. In particolare la SIN si propone di:

- promuovere la ricerca di base ed applicata a supporto di una produzione sostenibile e di un impiego sicuro dei nanomateriali;
- favorire l'integrazione delle discipline scientifiche essenziali per la ricerca e per l'insegnamento della nanotossicologia;
- diffondere presso l'opinione pubblica le conoscenze derivanti dalla ricerca nanotossicologica;
- essere un punto di riferimento scientifico per il mondo industriale e commerciale e per i consumatori al fine di uno sviluppo sicuro e sostenibile della nanotecnologia;
- interagire con il legislatore nella stesura di normative finalizzate alla prevenzione e alla gestione del rischio occupazionale ed ambientale derivante dall'uso di nanomateriali;
- facilitare e valorizzare la discussione informata di aspetti etici e sociali di rilevanza per la nanotossicologia.

In particolare in questo lavoro sono state studiate le proprietà tossicologiche di nanoparticelle di silice. La silice è il composto più abbondante presente sulla crosta terrestre, dopo il carbonio, e si può dividere in cristallina e non cristallina (silice amorfa). Quest'ultima è presente sia nella forma naturale che in quella sintetizzata artificialmente e, contrariamente a quella cristallina, non causa silicosi, una pneumoconiosi in grado di determinare fibrosi polmonare (Arts et al., 2007). Viene utilizzata come materiale nanoparticellare in moltissimi prodotti industriali, chimici e biomedici (vedi paragrafo 2.3) e, con il rapido incremento delle sue applicazioni, sono cresciuti contemporaneamente la preoccupazione e lo studio degli

effetti tossici sulla salute umana, anche se al giorno d'oggi sono ancora pochi gli studi a riguardo. È stato comunque dimostrato che le NP di silice sono in grado di indurre tossicità in diverse linee cellulari di mammifero *in vitro* (Chang et al., 2007; Lin et al., 2006), con effetto dose e tempo dipendente. Dati di effetti delle particelle di silice *in vivo* sono ancora limitati e i meccanismi precisi degli effetti patologici non sono ancora chiari: è stato comunque dimostrato che a tempi brevi, 30 minuti o 2 ore, di esposizione, ci sono evidenze di degenerazioni e necrosi delle cellule epiteliali bronchiali di ratto causate dall'esposizione di particelle colloidali di silice, con una conseguente acuta infiammazione polmonare (Kaewamatwong et al., 2006).

Benché si siano fatte numerose ipotesi sui possibili effetti dannosi delle NP per l'organismo, come l'infiammazione a livello dei sistemi respiratorio e cardiovascolare, tuttavia non è chiaro quale sia l'esatto meccanismo con il quale queste NP interagiscono con le cellule e con le strutture subcellulari. La teoria finora più accreditata afferma che l'ingresso delle nanoparticelle nelle cellule per mezzo della membrana cellulare sia in grado di innescare un meccanismo di produzione di specie reattive dell'ossigeno (ROS) (Lin et al., 2006), con conseguente stress ossidativo. I ROS sono generalmente prodotti durante il normale metabolismo cellulare, ma la loro formazione può essere incrementata da particolari condizioni dell'ambiente esterno, quali l'esposizione a radiazioni ionizzanti, la presenza nel mezzo di agenti ossidanti, o anche l'esposizione a nanoparticelle. La formazione e l'accumulo di specie reattive dell'ossigeno, quali l'anione superossido ($O_2^{\cdot-}$), il radicale idrossilico ($OH\cdot$), il perossido d'idrogeno (H_2O_2) e l'ossigeno di singoletto (1O_2), danneggiano molti componenti cellulari attraverso l'ossidazione di proteine, lipidi e acidi nucleici, poichè sono molecole altamente reattive in grado di reagire con macromolecole come proteine, lipidi e DNA, causandone la rottura dello scheletro zucchero-fosfato, l'alterazione di basi azotate o la delezione di nucleotidi (Cooke et al., 2003). Numerose evidenze mostrano come nanoparticelle di TiO_2 e di carbonio, se inalate, siano in grado di indurre infiammazione e stress ossidativo polmonare (Nel et al., 2006). Altri studi condotti su cellule del carcinoma polmonare umano (A549, utilizzate anche in questo lavoro) dopo esposizione a NP di SiO_2 hanno messo in risalto una riduzione della sopravvivenza cellulare in maniera dose e tempo dipendente, correlata all'aumento dello stress ossidativo (Lin et al., 2006). Ioni di metalli di transizione (ad esempio ferro, nickel, cobalto e zinco) rilasciati all'interno della cellula da alcune nanoparticelle sono in grado di convertire i prodotti metabolici quali il perossido di idrogeno (H_2O_2) e l'anione superossido ($O_2^{\cdot-}$) nel radicale idrossilico ($OH\cdot$), una delle specie radicaliche principali che causano danni indiretti al DNA (Singh et al., 2009).

Se sufficientemente piccole, le NP possono entrare all'interno della cellula e successivamente nel nucleo sia per diffusione attraverso la membrana nucleare sia attraverso il trasporto tramite il complesso del poro nucleare (vedi paragrafo 2.5). Una volta localizzate all'interno del nucleo, la diretta interazione tra le NP e DNA o proteine associate al DNA può provocare

danni fisici al materiale genetico (Singh et al., 2009). È stato dimostrato che nanoparticelle di silice possono entrare nel nucleo inducendo la formazione di aggregati proteici che possono inibire la replicazione e trascrizione del DNA e la proliferazione cellulare (Chen et al., 2005). È stato osservato inoltre che NP di silice inducono un arresto del ciclo cellulare a causa dell'incremento dei livelli di ROS intracellulari (Wang et al., 2009). Nel caso in cui i danni riportati dalle cellule siano particolarmente gravi si è osservata infine l'induzione di apoptosi (Jin et al., 2007) o l'alterazione dell'espressione genica (Müller et al., 2007) e proteica, con alterazioni della quantità di proteine associate allo stress ossidativo e all'apoptosi (Yang et al., 2010).

In generale si può affermare che la tossicità di un nanomateriale dipende da numerosi parametri chimico-fisici che si possono così riassumere:

- numero e dimensioni del nanomateriale (Lin et al., 2006);
- tempo di esposizione;
- composizione chimica;
- stato di aggregazione (singole particelle, aggregati, agglomerati);
- area e carica superficiale;
- dispersione in gas (aerosol), liquidi o solidi;
- forma (sfere, tubi, dischi) (Jia et al., 2005) e struttura (cristallinità e porosità);
- modifica di superficie, ovvero nanomateriali non trattati e usati così come sono stati ottenuti dal processo di produzione, oppure nanomateriali rivestiti (NP coniugate, film polimerici).

Bisogna ricordare infine che, in previsione delle potenziali applicazioni *in vivo* di nanoparticelle in ambito biomedico, sarà molto importante chiarirne le farmacocinetiche, il tempo di emivita nel circolo sanguigno, l'escrezione, la biodistribuzione e l'accumulo nei vari organi dopo la loro somministrazione sistemica. Una volta che le nanoparticelle hanno espletato la loro funzione nel sito bersaglio, è desiderabile che esse vengano escrete o degradate senza alcun effetto tossico. Un approccio per favorire ciò è che le nanoparticelle vengano preparate con materiali polimerici biodegradabili già in uso in biomedicina o di creare nuovi nanosistemi con polimeri biodegradabili. Per le NP in silice i risultati ottenuti dagli studi di tossicità sono ancora controversi e non definitivi, poiché mentre alcuni autori suggeriscono che le nanoparticelle agiscono a livello cellulare e subcellulare causando evidente citotossicità (Akerman et al., 2002), altri affermano che esse sono materiali biologicamente inerti (Xue et al., 2006).

2.7 REGOLAMENTAZIONE SULL'UTILIZZO DI NANOMATERIALI

La rapida crescita delle nanotecnologie non è stata finora affiancata da un'adeguata conoscenza dei rischi per la salute e da relative misure di sicurezza. Anche i ricercatori stessi pongono dubbi sull'impatto di applicazioni e prodotti a base "nano", evidenziando la mancanza di dati e la necessità di adottare una precisa regolamentazione. Le nanotecnologie sono un campo ampio e complesso, ed alcuni fattori, tra cui la grande varietà di materiali e applicazioni, i riscontri scientifici ancora insufficienti sulla tossicità dei nanomateriali, e la mancanza di standard internazionali condivisi per la valutazione del rischio, rendono difficile l'adozione di precise e comuni norme. L'Unione Europea ha però iniziato a regolamentare l'utilizzo di nanoparticelle, soprattutto nel campo della cosmesi e in quello alimentare, per promuovere uno sviluppo sostenibile e responsabile di queste applicazioni, confermando la necessità di adottare il principio di precauzione. Quest'ultimo prevede che, una volta identificati eventuali rischi per i quali però non sia possibile avere una valutazione scientifica conclusiva, vengano comunque adottate delle misure di sicurezza, proporzionali al livello di protezione ricercato, e valutate a seguito di un opportuno esame dei vantaggi e degli oneri derivanti. Tali misure sono provvisorie ma devono essere mantenute fino all'ottenimento di nuovi dati scientifici resi successivamente disponibili.

Alcuni tentativi per regolamentare le nanotecnologie sono stati fatti in Francia e in Canada, attraverso l'elaborazione di linee guida e di schemi per orientare le procedure normative. Inoltre, all'inizio del 2009 il Canada è diventato il primo paese al mondo ad aver obbligato le società a fornire informazioni specifiche sull'utilizzo dei nanomateriali all'interno dei propri prodotti. A seguito di questo, l'UE richiede attualmente un'adeguata etichettatura sui prodotti cosmetici che contengono nanoparticelle e prevede inoltre che i nanomateriali, prima di essere immessi sul mercato alimentare, siano soggetti a specifici test secondo criteri standard per la valutazione del rischio e senza l'utilizzo di animali.

Attualmente le priorità da affrontare dal punto di vista normativo sono la sicurezza per i lavoratori e l'individuazione dei settori con il più alto livello di rischio che hanno già immesso sul mercato prodotti commerciali, ovvero la chimica, l'industria cosmetica, il settore alimentare e la produzione di nuovi materiali. Bisogna ricordare, inoltre, che gli standards attuali sull'utilizzo di sostanze tossiche si basano sulla massa di queste sostanze e delle particelle eventualmente inalate (Direttiva quadro 89/391/EEC, 89/656/EEC, 98/24/EC, 1999/38/EC), prevedendo l'utilizzo di attrezzature di protezione individuale per i lavoratori nel caso in cui i rischi non possono essere evitati da mezzi tecnici di protezione collettiva o da misure, metodi e procedimenti di organizzazione del lavoro. Tuttavia per le nanoparticelle la massa non sembra essere il fattore più importante per la valutazione di eventuali effetti biologici, bensì hanno maggiore rilevanza il numero e le dimensioni delle particelle, la loro

area superficiale e il tipo di esposizione del lavoratore o del consumatore (Oberdöster et al., 1994; Foged et al., 2005; Napierska et al., 2009).

La Commissione per l'ambiente, la sanità pubblica e la sicurezza alimentare ha pubblicato la Comunicazione "Nanoscienze e nanotecnologie: piano d'azione per l'Europa 2005-2009" (7.6.2005.COM (2005) 243 final), precisando che tutte le applicazioni e gli usi delle nanoscienze e delle nanotecnologie devono rispettare l'elevato livello di salute pubblica, di sicurezza dei consumatori, di protezione dei lavoratori e di tutela dell'ambiente, affermando che "nel complesso l'attuale legislazione copre in larga misura i rischi relativi ai nanomateriali". Il Regolamento REACH (acronimo di Registrazione, Valutazione, Autorizzazione e Restrizione delle sostanze chimiche), entrato in vigore il 1° Giugno 2007, (Regolamento (CE) n. 1907/2006, del 30.12.2006) secondo la Commissione fornisce una legislazione sulla fabbricazione, l'immissione sul mercato e l'uso di sostanze e, "seppure non faccia esplicito riferimento ai nanomateriali, questi sono coperti dalla definizione "sostanza" del REACH". Il Parlamento Europeo, il 24 Aprile 2009, ha però votato una Risoluzione sugli aspetti normativi in tema di nanomateriali (2008/2208(INI)), che rovescia la posizione della Commissione sull'uso di nanoparticelle. "Il Parlamento Europeo:

1. è convinto che l'impiego di nanomateriali dovrebbe rispondere alle reali esigenze dei cittadini e che i loro benefici dovrebbero essere meglio realizzati nell'ambito di un chiaro quadro regolamentare e politico (disposizioni legislative e di altro genere) che affronti espressamente le applicazioni esistenti e prevedibili dei nanomateriali nonché la natura stessa dei potenziali problemi di sicurezza relativi ai nanomateriali; (...)

3. dissente (...) dalle conclusioni della Commissione secondo cui la legislazione attuale copre, in linea di massima, i principali rischi connessi ai nanomateriali (...);

4. ritiene che il concetto di «approccio sicuro, responsabile e integrato» alle nanotecnologie, sostenuto dall'Unione europea, sia compromesso dalla mancanza di informazioni sull'impiego e sulla sicurezza dei nanomateriali già presenti sul mercato (...);

5. invita la Commissione a rivedere entro due anni l'intera normativa in materia al fine di garantire la sicurezza per tutte le applicazioni dei nanomateriali nei prodotti aventi un potenziale impatto sulla salute, l'ambiente o la sicurezza nel corso del loro ciclo di vita; (...)

8. chiede alla Commissione di promuovere l'adozione di una definizione dei nanomateriali a livello internazionale e di adeguare di conseguenza il quadro legislativo europeo in materia; (...)

11. chiede in particolare alla Commissione di valutare la necessità di rivedere il regolamento REACH per quanto riguarda, fra l'altro: una registrazione semplificata dei nanomateriali prodotti o importati, una considerazione di tutti i nanomateriali quali nuove sostanze; (...)

17. reitera la sua richiesta di fornire informazioni ai consumatori sull'impiego di nanomateriali nei prodotti di consumo; ritiene che tutti gli ingredienti presenti sotto forma di nanomateriali

nelle sostanze, miscele o articoli debbano essere chiaramente indicati nell'etichettatura del prodotto (ad esempio, nell'elenco degli ingredienti antepoendo al nome dell'ingrediente il prefisso «nano»); (...)

20. chiede un incremento sostanziale dei finanziamenti destinati alla ricerca sugli aspetti ambientali, sanitari e della sicurezza dei nanomateriali durante il loro ciclo di vita, ad esempio istituendo un fondo speciale europeo nell'ambito del PQ7; (...)

25. ritiene che sia necessario sviluppare, a tempo debito e specialmente per la nanomedicina, degli orientamenti etici rigorosi (...) pur incoraggiando il promettente settore interdisciplinare che applica tecnologie d'avanguardia come la visualizzazione molecolare e la diagnostica molecolare, che possono avere ricadute spettacolari per la diagnosi precoce e il trattamento mirato ed efficace di numerose patologie; (...)"

Negli ultimi anni, quindi, contemporaneamente all'impiego sempre più vasto dei nanomateriali in svariati campi, dall'edilizia al settore tessile ed alimentare fino a quello medico-diagnostico e della ricerca biomolecolare, si è sviluppata un'esigenza sempre maggiore di fornire informazioni esaurienti per valutare l'impatto dei nanomateriali sulla salute umana e sull'ambiente e sviluppare una conseguente regolamentazione del loro utilizzo.

3. Scopo

Il rapido sviluppo e impiego delle nanotecnologie ha portato ad un loro sempre più vasto utilizzo in svariati campi industriali, senza però fornire esaurienti informazioni sull'impatto dei nanomateriali sulla salute umana. Sebbene si siano fatte numerose ipotesi sui possibili effetti dannosi delle NP per l'organismo, tuttavia non è ancora chiaro quale sia l'esatto meccanismo con il quale queste nanostrutture interagiscano con le cellule e con le strutture subcellulari. Questo lavoro di Dottorato di Ricerca si colloca all'interno del progetto promosso e finanziato da ECSIN (*European Centre for the Sustainable Impact of Nanotechnology*) volto a valutare la tossicità indotta da nanostrutture di uso industriale. In particolare è stata condotta un'indagine *in vitro* sulla citotossicità di nanoparticelle commerciali di silice Ludox[®] (prodotto a marchio registrato della W. R. Grace & Co), che vengono utilizzate in svariati campi, dall'edilizia ai settori dell'industria tessile ed alimentare. In particolare sono state prese in esame le formulazioni Ludox[®] AS30 e SM30, rispettivamente di 20 e 7 nm di diametro, con lo scopo di valutare i loro possibili effetti citotossici su tre linee cellulari umane. Grazie a studi precedenti riportati in letteratura (Geiser et al., 2007; Nel et al., 2006), è stato dimostrato che una delle principali vie attraverso cui entriamo in contatto con nanostrutture ingegnerizzate è rappresentata dalla via respiratoria. Per tale motivo è stata selezionata per questo lavoro la linea cellulare CCD-34 Lu di fibroblasti di polmone neonatali normali, con lo scopo di studiare gli effetti tossici e i meccanismi d'azione *in vitro* su questo tipo cellulare. Per confrontare poi i risultati fra cellule normali e tumorali sono state selezionate anche due linee umane tumorali: le HT-1080, di fibrosarcoma, e la linea di carcinoma polmonare A549, per la quale esistono numerosi lavori riguardanti la tossicità di nanomateriali (Foldbjerg et al., 2010; Kim et al., 2006; Lin et al., 2006). In tali lavori vengono riportati risultati riguardanti il meccanismo di ingresso tramite endocitosi di nanoparticelle di silice e l'effetto dose e tempo dipendente delle nanoparticelle, in relazione al loro diametro e alla loro area superficiale.

Nel mio lavoro è stata analizzata innanzitutto l'interazione delle nanoparticelle con le componenti del terreno di coltura per valutare eventuali variazioni della stabilità della preparazione e della sua tossicità. In seguito sono stati indagati gli effetti dose-dipendenti sulla vitalità cellulare (tramite saggio clonogenico e saggio MTS) e sulla produzione intracellulare di specie reattive dell'ossigeno. Infine sono stati analizzati gli effetti indiretti dovuti all'aumento dello stress ossidativo, quali la formazione di doppie rotture al DNA, l'induzione di apoptosi e l'alterazione dell'espressione genica con il coinvolgimento di alcune vie metaboliche cellulari, quali la regolazione del ciclo cellulare.

4. Materiali e metodi

4.1 MATERIALI

Viene qui di seguito riportato l'elenco di tutti i materiali e i reagenti usati in questo lavoro.

Acqua milliQ: preparata a partire da acqua deionizzata ($R > 18 \text{ M}\Omega$) filtrata con sistema di purificazione Milli-Q della Millipore[®].

Acqua Gibco[®]: acqua distillata pura e priva di DNAsi/RNAsi, utilizzata per l'estrazione dell'RNA.

Antibiotici, Ab: streptomicina 75 U/mg, penicillina G 100 mg/ml (Sigma[®]).

Anticorpo I^o: mouse anti- γ -H2AX (Upstate[®]).

Anticorpo II^o: goat anti-mouse 488 (Molecular Probes[®]).

CellTiter 96[®] AQueous One Solution Proliferation Assay: Kit per test 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-carbossimetossifenil)-2-(4-sulfonil)-2H-tetrazolio (MTS), prodotto commerciale fornito dalla ditta Promega[®] utilizzato per valutare la vitalità cellulare.

Citofluorimetro BD FACS Canto[™] II con programma BD FACSDiva e ModFit LTTM (Becton Dickinson).

DAPI, 4',6-diamino-2-fenilindolo dilattato (Roche[®]).

DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium): terreno liquido per colture cellulari contenente GlutaMAX[®] e 4,5 g/l di glucosio, fornito dalla Gibco[®].

DMSO, dimetilsolfossido (Fluka[®]).

FBS (Foetal Bovine Serum): prodotto commerciale fornito dalla Gibco[®] (Invitrogen, Milano, Italia).

Fluorimetro Perkin Elmer LS 50 B.

Formaldeide 40% (Sigma[®]).

F-12K 1X (Nutrient Mixture Kaighn's modification): terreno per colture cellulari in forma liquida contenente L-Glutamina, fornito dalla Gibco[®].

Goat Serum (Siero di capra, Invitrogen[®]).

HBSS, soluzione salina (Invitrogen®).

Kit ApoAlert® Caspase Fluorescent Assay per il saggio di attivazione dell'enzima caspasi-3.

Kit “Whole Human Genome Oligo Microarray”, fornito dalla *Agilent*®.

Kit One-color Quick Amp Labeling, fornito dalla *Agilent*®.

Lettore Spettrofotometrico di piastre Spectramax 190 (Molecular Device®).

Microscopio a fluorescenza LEICA DM 5000B (Leica®).

MEM (Minimum Essential Medium): terreno liquido per colture cellulari, contenente sali di Earl e L-glutamina, fornito dalla Gibco®.

Mounting medium Vectashield (Invitrogen®).

Nanoparticelle di silice Ludox AS30 e SM30 (Sigma®).

NEAA, Non Essential AminoAcids 100X (Invitrogen®).

Piattaforma 2100 Bioanalyzer™, fornita dalla *Agilent*®.

PBS (Phosphate Buffered Saline): soluzione acquosa di sali inorganici quali NaCl, KCl, KH₂PO₄, Na₂HPO₄ 7 H₂O.

PBS con Ca²⁺ e Mg²⁺: PBS con aggiunta di CaCl₂ e MgCl₂.

RNasi 10 mg/ml (Sigma®).

RPMI 1640 1X (Roswell Park Memorial Institute 1640): terreno per colture cellulari in forma liquida, fornito dalla Gibco®. E' costituito da sali inorganici, vitamine, aminoacidi ed altre sostanze, quali D-glucosio, glutatione ridotto e rosso fenolo, ed è addizionato con GlutaMAX® 0,2 M, ovvero il dipeptide L-Alanil-L-Glutamina precursore della LGlutamina.

Sodio piruvato 100 mM (Sigma®).

Sonda fluorescente Carbossi-H₂DCFDA 10 mM in DMSO, fornita dalla Invitrogen®, per lo studio di produzione di ROS.

Sorgente di raggi-γ 137Cs in IBL-437 (Dip. Sc. Onc. e Chirur., Univ. di Padova).

Spettrofotometro Perkin Elmer Lambda 2 per la registrazione degli spettri UV-Vis.

Spettrofotometro NanodropTM (Thermo Fisher Scientific), per l'analisi di RNA (C.R.I.B.I., Univ. di Padova).

Tioridazina cloridrato: farmaco appartenente alla famiglia delle fenotiazine, fornito dalla Sandoz Pharma Ltd (Basilea, Svizzera); lo stock è sciolto in etanolo assoluto.

TPEN (N,N,N',N'-Tetrakis-(2-pyridylmethyl)-ethylenediamine, 30 μ M), fornito dalla Sigma[®].

Tripsina: tripsina liquida allo 0,25% con EDTA 1 mM, tripsina liquida allo 0,05% con EDTA 0,53 mM, tripsina allo 0,25%; fornite dalla Gibco[®].

TriZOL: soluzione monofasica di fenolo e guanidina isotiocianato, Invitrogen[®].

Trypan blue: colorante ad esclusione vitale in soluzione allo 0,4%, fornito dalla Sigma-Aldrich[®] (St. Louis, MO).

Versene: soluzione costituita da PBS contenente lo 0,2% di EDTA (acido etilendiammonio-tetracetico).

Violetto di genziana (Merck[®]).

HEPES (acido 4-(2-idrossietil)-1-piperaziniletansolfonico), Triton X-100, Ioduro di propidio: forniti dalla ditta Sigma-Aldrich[®].

Materiale plastico: le plastiche utilizzate per le colture cellulari sono prodotti Falcon[®].

4.2 LINEE CELLULARI

CCD-34 Lu Linea cellulare derivante da un espianto di fibroblasti di polmone neonatali umani normali. Queste cellule hanno un tempo di duplicazione di circa 24 ore, crescono in adesione e costituiscono una linea cellulare finita: le cellule cioè dopo circa 20 passaggi di replicazione tendono ad andare incontro a senescenza.

A549 Linea cellulare derivante da un carcinoma polmonare di un soggetto maschile caucasico di 58 anni. Le cellule crescono aderenti al substrato di coltura e hanno un tempo di duplicazione di circa 22 ore.

HT-1080 Linea cellulare che cresce in adesione con un tempo di duplicazione di circa 20-22 ore, e che deriva da un espianto di fibrosarcoma di un soggetto maschile caucasico di 35 anni.

IMR-90 Linea cellulare IMR-90 derivante da fibroblasti embrionali di polmone umano normale di un feto femminile di 16 settimane. È una linea cellulare primaria finita le cui cellule vanno incontro a senescenza dopo circa 16 passaggi di replicazione. Le cellule crescono in monostrati adesi al substrato e presentano un tempo di duplicazione di circa 24 ore.

Le linee cellulari utilizzate in questo lavoro sono fornite dalla ATCC[®] (American Type Culture Collection, Rockville, USA) e vengono mantenute in coltura in incubatore a 37°C, in atmosfera contenente il 5% di CO₂ e il 90% di umidità, nei rispettivi terreni qui sotto elencati:

Linea cellulare	Terreno di coltura completo
CCD-34 Lu	88% DMEM + 0,2% Ab* + 1% HEPES + 1% NEAA** + 10% siero
A549	90% F12K + 0,2% Ab* + 10% siero
HT-1080	88% MEM + 0,2% Ab* + 1% Sodio piruvato + 1% NEAA + 10% siero
IMR-90	88% MEM + 0,2% Ab* + 1% Sodio piruvato + 1% NEAA + 10% siero

*Ab = antibiotici streptomina, 38 unità/ml (30 mg/ml), e penicillina G, 100 unità/ml (25 mg/ml).

**NEAA = non essential aminoacids.

Prima che la coltura raggiunga la confluenza, il terreno viene eliminato e si effettua un lavaggio con 5 ml di versene (PBS 1X, 0,2 g/l EDTA e Ab). Per il distacco delle cellule CCD-

34 Lu e HT-1080 dalla superficie di coltura si utilizza 1 ml di soluzione di tripsina allo 0,25% in PBS 1X e si lascia agire per 4-5 minuti a 37°C. Per le linee A549 e IMR-90 si utilizza invece tripsina 0,05% e 0,2% EDTA. Al termine dell'incubazione vengono aggiunti 4 ml di terreno completo con il 10% di siero in modo da inattivare l'azione dell'enzima. Dopo aver risospeso la sospensione, si unisce ad una aliquota cellulare un egual volume di colorante ad esclusione vitale Trypan Blue per la stima del numero totale di cellule attraverso una conta con camera Bürker. Si preleva quindi un volume pari al numero di cellule desiderato per la nuova semina. Per le linee A549, CCD-34 Lu e IMR-90 si seminano $0,8 \times 10^6$ cellule in una fiasca T75 con 15 ml di terreno completo; per la linea HT-1080 si seminano $0,3 \times 10^6$ cellule in piastra Petri da 10 cm in 10 ml di terreno completo.

4.3 PREPARAZIONE DELLE NANOPARTICELLE LUDOX[®]

In questo lavoro sono state utilizzate due tipologie di nanoparticelle Ludox[®]: AS30 e SM30. Sono un prodotto a marchio registrato della W. R. Grace & Co. e sono ottenute dalla ditta Sigma-Aldrich[®]. Entrambe sono costituite da silice colloidale (SiO₂) con un diametro nominale rispettivamente di 20 e 7 nm. Presentano una carica superficiale negativa, vengono acquistate in soluzione acquosa, a pH basico e alla concentrazione di 300 mg/ml. Prima di poter essere utilizzate nelle colture cellulari per i diversi trattamenti, le nanoparticelle sono state caratterizzate in collaborazione con il Dipartimento di Scienze Chimiche dell'Università di Padova. Per effettuare i test di stabilità nei mezzi di coltura, sono state preparate delle soluzioni di NP alle concentrazioni di 0,1 e 1 mg/ml in H₂O, in PBS, in terreno di coltura RPMI, o in terreno addizionato con il 3% di siero: le diverse soluzioni sono lette allo spettrofotometro UV-visibile o al dynamic light scattering subito al termine della preparazione o dopo incubazione a 37°C per 24 h.

Per l'utilizzo nei sistemi cellulari le soluzioni madri di NP vengono diluite in acqua MilliQ ad una concentrazione di 5 mg/ml. La soluzione altamente basica viene portata ad un intervallo di pH compreso tra 7,3 e 7,5 ed infine viene filtrata con filtri a cut-off di 0,2 µm per renderla sterile. La soluzione diluita viene preparata fresca ad ogni utilizzo.

4.4 TRATTAMENTI CELLULARI CON NP LUDOX[®]

Per valutare la tossicità delle NP Ludox[®], le tre linee cellulari d'interesse (CCD-34 Lu, A549 e HT-1080) sono state trattate a 24 h dalla semina con dosi crescenti di NP AS30 o SM30 (comprese tra 0,005 e 0,7 mg/ml) per diversi tempi di incubazione (Figura 24). In questo lavoro sono state applicate due modalità di trattamento: un'incubazione con il 3% di siero per

24, 48 o 72 h (Figura 24-B), oppure un trattamento per 2 h senza siero (Figura 24-A). Il tempo di 2 h garantisce che le cellule non subiscano alcun danno nonostante l'assenza di siero. Al termine del tempo di incubazione si elimina il terreno di trattamento e si ripristina il terreno completo (con il 10% di siero) per 3 o 22 h. Le colture di controllo subiscono gli stessi passaggi delle cellule trattate con NP, quindi nel primo caso vengono trattate con solo terreno modificato e il 3% di siero, nel secondo caso vengono trattate in terreno modificato senza nanoparticelle e ripristinate anch'esse con terreno completo per gli stessi tempi.

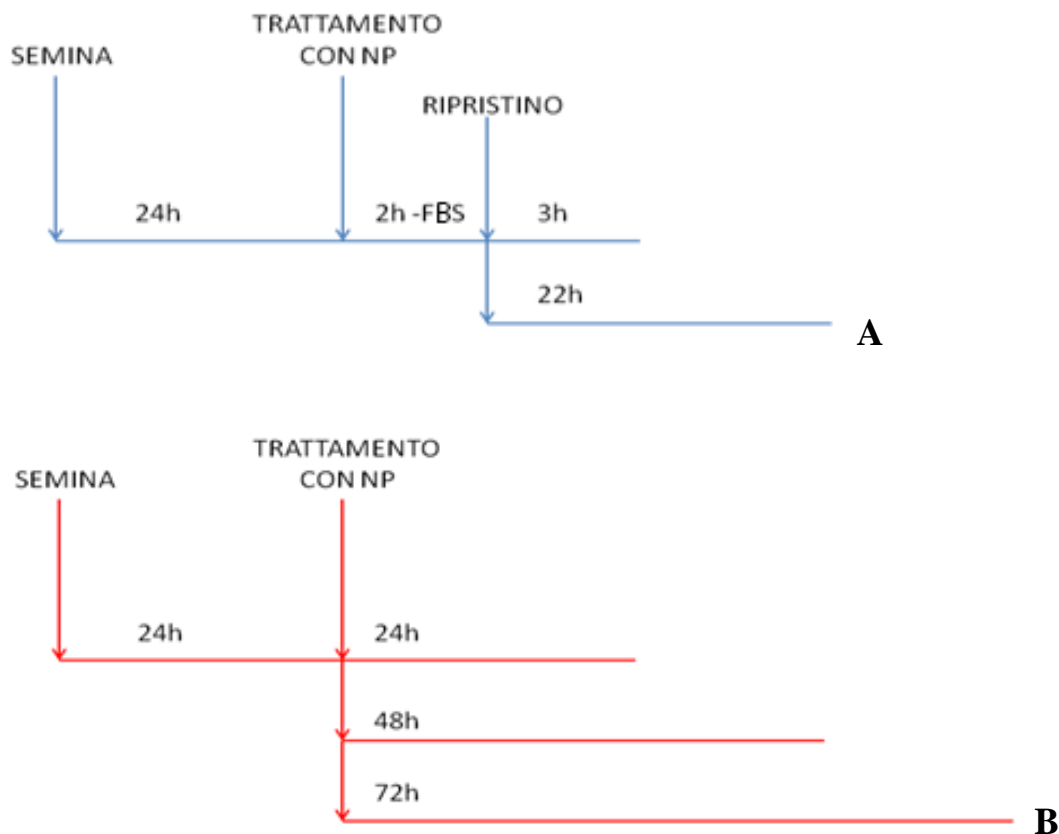


Figura 24: trattamento delle colture cellulari con NP Ludox[®]: le cellule vengono seminate e poste in incubatore a 37°C per 24 h, dopodiché vengono trattate con soluzione di NP AS30 o SM30 a diverse concentrazioni.

A) Trattamenti senza siero: le cellule sono incubate per 2 h in terreno di coltura privo di siero + NP; trascorso questo intervallo di tempo si ripristina la coltura con terreno completo (10% siero) per 3 o 22 h.

B) Trattamenti con 3% di siero: le cellule vengono incubate con NP e terreno di crescita con il 3% di siero, per 24, 48 o 72 h.

4.5 SAGGIO DI VITALITÀ CELLULARE MTS

Il CellTiter 96[®] Aqueous One Solution Proliferation Assay è un saggio colorimetrico che consente di determinare il numero di cellule vitali in esperimenti di proliferazione o di sopravvivenza, basandosi sull'attività delle deidrogenasi mitocondriali. Esso è infatti in grado di determinare spettrofotometricamente il numero di cellule metabolicamente attive e quindi di valutare la citotossicità di un composto chimico utilizzato nel trattamento di cellule *in vitro*. È costituito dal sale di tetrazolio 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-carbossimetossifenil)-2-(4-sulfonfenil)-2Htetrazolio (MTS o reagente di Owen) e dal reagente accoppiante di elettroni fenazina etosolfato (PES). L'MTS, dopo essere stato internalizzato dalle cellule, presenta un viraggio dal colore giallo al colore rosso, poichè viene bioridotto e trasformato in formazano, composto solubile nel mezzo di coltura cellulare e in grado di assorbire alla lunghezza d'onda di 490 nm. Questa conversione dell'MTS è presumibilmente accompagnata dalla formazione di NADPH o NADH prodotti dalle deidrogenasi, enzimi presenti nelle cellule metabolicamente attive. Tali agenti riducenti trasferiscono elettroni al PES, che risulta quindi in grado di ridurre l'MTS (Figura 25). La quantità di formazano prodotta, misurata come assorbimento a 490 nm, è pertanto direttamente proporzionale al numero di cellule vitali presenti nel campione: il confronto della lettura spettrofotometrica con l'assorbanza di cellule di controllo indica quindi il grado di tossicità del materiale testato.

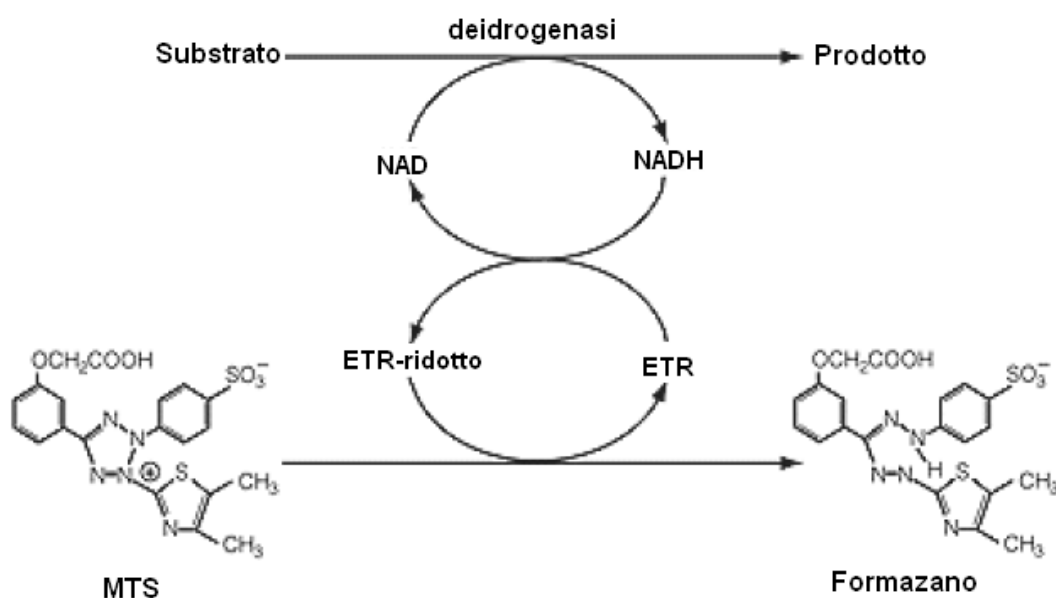


Figura 25: trasformazione dell'MTS a formazano (ETR: Electron Transfer Reagent, ossia il reagente accoppiante di elettroni PES).

Per effettuare tale test le cellule sono state seminate in piastre da 96 pozzetti con fondo piatto (rispettivamente $2,5 \times 10^3$ cellule per pozzetto per le CCD-34 Lu, 5×10^3 per le A549 e 2×10^3 per le HT-1080) in 200 μ l di terreno completo e lasciate crescere a 37°C per 24 ore. Allo scadere di tale tempo il terreno è stato sostituito con 150 μ l di soluzione di trattamento con concentrazioni crescenti di NP Ludox® AS30 o SM30 (3 pozzetti per ogni diversa dose di trattamento): le cellule sono state incubate a 37°C per 24, 48 o 72 h con terreno contenente le NP e il 3% di siero o per 2 h in terreno con NP senza siero, seguite da un ripristino in terreno completo di 3 o 22 h (vedi paragrafo precedente). Al termine dell'incubazione è stata valutata la vitalità cellulare col test MTS, rimuovendo da ciascun pozzetto il terreno e aggiungendo 100 μ l di terreno privo di siero e 20 μ l di soluzione MTS (inclusi 3 pozzetti per il bianco). La reazione è stata fatta procedere a 37°C al riparo dalla luce per circa 60-90 minuti, al termine dei quali è stata misurata l'assorbanza a 490 nm con lettore di piastra spettrofotometrico Spectramax 190 (Molecular Devices). Al valore di assorbanza dei campioni è stato sottratto il valore medio dei bianchi, ossia pozzetti privi di cellule il cui segnale rappresenta il background di assorbanza a 490 nm, calcolando così il valore di assorbanza del formazano prodotto dagli enzimi cellulari. Dal confronto dei valori di assorbanza dei campioni cellulari trattati con NP e l'assorbanza dei campioni di controllo, ovvero cellule che non sono state esposte al trattamento, ma che hanno subito gli stessi cambiamenti di terreno delle cellule trattate (posta come 100% di vitalità cellulare), si determina la vitalità cellulare (%) dei diversi campioni.

4.6 SAGGIO DI VITALITÀ CLONOGENICO

Il saggio clonogenico è un test *in vitro* che permette di valutare la sopravvivenza cellulare in base alla capacità di una singola cellula di formare una colonia a partire da una sospensione cellulare opportunamente diluita al momento della semina. Ogni clone è costituito da cellule geneticamente identiche, poiché derivanti da successive divisioni di un'unica cellula progenitrice, ed è considerato tale se formato da almeno 50 cellule (Franken et al., 2006).

In questo lavoro sono stati valutati gli effetti sulla vitalità cellulare del trattamento con NP Ludox® AS30 e SM30 sulle linee cellulari CCD-34 Lu, A549 e HT-1080, in base alla valutazione dell'alterazione dell'efficienza di clonaggio (E.C. %).

Le cellule vengono seminate alle rispettive densità riportate in tabella 5(a) e lasciate crescere per 24 h a 37°C con il 5% di CO₂ e il 95% di umidità relativa. Il terreno di coltura viene poi eliminato e vengono effettuati i trattamenti con diverse dosi di NP AS30 o SM30 per 24 h con il 3% di siero o in alternativa per 2 h senza siero seguite da ripristino per 3 o 22 h (vedi paragrafo 4.4). Al termine del trattamento, le cellule vengono staccate, raccolte e ne viene stimato il numero dopo una diluizione con il colorante ad esclusione vitale trypan blue e una

conta tramite camera di Bürker. Dopo opportune diluizioni seriali, viene infine raggiunta la densità di semina riportata in tabella 5(b) per permettere la formazione di cloni.

LINEA CELLULARE	ESPANSIONE ^(a) (cell/cm ²)	CLONOGENICO ^(b) (cell/cm ²)
CCD-34 Lu	3,1 x 10 ⁴	3,2
A549	2 x 10 ⁴	10,2
HT-1080	3,8 x 10 ⁴	10,2

Tabella 5: densità di semina per le tre linee cellulari utilizzate, relative alla fase di espansione prima del trattamento con NP (a) e al saggio clonogenico (b).

Da prove effettuate precedentemente ho verificato che le cellule CCD-34 Lu richiedono, per poter effettuare il saggio clonogenico, la presenza del 15% di siero nel terreno di coltura e di cellule feeder layer (in questo caso fibroblasti umani fetali normali IMR-90 alla densità di $1,9 \times 10^3$ cell/cm²) che fungono da supporto meccanico e metabolico per la crescita delle colonie. Le linee cellulari A549 e HT-1080 vengono invece seminate in terreno con il 10% di siero e in assenza di IMR-90 feeder layer.

Feeder layer di IMR-90:

Le cellule IMR-90 attive vengono scongelate e coltivate per due passaggi in fiasche T75 per poi essere seminate alla densità di $1,0 \times 10^6$ cellule in 10 ml di terreno completo in piastre Petri da 10 cm. Le colture vengono poi sottoposte ad una sorgente di radiazioni γ con intensità di 40 Gy per poterle inattivare e renderle quiescenti (Michalska, 2007). L'irradiazione con raggi γ è stata condotta con una sorgente di Cesio-137 presso il Dipartimento di Scienze Oncologiche e Chirurgiche (Università di Padova).

In seguito, le cellule vengono staccate dal supporto e possono quindi essere utilizzate immediatamente come feeder layer oppure congelate.

Congelamento: La sospensione cellulare di IMR-90 inattivate viene centrifugata a 125 g per 9 min a 4 °C. Il pellet ottenuto è risospeso in terreno di congelamento (85% MEM, 10% siero, 5% DMSO) e per ogni criovial vengono depositati 1×10^6 cellule in 1,5 ml di terreno di congelamento. Dopo il mantenimento overnight a -80°C ogni vial viene posta e conservata in azoto liquido.

Scongelamento: La vial conservata in azoto liquido viene scongelata in bagnetto termostato a 37°C e vengono aggiunti 2 ml di terreno. Viene poi effettuata una centrifugazione a 125 g per 9 min a temperatura ambiente e il pellet è risospeso in terreno e sottoposto a una conta cellulare con camera di Bürker.

Ogni condizione di trattamento saggiata viene effettuata in quattro repliche. Ciascuna piastra viene mantenuta a 37°C, 5% CO₂, 95% umidità relativa per un tempo variabile da 7 a 14 giorni a seconda della linea cellulare, sufficiente affinché si sviluppino eventuali cloni. Al termine del periodo di incubazione, le piastre vengono colorate per 10 min con Violetto di Genziana che, legandosi alla membrana cellulare, permette la visualizzazione delle colonie cresciute (Figura 26). Il colorante viene poi recuperato, le piastre vengono sciacquate per eliminare il colorante in eccesso e infine si effettua una conta dei cloni cresciuti su ciascuna piastra.

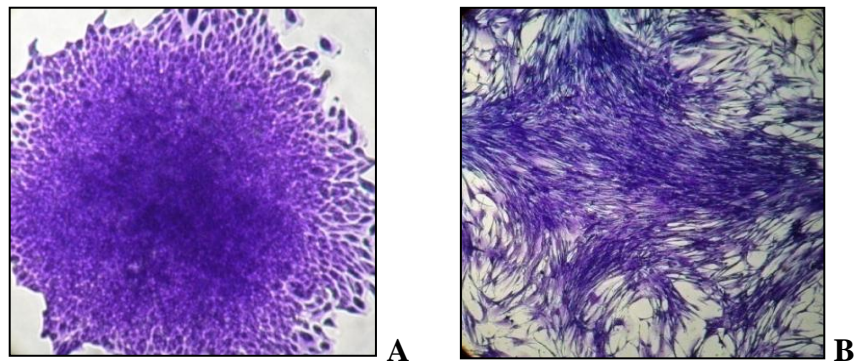


Figura 26: immagine al microscopio ottico di un clone di cellule A549 (A) e CCD-34 Lu (B).

L'efficienza di clonaggio percentuale per ogni campione (E.C.%) si calcola secondo la formula:

$$E.C. \% = \frac{\text{numero di cloni per piastra}}{\text{numero di cellule seminate per piastra}} \times 100$$

e riflette la sopravvivenza cellulare se si rapporta la E.C. del campione trattato rispetto a quella del controllo, che non è stato esposto al trattamento con NP, ma che ha subito gli stessi passaggi dei campioni trattati.

4.7 STUDI DI APOPTOSI

4.7.1 RILEVAZIONE DI APOPTOSI TRAMITE COLORAZIONE DAPI

Il DAPI, o 4',6-diamidino-2-phenylindole, è un colorante fluorescente in grado di legarsi al DNA cellulare e consente di evidenziare la morfologia nucleare dopo osservazione al microscopio a fluorescenza. Qualora la cellula sia in uno stadio avanzato di apoptosi dopo

trattamento con nanoparticelle, essa si presenterà sotto forma di corpi apoptotici che tramite colorazione DAPI appariranno come un insieme di vescicole fluorescenti inferiori alle dimensioni nucleari.

Per questo saggio vengono seminate $3,5 \times 10^5$ cellule HT-1080, A549 e CCD-34 Lu in piastre Petri da 10 cm e vengono lasciate a 37°C per 24 h. Il giorno seguente le cellule sono sottoposte a trattamento con NP per 2 h in terreno senza siero e ripristinate per 22 h con terreno completo. Al termine le cellule vengono staccate dal supporto, raccolte in numero pari a 1×10^6 cellule e sottoposte a una centrifugazione a 125 g per 10 min a 4°C , al termine della quale i campioni vengono mantenuti in ghiaccio per tutti i passaggi successivi. Il pellet viene risospeso in 3 ml di soluzione salina HBSS sotto moderata agitazione. Si aggiungono poi goccia a goccia circa 50 μl di fissativo (9:1 etanolo assoluto:acido acetico) incubando il campione in ghiaccio per 5 min e ripetendo questo passaggio 2 volte. La sospensione viene portata ad un volume finale di 6 ml con fissativo goccia a goccia, e dopo 10 min viene effettuata una centrifugazione a 125 g per 10 min a 4°C . Si elimina il surnatante e si aggiungono 3 ml di fissativo goccia a goccia per 10 min. Questo passaggio di centrifugazione, eliminazione del surnatante e aggiunta di nuovo fissativo viene ripetuto per 4 volte, al termine delle quali i campioni sono conservati a 4°C per almeno un giorno. Una volta centrifugati nuovamente, vengono aggiunti al pellet 400 μl di fissativo fresco. Si ripongono su un vetrino portaoggetti alcune gocce (circa 50 μl) del campione che vengono lasciate asciugare al buio per una notte a temperatura ambiente. Il giorno seguente si depositano sul vetrino portaoggetti 20 μl di soluzione DAPI + Vectashield[®] mounting medium (che previene il decadimento del segnale fluorescente del DAPI) ad una concentrazione di 0,2 $\mu\text{g/ml}$. Il campione viene infine coperto con un vetrino coprioggetti e sigillato con smalto per essere osservato al microscopio a fluorescenza ($\lambda_{\text{ex}} = 365 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 460 \text{ nm}$). Per ciascun campione vengono contate almeno 1000 cellule. L'indice apoptotico (I.A.) è calcolato come segue:

$$\text{I.A. \%} = \frac{\text{cell}_{\text{apoptosi}}}{\text{cell}_{\text{tot}}} \cdot 100$$

4.7.2 SAGGIO DI ATTIVAZIONE DELLA CASPASI-3

Le caspasi sono un gruppo di proteine appartenenti alla famiglia delle proteasi, caratterizzate da una cisteina nel sito attivo. Questi enzimi sono in grado di riconoscere e tagliare diversi substrati cellulari a seguito di un residuo di acido aspartico. Le caspasi sono sintetizzate, come zimogeni inattivi, nel citosol delle cellule di mammifero e vengono rapidamente attivate attraverso una specifica cascata di eventi quando la cellula va incontro al processo di morte cellulare programmata in seguito a gravi danni che ne pregiudicano le normali funzioni cellulari (Cohen, 1997). La caspasi-3, in particolare, è una proteasi implicata nella fase esecutiva dell'apoptosi, dove le cellule vanno incontro a cambiamenti morfologici, quali la

frammentazione del DNA, la condensazione della cromatina e la formazione di corpi apoptotici (Porter et al., 1999; Zou et al., 1999).

Per testare l'attivazione della caspasi-3 è stato utilizzato il kit ApoAlert[®] Caspase Fluorescent Assay che si basa sulla capacità dell'enzima caspasi-3 di tagliare il substrato DEVD-AFC (DEVD-7-amino-4-trifluorometilcumarina, $\lambda = 400$ nm), liberando la molecola AFC che emette fluorescenza alla lunghezza d'onda di 505 nm. Come controllo positivo, per confermare la correlazione tra l'attività della caspasi-3 e la rilevazione del segnale di fluorescenza, sono state utilizzate cellule trattate per 5 h con N,N,N',N'-Tetrakis-(2-pyridilmethyl)-ethylenediamine (TPEN, 30 μ M), un chelante di ioni Zn^{2+}/Cu^{2+} induttore di caspasi 3, 5 e 8, scelto sulla base di precedenti studi condotti presso il mio laboratorio.

Il saggio è stato condotto nelle due linee cellulari tumorali (A549 e HT-1080), che hanno dato risposta positiva alla colorazione DAPI (vedi paragrafo 4.7.1). Le cellule sono state seminate in piastre Petri del diametro di 35 mm in numero pari a $0,6 \times 10^5$ per la linea HT-1080 e $0,7 \times 10^5$ per la linea A549. Dopo 24 h di crescita a 37°C le cellule sono state trattate con NP Ludox[®] SM30 alla dose 0,04 mg/ml per 2 h in terreno senza siero, seguite da un ripristino in terreno completo di 22 h. Per condurre il saggio sono state raccolte 1×10^6 cellule HT-1080 e A549 per ogni campione da analizzare. Le cellule, una volta eliminato il terreno tramite centrifugazione a 200 g per 10 min, sono state conservate a -80°C. Al momento dell'analisi il pellet cellulare è stato risospeso in 50 μ l di buffer di lisi freddo (fornito nel kit) e incubato in ghiaccio per 10 min. Il lisato è stato centrifugato per 3 min alla velocità massima a 4°C per depositare i detriti cellulari, e il surnatante è stato quindi recuperato e ad esso sono stati aggiunti 50 μ l di buffer di reazione (2X Reaction Buffer, 10 μ M DTT, fornito nel kit) e 5 μ l di substrato di reazione (DEVD-AFC, 50 μ M). La reazione è condotta incubando 1 h in bagnetto termostato a 37°C. I campioni sono stati infine letti al fluorimetro Perkin Elmer LS 50 B ($\lambda_{exc} = 400$ nm; $\lambda_{em} = 505$ nm).

Un campione a cui non è stato aggiunto il substrato viene usato come bianco per la lettura al fluorimetro per eliminare il background di fluorescenza cellulare a tale lunghezza d'onda.

Per ciascun campione trattato con NP ho ricavato l'indice di attivazione della caspasi-3 come rapporto tra il valore di fluorescenza del campione e il valore di fluorescenza del controllo.

4.8 VALUTAZIONE DELLA PRODUZIONE DI ROS

Per valutare la produzione endogena di ROS (specie reattive dell'ossigeno) indotta dal trattamento con NP Ludox[®] è stata utilizzata la sonda Carbossi-H₂DCFDA: dopo internalizzazione cellulare tramite endocitosi, la sonda viene deacetilata a Carbossi-DCFH da esterasi intracellulari. In presenza di ROS, la sonda viene poi ossidata e convertita in Carbossi-DCF, molecola la cui fluorescenza può essere osservata tramite citofluorimetria a

flusso ($\lambda_{\text{ex}} = 495 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 529 \text{ nm}$) (Figura 27). L'intensità di fluorescenza emessa dalla sonda è proporzionale alla quantità di ROS prodotti dalla cellula.

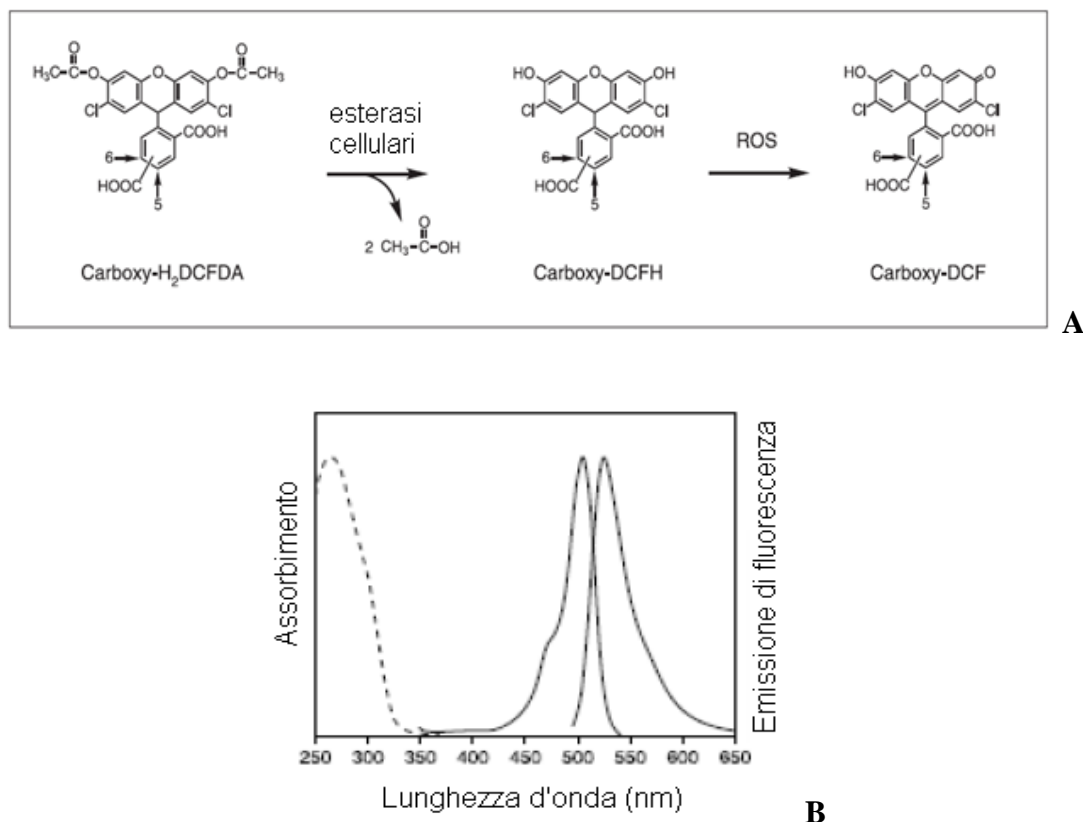


Figura 27: A) reazioni della Carboxy-H₂DCFDA una volta internalizzata dalle cellule e in presenza di ROS. B) Spettro di assorbimento del composto nella forma non ossidata (tratteggiato) e spettro di assorbimento-emissione del composto dopo l'ossidazione (linea continua).

Il protocollo riportato in seguito è stato effettuato per tutte e tre le linee cellulari utilizzate in questo lavoro: CCD-34 Lu, A549 e HT-1080.

Le cellule vengono seminate in piastre Petri da 35 mm in un numero pari a $0,15 \times 10^6$ per le linee CCD-34 Lu e A549, e $0,6 \times 10^5$ cellule per la linea HT-1080. Dopo 24 h a 37°C si procede con il trattamento con NP Ludox[®] AS30 o SM30 in dosi comprese tra 0,005 e 0,07 mg/ml per 2 h in terreno senza siero: da esperimenti preliminari ho potuto osservare che la maggiore produzione di ROS avviene al termine del trattamento di 2 h in assenza di siero. Per questo motivo il protocollo sperimentale per questo tipo di analisi si riferisce a questo tempo di trattamento cellulare (Figura 28).



Figura 28: schema del protocollo per la valutazione della produzione di ROS. Le cellule vengono seminate e poste a 37°C per 24 h, dopodichè vengono trattate con concentrazioni crescenti di NP e, prima dell'analisi al citofluorimetro, vengono incubate con la sonda H₂DCFDA per 40 minuti.

Come confronto dello stress ossidativo indotto nei campioni a seguito dei trattamenti, si utilizzano due controlli, uno negativo e uno positivo: il primo, incubato solo con terreno in assenza di siero, serve per valutare il normale background di fluorescenza dovuto alla produzione basale di ROS; il secondo viene trattato invece con Tioridazina cloridrato, un farmaco che, se irradiato con luce UV, induce stress ossidativo e permette di attestare che la linea cellulare presa in esame produca effettivamente ROS in condizioni di stress. Per la preparazione del controllo positivo si seminano $0,1 \times 10^6$ cellule in piastre Petri da 35 mm che vengono mantenute a 37°C per 24 h. Il giorno seguente sono trattate con 2 ml di soluzione di Tioridazina cloridrato (5 µM per 24 h in terreno con il 3% di siero) e mantenute per 24 h a 37°C. Al termine viene eliminato il terreno di incubazione in tutti i campioni (controllo negativo, controllo positivo e campioni trattati con NP Ludox®) e vengono aggiunti 500 µl della sonda Carbossi-H₂DCFDA (25 µM in PBS 1X con Ca²⁺ e Mg²⁺) per ciascun campione. I controlli positivi vengono incubati con la sonda a 37°C al buio per 20 min e in seguito irradiati con luce UV a 365 nm, alla potenza di 10 J/cm² per altri 20 min. I controlli negativi e i trattati con NP vengono invece incubati per 40 min a 37°C al buio. Per ciascun campione viene poi eliminata la soluzione di PBS, e le cellule sono staccate dal supporto plastico, raccolte in tubi da citofluorimetro e centrifugate a 125 g per 9 min. Una volta eliminato il surnatante, i pellet vengono risospesi in 500 µl di PBS 1X ed analizzati mediante citofluorimetria a flusso.

Il FACS (*Fluorescence Activated Cell Sorter*) o citofluorimetro è un potente strumento di indagine biologica che permette di effettuare misurazioni simultanee di molteplici caratteristiche di una singola cellula che si trova immersa in un fluido in movimento: le cellule del campione opportunamente marcate vengono aspirate da un ago e fatte passare ad una ad una attraverso una “strozzatura” dove vengono colpite da uno o più laser, quindi la luce diffusa viene raccolta da dei rivelatori (Figura 29).

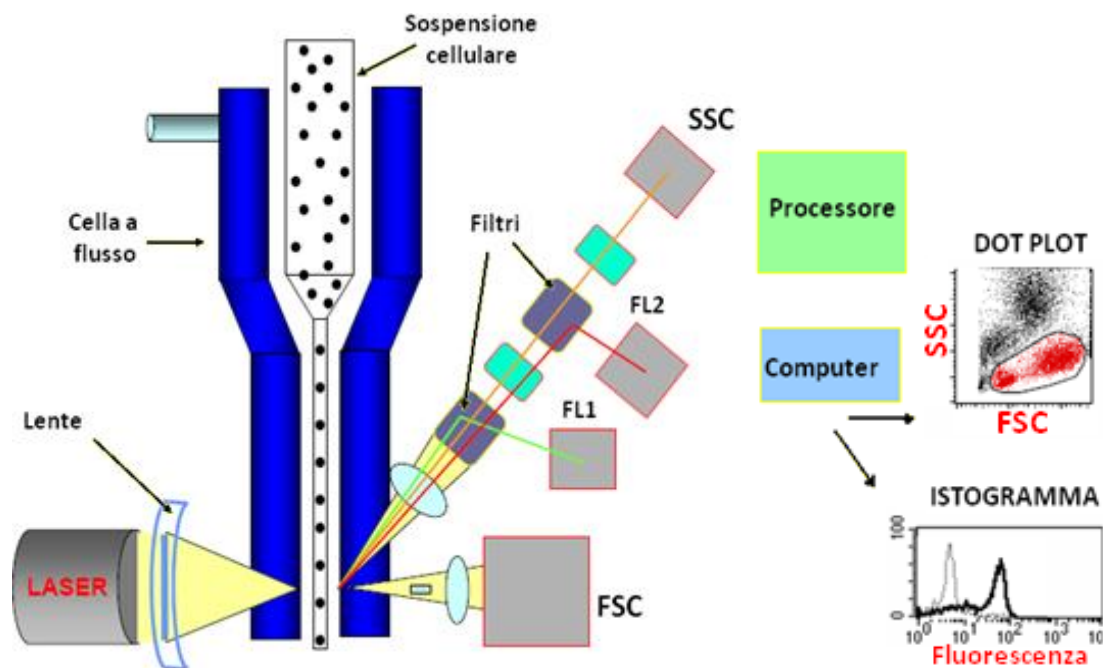


Figura 29: schema di funzionamento di un citofluorimetro a flusso (FACS, *Fluorescence Activated Cell Sorter*).

Durante l'analisi è possibile, inoltre, utilizzare una finestra elettronica (gate) che permette di isolare una determinata popolazione da tutte le altre cellule e di analizzare specifici parametri all'interno della popolazione scelta, dividendola così in ulteriori subpopolazioni. Il citofluorimetro a flusso impiegato in questo lavoro (BD FACS Canto™ II) utilizza una sorgente luminosa di ioni Argon centrata su una lunghezza d'onda di 488 nm. La singola cellula che viene dunque colpita dal raggio laser può fornire diverse informazioni:

- la dimensione della cellula viene calcolata tramite il Forward Scatter (FSC), rivelatore lungo l'asse della luce incidente che misura la luce diffratta e la correla alla dimensione cellulare;
- la complessità e la granulosità interna vengono misurate con il Side Scatter (SSC), rivelatore a 90° rispetto alla sorgente;
- se le cellule sono marcate con sostanze fluorescenti (ad esempio propidio ioduro, sonde fluorescenti, anticorpi coniugati a fluorofori) è possibile analizzare anche la fluorescenza che questi emettono, permettendo un'analisi quantitativa e qualitativa dell'intera popolazione cellulare.

In questo lavoro viene rilevata la fluorescenza emessa dalla sonda H₂DCFDA attraverso il filtro FITC (fluoresceina isotiocianato, $\lambda = 530 \text{ nm} \pm 15 \text{ nm}$), acquisendo per ogni campione 10000 eventi: la quantità di fluorescenza misurata è proporzionale alla quantità di sonda resa fluorescente dalla presenza di ROS.

I risultati forniti quindi dal citofluorimento, dopo l'acquisizione e l'analisi dei dati tramite il programma BD FACSDiva, sono:

- 1) i dot-plot, nei quali è rappresentata la complessità cellulare (SSC) in funzione della dimensione cellulare (FSC);
- 2) l'andamento della fluorescenza FITC rappresentato in istogramma sul campione della popolazione analizzato. La creazione di un istogramma dell'intensità di fluorescenza della sonda contro il numero di cellule permette di calcolare il valore medio dell'incremento di produzione di specie reattive dell'ossigeno.

In campioni di cellule CCD-34 Lu, di controllo negativo o trattate con NP Ludox[®] SM30 alla dose 0,03 mg/ml per 2 h senza siero, è stata inoltre effettuata un'ulteriore analisi, utilizzando al momento dell'acquisizione dei campioni al FACS anche il propidio ioduro (PI, 50 $\mu\text{g/ml}$, $585 \pm 21 \text{ nm}$). Il PI, intercalante del DNA, è in grado di entrare nelle cellule con la membrana danneggiata discriminando così le cellule vitali da quelle non vitali: in questo modo è stato possibile valutare lo stato di vitalità delle cellule e verificare quale sottopopolazione cellulare fosse responsabile dell'incremento della produzione di ROS osservata.

4.9 RILEVAMENTO DI DOPPIE ROTTURE AL DNA TRAMITE IMMUNOFLUORESCENZA

La tecnica dell'immunofluorescenza sfrutta la caratteristica propria degli anticorpi di legarsi con estrema specificità ed elevata affinità a determinanti antigenici allo scopo di individuarne la localizzazione in preparazioni di campioni biologici. A questi anticorpi è coniugato in precedenza un fluorocromo, una molecola che colpita da luce di determinata lunghezza d'onda, emette fluorescenza a una lunghezza d'onda maggiore. In questo lavoro è stata utilizzata una variante della tecnica dell'immunofluorescenza, detta indiretta, poichè il tracciante è legato a un secondo anticorpo, specifico per quello primario che si lega direttamente all'antigene in esame (Figura 30). Questo processo combinato permette di ottenere un'amplificazione della fluorescenza, rendendo più facile l'analisi al microscopio.

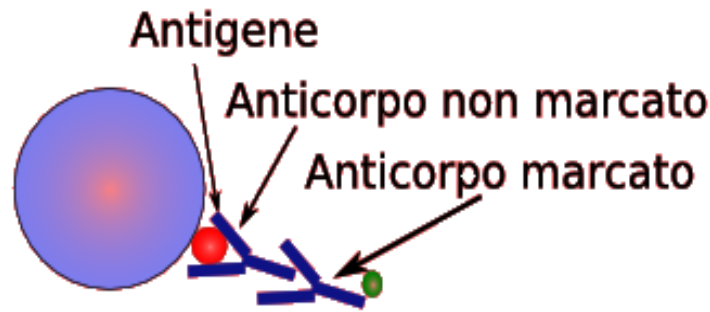


Figura 30: schema di un'immunofluorescenza indiretta.

In questo lavoro è stata analizzata l'eventuale presenza di doppie rotture al DNA (double-strand breaks, DSBs) indotta dal trattamento con nanoparticelle Ludox[®] mediante il rilevamento di foci di fluorescenza dell'istone H2AX fosforilato (γ -H2AX): quando si formano DSBs al DNA, la variante istonica H2AX viene fosforilata sulla serina in posizione 139 dalla chinasi ATM, che rappresenta uno dei sensori del danno al DNA. Questa fosforilazione è necessaria per la segnalazione del danno e permette di reclutare le proteine di riparazione del DNA nel sito di rottura (Singh et al., 2009).

Per evidenziare la presenza dell'istone γ -H2AX si è utilizzato un anticorpo primario monoclonale anti γ -H2AX prodotto in topo (mouse), mentre l'anticorpo secondario è il goat anti mouse 488, coniugato con il fluoroforo Alexa fluor 488 (verde). Il protocollo prevede:

- semina delle cellule sui vetrini coprioggetto;
- trattamento con NP Ludox[®] AS30 e SM30;
- fissazione;
- permeabilizzazione delle membrane;
- saturazione dei siti aspecifici;
- aggiunta dell'anticorpo primario;
- aggiunta dell'anticorpo secondario;
- aggiunta dell'intercalante del DNA (DAPI);
- osservazione al microscopio a fluorescenza.

L'immunofluorescenza è stata condotta sulle linee CCD-34 Lu, A549 e HT-1080. Per le linee CCD-34 Lu e A549 vengono seminate $1,5 \times 10^5$ cellule, per la linea HT-1080 vengono seminate invece 6×10^4 cellule in piastre Petri da 35 mm di diametro, all'interno delle quali è stato precedentemente riposto un vetrino coprioggetto sterilizzato. Le cellule vengono lasciate crescere a 37°C per 24 h, dopodichè vengono trattate con diverse concentrazioni di nanoparticelle AS30 e SM30 (da 0,01 a 0,4 mg/ml) per diversi tempi: 24, 48, 72 h in terreno con il 3% di siero (che hanno dato risultati negativi) oppure per 2 h in terreno senza siero, al

termine delle quali alcuni vetrini vengono subito fissati mentre altri vengono ripristinati con terreno completo per 3 o 22 h (Figura 31).

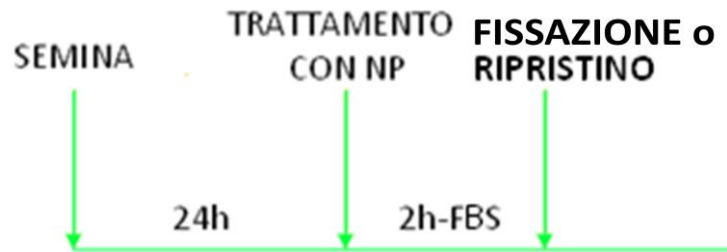


Figura 31: trattamento per l'analisi delle doppie rotture al DNA.

Per la fissazione si trasferiscono i vetrini in nuove piastre Petri da 35 mm e si effettuano 2 lavaggi con PBS 1X. Le cellule vengono poi fissate in 1 ml di formaldeide (al 4% in PBS 1X) a 37°C per 10 min. La formaldeide, agendo sui legami del DNA e delle proteine, assicura che le caratteristiche strutturali del campione rimangano inalterate per gli studi successivi. In seguito alla fissazione si effettuano 3 lavaggi con 2 ml di PBS 1X per eliminare tracce del fissativo e si conservano così i campioni a 4°C.

Il passaggio successivo prevede la permeabilizzazione della membrana cellulare ed è necessario affinché l'antigene possa essere raggiunto dall'anticorpo. A questo scopo è stata utilizzata una soluzione contenente un detergente non ionico (Triton X-100 0,2%, Sigma[®], in PBS) per 10 min a 37°C. La soluzione permeabilizzante è stata quindi rimossa e il campione incubato in soluzione di saturazione (Goat serum 10% in PBS) per 1,5 h a temperatura ambiente. Questo passaggio ha la funzione di bloccare i siti aspecifici ai quali l'anticorpo potrebbe legarsi per cross-reattività. Rimosso il saturante, i campioni sono stati incubati con 30 µl della soluzione contenente l'anticorpo primario (anti γ -H2AX 1:200 in soluzione permeabilizzante e 10% di goat serum) per 90 min a temperatura ambiente in camera umida. Per evitare un'eccessiva dispersione dell'anticorpo sulla superficie del vetrino è stato applicato un piccolo ritaglio di parafilm sopra allo spot delle cellule in modo da farlo ben aderire alla superficie del vetrino. Al termine sono stati eseguiti 4 lavaggi da 5 min di cui il 1° e il 4° con PBS 1X mentre il 2° e il 3° con PBS 1X e 0,1% Triton X-100, mantenendo i vetrini in agitazione, in modo da rimuovere l'eccesso di anticorpo non legato. I campioni vengono poi incubati in condizioni analoghe con 30 µl della soluzione contenente l'anticorpo secondario coniugato (goat anti-mouse 1:250 in soluzione permeabilizzante e 10% di goat serum) per 1 h in ambiente buio per evitare il decadimento ossidativo della molecola di fluorocromo indotto dalla luce. Sono stati ripetuti quindi i lavaggi precedentemente descritti con l'aggiunta di un

ultimo lavaggio in acqua bidistillata per rimuovere l'eccesso di sali del PBS che può rendere i vetrini più opachi alla luce. Infine i campioni vengono lasciati asciugare bene e viene poi depositata una goccia di soluzione montante (Vectashield[®] mounting medium, soluzione che previene il decadimento della fluorescenza) contenente 0,2 µg/ml di DAPI su ogni vetrino portaoggetti sui quali verranno montati capovolti i vetrini una volta asciutti. I vetrini vengono sigillati con smalto e infine osservati al microscopio a fluorescenza (Leica[®] DM5000), discriminando le cellule positive ai foci di riparazione da quelle negative ed effettuando una conta su campioni di almeno 100 cellule.

Per verificare il corretto funzionamento degli anticorpi è stato creato anche un controllo positivo di cellule A549 (Munshi et al., 2006), che a 24 h dalla semina vengono irradiate con raggi γ con una dose pari a 2 Gy prima di procedere con l'immunofluorescenza. L'irradiazione con raggi γ è stata condotta con una sorgente di Cesio-137 presso il Dipartimento di Scienze Oncologiche e Chirurgiche (Università di Padova).

4.10 ANALISI DI ESPRESSIONE GENICA MEDIANTE TECNICA MICROARRAY

Per valutare gli eventuali effetti genotossici causati dall'incubazione con NP Ludox[®] è stata analizzata l'alterazione dell'espressione genica tramite il kit della Agilent[®] "Whole Human Genome Oligo Microarray" (con la collaborazione del gruppo del prof. Lanfranchi, C.R.I.B.I., Università di Padova). Tramite i *chip* a DNA è possibile misurare il livello di espressione di migliaia di geni contemporaneamente, sfruttando i principi di base dell'ibridazione degli acidi nucleici. Un tipico esperimento di microarray si divide in quattro fasi distinte: 1) marcatura del campione; 2) ibridazione sul supporto solido; 3) acquisizione dell'immagine; 4) estrazione dei dati grezzi ed analisi statistica dei valori misurati (Figura 32). L'intensità del segnale rilevata in ogni spot dell'array è in definitiva una misura indiretta della concentrazione di quel target (in questo caso RNA messaggero) nella cellula.

Gli effetti genotossici delle NP Ludox[®] sono stati valutati nella linea cellulare A549: dopo 24 h dalla semina di 1×10^6 cellule in piastre Petri da 10 cm di diametro, si è effettuato un trattamento con NP AS30 e SM30 alla concentrazione di 0,02 mg/ml, per 2 h in terreno senza siero, seguite poi da un ripristino in terreno completo di 3 h (per le NP AS30 e SM30) o di 22 h (solo per le NP AS30). Al termine del trattamento i campioni trattati e quelli di controllo vengono tripsinizzati e i pellet sono conservati a -80°C fino al passaggio successivo, dopo aver aggiunto a ciascuno di essi 1 ml di TRIzol (Invitrogen[®]): il TRIzol è una soluzione monofasica di fenolo e guanidina a concentrazioni elevate, che costituiscono forti denaturanti delle proteine, e di conseguenza potenti inibitori delle RNasi. La composizione del TRIzol

garantisce la lisi cellulare, e la presenza di detergenti aiuta la dissociazione dei complessi proteine-acidi nucleici, che possono causare degradazione dell'RNA.

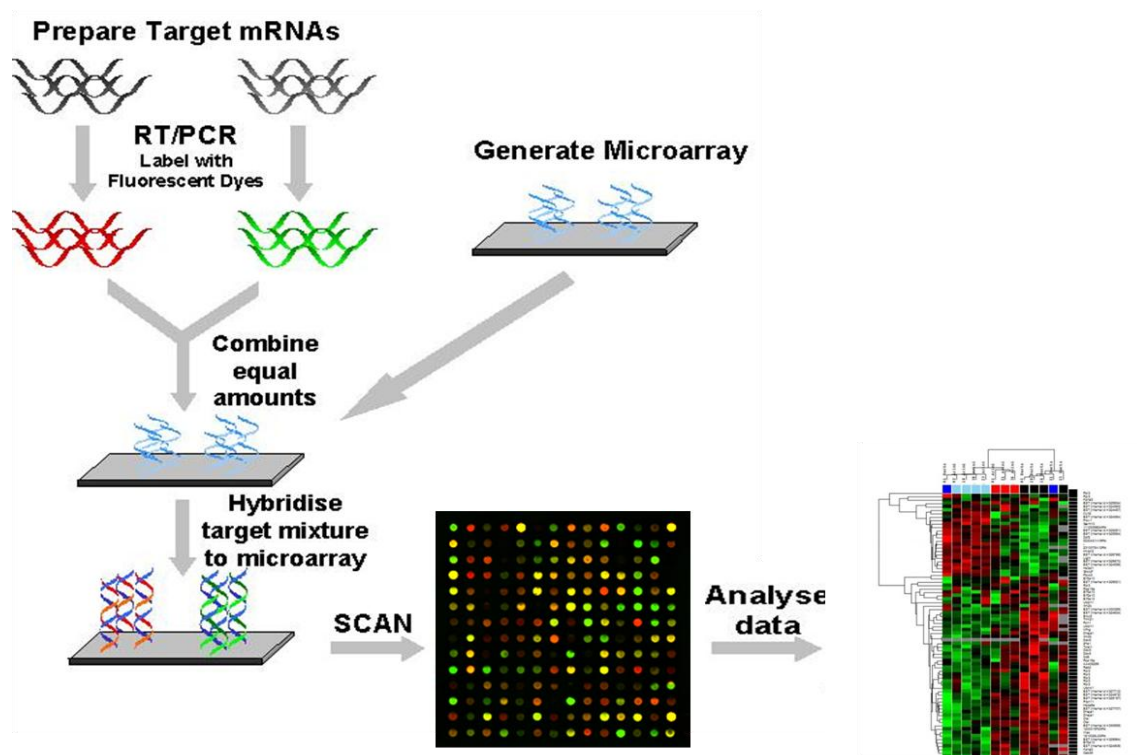


Figura 32: schema delle fasi sperimentali di un esperimento di microarray.

4.10.1 ESTRAZIONE DELL'RNA TOTALE

L'estrazione dell'RNA è il punto di partenza per l'analisi di espressione genica mediante DNA microarray. Data l'elevata instabilità dell'acido nucleico, è importante garantire assenza di RNAsi, usando accorgimenti particolari, come l'utilizzo di guanti e di plastiche RNAsi-free, e lavorando in ghiaccio.

Dopo aver mantenuto i campioni per 5 min a temperatura ambiente, per dare tempo ai complessi di proteine e acidi nucleici di dissociarsi, si aggiungono 200 µl di cloroformio, si agita vigorosamente la provetta per 30 sec lasciando disgregare i complessi nucleoproteici e rendendo così omogenea l'emulsione, e si mantiene in ghiaccio per 15 min. Si centrifuga poi a 12000 g, 15 min a 4°C, per separare la fase acquosa superiore contenente l'acido nucleico dalla fase organica sottostante (di colore rosa). Avendo cura di evitare l'entrata in contatto con l'interfaccia tra fase organica e fase acquosa, contenente proteine e membrane cellulari contaminanti, si trasferisce il surnatante in nuova provetta e si aggiunge un isovolume (600 µl) di isopropanolo. Dopo aver agitato dolcemente per 10-20 sec, si incuba a -20°C per almeno 2 h e si centrifuga a 12000 g, 20 min a 4°C. Una volta eliminato l'isopropanolo,

prestando attenzione a non rimuovere il pellet (formato da RNA) sul fondo del tubo, il precipitato viene lavato due o tre volte con 1 ml di etanolo 75% centrifugando a 12000 g, 10 min a 4°C. Eliminato con cura il surnatante con pipetta di vetro, si lascia asciugare brevemente il precipitato a temperatura ambiente senza però farlo seccare. L'RNA viene infine risospeso in acqua Gibco (40 µl) e può essere mantenuto a -80°C per alcuni mesi.

4.10.2 QUANTIFICAZIONE SPETTROFOTOMETRICA DELL'RNA TOTALE

Gli acidi nucleici, sia RNA che DNA, possono essere quantificati in soluzione, determinandone contemporaneamente la purezza, in particolar modo valutando eventuali contaminazioni da proteine e polisaccaridi, sfruttando la caratteristica delle basi azotate di assorbire nello spettro UV.

Una volta estratto l'RNA da tutti i campioni, di controllo e trattati con NP, si procede alla quantificazione spettrofotometrica dell'RNA totale e alla valutazione del suo stato di purezza tramite lo spettrofotometro Nanodrop™ (Figura 33).



Figura 33: spettrofotometro Nanodrop, per l'analisi di acidi nucleici: una goccia di campione (1 µl) viene depositata sul piedestallo di misura dello strumento. Il braccio mobile dello strumento viene abbassato, comprimendo la goccia che è mantenuta in posizione dalla tensione superficiale. Viene effettuata la misura spettrofotometrica su un cammino ottico di 1 mm, alle lunghezze d'onda selezionate. Completata l'analisi, il campione viene rimosso semplicemente asciugando le due testine con carta. Lo strumento è collegato ad un programma, che restituisce i dati di assorbanza e mostra la curva di assorbimento del campione.

La concentrazione di RNA viene determinata indirettamente misurando l'assorbanza (A) a 260 nm, lunghezza d'onda di assorbimento tipica degli acidi nucleici, dalla quale si ricava

anche la quantità totale di RNA in ng (concentrazione [ng/ μ l] * volume campione [μ l]).

Viene anche misurata l'assorbanza a:

- $\lambda = 230$ nm: indice di contaminazione del campione dovuta a carboidrati, fenoli o peptidi.

- $\lambda = 280$ nm: indice di contaminazione del campione dovuta a proteine;

- $\lambda = 320$ nm: lunghezza d'onda associata ad eventuale torbidità e/o rumore di fondo.

Per valutare lo stato di purezza dell'acido nucleico estratto da ogni campione si procede a una stima delle contaminazioni, valutando i rapporti tra l'assorbanza a 260 nm e quella a 230 nm (per contaminazioni da polisaccaridi) e tra 260 nm/280 nm (per contaminazioni da proteine). Generalmente rapporti A_{260}/A_{230} attorno a 2 e A_{260}/A_{280} compreso tra 1,8 e 2 indicano una buona purezza dei campioni.

Nei passaggi successivi, per l'analisi dell'alterazione dell'espressione genica, ho lavorato in collaborazione con il gruppo del prof. Lanfranchi (C.R.I.B.I, Università di Padova).

4.10.3 ANALISI QUALITATIVA DELL'RNA

Ad oggi la principale tecnologia utilizzata nell'analisi qualitativa è quella dell'Agilent 2100 BioanalyzerTM, una piattaforma basata su principi di microfluidica, che esegue una corsa elettroforetica all'interno di microcanali riempiti con una matrice polimerica e con un *dye* fluorescente, in grado di intercalare gli acidi nucleici, che vengono separati in base al peso molecolare, come in una normale elettroforesi. I complessi di DNA o RNA e fluoroforo che vengono separati sono poi rilevati grazie ad un sistema di eccitazione laser e rilevazione di fluorescenza, e, dopo il controllo con un *ladder* che contiene frammenti di lunghezza e concentrazioni note, i segnali vengono tradotti in elettroferogrammi. L'utilizzo di un frammento marker come standard interno, fatto correre insieme al campione, è necessario per allineare nel modo migliore i dati ottenuti dalla corsa del campione nel pozzetto con il *ladder*.

4.10.4 MARCATURA DEI CAMPIONI ED IBRIDAZIONE SU MICROARRAY

I campioni sono stati marcati con Cy3 partendo da 1 μ g di RNA purificato attraverso il kit One-color Quick Amp Labeling, sfruttando la marcatura diretta accoppiata ad un'amplificazione con T7 RNA polimerasi. L'RNA amplificato e marcato viene poi frammentato a 60°C in un Fragmentation Buffer, per produrre campioni di lunghezze comparabili tra loro, per evitare che nell'ibridazione le diverse dimensioni dei frammenti possano creare differenze nella reazione. Dopo aggiunta dell'Hybridization Buffer si può quindi procedere ad un'ibridazione non competitiva tra il target marcato e le sonde, in condizioni strettamente controllate, su un vetrino contenente le sonde corrispondenti a 41000 geni e trascritti umani. Tutti gli esperimenti sono stati eseguiti in triplicato, partendo da tre diverse estrazioni di RNA, marcate in modo indipendente. Si sono effettuate ibridazioni non competitive, facendo ibridare ogni replica su un vetrino diverso, in agitazione in stufa a 65°C

per 12-17 h. Al termine si procede con i lavaggi dei vetrini che sono estremamente importanti per ottenere dei dati di buona qualità, eliminando eventuali aspecifici legati: le soluzioni di lavaggio sono anch'esse fornite dal kit e si mantengono per 1 minuto (per il primo lavaggio a temperatura ambiente, per il secondo a 37°C). Si esegue infine un veloce terzo lavaggio in acetonitrile per 10 secondi circa, per garantire una maggiore pulizia del vetrino.

4.10.5 ANALISI DEI DATI DI ESPRESSIONE

L'analisi dei dati di espressione inizia dal rilevamento della fluorescenza emessa dai fluorofori. Tale operazione è eseguita tramite uno scanner GenPix 4000BTM (Agilent[®]) ad alta risoluzione che eccita i fluorofori a specifiche lunghezze d'onda, registrando poi l'intensità della loro risposta. In questo modo ho acquisito l'immagine di fluorescenza del Cy3 (eccitazione a 550 nm ed registrazione della fluorescenza a 570 nm), e attraverso un software specifico ho effettuato l'acquisizione dell'immagine e la quantificazione della fluorescenza. L'immagine che si ottiene in seguito a tale scansione è un file di formato TIFF (Tagged Image File Format), in cui ad ogni pixel è associato un livello di fluorescenza, in una scala luminosa di tonalità di grigio. Il programma è poi in grado di convertire le tonalità grigie in colori, fornendoci una modalità di visualizzazione più efficace.

Dopo aver sottratto il segnale di background, aver normalizzato i dati sia all'interno dello stesso array che tra i diversi esperimenti effettuati, e averli trasformati in logaritmo in fase 2, facilitandone la successiva analisi, si può procedere all'analisi statistica sui dati (ad esempio la *cluster analysis* che permette di valutare che le repliche tecniche sull'array siano concordanti) e all'identificazione dei geni differenzialmente espressi.

Per l'identificazione dei geni differenzialmente espressi tra controllo e trattato, è stato utilizzato l'algoritmo SAM (*Significance Analysis of Microarrays*), che rappresenta un metodo per identificare i geni che presentino una significativa variazione di espressione basandosi su un confronto tra l'espressione di un gene nei diversi campioni in analisi, corretta da un fattore in grado di tener conto della varianza dei dati ottenuti nei singoli campioni. Il confronto di questo dato con una distribuzione ottenuta permutando tutti i dati in analisi ci fornisce una curva. Il programma individua i geni differenzialmente espressi mediante l'uso di *t*-test gene-specifici: a ciascun gene si assegna una statistica, definita come "differenza relativa" $d(i)$, che tiene conto sia della differenza di espressione che della concordanza di valori in replica. La $d(i)$ è quindi confrontata con una distribuzione calcolata tramite permutazioni dell'intero set di dati in analisi. In questo modo vengono calcolate, per ogni gene, le differenze relative attese $d_E(i)$, contro le quali vengono confrontate le $d(i)$. Per la grande maggioranza dei geni $d(i) \approx d_E(i)$, ma in alcune osservazioni $d(i)$ si discosta dalla retta $d(i) = d_E(i)$: se questa distanza supera una certa soglia Δ viene considerata significativa. A questa lista di geni si associa anche una stima della frequenza di possibili falsi positivi, detta *False Discovery Rate* (FDR).

Una volta identificati gruppi di trascritti differenzialmente espressi, per meglio interpretare i risultati, è necessario acquisire ulteriori informazioni su di essi e suddividerli in categorie funzionali. A tal proposito esistono numerose banche dati consultabili in rete che permettono di comprendere le funzioni molecolari dei geni e i processi biologici che li coinvolgono, e di valutare se ci sono arricchimenti in particolari categorie rispetto ad un insieme di riferimento, rappresentato in questo caso dall'intero genoma umano contenuto nella piattaforma microarray utilizzata. Per questa valutazione complessiva a livello genomico ho utilizzato le liste complete di tutti i geni differenzialmente espressi indentificati e, tramite il tool di DAVID (Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery) Functional Annotation Clustering, ho individuate le categorie funzionali che presentano un arricchimento rispetto all'intero genoma.

4.11 ANALISI DEL CICLO CELLULARE MEDIANTE CITOFLUORIMETRIA A FLUSSO

Attraverso la tecnica di citofluorimetria a flusso già descritta nel paragrafo 4.8, ho analizzato se il trattamento con NP Ludox[®] AS30 o SM30 fosse in grado di indurre un'alterazione della normale progressione del ciclo cellulare, analizzando le cellule in base al contenuto di DNA, opportunamente marcato con propidio ioduro. È stato così possibile effettuare per ogni campione l'analisi quantitativa del contenuto di DNA e discriminare quindi le cellule nelle diverse fasi del ciclo proliferativo (G1, S, G2/M).

Il protocollo sperimentale prevede innanzitutto la semina delle cellule in piastre Petri da 10 cm di diametro (rispettivamente $0,6 \times 10^6$ cellule per la linea CCD-34 Lu, e $0,5 \times 10^6$ cellule per le linee A549 e HT-1080). Dopo 24 h di crescita a 37°C in atmosfera controllata, si procede al trattamento con NP (con dosi da 0,02 a 0,05 mg/ml) e alla preparazione dei campioni per l'analisi al FACS (Figura 34). Per i campioni di controllo è stata effettuata anche un'analisi al tempo 0 h per studiare la distribuzione delle cellule prima di sottoporle a qualunque tipo di trattamento che potrebbe alterare la normale progressione del ciclo cellulare.

Per ogni campione cellulare si raccoglie un numero pari a 1×10^6 cellule mediante tripsinizzazione e conta con camera di Bürker. Per la fissazione le cellule raccolte vengono centrifugate a 125 g per 10 min a 4°C. Il pellet è lavato per 2 volte in 2 ml di PBS 1X freddo, e le cellule sono fissate aggiungendo lentamente 2 ml di etanolo 95% freddo, vorticando lentamente. La sospensione è stata quindi conservata a 4°C.

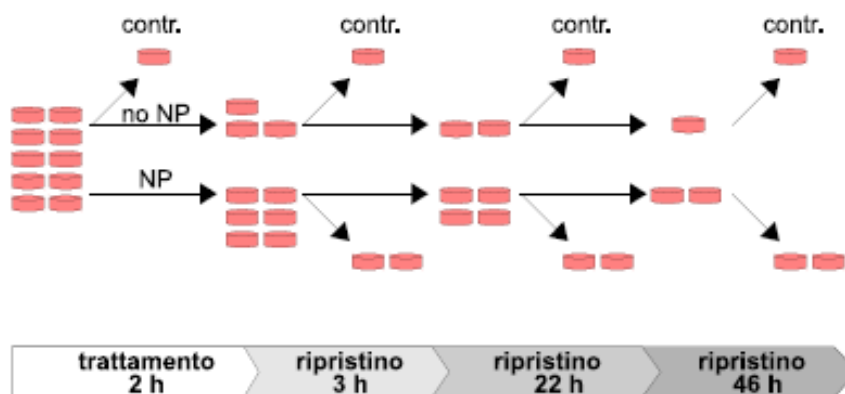


Figura 34: schema riguardante la procedura di trattamento con NP di 2 h in terreno senza siero, seguita da relativi ripristini con terreno completo per 3, 22, 46 h; parte delle piastre cellulari funge da controllo negativo per l'analisi del ciclo cellulare.

Per procedere con l'analisi del campione si rimuove l'etanolo centrifugando la sospensione cellulare a 125 g per 10 min a 4°C e compiendo un lavaggio in 2 ml di acqua bidistillata. Dopo un'ulteriore centrifugazione di 10 min il pellet è risospeso in 1 ml di una soluzione a base di ioduro di propidio (50 µg/ml) e RNasi (100 µg/ml) e incubato a 37°C per 1 h al buio. I campioni vengono analizzati mediante citofluorimetro sfruttando il laser ad argon a 488 nm come sorgente di eccitazione. La fluorescenza emessa dallo ioduro di propidio è misurata nell'intervallo di 585 ± 21 nm e permette di valutare la quantità di DNA cellulare. Per l'acquisizione e per l'analisi dei dati sono stati usati rispettivamente i programmi BD FACSDiva Software e ModFit LT 3.0, che ha permesso di definire il numero e il gate di cellule da analizzare all'interno del dot-plot SSC/FSC, escludendo così dall'analisi i detriti e gli aggregati cellulari. Utilizzando gli istogrammi del contenuto di DNA vs il numero di cellule, il programma permette di calcolare la percentuale delle cellule nelle diverse fasi del ciclo cellulare (G1, S, G2/M).

4.12 ANALISI STATISTICA

I risultati relativi alla vitalità cellulare ottenuti con il saggio colorimetrico MTS e il saggio clonogenico, i dati di induzione di apoptosi dopo colorazione DAPI, i risultati di incremento di produzione di ROS e di induzione di doppie rotture al DNA sono stati analizzati utilizzando il programma di statistica medica per Discipline Biomediche (Mc GrowHill) per valutare i diversi livelli di significatività. In particolare è stato applicato il test *t di Student* per poter effettuare confronti tra due gruppi di campioni.

5. Risultati e discussione

5.1 CARATTERIZZAZIONE CHIMICA DELLE NANOPARTICELLE

Le nanoparticelle Ludox[®] AS30 e SM30 utilizzate in questo lavoro sono un prodotto a marchio registrato della W. R. Grace & Co., ottenute dalla ditta Sigma-Aldrich[®] e caratterizzate in collaborazione con il Dipartimento di Scienze Chimiche dell'Università di Padova. Si presentano come NP di forma sferica, non porose, composte da ossido di silicio amorfo e sono commercializzate come sospensioni colloidali in fase acquosa.

Di seguito sono riportati alcuni dati di caratterizzazione: entrambe le NP sono stabili a pH basico, presentano carica superficiale negativa e la sospensione acquosa è stabilizzata elettrostaticamente da un controione, rispettivamente ammonio per le NP più grandi (AS30) e sodio per le NP più piccole (SM30).

	Controione	potenziale ζ	diametro DLS	diametro TEM	area superficiale (m ² /g)	pH di stabilizzazione
AS30	Ammonio	-25.9 mV	20 ± 4 nm	18 ± 3 nm	230	9.1
SM30	Sodio	-26.3 mV	14 ± 4 nm	9 ± 3 nm	345	10.0

Tabella 6: dati di caratterizzazione chimica delle NP di silice Ludox[®] utilizzate in questo lavoro.

Il valore di potenziale ζ indica il potenziale generato in seguito alla formazione di un doppio strato elettrico (Figura 35) e fornisce informazioni sulle caratteristiche fisiche e chimiche delle particelle in sospensione: un valore di potenziale ζ basso, tra +30 e -30 mV, come nel caso delle NP utilizzate in questo lavoro, è associato ad una instabilità della dispersione colloidale, dovuta alla possibile formazione di aggregati.

Le analisi al dynamic light scattering (DLS) hanno permesso di misurare il diametro idrodinamico delle NP, basandosi sul principio che quando un fascio di luce attraversa una dispersione colloidale le particelle disperdono parte della luce in tutte le direzioni, cambiando la lunghezza d'onda della luce in arrivo, in maniera legata alla dimensione della particella. Le analisi al microscopio a trasmissione elettronica (TEM) hanno infine permesso di confermare i dati di dimensione e forma delle due sospensioni di NP utilizzate in questo lavoro.

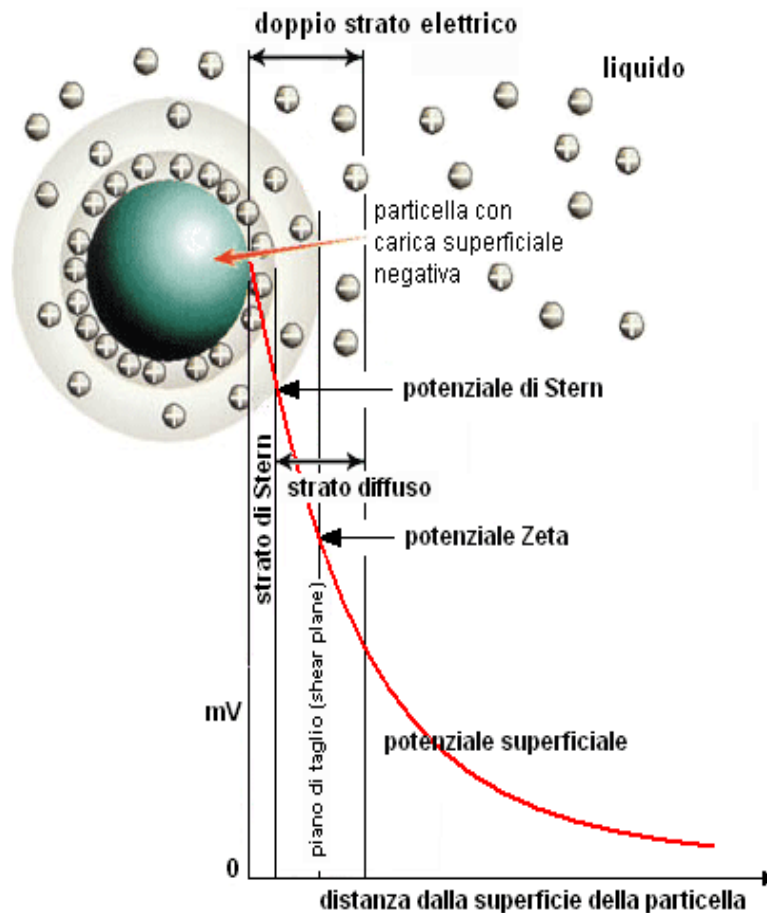


Figura 35: una particella superficialmente carica produce una distribuzione di ioni nella regione che la circonda, provocando un aumento della concentrazione di controioni vicino alla superficie. Lo strato di liquido che circonda la particella costituisce un doppio strato elettrico (lo strato di Stern e lo strato esterno diffuso con interazioni più deboli) attorno ad essa. All'interno dello strato diffuso è possibile individuare un confine teorico entro il quale ioni e particelle formano entità stabili. Il potenziale in corrispondenza di questo confine è conosciuto come potenziale ζ .

Prima di poter essere utilizzate nelle colture cellulari, le nanoparticelle vengono diluite in acqua milliQ, la soluzione a pH basico viene portata ad un intervallo di pH tra 7,3 e 7,5 e infine viene filtrata con filtri a cut-off di 0,2 μm per renderla sterile.

Inoltre, prima di poter procedere con i diversi test effettuati *in vitro* sulle colture cellulari è stato necessario compiere degli studi di stabilità delle NP e verificare la formazione di aggregati una volta sospese nel mezzo di coltura. A questo scopo sono stati effettuati due diversi studi: un'analisi spettrofotometrica e un'analisi al dynamic light scattering della sospensione di NP in differenti soluzioni.

1. Analisi spettrofotometrica UV-visibile

L'analisi spettrofotometrica UV-visibile permette di verificare la presenza di cambiamenti nello spettro di assorbimento nel tempo e a seconda della soluzione in cui sono disciolte le NP, indicando la formazione di interazioni tra queste e le altre componenti in soluzione. Le NP Ludox[®] AS30 e SM30 sono state addizionate alle concentrazioni di 0,1 e 1 mg/ml in soluzioni di acqua, terreno di coltura RPMI e terreno di coltura con una bassa percentuale di siero (3%). Le sospensioni ottenute sono state poi analizzate allo spettrofotometro ($\lambda_{\text{ass}} = 200\text{-}800\text{ nm}$) subito dopo la preparazione (0 h) e dopo 24 h di mantenimento in incubatore a 37°C. I risultati mostrati in figura 36 sono relativi alle NP SM30 alla concentrazione più bassa, ma risultati analoghi sono stati ottenuti per la dose maggiore e per le NP di diametro superiore ad entrambe le concentrazioni.

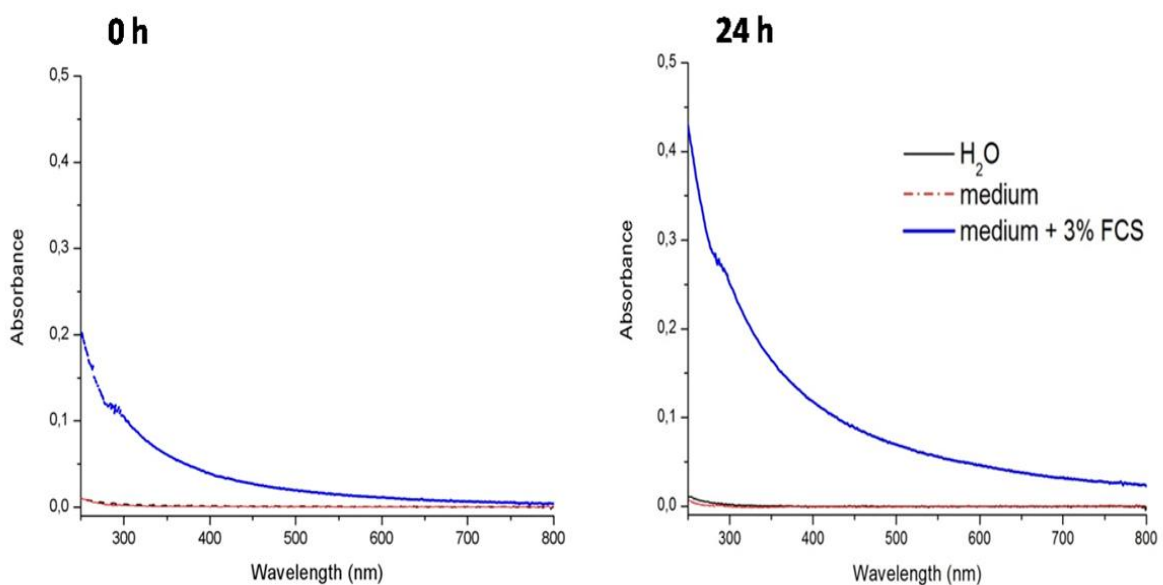


Figura 36: spettro di assorbimento di una sospensione di NP Ludox[®] SM30 alla concentrazione di 0,1 mg/ml in acqua, in terreno di coltura RPMI e in terreno RPMI con l'aggiunta del 3% di siero, subito dopo la preparazione delle soluzioni (0 h) e dopo 24 h di incubazione a 37°C.

Gli spettri mostrano l'assenza di assorbimento delle NP una volta disciolte in acqua o in mezzo di coltura. Lo spettro invece subisce delle modifiche non appena si aggiunge alla sospensione il siero anche in piccola percentuale (3%): già al tempo 0 h si registra un aumento sensibile dell'assorbimento e un cambiamento nello spettro con il fenomeno di dispersione della luce. Questo è da attribuirsi a un'interazione della radiazione con la materia e, come mostrato in figura 36, aumenta con l'aumentare del tempo di incubazione. Questi risultati ci

permettono di affermare che le NP interagiscono con le proteine del siero con la probabile formazione nel tempo di aggregati di dimensioni maggiori.

2. Analisi al dynamic light scattering

Per confermare questi dati preliminari di stabilità delle NP, si è proceduto con una seconda analisi al dynamic light scattering per permettere di verificare l'eventuale aggregazione delle NP studiando il profilo di distribuzione del loro diametro in soluzione. NP Ludox AS30 e SM30 alle concentrazioni 0,1 e 1 mg/ml sono addizionate alla soluzione salina di PBS, al terreno di coltura RPMI e al terreno con il 3% di siero per 24 h. Le sospensioni ottenute sono state analizzate al DLS presso il Dipartimento di Scienze Chimiche dell'Università di Padova e i risultati sono riportati in figura 37. Per la sospensione di NP SM30 in PBS e anche in terreno di coltura RPMI, le tre curve di distribuzione misurate a distanza di 2 minuti sullo stesso campione sono molto simili l'una all'altra e indicano un diametro medio di circa 13 nm, a conferma dei dati di caratterizzazione chimica (vedi tabella 6). Le NP quindi in soluzione salina e in terreno di coltura sono stabili e non subiscono modifiche chimico-fisiche tali da causare la formazione di aggregati. Mantenendo invece le NP SM30 in sospensione in terreno di coltura con l'aggiunta del 3% di siero per 24 h a 37°C, i tre profili di distribuzione dello stesso campione risultano alquanto differenti con misurazioni fino a 35 nm di diametro medio: questo sta ad indicare una forte instabilità del sistema che probabilmente forma degli aggregati con legami reversibili con le proteine del siero.

Analoghi risultati sono stati ottenuti per le sospensioni a dosi più basse di NP e per le NP Ludox[®] AS30, confermando la rapida formazione di aggregati di dimensioni più o meno grandi in presenza di siero nella sospensione.

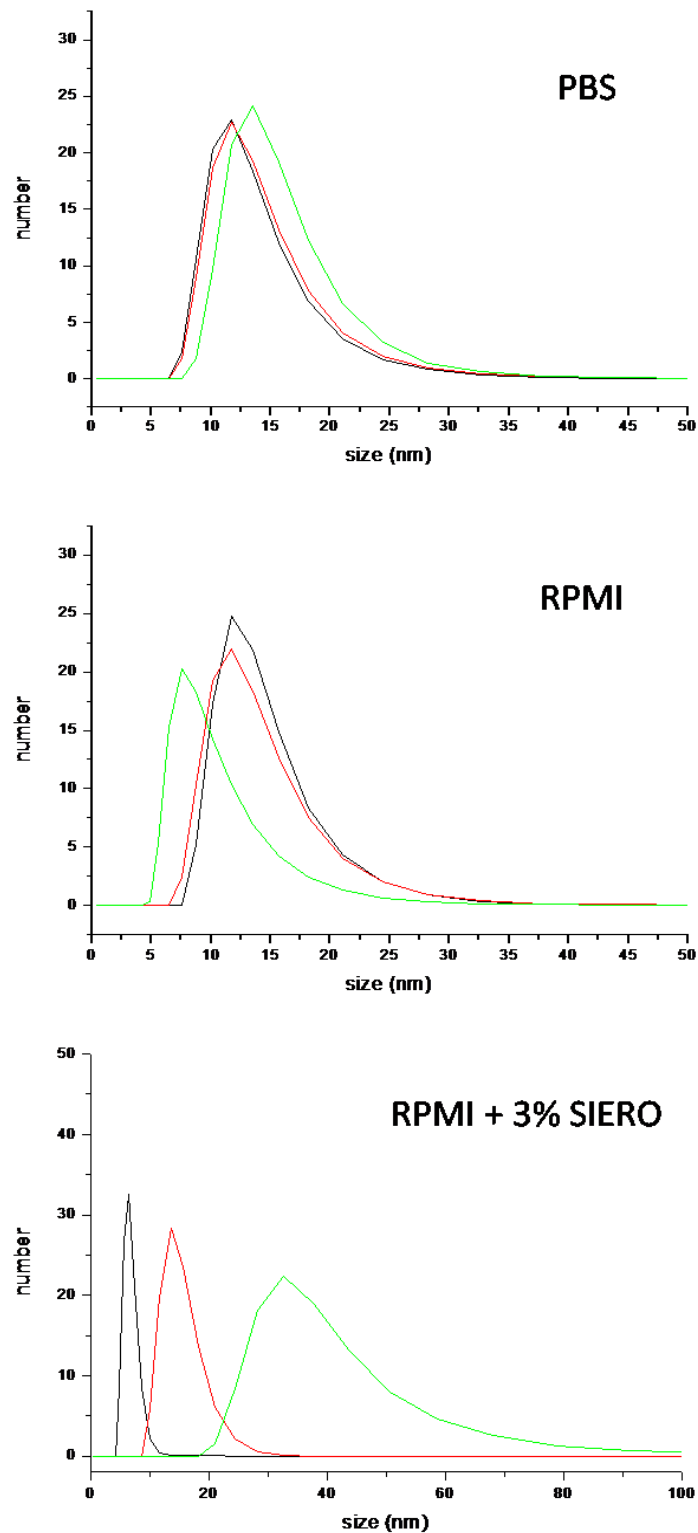


Figura 37: profili di distribuzione al DLS per le nanoparticelle Ludox[®] SM30 alla concentrazione 1 mg/ml in PBS, in terreno di coltura e in terreno con il 3% di siero. Per ogni grafico sono riportate 3 misurazioni dello stesso campione effettuate a distanza di 2 minuti l'una dall'altra, indicate con i tre diversi colori in figura.

5.2 TRATTAMENTI CELLULARI CON NANOPARTICELLE LUDOX®

Per valutare la tossicità delle NP Ludox®, le tre linee cellulari d'interesse (CCD-34 Lu, A549 e HT-1080) sono state trattate a 24 h dalla semina con dosi crescenti di NP AS30 o SM30 (comprese tra 0,005 e 0,7 mg/ml) per diversi tempi di incubazione (Figura 24, vedi paragrafo 4.4). I trattamenti sono stati effettuati con il 3% di siero (per 24, 48 e 72 h) o per 2 h senza siero, visti i risultati dei test di stabilità, descritti nel paragrafo precedente, che hanno dimostrato che le NP in presenza anche di piccole percentuali di siero aggregano, presumibilmente con un legame reversibile tra esse e le proteine del siero.

La scelta del migliore tempo di incubazione delle cellule senza siero è stata effettuata valutando la capacità delle tre linee cellulari d'interesse di crescere in totale assenza di siero. A questo scopo le cellule, dopo essere state seminate e mantenute a 37°C per 24 ore con il 10% di siero, sono state fatte crescere senza siero per diversi tempi (30 minuti, 2 h, 5 h, 8 h, 15 h e 24 h). In seguito è stata effettuata la conta cellulare ai tempi indicati per determinare la curva di crescita in assenza di siero e confrontarla con la rispettiva curva di crescita in presenza del 10% di siero, normalizzando i dati in base al controllo contato a 24 h dalla semina, senza effettuare alcun tipo di trattamento (Figura 38).

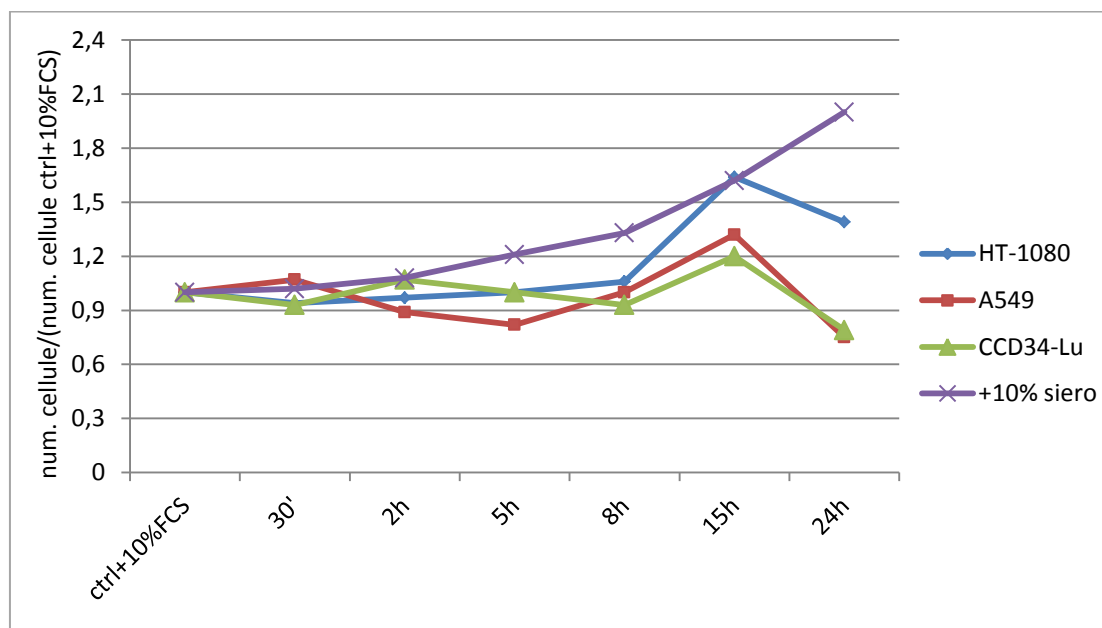


Figura 38: curve di crescita in assenza di siero delle tre linee cellulari utilizzate in questo lavoro. I dati sono normalizzati sulla base del rispettivo controllo (posto con valore pari a 1) che non ha subito alcun tipo di trattamento. La curva riportata in viola si riferisce invece a cellule fatte crescere con il 10% di siero e sottoposte a tripsinizzazione e successiva conta cellulare negli stessi intervalli di trattamento senza siero (in questo caso è stata scelta la linea normale di fibroblasti CCD-34 Lu che ha un tempo di duplicazione di 24 h).

I risultati mostrano che tutte e tre le linee cellulari prese in esame si discostano di molto dalla normale curva di crescita dopo essere state fatte crescere per 24 h in totale assenza di siero. Analizzando i tempi di incubazione senza siero più brevi si può concludere che non si ha un calo della vitalità per tutte e tre le linee cellulari solo fino a 2 h di crescita in terreno senza siero, e tale tempo è stato perciò scelto per il trattamento con le NP in solo terreno di crescita. A maggiore conferma di questo dato ho poi effettuato lo stesso test incubando le cellule fino ad un tempo di 8 h senza siero con due dosi diverse di NP Ludox[®] SM30: la dose 0,02 mg/ml e una dose doppia pari a 0,04 mg/ml. In figura 39 sono riportati i risultati relativi alla linea cellulare HT-1080 ma dati analoghi sono stati ottenuti anche per le altre due linee cellulari prese in esame: il tempo di 2 h senza siero è risultato essere il tempo di incubazione migliore poichè le cellule di controllo non subiscono scostamenti dalla normale curva di crescita con il 10% di siero (vedi anche figura 38), quindi il calo di vitalità dopo il trattamento con NP è da attribuire totalmente ad esse e non all'assenza di siero nel mezzo di coltura. Il numero di cellule inoltre subisce dopo 2 h un calo proporzionale alla dose di trattamento, dato che non è ottenibile dopo solo 30 minuti di incubazione e che non è più riscontrabile aumentando il tempo di trattamento a 5 h o 8 h. Infatti il numero di cellule per questi tempi di incubazione tende ad andare a zero per entrambe le dosi di trattamento.

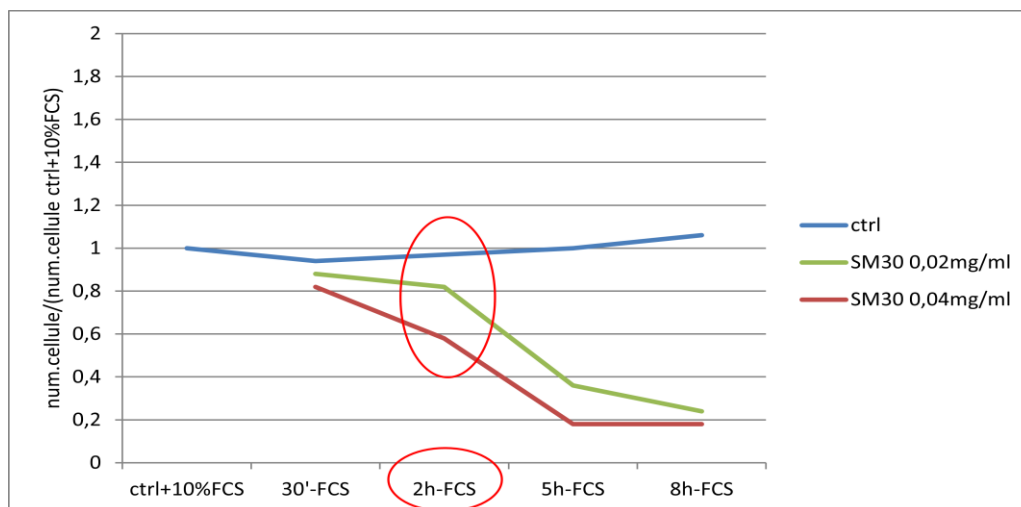


Figura 39: curve di crescita in assenza di siero della linea cellulare HT-1080 mantenuta, dopo 24 h dalla semina, in totale assenza di siero per 30 minuti, 2 h, 5 h e 8 h, oppure sottoposta per gli stessi tempi di incubazione a un trattamento con NP SM30 in assenza di siero a due diverse dosi: 0,02 e 0,04 mg/ml. I dati sono normalizzati sulla base del rispettivo controllo (ctrl+10%FCS) che, dopo essere stato mantenuto a 37°C per 24 h con il 10% di siero, non ha subito alcun tipo di trattamento ma è stato subito sottoposto a una conta cellulare.

Ottenuti questi dati si è potuto quindi stabilire per i trattamenti con le NP Ludox[®] in assenza di siero un tempo di incubazione di 2 h per tutte e tre le linee cellulari umane utilizzate in questo lavoro.

5.3 TEST DI VITALITÀ CON SAGGIO MTS

Con questo saggio ho valutato la vitalità cellulare della linea normale CCD-34 Lu e delle due linee cellulari tumorali A549 e HT-1080 dopo trattamento a concentrazioni crescenti di NP Ludox[®] AS30 e SM30. Le cellule sono incubate per 24, 48 e 72 h con NP a diverse dosi in terreno con il 3% di siero, oppure per 2 h in terreno senza siero, facendo seguire il trattamento da un ripristino in terreno completo con il 10% di siero per 3 h o per 22 h prima di procedere con il saggio dell'MTS. Le concentrazioni di NP saggate nei test con siero sono comprese tra 0,1 e 0,7 mg/ml, mentre nei test effettuati in assenza di siero le dosi di NP sono inferiori e vanno da 0,025 a 0,2 mg/ml. In figura 40 sono riportati i valori di LD₅₀ dei due tipi di NP calcolati per ciascuna tipologia di trattamento e linea cellulare. Il valore LD₅₀, in generale, si riferisce alla dose di una sostanza tossica in grado di uccidere il 50% di una popolazione campione; in particolare, in questo studio, indica per ciascuna linea cellulare la concentrazione di NP alla quale è stata riscontrata con il saggio MTS una mortalità cellulare del 50%.

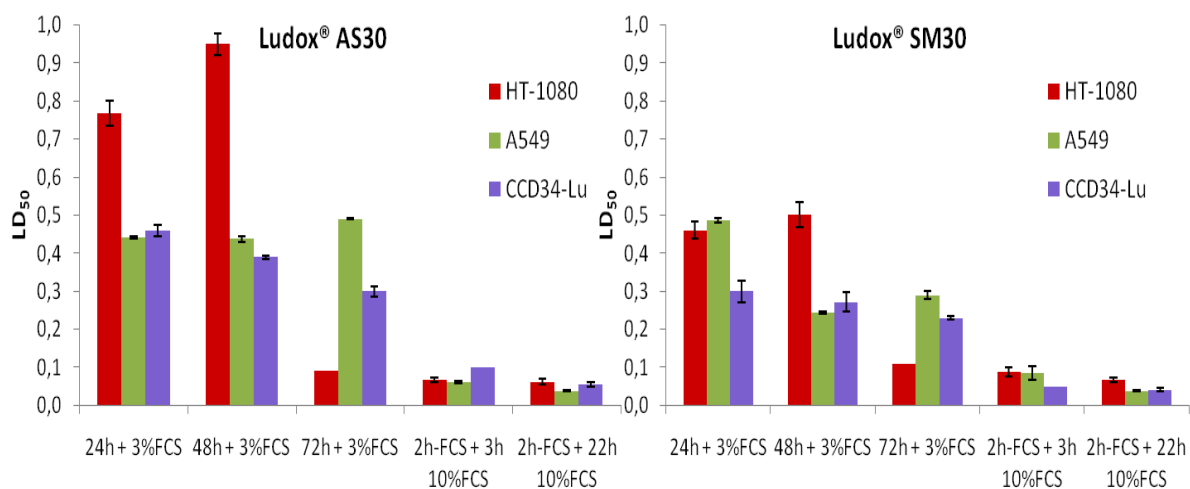


Figura 40: valori di LD₅₀ (dose letale 50) calcolati con il saggio colorimetrico MTS nelle linee cellulari CCD-34 Lu, A549 e HT-1080 dopo incubazione con NP Ludox[®] AS30 e SM30 per diversi tempi di trattamento: 24, 48 e 72 h con il 3% di siero nel mezzo di coltura, oppure 2 h di trattamento senza siero, seguite da un ripristino in terreno completo di 3 h o di 22 h.

Le deviazioni standard si riferiscono al valore medio di LD₅₀ (media LD₅₀ ± σ_n) di n esperimenti di MTS (3 ≤ n ≤ 15).

Si può osservare innanzitutto che per entrambe le NP i valori di LD₅₀ sono notevolmente inferiori per i trattamenti senza siero rispetto ai valori di LD₅₀ per i trattamenti con il 3% di siero, dimostrando ancora una volta che la presenza di siero nel mezzo di coltura causa la formazione di aggregati (vedi paragrafo 5.1). Tali aggregati risultano meno tossici per le cellule probabilmente perchè non sono in grado di penetrare nelle membrane cellulari data la loro maggiore dimensione. Questo risultato giustifica la scelta delle dosi di trattamento più basse per le incubazioni senza siero. In generale poi, i valori di LD₅₀ per le NP più piccole (SM30) sono inferiori rispetto alle NP di diametro maggiore (AS30) per tutti i tempi di trattamento e per tutte e tre le linee cellulari, in accordo con studi di letteratura che dimostrano la maggiore tossicità di particelle con diametro inferiore e area superficiale maggiore (Lin et al., 2006; Napierska et al., 2009). Confrontando inoltre i valori di LD₅₀ della linea cellulare normale CCD-34 Lu rispetto a quelli calcolati per le due linee tumorali, i primi risultano generalmente inferiori, mentre la linea cellulare tumorale HT-1080 è quella che si è dimostrata più resistente, tranne per i tempi di incubazione lunghi (72 h).

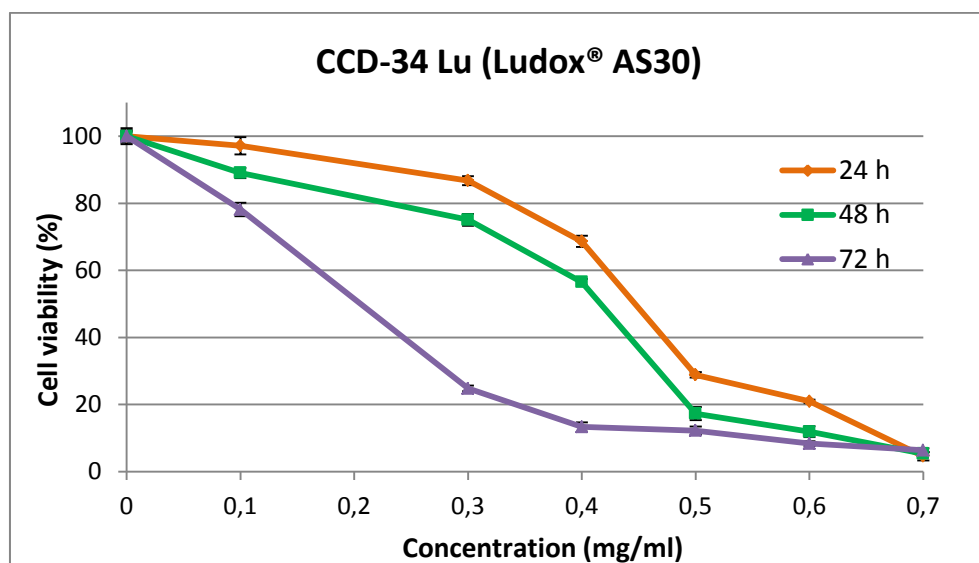


Figura 41: effetto citotossico dose e tempo-dipendente delle NP Ludox® AS30 dimostrato tramite il saggio colorimetrico MTS nella linea cellulare CCD-34 Lu dopo trattamento di 24, 48 o 72 h con dosi crescenti di NP in sospensione nel mezzo di coltura con il 3% di siero. Analoghi risultati sono stati ottenuti per le NP più piccole e anche per le altre due linee cellulari utilizzate in questo lavoro.

I dati rappresentano le medie \pm deviazione standard ($n = 6$).

Con i risultati ottenuti tramite il test di vitalità MTS si può infine concludere che, oltre a un effetto dose-dipendente delle NP in tutte le linee cellulari e i tempi di trattamento indagati, in

accordo con altri risultati riportati in letteratura (Lin et al., 2006; Wang et al., 2009), per i trattamenti in presenza di siero si osserva in generale anche un effetto tempo-dipendente (Figura 41) per entrambe le NP e per tutte e tre le linee cellulari prese in esame: aumentando il tempo di incubazione (24-48-72 h) diminuiscono i valori di LD₅₀, ad eccezione di pochi casi come per la linea HT-1080 trattata per 48 h (vedi figura 40).

5.4 TEST DI VITALITÀ CON SAGGIO CLONOGENICO

Il saggio clonogenico permette di misurare la vitalità cellulare in base alla capacità di una singola cellula di formare una colonia a partire da una sospensione cellulare opportunamente diluita al momento della semina. Gli effetti sulla vitalità cellulare dovuti al trattamento con NP Ludox[®] AS30 e SM30 sono stati valutati sulla base dell'alterazione dell'efficienza di clonaggio (E.C.) nelle tre linee cellulari CCD-34 Lu, A549 e HT-1080, dopo trattamento di 24 h in terreno con il 3% di siero, oppure di 2 h senza siero, seguite da un ripristino in terreno completo di 3 h o 22 h, per verificare il potenziale citotossico delle NP Ludox[®] in condizioni in cui non si verifica aggregazione. Da prove effettuate precedentemente ho verificato che le cellule CCD-34 Lu richiedono, per poter effettuare il saggio clonogenico, la presenza del 15% di siero nel terreno di coltura e di cellule feeder layer (in questo caso fibroblasti umani fetali normali IMR-90) che fungono da supporto meccanico e metabolico per la crescita delle colonie.

In figura 42 sono riportati i risultati del saggio clonogenico nelle tre linee cellulari incubate con NP AS30 e SM30 a dosi crescenti per 24 h in presenza del 3% di siero. Dai risultati ottenuti si può notare innanzitutto come l'efficienza di clonaggio in 3% di siero risulti più bassa rispetto al controllo con il 10% di siero per tutte e tre le linee cellulari, a riprova dell'importanza del siero per il normale sviluppo di una coltura cellulare. Per i trattamenti con le NP è stata però scelta, come già visto nel saggio di vitalità MTS (vedi paragrafo 5.3) una dose più bassa di siero (3%) che permettesse una buona crescita cellulare ma che non andasse troppo ad interferire con la stabilità delle NP in soluzione. Dai dati riportati si evince che l'efficienza di clonaggio è risultata inferiore dopo trattamento con NP SM30, rispetto alle AS30 di diametro maggiore. La linea cellulare A549 si è dimostrata la più resistente: dopo trattamento con NP AS30 alla dose 0,3 mg/ml l'efficienza di clonaggio è pari al 10% mentre le altre due linee cellulari alla stessa dose hanno una E.C. pari a zero. Le CCD-34 Lu mostrano una E.C. pari a zero già alla dose 0,2 mg/ml dopo trattamento con le stesse NP, mentre per quelle di diametro inferiore la dose alla quale queste cellule non hanno più capacità di clonare si abbassa addirittura a 0,1 mg/ml, dimostrando la maggiore sensibilità della linea cellulare normale rispetto alle due linee tumorali, come già verificato tramite il saggio MTS (vedi paragrafo 5.3).

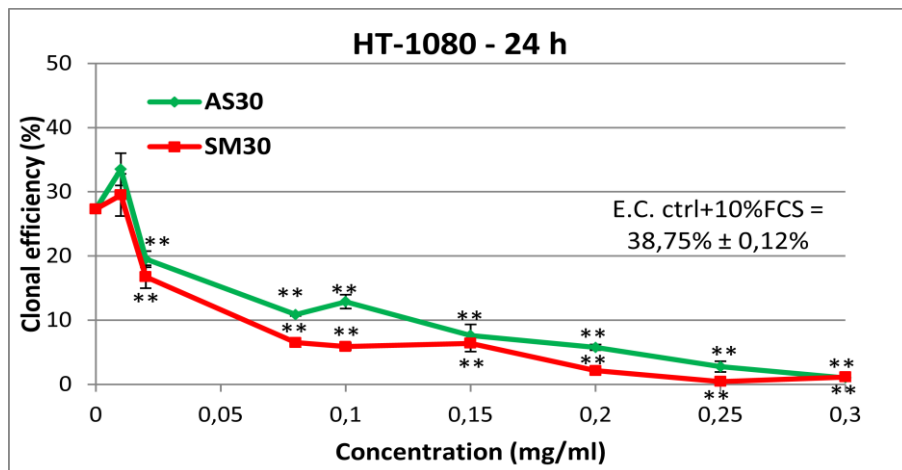
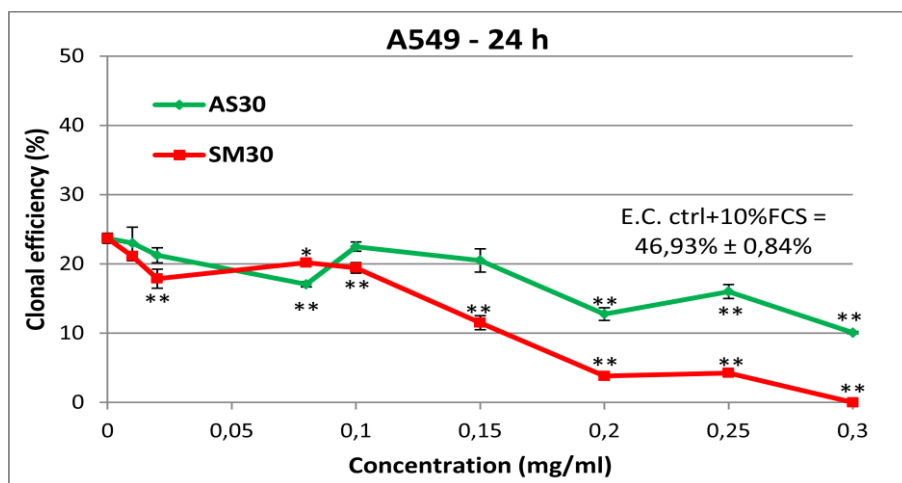
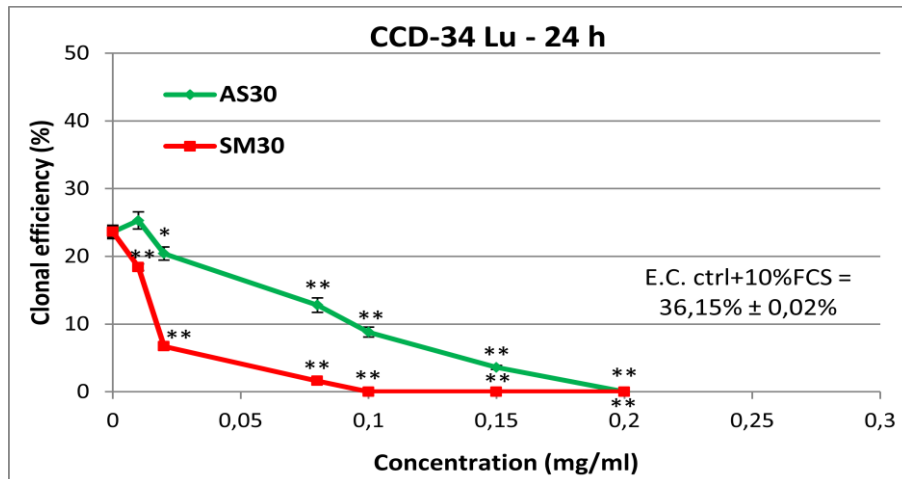


Figura 42: efficienza di clonaggio (%) delle linee cellulari CCD-34 Lu, A549 e HT-1080 dopo trattamento di 24 h con NP AS30 e SM30 in terreno con il 3% di siero. Per ogni linea cellulare è riportata anche l'efficienza di clonaggio di cellule di controllo seminate con il 10% di siero.

I dati rappresentano le medie ± deviazione standard ($3 \leq n \leq 12$).

* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *t* test rispetto alle cellule di controllo seminate con il 3% di siero.

È stata poi valutata la capacità di queste tre linee cellulari di formare cloni dopo trattamento con NP AS30 e SM30 in totale assenza di siero (con 3 o 22 h di ripristino in terreno completo) per studiare la tossicità delle Ludox[®] in condizioni in cui non vanno incontro ad aggregazione. I risultati riportati in figura 44 mostrano innanzitutto che, come già riscontrato nel saggio di vitalità MTS, le dosi utilizzate nelle incubazioni senza siero (da 0,01 a 0,5 mg/ml) sono molto più basse rispetto a quelle dei trattamenti con siero (da 0,01 a 0,3 mg/ml, vedi Figura 42) poichè si osserva un calo dell'efficienza di clonaggio e della vitalità cellulare molto maggiore nelle condizioni in cui le NP non aggregano, ovvero in assenza di siero, probabilmente perchè è favorito il loro ingresso nelle cellule. Questo dato è rappresentato anche nella figura 43 portando come esempio la dose 0,02 mg/ml per entrambi i tipi di NP nelle cellule CCD-34 Lu.

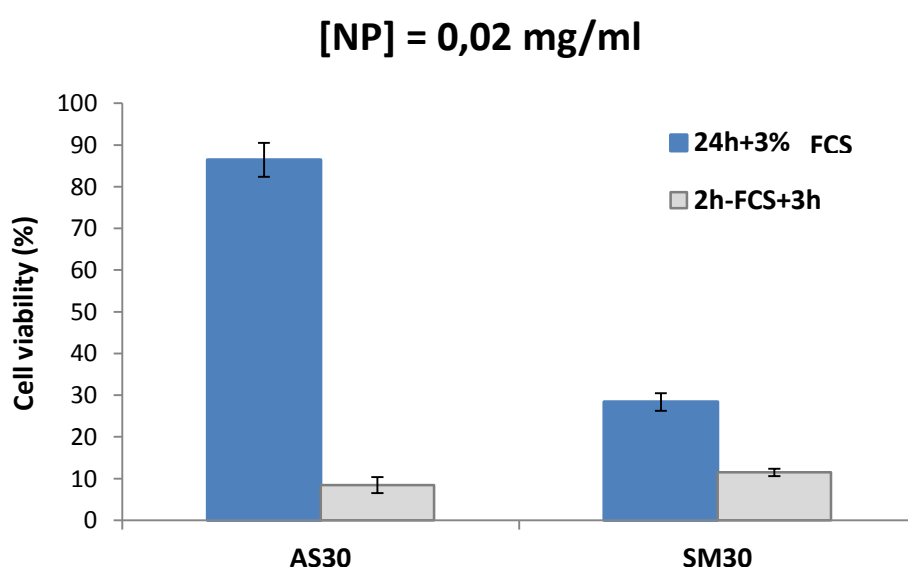


Figura 43: vitalità cellulare calcolata con il saggio clonogenico in cellule CCD34-lu trattate con concentrazione 0,02 mg/ml di NP AS30 e SM30 ai tempi 24 h con 3% di siero e 2 h senza siero seguite da un ripristino di 3 h. Le cellule trattate con NP in terreno con 3% di siero danno, a parità di dose, un valore di sopravvivenza cellulare molto più alta rispetto al trattamento senza siero.

I dati rappresentano le medie \pm deviazione standard ($n = 4$).

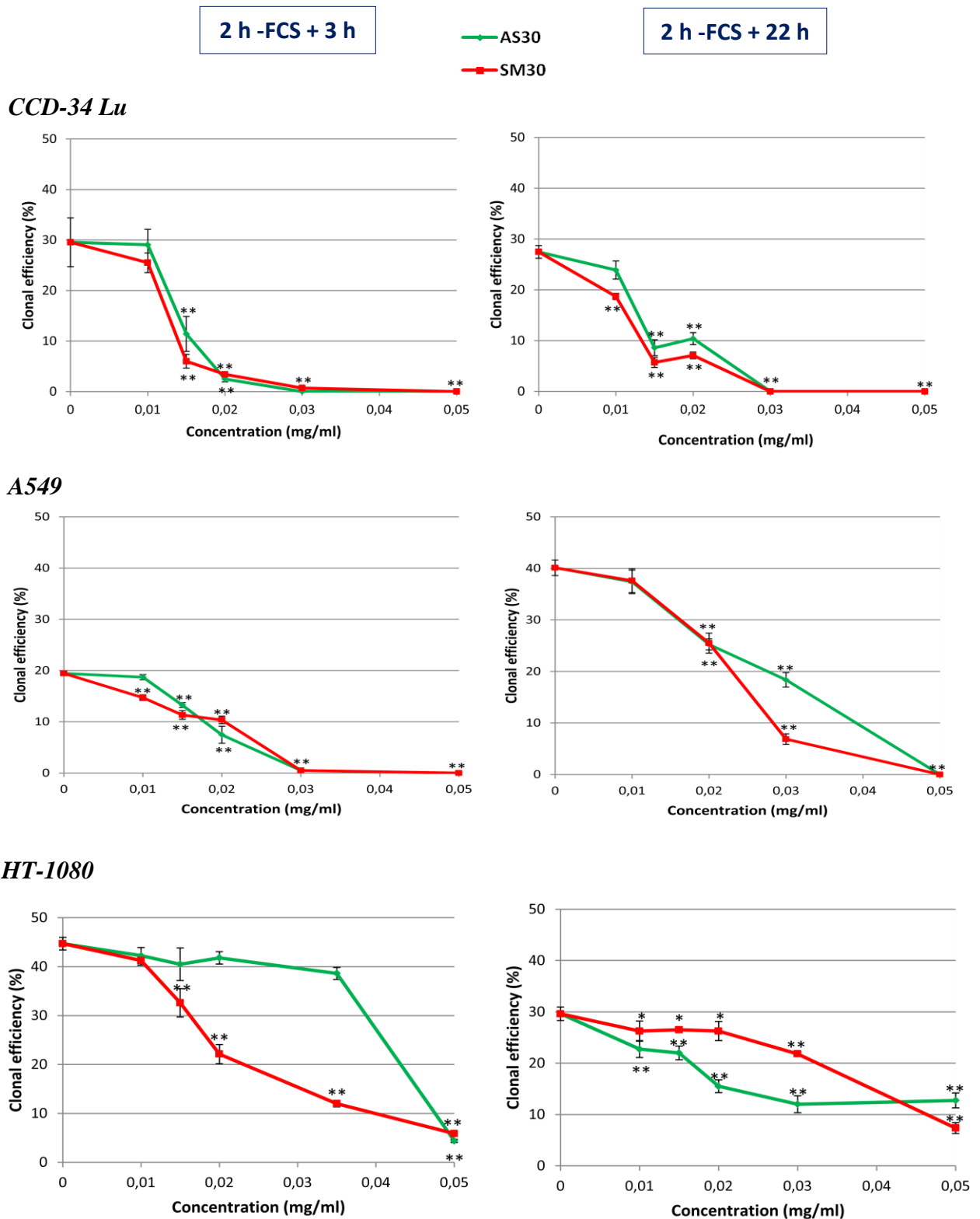


Figura 44: efficienza di clonaggio (%) delle linee cellulari CCD-34 Lu, A549 e HT-1080 dopo trattamento di 2 h con NP AS30 e SM30 in terreno senza siero, seguito da un ripristino in terreno completo con il 10% di siero di 3 o di 22 h.

I dati rappresentano le medie \pm deviazione standard ($3 \leq n \leq 12$).

* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, t test rispetto alle cellule di controllo

Le due linee cellulari tumorali risentono del tempo di ripristino in terreno completo dopo le 2 h di trattamento: l'E.C. nelle cellule di controllo passa dal 20 al 40% nella linea A549 aumentando da 3 h a 22 h il tempo di ripristino, mentre per le cellule HT-1080 si osserva il fenomeno contrario, ovvero le cellule dopo essere state mantenute 2 h senza siero sono più capaci di formare cloni dopo un tempo breve di ripristino piuttosto che dopo un tempo più lungo (l'E.C. si abbassa infatti da un 45 a un 30% circa). Di conseguenza, subendo le cellule di controllo queste variazioni a seconda del tempo in cui sono mantenute in terreno completo dopo il trattamento, anche i campioni trattati con NP presentano un'efficienza di clonaggio diversa in base al tempo di ripristino, ovvero all'aumentare di quest'ultimo cresce l'E.C. nelle cellule A549 e diminuisce nelle HT-1080, in maniera proporzionale alla dose.

Si può notare inoltre che, anche in questi esperimenti condotti in assenza di siero, si è verificato generalmente un effetto dose-dipendente e un calo dell'efficienza di clonaggio più significativo in seguito ad incubazioni con le NP di diametro inferiore (SM30), tranne per le linee cellulari HT-1080 dopo il tempo di 22 h di ripristino.

Come già riscontrato nel saggio MTS infine, la linea cellulare normale CCD-34 Lu si è dimostrata più sensibile rispetto alle due linee tumorali, mentre la linea cellulare più resistente al trattamento con NP Ludox[®] non è la linea A549, come negli esperimenti di clonaggio condotti dopo trattamento di 24 h con il 3% di siero, ma bensì la linea cellulare HT-1080, in accordo con i dati di vitalità del saggio MTS (vedi paragrafo 5.3).

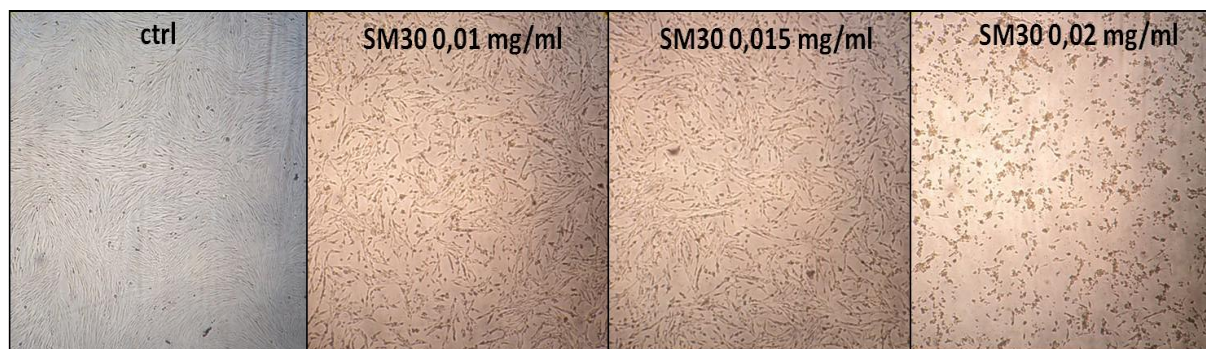


Figura 45: immagini al microscopio ottico di cellule CCD-34 Lu di controllo oppure trattate con NP SM30 a tre diverse dosi (0,01-0,015-0,02 mg/ml) per 2 h senza siero seguite da un ripristino in terreno completo di 22 h: dopo trattamento con NP le cellule adese iniziano a staccarsi dal supporto e anche le cellule che rimangono attaccate hanno un cambiamento morfologico e tendono ad assumere una forma meno allungata fino a presentarsi notevolmente danneggiate per dosi di NP più elevate.

5.5 CONFRONTO TRA I SAGGI DI VITALITÀ CELLULARE

I due saggi di vitalità utilizzati in questo lavoro, ovvero il saggio MTS e il saggio clonogenico, hanno permesso di valutare come varia la vitalità cellulare in seguito al trattamento con NP Ludox[®] AS30 e SM30 a diverse concentrazioni e dopo diversi tempi di incubazione. I due test però si basano su proprietà diverse: il saggio clonogenico infatti valuta la vitalità cellulare a lungo termine espressa come la capacità di formare cloni partendo da una popolazione cellulare seminata a bassa densità; il saggio MTS, invece, permette di rilevare la vitalità cellulare al termine del periodo di trattamento, misurando l'attività delle deidrogenasi, prevalentemente mitocondriali, che possono mantenere la loro attività anche in casi di cellule gravemente danneggiate. Queste differenze giustificano la discordanza dei dati ottenuti con i due saggi: infatti, a parità di concentrazione, i valori di vitalità cellulare osservati per il saggio clonogenico sono sensibilmente inferiori a quelli rilevati tramite saggio MTS per tutte e tre le linee saggiate. Ad esempio, come riportato in figura 46, per la linea cellulare CCD-34 Lu, la vitalità percentuale ricavata dall'E.C. alla concentrazione 0,03 mg/ml in seguito a trattamento di 2 h senza siero e ripristino di 3 h in terreno completo è prossima allo zero, mentre nelle stesse condizioni la vitalità rilevata tramite saggio MTS è ancora del 100%.

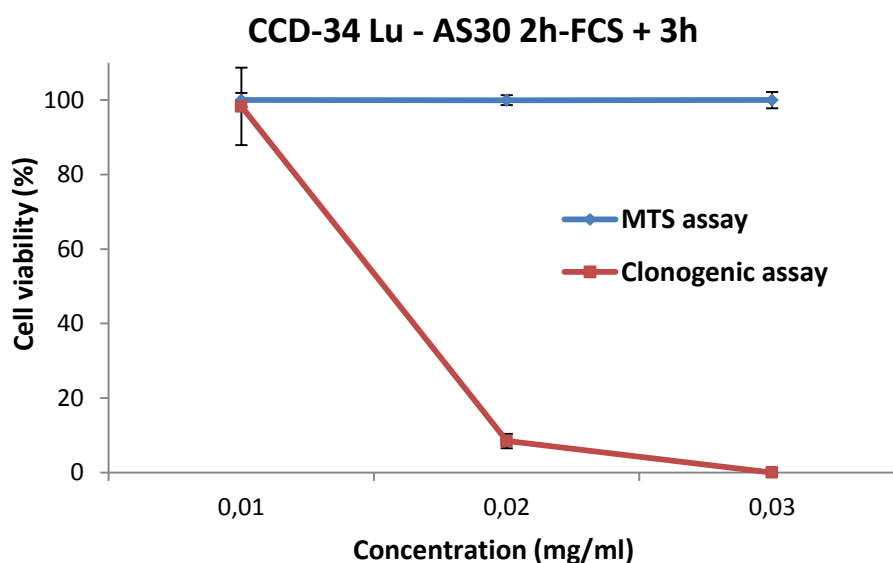


Figura 46: confronto tra saggio clonogenico e saggio MTS in cellule CCD-34 Lu incubate con NP AS30 a tre diverse dosi, con un trattamento di 2 h senza siero + 3 h di ripristino in terreno completo.

Per entrambi i saggi comunque si può concludere che:

- la vitalità cellulare è inversamente proporzionale alla dose di NP utilizzata nei trattamenti;

- i trattamenti senza siero sono più tossici per tutte e tre le linee cellulari saggiate;
- le NP SM30 risultano più tossiche delle NP di diametro maggiore;
- la linea di fibroblasti normali CCD-34 Lu è la più sensibile ai trattamenti con entrambe le NP rispetto alle due linee tumorali.

5.6 INDUZIONE DI APOPTOSI

Per effettuare degli studi preliminari sul meccanismo di morte cellulare indotto dal trattamento con NP Ludox[®], in questo lavoro è stato indagato se le tre linee cellulari utilizzate (CCD-34 Lu, A549 e HT-1080) vanno incontro a morte cellulare tramite apoptosi. A questo scopo è stata utilizzata innanzitutto la colorazione tramite il fluoroforo DAPI, che è un intercalante del DNA e consente di evidenziare la morfologia nucleare dopo osservazione al microscopio a fluorescenza: qualora la cellula sia in un avanzato stadio di apoptosi dopo trattamento con nanoparticelle, presenterà corpi apoptotici che appariranno come un insieme di vescicole fluorescenti di dimensioni inferiori a quelle nucleari (Figura 47).

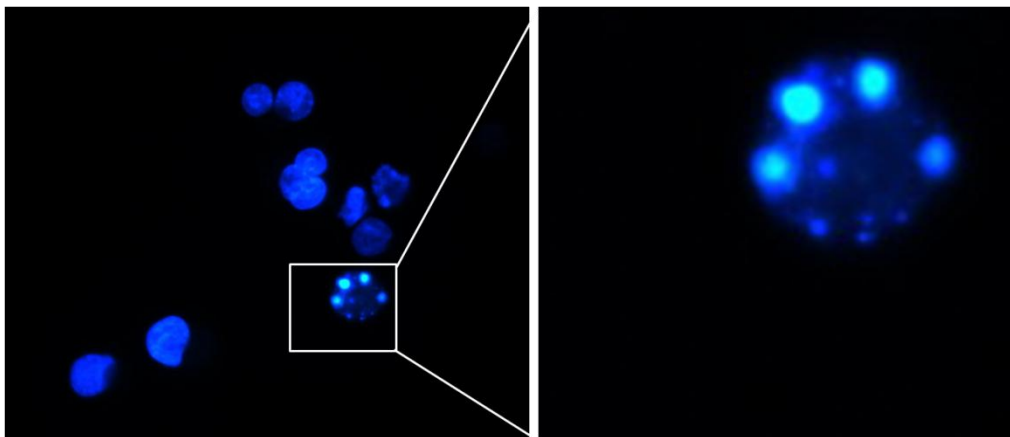


Figura 47: colorazione DAPI di cellule A549 trattate con NP Ludox[®] SM30 alla dose 0,04 mg/ml per 2 h in totale assenza di siero, seguite poi da un ripristino in terreno completo di 22 h. Nel riquadro a destra è riportato un ingrandimento di una cellula apoptotica.

Le tre diverse linee cellulari sono state trattate per 2 h in terreno senza siero con una concentrazione di NP Ludox[®] AS30 o SM30 di 0,04 mg/ml. Le cellule sono state poi fissate e colorate dopo 22 h dalla fine del trattamento. Dal grafico mostrato in figura 48 si osserva che le NP Ludox[®] inducono morte cellulare programmata nelle due linee tumorali A549 e HT-

1080, in percentuale significativa solamente dopo trattamento con le NP di diametro inferiore (SM30), in accordo con i dati di tossicità riportati nei paragrafi precedenti. Inoltre, l'indice apoptotico aumenta considerevolmente nella linea cellulare HT-1080 rispetto alle A549, sia dopo trattamento con AS30 che con SM30: la percentuale di cellule in apoptosi va dal 4% del controllo al 12,2% del trattato con le NP di diametro maggiore, fino a un 24,81% per il campione trattato con le NP più piccole (SM30). Per questa dose e questo tempo di trattamento con SM30 le cellule HT-1080 mostrano una vitalità cellulare del 45% (vedi E.C. in figura 44): si può quindi concludere che del 55% di cellule HT-1080 che muoiono in seguito al trattamento con NP SM30, il 25% circa va incontro a morte cellulare programmata, mentre il rimanente 30% muore per processi differenti dall'apoptosi. Le cellule infatti possono rispondere all'attività citotossica di qualunque agente con diverse modalità che possono essere l'arresto del ciclo cellulare, l'induzione di senescenza o la morte per necrosi o per apoptosi (Blagosklonny, 2000). Questo giustifica anche l'assenza di induzione di apoptosi osservata per la linea cellulare CCD-34 Lu. Gli indici apoptotici di questa linea dopo trattamento con NP AS30 (0,25%) o SM30 (0,1%) non si discostano dal controllo che presenta un indice apoptotico pari a 0,28%. Tale risultato è in accordo con studi di letteratura che dimostrano che in questo tipo di cellule non si verifica induzione di morte cellulare programmata da parte di agenti chimici o fisici (Hampel et al., 2005).

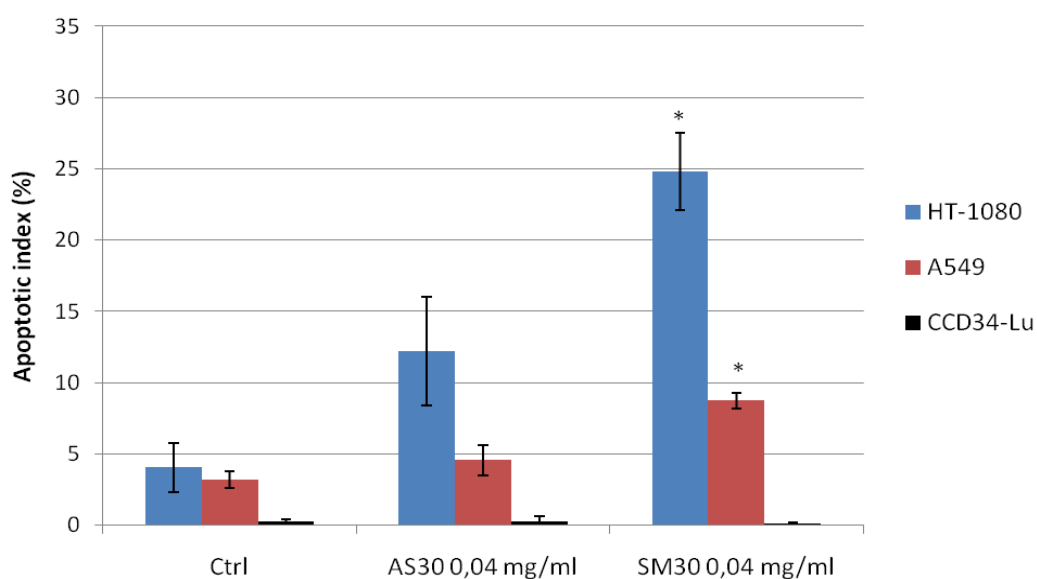


Figura 48: indice apoptotico rilevato tramite colorazione DAPI per le tre linee cellulari testate con NP Ludox® AS30 e SM30 alla dose 0,04 mg/ml per 2 h in totale assenza di siero, seguite poi da un ripristino in terreno completo di 22 h. I dati rappresentano le medie \pm deviazione standard ($n = 2$).

* $p < 0,05$, t test rispetto alle cellule di controllo

L'induzione di apoptosi è stata in seguito valutata nelle cellule A549 e HT-1080 anche mediante il saggio fluorimetrico di attivazione della caspasi-3, una cistein-proteasi "effettrice" che taglia precisi substrati proteici dando corso al processo apoptotico. Le due linee cellulari sono state sottoposte a un trattamento di 2 h (seguito da 22 h di ripristino in terreno completo) con NP SM30 alla dose 0,04 mg/ml, poichè questo trattamento è stato quello che ha causato un aumento significativo dell'indice apoptotico evidenziato con colorazione DAPI in entrambe le linee cellulari (vedi figura 48). L'indice di attivazione della caspasi-3 indotta dal trattamento con NP è stata quindi determinata come rapporto tra il valore di fluorescenza del campione ed il valore di fluorescenza del controllo.

	HT-1080		A549	
	Fluo _{505 nm}	indice apoptotico	Fluo _{505 nm}	indice apoptotico
Controllo	18,89	1,00	12,82	1,00
SM30 0,04 mg/ml	152,5	8,07	16	1,25
TPEN 30 µM 5 h	989	52,35	543,63	42,40

Tabella 7: emissione di fluorescenza e valore dell'indice apoptotico calcolato in base all'attivazione della caspasi-3 in cellule HT-1080 e A549 di controllo oppure trattate con NP Ludox[®] SM30 alla concentrazione di 0,04 mg/ml per 2 h senza siero, seguite da un ripristino in terreno completo di 22 h. Il controllo positivo è stato incubato 5 h con l'induttore di apoptosi TPEN prima di effettuare il saggio e valutare l'emissione di fluorescenza a 505 nm.

Come mostrato in tabella 7, nelle cellule HT-1080 trattate con SM30 alla dose 0,04 mg/ml l'attivazione della caspasi-3 subisce un aumento di circa 8 volte rispetto al controllo, mentre nella linea cellulare A549 il valore di emissione di fluorescenza del campione trattato non si discosta molto da quello del rispettivo controllo. Questi dati confermano i risultati ottenuti con la colorazione DAPI (vedi figura 48) che hanno mostrato una risposta apoptotica significativa nelle cellule HT-1080 trattate con SM30 e solo in misura minore una risposta nelle A549, che non viene apprezzata tramite il saggio della caspasi-3.

5.7 ANALISI DELLA PRODUZIONE DI ROS INDOTTA DA NP LUDOX[®]

Numerosi studi in letteratura dimostrano che la produzione di specie reattive dell'ossigeno (ROS), generalmente prodotte dai normali processi metabolici, può essere incrementata da

particolari condizioni esterne, quali l'esposizione a stress ossidativo e radiazioni ionizzanti (Tominaga et al., 2004). Ci sono numerose evidenze che anche l'esposizione a nanomateriali di diversa natura, tra cui le nanoparticelle di silice, causano un aumento della produzione cellulare di ROS (Wang et al., 2009; Nel et al., 2006; Park et al., 2008). È per questa ragione che in questo lavoro è stata analizzata la produzione di specie reattive dell'ossigeno nelle linee cellulari CCD-34 Lu, A549 e HT-1080 sottoposte a incubazione con dosi diverse di nanoparticelle Ludox[®] AS30 e SM30.

Da esperimenti condotti in precedenza e qui non riportati si è potuto osservare che la maggiore produzione di ROS avviene nei trattamenti in assenza di siero, subito dopo la fine del trattamento di 2 h. La quantificazione della produzione endogena di ROS è stata possibile grazie all'utilizzo della sonda Carboxy-H₂DCFDA che viene introdotta nelle cellule per endocitosi, deacetilata dalle esterasi intracellulari e, in presenza di ROS, convertita in Carboxy-DCF, una molecola la cui fluorescenza può essere rilevata tramite citofluorimetria a flusso (λ_{ex} = 495 nm, λ_{em} = 529 nm). L'intensità di fluorescenza emessa dalla sonda è proporzionale alla quantità di ROS prodotti dalla cellula.

I risultati forniti quindi dal citofluorimento dopo l'analisi sono:

- 1) i dot-plot, nei quali è rappresentata la complessità cellulare (SSC) in funzione della dimensione cellulare (FSC);
- 2) l'andamento della fluorescenza FITC rappresentato in istogramma sul campione della popolazione analizzato.

In Figura 49 sono riportati i dot plot e gli istogrammi FITC-H per la linea cellulare A549 rappresentativi di una dose con scarso potere ossidante (0,04 mg/ml) e di una dose con alto potere ossidante (0,06 mg/ml), per le nanoparticelle di diametro inferiore (SM30). In figura 50 invece sono mostrati gli istogrammi relativi all'incremento rispetto al controllo negativo dell'intensità di fluorescenza di campioni di cellule A549 e CCD-34 Lu trattati con dosi crescenti di NP Ludox[®] AS30 e SM30. I risultati per la linea tumorale HT-1080 non sono riportati ma sono analoghi all'altra linea cellulare tumorale indagata. Quello che emerge dai risultati ottenuti è che la produzione di specie reattive dell'ossigeno è dose-dipendente, con uno spostamento del picco di fluorescenza della sonda visibile negli istogrammi, ma, contemporaneamente all'aumentare della dose di NP, si verifica uno scostamento della popolazione cellulare verso valori di FSC (Forward Scatter) minori, come visibile dai dot-plot in figura 49, indicando la presenza di una sottopopolazione danneggiata e frammentata. Anche i detriti cellulari, evidenziati nell'angolo in basso a sinistra dei dot-plot, avendo essi valori di FSC e SSC bassi, aumentano all'aumentare della concentrazione di NP. Dagli istogrammi riportati in figura 50 sembrerebbe inoltre che le NP di diametro inferiore (SM30) siano generalmente meno tossiche rispetto a quelle più grandi AS30 (figura 50-A) rappresentando un risultato contrario a tutti gli altri test già descritti in questo lavoro; in realtà

osservando i relativi dot-plot si nota che la popolazione cellulare nei trattamenti con SM30 è molto più danneggiata rispetto alle cellule trattate con le stesse dosi di AS30 (Figura 51).

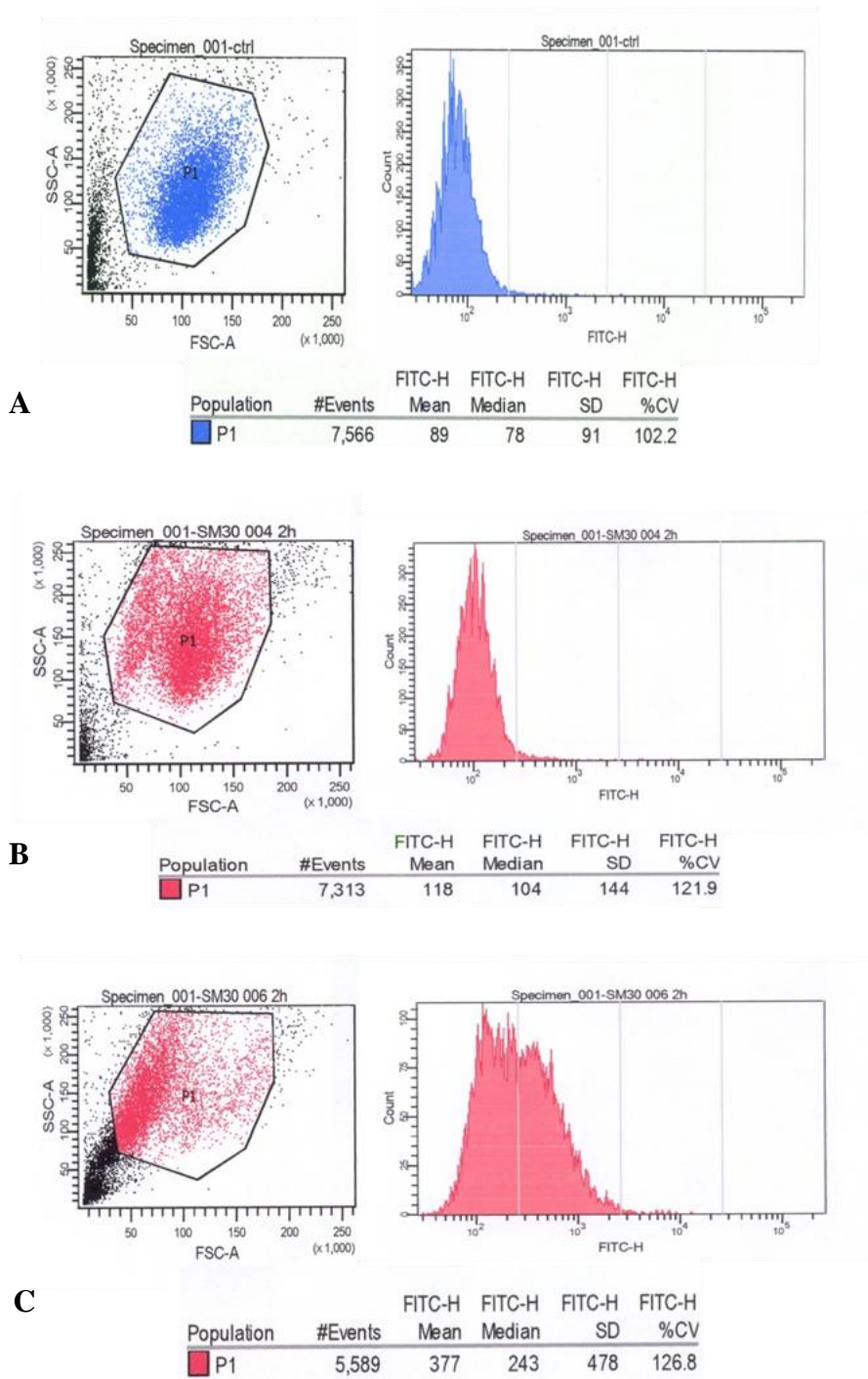


Figura 49: Dot plot (SSC vs FSC) e istogramma di FITC-H relativo a cellule A549 di controllo (A) o incubate con NP SM30 alle dosi 0,04 mg/ml (B) e 0,06 mg/ml (C).

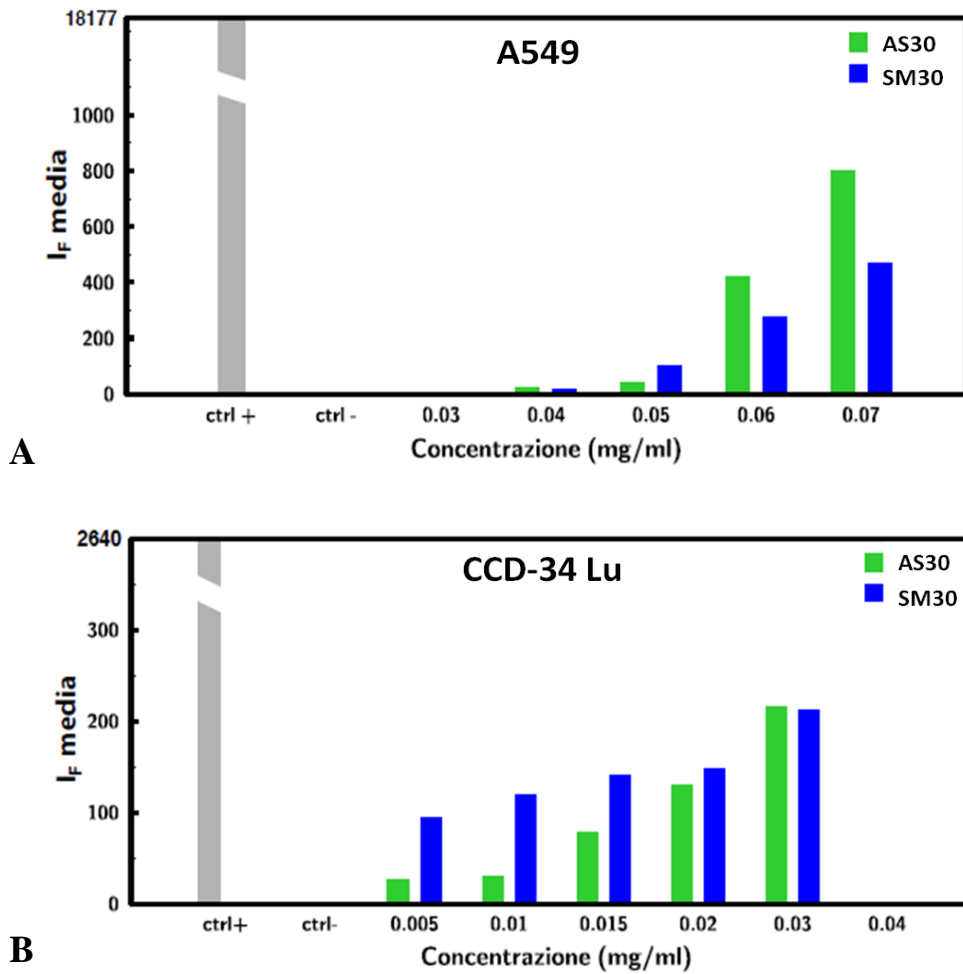


Figura 50: valori di intensità di fluorescenza media della sonda per i ROS, indicati come incremento rispetto al controllo negativo, nelle linee cellulari A549 (A) e CCD-34 Lu (B) sottoposte a trattamento di 2 h senza siero con dosi crescenti di NP AS30 e SM30. I valori riportati si riferiscono ad un unico esperimento esemplificativo per ciascun tipo di NP.

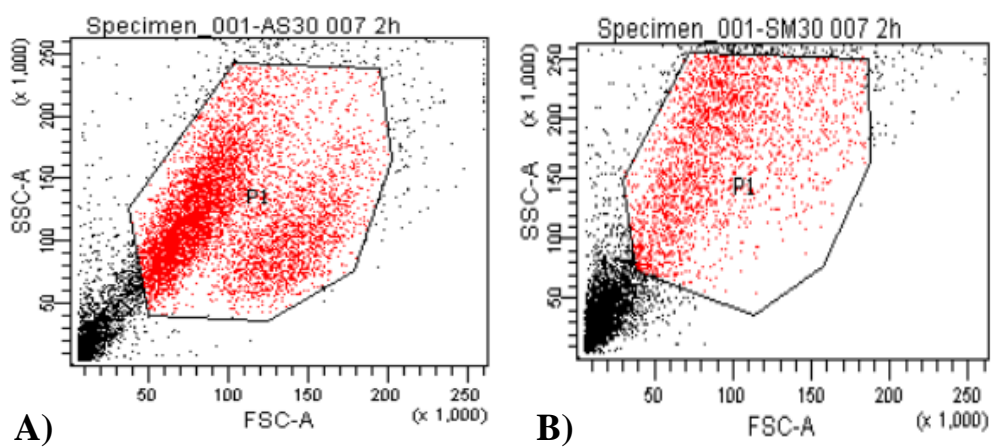


Figura 51: distribuzione delle cellule A549 secondo i parametri FSC e SSC dopo trattamento di 2 h con una dose pari a 0,07 mg/ml di NP AS30 (A) o SM30 (B).

Come riportato in figura 50, la linea cellulare normale CCD-34 Lu produce specie reattive dell'ossigeno già a partire da dosi molto basse di trattamento con le nanoparticelle (0,005 mg/ml) e l'intensità di fluorescenza della sonda dei ROS aumenta in maniera proporzionale alla dose fino alla concentrazione 0,03 mg/ml. A questa dose invece la linea cellulare tumorale non ha ancora nessun incremento di fluorescenza rispetto al controllo negativo corrispondente. Inoltre la linea cellulare normale subisce un drastico crollo dell'intensità di fluorescenza alla dose 0,04 mg/ml e tale valore rimane nullo aumentando le concentrazioni di NP fino ai valori di 0,07 mg/ml utilizzati negli esperimenti condotti con le cellule tumorali A549 e HT-1080, probabilmente perchè la popolazione risulta a queste dosi alte gravemente danneggiata come visibile dai relativi dot-plot. Per giustificare questa ipotesi e per valutare quindi lo stato di vitalità delle cellule dopo trattamento con NP, è stata effettuata un'analisi utilizzando un'ulteriore sonda, ovvero il propidio ioduro (PI). Il PI, intercalante del DNA, è in grado di entrare solamente nelle cellule con la membrana danneggiata discriminando in questo modo le cellule vitali da quelle non vitali. In figura 52 sono riportati i risultati dell'analisi con due fluorofori (FITC e propidio) per le cellule CCD34-lu trattate per 2 h con NP SM30 alla concentrazione 0,03 mg/ml.

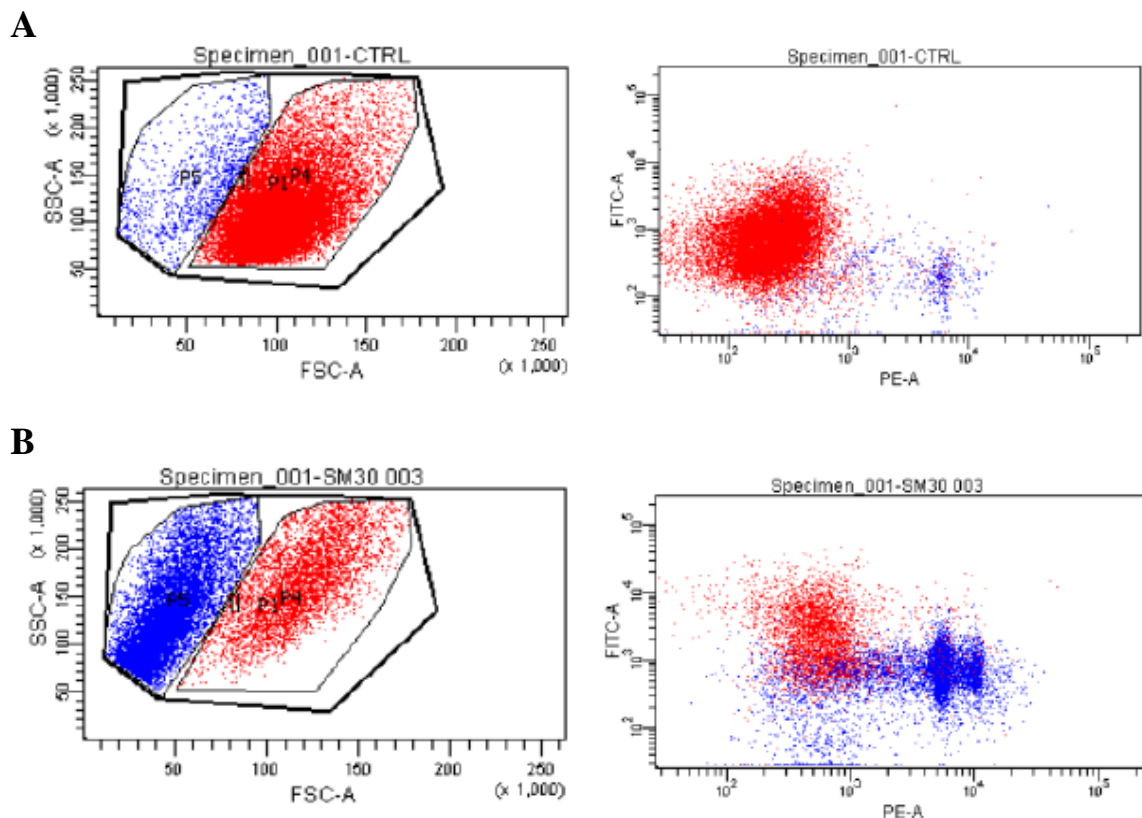


Figura 52: distribuzione secondo i parametri FSC ed SSC e secondo l'intensità di fluorescenza del propidio ioduro (PE) e della sonda dei ROS (FITC) per cellule CCD-34 Lu di controllo (A) o trattate con NP SM30 alla dose 0,03 mg/ml per 2 h senza siero (B).

Per questa analisi è stata innanzitutto esclusa dal gate la sottopopolazione di detriti cellulari ed in seguito la popolazione analizzata è stata suddivisa in due sottopopolazioni: una con valori normali di FSC ed SSC (gate rosso, figura 52) ed una che rappresenta le cellule danneggiate, con FSC più bassa (gate blu). Nelle cellule di controllo si osserva come la popolazione cellulare analizzata sia compresa quasi interamente all'interno del gate rosso. Dopo il trattamento con NP, invece, aumenta notevolmente la sottopopolazione con valori minori di FSC (gate blu), che risulta il doppio dell'altra (gate rosso). Valutando i parametri di fluorescenza del propidio (in ascissa) e della sonda H₂DCFDA (in ordinata), si può notare che nelle cellule di controllo la maggior parte della popolazione risulta negativa al propidio indicando che le cellule non sono danneggiate, mentre l'intensità di fluorescenza della sonda per i ROS indica un livello di produzione di specie reattive dell'ossigeno derivato dal metabolismo basale della cellula. Al contrario, nelle cellule CCD-34 Lu sottoposte a trattamento con NP SM30, la sottopopolazione compresa all'interno del gate blu e quindi di dimensioni minori ed FSC più basso, risulta positiva al propidio ioduro (si passa da un'intensità di fluorescenza di 283 del controllo ad un'intensità di 5190) e quindi rappresenta una popolazione cellulare con la membrana molto danneggiata; questa stessa sottopopolazione non appare però positiva alla sonda per i ROS dal momento che l'intensità di fluorescenza confrontata con quella del controllo è molto simile. La sottopopolazione che mantiene invece, nonostante il trattamento con le NP, valori di FSC ed SSC pari al controllo (compresa nel gate rosso) si sposta verso valori maggiori di intensità di fluorescenza della sonda per i ROS (dal valore di 933 del controllo si passa a 4248) e risulta negativa al propidio ioduro rappresentando quindi una sottopopolazione di cellule vive. Si può quindi concludere che l'effettiva produzione di ROS dopo trattamento con NP è dovuta alla sottopopolazione cellulare viva e non danneggiata che, all'aumentare della dose di trattamento con NP, si riduce in maniera proporzionale. Aumenta invece il numero di cellule con la membrana danneggiata e frammentata, probabilmente morte e non più in grado di internalizzare la sonda dei ROS e di modificarla chimicamente per renderla fluorescente in seguito alla produzione di specie reattive dell'ossigeno.

In figura 53 sono infine riportati i dati riassuntivi relativi all'intensità di fluorescenza misurata in seguito al trattamento delle linee cellulari CCD-34 Lu, A549 e HT-1080 con NP SM30 a concentrazioni comprese tra 0,02 e 0,06 mg/ml. Rispetto alle due linee tumorali, i fibroblasti normali CCD-34 Lu risultano più sensibili al trattamento con NP già a basse concentrazioni: infatti questa linea cellulare presenta un picco massimo di fluorescenza alla concentrazione di 0,03 mg/ml di NP, per poi decrescere bruscamente fino a un valore di fluorescenza nullo alla dose 0,04 mg/ml. Questo è dovuto al fatto che a questa concentrazione le NP SM30 inducono un'alta mortalità cellulare nella linea normale. Le due linee tumorali A549 e HT-1080 hanno invece un andamento di fluorescenza simile tra loro e, a dosi più alte (0,06 mg/ml), hanno ancora un'elevata produzione di ROS, a conferma dei dati di vitalità cellulare (saggio MTS e

saggio clonogenico, vedi paragrafi 4.3 e 4.4) che hanno dimostrato la loro maggiore resistenza al trattamento con NP rispetto alla linea cellulare di fibroblasti normali CCD-34 Lu.

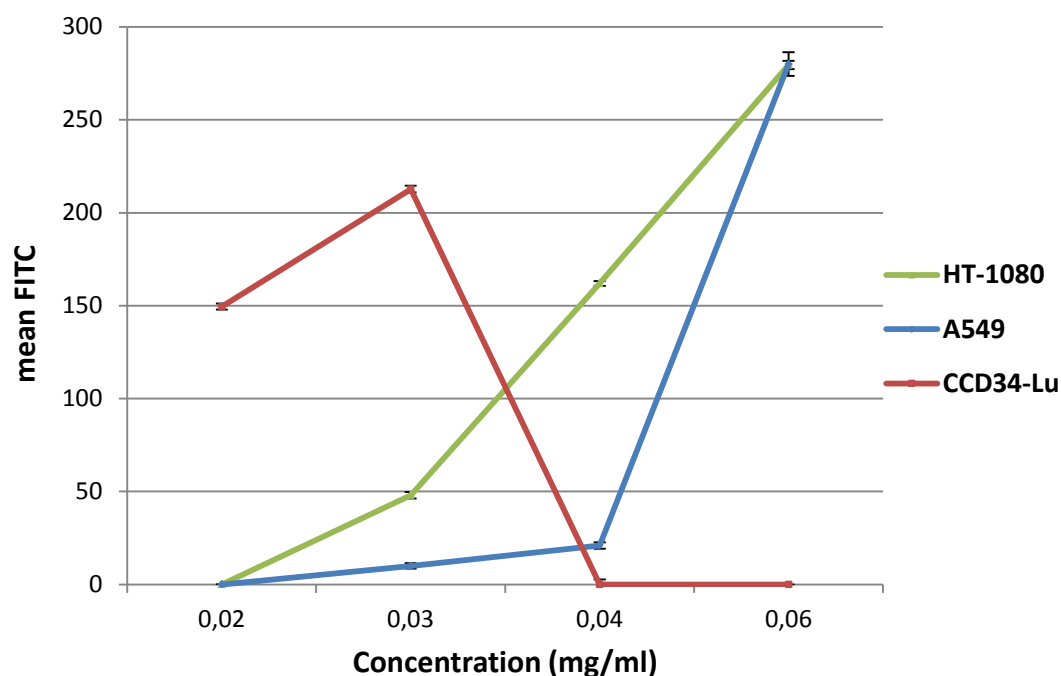


Figura 53: grafico riassuntivo della produzione di ROS per le tre linee cellulari esaminate dopo trattamento di 2 h senza siero con quattro diverse dosi di NP SM30. L'intensità di fluorescenza (mean FITC) emessa dalla sonda è espressa come incremento rispetto al valore di fluorescenza del controllo negativo ed è proporzionale alla quantità di ROS prodotti dalla cellula. È riportato per ogni valore l'errore standard calcolato come σ/\sqrt{n} (σ è la deviazione standard calcolata dal FACS; n è il numero di eventi rilevati dallo strumento per ogni campione).

I valori di fluorescenza del controllo positivo sono i seguenti: $2640 \pm 7,93$ (CCD-34 Lu); 18177 ± 108 (A549); $3360 \pm 15,83$ (HT-1080).

5.8 DANNI AL DNA INDOTTI DA NP LUDOX®

La formazione e l'accumulo di specie reattive dell'ossigeno indotte da nanoparticelle possono causare diversi tipi di danni quali la perossidazione dei lipidi, la denaturazione proteica, l'alterazione del metabolismo degli organelli cellulari, come ad esempio i mitocondri, e danni al materiale genetico causandone l'alterazione di basi azotate, la delezione di nucleotidi o la rottura dello scheletro zucchero-fosfato di un filamento o di entrambi i filamenti (Figura 54).

Le specie reattive dell'ossigeno, infatti, possono attaccare il DNA causando diverse alterazioni tra cui la formazione di ossiguanina (oxo⁸-Gua) o la rimozione di intere basi, che possono portare alla rottura di un filamento della doppia elica del DNA (SSBs, single-strand breaks), oppure, danno ancora più grave, alla rottura di entrambi i filamenti di DNA (DSBs, double-strand breaks). Le DSBs sono considerate il danno biologicamente più grave a livello di DNA in quanto, se non riparato, può portare al blocco permanente del ciclo cellulare, all'induzione di apoptosi a causa della perdita di materiale genetico, all'insorgenza di mutazioni e può essere alla base dei processi di cancerogenesi. Per questo motivo le DSBs rappresentano un parametro molto importante nel valutare i danni indotti dall'esposizione di NP.

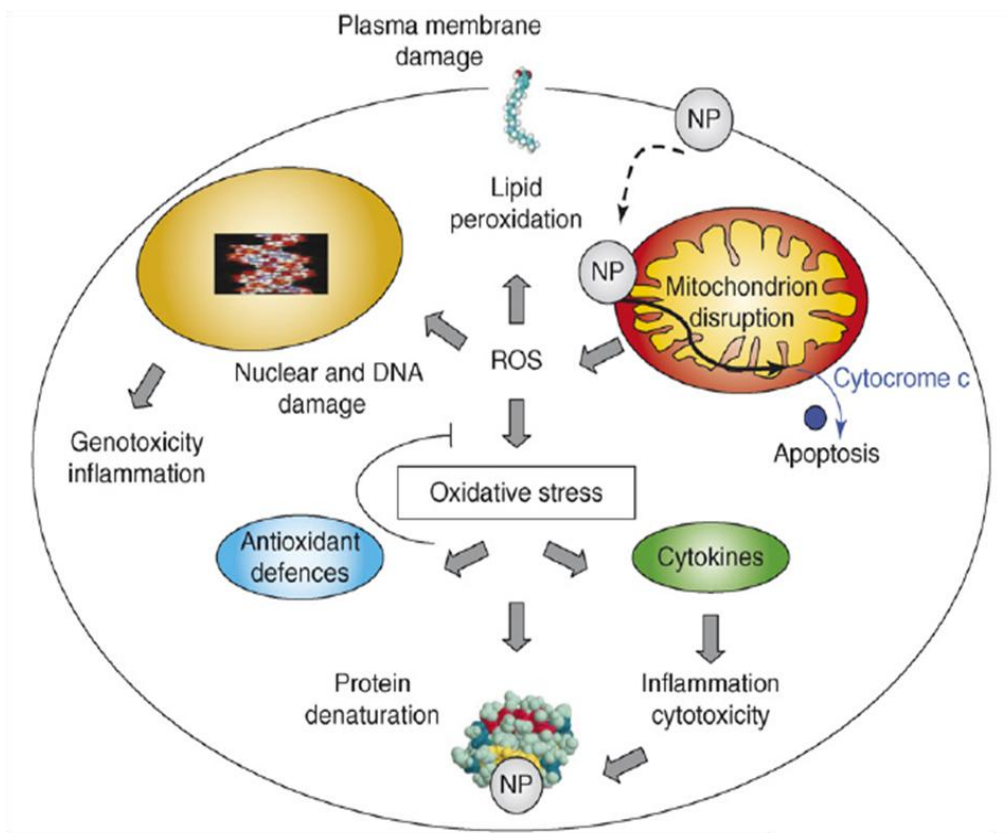


Figura 54: schema dei possibili meccanismi cellulari associati alla tossicità di NP.

Quando il DNA viene danneggiato, è indotta l'attivazione dei checkpoint del ciclo cellulare che ne regolano la progressione, e vengono trasdotti i segnali necessari per coordinare i sistemi di riparazione. In prossimità di doppie rotture al DNA, la variante istonica H2AX, che nei mammiferi rappresenta il 2-25% dell'istone H2A, viene fosforilata sulla serina in posizione 139 (forma fosforilata γ -H2AX) dalla chinasi ATM, che rappresenta uno dei sensori

del danno al DNA. Questa fosforilazione è necessaria per la segnalazione del danno e permette di reclutare le proteine di riparazione del DNA nel sito di rottura (Singh et al., 2009). Sebbene la fosforilazione della variante istonica H2AX potrebbe non essere un processo indotto esclusivamente dalle doppie rotture al DNA, la presenza di questo istone fosforilato è altamente correlabile alla lesione di entrambe le eliche indotta dalle radiazioni ionizzanti o da condizioni di stress ossidativo (Hamer et al., 2003; Rothkamm et al., 2003; Zhang et al., 2009). In seguito alla doppia rottura entrano quindi in gioco numerosi pathways enzimatici che servono per segnalare il danno e reclutare velocemente le proteine necessarie per la sua riparazione, come BRCA1, 53BP1, Rad9, Rad4, RAP1, XRCC1 e le DNA ligasi III e IV (Bork et al., 1997; Callebaut et al., 1997). La quantificazione di queste proteine riflette molto spesso la gravità del danno al DNA (Jin et al., 2007). La proteina 53BP1 ad esempio è in grado di legare il soppressore tumorale p53 che a sua volta agisce come attivatore trascrizionale per numerosi geni implicati nell'arresto della crescita, nel mantenimento dell'integrità genomica e nel controllo dei processi di morte programmata (Horikoshi et al., 1995).

Al fine di valutare se il trattamento con NP Ludox[®] induca la formazione di doppie rotture al DNA, è stata analizzata la presenza di foci dell'istone γ -H2AX tramite immunofluorescenza indiretta *in situ* nelle linee cellulari CCD-34 Lu, A549 e HT-1080 dopo trattamento con dosi crescenti di NP Ludox[®] AS30 ed SM30 per diversi tempi di incubazione, con e senza la presenza del siero nel mezzo di coltura cellulare. Poiché la fosforilazione dell'istone H2AX si estende per alcune megabasi intorno al sito delle doppie rotture, è possibile evidenziare dei foci fluorescenti usando un anticorpo primario contro γ -H2AX, che riconosce la proteina bersaglio, e un anticorpo secondario, che si lega a quello primario e che è coniugato a un fluoroforo.

In tutte le condizioni di trattamento utilizzate, con dosi di NP AS30 ed SM30 da 0,01 a 0,4 mg/ml, le cellule CCD-34 Lu ed A549 non hanno mostrato alcuna presenza di foci dell'istone γ -H2AX (Figura 55) per nessuna dose e nessun tempo di trattamento. Questi dati sono in accordo con alcuni dati di letteratura secondo i quali le nanoparticelle di silice non causano un significativo numero di danni al DNA: probabilmente la morte di cellule polmonari esposte a questo tipo di NP avviene per necrosi in conseguenza a stress ossidativo e danni agli organelli citosolici, piuttosto che a causa di perdita di informazione genetica e danni al DNA (Jin et al., 2007). Nei miei esperimenti però, la linea cellulare di fibrosarcoma umano HT-1080 è risultata positiva alla formazione di foci dell'istone γ -H2AX dopo trattamenti con NP Ludox[®] di entrambe le dimensioni in totale assenza di siero, sia alla fine delle 2 h di trattamento, che dopo 3 o 22 h di ripristino in terreno completo (Figura 56). I trattamenti in presenza del 3% di siero invece non hanno dato risultati positivi nemmeno dopo tempi lunghi di esposizione (72 h).

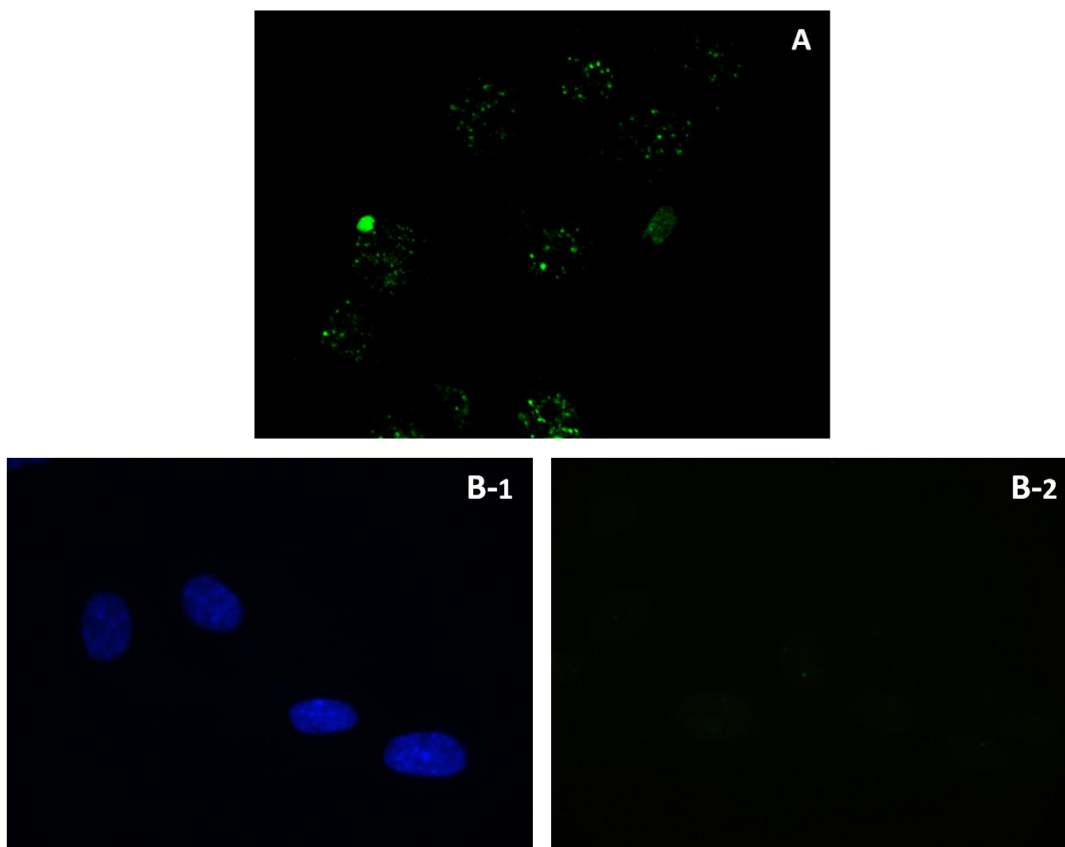


Figura 55: alcune immagini esemplificative di cellule A549 trattate per 2 h con NP SM30 alla dose 0,1 mg/ml in assenza di siero, seguite da un ripristino di 3 h in terreno completo: a sinistra (B-1) la fluorescenza del DAPI che permette la visualizzazione dei nuclei, a destra (B-2) la fluorescenza dell'anticorpo contro l'istone γ -H2AX che evidenzia l'assenza di foci di riparazione.

In figura A è mostrata invece la formazione di foci dell'istone fosforilato in cellule A549 irradiate con raggi γ con una dose pari a 2 Gy. Questo campione funge da controllo positivo per verificare il corretto funzionamento degli anticorpi e l'effettiva produzione di foci in questa linea cellulare (Tanaka et al., 2007).

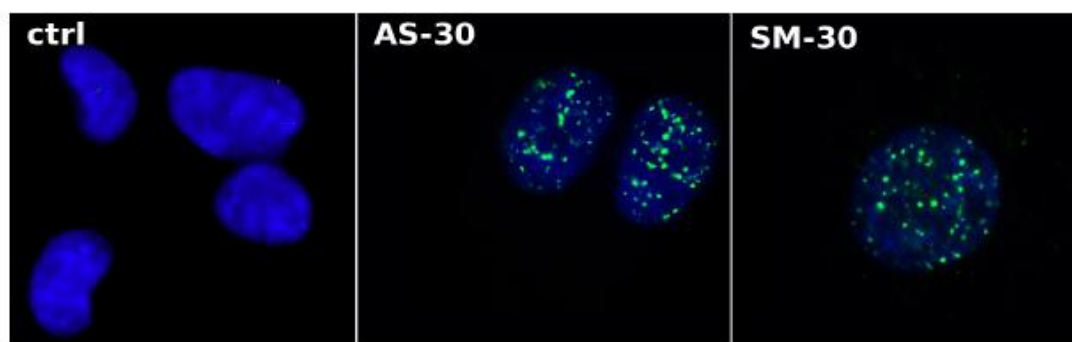


Figura 56: foci dell'istone γ -H2AX rilevate nella linea tumorale HT-1080. Da sinistra a destra, sono raffigurate cellule di controllo e cellule trattate con NP AS30 o SM30 alla dose 0,06 mg/ml per 2 h senza siero seguite da un ripristino in terreno completo di 22 h.

In figura 57 sono riportate le percentuali di cellule HT-1080 positive alla formazione di foci di riparazione dell'istone γ -H2AX in seguito al trattamento di 2 h senza siero seguite o meno da un ripristino in terreno completo di 22 h.

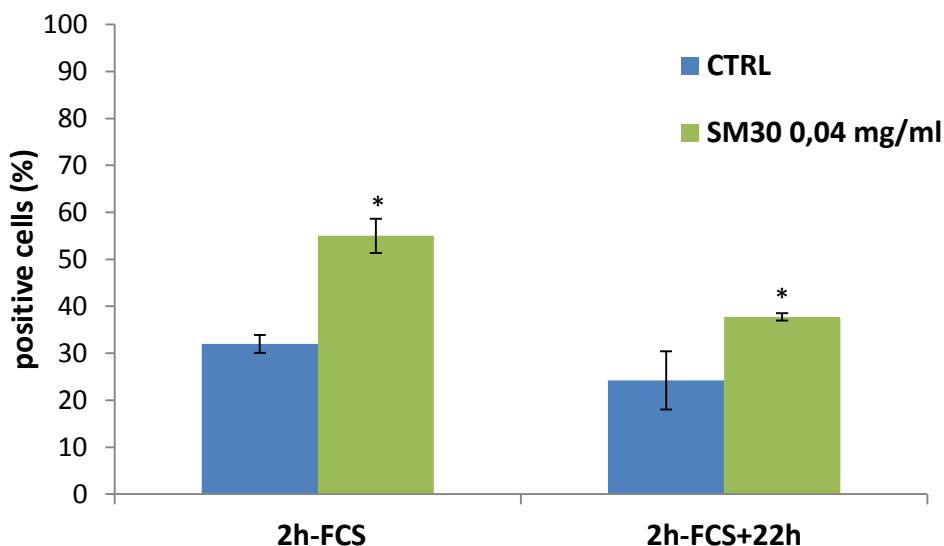


Figura 57: cellule HT-1080 positive ai foci γ -H2AX fissate subito dopo essere state mantenute 2 h in assenza di siero o dopo un successivo ripristino di 22 h in terreno completo con il 10% di siero. I campioni di cellule trattate sono state incubate con NP Ludox[®] SM30 alla dose 0,04 mg/ml.

I dati rappresentano le medie \pm deviazione standard di n esperimenti ($2 \leq n \leq 4$), in ciascuno dei quali sono state contate almeno 100 cellule.

* $p < 0,05$, t test rispetto alle cellule di controllo

Considerando che vengono valutate positive le cellule che hanno più di 4 foci per nucleo, si nota dal grafico che la percentuale di cellule positive ai foci va dal 32% circa del controllo al 55% del trattato con NP SM30 quando il campione è analizzato al termine delle 2 h di trattamento in assenza di siero; questi valori invece passano dal 24% del controllo al 37,7% del campione trattato, quando l'analisi viene effettuata dopo 22 h dalla fine del trattamento. In entrambi i casi la percentuale di cellule con foci conseguente al trattamento con le NP aumenta significativamente se confrontata con il rispettivo controllo, sebbene tale aumento sia più evidente a 2 h, quando più di metà delle cellule risultano positive ai foci di γ -H2AX. Nonostante la positività di questa linea cellulare, non sono state riscontrate differenze significative al variare del tipo di NP utilizzate (AS30 o SM30, dati non mostrati), e anche il tempo di ripristino al termine del trattamento (0 h, 3 h o 22 h) non ha permesso di apprezzare

differenze significative nella percentuale di cellule positive per la presenza dell'istone fosforilato. È per questo motivo che si è deciso di effettuare un ulteriore studio, ovvero di analizzare la distribuzione delle cellule HT-1080 trattate con SM30 (0,04 mg/ml) in base al numero di foci in ciascun nucleo alla fine del trattamento di 2 h e dopo 22 h di ripristino in terreno completo. I risultati riportati in figura 58 mostrano che, al termine delle 2 h di trattamento, le cellule negative per la formazione di foci (0-4 foci per nucleo) corrispondono al 45% delle cellule totali, rispetto a un 68% delle cellule di controllo, mentre il 55% risultano positive. In particolare, la maggior parte delle cellule positive è rappresentata da cellule con più di 20 foci (32,6%). Dopo 22 h di ripristino in terreno con il 10% di siero, aumenta considerevolmente il numero di cellule negative, rappresentato dal 75,8% del controllo e dal 62,3% del trattato con SM30. Inoltre si riduce notevolmente il numero di cellule che possiedono più di 20 foci, che arriva nel trattato fino a un valore del 12,9%.

Quindi, nonostante il numero di cellule positive ai foci dell'istone nel campione trattato con NP rimanga comunque maggiore rispetto al campione di controllo, dopo 22 h in terreno completo si può ipotizzare che le doppie rotture al DNA vengano per la maggior parte riparate (Markova et al., 2007; van Veelen et al., 2005).

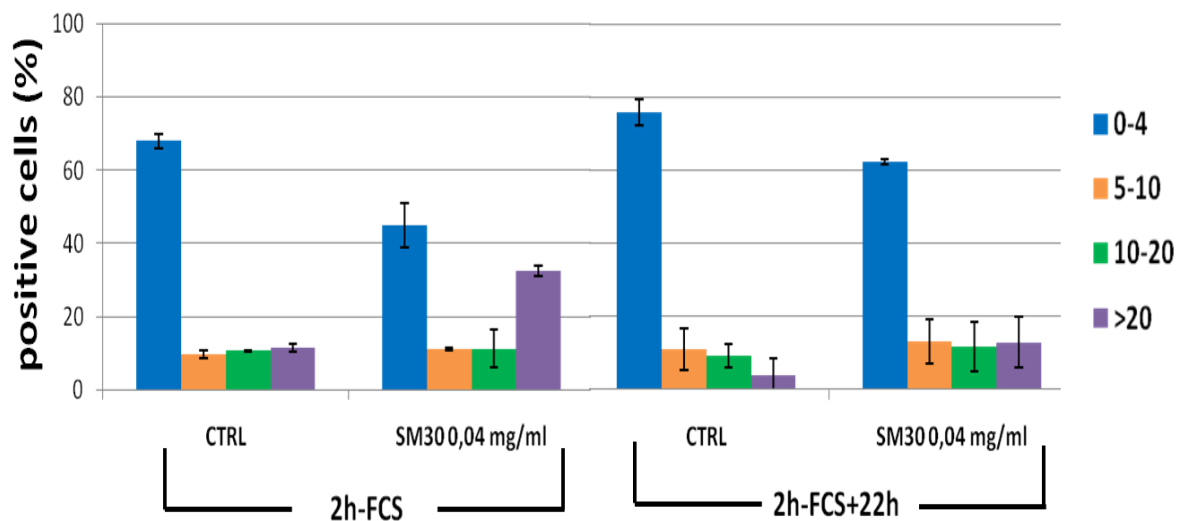


Figura 58: percentuali di positività ai foci dell'istone γ -H2AX di cellule HT-1080 di controllo o trattate con NP SM30 alla dose 0,04 mg/ml per 2 h senza siero. Le cellule sono state fissate subito alla fine del trattamento o dopo 22 h di ripristino in terreno completo. In questo istogramma sono rappresentati i valori percentuali di cellule che possiedono da 0 a 4 foci, e quindi considerate negative, e i valori percentuali delle cellule positive di ogni campione con i seguenti intervalli di numeri di foci per nucleo: 5-10; 10-20; >20.

I dati rappresentano le medie \pm deviazione standard di n esperimenti ($2 \leq n \leq 4$).

5.9 ALTERAZIONE DELL'ESPRESSIONE GENICA

I recenti progressi tecnologici, compiuti nei settori delle biotecnologie, della robotica, della chimica dei materiali e della biologia molecolare, hanno determinato l'affermarsi di un nuovo campo di ricerca in continuo sviluppo: la genomica. Essa non si occupa solo della determinazione della sequenza completa di un genoma ma anche dell'analisi su larga scala dell'espressione e delle funzioni dei geni di un organismo (genomica funzionale). In questo contesto, la tecnologia dei *microarray* ha rivoluzionato l'analisi dell'espressione genica permettendo lo studio in parallelo di migliaia di geni: l'analisi dei profili trascrizionali può indicare quali sono i processi biologici coinvolti, per esempio, in stati patologici (Radhakrishnan et al., 2008), o gli effetti di trattamenti farmacologici (Moreira et al., 2008). Il concetto fondamentale per applicazioni tossicologiche della tecnologia dei microarray si basa sull'assunto che le diverse sostanze tossiche alterano l'espressione genica e, di conseguenza, lo studio dei profili trascrizionali, ossia l'abbondanza degli RNA trascritti, può aiutare ad accertare l'esposizione e a comprendere il meccanismo dell'azione tossica.

Per valutare quindi gli eventuali effetti genotossici causati dall'incubazione con NP Ludox[®] si è valutata l'alterazione dell'espressione genica tramite il kit della Agilent[®] "Whole Human Genome Oligo Microarray" (con la collaborazione del gruppo del prof. Lanfranchi, C.R.I.B.I., Università di Padova). I *chip* a DNA sono piattaforme molto compatte caratterizzate dal posizionamento preciso di un numero estremamente elevato di frammenti di DNA o di oligonucleotidi su una superficie ridotta (Schena et al., 1995); con questa tecnologia è possibile misurare il livello di espressione di migliaia di geni contemporaneamente, sfruttando i principi di base dell'ibridazione degli acidi nucleici. L'intensità del segnale rilevata in ogni spot dell'array è in definitiva una misura indiretta della concentrazione di quel target (in questo caso RNA messaggero) nella cellula. Tramite l'esperimento di microarray è possibile quindi capire non solo quali sono i geni espressi nelle condizioni esaminate, ma anche se la loro espressione è alterata rispetto al campione di controllo (Kronick, 2004).

I risultati preliminari raggiunti in questo lavoro riguardano la linea cellulare A549 incubata con nanoparticelle Ludox[®] AS30 e SM30 alla concentrazione di 0,02 mg/ml, con un trattamento di 2 h senza siero, seguito poi da un ripristino in terreno completo di 3 h (per le NP AS30 e SM30) o di 22 h (solo per le NP AS30).

Una volta estratto l'RNA da tutti i campioni, di controllo e trattati con NP, aver effettuato una quantificazione e un controllo del suo stato di purezza e della qualità dell'RNA totale estratto (vedi paragrafo 4.10), si è proceduto con la marcatura dei campioni e con l'ibridazione su microarray. Per analizzare i dati prodotti si sottrae il segnale di background, si normalizzano i dati sia all'interno dello stesso array che tra i diversi esperimenti effettuati (Figura 59), e si

trasformano in logaritmo in base 2, per facilitare la successiva analisi. Si procede quindi all'analisi statistica sui dati e all'identificazione dei geni differenzialmente espressi.

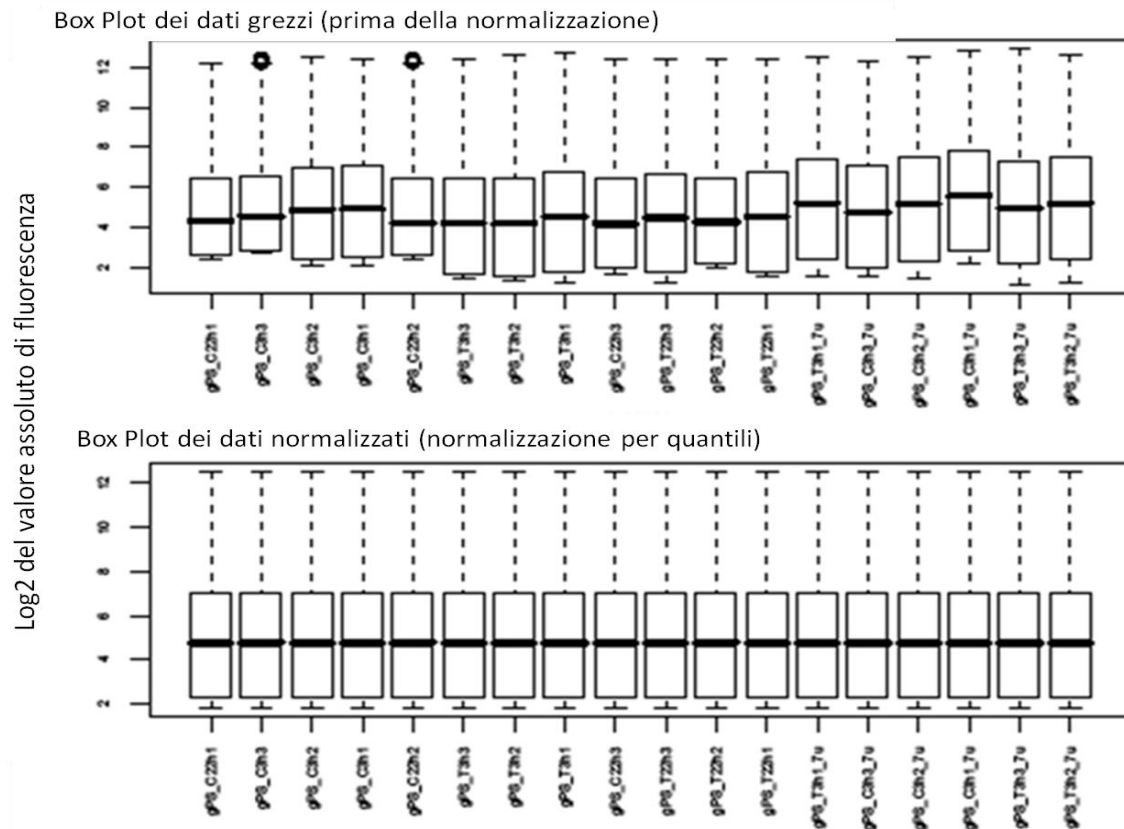


Figura 59: Box-Plot dei dati grezzi (in alto) e normalizzati (in basso). Con C è indicato il controllo, con T il campione trattato con NP AS30 o SM30 (indicate con 7) con 3 o 22 h di ripristino. 1-2-3 indicano i tre esperimenti.

Per l'identificazione dei geni differenzialmente espressi tra controllo e trattato, è stato utilizzato l'algoritmo SAM (*Significance Analysis of Microarrays*), che è forse il test più comune poichè è legato a un'analisi statistica rigorosa, che allo stesso tempo fornisce un buon numero di geni differenzialmente espressi, limitando l'errore dovuto a test multipli (Tusher et al., 2001). Questo algoritmo rappresenta un metodo per identificare i geni che presentano una significativa variazione di espressione basandosi su un confronto tra l'espressione di un gene nei diversi campioni in analisi, corretta da un fattore in grado di tener conto della varianza dei dati ottenuti nei singoli campioni. Il confronto di questo dato con una distribuzione ottenuta permutando tutti i dati in analisi ci fornisce una curva (Figura 60). Il programma individua i geni differenzialmente espressi mediante l'uso di *t*-test gene-specifici: a ciascun gene si assegna una statistica, definita come "differenza relativa" $d(i)$, che tiene conto sia della

differenza di espressione che della concordanza di valori in replica. La $d(i)$ è quindi confrontata con una distribuzione calcolata tramite permutazioni dell'intero set di dati in analisi. In questo modo vengono calcolate, per ogni gene, le differenze relative attese $d_E(i)$, contro le quali vengono confrontate le $d(i)$. Per la grande maggioranza dei geni $d(i) \approx d_E(i)$, ma in alcune osservazioni $d(i)$ si discosta dalla retta $d(i) = d_E(i)$: se questa distanza supera una certa soglia Δ viene considerata significativa. A questa lista di geni si associa anche una stima della frequenza di possibili falsi positivi, detta *False Discovery Rate* (FDR).

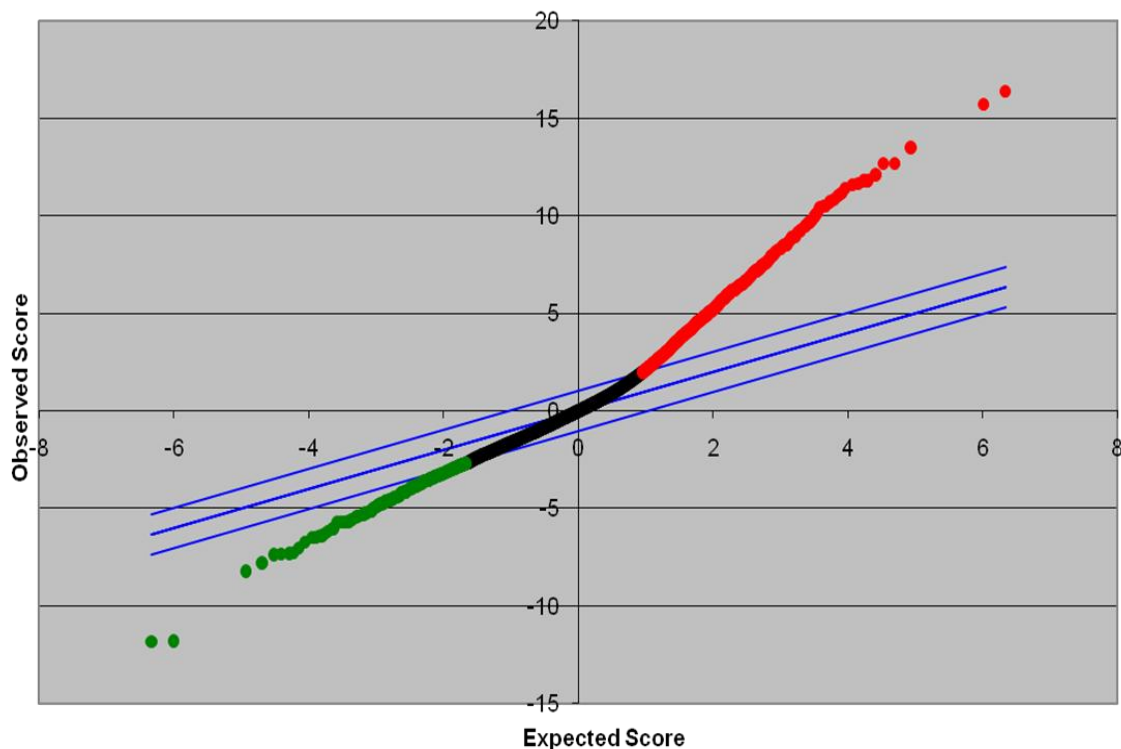


Figura 60: grafico del SAM per campioni di A549 trattati con NP SM30 per 2 h senza siero, seguite da un ripristino di 3 h in terreno completo. L'asse delle ascisse indica le $d_E(i)$, mentre in ordinata ci sono le $d(i)$. Ogni punto rappresenta un gene: i punti in rosso rappresentano i geni sovraespressi del trattato rispetto al controllo, mentre i punti in verde sono quelli sottoespressi.

I risultati che ho ottenuto in questo lavoro hanno mostrato che il numero di geni che risulta alterato in maniera significativa rispetto al controllo è più alto nel campione trattato con le NP SM30 (354 geni) rispetto al campione trattato con le NP AS30 (Tabella 8), come ci si aspetta data la maggiore tossicità delle NP di dimensione inferiore già dimostrata nei test descritti in precedenza. In entrambi i casi comunque sono in misura maggiore i geni sovra-espressi rispetto a quelli sotto-espressi confrontati con il campione di controllo, e inoltre l'espressione

genica risulta maggiormente alterata quando l'analisi viene condotta dopo 3 h dalla fine del trattamento rispetto al tempo lungo di 22 h di ripristino in terreno completo.

	AS30		SM30
	2h - FCS + 3h	2h - FCS + 22h	2h - FCS + 3h
up-regulated	148	91	344
down-regulated	74	27	10

Tabella 8: numero di geni significativamente sovra- o sotto-espressi rispetto al controllo in campioni di cellule A549 trattate con NP Ludox[®] AS30 o SM30 alla concentrazione 0,02 mg/ml per 2 h senza siero, seguite poi da un ripristino in terreno completo di 3 h (per entrambe le NP) o di 22 h (solo per le NP AS30).

Bisogna ricordare che i cambiamenti nell'espressione genica non avvengono come eventi indipendenti, ma in modo coordinato e interdependente. Per capire il significato biologico di tali cambiamenti è dunque necessario capire quali siano queste interdipendenze, andando innanzitutto ad indagare i livelli di espressione dei principali geni alterati ed effettuando un raggruppamento dei geni in percorsi metabolici condivisi: si valuta cioè se ci sono arricchimenti in particolari categorie rispetto ad un insieme di riferimento, definito background, che in questo caso rappresenta l'intero genoma umano contenuto nella piattaforma microarray utilizzata. Per questa valutazione complessiva a livello genomico ho utilizzato le liste complete di tutti i geni differenzialmente espressi indentificati e, tramite il tool di DAVID Functional Annotation Clustering, ho posto come soglia un livello di espressione (definito come \log_2 trattato/ \log_2 controllo) maggiore o uguale a $\pm 0,5$: in questo modo ho individuato le categorie funzionali che presentano un arricchimento di trascritti rispetto all'intero genoma o una sottoespressione di alcuni geni coinvolti in particolare vie metaboliche (Tabella 9).

	gene name	description	log ₂ T/C
cell cycle	Bub3	this gene encodes a protein involved in spindle checkpoint function	1,3
	p21	cyclin-dependent kinase inhibitor 1A, regulator of cell cycle progression at G1	0,76
	cyclin D3	cyclin D3	-0,8
	HDAC	histone deacetylase 4	-0,59
p53	PUMA	Bcl2 binding component 3: essential mediator of apoptosis	1,32
	p21	cyclin-dependent kinase inhibitor 1A, regulator of cell cycle progression at G1	0,76
	cyclin D3	cyclin D3	-0,8
regulation of actin cytoskeleton	ERM	cross-linkers between plasma membranes and actin-based cytoskeletons	0,46
	Git1	G-protein coupled receptor kinase interactor 1: mediates beta2-adrenergic receptor endocytosis	0,56
WNT	Wnt	this gene family encodes secreted signaling proteins, implicated in oncogenesis and in several developmental processes	1,14
	CK1ε	casein kinase 1, ε, implicated in the control of cytoplasmic and nuclear processes, including DNA replication and repair	0,63
	cyclin D3	cyclin D3	-0,8

Tabella 9: descrizione dei principali geni alterati, delle vie metaboliche cellulari coinvolte e dei livelli di espressione (definiti come log₂ trattato/ log₂ controllo) in cellule A549 trattate con NP AS30 alla dose 0,02 mg/ml (2 h -FCS + 3 h).

Si è potuto così osservare che in generale nei diversi tipi di trattamento i principali pathways alterati sono:

- il pathway di p53, in cui sono sovraespressi rispetto al controllo il gene p21 (cyclin-dependent kinase inhibitor 1A), che regola la progressione del ciclo cellulare nella fase G1, e il gene PUMA (BCL2 binding component 3), che è un mediatore essenziale dell'apoptosi p53-dipendente. È invece sottoespresso il gene che codifica per la ciclina D3, inibito da p21, che dovrebbe provocare un arresto in fase G1;
- la via di signalling delle MAPK (mitogen-activated protein kinase), nella quale sono differenzialmente espressi 9 geni rispetto al controllo, a loro volta correlati con la regolazione del ciclo cellulare, della proliferazione e del differenziamento delle cellule, con la morte cellulare per apoptosi e con la regolazione del citoscheletro cellulare;
- la via di segnalazione WNT (termine derivante dalla combinazione di Wg, wingless, e del gene Int), che descrive una rete complessa di proteine, implicate nell'embriogenesi e nell'oncogenesi, e coinvolte anche in processi fisiologici normali, quali la regolazione del citoscheletro cellulare, la trascrizione genica e la regolazione del ciclo cellulare;
- il pathway di regolazione del citoscheletro cellulare, nel quale sono sovraespressi alcuni geni (ad esempio ERM, WAVE 2, RTK, Git1) implicati nella regolazione dell'endocitosi,

nella trasduzione di segnali coinvolti nei cambiamenti di forma e motilità cellulare, e nella cascata di segnali che influenzano la mitogenesi e il differenziamento cellulare;

- il pathway di regolazione del ciclo cellulare (Figura 61), nel quale sono sovraespressi il gene Bub3, che codifica per una proteina coinvolta nella formazione del fuso mitotico, e il gene p21, un inibitore delle chinasi ciclina-dipendenti, che regola la progressione del ciclo cellulare nel passaggio dalla fase G1 alla fase S. In questa via metabolica sono alterati anche due geni che risultano significativamente sottoespressi rispetto al controllo: la ciclina D3, necessaria per la transizione G1/S del ciclo cellulare, e il gene HDAC, che codifica per l'istone deacetilasi 4, responsabile della rimozione dei gruppi acetili dagli istoni, e quindi della diminuzione della trascrizione. La deregolazione di questo pathway cellulare fa supporre che il trattamento con NP Ludox[®] porti ad un più rapido avanzamento nelle diverse fasi del ciclo e a una maggiore proliferazione delle cellule coinvolte (vedi paragrafo 5.10).

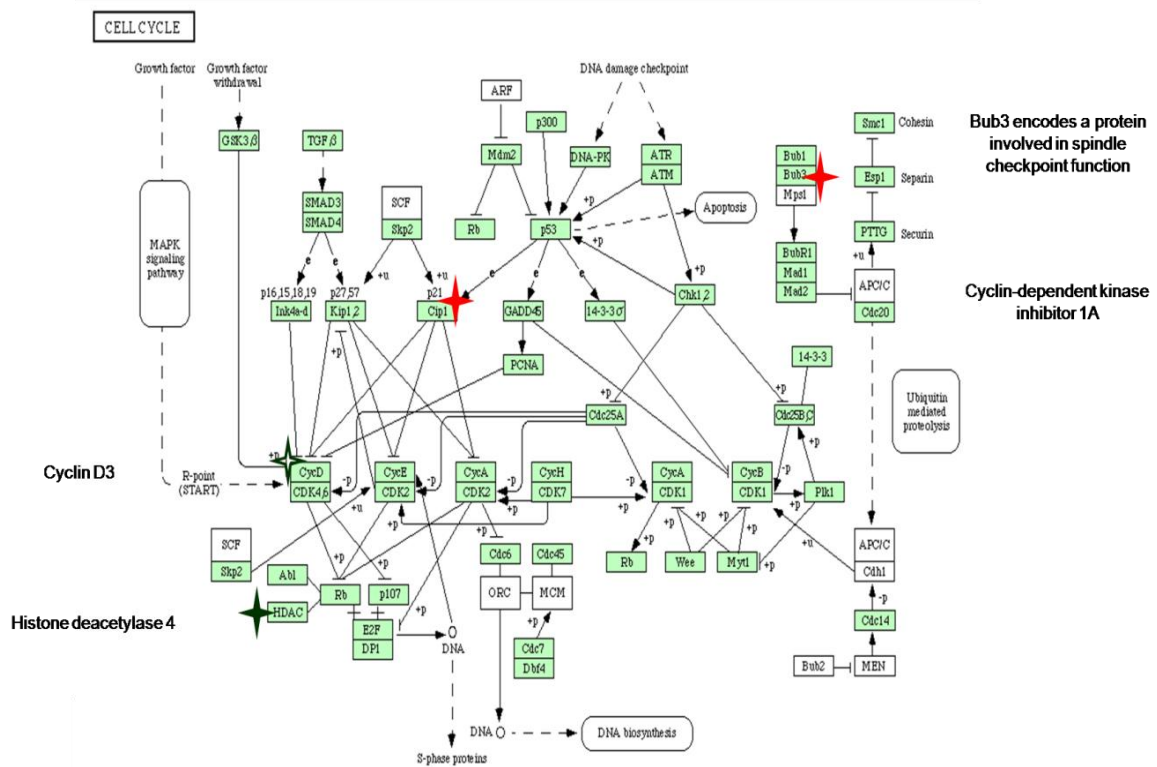


Figura 61: esempio di via metabolica cellulare alterata in cellule A549 dopo trattamento con NP Ludox[®] AS30. Il pathway di regolazione del ciclo cellulare evidenzia 2 geni sovra-espressi rispetto al controllo (in rosso), Bub3 e p21, e 2 geni significativamente sotto-espressi (in verde), la ciclina D3 e l'istone deacetilasi 4.

5.10 ANALISI DEL CICLO CELLULARE

Dato che lo studio dei profili di espressione genica ha messo in evidenza un'alterazione del ciclo cellulare dopo trattamento con NP Ludox[®], è stata effettuata un'analisi del ciclo cellulare tramite citofluorimetria a flusso in tutte e tre le linee cellulari prese in esame in questo lavoro: la citotossicità a seguito di trattamento con nanoparticelle Ludox[®] è stata analizzata per esaminare gli effetti dei diversi trattamenti sulla normale progressione del ciclo cellulare. In particolare è stato valutato l'effetto delle NP più tossiche, ovvero quelle di dimensione minore (SM30), alla dose 0,02 mg/ml: dopo diversi tempi, ovvero dopo 2 h di trattamento senza siero seguite o meno da 22 h di ripristino in terreno completo, sono stati valutati i parametri di volume e contenuto di DNA di ogni singola cellula con l'utilizzo del propidio ioduro mediante analisi al FACS. Per i campioni di controllo è stata effettuata anche un'analisi al tempo 0 h per studiare la distribuzione delle cellule prima di sottoporle a qualunque tipo di trattamento che potrebbe alterare la normale progressione del ciclo cellulare. Per l'acquisizione e per l'analisi dei dati sono stati usati rispettivamente i programmi BD FACSDiva Software e ModFit LT 3.0, che ha permesso di definire il numero e il gate di cellule da analizzare, escludendo così dall'analisi i detriti e gli aggregati cellulari. Utilizzando gli istogrammi del contenuto di DNA vs il numero di cellule, il programma permette di calcolare la percentuale delle cellule nelle diverse fasi del ciclo cellulare (G1, S, G2/M).

Per la linea cellulare di fibroblasti normali CCD-34 Lu si osserva un rallentamento del ciclo cellulare con un incremento della fase S rispetto al controllo (Figura 62) dopo 2 h di trattamento con NP SM30: la percentuale di cellule in fase S aumenta infatti da un 25% circa a un 34,6% comportando un lieve calo delle cellule in fase G2/M e soprattutto una diminuzione delle cellule in fase G1. Questa situazione non si presenta però più dopo 22 h di ripristino in terreno completo, o meglio le cellule hanno la stessa distribuzione nel ciclo cellulare del campione di controllo, indicando che probabilmente questa condizione è dovuta principalmente all'assenza di siero piuttosto che al trattamento con le nanoparticelle.

Per la linea tumorale A549 (Figura 63) non si osserva invece in nessuna condizione alcuna variazione apprezzabile rispetto al controllo 0 h, che presenta una distribuzione tipica delle cellule nelle diverse fasi: un 59% circa delle cellule totali è in fase G1, un 30% in fase S e il rimanente 11% si presenta in fase G2/M. Anche confrontando le cellule trattate con NP rispetto ai relativi controlli non vi sono sostanziali differenze nelle percentuali delle diverse fasi del ciclo cellulare. Per approfondire questo studio sono stati effettuati anche esperimenti a concentrazioni di NP fino a 0,05 mg/ml e con tempi di ripristino in terreno completo fino a 46 h senza però riscontrare differenze rispetto ai risultati qui riportati, che non hanno evidenziato alcun effetto dovuto né all'assenza di siero nel mezzo di coltura né al trattamento con NP Ludox[®]. Analoghi esperimenti sono stati effettuati anche nella linea cellulare di fibrosarcoma umano HT-1080, non riportando alcun risultato significativo dell'effetto delle nanoparticelle

sulla progressione del ciclo cellulare (dati non mostrati), al contrario di quanto riportato da alcuni dati in letteratura (Zhang et al., 2006; Yang et al., 2010), che mostrano generalmente una significativa riduzione delle cellule in fase S dopo esposizione a NP di silice.

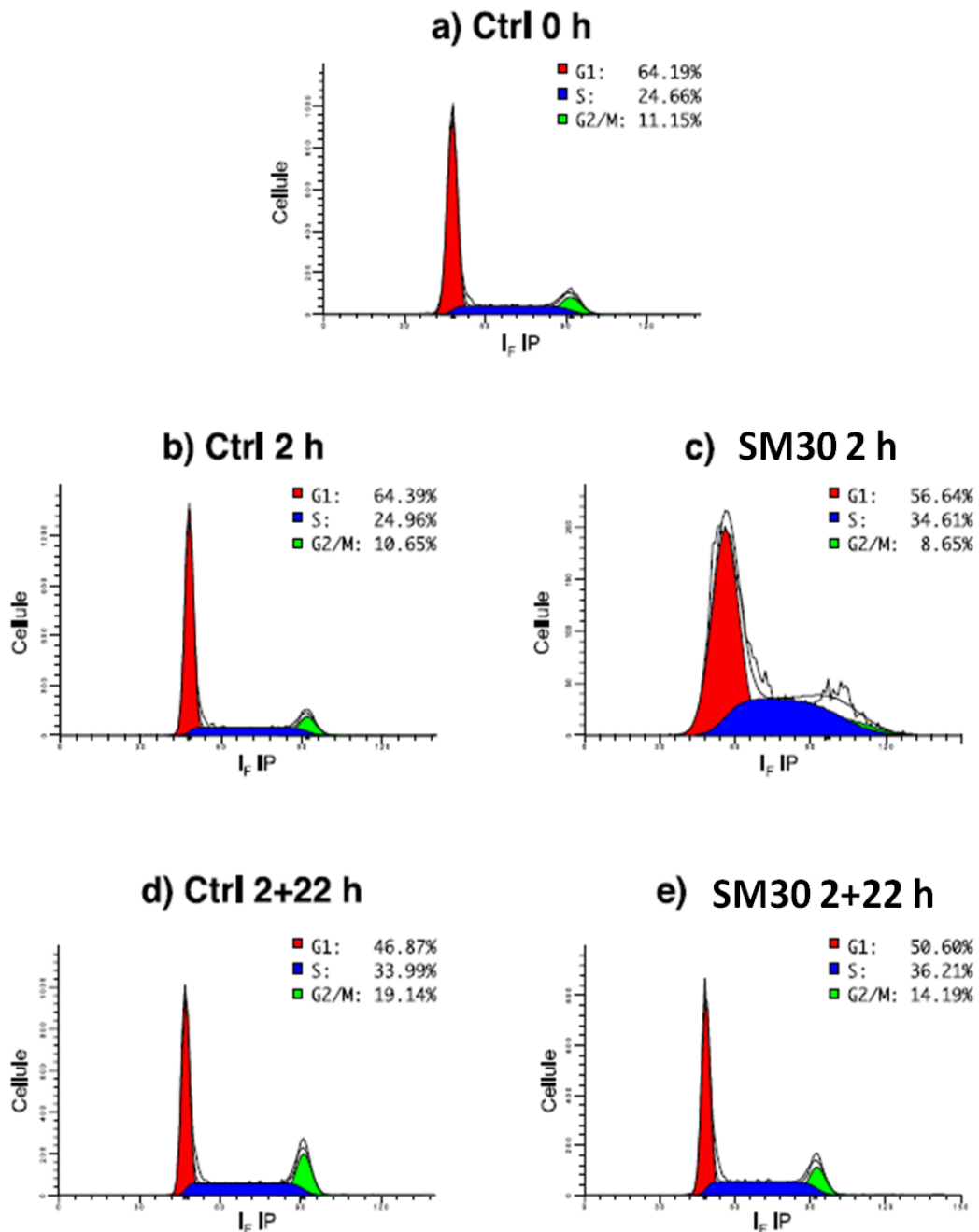


Figura 62: diagrammi di distribuzione del ciclo cellulare di cellule **CCD-34 Lu** trattate per 2 h con NP SM30 alla concentrazione 0,02 mg/ml e fissate subito al termine del trattamento (c) o dopo 22 h (e). I controlli (b) e (d) sono stati sottoposti agli stessi passaggi ma in assenza di NP. Si riporta anche l'analisi del ciclo cellulare per il controllo prima del trattamento senza siero (a). I diagrammi riportati si riferiscono a una delle due serie di esperimenti effettuati, che hanno mostrato risultati simili.

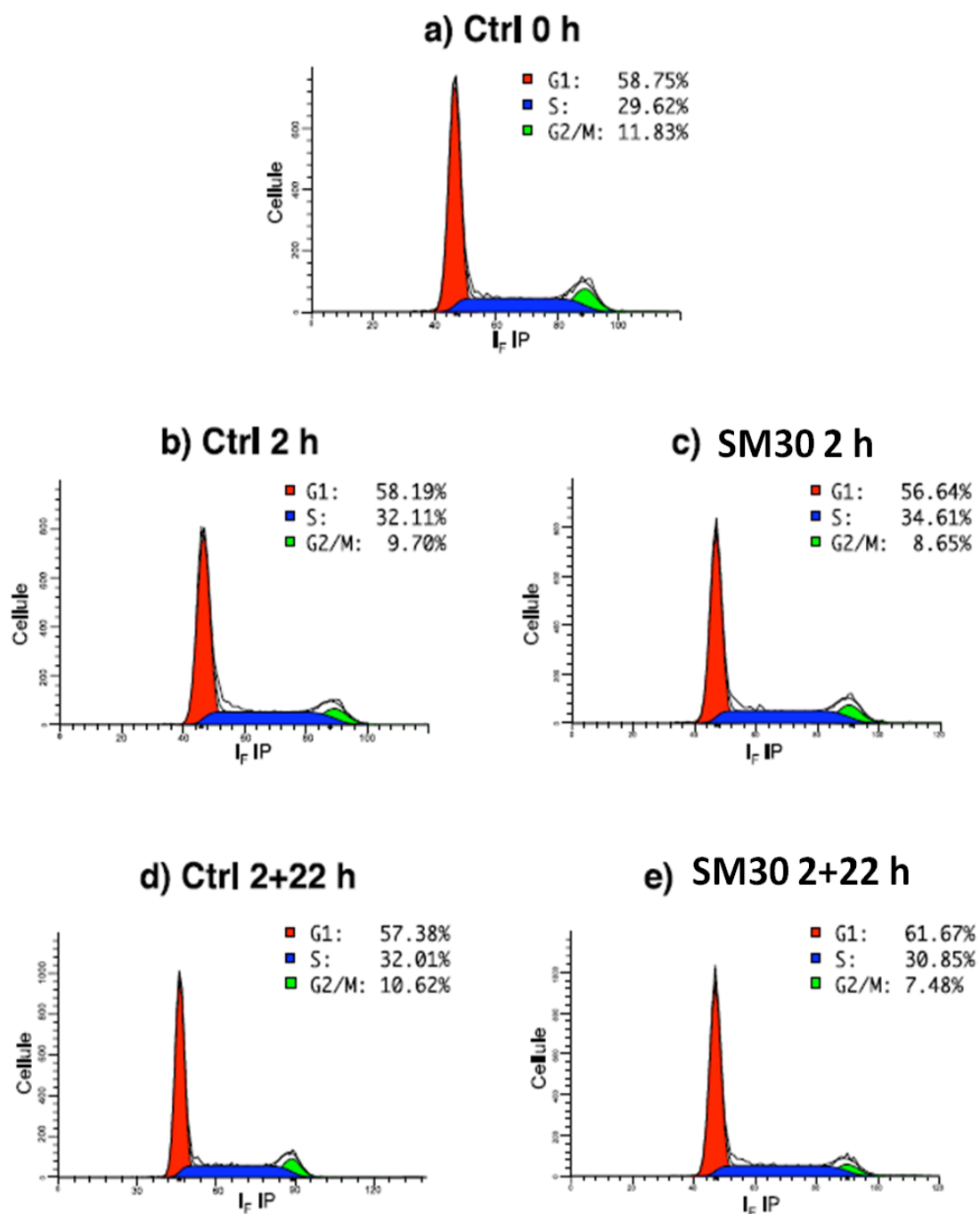


Figura 63: diagrammi di distribuzione del ciclo cellulare di cellule **A549** trattate per 2 h con NP SM30 alla concentrazione 0,02 mg/ml e fissate subito al termine del trattamento (c) o dopo 22 h (e). I controlli (b) e (d) sono stati sottoposti agli stessi passaggi ma in assenza di NP. Si riporta anche l'analisi del ciclo cellulare per il controllo prima del trattamento senza siero (a). I diagrammi riportati si riferiscono a una delle due serie di esperimenti effettuati, che hanno mostrato risultati simili.

6. Conclusioni

Durante il mio Dottorato di Ricerca ho condotto un'analisi *in vitro* per valutare gli effetti citotossici causati dall'esposizione a nanoparticelle di uso industriale Ludox[®]. Dati i numerosi studi di tossicità condotti su colture di fibroblasti polmonari (Mroz et al., 2007; Foldbjerg et al., 2010) e l'alto rischio di esposizione alle nanoparticelle a livello polmonare (Gwinn et al., 2006; Nel et al., 2006), per questo lavoro sono state selezionate una linea cellulare umana, CCD-34 Lu, derivata da fibroblasti di polmone neonatali, e due linee umane tumorali, A549, di carcinoma polmonare, e HT-1080, di fibrosarcoma, per il trattamento con NP AS30 (20 nm) ed SM30 (7 nm) e lo studio della loro tossicità e dei loro meccanismi d'azione.

I risultati ottenuti dimostrano, in accordo con studi in letteratura (Lin et al., 2006; Napierska et al., 2009), che le due NP di silice saggiate danno una tossicità tempo e dose-dipendente in tutte e tre le linee cellulari *in vitro*. Inoltre, le NP di diametro minore e area superficiale maggiore (SM30) possiedono generalmente una maggiore attività citotossica, probabilmente perchè, essendo più piccole, possono penetrare più facilmente nelle membrane e inoltre, a parità di peso, ne viene somministrato alle cellule un numero maggiore rispetto alle NP AS30. Poiché è stato dimostrato che le NP tendono ad aggregare anche in presenza di una bassa concentrazione di siero (3%), sono stati confrontati i risultati dei saggi di vitalità cellulare trattando le cellule in presenza di siero nel terreno di coltura o in assenza di siero per tempi brevi (2 h). Sia il saggio clonogenico che il test MTS hanno messo in evidenza che la diminuzione di vitalità è minore quando il trattamento con le NP Ludox[®] avviene in terreno con il 3% di siero. Questo risultato è probabilmente determinato dal fatto che le NP, formando aggregati reversibili ed instabili con le proteine del siero, risultano meno tossiche, probabilmente perchè, date le maggiori dimensioni, attraversano la membrana cellulare in quantità minore. Per dimostrare questa ipotesi sarebbe necessario effettuare degli studi di internalizzazione delle NP nelle diverse condizioni di coltura; ciò non è stato possibile dal momento che le NP Ludox[®] non sono visibili al microscopio. Anche legando ad esse delle molecole di fluoresceina, rendendole così visibili al microscopio a fluorescenza, non si potrebbe dimostrare il meccanismo d'ingresso nelle cellule delle NP Ludox[®], dal momento che anche piccole modifiche ne alterano le caratteristiche chimico-fisiche.

Infine, la linea cellulare normale CCD-34 Lu è risultata la più sensibile al trattamento con le NP rispetto alle due linee tumorali, che mostrano un calo significativo della vitalità cellulare solo a dosi che risultano pressochè letali per la linea normale (~0,02 mg/ml). In modo analogo, le cellule CCD-34 Lu producono alti livelli di specie reattive dell'ossigeno (ROS) a concentrazioni di NP a cui le due linee tumorali A549 e HT-1080 risultano pressochè insensibili (~0,03 mg/ml). Per tutte e tre le linee cellulari prese in esame si è comunque riscontrata una produzione di ROS dose-dipendente dopo 2 h di incubazione in terreno di coltura in assenza di siero.

È stato dimostrato che la formazione e l'accumulo di specie reattive dell'ossigeno possono causare notevoli danni a livello cellulare, il più grave dei quali a livello del DNA consiste in

doppie rotture (DSBs, double strand breaks) (Mroz et al., 2007; Mroz et al., 2008). Per questa ragione in questo lavoro è stata analizzata tramite immunofluorescenza l'induzione di DSBs al DNA per mezzo di un marcatore di tale lesione, ovvero i foci dell'istone H2AX fosforilato. I risultati ottenuti hanno evidenziato che solo la linea cellulare di fibrosarcoma umano HT-1080 è positiva per la presenza di foci dopo trattamento con nanoparticelle Ludox[®] AS30 e SM30. In questa linea cellulare la cinetica di riparazione delle DSBs porta a un progressivo calo del numero di foci per cellula. Nelle cellule CCD-34 Lu e A549, invece, non sono stati rilevati foci dell'istone H2AX per tutti i tempi e le dosi di trattamento analizzate. Quindi, nonostante i ROS non sembrano indurre doppie rotture nelle linee A549 e CCD-34 Lu, potrebbero invece essere responsabili dell'induzione di questo tipo di danni nella linea HT-1080.

Analizzando poi l'induzione di apoptosi per ciascuna linea cellulare è stato evidenziato che le NP SM30 causano una maggiore mortalità delle AS30, principalmente nella linea cellulare tumorale HT-1080 e in misura minore anche nella linea cellulare A549. In entrambi i casi l'aumento dell'indice apoptotico è significativo solo dopo trattamento con NP SM30 alla dose 0,04 mg/ml (per 2 h senza siero seguite da un ripristino di 22 h in terreno completo), ed inoltre la linea di carcinoma polmonare A549 presenta una percentuale di cellule in apoptosi più bassa rispetto alla linea HT-1080, non proporzionale all'induzione di mortalità riscontrata tramite il saggio clonogenico, suggerendo che la morte cellulare programmata non è il principale meccanismo di morte indotto dalle NP Ludox[®]. Nelle cellule CCD-34 Lu non è stata riscontrata alcuna induzione di apoptosi confermando dati riportati in letteratura che dimostrano che questa linea di fibroblasti polmonari umani normali non va incontro ad apoptosi ma presenta differenti modalità di risposta all'attività citotossica di diversi agenti chimici o fisici (Hampel et al., 2005).

Per studiare gli eventuali effetti genotossici causati dalle NP Ludox[®] è stata analizzata l'espressione genica nelle cellule trattate, tramite la tecnologia dei microarray a DNA. I dati ottenuti con questa analisi permettono di evidenziare la presenza di geni differenzialmente espressi nei campioni trattati rispetto a campioni di controllo e, successivamente, di individuare i pathways cellulari in cui sono coinvolti. I risultati preliminari raggiunti in questo lavoro riguardano la linea cellulare A549 e permettono di concludere che, dopo trattamento con una dose bassa di NP (0,02 mg/ml), si verifica un'alterazione dell'espressione genica: il numero di geni la cui espressione risulta significativamente alterata rispetto al controllo è più alto nel campione trattato con le NP SM30 (354 geni) rispetto al campione trattato con le NP AS30 (222 geni) a parità di dose. In entrambi i casi comunque un numero maggiore di geni alterati risulta sovra-espresso rispetto ai geni sotto-espressi, se confrontati con il campione di controllo. Inoltre, il livello di espressione genica risulta maggiormente alterato quando l'analisi viene condotta dopo 3 ore di ripristino rispetto al tempo lungo (22 h di ripristino in terreno completo), suggerendo che le cellule sono in grado di far fronte agli effetti genotossici

indotti dalle NP. Successivamente, andando a indagare i livelli di espressione dei principali geni alterati ed effettuando un raggruppamento dei geni in percorsi metabolici condivisi in cui essi sono coinvolti, si è potuto osservare che i principali pathways alterati sono il controllo del ciclo cellulare, le vie regolate da p53, la via di signalling delle MAPK e la regolazione dell'organizzazione del citoscheletro cellulare, dimostrando così che il trattamento con NP Ludox[®] può alterare *in vitro* i normali processi metabolici delle cellule coinvolte. Questi dati sono comunque da approfondire e da confermare effettuando analoghi studi di alterazione dell'espressione genica nelle altre due linee cellulari prese in esame in questo lavoro. Nonostante lo studio dei profili di espressione genica abbia messo in evidenza una deregolazione di alcuni geni coinvolti nel controllo del ciclo cellulare dopo trattamento con NP Ludox[®], l'analisi del ciclo cellulare tramite citofluorimetria a flusso per esaminare gli effetti dei diversi trattamenti sulla normale progressione del ciclo in tutte e tre le linee cellulari studiate non ha però portato in evidenza alcuna alterazione imputabile alle NP in nessuna delle condizioni di trattamento studiate. Questo dato suggerisce che l'alterazione dell'espressione dei geni coinvolti nel ciclo cellulare non è tale da causare un cambiamento significativo sulla percentuale delle cellule nelle varie fasi del ciclo rispetto alle cellule di controllo.

I risultati di questo lavoro costituiscono quindi uno studio preliminare *in vitro* degli effetti citotossici provocati in cellule umane dalle nanoparticelle di silice Ludox[®], che sono un valido esempio di nanoparticelle commerciali di largo impiego, che possono offrire notevoli vantaggi in campo alimentare, medico ed industriale, ma che conducono allo stesso tempo a un'esigenza sempre maggiore di fornire informazioni esaurienti sul loro impatto sugli effetti ambientali e sulla salute umana. Benché solo attraverso studi *in vivo* si potrà definire il reale effetto di nanoparticelle all'interno dell'organismo umano, prendendo in esame anche il loro trasporto per mezzo dei fluidi corporei e il coinvolgimento del sistema immunitario, questo studio *in vitro* è risultato una metodologia di semplice approccio per uno studio preliminare e approfondito degli effetti citotossici provocati da NP Ludox[®].

7. Abbreviazioni

A: assorbanza
Ab: antibiotici
Carbossi-DCFH: carbossi-diclorofluoresceina
Carbossi-H₂DCFDA: 5-(e 6)-carbossi-2',7'-diclorodiidrofluoresceina diacetato
Cy3: 5-NN'-dietil-tetrametilindocarbocianina
DAPI: 4',6-diamidino-2-fenilindole
DLS: Dynamic Light Scattering
DMEM: Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO: dimetilsolfossido
DNA: acido desossiribonucleico
DSB: double strand breaks
EDTA: acido etilen-diammino-tetracetico
FACS: Fluorescence Activated Cell Sorter
FBS: Foetal Bovine Serum
FITC: fluoresceina isotiocianato
FSC: Forward Scatter
F-12K: Nutrient Mixture Kaighn's modification
HBSS: Hank's Buffered Salt Solution
HEPES: acido 4-2-idrossietil-1-piperazinil-etansolfonico
MEM: Minimum Essential Medium
MTS: 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-carbossimetossifenil)-2-(4-sulfofenil)-2Htetrazolio
NEAA: amminoacidi non essenziali
nm: nanometri
NP: nanoparticelle
PBS: Phosphate Buffered Saline
PES: fenazina etosolfato
PI: propidio ioduro
RE: reticolo endoplasmatico
RNA: acido ribonucleico
ROS: Reactive Oxygen Species
RPMI-1640: Roswell Park Memorial Institute-1640
SSC: Side Scatter
TEM: Transmission Electron Microscopy
TPEN: (N,N,N',N'-Tetrakis-(2-pyridilmethyl)-ethylenediamine
UV: raggi ultravioletti

8. Bibliografia

- Abu-Salah K. M., Ansari A. A., Alrokayan S. A. (2010) DNA-Based Applications in Nanobiotechnology. *Journal of Biomedicine and Biotechnology* 2010:715295
- Akerman M. E., Chan W. C., Laakkonen P., Bhatia S. N., Ruoslahti E. (2002) Nanocrystal targeting *in vivo*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 99, 12617-12621
- Arts J. H., Muijser H., Duistermaat E., Junker K., Kuper C. F. (2007) Five-day inhalation toxicity study of three types of synthetic amorphous silicas in Wistar rats and post-exposure evaluations for up to three months. *Food Chem. Toxicol.* 45: 1856-67
- Barratt G. (2002) Colloidal drug carriers: achievements and perspective. *Cell. Mol. Life Sci.* Vol.60, p.21-37
- Blagosklonny M.V. (2000) Cell death beyond apoptosis. *Leukemia* 14(8):1502-8
- Bork P., Hofmann K., Bucher P., Neuwald A. F., Altschul S. F., Koonin E. V. (1997) A superfamily of conserved domains in DNA damage-responsive cell cycle checkpoint proteins. *FASEB J.*, 11:68-76
- Callebaut J., Marnon J. P. (1997) From BRCA1 to RAP1: a widespread BRCT module closely associated with DNA repair. *FEBS lett.*, 400:25-30
- Cannistraro S. (2004) Nanoscienze e nanotecnologie: una sfida e una opportunità per la ricerca italiana nel contesto europeo. *Analysis*, 4
- Chang J. S., Chang K. L., Hwang D. F., Kong Z. L. (2007) In vitro cytotoxicity of silica nanoparticles at high concentrations strongly depends on the metabolic activity type of the cell line. *Environ. Sci. Technol.* 41:2064-68
- Chen Z., Meng H., Xing G., Chen C., Zhao Y., Jia G., Wang T., Yuan H., Ye C., Zhao F., Chai Z., Zhu C., Fang X., Ma B., Wan L. (2006) Acute toxicological effects of copper nanoparticles *in vivo*. *Toxicol. Lett.*, 163(2):109-20

- Chen M., von Mikecz A. (2005) Formation of nucleoplasmic protein aggregates impairs nuclear function in response to SiO₂ nanoparticles. *Experimental cell research*, 305(1):51–62
- Chithrani B. D., Chan W. C. W. (2007) Elucidating the mechanism of cellular uptake and removal of protein-coated gold nanoparticles of different sizes and shapes. *Nano Lett.*, 7(6):1542–1550
- Cohen G. M. (1997) Caspases: the executioners of apoptosis. *Biochem. J.*, 326:1-167
- Compagnin C., Baù L., Mognato M., Celotti L., Miotto G., Arduini M., Moret F., Fede C., Selvestrel F., Rio Echevarria I. M., Mancin F., Reddi E. (2009) The cellular uptake of meta-tetra(hydroxyphenyl)chlorin entrapped in organically modified silica nanoparticles is mediated by serum proteins. *Nanotechnology* 20, 345101-345112
- Cooke M. S., Evans M. D., Dizdaroglu M., Lunec J. (2003) Oxidative DNA damage: mechanisms, mutation, and disease. *FASEB J.*, 17(10):1195-214
- Dailey L. A., Jekel N., Fink L., Gessler T., Schmehl T., Wittmar M., Kissel T., Seeger W. (2006) Investigation of the proinflammatory potential of biodegradable nanoparticle drug delivery systems in the lung. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 215, 100-108
- Davis M.E., Chen Z.G., Shin D.M. (2008) Nanoparticle therapeutics: an emerging treatment modality for cancer. *Nat. Rev. Drug Discov.* 7, 771-782
- Farokhzad O. C., Langer R. (2009) Impact of nanotechnology on drug delivery. *ACS Nano* 3, 16-20
- Foged C., Brodin B., Frokjaer S., Sundblad A. (2005) Particle size and surface charge affect particle uptake by human dendritic cells in a vitro model. *International Journal of Pharmaceutics*, 298:315-22

- Foldbjerg R., Dang D. A., Autrup H. (2010) Cytotoxicity and genotoxicity of silver nanoparticles in the human lung cancer cell line, A549. *Arch. Toxicol.*
- Franken N. A. P., Rodermond H. M., Stap J., Haveman J., van Bree C. (2006) Clonogenic assay of cell in vitro. *Nature Publishing Group*, p.2315-2319, 21
- Geiser M., Kreyling W.G. (2007) Deposition and biokinetics of inhaled nanoparticles. *Part. Fibre Toxicol.*, 7:2
- Geiser M., Rothen-Rutishauser B., Kapp N., Schürch S., Kreyling W., Schulz H., Semmler M., Im Hof V., Heyder J., Gehr P. (2005) Ultrafine Particles Cross Cellular Membranes by Nonphagocytic Mechanisms in Lungs and in Cultured Cells. *Environ. Health Perspect.*, 113(11): 1555-60
- Gharbi N., Pressac M., Hadchouel M., Szwarc H., Wilson S. R., Moussa F. (2005) C[60] fullerene is a powerful antioxidant *in vivo* with no acute or subacute toxicity. *Nano Letters* 5 (12), p.2578–2585
- Godbey W. T., Wu K. K., Mikos A. G. (1999) Tracking the intracellular path of poly(ethylenimine)/DNA complexes for gene delivery. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 96(9):5177-81
- Gupta A. K., Gupta M. (2005) Cytotoxicity suppression and cellular uptake enhancement of surface modified magnetic nanoparticles. *Biomaterials* 26: 1565-1573
- Gupta A. K., Gupta M. (2005) Synthesis and surface engineering of iron oxide nanoparticles for biomedical applications. *Biomaterials* 26(18), p.3995–4021
- Gwinn MR., Vallyathan V. (2006) Nanoparticles: Health Effects—Pros and Cons, *Env Health Perspect.*, Vol.114, p.1818-1824

- Hagens W. I., Oomen A. G., de Jong W. H., Cassee F. R., Sips A. J. (2007) What do we (need to) know about the kinetic properties of nanoparticles in the body? *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 49: 217-229
- Hamer G., Roepers-Gajadien H. L., van Duyn-Goedhart A., Gademan I. S., Kal H. B., van Buul P. P. W., de Rooij D. G. (2003) DNA double-strand breaks and γ -H2AX signaling in the testis. *Biology of Reproduction*, 68, 628-634
- Hampel B., Wagner M., Teis D., Zwerschke W., Huber L. A., Jansen-Dürr P. (2005) Apoptosis resistance of senescent human fibroblasts is correlated with the absence of nuclear IGFBP-3. *Aging Cell*; 4(6):325-30.
- Hoet P.H.M., Bruske-Hohlfeld I., Salata O. V. (2004) Nanoparticles – known and unknown health risks. *Journal of Nanobiotechnology*, 2(1):12
- Horikoshi N., Usheva A., Chen J. D., Levine A. J., Weinmann R., Shenk T. (1995) Two domains of p53 interact with the TATA-binding protein and the adenovirus 13S E1A protein disrupts the association, revealing p53-mediated transcriptional repression. *Mol. Cell. Biol.*, 15:227-234
- Huang X., Jain P. K., El-Sayed I. H., El-Sayed M.A. (2007) Gold nanoparticles: interesting optical properties and recent applications in cancer diagnostics and therapy. *Nanomedicine*, 2(5):681–693
- Hudson S. P., Padera R. F., Langer R., Kohane D. S. (2008) The biocompatibility of mesoporous silicates. *Biomaterials*, 29(30):4045–4055
- Hussain N., Jaitley V., Florence A. T. (2001) Recent advances in the understanding of uptake of microparticulates across the gastrointestinal lymphatics. *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 50(1-2):107-42

- Jani P., Halbert G. W., Langridge J., Florence A. T. (1990) Nanoparticle uptake by the rat gastrointestinal mucosa: quantitation and particle size dependency. *J. Pharm. Pharmacol.*, 42(12):821-6
- Jani P., McCarthy D. E., Florence A. T. (1994) Titanium dioxide (rutile) particle uptake from the rat GI tract and translocation to systemic organs after oral administration. *International journal of pharmaceutics*, 105(2):157–168
- Jia G., Wang H., Yan L., Wang X., Pei R., Yan T., Zhao Y., Guo X. (2005) Cytotoxicity of carbon nanomaterials: single-wall nanotube, multi-wall nanotube, and fullerene. *Environ. Sci. Technol.*, 39(5):1378–83
- Jin Y., Kannan S., Wu M., Zhao J. X. (2007) Toxicity of luminescent silica nanoparticles to living cells. *Chem. Res. Toxicol.*, Vol.20, p.1126-1133
- Jones M. C., Leroux J. C. (1999) Polymeric micelles – a new generation of colloidal drug carriers. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 48, 101-111
- Kaewamatwong T., Shimada A., Obajima M., Inou H., Morita T., Inou K. (2006) Acute and subacute pulmonary toxicity of low dose of ultrafine collidal silica particles in mice after intratracheal instillation. *Toxicol. Letter*, 175:24-33
- Karn B., Kuiken T., Otto M. (2009) Nanotechnology and in Situ Remediation: A Review of the Benefits and Potential Risks. *Environ. Health Perspect.*; 117(12): 1813–1831
- Kim J. S., Yoon T. J., Yu K. N., Noh M. S., Woo M., Kim B. G., Lee K. H., Sohn B. H., Park S. B., Lee J. K. (2006) Cellular uptake of magnetic nanoparticles is mediated through energy-dependent endocytosis in A549 cells. *J. Vet. Sci.*, 7:321–326
- Kolosnjaj J., Szwarc H., Moussa F. (2007) Toxicity studies of fullerenes and derivatives. *Adv. Exp. Med. Biol.* 620: 168–180

- Kronick M.N. (2004) Creation of the whole human genome microarray. *Expert Rev. Proteomics.*;1(1):19-28
- Lanza G. M., Wickline S. A. (2003) Targeted ultrasonic contrast agents for molecular imaging and therapy. *Curr. Probl. Cardiol.*; 28(12):625-53
- Lewinski N., Colvin V., Drezek R. (2008) Cytotoxicity of nanoparticles. *Small*, 4(1):26–49
- Lin W., Huang Y., Zhou X. D., Ma Y. (2006) In vitro toxicity of silica nanoparticles in human lung cancer cells. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 217: 252-259
- Lines M. G. (2008) Nanomaterials for practical functional use. *Journal of Alloys and Compounds*, Vol.449, p.242-245
- Liu D., Gu N. (2009) Nanomaterials for fresh-kipping and sterilization in food preservation. *Recent Pat. Food Nutr. Agric.*; 1(2):149-54
- Lomer M. C., Thompson R. P., Powell J. J. (2002) Fine and ultrafine particles in the diet: influence on the mucosal immune response and association with Crohn's disease. *Proc. Nutr. Soc.*, 61(1): 123-30
- Lundqvist M., Sethson I., Jonsson B. H. (2004). Protein adsorption onto silica nanoparticles: conformational changes depend on the particles' curvature and the protein stability. *Langmuir*; 20(24):10639-47
- Markova E., Schultz N., Belyaev I. Y. (2007) Kinetics and dose-response of residual 53BP1/γH2AX foci: co-localization, relationship with DSB repair and clonogenic survival. *Int. J. Radiat. Biol.*, 83:319-329
- Mazzola L. (2003) Commercializing nanotechnology, *Nature Biotechnology*, Vol.21, No.10
- McNeil S.E. (2005) Nanotechnology for the biologist. *J. Leukoc. Biol.* 78(3): 585-94

- Medina C., Santos-Martinez M. J., Radomski A., Corrigan O. I., Radomski M. W. (2007) Nanoparticles: pharmacological and toxicological significance. *Br. J. Pharmacol.* 150: 552-558
- Medintz I. L., Uyeda H. T., Goldman E. R., Mattoussi H. (2005) Quantum dot bioconjugates for imaging, labelling and sensing. *Nature Materials*, 4(6):435–446
- Michalska E. A. (2007) Isolation and propagation of mouse embryonic fibroblasts and preparation of mouse embryonic feeder layer cells. *Curr. Protoc. Stem Cell Biol.* 3:1C
- Moghimi S. M., Hunter A. C., Murray J. C. (2005) Nanomedicine: current status and future prospects. *The FASEB Journal*, 19(3):311
- Moghimi S. M., Szebeni J. (2003) Stealth liposomes and long circulating nanoparticles: critical issues and pharmacokinetics, opsonisation and protein binding properties. *Progress in Lipid Research*, 42: 463-478
- Moreira D. F., Strauss B. E., Vannier E., Belizário J. E. (2008) Genes up- and down-regulated by dermcidin in breast cancer: a microarray analysis. *Genet. Mol. Res.*, 7(3): 925-32
- Mroz R. M., Schins R. P. F., Li H., Drost E. M., Macnee W., Donaldson K. (2007) Nanoparticle carbon black driven DNA damage induces growth arrest and AP-1 and NF- κ B DNA binding in lung epithelial A549 cell line. *Journal of physiology and pharmacology*, 58(5):461–470
- Mroz R. M., Schins R. P. F., Li H., Jimenez L. A., Drost E. M., Holownia A., MacNee W., Donaldson K. (2008) Nanoparticle-driven DNA damage mimics irradiation-related carcinogenesis pathways. *Eur. Respir. J.*; 31: 241–251
- Müller W. E., Boreiko A., Wang X., Krasko A., Geurtsen W., Custódio M. R., Winkler T., Lukić-Bilela L., Link T., Schröder H. C. (2007) Morphogenetic activity of silica and bio-

silica on the expression of genes controlling biomineralization using SaOS-2 cells. *Calcif. Tissue Int.*, 81(5):382-93.

- Munshi A., Tanaka T., Hobbs M. L., Tucker S. L., Richon V. M., Meyn R. E. (2006) Vorinostat, a histone deacetylase inhibitor, enhances the response of human tumor cells to ionizing radiation through prolongation of gamma-H2AX foci. *Mol. Cancer Ther.*, 5(8):1967-74
- Napierska D., Thomassen L. C. J., Rabolli V., Lison D., Gonzalez L., Kirsch-Volders M., Martens A., Hoet P. H. (2009) Size-dependent cytotoxicity of monodisperse silica nanoparticles in human endothelial cells. *Small*, 5(7):846–853
- Nel A., Xia T., Madler L., Li N. (2006) Toxic potential of materials at the nanolevel. *Science*, 311(5761):622
- Newman M. D., Stotland M., Ellis J. I. (2009) The safety of nanosized particles in titanium dioxide- and zinc oxide-based sunscreens. *Journal of the American Academy of Dermatology*, 61(4):685–692
- Nohynek G. J., Dufour E. K., Roberts M. S. (2008) Nanotechnology, cosmetics and the skin: is there a health risk? *Skin Pharmacol. Physiol.*, 21(3):136-49
- Oberdörster G., Ferin J., Lehnert B. E. (1994) Correlation between particle size, *in vivo* particle persistence, and lung injury. *Environ. Health Perspect.*, 102 Suppl 5:173-9
- Oberdörster G., Oberdörster E., Oberdörster J. (2005) Nanotoxicology: an emerging discipline evolving from studies of ultrafine particles. *Environ. Health Perspect.* 113, 823-839
- Orive G., Anitua E., Pedraz J. L., Emerich D. F. (2009) Biomaterials for promoting brain protection, repair and regeneration. *Nat. Rev. Neurosci.* 10, 682-692

- Owens D. E., Peppas N. A. (2006) Opsonization, biodistribution, and pharmacokinetics of polymeric nanoparticles. *Int. J. Pharm.* 307, 93-102
- Pagona G., Tagmatarchis N. (2006) Carbon nanotubes: materials for medicinal chemistry and biotechnological applications. *Curr. Med. Chem.* 13, 1789-1798
- Panté N., Kann M. (2002) Nuclear pore complex is able to transport macromolecules with diameters of about 39 nm. *Mol. Biol. Cell*, 13(2):425–34
- Panyam J., Labhasetwar V. (2003) Biodegradable nanoparticles for drug and gene delivery to cell and tissues. *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 55(3): 329-47
- Park E. J., Park K. (2008) Oxidative stress and pro-inflammatory responses induced by silica nanoparticles *in vivo* and *in vitro*. *Toxicology Letters*, 184(1):18-2
- Polizu S., Savadogo O., Poulin P., Yahia L. H. (2006) Applications of carbon nanotubes-based biomaterials in biomedical nanotechnology. *Journal of nanoscience and nanotechnology*, 6(7):1883–1904
- Porter A. G., Jänicke R. U. (1999). Emerging roles of caspase-3 in apoptosis. *Cell Death Differ.* 6(2):99-104
- Quintana A., Raczka E., Piehler L., Lee I., Myc A., Majoros I., Patri A. K., Thomas T., Mule J., Baker Jr J. R. (2002) Design and function of a dendrimer-based therapeutic nanodevice targeted to tumor cells through the folate receptor. *Pharm. Res. Vol.19*, p.1310–1316
- Radhakrishnan R., Solomon M., Satyamoorthy K., Martin L. E., Lingen M. W. (2008) Tissue microarray - a high-throughput molecular analysis in head and neck cancer. *J. Oral Pathol. Med.*: 37(3):166-76
- Rai M., Yadav A., Gade A. (2009) Silver nanoparticles as a new generation of antimicrobials. *Biotechnology advances*, 27(1):76–83

- Roco M. (2003) Nanotechnology: convergence with modern biology and medicine. *Curr. Opin. Biotechnol.* 14: 337-346
- Roser M., Fischer D., Kissel T. (1998) Surface-modified-biodegradable albumin nano- and microspheres II: effects of surface charges on *in vitro* phagocytosis and biodistribution in rats. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 46:255-63
- Rothkamm K., Krüger I., Thompson L. H., Löbrich M. (2003) Pathways of DNA double-strand breaks repair during mammalian cell cycle. *Molecular and Cellular Biology*, 16:5706-5715
- Rothkamm K., Löbrich M. (2003) Evidence of a lack of DNA double-strand break repair in human cells exposed to very low X-rays doses. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 100:5057-5062
- Roy I., Ohulchanskyy T. Y., Pudavar H. E., Bergey E. J., Oseroff A. R., Morgan J., Dougherty T. J., Prasad P. N. (2003) Ceramic-based nanoparticles entrapping water-insoluble photosensitizing anticancer drugs: a novel drug-carrier system for photodynamic therapy. *J. Am. Chem. Soc.* 125, 7860-7865
- Ryman-Rasmussen J. P., Riviere J. E., Monteiro-Riviere N. A. (2006) Penetration of Intact Skin by Quantum Dots with Diverse Physicochemical Properties. *Toxicological Sciences* 91(1): 159–165
- Salata O.V. (2004) Application of nanoparticles in biology and medicine. *Journal of nanobiotechnology*, vol.2, p.1-6
- Sanvincens N., Marco M. P. (2008) Multifunctional nanoparticles – properties and prospects for their use in human medicine. *Trends Biotechnol.*, 26(8): 425-33
- Savic R., Luo L., Eisenberg A., Maysinger D. (2003) Micellar nano-containers distribute to defined cytoplasmic organelles. *Science*, 300(5619):615–8

- Schena M., Shalon D., Davis R. W., Brown P. O. (1995) Quantitative monitoring of gene expression patterns with a complementary DNA microarray. *Science*, 270(5235):368-9, 371
- Service S. R. (2005) Nanotechnology. Calls rise for more research on toxicology of nanomaterials. *Science*, 310(5754):1609
- Shin J. S., Abraham S. N. (2007) Caveolae-not just craters in the cellular landscape. *Science*, 293(5534):1447-8
- Singh R., Lillard J. W. (2009) Nanoparticle-based targeted drug delivery. *Exp. Mol. Pathol.* 86, 215-223
- Singh N., Manshian B., Jenkins G. J. S., Griffiths S. M., Williams P. M., Maffei T. G. G., Wright C. J., Doak S. H. (2009) NanoGenotoxicology: The DNA damaging potential of engineered nanomaterials. *Biomaterials*, vol.30, p.3891-3914
- Singh S., Nalwa H. S. (2007) Nanotechnology and health safety: toxicity and risk assessments of nanostructured materials on human health. *J. Nanosci. Nanotechnol.* 7(9):3048-70
- Swanson J. A., Watts C. (1995) Macropinocytosis. *Trends Cell Biol.*, 5(11): 424-8
- Tabatabaei S., Shukohfar A., Aghababazadeh R., Mirhabibi A. (2006) Experimental study of the synthesis and characterisation of silica nanoparticles via the sol-gel method. *Journal of Physics: Conference Series*, vol. 26, p.371-74
- Takei K., Haucke V. (2001) Clathrin-mediated endocytosis: membrane factors pull the trigger. *Trends Cell Biol.*, 11(9): 385-91
- Tanaka T., Huang X., Jorgensen E., Gietl D., Traganos F., Darzynkiewicz Z., Albino A. P. (2007) ATM activation accompanies histone H2AX phosphorylation in A549 cells upon exposure to tobacco smoke. *BMC Cell Biol.*, 8:26

- Thomas M., Klibanow A. M. (2003) Conjugation to gold nanoparticles enhances polyethylenimine's transfer of plasmid DNA into mammalian cells. *Proc. Natl. Acad. Sci., Vol.100, p.9138– 9143*
- Tomalia D. A., Frechet J. M. J. (2002) Discovery of dendrimers and dendritic polymers: a brief historical prospective. *J. Polim. Sci. Part.: Poly Chem., Vol.40, p.2719-2728*
- Tominaga H., Kodama S., Matsuda N., Suzuki K., Watanabe M. (2004) Involvement of reactive oxygen species (ROS) in the induction of genetic instability by radiation. *J Radiat Res;45(2):181-8*
- Tong R., Cheng J. J. (2007) Anticancer polymeric nanomedicines. *Polym. Rev. 47, 345-381*
- Torchilin V. P. (2005) Recent advances with liposomes as pharmaceutical carriers. *Nature Reviews Drug Discovery, 4(2):145–160*
- Tusher V. G., Tibshirani R., Chu G. (2001) Significance Analysis of Microarrays applied to the ionizing radiation exposure. *Proc. Natl. Acad. Sci.; 98(9): 5116-5121*
- Van Veelen L. R., Cervelli T., van de Rakt M.W.M.M., Theil A. F., Essers J., Kanaar R. (2005) Analysis of ionizing radiation-induced foci of DNA damage repair proteins. *Mutat. Res., 547:22-33*
- Wang F., Wang F., Gao F., Lan M., Yuan H., Huang Y., Liu J. (2009) Oxidative stress contributes to silica nanoparticles-induced cytotoxicity in human embryonic kidney cells. *Toxicology in Vitro, Vol.23, p.808-815*
- Weissleder R., Elizondo G., Wittenberg J., Lee A. S., Josephson L., Brady T. J. (1990) Ultrasmall superparamagnetic iron oxide: an intravenous contrast agent for assessing lymph nodes with MR imaging. *Radiology 175, 494-498*

- Xue Z. G., Zhu S. H., Pan Q., Liang D. S., Li Y. M., Liu X. H., Xia K., Xia J. H. (2006) Biotoxicology and biodynamics of silica nanoparticle. *Zhong Nan Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban.* 31(1):6-8
- Yang X., Liu J., He H., Zhou L., Gong C., Wang X., Yang L., Yuan J., Huang H., He L., Zhang B., Zhuang Z. (2010) SiO₂ nanoparticles induce cytotoxicity and protein expression alteration in HaCaT cells. *Particle and Fibre Toxicology*, 7:1
- Zhang H. Y., Hormi-Carver K., Zhang X., Spechler S. J., Souza R. F. (2009) In benign Barrett's epithelial cells, acid exposure generates reactive oxygen species that cause DNA double-strand breaks. *Cancer research*, 69(23):9083-9
- Zhang T., Stilwell J. L., Gerion D., Ding L., Elboudwarej O., Cooke P. A., Gray J. W., Alivisatos A. P., Chen F. F. (2006) Cellular effects of high doses of silica-coated quantum dot profiled with high throughput gene expression analysis and high content cellomics measurements. *Nano Lett.*, 6(4):800-8
- Zou H., Li Y., Liu X., Wang X. (1999) An APAF-1.cytochrome c multimeric complex is a functional apoptosome that activates procaspase-9. *J. Biol. Chem.* 274(17):11549-56
- *Websites:* www.eur-lex.europa.eu; www.grace.com; www.nanocompositech.com; www.nanodiagnostics.it; www.nanosilver.it; www.nanotechproject.org

Pubblicazioni

- Compagnin C., Baù L., Mognato M., Celotti L., Miotto G., Arduini M., Moret F., Fede C., Selvestrel F., Rio Echevarria I. M., Mancin F., Reddi E. “The cellular uptake of meta-tetra(hydroxyphenyl)chlorin entrapped in organically modified silica nanoparticles is mediated by serum proteins”. *Nanotechnology*. 2009 Aug 26;20(34):345101-345112

Partecipazioni a congressi

Il contenuto di questa tesi è stato presentato a congressi nazionali ed internazionali:

- Congresso internazionale sulle nanotecnologie “Nanotec2008.it-Nanotechnology for Industry”, Venezia, 10-14 Marzo 2008. “Organic modified silica (ORMOSIL) nanoparticles for the delivery of photosensitizer *m*THPC to cancer cells”, C. Compagnin, C. Fede, F. Moret, M. Mognato, E. Reddi and L. Celotti.
- “Environmental Mutagens and Human Health” (EEMS 38th Annual Meeting), Cavtat (Croazia), 21-25 Settembre 2008. “Cytotoxicity of nanostructures”, C. Fede, C. Compagnin, M. Mognato, A. Lembo, F. Selvestrel, E. Reddi, L. Celotti.
- “Nanotec2009”, Roma, 31 Marzo-2 Aprile 2009. “Cytotoxicity and DNA damage induced in human cells incubated with commercial nanomaterials”, C. Fede, M. Mognato, A. Lembo, M. De Nardi, F. Selvestrel, E. Reddi, L. Celotti.
- “ICEM 2009” (10th International Conference on Environmental Mutagens), Firenze, 20-25 Agosto 2009. “Cytotoxicity and genotoxicity induced in human cells incubated with commercial nanomaterials”, C. Fede, M. Mognato, F. Mancin, E. Reddi, L. Celotti.
- “IBIC 2010” (2nd International Conference on Industrial Biotechnology), Padova, 12-14 Aprile 2010. “Cytotoxicity and genotoxicity induced in human cells by commercial silica nanoparticles”, C. Fede, C. Compagnin, M. Mognato, C. Millino, B. Pacchioni, G. Lanfranchi, E. Reddi, L. Celotti.
- “Nanotoxicology 2010”, Edimburgo, 2-4 Giugno 2010. “Cytotoxicity and genotoxicity induced in human cells by commercial silica nanoparticles”, C. Fede, C. Compagnin, M. Mognato, C. Millino, B. Pacchioni, G. Lanfranchi, E. Reddi, L. Celotti.
- “EEMS 2010”, Oslo, 15-18 Settembre 2010. “Cytotoxicity and genotoxicity induced in human cells by commercial silica nanoparticles”, C. Fede, C. Compagnin, M. Mognato, C. Millino, B. Pacchioni, G. Lanfranchi, E. Reddi, L. Celotti.