

**UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI NAPOLI
FEDERICO II**



**DOTTORATO DI RICERCA
IN
INGEGNERIA DEI MATERIALI E DELLA PRODUZIONE
XXV CICLO**

Effetti delle Nanoparticelle su differenti sistemi biologici

Coordinatore:

Ch.mo Prof. Giuseppe Mensitieri

Tutor:

Ch. mo Prof. Paolo Antonio Netti

Ch. mo Prof. Riccardo Talevi

Candidata:

Dott.ssa Ilaria Fiorentino

TRIENNIO 2009-2012

CAPITOLO 1

Introduzione e Scopo del lavoro pag. 1

CAPITOLO 2

Ruolo della matrice extracellulare sulle funzioni cellulari in vivo pag. 5

1. Interazione cellula-matrice in vivo pag. 6

1.1 La matrice extracellulare (ECM): struttura e funzione pag. 6

2. Comunicazione tra citosol e ambiente extracellulare pag. 7

2.1 La membrana plasmatica pag. 7

2.1.2 Trasporti transmembrana pag. 11

2.1.2.1 Trasporto passivo pag. 12

2.1.2.2 Trasporto attivo pag. 13

2.1.2.3 Endocitosi pag. 14

2.1.2.3.1 Fagocitosi pag. 14

2.1.2.3.2 Pinocitosi pag. 15

2.1.2.3.3 Endocitosi mediata da recettori pag. 16

3. Esocitosi pag. 17

CAPITOLO 3

Interazioni tra biomateriali e ambiente biologico pag. 19

<i>1. Interazioni cellula-biomateriale in vitro</i>	pag. 20
<i>2. Caratteristiche chimiche del materiale</i>	pag. 21
<i>2.1 Natura del materiale</i>	pag. 21
<i>2.2 Bioattivazione</i>	pag. 22
<i>3. Caratteristiche fisiche del materiale</i>	pag. 25
<i>3.1 Proprietà meccaniche</i>	pag. 25
<i>3.2 Forma del materiale</i>	pag. 27
<i>3.3 Dimensione del materiale: le nanoparticelle</i>	pag. 29
<i>4. Applicazioni delle nanoparticelle in campo biomedico</i>	pag. 29
<i>4.1 Drug delivery</i>	pag. 29
<i>4.1.2 Sistemi particellari a base di acido poli (lattico-co-glicolico) per il rilascio controllato di farmaci</i>	pag. 32
<i>4.2 Gene therapy</i>	pag. 33
<i>4.3 Ipertermia</i>	pag. 36
<i>4.4 Risonanza magnetica</i>	pag. 38
CAPITOLO 4	
Nanotossicità: Danni cellulari e meccanismi di difesa	pag. 41
<i>1. ROS (“Reactive Oxygen Species”)</i>	pag. 42

<i>1.1 Meccanismi di difesa antiossidante</i>	pag. 44
<i>1.1.1 Antiossidanti enzimatici</i>	pag. 45
<i>1.1.2 Antiossidanti non enzimatici</i>	pag. 45
<i>2. Il ciclo cellulare</i>	pag. 47
<i>2.1 Chinasi e cicline</i>	pag. 48
<i>2.1.1 Gli Inibitori delle Chinasi Ciclina-Dipendenti</i>	pag. 50
<i>2.2 Punti di controllo del danno al DNA nel ciclo cellulare.</i>	pag. 51
<i>3. Infiammazione cellulare</i>	pag. 51
<i>4. Morte cellulare</i>	pag. 52
<i>4.1 Necrosi cellulare</i>	pag. 52
<i>4.2 Apoptosi cellulare</i>	pag. 53
<i>5. Effetti citotossici indotti da Nanoparticelle.</i>	pag. 55

CAPITOLO 5

Lo sviluppo embrionale bovino in vitro: Saggio predittivo di nanotossicità'	pag. 58
<i>1. Saggi di tossicità dei nanomateriali</i>	pag. 59
<i>2. La riproduzione sessuata</i>	pag. 62
<i>2.1 Fecondazione nei mammiferi</i>	pag. 62

<i>2.1.1. Completamento della maturazione ovocitaria</i>	pag. 63
<i>2.1.2 Capacitazione spermatica</i>	pag. 63
<i>2.1.3 Interazione ovocita spermatozoo: Fecondazione</i>	pag. 63
<i>2.1.4 Sviluppo embrionale</i>	pag. 65
<i>3. Sviluppo Embrionale in vitro: sensibile saggio di tossicità</i>	pag. 69

CAPITOLO 6

Effetto della taglia sull'uptake di nanoparticelle in cellule epiteliali oviduttali bovine	pag. 71
--	---------

INTRODUZIONE	pag. 72
---------------------	---------

MATERIALI E METODI	pag. 73
---------------------------	---------

<i>1. Nanoparticelle di polistirene</i>	pag. 73
---	---------

<i>1.1 Misure di determinazione del potenziale zeta e della taglia di nanoparticelle di polistirene da 44nm</i>	pag. 74
---	---------

<i>2. Prelievo delle cellule epiteliali oviduttali bovine (BOEC) e allestimento della coltura primaria</i>	pag. 74
--	---------

<i>3. Cinetica di internalizzazione di Nanoparticelle di polistirene da 44 e 100nm in BOEC</i>	pag. 76
--	---------

<i>3.1 Analisi d'immagine</i>	pag. 76
-------------------------------	---------

<i>3.2 Analisi spettrofluorimetrica</i>	pag. 77
---	---------

<i>3.2.1 Acquisizione dei dati allo spettrofluorimetro</i>	pag. 77
<i>4. Studio dei meccanismi di internalizzazione di nanoparticelle di polistirene da 44nm in BOEC</i>	pag. 80
<i>4.1 Colorazione dei filamenti actinici con falloidina rodaminata</i>	pag. 81
<i>5. Immunofluorescenza indiretta</i>	pag. 81
<i>6. Rilascio di Nanoparticelle di polistirene di 44nm da BOEC</i>	pag. 82
<i>6.1 Analisi d'immagine</i>	pag. 82
<i>6.2 Analisi spettrofluorimetrica</i>	pag. 82
<i>7. Analisi statistica</i>	pag. 82
RISULTATI	
<i>1. Determinazione della taglia e del potenziale zeta di nanoparticelle di polistirene da 44nm e 100nm</i>	pag. 83
<i>2. Cinetica di internalizzazione di Nanoparticelle di polistirene da 44 e 100nm in BOEC</i>	pag. 83
<i>2.1 Analisi d'immagine</i>	pag. 83
<i>2.2 Analisi spettrofluorimetrica</i>	pag. 84
<i>3. Meccanismi di internalizzazione di nanoparticelle di polistirene da 44nm in BOEC</i>	pag. 85
<i>4. Immunofluorescenza indiretta</i>	pag. 89

<i>5. Rilascio di NPs-PS da 44nm in BOEC</i>	pag. 90
<i>6. Cinetica di rilascio di NPs-PS da 44nm da BOEC</i>	pag. 91
DISCUSSIONE	pag. 91
CAPITOLO 7	
Effetti citotossici di nanoparticelle.	
Sviluppo embrionale bovino in vitro: saggio predittivo di nano tossicità	pag. 97
INTRODUZIONE	pag. 98
MATERIALI E METODI	pag. 100
<i>1. Nanoparticelle</i>	Pag. 100
<i>1.1 Nanoparticelle di polistirene</i>	pag. 100
<i>1.2 Nanoparticelle di acido poli(D,L-lattico-co-glicolico) e polietilene glicole</i>	pag. 100
<i>1.3 Nanoparticelle di ossido di silicio</i>	pag. 101
<i>1.4 Misure di determinazione del potenziale zeta e della taglia delle nanoparticelle</i>	pag. 101
<i>2. Internalizzazione di NPs-PS da 44-100nm e di NPs-PLGA/PEG da 65nm in cellule germinali bovine.</i>	pag. 101
<i>2.1 Recupero di ovociti bovini e maturazione ovocitaria in vitro</i>	pag. 101
<i>2.2 Preparazione del liquido seminale bovino</i>	pag. 102

<i>3. Sistema computerizzato per l'analisi di parametri spermatici (SCA)</i>	pag. 102
<i>3.1 Descrizione del sistema computerizzato per l'analisi (SCA)</i>	pag. 103
<i>3.1.1 Settaggio dello SCA</i>	pag. 106
<i>3.1.2 Fonti di errori nei sistemi SCA</i>	pag. 107
<i>3.1.2.1 Riconoscimento dell'oggetto</i>	pag. 107
<i>3.1.2.2 Movimento</i>	pag. 107
<i>4. Esperimenti di citotossicità di NPs-PS di 44-100nm, di NPs-PLGA/PEG di 65nm, NPs-SiO₂ di 20nm su spermatozoi bovini</i>	pag. 107
<i>5. Esperimenti di citotossicità di NPs-PS di 44nm, di NPs-PLGA/PEG di 65nm e di NPs-SiO₂ di 20nm sullo sviluppo embrionale bovino in vitro</i>	pag. 108
<i>5.1 Fecondazione e sviluppo embrionale bovino in vitro</i>	pag. 108
<i>5.2. Tunel assay</i>	pag. 109
<i>6. Analisi statistica</i>	pag. 109

RISULTATI

<i>1. Misure di determinazione del potenziale zeta e della taglia delle nanoparticelle</i>	pag. 109
<i>2. Internalizzazione di NPs-PS 44-100nm e NPs-PLGA/PEG 65nm in ovociti bovini</i>	pag. 110
<i>3. Internalizzazione di NPs-PS 44-100nm e NPs-PLGA/PEG 65nm</i>	

<i>in spermatozoi bovini</i>	pag. 111
<i>4. Esperimenti di citotossicità di NPs sulla cinetica e vitalità di spermatozoi bovini</i>	pag. 112
<i>4.1 NPs-PS di 44-100nm</i>	pag 112
<i>4.2. NPs-PLGA/PEG di 65nm</i>	pag. 118
<i>4.3. NPs-SiO₂ di 20nm</i>	pag. 121
<i>5. Esperimenti di citotossicità di NPs-PS di 44nm, NPs-PLGA/PEG di 65nm e di NPs-SiO₂ di 20nm sulla fecondazione e sviluppo embrionale bovino in vitro</i>	pag. 124
DISCUSSIONE	pag. 129
CAPITOLO 8	
CONCLUSIONI	pag. 134
REFERENZE BIBLIOGRAFICHE	pag. 136

-CAPITOLO 1-
INTRODUZIONE E SCOPO DEL LAVORO

Negli ultimi anni, la nanobiotechnologia sta focalizzando sempre più la sua attenzione sulla progettazione di nanomateriali innovativi (nanocapsule, nanosfere, nanoparticelle, nanotubi), da utilizzare in campo biomedico per la veicolazione di farmaci (“drug delivery”), per la terapia genica (“gene therapy”) e per la diagnostica. Le nanoparticelle (NPs), secondo la definizione standard della “American Society for Testing and Materials (ASTM)”, sono particelle con lunghezza che va da 1 a 100nm in due o tre dimensioni (ASTM E 2456-06).

Un forte interesse dell’ingegneria dei biomateriali è rappresentato dalla capacità delle NPs polimeriche di permeare i tessuti, in vista di un loro impiego come vettori specifici in campo biomedico.

Cambiamenti nelle proprietà strutturali e funzionali delle particelle (dimensione, composizione chimica, carica di superficie, forma e morfologia) possono significativamente influenzare la loro interazione con le cellule, la vitalità cellulare e la loro compatibilità col sangue (Alexis et al., 2008; Champion et al., 2006; Cortez et al., 2007; Decuzzi et al., 2010; Foged et al., 2005; Gratton et al., 2008; Heslinga et al., 2009; Hu et al., 2009; Makino et al., 2003; Miller et al., 1998; Yoo et al., 2010). I vettori di farmaci basati su nanoparticelle presentano numerosi vantaggi, quali la possibilità di aumentare la funzione e solubilità dei farmaci, di combinare farmaci multipli, di proteggere questi ultimi dalla degradazione metabolica e di controllarne il rilascio specifico (des Rieux et al., 2006; Prego et al., 2005; Hans et al., 2002; Soppimath et al., 2001; Luo et al., 2000).

Inoltre la taglia nanometrica di questi nanovettori offre unici vantaggi per il “drug delivery”, quali quello di poter penetrare profondamente nei tessuti attraverso i piccoli capillari, attraversare la fenestrazione presente nel rivestimento epiteliale ed infine essere internalizzati dalle cellule (Vinogradov et al., 2002).

Per un sistema di rilascio adeguato, i punti chiave, al fine di una loro efficiente applicazione, sono rappresentati dall’efficienza di ingresso delle nanoparticelle nei tessuti bersaglio e dalle conoscenze dei meccanismi di internalizzazione e del traffico intracellulare. Tuttavia tali meccanismi hanno cominciato a essere studiati solo di recente. (Harush-Frenkelet al., 2007; Panyam et al., 2002; Rejman et al., 2004).

Finora sono stati mostrati dati controversi sull’internalizzazione delle NPs nelle cellule, queste discrepanze riscontrate possono essere ricondotte alle differenti NPs utilizzate, alle diverse condizioni sperimentali e sistemi biologici in vitro e in vivo.

Pertanto, risultano ancora necessari ulteriori approfondimenti sui meccanismi che regolano l'internalizzazione dei nanomateriali nella cellula, al fine di modulare le diverse risposte cellulari (SCENIHR 2007, 2009; EPA 2007; FDA 2006, 2008).

Finora la maggior parte degli studi sull'uptake delle NPs è stata effettuata su linee cellulari immortalizzate, mentre rare analisi sono state condotte su colture cellulari primarie.

Alla luce di questi dati, per superare i problemi dovuti all'utilizzo di differenti NPs e dei diversi sistemi biologici, in questo lavoro di tesi è stata studiata l'influenza della taglia sull'uptake di NPs "modello" di polistirene da 44 e 100nm incubate con un unico tipo di coltura cellulare primaria.

A tal fine è stata analizzata la cinetica di ingresso/rilascio delle NPs, le vie di internalizzazione impiegate e la loro localizzazione intracellulare in colture primarie di cellule epiteliali oviduttali bovine (BOEC). Tali cellule costituiscono il rivestimento epiteliale dei tratti oviduttali, coinvolto nell'emissione di prodotti secretori essenziali per creare un microambiente favorevole per la maturazione oocitaria, la capacitazione spermatica, la fecondazione e il trasporto di gameti ed embrioni (Ellington, 1991; Hunter, 2003).

L'uso delle NPs potrebbe anche rappresentare un rischio per la salute dei loro produttori e dei consumatori, infatti, numerosi studi hanno evidenziato che a livello nanometrico il materiale d'origine presenta caratteristiche chimico-fisiche, che conferiscono citotossicità (Lewinski et al., 2008). A causa delle loro dimensioni estremamente ridotte, infatti, le NPs possiedono un'alta area di superficie in rapporto al volume che le conferisce un'alta reattività, la quale potrebbe portare a interazioni dannose con i sistemi biologici e l'ambiente (Oberdorster et al., 2005b).

Finora la maggior parte degli studi è stata effettuata su diverse linee cellulari somatiche in vitro, dimostrando che differenti NPs erano in grado di indurre stress ossidativo (Oberdorster et al., 2005a; McCarthy, 2012), interazione col DNA (Singh et al., 2009; Mu et al., 2012; Toduka et al., 2012), stimolazione di secrezione di proteine infiammatorie, riduzione della vitalità e morte cellulare, dipendente dalle caratteristiche chimico-fisiche e dalla dose (Waters, 2009; Chen et al., 2004). Tuttavia il comportamento delle NPs verso i sistemi biologici e i loro effetti tossici non sono finora pienamente compresi.

Pertanto identificare le caratteristiche chimico-fisiche necessarie per l'utilizzo delle NPs in campo biomedico e sviluppare un predittivo e appropriato saggio di

nanotossicità per questi nuovi nanomateriali, risulta indispensabile prima del loro impiego in biomedicina (SCENIHR 2007, 2009; EPA 2007; FDA 2006, 2008).

Alla luce di questi dati, il secondo obiettivo di tale lavoro di tesi è stato quello di analizzare gli eventuali effetti tossici di differenti nanoparticelle su sistemi biologici estremamente sensibili, quali la coltura di cellule germinali e lo sviluppo embrionale bovino in vitro (Fleming et al., 2004; Sinclair and Singh, 2007; Thompson et al., 2007; Watkins et al., 2008a). Il raggiungimento dello stadio di blastocisti in vitro rappresenta un ottimo test di funzionalità cellulare in vivo, consentendo oltresì di superare i limiti dei brevi tempi delle colture somatiche. Pertanto lo sviluppo embrionale potrebbe rappresentare un sensibile saggio tossicologico predittivo necessario per analizzare la sicurezza delle NPs prima di un loro impiego in biomedicina.

-CAPITOLO 2-
RUOLO DELLA MATRICE EXTRACELLULARE SULLE
FUNZIONI CELLULARI IN VIVO

1. Interazione cellula-matrice in vivo

1.1 La matrice extracellulare (ECM): struttura e funzione

Le cellule in vivo sono circondate da uno spazio extracellulare, riempito in gran parte da una complessa rete di macromolecole che costituiscono la matrice extracellulare (ECM). Tale matrice è costituita da una notevole quantità di proteine e polisaccaridi secreti localmente e assemblati in una rete organizzata in stretta associazione con la superficie della cellula che li ha prodotti. La ECM, rappresenta non solo l'impalcatura meccanica necessaria per la struttura fisica dei tessuti, ma presenta anche un complesso ruolo nella regolazione della maggior parte dei programmi di crescita, di differenziamento e di apoptosi delle cellule con cui entra in contatto (Boudreau and Jones, 1999).

La ECM è costituita da varie fibre proteiche intessute in un gel idratato composto da un reticolo di catene di glicosamminoglicani (GAG). Le proteine fibrose, tra cui collagene, elastina, fibronectina e laminina, hanno funzioni sia strutturali che adesive. I collagene fibrillari (tipi I, II, III, V e XI) sono molecole costituite da 3 catene polipeptidiche α a struttura di elica che si avvolgono in lunghe fibrille (10-300nm di diametro). Queste ultime spesso si aggregano in fasci più grandi, detti fibre di collagene, con diametro di parecchi micrometri. I collagene di tipo IX e XII, chiamati collagene associati alle fibrille, sembrano collegare le fibrille di collagene tra loro e le altre componenti della ECM. I tipi IV e VII sono collagene che formano reticoli, in particolare le molecole di tipo IV si assemblano in un reticolo che costituisce la parte principale delle lamine basali mature; mentre quelle di tipo VII formano dimeri che si assemblano ed ancorano la lamina basale di epitelii multistratificati al tessuto connettivo.

Le molecole di elastina formano un reticolo esteso unito da legami crociati di fibre e di fogli che possono stirarsi e accorciarsi, conferendo elasticità alla matrice.

La fibronectina e la laminina sono grandi glicoproteine della ECM a domini multipli di legame per le altre macromolecole della matrice e per recettori sulla superficie delle cellule, che contribuiscono così sia ad organizzare la matrice che a far aderire le cellule a quest'ultima. I GAG sono un gruppo eterogeneo di catene polipeptidiche cariche negativamente (eccetto per lo ialuronano) unite covalentemente a nuclei proteici a formare molecole di proteoamminoglicani. Le catene di GAG, formando gel porosi idratati, riempiono la maggior parte dello spazio extracellulare, fornendo un supporto meccanico al tessuto. I proteoglicani possono trovarsi secreti nella matrice

extracellulare oppure inseriti nella membrana plasmatica come proteine integrali che possono interagire con ligandi extracellulari e modularne l'interazione con i recettori specifici presenti sulla membrana.

Il collegamento della matrice extracellulare alla cellula richiede proteine di adesione transmembrana che agiscono da recettori della matrice, legando quest'ultima al citoscheletro della cellula. Oltre ad alcuni proteoglicani, le integrine, rappresentano i principali recettori omologhi transmembrana deputati non solo al legame con la maggior parte delle proteine della ECM, ma anche all'attivazione di vie di segnale intracellulare che partono dalla matrice circostante. Le integrine e i recettori convenzionali di segnalazione spesso cooperano nel promuovere crescita, sopravvivenza e proliferazione cellulare. La ECM è in grado di promuovere o sopprimere la crescita cellulare mediante stimolazione o inibizione dei mediatori chiave del ciclo cellulare, incluse cicline e geni "early-response" (Rana et al., 1994; Boudreau et al., 1996; Zhu and Assoian, 1995; Dike and Ingber, 1996). Essa, inoltre, regola la trascrizione di geni associati al differenziamento cellulare (Jones et al., 1995; Srebrow et al., 1998) e all'apoptosi (Meredith et al., 1993; Frisch and Ruoslahti, 1997; Boudreau et al., 1995; Stromblad et al., 1996) (Fig. 1).

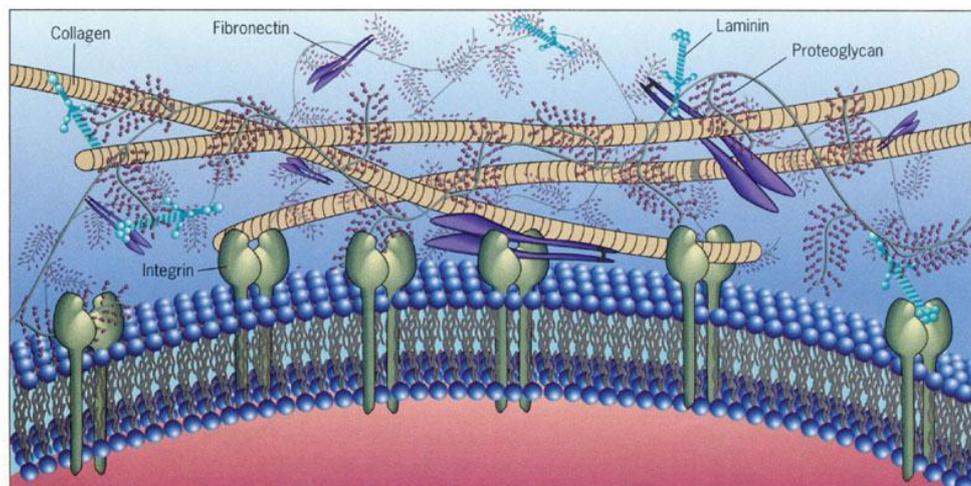


Fig. 1: Struttura della ECM

2. Comunicazione tra citosol e ambiente extracellulare

2.1 La membrana plasmatica

Le membrane cellulari sono cruciali per la vita della cellula. La membrana plasmatica, anche plasmalemma, racchiude la cellula, ne definisce i confini e ne mantiene le differenze essenziali fra il citosol e l'ambiente extracellulare. La

membrana plasmatica, grazie alla sua permeabilità selettiva, controlla la composizione dell'ambiente interno della cellula, regolando gli scambi tra l'interno e l'esterno e viceversa. I primi studi rivolti a capire quale fosse la struttura della membrana plasmatica si basarono su osservazioni di tipo fisico-chimico su globuli rossi. Questi posti in soluzioni ipotoniche, andavano incontro a lisi, lasciando un sacchetto vuoto, detto "ombra", la cui analisi rivelò che esse erano costituite principalmente da fosfolipidi. Il primo modello di struttura della membrana plasmatica prevedeva che questa fosse formata da un film monomolecolare di fosfolipidi disposti a palizzata, con le teste idrofile rivolte verso l'acqua e le code idrorepellenti verso l'aria. Contemporaneamente, altri studiosi, esaminando la composizione chimica dei globuli rossi, evidenziarono che, in soluzione acquosa, l'area occupata dai fosfolipidi estratti dalle ombre eritrocitarie era doppia rispetto all'area eritrocitaria stessa. Si giunse alla conclusione che la membrana plasmatica non fosse formata da un monostrato, bensì da un doppio strato di fosfolipidi, le cui code idrofobe, attratte da forze idrofobiche, si dispongono frontalmente tra loro, mentre le teste idrofile si orientano verso l'ambiente acquoso esterno ed interno alla cellula. Secondo il "*modello a sandwich*" di Danielli, la membrana plasmatica è una struttura fosfolipoproteica costituita da un doppio strato di fosfolipidi sulle cui teste si legano, tramite legami elettrostatici, proteine filamentose disposte perpendicolarmente. Queste ultime orientavano i propri gruppi polari verso gli strati acquosi e i loro gruppi non polari, idrofobici, verso le catene degli acidi grassi. Fu inoltre ipotizzata la presenza di pori acquosi che consentissero la diffusione di sostanze idrosolubili. Secondo questo modello essi erano formati per interruzione del doppio strato lipidico ed erano rivestiti da proteine, introflesse nel poro dallo strato proteico interno o esterno.

Agli inizi degli anni 70 Singer e Nicholson giunsero alla formulazione del "modello trilaminare a mosaico fluido". Secondo questo modello la membrana è formata da un doppio strato fosfolipidico nel cui spessore si inseriscono proteine dette intrinseche, che possono attraversare tutta la membrana da parte a parte o sporgere da un solo lato della membrana con l'unico gruppo polare o sporgere da entrambi i lati con i due gruppi polari. Ci sono, poi, le proteine estrinseche o periferiche, legate elettrostaticamente alle teste interne o esterne dei fosfolipidi. Questo modello mise in discussione l'esistenza di un unico tipo di membrana per tutte le cellule, infatti, ogni tipo di membrana ha le sue caratteristiche proteine globulari e non filamentose, che,

grazie al fatto che le interazioni tra i lipidi e quelle tra le proteine e lipidi non siano covalenti, possono spostarsi lateralmente nel piano della membrana.

Il doppio strato lipidico non ha carattere omogeneo, non solo tra cellule diverse ma anche tra i due strati fosfolipidici, infatti, cambiando il rapporto tra composizione lipidica e proteica, la membrana plasmatica presenta una marcata asimmetria, che riflette le differenti funzioni dei due monostrati. Essenzialmente le membrane plasmatiche sono costituite da lipidi, proteine e carboidrati. I lipidi di membrana sono molecole antipatiche che non costituiscono una famiglia omogenea, essi variano per natura e quantità, da membrana a membrana. Nel plasmalemma delle cellule procariotiche i lipidi sono quasi esclusivamente rappresentati da fosfolipidi e glicolipidi; nelle cellule eucariotiche, invece, si trovano fosfolipidi, glicolipidi, sfingolipidi e colesterolo. I lipidi presenti nelle membrane interne della cellula sono costituiti prevalentemente da fosfolipidi. I principali fosfolipidi di membrana sono: fosfatidilserina, fosfatidiletanolamina soprattutto nello strato interno; fosfatidilcolina e sfingomielinina presenti soprattutto nello strato esterno.

I lipidi di membrana presentano una funzione strutturale e di barriera semipermeabile, costituendo, infatti, l'impalcatura fondamentale della membrana plasmatica che si lascia attraversare liberamente dalle molecole liposolubili, ma non da quelle idrosolubili. Altra funzione dei lipidi, inoltre, è quella metabolica, in quanto essi rappresentano una fonte di mediatori lipidici, che possono essere mobilizzati in risposta a stimoli esterni. Le proteine di membrana sono molto eterogenee in peso molecolare, composizione amminoacidica e mobilità elettroforetica. Esse mediano tutte le altre funzioni della membrana, infatti, possono agire come enzimi generando segnali intracellulari; possono funzionare come pompe, trasportando molecole grandi e polari dentro e fuori le cellule e gli organelli; possono catalizzare la sintesi di ATP; possono fungere da recettori, permettendo il riconoscimento di segnali; possono connettere il citoscheletro o alla matrice extracellulare o alle cellule adiacenti. I carboidrati di membrana sono di solito oligosaccaridi presenti, in forma di glicoproteine e glicolipidi, nel solo foglietto esterno, in contatto con l'ambiente extracellulare. Essi costituiscono il cosiddetto glicocalice che svolge una funzione recettoriale, mediando il riconoscimento cellulare e una funzione protettiva, proteggendo la membrana plasmatica dagli insulti meccanici e chimici. Inoltre, grazie alla presenza di cariche elettriche dell'acido sialico, trattiene molecole d'acqua che contribuiscono a mantenere idratate le cellule.

In condizioni fisiologiche, sia le molecole lipidiche sia quelle proteiche in esse immerse, sono in grado di muoversi all'interno del proprio monostrato. A temperature fisiologiche, la membrana cellulare è allo stato lamellare liquido-cristallino, in cui le catene idrocarboniose dei lipidi sono allo stato fluido, per cui manifestano una notevole libertà di movimento. Al contrario, allo stato cristallino le catene idrocarboniose presentano una disposizione più rigida. Nelle membrane biologiche questa rigidità è risolta da una più elevata concentrazione di colesterolo, che impedendo la cristallizzazione delle catene alifatiche dei fosfolipidi, consente alla membrana di presentare una struttura semifluida. La maggior parte delle proteine presenta movimenti di spostamento (diffusione) laterale; fanno eccezione le proteine di membrana ancorate al citoscheletro. Per quanto riguarda i lipidi di membrana, sono stati descritti diversi tipi di movimenti, che possono essere intramolecolari o intermolecolari. Il movimento intermolecolare si svolge soprattutto in direzione orizzontale (“diffusione laterale”) e solo raramente avviene il movimento di un lipide da una faccia all'altra della membrana (“diffusione a flip-flop”) a opera di proteine dette Flippasi, poiché esso richiede che la testa polare lasci il suo ambiente acquoso e penetri l'interno idrofobico, determinando una grande variazione positiva dell'energia libera. I principali fattori che determinano la fluidità della membrana cellulare sono, oltre alla temperatura, la lunghezza degli acidi grassi, il grado di insaturazione degli acidi grassi delle code dei fosfolipidi, le caratteristiche delle teste polari e la concentrazione del colesterolo nella membrana.

Il doppio strato fosfolipidico permette il libero passaggio, dell'acqua, di gas e di piccole molecole liposolubili, mentre specifiche proteine di trasporto assicurano il passaggio di ioni e molecole idrosolubili. Questa diversa distribuzione di cariche elettriche all'esterno e interno del doppio strato determina un potenziale di membrana pari a -72mV . Nel citoplasma è presente una grande quantità di macromolecole non diffusibili (acidi nucleici, glicosaminoglicani solforati e proteine fosforilate) le quali si dissociano come anioni. L'eccesso di cariche negative viene quindi bilanciato dall'ingresso di cationi (K^+ , Mg^{2+}) che risultano perciò più concentrati nel citoplasma rispetto ai fluidi extracellulari; fa eccezione il Na^+ , la cui concentrazione citoplasmatica è molto più bassa, essendo pari a quella del Cl^- , che non viene attratto all'interno della cellula, visto l'eccesso di polianioni. Questa differenza di concentrazione tra i cationi K^+ e Na^+ , tra l'interno ed esterno della cellula, è mantenuta dalla pompa del Na^+ e K^+ , che a spese dell'idrolisi di ATP pompa

attivamente 2 ioni K^+ all'interno della cellula mentre espelle 3 ioni Na^+ all'esterno. Nella membrana è presente anche un canale per il K^+ , ossia uno ionoforo canalizzato che permette la fuoriuscita del K^+ secondo un gradiente di concentrazione, senza consumo di energia. La fuoriuscita di K^+ abbassa la concentrazione cationica del citoplasma che quindi risulta negativa rispetto all'esterno. La fuoriuscita di K^+ si arresta quando la differenza di potenziale tra le due facce della membrana risulta di $-72mV$. A tale valore, detto potenziale di membrana, i flussi in entrata e uscita di K^+ , l'uno dovuto al gradiente elettrico e l'altro al gradiente di concentrazione, si equivalgono (Fig. 2).

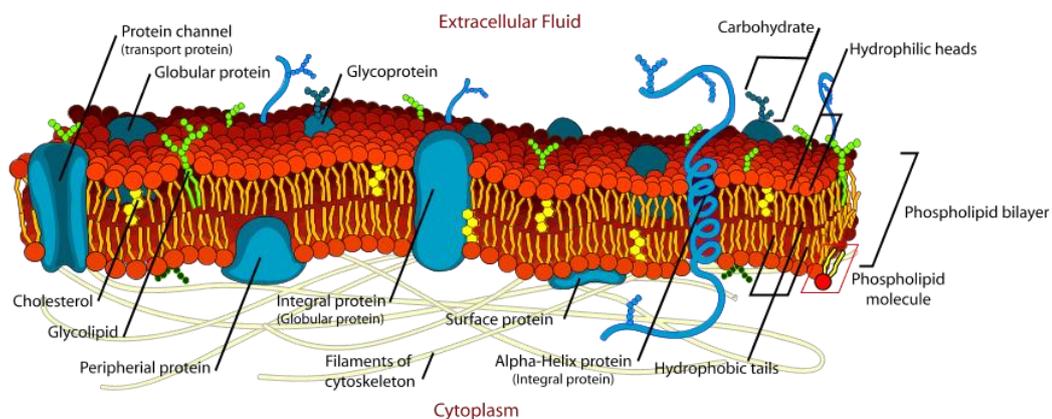


Fig. 2: Struttura della membrana cellulare.

2.1.2 Trasporti transmembrana.

Il plasmalemma è dotato di una permeabilità selettiva, che consente il passaggio solo di alcune sostanze. Diffondono liberamente attraverso la membrana: piccole molecole non polari (O_2 e CO_2) e, più lentamente, piccole molecole polari non cariche come urea e acqua, mentre non possono entrare liberamente nella cellula molecole con grosso diametro o polari cariche. I composti che non sono solubili nella membrana cellulare, infatti, devono essere trasportati nella cellula da specifiche molecole trasportatrici, incorporate nel plasmalemma. Le proteine di membrana che mediano il trasporto sono: proteine trasportatrici o trasportatori che subiscono modifiche conformazionali presentando uno o più siti di legame specifici per il substrato; e proteine canale (soprattutto canali ionici) che legano con minore specificità il soluto. Si riconoscono diversi tipi di trasporto mediato da proteine: trasporto passivo o diffusione, trasporto attivo e trasporto attivo secondario.

Essi possono dar luogo ad un uniporto, ossia al trasporto di un'unica specie di soluto; al simporto ossia al trasporto accoppiato di due diverse specie di soluti nella stessa direzione e all'antiporto in direzione opposta (Fig. 3).

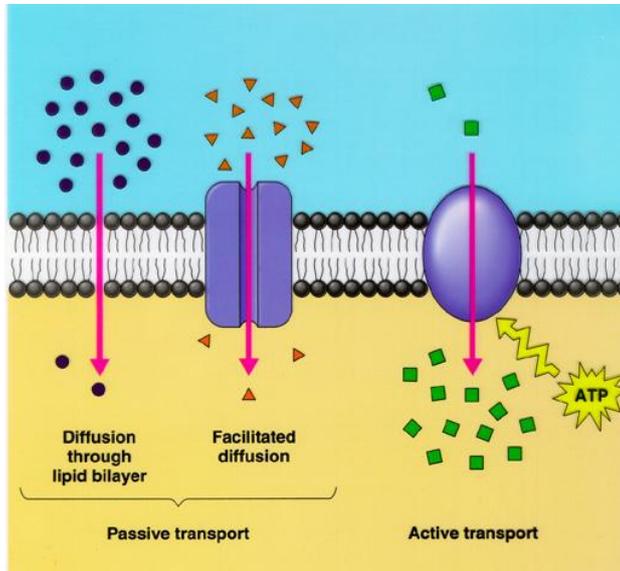


Fig. 3: Principali trasporti trans membrana

2.1.2.1 Trasporto passivo

Il trasporto può avvenire secondo il gradiente di concentrazione del soluto, senza dispendio energetico sotto forma di Adenosina Trifosfato (ATP), ed è definito in questo caso *trasporto passivo*. Il trasporto passivo si distingue in:

- 1) Diffusione semplice: passaggio di una molecola idrosolubile (uniporto), senza consumo di energia, secondo un gradiente di concentrazione (nel caso di ioni si parla di gradiente elettrochimico) da regioni a maggiore concentrazione di soluto a regioni a concentrazione più bassa.
- 2) Diffusione facilitata: se tale diffusione secondo gradiente di concentrazione è mediata da proteine trasportatrici, dette anche permeasi, e canali.

Le proteine trasportatrici mediano il trasporto sia passivo che attivo di glucidi, aminoacidi e nucleosidi. Una volta legato il soluto nel compartimento ad alta concentrazione, le permeasi vanno incontro a un cambiamento conformazionale che permette il trasferimento del soluto nel compartimento a bassa concentrazione.

La transizione tra le due conformazioni può avvenire a caso, è completamente reversibile e non dipende dal fatto che il sito sia occupato. Pertanto se la

concentrazione del soluto è maggiore da un lato della membrana, è qui che si legherà più soluto al sito della permeasi e ci sarà pertanto un trasporto netto di soluto lungo il suo gradiente di concentrazione. Nel caso dei canali, le proteine interagiscono col soluto da trasportare molto più debolmente. Esse formano dei pori acquosi nella membrana plasmatica, che quando aperti consentono la veloce diffusione di ioni o di piccole molecole idrosolubili di idoneo peso molecolare e carica elettrica.

2.1.2.2 Trasporto attivo

Nel *trasporto attivo* le proteine trasportano i soluti contro il gradiente elettrochimico, utilizzando l'energia ottenuta dall'idrolisi dell'ATP, pertanto queste proteine trasportatrici sono dotate di attività enzimatica. Ciascun tipo di proteina trasportatrice ha uno o più siti di legame specifici per il soluto e trasferisce quest'ultimo subendo cambiamenti conformazionali reversibili che espongono alternativamente il sito che lega il soluto su un lato e poi sull'altro della membrana. E' il legame dell'ATP alla proteina di trasporto che permette il cambiamento conformazionale necessario al trasferimento del soluto.

Nel *trasporto attivo secondario*, l'energia necessaria al trasporto di un soluto contro il suo gradiente di concentrazione non è fornita direttamente dall'ATP, ma dall'esistenza di un gradiente elettrochimico del Na^+ (o di H^+) prodotto dalla rispettiva pompa ionica. Il trasporto attivo secondario è quindi indirettamente accoppiato a un sistema di trasporto attivo primario, che genera il gradiente elettrochimico. Nel trasporto attivo secondario si ha, quindi, il trasporto accoppiato di due diverse specie di soluti: il Na^+ (o H^+).

Uno dei due soluti è trasportato passivamente secondo gradiente di concentrazione, mentre l'altro soluto è trasportato, sempre passivamente, ma contro il gradiente di concentrazione. Nel simporto il trasporto dei due soluti avviene nella stessa direzione, mentre nell'antiporto avviene in direzione opposta. Anche in questo caso il trasferimento dei soluti avviene grazie al cambiamento conformazionale della proteina trasportatrice, che è indotto dal legame dei soluti stessi.

2.1.2.3 Endocitosi

Le cellule possono trasportare al proprio interno sostanze necessarie al metabolismo anche grazie ad un meccanismo del tutto differente dal trasporto attivo mediato da pompe di membrana: tale meccanismo prende il nome di endocitosi, dal greco endo = dentro e kytos = cavità. Tali sostanze sono macromolecole, sostanze particolate, e, in casi speciali, anche altre cellule, che una volta assunte vengono trasportate agli endosomi precoci e quindi, attraverso gli endosomi tardivi, agli enzimi digestivi immagazzinati nei lisosomi. L'endocitosi, si distingue in fagocitosi ed endocitosi propriamente detta, distinta a sua volta in pinocitosi ed endocitosi mediata (Fig. 4).

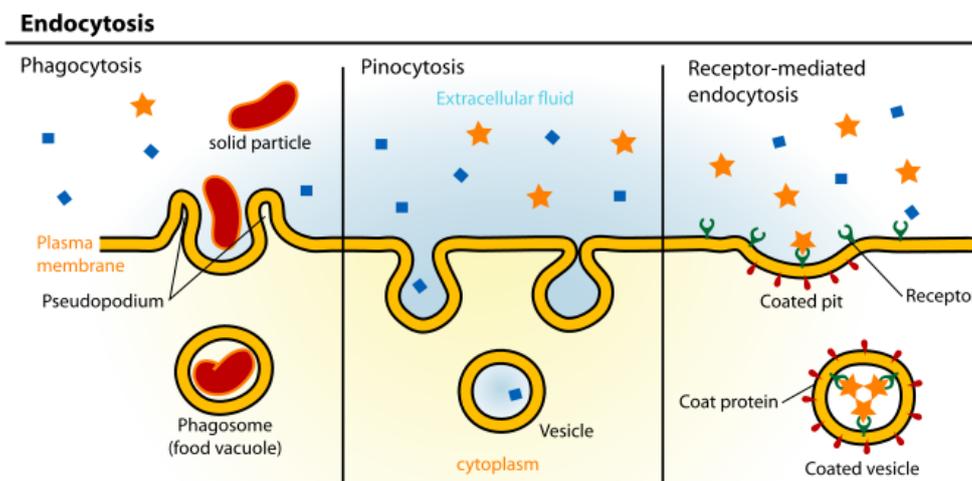


Fig. 4: Meccanismi di endocitosi cellulare.

2.1.2.3.1 Fagocitosi

La fagocitosi (dal greco phagein= mangiare e cyto= cellula) è una forma speciale di endocitosi deputata all'internalizzazione, da parte di determinati tipi cellulari (ad es. macrofagi, neutrofilo e cellule dendritiche), di particelle di notevoli dimensioni come microrganismi o cellule morte, tramite vescicole formatesi da invaginazioni della membrana plasmatica. Tali vescicole dette fagosomi (> 250nm di diametro), grazie all'attività della pompa protonica presente nella membrana vescicolare presentano al loro interno un pH acido. I fagosomi si fondono con i lisosomi, nei quali il pH acido determinerà l'attivazione degli enzimi idrolitici lisosomiali in grado di degradare le sostanze ingerite. Tutte le sostanze indigeribili rimarranno nei lisosomi, formando i cosiddetti corpi residui. Alcune componenti della membrana plasmatica internalizzata

non raggiungono mai i lisosomi, in quanto sono recuperati dal fagosoma in vescicole di trasporto e riportati al plasmalemma.

I fagociti hanno una varietà di recettori di superficie specializzati che trasmettono i segnali all'interno della cellula ne determinano una risposta fagocitaria. I segnali di attivazione della fagocitosi sono rappresentati, in particolar modo, da anticorpi che legandosi alla superficie di microrganismi formano un rivestimento in cui la regione di coda di ciascuna molecola anticorpale, chiamata regione Fc è esposta all'esterno e riconosciuta da recettori del Fc specifici sulla superficie di macrofagi e neutrofili. Altri recettori invece riconoscono componenti del complemento che collaborano con gli anticorpi nel ricoprire microrganismi; alcuni invece riconoscono direttamente oligosaccaridi sulla superficie microbica; ancora altri riconoscono le cariche negative delle fosfatidilserine esposte sul lato esterno del plasmalemma di cellule apoptotiche. Normali cellule non vengono fagocitate poiché dotate di specifiche proteine di superficie in grado di legare recettori inibitori sulla superficie dei macrofagi, che reclutando antagonizzano l'inizio della fagocitosi.

2.1.2.3.2 Pinocitosi

La pinocitosi dal greco pinein= bevo e cyto= cellula è un processo costitutivo deputato all'assunzione non specifica di piccoli quantitativi di fluido extracellulare nel quale sono disciolti i materiali di interesse metabolico. Essa ha lo scopo di incamerare sostanze il cui ingresso non può avvenire attraverso i vari tipi di pori della membrana plasmatica. La pinocitosi è distinta in macro e micro pinocitosi a seconda delle dimensioni del particolato immerso nel fluido extracellulare. Essa inizia con la formazione di estese protrusioni della membrana plasmatica, sostenute da elementi citoscheletrici actinici. Le protrusioni si fondono quindi con membrana a formare piccole vescicole pinocitiche (circa 100nm di diametro) contenenti materiale extracellulare.

La parte endocitotica del ciclo, detta endocitosi della fase fluida, spesso inizia nelle fossette rivestite di clatrina, una proteina fibrosa che forma polimeri detti trischeli (triskelions), ossia tre braccia proteiche divaricate tra loro di 120° consistenti in tre catene pesanti di clatrina e tre catene leggere che interagiscono al loro C-terminale. Tali fossette daranno luogo a vescicole rivestite di clatrina che lasciano la membrana plasmatica, perdono il loro rivestimento e si fondono con gli endosomi precoci. Le

vescicole pinocitotiche possono formarsi anche a partire da caveole, piccole invaginazioni della membrana plasmatica, a forma di fiasca, che si formano in corrispondenza di regioni della membrana plasmatica ricche di colesterolo e sfingolipidi (zattere lipidiche). Le caveole sono rivestite da caveolina, una proteina dimerica che lega il colesterolo inserendosi in tal modo nella membrana plasmatica. Le caveole si distaccano dalla membrana e possono portare il loro contenuto o a compartimenti simili a endosomi, o alla membrana plasmatica sul lato opposto di una cellula polarizzata (transitosi).

2.1.2.3.3 Endocitosi mediata da recettori

Nell'endocitosi mediata da recettori vi è invece una specifica selettività delle sostanze estranee alla cellula, mediata da recettori transmembrana. Vi è una interazione cargo-recettore altamente specifica che innesca movimenti di invaginazione della membrana, la quale ingloba il complesso cargo-recettore in una vescicola endocitotica destinata a fondersi con i lisosomi nel citosol. In particolare tali fossette da cui ha inizio l'invaginazione del materiale assunto per endocitosi, possono essere rivestite sul versante citoplasmatico da proteine quali, la clatrina, proteina fibrosa che forma polimeri detti trischeli. I trischeli, in seguito al segnale dell'avvenuta interazione ligando-recettore specifico, possono assemblarsi tra loro e determinare la formazione della vescicola rivestita, che sarà chiusa su sè stessa dall'azione idrolitica della proteina GTP-dipendente detta Dinamina. Tutti i tipi di endocitosi sembrano dipendere dalla dinamina, ad eccezione della macropinocitosi. Quando la vescicola endocitotica si fonde con altre vescicole ammantate nel citosol della cellula, il rivestimento è perso e la clatrina ritorna alla membrana plasmatica, pronta per formare una nuova fossetta rivestita.

È stata descritta anche una seconda classe di vescicole rivestite, si tratta di vescicole ricoperte di caveolina che derivano dalle zattere lipidiche, ossia rigidi microdomini di membrana ricchi di fosfolipidi, sfingolipidi e colesterolo.

I materiali endocitati che raggiungono gli endosomi tardivi vengono mescolati con idrolasi acide di nuova sintesi e finiscono per essere degradati nei lisosomi. Molte molecole però non sono indirizzate verso questa degradazione e sono rinviate, tramite vescicole di trasporto, dagli endosomi precoci al plasmalemma.

3. Esocitosi

Il trasporto mediato da vescicole può avvenire anche dall'interno della cellula verso il versante extracellulare, tale processo è detto esocitosi. Si distingue un'esocitosi: costitutiva (via della secrezione costitutiva) e regolata (via della secrezione regolata). Le due vie si separano nel reticolo del Golgi trans.

Nella via secretoria costitutiva, che avviene in tutti i tipi cellulari, le vescicole di secrezione che gemmano ininterrottamente dal reticolo del Golgi trans sono rivestite da particolari proteine di rivestimento, i coatomeri. Tali vescicole si fondono con la membrana plasmatica fornendo a quest'ultima lipidi e proteine di nuova sintesi e proteine solubili alla matrice extracellulare.

Nella secrezione regolata, tipica delle cellule degli epitelii ghiandolari endocrini (secrezione regolata di ormoni) ed esocrini (esocitosi di muco, siero, ect), le vescicole che gemmano dal reticolo del Golgi trans sono rivestite da clatrina. In una cellula capace di secrezione regolata, almeno tre classi di proteine devono essere separate prima di lasciare il reticolo del Golgi trans, ossia quelle destinate ai lisosomi, tramite gli endosomi precoci; quelle destinate alle vescicole secretorie e quelle destinate al trasporto immediato alla superficie cellulare. Le vescicole secretorie si fondono tra loro e si accumulano nel citoplasma fino a quando uno specifico segnale extracellulare ne stimola la secrezione.

In una cellula non polarizzata sembra che qualunque proteina nel lume dell'apparato di Golgi sia trasportata automaticamente alla superficie cellulare dalla via secretoria costitutiva non selettiva, detta per questo "via di default". Ciò avviene a meno che non sia riportata specificamente all'ER o selezionata per le vie che portano alla secrezione regolata o ai lisosomi. Le proteine destinate ai lisosomi, infatti, sono etichettate per essere impacchettate in vescicole specifiche (dal mannosio 6-fosfato per le idrolasi lisosomiali) e si pensa che probabilmente segnali analoghi possano indirizzare le proteine secretorie nelle vescicole secretorie (Fig. 5).

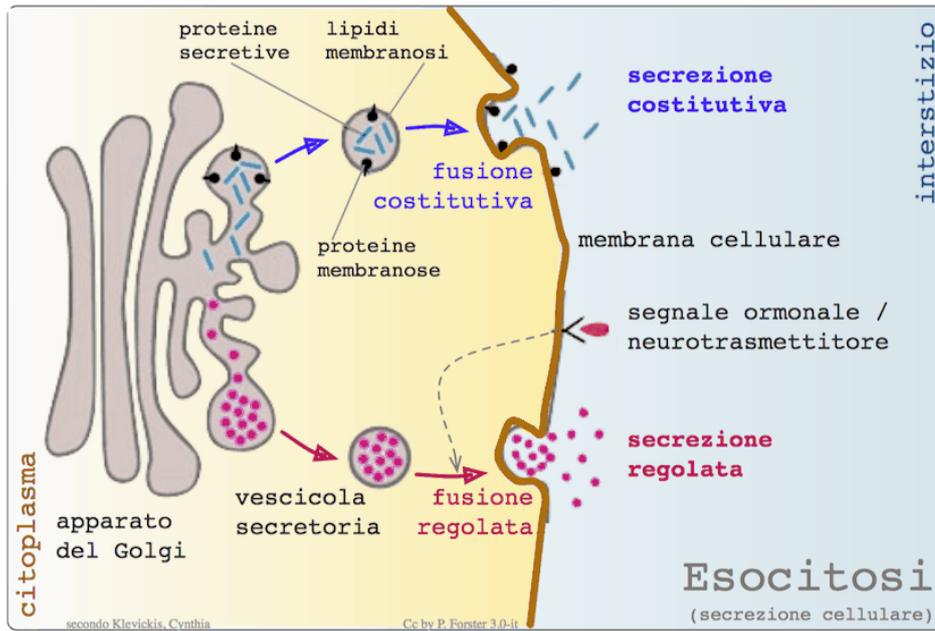


Fig. 5: Esocitosi

-CAPITOLO 3-
INTERAZIONI TRA BIOMATERIALI ED AMBIENTE
BIOLOGICO

1. Interazione cellula-biomateriale in vitro

Crescente è negli ultimi anni l'impegno della nanoscienza nel cercare di ingegnerizzare i materiali in modo da rispondere alle esigenze più comuni delle applicazioni biomediche. Si definisce biomateriale un materiale concepito per interfacciarsi con i sistemi biologici per valutare, dare supporto o sostituire un qualsiasi tessuto, organo o funzione del corpo (II International Consensus Conference on Biomaterials, Chester, Gran Bretagna, 1991). La crescita e il perfezionamento dei biomateriali è stata nell'ultimo ventennio considerevole ed ha avuto importanti ricadute cliniche in tutte le discipline mediche.

Le prestazioni dei materiali impiegati in campo medico sono valutate in base alla loro biofunzionalità e biocompatibilità.

La biofunzionalità si riferisce alle proprietà che un biomateriale deve avere per riprodurre una determinata funzione dal punto di vista fisico e meccanico; la biocompatibilità, invece, alla capacità del biomateriale di essere ben tollerato dall'organismo ospite continuando a svolgere quella determinata funzione per l'intera durata dell'applicazione. Inizialmente, poichè i fluidi corporei potrebbero degradare i materiali con cui vengono a contatto, si pensò di utilizzare materiali che, oltre a possedere determinate proprietà meccaniche, fossero anche inerti (biomateriali di prima generazione).

L'organismo umano ha la possibilità di attivare numerosi e complessi meccanismi biologici che hanno funzioni di difesa nei confronti di eventi o materiali estranei ritenuti dannosi. I meccanismi di difesa naturali, sebbene siano indispensabili per la sopravvivenza dell'organismo, costituiscono il principale ostacolo all'applicazione di materiali biomedici. Tuttavia nessun dispositivo inerte, che sia tollerato passivamente dall'organismo e non stimoli una incorporazione ed un riconoscimento, può assicurare la stabilità delle sue prestazioni nel lungo periodo.

Pertanto ai biomateriali di prima generazione bioinerti, si sono sostituiti prima i materiali di seconda generazione, bioattivi e biodegradabili, in grado di stabilire una interazione con l'organismo ospite in cui viene impiantato.

Gli studi più recenti sono rivolti all'impiego di biomateriali di terza generazione dotati di bioattività, ossia in grado di indurre risposte cellulari e tissutali che a loro volta possono causare un processo di degradazione nel biomateriale stesso. La loro progettazione deve considerare diversi parametri che possano influenzare l'interazione cellula-materiale. Alle proprietà fondamentali di un biomateriale, quali

biocompatibilità, biodegradabilità e processabilità (lavorazione e possibilità di sterilizzazione), devono essere affiancate, inoltre, precise caratteristiche chimiche (composizione) e fisiche (proprietà meccaniche, forma, porosità, dimensioni).

2. Caratteristiche chimiche del materiale

2.1 Natura del materiale

Le ricerche sui materiali di origine naturale portano a comprendere il complesso rapporto tra la loro struttura particellare e le proprietà chimico-fisiche, consentendo di progettare e realizzare nuovi materiali.

I biomateriali sono materiali sintetici o naturali che vengono utilizzati per la realizzazione di dispositivi medici a contatto con i sistemi biologici e, in particolare, con il corpo umano. Oltre che nel settore propriamente medico, i biomateriali vengono impiegati anche nelle tecniche diagnostiche e nelle biotecnologie.

I biomateriali possono essere metalli, polimeri, vetri, ceramici e, sempre più spesso, sistemi compositi, che consentono di soddisfare il maggior numero di requisiti per l'interazione con il corpo umano.

I polimeri possono essere classificati secondo la loro origine (naturale o sintetica), secondo la loro reazione al calore o alla luce, oppure secondo le reazioni di polimerizzazione o la struttura molecolare. I polimeri esistono in natura, basti pensare alla gomma naturale, ad alcune resine naturali come l'ambra, la cellulosa, e le sostanze proteiche.

Accanto alla vulcanizzazione della gomma naturale, si ricordano alcuni dei primi polimeri come il nitrato di cellulosa, meglio conosciuto come celluloidi, o la resina fenolo-formaldeide brevettata poi con il nome di Bakelite. I materiali naturali utilizzati per applicazioni biomediche sono generalmente di natura proteica (come, ad esempio, il collagene o la fibrina) o polisaccaridica (come ad esempio l'acido ialuronico).

Il vantaggio principale nell'utilizzo di materiali naturali sta nella loro natura amminoacidica o polisaccaridica che ne facilita il riconoscimento da parte delle cellule, poiché dotate intrinsecamente di segnali biochimici per l'attivazione di determinate risposte cellulari. Tuttavia essi presentano alcuni inconvenienti, quali la composizione spesso variabile, la scarsa prestazione meccanica, il limitato tempo di

permanenza (veloce degradazione o assorbimento) e, soprattutto, nel caso di materiali di derivazione animale, problemi relativi all'immunogenicità.

Successivamente con la messa a punto del processo di polimerizzazione, è iniziata la commercializzazione di molti importanti polimeri quali polistirene (1920), polivinilcloruro e polimetilmetacrilato (1927), poliammide (1938), poliestere (1941), polietilene (1942). Tuttavia soltanto nel dopoguerra fu realizzata in modo estensivo la produzione e lavorazione dei nuovi polimeri, conseguenza anche dello sviluppo di nuove tecnologie di sintesi e di trasformazione.

I polimeri sintetici utilizzati per applicazioni biomediche hanno una struttura chimica molto simile ai polimeri naturali contenuti nei tessuti biologici, ad esempio, il collagene.

I materiali sintetici (ad es. l'acido polilattico o il poli-etilenglicole), presentano il vantaggio di avere bassi costi di produzione, un'ottima riproducibilità e alte prestazioni meccaniche. Il maggiore svantaggio è che tali materiali non vengono riconosciuti dalle cellule in maniera specifica e, quindi, non sono in grado di guidare l'interazione cellula-materiale, tuttavia in alcuni casi è possibile ottenere dei legami chimici tra le catene dei polimeri naturali e quelle dei polimeri sintetici. In questo senso i materiali polimerici possono avere una buona biocompatibilità intesa come interazione che promuove l'accettazione del materiale da parte dell'organismo. Talvolta questa interazione può condurre a una sorta di metabolizzazione del polimero che nel tempo viene degradato e successivamente eliminato. Questi polimeri vengono impiegati in quelle applicazioni per le quali è richiesto un uso temporaneo. E' fondamentale evidenziare che i materiali polimerici per uso biomedico differiscono dagli stessi materiali impiegati per applicazioni tradizionali, in quanto, devono contenere quantità molto limitate di additivi e di residui monomerici che possono essere rilasciati nei tessuti.

2.2 Bioattivazione

I principali vantaggi che i polimeri presentano rispetto alle altre classi di materiali sono una maggiore biocompatibilità, possibilità di modificarne composizione e proprietà fisico-meccaniche, bassi coefficienti di attrito, alta processabilità e lavorabilità. Gli svantaggi principali sono la presenza di sostanze che possono essere rilasciate nell'organismo (monomeri, catalizzatori, additivi, ecc.), la facilità di

assorbimento di acqua e biomolecole dall'ambiente circostante (anche nelle applicazioni in cui non è richiesto), le basse proprietà meccaniche e, in alcuni casi, la difficoltà di sterilizzazione.

Le proprietà finali del biomateriale dipendono, sia dalla struttura molecolare intrinseca del polimero, che dai processi chimici e fisici a cui è sottoposto, e possono essere ampiamente manipolate intervenendo sulle condizioni operative di tali processi e sulla reazione di polimerizzazione. Ciò che determina la risposta biologica dell'organismo ospite, sono la struttura, la composizione e le caratteristiche della zona superficiale del materiale polimerico impiantato. Queste proprietà, infatti, sono responsabili della trasmissione delle sollecitazioni, dell'adesione, dell'attrito, della permeabilità a gas e a liquidi, della compatibilità con l'ambiente organico corrosivo circostante, ecc. Nella soluzione ottimale il materiale e il tessuto dovrebbero interagire nel modo più appropriato possibile per massimizzare l'incorporazione del materiale nel relativo tessuto e per assicurare, di conseguenza, la stabilità.

Un biomateriale per applicazioni nell'ingegneria tissutale può essere bioattivato al fine di favorire l'adesione o la migrazione cellulare, oppure nel "drug delivery" o nella "gene therapy", per favorire o inibire il processo endocitico in specifiche cellule. La bioattività può essere indotta o da:

- 1) trattamenti superficiali che possono essere raggruppati in due grandi categorie, ossia modifiche che alterano chimicamente o fisicamente gli atomi o le molecole presenti sulla superficie; e i rivestimenti della superficie con materiali di diversa composizione.
- 2) dall'introduzione nel materiale di molecole biologicamente attive (fattori di crescita, inibitori della crescita, fattori angiogenici e/o agenti immunosoppressori), al fine di indurre nelle cellule bersaglio uno specifico programma.

Sono stati studiati, quindi, diversi metodi per ottimizzare le interazioni tra la superficie dei polimeri utilizzati in dispositivi biomedici e i tessuti dell'organismo ospite. Si possono, ad esempio, introdurre nei polimeri siti per l'immobilizzazione di specifiche cellule o biomolecole, creando superfici che ostacolano l'adsorbimento di determinate molecole e favoriscano quello di farmaci antinfiammatori o fattori di crescita.

Un metodo impiegato per funzionalizzare i polimeri è quello dell'adsorbimento proteico (Keselowsky, 2004). La qualità dell'adesione tra le cellule e la superficie di un biomateriale dipende proprio dalle proteine adesive adsorbite al materiale.

Quando un biomateriale è posto a contatto con i fluidi biologici le prime molecole ad avvicinarsi alla superficie sono le molecole di acqua, che influenzano la successiva solvatazione degli ioni presenti nei fluidi biologici. La carica della superficie può quindi variare in base alla carica degli ioni con cui entra in contatto. Successivamente segue il processo di adsorbimento delle proteine sulla superficie del biomateriale che rende quest'ultimo capace di scatenare una risposta da parte dell'organismo (coagulazione, adesione/proliferazione cellulare etc.).

Le proprietà fisiche e chimiche del materiale, la natura della proteina e del suo solvente influenzano la concentrazione e l'orientamento delle proteine adsorbite al materiale e di conseguenza anche il comportamento delle cellule in contatto con esso.

Le proteine spesso esibiscono maggiore attività di superficie in prossimità del loro punto isoelettrico (pI) al quale corrisponde una ridotta repulsione elettrostatica tra le molecole favorendo il legame con la superficie. La capacità di adsorbimento superficiale è influenzata anche dalle proprietà relative al ripiegamento ("folding") della catena proteica che influenza l'esposizione o meno di siti di contatto con la superficie. Poiché i recettori cellulari riconoscono, come ligando, un dominio molto ristretto dell'intera proteina, rappresentato da una breve sequenza amminoacidica, i materiali vengono bioattivati utilizzando brevi sequenze peptidiche legate in modo covalente al materiale.

La sequenza peptidica maggiormente impiegata, grazie alla sua ampia distribuzione nell'organismo e alla capacità di legare più recettori di adesione, è la tripletta amminoacidica RGD (Arginina-Glicina-Aspartato), sito con cui la fibronectina si lega ai recettori cellulari promuovendo l'adesione (Fig. 6).

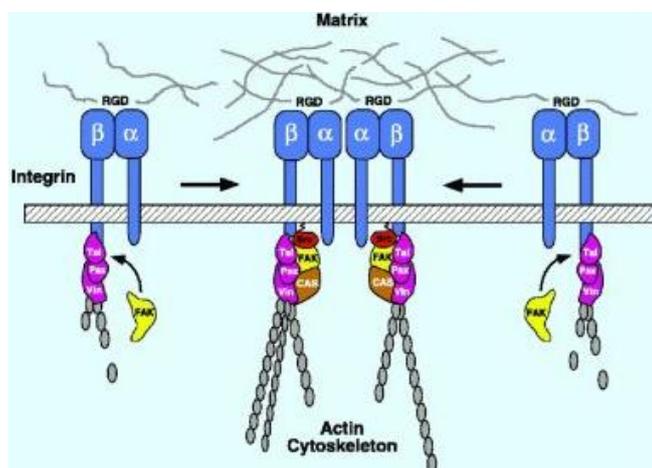


Fig. 6: Interazione tra integrine e il sito di legame RGD.

Nei fluidi biologici si ha la presenza contemporanea di molte proteine diverse (es. nel sangue > 150), con differenti affinità per la superficie. Sulla superficie il numero di siti di legame è finito pertanto le molecole in soluzione devono competere fino al raggiungimento di uno stato pseudo stazionario la cui composizione dipende non solo dalle interazioni proteina superficie ma anche dalle interazioni proteina-proteina. In una soluzione mono-componente dominano le interazioni intermolecolari repulsive, mentre nei sistemi multi-componente possono verificarsi anche attrazioni tra molecole diverse.

In presenza di trasporto diffusivo, indipendentemente dalla affinità per la superficie, le proteine presenti in maggior concentrazione e/o con minor peso molecolare arrivano più rapidamente alla superficie. Nel tempo arrivano in superficie molecole che pur dotate di maggiore affinità a causa della minore concentrazione e/o del maggiore ingombro risultano più lente, pertanto, potranno ancorarsi alla superficie solo dopo che le prime si siano staccate. Ne consegue uno scambio competitivo tra le proteine adsorbite più rapidamente e quelle che hanno una maggiore affinità di superficie. Questa serie di collisioni, adsorbimento e scambio sono chiamate EFFETTO VROMAN avviene in situazioni di multi-componenti proteiche e fino a quando la superficie sia tutta popolata di molecole dotate di forti interazioni con il substrato (elevata affinità).

3. Caratteristiche fisiche del materiale

3.1 Proprietà meccaniche

Crescente è negli ultimi anni la progettazione e realizzazione di tessuti ingegnerizzati caratterizzati dall'interazione tra cellule e scaffolds di natura sintetica.

Le attività cellulari che sono maggiormente influenzate dalle proprietà dei materiali sono l'adesione, lo spreading, la migrazione, la proliferazione e il differenziamento.

Fondamentali per lo sviluppo di innovativi materiali sono, non solo le loro proprietà chimiche, ma soprattutto le proprietà meccaniche del substrato. Le proprietà meccaniche di un materiale dipendono dalla relazione tra la forza applicata e la superficie di applicazione.

Il corpo umano è costituito da tessuti con moduli elastici o di Young molto eterogenei, che aumentano notevolmente ad esempio in caso di trasformazione tumorale dello stesso tessuto (Liu and Chen, 2005). Recenti studi, ad esempio, hanno

evidenziato spreading e motilità cellulari notevolmente differenti in fibroblasti normali e immortalizzati quando esposti a combinati stimoli topografici e meccanici (Tzvetkova-Chevolleau et al., 2008).

Inoltre studi riportano l'importanza degli stimoli meccanici prodotti dal rimodellamento citoscheletrico delle cellule al punto da influire sulla morfogenesi dei tessuti durante l'embriogenesi (Ingber, 2006). La capacità delle cellule di rispondere alle proprietà meccaniche del substrato, detta "mechanosensing", si basa sull'esistenza di meccanismi che regolano l'interazione tra le forze generate dal citoscheletro e tali proprietà meccaniche (Ventre et al., 2012) (Fig. 7).

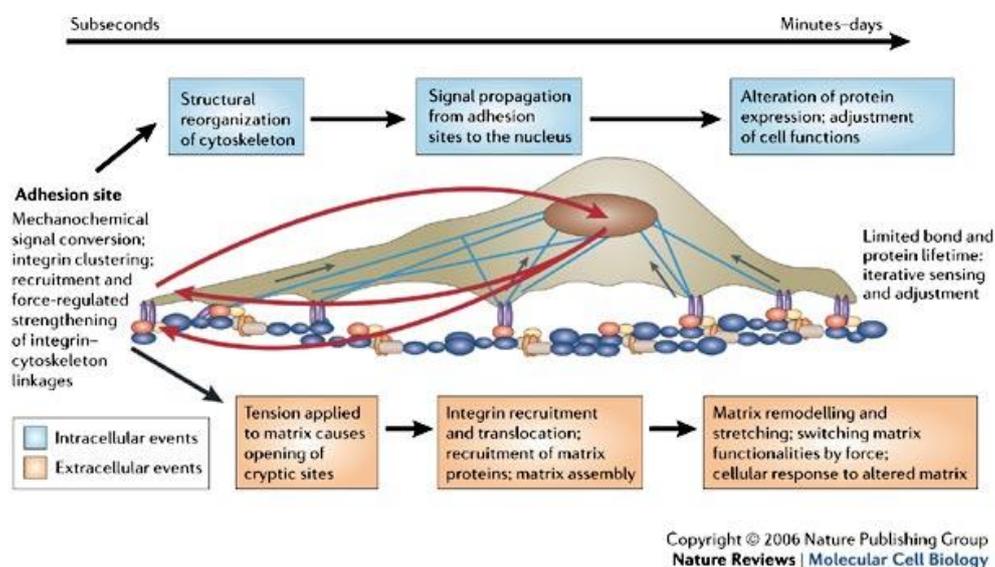


Fig. 7: Steps del "mechanosensing" nel tempo, che coinvolgono modificazioni del substrato e riorganizzazione del citoscheletro.

Pertanto è chiara l'influenza delle proprietà meccaniche del substrato sul comportamento cellulare e viceversa (Discher et al., 2005; Vogel and Sheetz, 2006). Inizialmente, lo studio di tali proprietà è stato effettuato su polimeri di origine naturale, le cui proprietà meccaniche, come ad esempio l'elasticità, potevano essere modulate cambiandone la concentrazione. Tuttavia non era chiaro se il differente comportamento cellulare fosse dovuto alla variazione di elasticità o ai cambiamenti di natura chimica del substrato.

Pertanto la comprensione di tali interazioni ha richiesto la produzione di matrici caratterizzate da polimeri di natura sintetica. Sono stati impiegati polimeri sintetici quali la poli-acrilammide (PAAM) o il poli-etilenglicole (PEG), in grado di essere

bioattivati e di dar luogo a materiali di differente elasticità in proporzione alla concentrazione (Lo et al., 2000), o la densità dei “crosslinkers” (Zaari et al., 2004).

Le proprietà meccaniche hanno una notevole influenza sull’adesione, proliferazione e migrazione cellulare e sulla relativa deformazione del substrato. Infatti, studi riportano che la rigidità meccanica dei substrati influenza notevolmente l’adesione di cellule coltivate su “gels” di PAAM rivestiti di collagene (Pelham et al., 1997). In particolare, sono evidenti adesioni focali mature e stabili in gels rigidi, mentre complessi più dinamici e brevi in gels meno rigidi (Georges and Janmey, 2004). Un tasso più alto di proliferazione e più lento di migrazione era osservato in gels più rigidi (Wang et al., 2000; Pelham et al., 1997). Studi riportano che cellule coltivate su substrati caratterizzati da gradienti di rigidità, migrano preferenzialmente dalla zona più morbida a quella più rigida (duro taxis) (Lo et al., 2000). Recenti studi hanno dimostrato che cellule staminali mesenchimali (MSCs) coltivate su gels di PAAM dotati di una rigidità tipica del cervello, muscolo o osso, differenziavano in neuroni, mioblasti e osteoblasti, rispettivamente; viceversa rimanevano quiescenti le cellule coltivate su substrati la cui rigidità era tipica dell’adipe o del midollo osseo (Engler et al., 2006; Winer et al., 2009).

Tuttavia non tutte le cellule rispondono omogeneamente alla rigidità del substrato, pertanto questi fenomeni sono strettamente dipendenti dalle condizioni di coltura e dal tipo cellulare (Le et al., 2004; Peyton et al., 2005).

3.2 Forma del materiale

Il comportamento cellulare è influenzato significativamente dalla topografia della matrice extracellulare. Recenti studi hanno evidenziato che la struttura topografica del substrato può influenzare le funzioni e le attività delle cellule, le quali sembrano rispondere all’ondulazione dei micro e nano-materiali, prevalentemente attraverso la deformazione e la distensione delle membrane. I segnali topografici non sono considerati artefatti in vitro poiché gli effetti dei patterns topografici sull’attività cellulare sono anche presenti in vivo.

Esempi di micro e “nano-patterns” nativi sono riscontrabili in fasci di fibrille e fibre (collagene e fibrina), superfici ruvide (depositi di cristallo nell’osso) e membrane porose (membrane basali) (Ventre et al. 2012).

Così come per i substrati di origine naturale, anche i materiali sintetici dalla composizione chimica nota e dalle caratteristiche superficiali controllate possono influenzare il comportamento cellulare. Le tecniche di fabbricazione di substrati sintetici con topografia superficiale controllata sono la litografia (den Braber et al., 1998; Yim et al., 2005), la litografia a fascio elettronico (Dalby et al., 2007), la litografia a nano-stampo (Gaubert et al., 2007) che possono imprimere “patterns” topografici con risoluzione spaziale di pochi nanometri. Altre metodologie, come la separazione di fase polimerica e l’“electrospinning” polimerico, risultano più veloci e con costi limitati. Gli elementi topografici riproducibili sulla superficie di un materiale possono avere diverse forme come scanalature, griglie, protrusioni e fori. Tre dimensioni caratteristiche, quali, la grandezza, la lunghezza e la profondità, definiscono, inoltre, tali superfici. (Ventre et al., 2012).

La struttura topografica prodotta dalla presenza di una o più tipologie di elementi topografici, distribuiti sulla superficie con una certa densità, può essere caratterizzata o meno da proprietà quali la simmetria e/o la regolarità. La tipologia di elementi topografici prevalentemente utilizzata in studi su colture cellulari è quella dei canali, evidenziando che molti tipi cellulari tendono ad allinearsi all’asse principale dei canali stessi (Ohara et al., 1979) e che spesso anche l’organizzazione delle componenti citoscheletriche e dei contatti focali risulta orientata nella medesima direzione (Oakley et al., 1993). Da una attenta analisi dei meccanismi e della dinamica di risposta agli stimoli topografici da parte delle cellule è possibile individuare il fenomeno della “topographic guidance” (o contact guidance) (Weiss, 1958), attribuibile alla reazione immediata da parte dei microtubuli, e della “topographic compensation”, da parte, invece, dei microfilamenti (Oakley et al., 1997). La presenza dei canali può indurre, nei tipi cellulari sensibili agli stimoli topografici, anche un orientamento preferenziale della migrazione (Wilkinson et al., 1982). In presenza di canali di opportune dimensioni, invece, la cellula aderisce al substrato e i fasci di microfilamenti si dispongono prevalentemente nella stessa direzione dei canali.

E’ dimostrato, infine, che anche la simmetria e la regolarità della struttura topografica, a parità di altre sue caratteristiche morfologiche e dimensionali, sono proprietà fondamentali per le cellule (Curtis et al., 2001).

3.3 Dimensione del materiale: le nanoparticelle

E' opportuno distinguere i sistemi particellari in due categorie principali che differiscono per dimensioni: sistemi microparticellari e nanoparticellari.

Si definiscono sistemi microparticellari, particelle con dimensioni comprese tra 1 e 1000 μm . Le nanoparticelle, invece, in accordo con la definizione standard della "American Society for Testing and Materials (ASTM)", sono particelle con lunghezze che vanno da un range di 1 a 100nm, in 2 o 3 dimensioni (ASTM E 2456-06. Terminology for nanotechnology. ASTM International; 2006).

A seconda della tecnica di preparazione utilizzata, è possibile ottenere sistemi nanometrici con architetture differenti (nanocapsule, nanosfere, nanoparticelle, nanotubi).

Le nanoparticelle esibiscono delle caratteristiche fortemente dipendenti dalle dimensioni rispetto a particelle di dimensioni maggiori. Il "range" nanometrico della taglia di tali sistemi di trasporto offre certamente distinti vantaggi per un loro impiego in campo biomedico. Dovuto alla loro taglia sub-cellulare e sub-micrometrica, le nanoparticelle possono, infatti, penetrare profondamente nei tessuti attraverso i fini capillari, attraversare la fenestrazione presente nel rivestimento epiteliale ed essere catturate efficientemente dalle cellule (Vinogradov et al., 2002).

Attraverso modificazioni delle loro proprietà fisiche come la taglia, la forma, e le caratteristiche di superficie è possibile controllare l'interazione e l'ingresso delle NPs nelle cellule e nei compartimenti sub-cellulari; pertanto il controllo di tali proprietà diventa essenziale per un loro impiego nelle applicazioni terapeutiche (Petros and DeSimone, 2010).

4. Applicazioni delle nanoparticelle in campo biomedico

4.1 "Drug delivery"

L'avvento di tecnologie innovative ha consentito la realizzazione di nuove forme di somministrazione per farmaci a basso e alto peso molecolare detti sistemi a rilascio controllato (CRS).

I CRS sono costituiti, solitamente, da supporti polimerici di diversa natura chimica. Sfruttando le diverse proprietà fisico-chimiche del biomateriale e le numerose modalità con le quali esso può essere impiegato, è possibile ottenere un CRS capace

di modificare il rilascio del farmaco mediante la cinetica desiderata, ottimizzando il profilo di attività.

Il requisito fondamentale di un biomateriale da impiegare per la preparazione di un CRS, sia esso un materiale non biodegradabile o biodegradabile, è la biocompatibilità, ossia l'assenza di tossicità cellulare e tissutale (Biondi et al., 2008). A questa esigenza cerca di rispondere la scienza dei biomateriali, che sta concentrando i suoi sforzi nel tentativo di ingegnerizzare opportunamente i materiali da impiegare nelle applicazioni biomediche. I CRS devono essere in grado di realizzare l'efficacia terapeutica con un'unica somministrazione per l'intera durata della terapia, di rilasciare il principio attivo al sito d'azione, minimizzando gli effetti collaterali, e di consentire il controllo delle concentrazioni del farmaco nello spazio e nel tempo (Biondi et al., 2008).

Il riconoscimento specifico si può avere a livello di un determinato tipo cellulare per un determinato organo, o a livello delle componenti individuali delle cellule, come gli antigeni di superficie (Berry and Curtis, 2003). Inoltre, per avere efficacia, la concentrazione di farmaco dovrebbe essere mantenuta all'interno di un certo "range" terapeutico tipico, nel quale i farmaci risultano tossici al di sopra del limite superiore di tale intervallo ed inefficaci al di sotto di esso (Fig. 8).

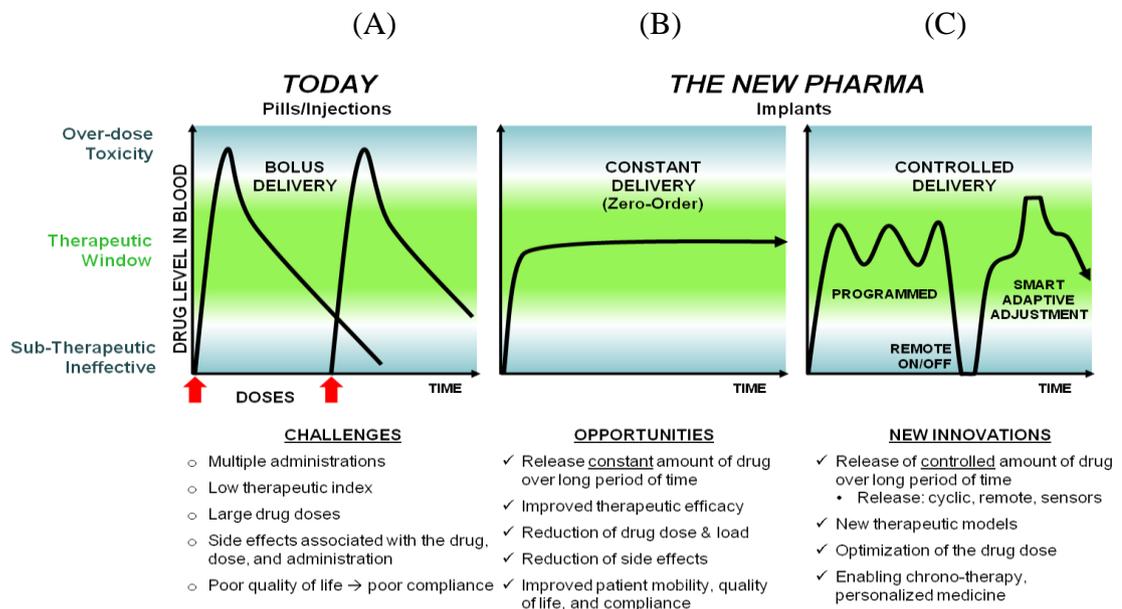


Fig. 8: Profili dei livelli di farmaco presente nel circolo ematico nel tempo ottenuti in seguito: a una terapia farmacologica tradizionale (A); a una terapia di rilascio costante (B); a una terapia di rilascio controllato (C).

Il più semplice modello di "drug delivery" è quello del rilascio a "ordine zero" o rilascio costante per un lungo periodo di tempo, che consente di eliminare i picchi e le

depressioni, fornendo così una consistente dose nota. Tuttavia nelle usuali forme di somministrazione non si riesce a mantenere la concentrazione di farmaco all'interno dell'intervallo terapeutico per molto tempo, infatti, il livello del medicinale tende a fluttuare all'interno di quest'ultimo. Tali problematiche hanno sollecitato lo sviluppo di sistemi di somministrazione controllata, per l'appunto il "drug delivery system".

Il principio attivo incapsulato in un sistema nanoparticellare può essere localizzato in cavità interne al sistema (nano capsule, sistemi a matrice polimerica impiegati per la veicolazione di principi attivi particolarmente tossici o con significativi problemi farmacocinetici), o finemente disperso nella matrice polimerica (nanosfere, cluster atomici o molecolari con un diametro compreso tra 1 nm e 100 nm), a seconda della tecnica di produzione e/o della formulazione di partenza.

Si prediligono i sistemi nano particellari, in quanto, le loro dimensioni consentono l'accesso ai tessuti e alle cellule bersaglio evitando il sistema endosoma-esosoma e offrono, inoltre, la possibilità di somministrare il farmaco, direttamente nel sito d'azione dove il sistema costituisce un deposito da cui il principio attivo può essere liberato ed agire per un periodo di tempo prolungato.

Lo scopo dell'utilizzo delle nanoparticelle a supporto del "drug delivery" si esplica, quindi, nell'aggirare tutti gli inconvenienti legati a una terapia farmacologica classica, e nell'agire sulla cinetica del farmaco stesso, circoscrivendone l'effetto biologico su un determinato tipo di cellule bersaglio, migliorandone dunque l'efficacia e riducendone la tossicità.

Pertanto le nanoparticelle potrebbero rappresentare un vettore ideale, grazie, proprio alle dimensioni nanometriche, che consentono di accedere in profondità nei tessuti e nelle cellule "target", alla biocompatibilità e biodegradabilità dei materiali e alla possibile funzionalizzazione che ne consente il riconoscimento da parte di specifiche cellule.

Le nanoparticelle sono uno strumento promettente per la consegna di farmaci non più utilizzati per il mancato accesso ai loro bersagli intracellulari o perché velocemente degradati. Lo studio dei meccanismi di assorbimento e del traffico intracellulare delle nanoparticelle è stato affrontato solo di recente, pertanto sono necessarie ulteriori analisi prima di un loro impiego in ambito biomedico.

4.1.2 Sistemi particellari a base di acido poli(lattico-co-glicolico) per il rilascio controllato di farmaci

Crescente è l'interesse nei confronti dello sviluppo di nuove forme farmaceutiche a base di polimeri biocompatibili, in grado di proteggere e rilasciare il principio attivo in tempi prolungati (Crotts and Park, 1998). Tra i materiali biodegradabili più impiegati nel CRS di proteine e peptidi, appaiono i poliesteri a base di acido lattico (PLA) e i loro copolimeri con acido glicolico (PLGA), destrano e chitosano.

I polimeri biodegradabili sono tipicamente degradati in oligomeri e singoli monomeri metabolizzati e rimossi poi dal corpo attraverso le normali vie metaboliche, in particolare attraverso il ciclo di Krebs (Duncan, 2006; Lammers et al., 2010; Grund, 2011). Grazie alla sua biocompatibilità e biodegradabilità (Ronneberger et al., 1996) il PLGA è frequentemente utilizzato come matrice per la preparazione di nanoparticelle per il “drug”, “gene”, o “imaging agent” “delivery”. Cambiando la composizione dei comonomeri e il peso molecolare del PLGA, si può controllare la velocità di rilascio di farmaci da nanoparticelle di PLGA (Yoo et al., 2000). Studi evidenziano che NPs inferiori ai 100 nm, costituite da copolimeri di PLGA-PEG, sembrano rappresentare nanomateriali capaci di accumularsi in tumori ipervascolari (Schädlich et al., 2011).

Il PLA presenta un'idrofobicità più spiccata rispetto al PLGA, e un aumento progressivo della componente idrofila (per esempio una riduzione del rapporto acido lattico/glicolico) determina un maggior richiamo d'acqua e una riduzione dei tempi di degradazione (Jalil and Nixon, 1990). Per questo motivo, PLGAs caratterizzati da tempi di degradazione *in vivo* che possono variare da 3 settimane fino a raggiungere un massimo di un anno, sono attualmente disponibili in commercio.

I poliesteri PLA e i loro copolimeri PLGA sono utilizzati per la formazione di sistemi particellari per la veicolazione di farmaci. Tuttavia sono fondamentali le proprietà di superficie delle nano/microsfere polimeriche, che dovranno essere tali da prevenire la loro rapida rimozione per opsonizzazione. La reazione di opsonizzazione avviene a opera delle opsonine, proteine contenute nel siero del sangue, che rendono possibile la fagocitosi dei materiali corpuscolati da parte dei monociti-macrofagi. Tali problematiche riguardano, ovviamente, quei sistemi che vengono somministrati per via endovenosa. La rimozione di nanoparticelle, da parte dei monociti-macrofagi, comincia con l'assorbimento di proteine sulla superficie particellare. Per evitare ciò, è possibile rivestire le nanoparticelle con un polimero idrofilico, non ionico, conosciuto

con il nome di PEG (polietilenglicole), i cui polimeri sono i più impiegati nella modificazione del rivestimento nanoparticellare al fine di evitare così il riconoscimento da parte del sistema reticolo-endoteliale (Gref et al., 2000).

4.2 Gene therapy

Il concetto alla base della terapia genica è la possibilità di trasferire materiale genetico in specifiche cellule al fine di correggere o supplementare i geni deficienti responsabili dell'insorgere di specifiche malattie. Lo sviluppo di vettori per il trasporto di materiale genetico nelle cellule ha destato un forte interesse negli ultimi anni, tuttavia, in alcuni casi, ancora bassa risultava l'efficacia dei protocolli impiegati a causa dell'inefficienza dei vettori genici utilizzati. Il sistema di trasporto genico ideale deve essere capace di evitare l'interazione del DNA terapeutico con le componenti del sangue, con le cellule endoteliali vascolari e di proteggerlo dalla degradazione da parte delle nucleasi del siero fino al raggiungimento delle cellule bersaglio. (Quong and Neufeld, 1998).

Inoltre il sistema di trasporto deve essere piccolo abbastanza da consentire la sua internalizzazione in cellule bersaglio ma, allo stesso tempo, di sfuggire al processamento da parte del sistema endosoma-lisosoma e di entrare direttamente nel nucleo.

I vettori di trasporto possono essere essenzialmente separati in due categorie: vettori virali e non virali.

I più comuni vettori virali utilizzati oggi sono i retrovirus, herpes simplex virus, lentivirus, adenovirus e adeno-associated virus, ciascuno con le proprie caratteristiche (Oligino et al., 2000). Il vantaggio dell'utilizzo di vettori virali è la loro abilità a entrare nelle cellule, l'alto tasso di transfezione e una rapida trascrizione del materiale esogeno inserito nel genoma virale. Tuttavia, l'uso di virus nella terapia genica potrebbe essere limitato da diversi fattori legati alla sicurezza, quali la possibilità di ricombinazione virale endogena, di effetti oncogenici e di risposte immunitarie (Lee et al., 1998). Studi precedenti, infatti, dimostrano che il vettore AdenoVirus (Ad) interagisce con le cellule del sistema reticoloendoteliale (RES) inducendo il rilascio e/o la produzione di diverse citochine pro-infiammatorie incluse il IL-6, TNF α , IL-8, GM-CSF e MIP (Zhang Y et al., 2001; Higginbotham et al., 2002). Un ulteriore svantaggio è rappresentato dal fatto che le ridotte dimensioni dei vettori virali

consentono l'inserzione solo di piccole sequenze di DNA esogeno nel genoma virale. Le limitazioni dei vettori virali, in particolare riguardanti i concetti di sicurezza, hanno condotto alla valutazione e allo sviluppo di vettori alternativi basati su sistemi non-virali. L'utilizzo di vettori non virali oltre a risolvere i problemi di sicurezza legati all'impiego di vettori virali, presenta vantaggi in termini di facilità d'uso e di produzione in larga scala.

Il più semplice sistema di trasporto genico non virale utilizza l'iniezione diretta di DNA nudo in specifici tessuti, in particolar modo nel muscolo, che ha mostrato produrre alti livelli di espressione genica (Wolff et al., 1990). Tuttavia il DNA nudo presenta lo svantaggio di essere più esposto alla degradazione da parte di nucleasi del siero ed inoltre il livello complessivo di espressione genica risultava essere molto più basso di quello ottenuto con vettori virali o, come vedremo, liposomiali.

Polimeri e fosfolipidi cationici sono due dei principali tipi di vettori di trasporto genico non virale maggiormente studiati. Grazie alla loro carica cationica permanente entrambi interagiscono elettrostaticamente col DNA carico negativamente formando dei complessi. I liposomi formati da fosfolipidi cationici offrono diversi vantaggi rispetto ai vettori virali, come la bassa immunogenicità e la facilità di preparazione (Deshpande et al., 1998). Inoltre possono anche interagire con le membrane cellulari cariche negativamente e così, in seguito a fusione, trasportare il DNA all'interno della cellula direttamente attraverso il plasmalemma (Zelphati et al., 2001). Molti studi hanno analizzato l'uso sistemico di complessi liposoma/DNA in vivo (Gill et al., 1997; Laitinen et al., 2000), evidenziando come siano rapidamente eliminati dal circolo ematico e distribuiti nel corpo (Liu and Huang, 2002; Song and Liu, 1998). Tuttavia la citotossicità in vitro (Brown et al., 2001) dei lipidi cationici e la bassa efficienza di transfezione comparata ai vettori genici virali (Oligino et al., 2000; Audouy et al., 2002), a causa della loro suscettibilità alla distruzione da parte delle proteine del siero, rappresentano i principali svantaggi.

I polimeri cationici coinvolti nei complessi DNA/polimero, risultano più stabili e capaci di condensare maggiormente il DNA, rispetto ai lipidi cationici (De Smedt et al., 2000), tuttavia comparati ai vettori virali, l'efficienza di transfezione risulta ancora più bassa (Garnett, 1999). Sebbene i complessi polielettroliti presentino molti vantaggi rispetto ai vettori virali, come la bassa immunogenicità e la semplice manifattura (Deshpande, 1998), diversi problemi come la tossicità, la mancanza di

biodegradabilità e la bassa efficienza di trasfezione necessitano di essere risolti prima di un uso pratico nel trasporto genico (Alan et al., 2002; Pouton and Seymour, 2001). In generale i vettori non virali, caratterizzati da lipidi o polimeri cationici devono efficacemente diffondere attraverso il sistema capillare, sfuggendo all'attacco dei macrofagi e all'interazione con la membrana cellulare e internalizzare nelle cellule (Kuo and Saltzman, 1996), possibilmente attraverso endocitosi, per poi dagli endosomi raggiungere il nucleo in cui possono essere trascritti (Zabner et al., 1995). Nei recenti anni, la nanotecnologia ha focalizzato la sua attenzione sullo sviluppo di sistemi di trasporto mirato di farmaci, di proteine, peptidi o geni. In particolare tale ramo della scienza si sta impegnando nella progettazione di sistemi di trasporto caratterizzati da nanocompositi come nanoparticelle, nanocapsule, sistemi micellari e coniugati capaci di preservare l'effetto del farmaco o del materiale genetico fino al raggiungimento del tessuto bersaglio e di preservare gli agenti terapeutici dalla degradazione enzimatica (Moghimi et al., 2001). La taglia nanometrica di questi sistemi di rilascio offre distinti vantaggi, infatti, le nanoparticelle possono penetrare profondamente nei tessuti attraverso i capillari, attraversare la fenestrazione presente nel rivestimento epiteliale, essere internalizzate efficientemente dalle cellule e penetrare nel nucleo (Vinogradov et al., 2002). L'efficienza di trasfezione genica di vettori nanoparticellari potrebbe essere incrementata legando alla loro superficie specifici segnali, come il segnale di localizzazione nucleare (NLS), in modo da indirizzarle specificamente al nucleo. Le nanoparticelle possono essere rilasciate a distanti siti bersaglio, sia mediante il trasporto localizzato, utilizzando sistemi basati su cateteri con una procedura il meno possibile invasiva (Song et al., 1998), sia coniugandole a biospecifici ligandi che potrebbero indirizzarle a tessuti o organi bersaglio (Moghimi et al., 2001). Studi hanno dimostrato che geni marker incapsulati in nanoparticelle, venivano espressi sia in colture cellulari in vitro (Panyam and Labhasetwar, 2012), che in vivo (Labhasetwar et al., 1999). Sebbene la trasfezione genica con nanoparticelle risulti significativamente più bassa di quella osservata con liposomi in vitro, in vivo essa era superiore di due ordini di grandezza ed era osservata fino a 28 giorni, suggerendo l'applicazione di nanoparticelle per la terapia genica. (Cohen et al., 2000).

Studi hanno evidenziato che le ridotte dimensioni e una distribuzione di taglia uniforme delle nanoparticelle sono fondamentali per incrementare l'espressione genica nano particella-mediata (Panyam and Labhasetwar, 2012). Un altro fattore

limitante nella terapia genica è la tossicità dei vettori di espressione (Clark and Hersh, 1999), che spesso limita la dose di DNA che può essere rilasciata.

Sebbene la dose di DNA associate alle nanoparticelle (1:50 w/w) è relativamente più bassa di quella in polimeri cationici (1:0.4 to 1:6) o sistemi lipidici (1:2 to 1:6), studi in vivo in modelli animali hanno dimostrato la biocompatibilità a lungo termine (Labhasetwar et al., 1997; Guzman et al., 1996), pertanto, la dose di nanoparticelle può essere incrementata al fine di rilasciare un adeguato quantitativo di DNA senza rischiare di incorrere in nanotossicità.

La sicurezza del vettore di espressione in vivo è ugualmente importante all'efficienza dell'espressione genica per il successo della terapia genica (Maheshwari et al., 2002). Pertanto ulteriori studi sono necessari al fine di definire tali nanostrutture come sicuri sistemi di trasporto di agenti terapeutici e consentire così un loro massivo impiego in ambito clinico.

4.3 Ipertermia

Per terapia ipertermica o ipertermia si intende il riscaldamento di tessuti biologici a temperature superiori a quella fisiologica attraverso onde elettromagnetiche comprese nell'intervallo di frequenze che va dalle microonde alle onde corte, sino alle onde lunghe. Attualmente si utilizza la frequenza di 13,56 MHz, la cui potenza dissipata localmente permette di ottenere, in modo non invasivo, innalzamenti della temperatura (da 41° a 45°C) in profondità dei tessuti trattati.

Studi riportano che l'associazione di trattamenti di ipertermia a quelli di radio e chemioterapia può, a parità di dose, incrementarne l'efficacia. I tumori sono caratterizzati da un sistema neovascolare che, essendo privo della tipica impalcatura muscolare, non è in grado di consentire una vasodilatazione fisiologica in caso di necessità di dispersione del calore. Pertanto l'innalzamento di temperatura sviluppato in seguito ad ipertermia è in grado di attivare sia le caspasi che degradando il DNA portano la cellula cancerosa all'apoptosi; sia la liberazione di citochine che stimolando l'arrivo in situ dei leucociti aumentano la risposta immunitaria contro le cellule tumorali (Berry and Curtis, 2003).

L'integrazione tra ipertermia e radiazioni non è ancora ben nota, tuttavia si suppone che tragga vantaggi dall'effetto citotossico provocato dal calore, ossia dalla scarsa nutrizione per via vascolare, carenza di ossigeno ed aumentata acidità in

corrispondenza della massa tumorale. Un ulteriore vantaggio potrebbe essere dovuto al fatto che, il calore inducendo un effetto radio sensibilizzante, consente di utilizzare l'ipertermia come terapia adiuvante per distruggere cellule tumorali radioresistenti. L'interazione tra ipertermia e chemioterapia è più complessa ed è fondata su diversi meccanismi. Bisogna tener conto che prima di poter raggiungere e danneggiare il DNA della cellula, il farmaco deve attraversare il plasmalemma e resistere all'azione detossificante degli agenti intracellulari, ed anche una volta danneggiato il DNA, la cellula può riparare il danno e sopravvivere. L'ipertermia, inducendo denaturazione proteica nella cellula, può potenziare l'azione tossica del farmaco e ridurre il fenomeno della chemioresistenza cellulare. Inoltre l'aumento di temperatura, determinando l'incremento della permeabilità della membrana cellulare, consente una maggiore possibilità di passaggio dei farmaci all'interno della cellula.

Al fine di evitare l'effetto collaterale legato all'ipertermia, ossia il riscaldamento anche di cellule sane adiacenti a quelle cancerose, è stato proposto l'impiego di nanoparticelle. Esse, una volta iniettate, solitamente migrano nei sistemi del reticolo endoteliale come i macrofagi e le cellule di Kupffer nel fegato, nella milza e nei linfonodi, siti nei quali i tumori metastatici facilmente si diffondono. Tuttavia, la somministrazione di nanoparticelle è passiva e il suo controllo, pertanto, risulta molto complesso (Shinkai, 2002). L'ipertermia magnetofluida comporta l'iniezione del fluido contenente nanoparticelle magnetiche che, quando sottoposte ad un campo magnetico alternato di frequenza dell'ordine delle onde radio FM, si riscaldano dissipando calore, determinando così danno alle cellule cancerose. Studi in vivo su ratti affetti da carcinomi mammari, hanno dimostrato che la somministrazione di nanoparticelle, per via intravenosa, è stata in grado di determinare un innalzamento della temperatura indotto da campo magnetico (Shinkai, 2002).

Il vantaggio di questa tecnica, minimamente invasiva, consiste nella capacità di prevenire il danneggiamento dei tessuti sani poiché solo le nanoparticelle assorbono l'energia fornita dal campo magnetico. Pertanto le ricerche si stanno focalizzando sulla possibilità di funzionalizzare la superficie di tali nanoparticelle con specifici peptidi, anticorpi o siRNA in grado di legare e di conseguenza di essere internalizzate esclusivamente dalle cellule cancerose.

Studi infatti mostrano la possibilità di indirizzare specificamente nanotubi di carbonio in cellule tumorali, rivestendoli di molecole della vitamina folato, i cui recettori sono sovraespressi dalle cellule tumorali, consentendo così la loro internalizzazione solo da

parte delle cellule maligne. (Kam et al., 2005). Recenti studi mostrano la possibilità di indirizzare nanoparticelle magnetiche in cellule tumorali, funzionalizzandole con anticorpi diretti contro i recettori EGFRvIII tipici delle cellule cancerose (Wankhede et al., 2012) (Fig. 9).

Tuttavia la ricerca in tale senso è ancora in una fase preliminare e ulteriori studi sono necessari per assicurare che l'impiego di nanoparticelle nell'ipertemia non sia dannoso per la salute umana e sia appropriatamente efficace.

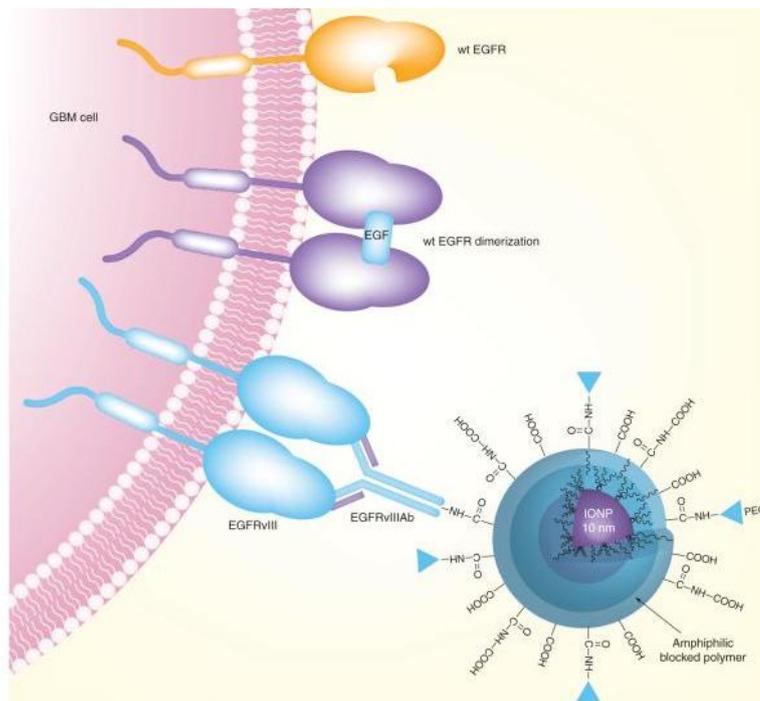


Fig. 9: Illustrazione del legame tra il recettore EGF vIII di una cellula del glioblastoma e l'anticorpo diretto contro il recettore EGF vIII coniugato a nanoparticelle magnetiche.

4.4 Risonanza magnetica

La risonanza magnetica rappresenta la più innovativa tecnica di imaging diagnostico, che consente di analizzare le sezioni corporee su tre piani diversi (assiale, coronale, sagittale) e di discriminare i tessuti in base alle loro caratteristiche biochimiche.

Il nucleo degli atomi è costituito da cariche elettriche dotate di un movimento rotazionale capace di creare un campo magnetico, il cui orientamento nello spazio è del tutto casuale (Pistoleri et al., XXXVIII). In presenza di un campo magnetico esterno i nuclei atomici tendono a disporsi lungo una direzione preferenziale, che verrà perturbata in caso di emissione di onde radio. Durante questa fase transitoria gli

atomi emettono dei segnali captabili da un rilevatore elettronico, che li trasmette ad un potente computer da cui verranno analizzati ed elaborati. Per questo motivo la risonanza magnetica impiega un potente magnete e un generatore di onde radio di frequenza pari a 42 megahertz, che corrisponde al numero di giri che i protoni dell'atomo di idrogeno compiono su se stessi in un secondo. L'atomo di idrogeno è stato scelto sia per le sue proprietà fisiche, sia per la sua abbondanza all'interno dell'organismo umano. Infatti, poiché, non tutti i nuclei atomici impiegano lo stesso tempo a ritornare nella posizione iniziale, analizzando questo periodo è possibile ricreare una mappa tridimensionale delle strutture anatomiche interne, evidenziandone anche lo stato di idratazione. Tali immagini possono essere implementate iniettando per via endovenosa dei mezzi di contrasto capaci di riprodurre il movimento dei protoni (Berry and Curtis, 2003) a livello dei tessuti normali e patologici nei quali si distribuiscono (Pozzi Mucelli, 2004).

I mezzi di contrasto per risonanza magnetica si distinguono principalmente in mezzi di contrasto paramagnetici e superparamagnetici, caratterizzati entrambi da ioni metallici legati a chelanti, capaci di ridurre la tossicità intrinseca.

I mezzi di contrasto paramagnetici sono costituiti da ioni metallici quali il ferro, il manganese e i lantanidi, caratterizzati dalla presenza di elettroni spaiati nella configurazione elettronica più esterna (Pozzi Mucelli, 2004). Il gadolinio è il mezzo di contrasto extracellulare più utilizzato in risonanza magnetica, per le caratteristiche paramagnetiche del suo ione Gd^{3+} , utile per valutare l'integrità della barriera emato-encefalica (BEE), o il pattern di impregnazione e quindi di vascolarizzazione di una lesione. I chelanti del gadolinio non specifici tendono ad accumularsi rapidamente nel fegato, permettendo così di avere una rappresentazione di immagini breve nel tempo (Berry and Curtis, 2003). Le particelle di ossido di ferro rappresentano un mezzo di contrasto superparamagnetico reticoloendoteliale, in quanto sono selettivamente captate dal sistema reticolo-endoteliale (SRE), dunque principalmente dal fegato (le cellule di Kupffer costituiscono l'80% dei macrofagi dell'organismo), ma anche da midollo osseo e milza (Van Beers et al., 1995). Tali particelle presentano dimensioni molto variabili da un minimo di 30nm fino a un massimo di 300nm. Studi su differenti agenti di contrasto mostrano che la biodistribuzione, così come la permanenza vascolare, dipende dalla taglia, carica e spessore del rivestimento particellare (Chouly et al., 1996; Pouliquen et al., 1992).

Tali particelle si distinguono in SPIO (superparamagnetic iron oxide) con dimensioni superiori a 50nm, rivestimento incluso e in USPIO (ultrasmall superparamagnetic iron oxide) inferiori ai 50nm (Pozzi Mucelli, 2004).

Generalmente presentano una forma irregolare e sono in grado di assorbire molta luce, determinando così una riduzione dell'intensità del segnale nei tessuti sani in quanto, a differenza di quelli patologici, sono caratterizzati da un sistema reticolo endoteliale. Per questo motivo i mezzi di contrasto superparamagnetici sono detti negativi, mentre quelli paramagnetici positivi (Pozzi Mucelli, 2004).

-CAPITOLO 4-
NANOTOSSICITA': DANNI CELLULARI E MECCANISMI DI
DIFESA

1. ROS (“Reactive Oxygen Species”)

L'ossigeno è una molecola ossidante che, nello stato fondamentale, presenta due elettroni spaiati in due orbitali π . La presenza di elettroni singoli lo annovera tra i *radicali liberi*, ovvero molecole caratterizzate dalla presenza di uno o più elettroni spaiati nell'orbitale esterno e da un'elevata reattività. Pur essendo incluso tra i radicali liberi, l'ossigeno non presenta un'elevata reattività, infatti, le reazioni in cui è coinvolto non si realizzano a temperature ordinarie o in assenza di catalizzatori. Ciononostante il suo potere ossidante dell'ossigeno rende la maggior parte delle sostanze d'interesse biologico instabili. Quest'evento apparentemente contraddittorio è giustificato dal fenomeno di *restrizione di “spin”*. L'ossigeno presenta nei due orbitali più esterni due elettroni con spin parallelo; questa particolare disposizione, durante i processi di ossidazione, renderebbe necessaria la messa a disposizione, da parte della molecola da ossidare, di due elettroni con spin paralleli tra loro e opposti a quelle dell'ossigeno. Dato che, secondo il principio di esclusione di Paoli, gli atomi presentano elettroni con spin opposto nell'ultimo orbitale, la necessità di operare l'inversione dello spin prima che gli elettroni siano accettati nell'orbitale dell'ossigeno, rallenta la reazione di ossidazione. Alcune sostanze come la citocromo ossidasi trasferiscono elettroni con il giusto verso.

La comparsa dell'ossigeno atmosferico sulla terra ha permesso a diversi organismi di sviluppare meccanismi in grado di utilizzare suddetto gas per i processi metabolici; nel contempo però si sono evoluti sistemi di difesa per tollerare i radicali tossici prodotti dall'incompleta riduzione dell'ossigeno ad acqua (Hassan et al.,1978). Durante le fasi di tale reazione si generano, infatti, forme parzialmente ridotte dell'ossigeno quali: *ione superossido* (O_2^-), *ione perossido* (O_2^{2-}), immediatamente protonato a *perossido d'idrogeno* (H_2O_2), *radicale idrossilico* (OH) ed infine l'aggiunta del quarto elettrone conduce allo *ione idrossile* (OH^-) che viene trasformato in acqua dall'aggiunta di un protone. I tre intermedi, in particolare il radicale idrossilico, sono molto reattivi e per tanto indicati come “Reactive Oxygen Species” (ROS).

I radicali liberi dell'ossigeno e altre specie reattive possono formarsi negli organismi viventi come sottoprodotto del normale metabolismo aerobico. La loro produzione può inoltre essere innescata nelle cellule da numerosi processi quali l'assorbimento di luce ultravioletta o di raggi X, l'introduzione nell'organismo di pesticidi, antibiotici, agenti tumorali ed elementi del fumo di sigaretta (Fig. 10).

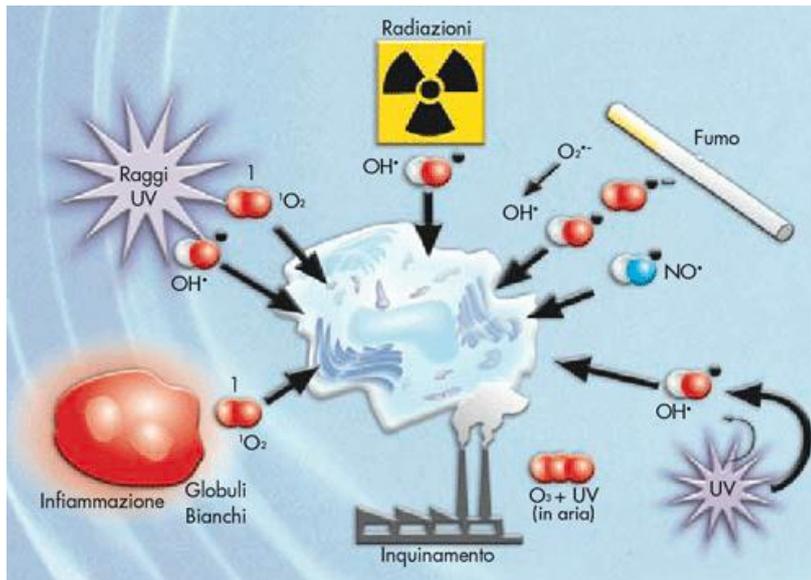


Fig. 10: Fonti esogene di produzione di ROS

La catena di trasporto elettronico mitocondriale è sicuramente la sorgente produttiva di ROS più importante. Nei mitocondri, durante la fosforilazione ossidativa, quasi tutto l'ossigeno è ridotto a molecola d'acqua dall'enzima citocromo ossidasi grazie ai complessi enzimatici della catena di trasporto mitocondriale. Alcuni trasportatori elettronici sono in grado di cedere all'ossigeno un solo elettrone formando così l'anione superossido che, non essendo capace di trattenerlo, lo rilascia nel mezzo circostante. La citocromo ossidasi è, invece, in grado di trattenere tutte le forme parzialmente ridotte dell'ossigeno fino alla sua completa riduzione. Nella matrice mitocondriale è presente l'enzima SuperOssidoDismutasi Mn-dipendente che converte l'anione superossido in perossido d'idrogeno. Inoltre alcuni studi indicano che nei mitocondri è prodotto anche il radicale ossidrilico (Nohl et al., 1981). Altri siti endogeni di produzione di radicali liberi sono rappresentati da: reticolo endoplasmatico, membrana cellulare e perossisomi; questi ultimi riducono l'ossigeno ad acqua attraverso un meccanismo che coinvolge come intermedio il perossido d'idrogeno.

I radicali liberi rivestono un ruolo determinante negli organismi poiché intervengono nella difesa contro i patogeni e nella regolazione di fondamentali processi biologici quali, ad esempio, l'espressione genica e la trasduzione dei segnali biochimici. Tuttavia essi risultano essere potenzialmente nocivi in quanto, per raggiungere la stabilità, tendono ad acquisire elettroni ossidando le molecole con le quali vengono a contatto.

I radicali liberi reagiscono con diversi target biologici come lipidi, proteine e DNA, tali reazioni inducono variazioni ossidative e alterano conseguentemente sia struttura che funzione della molecola bersaglio. La componente lipoproteica delle biomembrane rappresenta la classe di molecole maggiormente colpite dall'azione delle ROS (Halliwell and Gutteridge, 1990; Kowaltowski et al., 1999; Del Rio et al., 2005).

Gli acidi grassi polinsaturi (PUFA), colpiti dall'azione delle ROS, subiscono un processo a catena conosciuto come perossidazione lipidica che fa sì che essi siano trasformati in idroperossidi lipidici e composti aldeici secondari.

La perossidazione lipidica comporta una diminuzione della fluidità delle membrane e quindi alterazione della loro integrità e permeabilità, in particolare agli ioni Ca^{++} , portando inevitabilmente alla distruzione della cellula.

Come accennato in precedenza i danni delle ROS si estendono, non solo ai lipidi, ma anche a proteine e DNA. L'ossidazione degli amminoacidi comporta inattivazione degli enzimi e modifiche delle proprietà fisiche e strutturali delle proteine stesse (Wolff et al., 1986). Le alterazioni cui, queste, possono andare incontro, a seguito della reazione con i radicali dell'ossigeno, comprendono l'ossidazione delle catene laterali amminoacidiche, il cross-linking tra proteine, la degradazione dei legami peptidici, la formazione di legami covalenti con prodotti dell'ossidazione lipidica o glucidica e la loro stessa frammentazione.

Per quanto riguarda il DNA si parla di un'azione sia a livello nucleare che mitocondriale; in particolare il radicale ossidrilico reagisce sia con le basi puriniche che pirimidiniche modificando lo scheletro di ribosio-fosfato e provocando cross-linking e la scissione della doppia elica.

1.1 Meccanismi di difesa antiossidante

Un *antiossidante* è una qualsiasi sostanza che, presente a basse concentrazioni rispetto a quelle di un substrato ossidabile, ritarda o inibisce significativamente l'ossidazione di tale substrato (Halliwell and Gutteridge, 1990).

Al fine di evitare i danni indotti dallo stress ossidativo, la cellula ha messo in atto una serie di meccanismi di difesa in grado di prevenire la formazione dei ROS. Essi sono rappresentati dall'azione di difesa degli antiossidanti enzimatici e non; dalla chelazione dei cationi metallici, che rappresenta il principale controllo della perossidazione lipidica e della frammentazione del DNA; e dalle proteine che legano i

metalli, come la transferrina, che hanno un ruolo centrale nel controllare potenziali reazioni generate dai radicali.

1.1.1 Antiossidanti enzimatici

Diversi enzimi antiossidanti esplicano una funzione protettiva contro il danno per ossidativo, quali la superossido dismutasi (SOD), la catalasi e il glutatione perossidasi (GPX) (Li et al., 1993). La Superossidodismutasi (SOD) è una ossido-reduttasi che catalizza la conversione del superossido in perossido di idrogeno. Esistono molte forme comuni di SOD che possono essere legate a cofattori metallici. Nel mitocondrio è localizzata una SOD Mn-dipendente che interagisce con il superossido derivato dalla catena di trasferimento elettronico. All'interno del citosol cellulare si trova, invece, una forma di SOD legata a rame e zinco, che svolge una funzione catalitica più generica. La Catalasi (CAT) è una emoproteina, molto conservata durante l'evoluzione, che decompone il perossido di idrogeno in acqua e ossigeno. E' localizzata nei perossisomi e la sua attività enzimatica aumenta in concomitanza all'aumento della produzione del perossido di idrogeno. La Glutationeperossidasi (GPX) appartiene alla classe delle ossido-reduttasi, la cui funzione è quella di neutralizzare il perossido di idrogeno, formatosi dalla dismutazione del superossido, utilizzandolo come substrato per ossidare il glutatione. L'enzima GPX è ampiamente distribuito nei tessuti animali, ma è presente principalmente nel citosol, mentre la matrice mitocondriale contiene solo il 10 % del totale.

1.1.2 Antiossidanti non enzimatici

Gli antiossidanti non enzimatici, sono distinti in idrosolubili e liposolubili, e comprendono il β -carotene, la Vitamina E, Acido ascorbico, il Glutatione, il Coenzima Q₁₀, la ciste amina, lo zinco. Il β -carotene, precursore della vitamina A, è un antiossidante liposolubile che agisce bloccando l'anione superossido. La Vitamina E, detta anche tocoferolo, è l'antiossidante più abbondante in natura; ha una struttura costituita da un anello fenolico e una lunga catena isoprenoide. Il tocoferolo è una sostanza liposolubile maggiormente accumulata sottoforma di α - tocoferolo, che si concentra, in particolare, nei siti idrofobici delle membrane, in cui, prevenendo l'ossidazione delle lipoproteine, preserva l'integrità membranaria (Surai et al., 1997).

La sua attività antiossidante è dovuta alla capacità di cedere il proprio atomo di idrogeno fenolico ai radicali perossilici, interferendo così con le trasformazioni autocatalitiche della perossidazione lipidica. L' α - tocoferolo, privo del suo atomo di idrogeno si trasforma in un radicale poco reattivo ed è riconvertibile in vitamina E mediante l'intervento della vitamina C. Quest'ultima detta anche Acido ascorbico, è giudicata il più potente antiossidante presente nei fluidi extracellulari. La sua principale funzione è quella di proteggere le bio-membrane contro il danno perossidativo. Essa agisce secondo due meccanismi: intrappola i radicali perossilici nella fase acquosa prima che siano avviati al processo per-ossidativo, oppure agisce potenziando l'attività dell' α - tocoferolo. Inoltre, la vitamina C, opera influenzando l'espressione genica coinvolta nel pathway delle ROS (Ross et al., 2010). Il Glutatione (GSH) è un antiossidante idrosolubile che presenta nella sua struttura un gruppo tiolico. Il Coenzima Q₁₀, ubiquinone, fu isolato e caratterizzato, per la prima volta, da Festenstein and Morton, nel 1955. Esso è un componente della catena respiratoria mitocondriale, funge difatti da carrier di elettroni dai complessi I e II al complesso III; gioca un ruolo cruciale sia nel metabolismo energetico che nell'azione antiossidante. Recentemente, inoltre, si è considerato un suo coinvolgimento anche nell' induzione genica (Balercia et al., 2009) e nei meccanismi di trasduzione dei segnali (Turunen et al., 2004). La sua attività antiossidante può essere ascritta a un sinergismo con la vitamina E o ad un diretta attività di "spazzino" ("scavenger") (Ernster et al., 1992). La forma ridotta dell'ubichinone, l'ubichinolo, inibisce la perossidazione dei lipidi, agendo come "scavenger" dei radicali. Le proprietà antiossidanti dell'ubichinone, infatti, sono dovute alla sua capacità di essere ossidato a radicale semichinonico il quale, a sua volta, può essere ulteriormente ridotto a ubichinolo attraverso un ciclo redox. La membrana plasmatica delle cellule eucariotiche contiene una NADH ossidasi – CoQ dipendente (NOX) coinvolta nel trasferimento di elettroni attraverso la membrana. Questa ossidasi è localizzata sulla superficie esterna della membrana, mentre sulla superficie citosolica si trova una chinone reductasi che catalizza la riduzione del CoQ in CoQH₂ in presenza di NADH. La CoQH₂ inibisce la perossidazione lipidica ma, dato che questa forma viene ossidata durante il processo di perossidazione, la rigenerazione della forma ridotta è necessariamente richiesta per la partecipazione alle reazioni antiossidative (Fig. 11). Il CoQH₂ mitocondriale è efficientemente rigenerato dalla catena respiratoria. Si è

stabilito, inoltre, che il CoQH_2 rigenera la vitamina E dal radicale α -tocoferossilico, permettendo così alla vitamina E di svolgere la sua azione antiossidante.

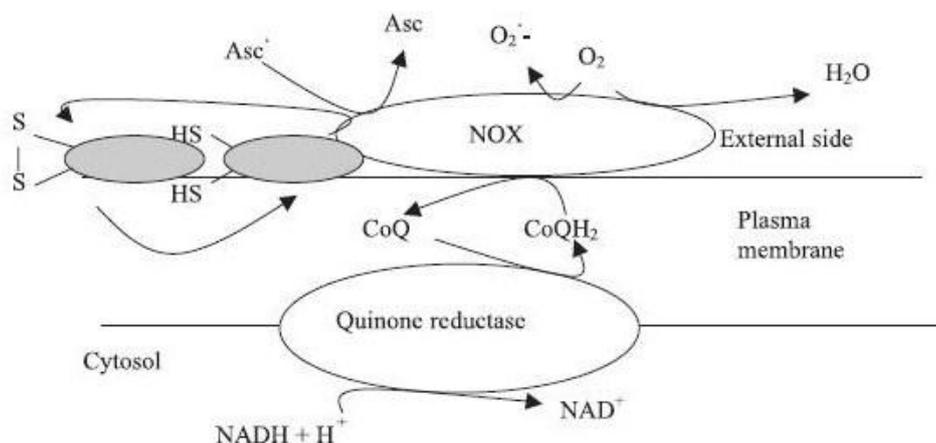


Fig. 11: Rappresentazione schematica del trasporto elettronico dipendente da CoQ

La cisteamina (CSH) protegge le cellule contro le radiazioni ionizzanti ed è conosciuta come ‘spazzino’ di OH^\cdot (Zheng et al., 1988). Lo Zinco è un metallo con proprietà antiossidanti che gioca un ruolo importante come “scavenger” delle specie reattive dell’ossigeno. Esso è cofattore per le proteine DNA-binding con motivo Zinc-finger e insieme al rame, cofattore della superossidodismutasi e di diverse proteine coinvolte nella riparazione dei danni al DNA. Recenti studi dimostrano che l’insufficiente assorbimento di zinco, può impoverire le difese antiossidanti, compromettendo i meccanismi di riparo del DNA (Colagar et al., 2009).

2. Il ciclo cellulare

La funzione base del ciclo cellulare è quella di duplicare accuratamente il DNA dei cromosomi e di segregare esattamente le copie nelle due cellule figlie geneticamente identiche. La duplicazione del DNA avviene durante la *fase S* che richiede 10-12 ore e occupa circa la metà della durata del ciclo cellulare di una cellula di mammifero. La segregazione e la divisione cellulare avvengono nella *fase M* che richiede molto meno tempo (meno di 1h nelle cellule di mammifero). Per concedere più tempo di crescita alla cellula sono presenti delle fasi gap nella maggior parte dei cicli cellulari- una *fase G1* tra la fase M e fase S ed una *fase G2* tra la fase S e la fase M. Il ciclo cellulare è

tradizionalmente diviso in quattro fasi sequenziali: G1-S-G2-M. Le fasi G1-S e G2 sono chiamate nel complesso *interfase* e può occupare 23h di un ciclo di 24h, con 1 h per la fase M.

La fase M inizia con la condensazione dei cromosomi, ossia l'involucro nucleare si disgrega e i cromosomi replicati, ciascuno consistente di una coppia di cromatidi fratelli, si attaccano ai microtubuli del fuso mitotico. Al procedere della mitosi nella metafase i cromosomi si dispongono allineati all'equatore del fuso mitotico pronti alla segregazione. All'anafase si ha la separazione dei cromatidi fratelli verso i poli opposti del fuso, dove si decondensano e riformano nuclei inatti. Durante la citochinesi la cellula si divide in due cellule. Le due fasi gap forniscono alla cellula il tempo necessario per controllare che l'ambiente extracellulare ed intracellulare siano nelle condizioni giuste per favorire una divisione cellulare. Se le condizioni esterne sono sfavorevoli le cellule ritardano nella fase G1 e possono entrare anche in uno stato di quiescenza detto fase G0. Le cellule per passare alla fase S devono superare un punto di restrizione vicino alla fine di G1 (Fig. 12).

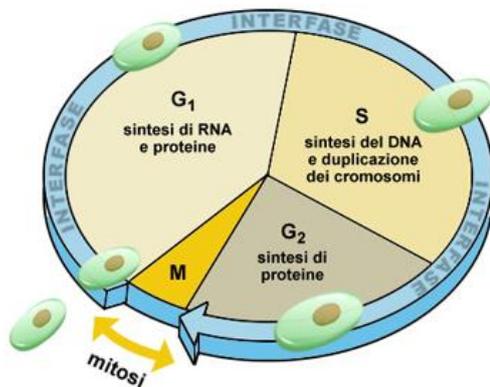


Fig. 12: Fasi del ciclo cellulare

2.1 Chinasi e ciclina

Le cellule eucariote hanno elaborato una rete complessa di proteine regolatrici, nota come sistema di controllo del ciclo cellulare. Tale sistema è deputato all'attivazione e disattivazione di enzimi necessari durante il ciclo cellulare, al controllo del giusto proseguimento delle fasi, all'innescamento di risposte cellulari e al controllo dei meccanismi alla base della sopravvivenza o morte cellulare.

Nella maggior parte delle cellule ci sono diversi punti di controllo nel ciclo cellulare a cui il ciclo può essere arrestato se gli eventi precedenti non sono stati completati.

Il sistema di controllo vede in prima linea le chinasi ciclina dipendenti (Cdk), la cui attività aumenta e diminuisce a seconda delle fasi del ciclo cellulare. L'incremento di attività delle cdK all'inizio della fase M, porta un aumento della fosforilazione di proteine deputate al controllo della condensazione della cromatina, della demolizione dell'involucro nucleare e dell'assemblaggio del fuso. Le cdK sono dipendenti dalle cicline per la loro attività, infatti, a meno che non siano legate a una ciclina non hanno attività chinastica. Ci sono quattro classi di cicline a seconda dello stadio cellulare in cui esplicano la loro funzione.

1. *ciclina G1/S*: legano Cdk alla fine di G1e impegnano la cellula per la replicazione

2. *ciclina S*: legano cdK durante la fase S e sono necessarie per la replicazione

3. *ciclina M*: promuovono gli eventi della mitosi

4. *ciclina G1*: aiutano a promuovere

Le cdK che interagiscono con i tre tipi di ciclina sono quattro nei vertebrati. Due interagiscono con le cicline G1, una con le cicline G1/S e con le cicline S e una con le cicline M. Queste chinasi sono presenti durante tutte le fasi del ciclo, ma vengono attivate solo transitoriamente in momenti ben precisi e poi rapidamente disattivate in seguito alla rapida degradazione delle cicline. Le cicline devono il loro nome al fatto che la loro concentrazione all'interno della cellula varia periodicamente a seconda della fase del ciclo cellulare. Il controllo della concentrazione delle cicline svolge un ruolo importante per collocare nel tempo i vari eventi del ciclo cellulare. Nei mammiferi esistono almeno sette chinasi ciclina-dipendenti, e un numero elevato di cicline, ciascuna caratteristica di una certa fase del ciclo cellulare. Ne consegue che si procederà da una fase all'altra solo quando la ciclina corrispondente raggiungerà un certo valore soglia, tale da attivare la chinasi relativa. La rapida degradazione di questa ciclina, che avviene a opera del sistema proteolitico ubiquitina-proteasoma-dipendente, provoca l'inattivazione della chinasi, e segnala l'uscita da una fase e l'ingresso in quella successiva. L'attivazione del sistema proteolitico dipende dalle stesse chinasi ciclinadipendenti, che in questo modo innescano una specie di timer che regola il loro stato di attivazione. Il legame con le cicline non è però sufficiente ad attivare le chinasi, infatti, riveste molta importanza lo stato di fosforilazione della chinasi stessa, in particolare della subunità catalitica p34. Questa subunità deve subire delle reazioni di fosforilazione (sulla treonina in posizione 160) e defosforilazione

(sulla tirosina in posizione 15), a opera di chinasi e fosfatasi specifiche. A questo punto è in grado di attivare altri complessi dello stesso tipo, amplificando rapidamente il segnale. Un differente stato di fosforilazione della subunità p34 regola negativamente l'attività dell'enzima, arrestando la progressione del ciclo cellulare.

2.1.1 Gli Inibitori delle Chinasi Ciclina-Dipendenti

Esistono, tuttavia, numerosi meccanismi con cui la cellula può bloccare, o rallentare la progressione nel ciclo cellulare. Negli ultimi anni è stata scoperta una serie di proteine in grado di inibire le chinasi ciclina-dipendenti. Alcuni inibitori sembrano coinvolti nella regolazione di passaggi intrinseci al ciclo cellulare, altri, invece, agirebbero bloccando la proliferazione in risposta a segnali esterni. Un esempio ben descritto è quello che riguarda il punto di restrizione che regola il passaggio dalla fase G₁ alla fase S. Per passare questo punto, il genoma cellulare deve essere integro, in caso contrario, il ciclo cellulare si arresta per permettere la riparazione del DNA. La presenza di un danno al DNA induce l'attivazione e l'aumento di concentrazione di una proteina regolatrice, definita p53, la cui funzione è quella di transattivare la trascrizione di alcuni geni, fra cui quello che codifica per p21/waf/cip, un fattore che legandosi al complesso ciclina-chinasi, che media il passaggio in S, ne impedisce l'attivazione. La cellula si arresta così in G₁, ripara il danno e poi prosegue nel ciclo cellulare. In caso di alterazioni, quantitative o qualitative, di p53, la replicazione del DNA procede anche in presenza di errori, aumentando così la probabilità che si sommino dei danni al genoma e portando la cellula verso la trasformazione neoplastica. Un altro esempio di controllo negativo sulla progressione nel ciclo è quello esercitato da una proteina di 105 kDa codificata dal gene Rb (retinoblastoma). Il retinoblastoma è un tumore infantile abbastanza raro, per il quale è stata dimostrata chiaramente una familiarità, in quanto spesso i pazienti presentano delle mutazioni germ-line che inattivano la proteina p105. Questa proteina in stato defosforilato sequestra nel citoplasma alcuni fattori di trascrizione quali E1F e E2F. In seguito alla fosforilazione, a opera di una chinasi ciclina-dipendente, rilascia questi fattori che possono così traslocare nel nucleo e attivare la trascrizione genica. In alcuni casi la progressione nel ciclo si arresta in seguito al differenziamento cellulare, per esempio, nei tessuti costituiti da elementi stabili (muscolo scheletrico, fegato) o perenni (tessuto nervoso). Queste cellule entrano in uno stadio che viene definito G₀, in cui il

sistema di controllo viene praticamente smantellato, dal momento che non è necessario. Molte cicline e relative chinasi non vengono più sintetizzate, anche se la cellula conserva le informazioni necessarie a fare ripartire il ciclo cellulare, posto che le condizioni ambientali lo permettano. Le cellule di un organismo pluricellulare fanno parte di un complesso sistema e la loro proliferazione deve essere regolata in modo che una certa cellula si divida solo quando è necessario, per sostituire un elemento perché invecchiato o danneggiato. Per proliferare, quindi, non bastano i nutrienti, ma sono necessari segnali provenienti da altre cellule, spesso adiacenti.

2.2 Punti di controllo del danno al DNA nel ciclo cellulare.

Quando si verifica un danno al DNA è essenziale riparare questo danno prima che la cellula tenti di replicarsi. Esistono, quindi, due punti di controllo del danno al DNA, uno alla fine della fase G1 che impedisce l'ingresso nella fase S e uno alla fine di G2 che impedisce l'ingresso in mitosi. Quando le cellule in G2 presentano un DNA danneggiato, esso invia segnali a una serie di proteine chinasi che fosforilano e inattivano la fosfatasi cdc25. Ciò inibisce la fosforilazione e l'attivazione di M-cdk, bloccando così l'ingresso in mitosi. Quando il danno è stato riparato il segnale inibitorio viene spento e la cellula progredisce con il ciclo cellulare. Il punto di controllo nella fase G1 inibisce l'attivazione dei complessi G1/S cdk e S-cdk impedendo alla cellula di andare in fase S. Nelle cellule di mammifero viene attivata la proteina p53 che attiva, in particolare, l'espressione del gene per p21 che si lega ai complessi G1/S cdk e S-cdk e ne inibisce l'attivazione.

3. Infiammazione cellulare

Le proteine NF- κ B sono proteine latenti che regolano geni al centro di molte risposte infiammatorie. In particolare nei vertebrati due citochine risultano fondamentali per l'induzione di risposte infiammatorie, il fattore di necrosi tumorale α (TNF- α) e l'interleuchina 1 (IL-1), prodotte entrambe da cellule del sistema immunitario innato, come i macrofagi, in risposta alle infezioni o a danno tissutale. Tali citochine pro-infiammatorie si legano a recettori di superficie e attivano NF- κ B, normalmente sequestrato in una forma inattiva nel citoplasma di quasi tutte le cellule. Una volta attivato, NF- κ B accende la trascrizione di più di 60 geni noti che partecipano a

risposte infiammatorie. Nei mammiferi ci sono 5 proteine NF- κ B (RelA, RelB, c-Rel, NF- κ B1 e NF- κ B2), che formano una vasta gamma di omodimeri ed etero dimeri, capaci di attivare una specifica serie di geni.

Proteine inibitrici chiamate I κ B si legano saldamente ai dimeri e li tengono in uno stato inattivo all'interno di grossi complessi proteici nel citoplasma. Segnali come TNF- α o IL-1 attivano i dimeri scatenando una via di segnalazione che porta alla fosforilazione, ubiquitinazione e conseguente degradazione di I κ B. Tale degradazione espone un segnale di localizzazione nucleare su NF- κ B, che ora si muove nel nucleo e stimola la trascrizione di specifici geni di risposta. Una serina/treonina chinasi specifica detta I κ B chinasi (IKK) dà luogo alla fosforilazione di I κ B su due serine. L'attacco di una citochina pro infiammatoria ai suoi recettori di superficie attiva la I κ B chinasi e fa reclutare alle code citosoliche dei recettori raggruppati varie proteine adattatrici e serina/treonina chinasi citoplasmatiche. Non tutte le proteine di segnalazione reclutate dalla coda citosolica del recettore del TNF- α contribuiscono però all'attivazione di NF- κ B. Alcune possono scatenare una cascata da MAP-chinasi, mentre altre possono attivare una cascata proteolitica che porta ad apoptosi.

4. Morte cellulare

L'esposizione a uno stimolo dannoso di bassa intensità e breve durata induce un danno reversibile, mentre uno stimolo prolungato guida la cellula in un punto di non ritorno, indirizzandola verso la morte cellulare. Esistono due differenti meccanismi di morte cellulare: necrosi e apoptosi. La necrosi interessa un elevato numero di cellule e si mostra con rottura delle membrane e rigonfiamento cellulare. Di contro, l'apoptosi è un processo di morte cellulare fisiologicamente programmato che riguarda singole cellule senza infiammazione del tessuto circostante (Wyllie et al., 1980).

4.1 Necrosi cellulare

La necrosi è la morte cellulare accidentale, che si verifica in risposta ad un'ampia varietà di noxae patogene come ipossia, ipertermia, ischemia, reazioni immunitarie, virus, traumi cellulari, radiazioni, sostanze tossiche ecc..

Essa può essere provocata da diversi fenomeni, quali la denaturazione diretta delle proteine da parte dell'alta temperatura, degli acidi e alcali forti e dei metalli pesanti; la

distruzione meccanica o chimica delle membrane cellulari, in seguito a congelamento o uso di tensioattivi; l'inibizione di enzimi o sistemi enzimatici mediante l'impiego di molti tipi di veleni o sostanze tossiche (cianuro, dinitrofenolo, ecc.); la riduzione o il blocco della nutrizione cellulare (ischemia).

I meccanismi d'azione con cui le varie cause di necrosi cellulare agiscono sulla cellula possono essere diversi, ma sono sostanzialmente riconducibili a danni diretti sulle strutture membranarie o alterazioni degli enzimi coinvolti nel metabolismo energetico, che si riflettono sulla permeabilità selettiva della membrana cellulare.

In particolare si verifica un ingresso di Na^+ e fuoriuscita di K^+ , capace di determinare un richiamo di liquidi all'interno della cellula che provoca un rigonfiamento cellulare.

Il mancato funzionamento delle pompe cationiche o i danni diretti sulla membrana provocano un aumento del calcio intracellulare che determina l'attivazione di fosfolipasi di membrana che degradano i fosfolipidi della membrana. Compagnano, così, estroflessioni della membrana cellulare, formazioni di vacuoli intracitoplasmatici, un rigonfiamento citoplasmatico e degli organuli cellulari (reticolo endoplasmico, Golgi, lisosomi, mitocondri). Le idrolasi rilasciate dai lisosomi (autolisi) producono una rapida accelerazione della distruzione cellulare.

I fenomeni a livello nucleare sono più tardivi e si esprimono dapprima come addensamento della cromatina e coartazione del nucleo (picnosi), poi come rottura della membrana nucleare preceduta dall'aggregazione della cromatina in masserelle discrete (carioressi) ed infine come dissoluzione totale della cromatina per espulsione o per dissoluzione nel citoplasma (cariolisi). Il DNA viene esposto all'azione delle desossiribonucleasi lisosomiali dalla digestione proteolitica degli istoni.

La necrosi coinvolge di solito gruppi di cellule contigue e si produce nel tessuto circostante una reazione infiammatoria dovuta al rilascio dei residui cellulari.

4.2 Apoptosi cellulare

L'apoptosi è un fenomeno complesso, che può essere indotto su tre distinti livelli: membrana plasmatica (presenza dei recettori Fas), nucleo (presenza di p53) e citoplasma (attivazione di Bax e rilascio del citocromo c) (Selivanova and Wiman, 1995; Gottlieb, 2001; Wolf and Green, 1999; Baccetti et al., 1996).

A livello della membrana è presente un recettore di segnali apoptotici estrinseci, Fas, il quale in presenza del proprio ligando di natura tetramerica, si lega omotipicamente

ad altri recettori e interagisce con proteine adattatrici citoplasmatiche (FADD), con le quali condivide un dominio definito “dominio di morte”. Il complesso così formato determina l’attivazione delle proteine effettrici del processo apoptotico.

A livello citoplasmatico il delicato equilibrio tra i membri pro-apoptotici (come BAX, BID, o BAD) e anti-apoptotici (Bcl-X1 e Bcl-2) agisce da diretto modulatore della funzione mitocondriale (Green and Reed, 1998). In presenza di un induttore apoptotico esterno, il bilancio suddetto viene compromesso. Nei mitocondri si determina l’apertura dei pori nella membrana interna, la quale si traduce in un decremento del potenziale di membrana, e un aumento di permeabilità della membrana esterna, con rilascio, dal mitocondrio al citoplasma, di endonucleasi G, Smac/Diablo (proteina che lega e inibisce le XIAP, cioè le proteine che inibiscono l’apoptosi), fattore AIF (flavoprotein apoptosis-inducing factor) e citocromo c (Ravagnan et al., 2002). Il citocromo c normalmente funziona nella produzione di energia, ma il suo rilascio dai mitocondri partecipa all’attivazione della cascata effettrice dell’apoptosi (Reed, 1997). Una volta liberato, infatti, esso si lega ad Apaf-1 (fattore pro-apoptotico di attivazione delle proteasi), ad ATP e ad una proteina effettrice della morte cellulare, creando un complesso multiproteico chiamato apoptosoma.

Nel nucleo la presenza di un danno al DNA determina, mediante un meccanismo indiretto, l’attivazione della proteina p53. In particolare, nelle cellule non danneggiate la proteina p53 è altamente instabile ed è presente in basse concentrazioni, a causa dell’interazione con la proteina Mdm2, la quale agisce da ubiquitina ligasi indirizzando p53 verso la degradazione proteosomica. Il danno al DNA, invece, attiva proteine chinasi che fosforilano p53 e riducono così il suo legame a Mdm2. Ciò fa diminuire la degradazione di p53 portando a un marcato aumento della sua concentrazione nella cellula, che determina l’arresto del ciclo cellulare ed in particolare, regola il promotore di p21, determinandone l’attivazione. p21 è un inibitore di chinasi ciclina-dipendenti, chinasi che sono partner catalitici delle cicline e che regolano la progressione del ciclo cellulare. La loro inibizione induce l’arresto della crescita in fase G1, offrendo alla cellula il tempo necessario per la riparazione dei danni. Se il processo di riparazione fallisce, p21 è inibito e p53 innesca l’apoptosi. L’induzione dell’apoptosi da parte di p53 avviene per attivazione della trascrizione dei recettori di morte (Fas e CD95); di proteine proapoptotiche (Bax, PUMA, NOXA,

Bid), di adattatori apoptotici come Apaf-1 e per repressione della trascrizione di proteine anti-apoptotiche come Bcl-2 e Bcl-Xl (Sionov et al., 1999).

La fase effettrice, comune a tutti i meccanismi di induzione, vede protagoniste le caspasi (proteasi in cisteina con specificità per l'aspartato). Tali proteasi sono sintetizzate come zimogeni inattivi (pro-caspasi) e attivate da taglio proteolitico (Cohen, 1997). Si dividono in due gruppi, caspasi d'inizio e caspasi effettrici, a seconda dell'ordine in cui vengono attivate prima della degradazione finale. Le caspasi d'inizio comprendono la caspasi 9, che si lega ad Apaf-1 e la caspasi 8, che è attivata dall'interazione Fas-ligando Fas. L'attivazione di queste caspasi comporta il reclutamento e l'attivazione delle caspasi effettrici, come la caspasi-3. L'azione di tali effettori, determina l'innescò di un programma di morte rapida e sequenziale, che prevede variazioni sia della superficie cellulare che nucleare (Susin et al., 1999). In particolare a livello della membrana plasmatica, le fosfatidilserine, di norma distribuite ordinatamente nel versante citoplasmatico vengono traslocate da enzimi denominati flippasi nella porzione esterna, dove innescano il riconoscimento fagocitico non-infiammatorio della cellula apoptotica, mentre nel nucleo specifiche endonucleasi determinano una frammentazione del DNA (Fig. 13).

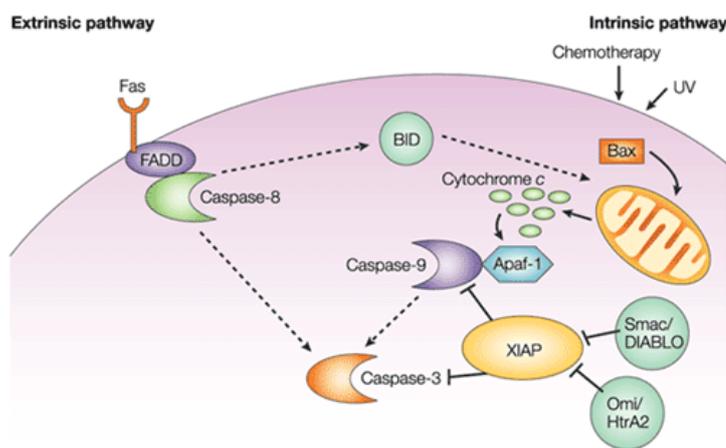


Fig. 13: Apoptosi cellulare

5. Effetti citotossici indotti da Nanoparticelle.

Negli ultimi anni i miglioramenti ottenuti nella sintesi e modificazione superficiale di nanomateriali, hanno consentito l'applicazione di nanoparticelle nel campo biomedico e biotecnologico. Mentre la commercializzazione delle nanoparticelle si sta espandendo rapidamente, il loro impatto sulla salute e sull'ambiente è finora poco

compreso. Numerosi studi hanno evidenziato che a livello nanometrico il materiale d'origine presenta caratteristiche chimico-fisiche, che conferiscono citotossicità (Lewinski et al., 2008). Accanto allo studio dell'internalizzazione delle NPs, gli scienziati stanno facendo uno sforzo globale per chiarire un possibile effetto citotossico delle differenti nanoparticelle (Ponti et al., 2009; Di Virgilio et al., 2010; Asharani et al., 2010). I dati tossicologici relativi alla biocompatibilità delle nanoparticelle sono necessari per identificare il rischio associato all'esposizione di nanoparticelle.

Studi tossicologici preliminari sui sistemi di nanoparticelle hanno identificato alcune caratteristiche strutturali fondamentali per la comprensione delle interazioni tra nano materiali e sistemi biologici (Kirchner et al., 2005; Kotov et al., 2009).

La composizione chimica del nucleo nanoparticelle è stato identificato come un buon predittore di tossicità. Le nanoparticelle composte da metalli tossici noti come per esempio il cadmio (Samia et al., 2003; Kirchner et al., 2005) e l'argento (Wise et al., 2009) risultano generalmente più tossiche di quelle costituite da materiali inerti come l'oro (Bar-Ilan et al., 2009). La dimensione del "core" è un elemento importante, particelle più piccole con un core dello stesso materiale, generalmente risultano più tossiche di quelle più grandi (Meng et al., 2007; Guo et al., 2008). Le particelle più piccole si pensa interagiscano maggiormente con i sistemi biologici, sia attraverso un migliore assorbimento cellulare, sia attraverso una decomposizione più veloce dovuta a un più alto rapporto area-volume rispetto a quello di particelle più grandi. Oltre alla composizione del "core" delle nanoparticelle, anche i ligandi di superficie possono influenzare la tossicità delle nanoparticelle (Hoshino et al., 2004).

Questa gamma di variabili può determinare relazioni struttura-attività difficili. Vari modelli biologici sono stati proposti per la valutazione tossicologica, includendo sia metodologie in vitro che in vivo. Gli studi in vitro su colture cellulari, hanno mostrato che alcune nanoparticelle sono in grado di indurre stress ossidativo (Oberdorster et al., 2005a; McCarthy, 2012), interazione col DNA (Singh et al., 2009; Mu et al., 2012), stimolazione di secrezione di proteine infiammatorie conducendo a una riduzione della vitalità e alla morte cellulare (Waters, 2009; Chen et al., 2004). E' evidente che particelle nanometriche con grandi aree di superficie possono attivare i recettori trans membrana e innescare varie vie di trasduzione del segnale dopo interazione con la membrana plasmatica. Le nanoparticelle possono anche entrare nelle cellule attraverso endocitosi e interferire con le normali funzioni cellulari

attraverso l'interazione con macromolecole intracellulari. Le potenziali interazioni tra nanoparticelle e sistemi cellulari che possono indurre diverse risposte cellulari e citotossicità risultano essere: (1) un'interazione con la membrana plasmatica che può causare instabilità associata al trasporto di ioni, trasduzione del segnale, e morte cellulare; (2) l'interazione con i mitocondri che possono alterare il metabolismo o interferire con le difese antiossidanti e la produzione di ROS; (3) il legame al DNA danneggiandolo, interferendo con la divisione cellulare e la sintesi proteica; (4) l'interazione con il citoscheletro che può fermare il traffico vescicolare e causare un'instabilità meccanica e la morte cellulare; (5) un'interazione con proteine, lipidi, e altre biomolecole che può portare a diversi tipi di effetti 'corona' ed effetti biologici. (Lai, 2012) (Fig. 14). Tuttavia ancora inconsistenti risultano i dati tossicologici relativi alla biocompatibilità delle nanoparticelle necessari per identificare il rischio associato all'esposizione di nanoparticelle. Dati controversi sono presenti in letteratura, a causa di una mancata standardizzazione degli studi da parte dei diversi autori, che impiegano, infatti, NPs differenti per caratteristiche chimico-fisiche, diverse condizioni sperimentali e di sistemi biologici in vivo e in vitro. Dunque identificare le caratteristiche chimico-fisiche delle nanoparticelle necessarie per un loro impiego in campo biomedico e sviluppare un sensibile e predittivo saggio di nanotossicità per tali nanomateriali risulta indispensabile prima di un loro uso in biomedicina (SCENIHR 2007, 2009; EPA 2007; FDA 2006, 2008).

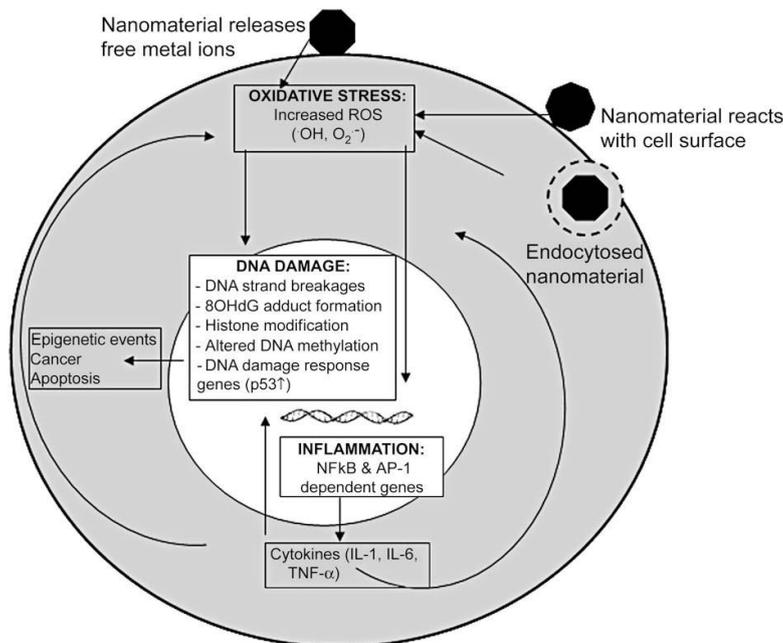


Fig. 14: Effetti citotossici indotti da nanomateriali

-CAPITOLO 5-
**LO SVILUPPO EMBRIONALE BOVINO IN VITRO: SAGGIO
PREDITTIVO DI NANOTOSSICITA'**

1. Saggi di tossicità dei nanomateriali

Negli ultimi anni la comunità scientifica è sempre più impegnata a capire se le stesse caratteristiche dei nanomateriali (NMTs) sfruttate dalla ricerca e dall'industria, quali l'elevata area superficiale, la reattività e la capacità di penetrare le membrane cellulari possano determinare effetti negativi sull'ambiente e sull'uomo (Aillon et al., 2009).

I tossicologi ritengono che, poiché i NMTs presentano proprietà chimico-fisiche differenti dagli stessi materiali di dimensioni atomiche o super-micrometriche, essi debbano essere testati e regolamentati in modo specifico. Tuttavia, a oggi, non esistono ancora protocolli standard e regolamentazioni internazionali sulla progettazione, sull'utilizzo e sulla valutazione tossicologica dei NMTs (SCENIHR 2007, 2009; EPA 2007; FDA 2006, 2008).

Il primo step per comprendere come un agente reagirà a contatto con i fluidi corporei, è quello di effettuare studi preliminari su colture cellulari. Tuttavia è necessario che vengano impiegati saggi tossicologici specifici e appropriati al fine di evitare risultati inesatti e furvianti. Numerosi sono a oggi i test tossicologici in vitro e in vivo utilizzati al fine di valutare gli effetti citotossici dei differenti nanomateriali.

Un semplice test citotossico consiste nel monitorare i cambiamenti nella morfologia cellulare o nucleare mediante microscopia in campo chiaro (Fiorito et al., 2006)

Tuttavia la maggior parte dei saggi tossicologici impiegati in letteratura analizzano la vitalità cellulare mediante metodi colorimetrici che misurano l'integrità di membrana e l'attività mitocondriale.

Un esempio è dato dal "Neutral red" che attraversa il plasmalemma per diffusione e si accumula maggiormente in cellule la cui membrana è integra, consentendo così una discriminazione delle cellule non vitali da quelle vitali, mediante misurazioni spettro fotoniche (Borenfreund and Puerner, 1985; Flahaut et al., 2006; Monteiro-Riviere and Inman, 2006). Il "Trypan blue", è in grado invece di permeare solo cellule con membrana destabilizzata, colorando di blu esclusivamente le cellule non vitali, identificate mediante microscopia in campo chiaro (Altman et al., 1993; Bottini et al., 2006). Ancora sono impiegati saggi di vitalità "LIVE/DEAD", come quello che include la acetossimetil-calceina (calceina AM) e l'etidio omodimero (Hirsch et al., 2003). La Calceina AM diffonde in cellule vitali in cui viene convertita, ad opera di esterasi, in calceina, molecola che fluoresce nel verde; l'etidio omodimero, invece, è in grado di attraversare solo cellule con membrane destabilizzate colorando di rosso il nucleo.

Ulteriore saggio è quello del rilascio della lattato deidrogenasi (LDH) (Muller et al., 2005) da parte di cellule danneggiate capace di ossidare il lattato in piruvato, che a sua volta promuove la conversione del sale tetrazolio in formazano, molecola con assorbanza a 490nm (Haslam et al., 2000).

L'attività mitocondriale può essere saggiata analizzando la formazione di sale tetrazolio da parte delle deidrogenasi mitocondriali, che avviene solo nelle cellule vitali dotate di mitocondri attivi (Mosmann, 1983).

Il saggio di vitalità 3-(4,5-dimetiltiazolo-2-yl)-2,5-difenil tetrazolio bromide (MTT) è il più utilizzato (Flahaut and Durrieu, 2006; Monteiro-Riviere and Inman, 2006; Jia et al., 2005). Tale test si basa sulla riduzione da parte dell'enzima mitocondriale succinato deidrogenasi del sale di tetrazolio (MTT), sostanza di color giallo, in cristalli di formazano, insolubili in soluzione acquosa. I cristalli vengono disciolti in isopropanolo acidificato e la soluzione viola che si forma con assorbanza a 492 nm può essere dosata spettrofotometricamente (Malich and Markovic, 1997).

Nel saggio Resazurin o Alamar (Shvedova et al., 2003; Selvan and Tan, 2005), tale molecola blu non fluorescente è ridotta, dall'attività metabolica, in una molecola rosa fluorescente, principalmente agendo come un accettore di elettroni per enzimi come la Nicotinammide adenina dinucleotide fosfato (NADP) e Flavina adenina dinucleotide (FADH) durante il consumo di ossigeno (O'Brien et al., 2000).

Non tutti gli effetti tossici risultano in difetti della funzionalità membranaria o metabolica, infatti, molti saggi sono deputati all'analisi dello stress ossidativo, in seguito all'utilizzo di nanoparticelle.

Il saggio Glutatione (GSH), analizza i livelli di GSH, importante componente antiossidante ossidata a glutatione disolfuro (GSSG) in presenza di specie reattive dell'ossigeno.

In particolare tale saggio analizza i livelli di glutatione utilizzando il reagente EllmanFs, acido 5,5'-ditio-bis-2-nitrobenzoico (DTNB), che reagisce col gruppo sulfidrilico del GSH producendo un prodotto giallo acido 5-tio-2-nitrobenzoico (TNB). La Glutatione riduttasi ricicla il GSH dal complesso GSH-TNB producendo più TNB. Il tasso di produzione di TNB è direttamente proporzionale alla concentrazione di GSH nel campione, l'assorbanza di TNB può essere misurata a 405 o 412nm per determinare il livello di GSH (Vandeputte et al., 1994).

Ancora fondamentale è analizzare la perossidazione lipidica della membrana plasmatica in seguito a trattamento con nanoparticelle. Essa può essere analizzata

utilizzando il saggio GSH o acido tiobarbiturico (TBA). Nel saggio TBA la malondialdeide (MDA), prodotta dalla perossidazione lipidica, a pH acido reagisce con l'acido 2-tiobarbiturico formando un cromogeno rosa fluorescente (Halliwell and Chirico, 1993).

L'infiammazione è un altro possibile effetto dovuto all'esposizione delle nanoparticelle. Pertanto è fondamentale testare la presenza di citochine pro-infiammatorie o proteine segnali di risposte infiammatorie come IL-1b, IL-6, and TNF-a e le chemochine IL-8 (Dinarello, 2000).

La presenza di queste citochine è analizzata utilizzando "enzyme-linked immunosorbant assay" (ELISA) e può essere quantificata misurando l'assorbanza di anticorpi marcati con fosfatasi alcalina o streptavidina-perossidasi di rafano a 405 o 620 nm, rispettivamente (Favre et al., 1997).

Al fine di studiare gli effetti genotossici delle nanoparticelle, molti test analizzano la presenza di danni al DNA mediante citometria di flusso (Kostarelos et al., 2007; Cui et al., 2005; Kam et al., 2004) la quale, mediante un fascio laser, differenzia le cellule in base alla loro dimensione e densità. Utilizzando un colorante intercalante del DNA, il contenuto di DNA cellulare può essere usato per determinare la proporzione di cellule in apoptosi. Un esempio è lo ioduro di propidio, in grado di penetrare solo le membrane destabilizzate, colorando di rosso, pertanto, solo le cellule danneggiate (King, 2000). In aggiunta alla citometria di flusso, la comet assay è utilizzata per individuare la presenza di DNA danneggiato che appare sottoforma di "comete" su gel elettroforetico. Infatti il DNA intatto è sulla porzione alta mentre sul fondo si ritrovano frammenti di DNA danneggiato, evidenziati grazie all'impiego dello ioduro di propidio (Fairbairn et al., 1995).

Solo di recente i nanotossicologi hanno cominciato ad analizzare l'espressione di specifici geni sovra o sotto-regolati mediante studi di DNA "microarray" (Ding et al., 2005; Yamawaki and Iwai, 2006; Chen and Gerion, 2004).

Tuttavia, studi di nanotossicologia, evidenziano che alcune caratteristiche delle NPs come l'alta capacità di assorbimento, l'idrofobicità, la carica superficiale, le proprietà ottiche e magnetiche o le attività catalitiche possono interferire con i test usati in tossicologia, portando così a risultati fuorvianti. Per esempio, si è osservato che NPs a base di carbonio possono interferire con le classiche analisi citotossiche come l'MTT, usato per valutare la vitalità cellulare. Un aumento o diminuzione nel numero di cellule vitali può essere valutato come corrispondente incremento o decremento

dell'assorbimento ottico dovuta ai sali di formazano, tuttavia, le NPs a base di carbonio risultano in grado di interagire con il substrato, riducendo la quantità di MTT libero e causando risultati falsi negativi (Kroll et al., 2009). Pertanto non solo è necessario effettuare contemporaneamente più saggi tossicologici per definire la tossicità di uno stesso tipo di nanoparticelle, ma occorrerebbe individuare sensibili e predittive strategie di “screening” di tossicità per accertare il potenziale rischio legato alle NPs. E' necessario la creazione di banche dati in cui ogni tipo di NPs sia classificata, caratterizzata e studiata singolarmente riguardo le sue interazioni con i sistemi biologici.

2. La riproduzione sessuata

La riproduzione sessuata si basa sulla formazione di gameti mediante divisione meiotica, determinando la generazione di un individuo con patrimonio genetico derivante dalla fusione dei nuclei dei due gameti, ma differente da entrambi i genitori. La maggior parte degli organismi si riproduce per via sessuata formando due tipi di gameti aploidi, le uova e gli spermatozoi.

Entrambi sono altamente specializzati e di vita breve, a meno che non si uniscano (anfimissi), mediante il processo di fecondazione, a formare un nuovo organismo.

2.1 Fecondazione nei mammiferi

La fecondazione sessuata, in particolare nei mammiferi, ha inizio con l'avvicinamento dello spermatozoo all'uovo e la conseguente fusione delle loro membrane plasmatiche, prosegue con l'attivazione di importanti meccanismi metabolici dell'uovo e termina con l'unione dei nuclei aploidi in un nuovo nucleo diploide, dando così origine allo zigote.

Per acquisire la capacità fecondante i gameti, e in particolare lo spermatozoo, vanno incontro ad alcune modificazioni funzionali che avvengono nelle vie genitali maschili e femminili.

2.1.1. Completamento della maturazione ovocitaria

Nel tratto ampollare della tuba l'ovocita, in contatto con le secrezioni tubariche, completa la maturazione citoplasmatica e nucleare, fondamentali per l'acquisizione della competenza al successivo processo di fecondazione. A livello citoplasmatico si assiste ad un cambiamento nella organizzazione e redistribuzione degli organelli cellulari, mentre a livello nucleare a modificazioni cromatiniche. Il picco dell'ormone luteinizzante (LH), 36 ore prima del processo ovulatorio, determina una retrazione dei prolungamenti delle cellule della granulosa dall'ovocita, con conseguente chiusura delle GAP junction che blocca così il passaggio dell' Adenosina monofosfato (AMP) ciclico. In seguito a tale blocco, l'AMP ciclico non determina più l'inibizione del fattore "cell division cycle 25" (cdc25), il quale è così in grado di attivare il fattore promotore la meiosi (MPF) che determina, appunto, lo sblocco della meiosi. L'ovocita dopo l'ovulazione si trova allo stadio di metafase della seconda divisione meiotica (MII) ed ha già estruso il primo globulo polare. La meiosi verrà portata a compimento solo se avrà luogo la fecondazione.

2.1.2 Capacitazione spermatica

Al fine di acquisire le competenze giuste per essere in grado di interagire e fecondare la cellula uovo, lo spermatozoo subisce una serie di modifiche nel tratto riproduttivo femminile, processo chiamato capacitazione. Tale fenomeno è scatenato da ioni bicarbonato (HCO_3^-) nella vagina, che entrando nello spermatozoo attivano direttamente un'adenilato ciclasi citosolica capace di produrre AMP ciclico responsabile della maggior parte dei cambiamenti associati alla capacitazione. Si assiste ad una modificazione della composizione lipidica e glicoproteica della membrana dello spermatozoo, fondamentale per il successivo riconoscimento con la cellula uovo e la reazione acrosomiale. Inoltre durante la capacitazione si assiste ad un aumento del metabolismo e della motilità spermatica e ad una iperpolarizzazione del plasmalemma.

2.1.3 Interazione ovocita-spermatozoo: Fecondazione

Una volta che uno spermatozoo capacitato ha penetrato lo strato di cellule follicolari costituenti il complesso cumulo-corona, comincia ad interagire con la zona pellucida

ovocitaria caratterizzata da tre glicoproteine ZP1, ZP2, ZP3, di cui le ultime due hanno funzione recettoriale per specifiche molecole di superficie dello spermatozoo, mentre ZP1 presenta una funzione strutturale intrinseca. Sono avvantaggiati quegli spermatozoi che hanno attraversato il complesso cumulo-corona senza liberare gli enzimi acrosomali, e sono quindi in grado di liberarli al contatto con i recettori ZP3 sulla superficie della zona, andando incontro a una serie di eventi, che prendono il nome di “reazione acrosomiale”.

Tali componenti ovocitarie si legherebbero ad un recettore di membrana spermatico che innesca segnali intracellulari in grado di determinare un aumento della concentrazione di Ca^{2+} nello spermatozoo, la quale determina la fusione della membrana acrosomiale esterna con la membrana plasmatica ed il conseguente rilascio degli enzimi litici acrosomiali.

Lo spermatozoo mediante l'azione di enzimi proteolitici come le lisine e la ialuronidasi, rilasciate dall'acrosoma, apre un varco nella zona pellucida. Solo gli spermatozoi che hanno subito la reazione acrosomiale espongono i recettori per la glicoproteina zonale ZP2 presenti sulla membrana acrosomiale interna a livello del segmento equatoriale o post-equatoriale. A questo punto, le membrane plasmatiche degli spermatozoi si fondono con la membrana plasmatica dei microvilli ovocitari. Quando lo spermatozoo inizia la fusione con l'oolemma, il potenziale di riposo dell'uovo subisce una depolarizzazione (*blocco elettrostatico della polispermia*), causata sia dall'apertura dei canali ionici, che permettono al sodio di entrare nell'ooplasma ed al potassio di uscirne, sia da un rilascio massivo di ioni Ca^{2+} dal reticolo endoplasmatico liscio ed altri organuli cellulari. L'ipotesi più accreditata sembra essere quella che definisce tale rilascio determinato dall'attivazione della fosfolipasi C, la quale idrolizza il fosfolipide di membrana fosfatidilinositolo 4,5-bisfosfato (PIP2) in inositol-1,4,5-trisfosfato (IP3) e diacilglicerolo (DAG).

L'IP₃ lega, infatti, i recettori presenti sulle membrane del reticolo endoplasmatico, determinando il rilascio di ioni Ca^{2+} partendo dal punto d'ingresso dello spermatozoo. Il DAG a sua volta attiverà l'AMP ciclico dando vita a secondi messaggeri che determinano un'amplificazione nel rilascio di ioni Ca^{2+} che propagano lungo tutta la superficie dell'uovo.

Nei 20 secondi successivi, tali onde di Ca^{2+} determinano la reazione corticale, ossia la fusione dei granuli corticali situati nel cortex ovulare con la membrana ovulare, dal punto in cui penetra lo spermatozoo fino a tutta la superficie dell'uovo.

Il contenuto dei granuli corticali caratterizzato dalla proteina ialina, mucopolisaccaridi acidi, proteasi e perossidasi, diffonde nello spazio perivitellino ossia tra la membrana plasmatica e la zona pellucida, dando luogo al cosiddetto blocco della polispermia.

Le proteasi, infatti, modificano la glicoproteina zonale ZP3 non più riconoscibile così dai recettori spermatici; le perossidasi induriscono la zona pellucida formando legami tra le tirosine di proteine adiacenti, in tal modo tali strutture fungono da barriera non solo per ulteriori spermatozoi, ma anche per patogeni e protegge l'embrione da stress meccanici.

Lo spermatozoo non entra interamente nel citoplasma ovulare, penetra di esso solo un centriolo e il nucleo, i mitocondri paterni non entrano o vengono eliminati appena entrati nel citoplasma dell'uovo, pertanto vengono tramandati alle generazioni successive solo quelli materni. Il processo di fecondazione, determina la cosiddetta "attivazione ovocitaria", ossia una serie di processi necessari per innescare la ripresa metabolica dell'ovocita, preparandolo così al processo di segmentazione. Dopo pochi minuti dalla fusione con lo spermatozoo, l'ovocita aumenta la respirazione e accelera il metabolismo in seguito a oscillazioni di ioni calcio e a un'entrata di ioni Na^+ compensata dalla fuoriuscita di ioni H^+ , che determina un aumento del pH intracellulare, necessario ad attivare enzimi finora inattivi. Questo cambiamento nell'attività enzimatica porta a una ripresa complessiva dell'attività metabolica, compresa la traduzione degli mRNA materni, immagazzinati nell'uovo durante la prima profase meiotica, necessari per il sostentamento dello sviluppo embrionale. Inoltre elevate quantità di membrana vengono prodotte per sostenere l'aumento delle membrane plasmatiche necessarie per avviare alla richiesta della futura proliferazione cellulare.

2.1.4 Sviluppo embrionale

In seguito al processo di fecondazione si ha la formazione dello zigote, considerato come la prima cellula diploide del nuovo organismo. Nei mammiferi, in particolare, dopo che i pronuclei aploidi hanno terminato la duplicazione del DNA, si ha la rottura dell'involucro nucleare e la disposizione dei cromosomi nell'area della futura piastra equatoriale, solo a questo punto lo zigote è pronto per dividersi.

La segmentazione rappresenta il primo processo di sviluppo a cui va incontro l'uovo fecondato. Tale processo si realizza attraverso una serie di rapide divisioni mitotiche, all'inizio sincrone, che danno luogo a cellule definite blastomeri.

Negli organismi animali le cellule uovo, date le notevoli dimensioni, hanno un basso rapporto tra il volume del nucleo e il volume del citoplasma, rispetto alle cellule somatiche. Il processo di segmentazione porta a un aumento di tale rapporto, infatti, tra due divisioni successive (fasi G e G₂) viene abolita la fase di accrescimento. Pertanto i blastomeri si dividono rapidamente, ma il mancato accrescimento, fa sì che la massa citoplasmatica dell'uovo non aumenti ma sia ripartita in cellule che diventano sempre più piccole e il cui rapporto nucleo-citoplasmatico si avvicini progressivamente a quello delle cellule somatiche dell'adulto. Nei vari organismi animali sono presenti diversi tipi di segmentazione, che differiscono sia per le dimensioni che per la collocazione dei blastomeri che si formano nel corso del processo. La modalità di segmentazione è influenzata notevolmente dalla quantità e distribuzione del vitello nella cellula uovo.

Le uova isolecitiche e mesolecitiche, caratterizzate da una scarsa quantità di vitello, presentano una segmentazione detta oloblastica, in quanto l'intero uovo si divide durante la citodieresi. La segmentazione oloblastica si distingue in radiale, bilaterale, spirale, rotazionale, in base all'orientamento dei piani di segmentazione, che danno luogo a una caratteristica disposizione dei blastomeri.

La segmentazione nei mammiferi presenta caratteristiche differenti e tipiche rispetto a quella degli altri animali.

Nei mammiferi euteri, infatti, pur maturando uova isolecitiche, la cellularizzazione dello zigote procede molto più lentamente rispetto al modello generale delle altre uova isolecitiche; il ciclo cellulare, infatti, impiega non meno di 12 ore.

Le divisioni mitotiche procedono, inoltre, in maniera asincrona in quanto i primi due blastomeri non si dividono contemporaneamente, infatti l'embrione già all'inizio della segmentazione può presentare un numero dispari di cellule.

Tale tipo di segmentazione oloblastica, inoltre, è definita rotazionale in quanto il primo piano di segmentazione è meridiano e passa lungo l'asse animale-vegetativo, come negli altri animali, nella seconda divisione, invece, uno dei due blastomeri si divide secondo un piano meridiano, l'altro, invece secondo un piano equatoriale, portando a una disposizione a croce dei solchi di segmentazione. Tale orientamento a

croce non è una caratteristica costante nell'ambito di una stessa specie né appare determinante, per il successivo sviluppo.

Il genoma dei mammiferi, inoltre, a differenza di quello di altri animali, viene attivato e svolge un ruolo essenziale già nelle prime fasi della segmentazione. Il processo che caratterizza la segmentazione dei mammiferi euteri, rispetto agli altri animali, è quello della compattazione. Sino allo stadio di otto cellule, i blastomeri sono lassamente uniti tra di loro, dopo tale stadio vanno incontro al processo di compattazione, ossia una serie di eventi, quali l'espressione di proteine di adesione cellulare come la E-caderina, che uniscono strettamente i blastomeri tra loro a formare una sfera solida di cellule, tanto che i limiti cellulari sono difficilmente riconoscibili. Ciascuno degli otto blastomeri va incontro a un processo di polarizzazione, come si osserva in corrispondenza delle cellule esterne sigillate da giunzioni strette, che consentono la formazione di un ambiente embrionale interno ben distinto. I blastomeri interni, infatti, sono in comunicazione tra loro grazie alla presenza di giunzioni serrate, pertanto perdono la loro caratteristica di cellule staminali totipotenti, divenendo pluripotenti, ossia in grado di dar luogo a tutti i tipi di cellule ma non ad un intero embrione.

Dopo la compattazione i blastomeri continuano a dividersi fino a raggiungere uno stadio definito di morula, che nell'uomo è raggiunto dopo 3-4 giorni dalla fecondazione, quando l'embrione transita dall'ovidotto all'utero. La morula, in genere, caratterizzata da 16 cellule è formata da 9 a 14 blastomeri esterni polarizzati, che delimitano da 2 a 7 blastomeri interni non polarizzati. Con il procedere della segmentazione le cellule esterne possono dividersi originando due cellule identiche che costituiranno il trofoblasto; oppure due cellule diverse, una esterna ed una invece interna che andrà a formare le cellule staminali della massa cellulare interna (ICM).

A questo stadio inizia il processo di cavitazione, ossia i blastomeri esterni cominciano ad endocitare fluido dalla cavità uterina e a riversarlo, arricchito di ulteriori componenti, in cavità formatesi tra i blastomeri più interni.

Nel corso dello sviluppo le varie cavità si fondono a formare una cavità più grande detta blastocele, posizionata al di sotto della massa cellulare interna. A tale stadio di 32-64 blastomeri l'embrione ha raggiunto lo stadio di blastocisti, il cui gruppo cellulare interno è anche definito nodo o bottone embrionale (Fig. 15). Il trofoblasto, all'interno dell'utero, formerà gli annessi extraembrionali e la porzione embrionale della placenta (corion), che consente all'embrione di ricevere ossigeno e nutrimento

da parte della madre. Il corion inoltre secerne ormoni, quali gonadotropina corionica (HCG), progesterone, estrogeni, che consentono il trattenimento del feto all'interno dell'utero, e sostanze regolatrici della risposta immunitaria che evitano il rigetto del feto.

Dall'ICM, invece, si organizzano le varie parti costituenti l'embrione e gli annessi embrionali, quali il sacco vitellino, l'allantoide e l'amnios.

Allo stadio di 64 blastomeri le cellule dell'ICM e quelle del trofoblasto formano strati cellulari indipendenti, pertanto, tale stadio della segmentazione, rappresenta il primo evento di differenziamento nello sviluppo dei mammiferi placentati.

Il trofoblasto e l'ICM esprimono geni diversi, infatti, solamente le cellule della ICM continuano a esprimere due fattori di trascrizione (Oct4 e Foxd3) associati alla pluripotenza. Le cellule della ICM, grazie alla loro capacità, in determinate condizioni, di rimanere indifferenziate moltiplicandosi in modo indefinito, possono essere coltivate in vitro ed essere manipolate geneticamente, ossia indotte a differenziarsi in coltura in specifici tipi cellulari, inclusi quelli della linea germinale. Durante la discesa fino all'utero, il blastocite aumenta di dimensioni, la ICM si posiziona al polo Animale. La zona pellucida, a questo stadio ha la funzione di proteggere l'embrione da eventuali patogeni, da insulti meccanici e di prevenire un impianto a livello delle tube.

La blastocisti giunta ormai nell'utero, inizia il processo di "hatching", ossia comincia a pulsare e a fuoriuscire da un foro nella zona pellucida creato dalla stripsina, una proteasi prodotta da un gruppo di cellule trofoblastiche localizzate in un'area opposta alla ICM in modo da ridurre il rischio di danni all'embrione. Avvenuta la schiusa, la blastocisti inizia il processo di impianto nell'utero, circa una settimana dopo la fecondazione.

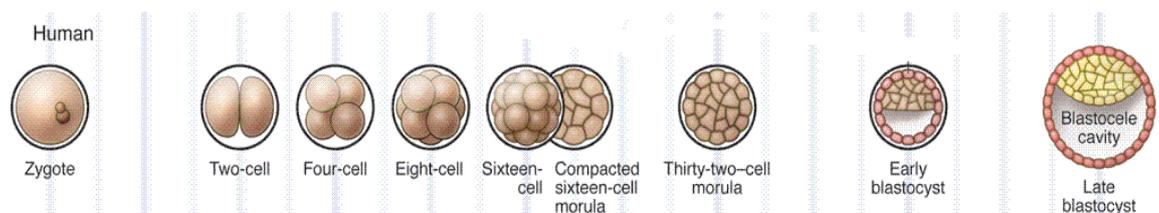


Fig. 15: Sviluppo embrionale

3. Sviluppo Embrionale in vitro: sensibile saggio di tossicità

Risulta necessario identificare le caratteristiche chimico-fisiche delle NPs necessarie per un loro sicuro impiego in ambito biomedico. Inoltre indispensabile è sviluppare un sensibile e appropriato saggio di nanotossicità per questi nuovi nanomateriali, che possa risultare predittivo, prima di un loro utilizzo in biomedicina (SCENIHR 2007, 2009; EPA 2007; FDA 2006, 2008).

La maggior parte degli studi riguardanti la nanotossicità è stata effettuata su linee cellulari somatiche, rari sono gli studi su sistemi biologici più sensibili come la coltura di cellule germinali e lo sviluppo embrionale. Negli ultimi anni numerosi studi hanno evidenziato l'estrema suscettibilità dello sviluppo embrionale pre-impianto a diversi fattori ambientali, sia in vivo (es. l'alimentazione materna) che in vitro (es. la coltura embrionale) (Fleming et al., 2004; Sinclair and Singh, 2007; Thompson et al., 2007; Watkins et al., 2008a).

Finora durante lo sviluppo pre-impianto, in particolare durante la segmentazione zigotica (approssimativamente 4 giorni nel topo e 6 giorni nell'uomo), l'embrione sembrava avere un ruolo rilevante sull'attivazione del genoma embrionale, sul progredire del ciclo cellulare, sul differenziamento e la morfogenesi della blastocisti (Eckert and Fleming, 2008). Tuttavia recenti lavori hanno mostrato che il programma intrinseco sembra rispondere a fattori estrinseci all'ambiente materno regolando lo sviluppo embrionale mediante meccanismi cellulari, fisiologici ed epigenetici.

Queste risposte all'ambiente potrebbero influenzare sia lo sviluppo embrionale precoce sia quello tardivo e addirittura postnatale. Per esempio, una dieta povera può promuovere un aumento della capacità endocitotica delle linee extra-embionali del sacco vitellino al fine di incrementare il recupero di nutrienti nella gravidanza avanzata (Watkins et al., 2008b). Recenti studi in vitro hanno evidenziato la suscettibilità dei mitocondri oocitari ed embrionali a stress ambientali, il cui basso potenziale, potrebbe persistere nella vita embrionale (McConnell et al., 2004; Thouas et al., 2006). Inoltre studi in bovini e ovini riportano che la capacità di sviluppo a breve o lungo termine dei tessuti embrionali, era compromessa dalla coltura in vitro in presenza di siero, dall'introduzione di embrioni pre-impianto in un ambiente uterino alterato o dalla produzione di embrioni clonati mediante il trasferimento nucleare (Holm et al., 1996; Sinclair et al., 1999,2000; Wells et al., 1999). In particolare è stata osservata un'incrementata crescita fetale e post-natale, un alterato

dimensionamento degli organi, cambiamenti nei patterns di espressione genica e aumentati tassi di morte perinatale. (Holm et al., 1996; Sinclair et al., 1999; Niemann and Wrenzycki, 2000; Farin et al., 2006; Smith et al., 2009). Pertanto lo sviluppo embrionale nel bovino in vitro potrebbe rappresentare un sensibile e predittivo saggio di tossicità delle nanoparticelle prima di un loro impiego in applicazione biomediche.

-CAPITOLO 6-
EFFETTO DELLA TAGLIA SULL'”UPTAKE” DI
NANOPARTICELLE IN CELLULE EPITELIALI OVIDUTTALI
BOVINE

INTRODUZIONE

Un crescente interesse dell'ingegneria dei materiali è incentrato su nanoparticelle polimeriche biodegradabili e non da impiegare in applicazioni biomediche, in particolar modo sulla loro capacità di penetrare i tessuti.

Cambiamenti delle loro proprietà strutturali e funzionali come taglia, composizione chimica, carica di superficie, forma e morfologia, possono significativamente influenzare la loro interazione con le cellule, la vitalità cellulare e la biocompatibilità con i fluidi corporei (Champion et al., 2006; Yoo et al., 2010; Decuzzi et al., 2010; Makino et al., 2003; Foged et al., 2005; Heslinga et al., 2009; Gratton et al., 2008; Miller et al., 1998; Cortez et al., 2007; Alexis et al., 2008; Hu et al., 2009).

Il range nanometrico della taglia di tali sistemi di trasporto offre certamente numerosi vantaggi per il rilascio di farmaci. In base alla loro taglia sub-cellulare e sub-micrometrica, le nanoparticelle possono penetrare profondamente nei tessuti attraverso i fini capillari, attraversare la fenestrazione presente nel rivestimento epiteliale ed essere catturate efficientemente dalle cellule (Vinogradov et al., 2002).

Per un sistema di rilascio adeguato, i punti chiave, al fine di una loro efficiente applicazione, sono rappresentati dall'efficienza di ingresso delle nanoparticelle nei tessuti bersaglio e dalle conoscenze dei meccanismi di internalizzazione e del traffico intracellulare. Tuttavia tali meccanismi hanno cominciato a essere studiati solo di recente (Harush-Frenkelet al., 2007; Panyam et al., 2002; Rejman et al., 2004).

Studi sull'internalizzazione hanno focalizzato l'attenzione sulle interazioni che le nanoparticelle hanno con le membrane biologiche. Queste coinvolgono un set di legami fisici e energetici come interazioni idrodinamiche, elettrodinamiche, elettrostatiche, solventi, sterici (Mailander and Landfester, 2009; Nel et al., 2009).

Queste interazioni, determinando modificazioni delle proprietà fisiche delle nanoparticelle, come la taglia, la forma e le caratteristiche di superficie, controllano il loro ingresso nelle cellule. Pertanto la modulazione di tali proprietà diventa essenziale per una loro applicazione terapeutica (Petros and DeSimone, 2010). Finora sono stati mostrati dati controversi sull'internalizzazione delle NPs nelle cellule, queste discrepanze riscontrate possono essere ricondotte alle differenti NPs utilizzate, alle diverse condizioni sperimentali e sistemi biologici in vitro e in vivo.

La pelle e le superfici mucose degli organi, dei tratti respiratori, riproduttivi etc., a causa della loro particolare struttura di barriera, sono molto spesso l'ostacolo chiave alla somministrazione di farmaci (Saltzman, 2001).

In medicina le NPs offrono possibilità uniche sia nel superamento delle barriere cellulari, sia nell'indirizzamento specifico dei farmaci. Inoltre potrebbero evitare la rimozione del farmaco dal citoplasma delle cellule attraverso la "multidrug resistance-related proteins" (Gottesman et al., 1993).

Finora la maggior parte degli studi sull'"uptake" delle NPs è stata effettuata su linee cellulari immortalizzate, mentre rari erano gli studi condotti su colture cellulari primarie.

Alla luce di questi dati, per superare i problemi dovuti all'utilizzo di differenti NPs e dei diversi sistemi biologici, in questo studio è stata studiata l'influenza della taglia sull'"uptake" di NPs di polistirene da 44 e 100nm incubate con un unico tipo di coltura cellulare primaria.

A tal fine è stata analizzata la cinetica di ingresso/rilascio delle NPs, le vie di internalizzazione impiegate e la loro localizzazione intracellulare in colture primarie di cellule epiteliali oviduttali bovine (BOEC). Tali cellule costituiscono il rivestimento epiteliale dei tratti oviduttali, coinvolto nell'emissione di prodotti secretori essenziali per creare un microambiente favorevole per la maturazione ovocitaria, la capacitazione spermatica, la fecondazione e il trasporto di gameti ed embrioni (Ellington, 1991; Hunter, 2003).

In particolare in tali studi sono state impiegate NPs di polistirene (NPs-PS) comunemente impiegate come particelle "modello" di riferimento per lo studio dell'"uptake" cellulare (Panyam et al., 2002; Rejman et al., 2004) in vitro (Geiser et al., 2005; Papageorgiou et al., 2007) e in vivo (Brown et al., 2001; Demoy et al., 1997; Fernandez-Urrusuno et al., 1995; Gibaud et al., 1996; Kanai et al., 1996; Nemmar et al., 2002; Yacobi et al., 2008). Esse, infatti, in quanto nanoparticelle "pioniere" mostrano fondamentali caratteristiche, quali proprietà non-immunogeniche, possibilità di modificare facilmente la taglia e superficie in un ampio range (Zauner et al., 2001; Win et al., 2005; Menei et al., 1994).

MATERIALI E METODI

1. Nanoparticelle di polistirene

Nei seguenti studi sono state utilizzate nanoparticelle di polistirene (NPs-PS) non modificate fluorescenti nel verde (468/508nm) con diametro di 44nm e NPs-PS non modificate fluorescenti nel rosso (542/612nm) con diametro di 100nm (Duke

Scientific Corporation). Il polistirene ha una densità di 1.05g/cm^3 e un indice di rifrazione di $1.59@589\text{nm}$ (25°C). Le sospensioni acquose contengono l' 1% di NPs e tracce di surfattante (miscela di sostanze, in genere organiche, capaci di incrementare la bagnabilità delle superfici o la miscibilità tra liquidi diversi). Le NPs fluorescenti sono particelle polimeriche che utilizzano il processo Firefli per incorporare e legare fortemente i fluorofori alla matrice polimerica. Questo metodo produce intensi colori fluorescenti, minimizza la fotodecolorazione e previene la lisciviazione del colorante in mezzi acquosi.

1.1 Misure di determinazione del potenziale zeta e della taglia di nanoparticelle di polistirene da 44nm

Il potenziale zeta, la taglia e la distribuzione della taglia delle NPs-PS sono state determinate mediante la tecnica del “dynamic scattering light” (DSL). Per le analisi una sospensione di 0.1 mg mL^{-1} di NPs in acqua distillata (12 corse per ogni campione) è stata sottoposta all'analisi mediante uno ZetaSizer Nano ZS, Malvern Instruments, Malvern, UK.

2. Prelievo delle cellule epiteliali oviduttali bovine (BOEC) e allestimento della coltura primaria

Gli ovidutti sono stati prelevati, durante la eviscerazione, da bovini Charolais sani non gravidi dai 16 ai 18 mesi, e trasportati in laboratorio in soluzione fisiologica a 4°C entro due ore dal prelievo. In laboratorio, gli ovidutti sono stati ripuliti dal tessuto connettivo e sottoposti a un rapido passaggio in alcool etilico 80% e a 3 lavaggi sequenziali in soluzione fisiologica. Infine, coppie di tube di ciascun animale, sono state immerse nel mezzo 199 (4530 SIGMA) supplementato con gentamicina $50\mu\text{g/mL}$, Fungizone $1\mu\text{g/mL}$ e hepes 20mM (tutti SIGMA) in cui è stato effettuato l'isolamento meccanico delle cellule epiteliali oviduttali bovine (BOEC). La sospensione cellulare ottenuta è stata lavata per sedimentazione in mezzo 199, supplementato con gentamicina $50\mu\text{g/mL}$ e fungizone $1\mu\text{g/mL}$ (mezzo di lavaggio). Eliminato il supernatante, al pellet è stato aggiunto mezzo di coltura (mezzo 199 supplementato con gentamicina $50\mu\text{g/mL}$, fungizone $1\mu\text{g/mL}$, Fetal calf serum (FCS) 10%), secondo un rapporto pellet/volume mezzo di 1:100.

Le cellule sono state inoculate in piastre Petri con biofilm da 10cm (FALCON) per 24-48h a 38,8°C, 5%CO₂. Dopo espianto esse presentano la caratteristica di compattarsi saldamente formando tipiche strutture follicolari natanti cavitate, che solo dopo 48 ore di coltura tendono a piastrare e dopo circa 7-10 giorni a formare un monostrato compatto (Fig. 16). Dopo le 24-48 ore sono stati allestiti vetrini tondi lenticolari da 12mm (Erba) conservati in alcool 80%. I vetrini sono stati sottoposti a 3 lavaggi in Acqua bidistillata, 1 in mezzo di lavaggio e poi incubati in mezzo di coltura supplementato Gelatina 10% (Sigma) per 10' a 38,8°C. Successivamente sono stati lavati in mezzo di lavaggio, posti in pozzetti Nunc e inoculati secondo un rapporto cellule (BOEC)/volume mezzo di coltura di 1:100 a 38,8°C, 5%CO₂. I cambi del mezzo di coltura sono stati effettuati ogni 48ore fino al raggiungimento della confluenza, stato in cui i monostrati sono stati impiegati per gli esperimenti sottodetti.

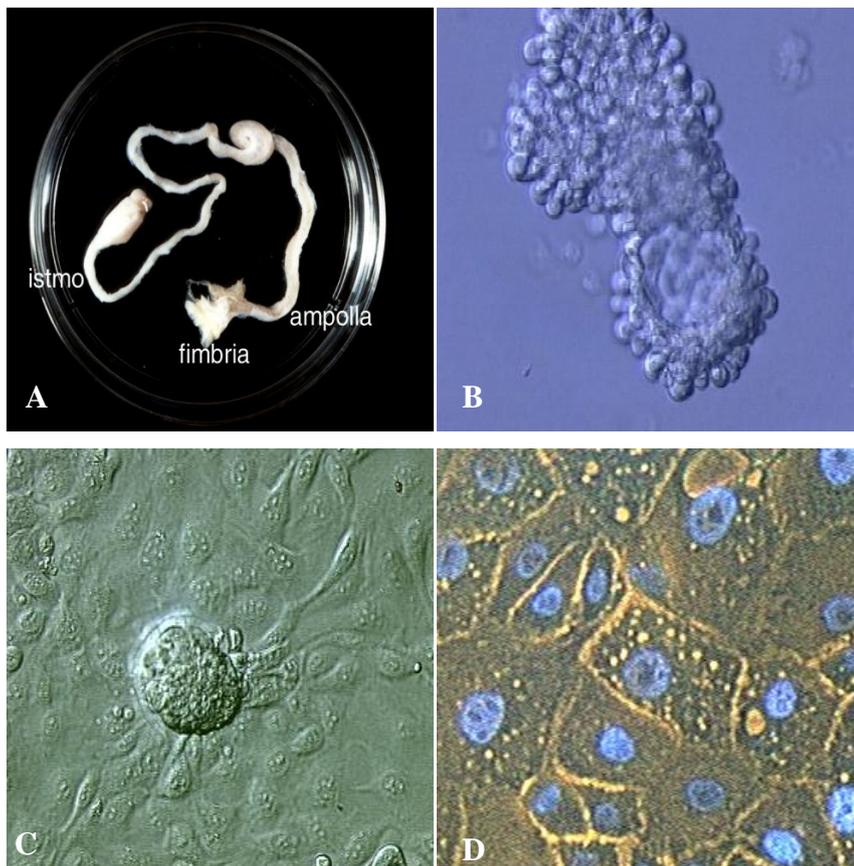


Fig. 16: A) Tuba uterina bovina dopo dissezione. B) Boec organizzate in follicoli natanti cavitati dopo circa 48ore di coltura. C) Piastratura dei follicoli natanti. D) mono-strato oviduttale dopo 7-10 giorni di coltura con nuclei colorati con l'Hoechst 33342.

3. Cinetica di internalizzazione di Nanoparticelle di polistirene da 44 e 100nm in BOEC

3.1 Analisi d'immagine

Studi sull'internalizzazione di NPs-PS da 44 e 100nm sono stati effettuati su monostrati confluenti di BOEC. Essi sono stati incubati in mezzo di coltura in presenza di suddette NPs-PS alla concentrazione di 10µg/mL a 38,8°C, 5% CO₂. A tempi stabiliti di incubazione (1', 10', 20', 30', 60') le cellule sono state lavate in mezzo di coltura fresco e fissate in paraformaldeide al 4% per 1h a temperatura ambiente (RT). Dopo fissazione esse sono state sottoposte a marcatura dei nuclei con Hoechst 33342 10µg/mL per 10min a RT ed infine allestite per l'osservazione al microscopio confocale (TS SP 5, Leica), equipaggiato con un laser argon a una lunghezza d'onda di 488nm e un laser He-Ne a una lunghezza d'onda di 543nm. Per le osservazioni è stato utilizzato un obiettivo a immersione 63x (apertura numerica 1.4) e la risoluzione d'immagine è stata fissata a 1024x1024 pixels quadrati, velocità 100Hz. La fluorescenza emessa è stata rilevata mediante filtri LP 505, BP 560–600 per la fluorescenza rossa e HFT 488/543 per la fluorescenza verde. Le analisi quantitative dell'intensità di fluorescenza dei vari campioni è stata valutata mediante l'ausilio del software LAS AF LITE (Leica Microsystems CMS Gmbh). Tale programma consente di circoscrivere un'area predefinita (ROI) e di valutarne differenti parametri (l'area, il valore medio, il numero di pixel, la somma dei pixel, la variazione, la deviazione standard, la deviazione media, il picco e la valle massimi, il volume, l'area della superficie) consentendo di analizzare il valore medio della scala dei grigi (Fig. 17).

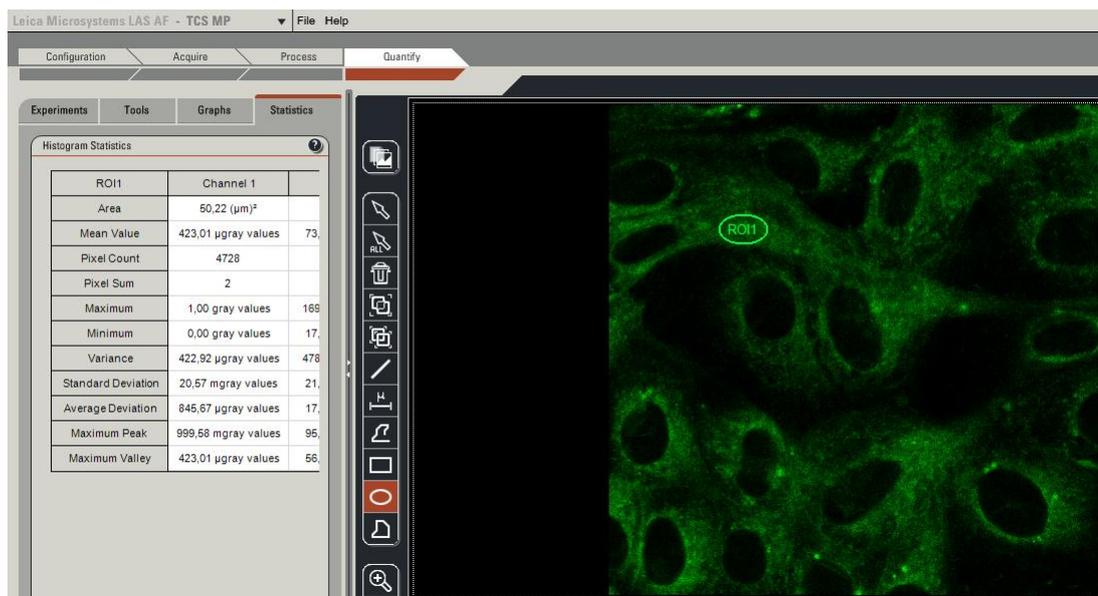


Fig. 17: Analisi quantitative dell'intensità di fluorescenza mediante l'ausilio del software LAS AF LITE (Leica Microsystems CMS Gmbh).

3.2 *Analisi spettrofluorimetrica*

Monostrati di BOEC, come sopra, sono stati incubati in mezzo di coltura in presenza di NPs-PS da 44-100nm alla concentrazione di 10µg/mL a 38,8°C, 5% CO₂.

A tempi stabiliti di incubazione (1', 10', 20', 30', 60'), dopo lavaggio in PBS 1X, le cellule sono stati lisate con Buffer di lisi (Tris-HCl 10mM, EDTA 5mM, NaCl 200mM, SDS 0.2%, Proteinasi K 100 µg/mL) in PBS 1X in rapporto volume/volume 1:3.

Il lisato cellulare, in volumi stabiliti di 100µl, è stato caricato in piastre da 96 well e sottoposto all'analisi dello spettro di emissione del contenuto cellulare mediante spettrofluorimetro (Wallac 4210, Perkin Elmer). L'analisi dell'intensità di fluorescenza del lisato cellulare consente una valutazione quantitativa della concentrazione di NPs internalizzate nel tempo.

3.2.1 *Acquisizione dei dati allo spettrofluorimetro*

Al fine di analizzare i dati spettrofluorimetrici sono state calcolate le rette di calibrazione mediante l'utilizzo di concentrazioni note di NPs-PS da 44nm. Per la lettura dell'intensità di fluorescenza dei campioni è stato impiegato il protocollo

standardizzato “fluorescein” presente nel software dello strumento (Wallac 4210, Perkin Elmer) (Fig. 18).

Protocol name Fluorescein
Protocol number N/A
Name of the plate type Generic
8x12 size plate
Number of repeats 1
Delay between repeats 0 s
Measurement height 8.20 mm
Protocol notes

Name of the label 488
Label technology Prompt
fluorometry
CW-lamp filter name F485
CW-lamp filter slot A5
Emission filter name F535
Emission filter slot A5
Measurement time 0.3 s
Emission aperture Small
CW-lamp energy 12385
Second measurement CW-lamp energy . 0
Emission side Above
CW-Lamp Control Stabilized
Energy
Excitation Aperture N/A

Fig. 18: Protocollo utilizzato per le letture spettrofluorimetriche.

Per determinare il numero di nanoparticelle totali contenuto all'interno delle concentrazioni note, è stato moltiplicato il numero di NPs/mL per il volume considerato nella realizzazione delle rette di calibrazione (100 µl).

La retta di calibrazione è stata ottenuta interpolando il punto dell'asse delle ascisse, rappresentante i valori della intensità di fluorescenza (IF), con quello delle ordinate,

in cui veniva inserito il numero di nanoparticelle contenuto nei vari campioni analizzati (Fig. 19). Utilizzando un foglio di calcolo excel sono state ricavate le equazioni della retta di calibrazione:

$$y = 8 \text{ E } -0,5 \cdot x - 0,1226$$

In cui:

- La y rappresenta il numero di nanoparticelle contenuto nel singolo volume analizzato.
- La x indica l'IF misurata dallo spettrofluorimetro per il singolo campione.

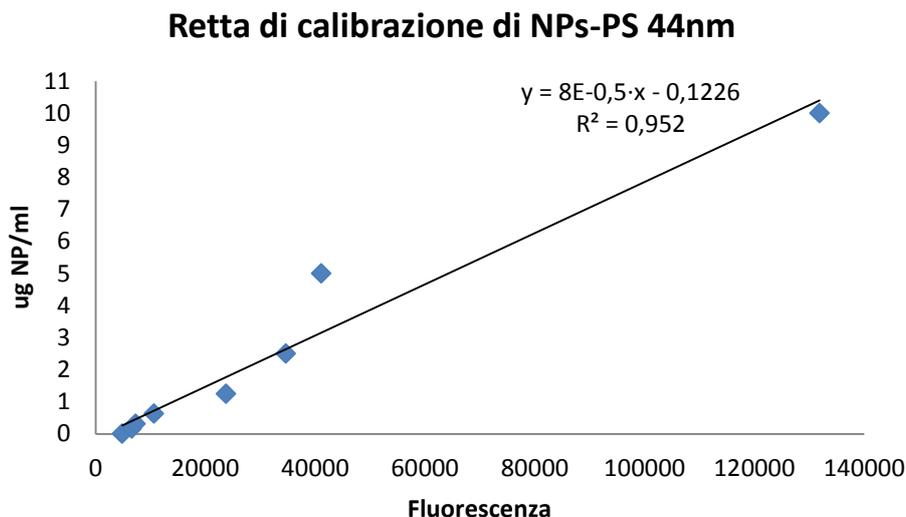


Fig. 19: Retta di calibrazione delle NPs-PS da 44nm

Successivamente sono state effettuate analisi quantitative delle NPs-PS da 44nm presenti nei campioni allestiti, come precedentemente descritto, per la rivelazione della loro cinetica di internalizzazione in BOEC. Come vedremo in seguito, tali valutazioni spettrofluorimetriche sono state effettuate anche per l'analisi della cinetica di rilascio e per lo studio dei meccanismi di "uptake" impiegati da tali nanoparticelle in BOEC.

E' stato, pertanto, analizzato lo spettro della luce emessa per fluorescenza dai vari campioni. L'intensità di fluorescenza dipende, infatti, dalla quantità di nanoparticelle fluorescenti contenute nei campioni analizzati.

Grazie alla valutazione della retta di calibrazione e delle letture allo spettrofluorimetro è stato calcolato il numero di nanoparticelle contenuto nelle concentrazioni di nanoparticelle analizzate. Per determinare il numero di nanoparticelle contenuto nella singola cellula, i valori relativi al numero di

nanoparticelle sono stati divisi per il numero totale di cellule piastrate, il quale era noto e pari a $0,45 \cdot 10^6$.

4. Studio dei meccanismi di internalizzazione di nanoparticelle di polistirene da 44nm in BOEC

Monostrati confluenti di BOEC sono stati allestiti, come suddetto, al fine di indagare sui meccanismi impiegati dalle NPs-PS 44nm per internalizzare in tali cellule.

Al fine di escludere dalle analisi cellule non vitali, le concentrazioni degli inibitori sono state scelte in maniera tale da mantenere inalterata la vitalità cellulare, valutata col Trypan blu 0,5% test. Gli esperimenti sono stati effettuati per un massimo di 1 ora poiché bloccando una via di internalizzazione, potrebbero attivarsi vie d'endocitosi alternative (Helinor et al., 2010; Lamprecht et al., 2002; Dausend et al., 2008).

Al fine di indagare specificamente sul ruolo della macropinocitosi, dell'endocitosi dinamica dipendente e mediata da clatrina, monostrati confluenti di BOEC sono stati pre-incubati con 5-N-Ethyl-N-IsoPropyl Amiloride (Eipa) 100 μ M, Dynasore monohydrate 80 μ M e saccarosio 0,9mM (tutti Sigma) rispettivamente, per 30min in mezzo di coltura a 38,5C°, 5% CO₂, 95% umidità.

Dopo tali pre-trattamenti, le cellule sono state co-incubate con le NPs-PS 44nm 10 μ g/mL per 30min, ossia il più breve tempo entro il quale le nanoparticelle hanno raggiunto la condizione di plateau nei campioni controllo in assenza di inibitori. (Dausend, 2008).

Al fine di indagare il coinvolgimento di processi energia dipendenti nell'internalizzazione di NPs-PS 44nm, i monostrati di BOEC sono stati o sottoposti alla temperatura di 4°C in mezzo di coltura per 10min; o in presenza di sodio azide 0,9mM in DPBS1X per 30min; o di Latrunculina A 3 μ M in mezzo di coltura per 1 ora. In particolare, dopo tali pre-trattamenti a 4°C e in presenza di sodio azide, le cellule sono state co-incubate con le NPs-PS 44nm 10 μ g/mL; mentre dopo pre-trattamento con Latrunculina A le cellule sono state incubate in mezzo fresco contenente le NPs-PS 44nm 10 μ g/mL a 38,5C°, 5% CO₂, 95% umidità.

L'efficienza degli inibitori è stata valutata utilizzando Fitc-destrano 5mg/mL e Fitc-insulina 100 μ g/mL (entrambi Sigma) come controlli positivi.

Tutti i campioni dopo trattamento sono stati lavati tre volte in DPBS1X, al fine di rimuovere le NPs non internalizzate, e allestiti per analisi spettrofluorimetriche (Wallac 4210, Perkin Elmer) e di microscopia confocale (LEICA TCS SP5), come sopra descritto.

4.1 Colorazione dei filamenti actinici con falloidina rodaminata

Al fine di evidenziare la struttura actinica dei campioni incubati con Latrunculina A 3 μ M, i monostrati dopo essere stati trattati, come suddetto, sono stati fissati in Paraformaldeide 4% per 1 ora a RT, lavati in PBS 1X supplementato con glicina 150Mm per 15min e permeabilizzati in PBS 1X supplementato con Polivinilalcol (PVA) 1mg/mL e Triton 100 0,1% a 4 °C per 30min. Successivamente i campioni sono stati incubati con Falloidina-Rodaminata (Invitrogen) 15UI/mL, capace di legare i polimeri actinici, in PBS-PVA per 1h a RT. I campioni sono stati incubati con Hoechst 33342 10 μ g/mL per 10min a RT, sottoposti a lavaggi in PBS-PVA a 4°C e montati su vetrino portaoggetto per l'osservazione al microscopio confocale LEICA TCS SP5.

5. Immunofluorescenza indiretta

Analisi di immunofluorescenza indiretta sono state effettuate per studiare l'influenza delle vie endocitotiche Clatrina/Caveolina-dipendenti sull'internalizzazione delle NPs-PS 44nm. Monostrati di BOEC confluenti sono stati incubati con NPs-PS 44nm 10 μ g/mL per 30min, lavati per tre volte in PBS 1X e fissati in paraformaldeide 4% per 1ora a RT. Le cellule sono state incubate in NH₄Cl per 10min e successivamente in PBS1X supplementato con saponina 0,75% e gelatina 0,2% per 20min a RT. I campioni sono stati incubati con anticorpi primari anti-clatrina monoclonale mouse (ABR) 1:1000 o anti-caveolina 1 rabbit (Abcam) 1:200 in agitazione "over night" a 4°C e successivamente con anticorpi secondari (Chemicon) anti-mouse TRITC o anti-rabbit TRITC diluiti rispettivamente 1:1000 e 1:100 in PBS-BSA 0,5% in agitazione per 1ora a RT. Successivamente i campioni sono stati lavati 3 volte in PBS 1X, sottoposti a colorazione dei nuclei con Hoechst 33342 10 μ g/mL (Sigma) per 7 min a RT e

infine montati su vetrini portaoggetti per l'osservazione al microscopio confocale LEICA TCS SP5.

6. Rilascio di Nanoparticelle di polistirene di 44nm da BOEC

6.1 Analisi d'immagine

Al fine di valutare l'eventuale rilascio di NPs-PS da 44nm, monostrati confluenti di BOEC sono stati incubati in mezzo di coltura in presenza di NPs-PS 44nm 10µg/mL per 30' (condizione di plateau) a 38,8°C, 5% CO₂. Al termine essi sono stati lavati e incubati in mezzo di coltura fresco. A tempi stabiliti i monostrati sono stati lavati, fissati in paraformaldeide 4% per 1h a RT, sottoposti a marcatura con Hoechst 33342 10µg/mL per 10min a RT e infine allestiti per l'osservazione al microscopio confocale (TS SP 5, Leica).

6.2 Analisi spettrofluorimetrica

Al fine di valutare la cinetica di rilascio di NPs-PS da 44nm, monostrati confluenti di BOEC sono stati incubati in mezzo di coltura in presenza di NPs-PS da 44nm 10µg/mL per 30min (condizione di plateau) a 38,8°C, 5%CO₂. Al termine essi sono stati lavati e incubati in mezzo di coltura fresco. A tempi stabiliti i monostrati sono stati lavati in DPBS1X e lisati con Buffer di lisi (Tris-HCl 10mM, EDTA 5mM, NaCl 200mM, SDS 0.2%, Proteinasi K 100 µg/mL) in PBS 1X in rapporto volume/volume 1:3. Il lisato cellulare è stato caricato in piastre da 96 well e sottoposto all'analisi dello spettro di emissione del contenuto cellulare mediante spettrofluorimetro (Wallac 4210, Perkin Elmer). L'analisi dell'intensità di fluorescenza del lisato cellulare consente una valutazione quantitativa della concentrazione di NPs presenti nelle cellule nel tempo, rispetto alla condizione di plateau.

7. Analisi statistica

I dati sono stati analizzati mediante il modello dell'analisi della varianza (ANOVA), seguita dal test delle differenze significative di Tukey per i confronti tra più campioni. I dati in percentuale sono state comparate mediante il test χ^2 o test esatto di Fisher. I

dati statisticamente significativi sono stati definiti come $P < 0.05$, mentre quelli altamente significativi come $P < 0.01$.

RISULTATI

1. *Determinazione del potenziale zeta e della taglia di nanoparticelle di polistirene da 44 e 100nm*

I valori delle analisi al DLS delle NPs-PS da 44 e 100nm sono di seguito riportati (Fig. 20).

	ζ potenziale zeta (mV)	Taglia (nm)	PDI (indice di polidispersità)
NPs-PS 44nm	-25.25 ± 5.26	43.67 ± 1.08	0.09
NPs-PS 100nm	-21.97 ± 2.11	116.70 ± 5.35	0.2

Fig. 20: Valori del potenziale zeta, della taglia e dell'indice di polidispersità di nanoparticelle di polistirene da 44 e 100nm ottenuti mediante analisi DLS

2. *Cinetica di internalizzazione di Nanoparticelle di polistirene da 44 e 100nm in BOEC*

2.1 *Analisi d'immagine*

L'intensità di fluorescenza delle immagini al microscopio confocale dei monostrati trattati con NPs-Ps 44nm, valutata mediante il software LAS AF LITE (Leica Microsystems CMS GmbH), indica un rapido incremento dell'internalizzazione delle NPs all'aumentare del tempo di incubazione (1min Fig. 21 A), (10 min Fig. 21 B), (20 min Fig. 21 C), (30 min Fig. 21 D) e il raggiungimento di una condizione di plateau dopo 20min. Nei primi 20min di incubazione in presenza di NPs-PS è stato osservato un aumento dell'intensità di fluorescenza di circa il 75%. È stato osservato un segnale fluorescente diffuso esclusivamente citoplasmatico, solo raramente sottoforma di "cluster" localizzati intorno alla regione perinucleare.

Al contrario in esperimenti in cui sono state utilizzate NPs-PS da 100nm non è stata osservata internalizzazione anche nel caso di incubazioni prolungate protratte fino a 7ore (Fig. 22).

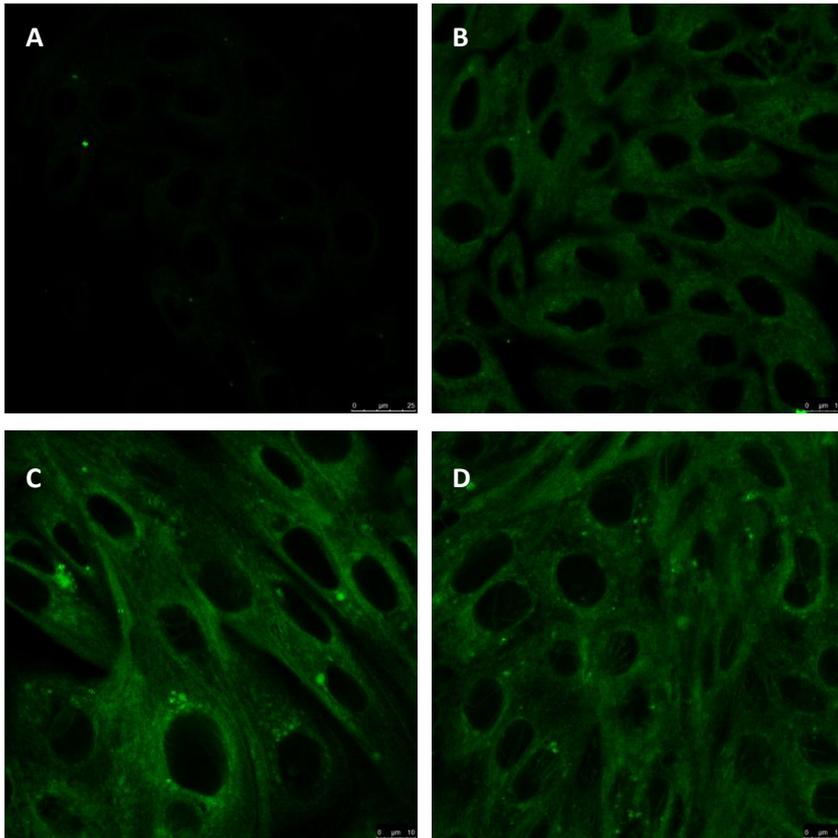


Fig. 21: Internalizzazione di NPs-PS da 44nm in monostrati di BOEC dopo 1min di incubazione (A), dopo 10 min (B), dopo 20 min (C), dopo 30 min (D). Le NPs mostrano un diffuso segnale citoplasmatico, raramente sottoforma di “cluster” intorno la regione perinucleare. (verde NPs). Barra 25 μm (A), 10 μm (B,C,D).

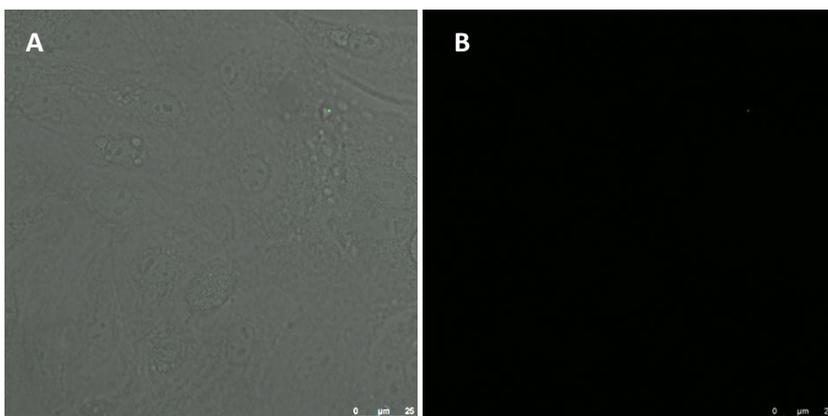


Fig. 22: Assenza di internalizzazione delle NPs-PS 100 nm in monostrati di BOEC dopo 7h di incubazione. Barra 25 μm .

2.2 *Analisi spettrofluorimetrica*

Le analisi spettrofluorimetriche confermano i dati ottenuti all’analisi microscopica confocale ed evidenziano un’efficiente internalizzazione delle NPs-PS 44nm nei

monostrati di BOEC. In particolare si nota un rapido incremento della loro internalizzazione all'aumentare del tempo di incubazione e una condizione di plateau dopo 20min (Fig. 23). Nei primi 20min di incubazione in presenza di NPs-PS si evidenzia un aumento dell'intensità di fluorescenza di circa il 75%, in accordo con le analisi d'immagine. Inoltre gli studi spettrofluorimetrici della cinetica di internalizzazione di NPs-PS da 100nm confermano l'assenza di internalizzazione di tali nanostrutture in BOEC già evidenziata dalle analisi d'immagini.

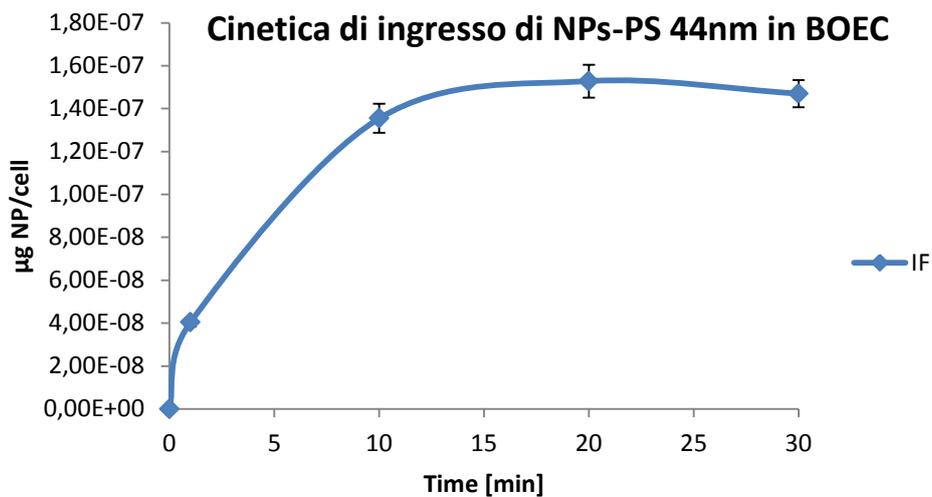


Fig. 23: Cinetica di internalizzazione di NPs-PS da 44nm in monostrati di BOEC.

3. Meccanismi di internalizzazione di nanoparticelle di polistirene da 44nm in BOEC

Le analisi al microscopio confocale dei monostrati di BOEC evidenziano che, il blocco dell'endocitosi dinamica dipendente e della macropinocitosi mediante l'utilizzo degli inibitori Dynasore 80µM ed Eipa 100µM, rispettivamente, sono in grado di impedire l'internalizzazione dell'insulina-Fitc e del destrano (controlli positivi), ma non l'internalizzazione delle NPs-PS da 44nm (Fig. 24).

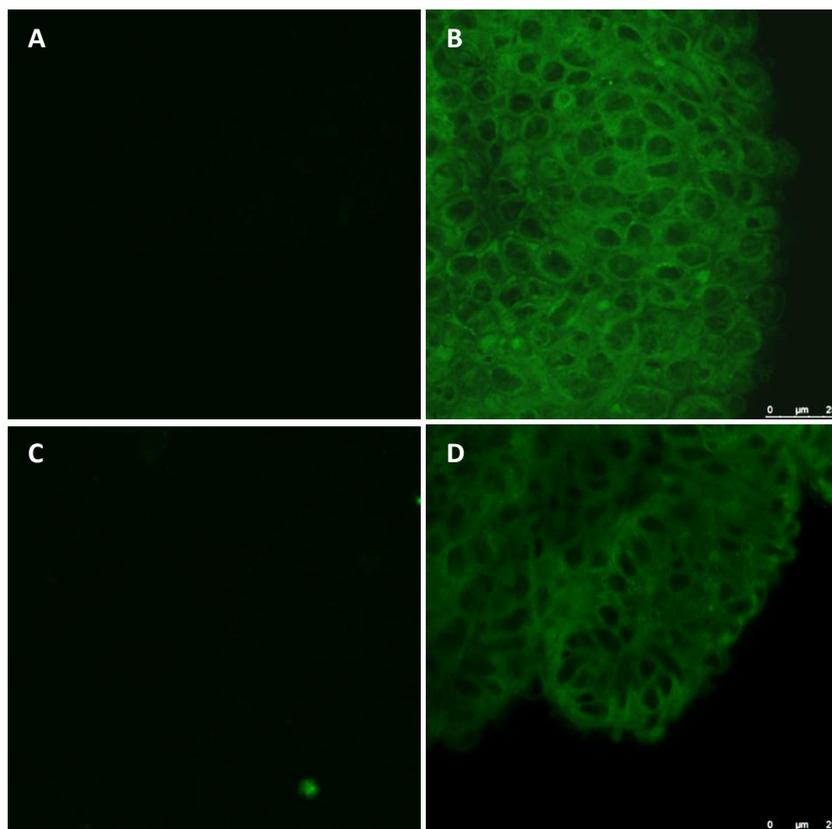


Fig. 24: Inibizione dell'internalizzazione di destrano-fite (A) e insulina-fite (C) in BOEC dopo trattamento con gli inibitori Eipa e Dynasore, rispettivamente. Internalizzazione di NPs-PS da 44nm 10 μ g/mL in monostrati di BOEC dopo trattamento con gli inibitori Eipa (B) e Dynasore (D). (verde NPs). Barra 25 μ m (B,D).

Ancora le analisi al microscopio confocale evidenziano che il blocco dell'endocitosi clatrina-dipendente, mediante l'utilizzo di saccarosio 0.9mM, non determina alcuna inibizione dell'internalizzazione delle NPs-PS 44nm in monostrati di BOEC (Fig. 25).

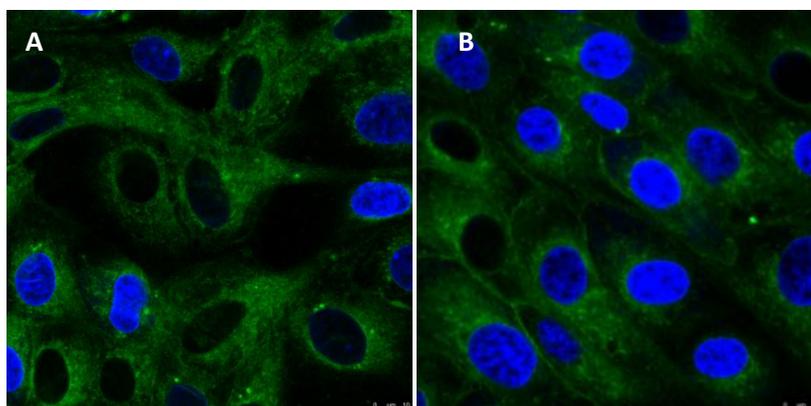


Fig. 25: Internalizzazione di NPs PS da 44nm 10 μ g/mL in assenza (A) e in presenza (B) di Saccarosio 0.9mM. (verde NPs, blu nuclei). Barra 10 μ m.

L'analisi effettuata al microscopio confocale mostra che il blocco dei processi ATP dipendenti, mediante l'utilizzo di sodio azide 0,9mM, non determina alcuna inibizione dell'internalizzazione delle NPs-PS 44nm in monostrati di BOEC (Fig. 26). La depolimerizzazione dei filamenti actini dopo 1ora di trattamento con latrunculina A 3 μ M, evidenziata dalla Falloidina Rodaminata (Fig. 27 A), non inibisce l'internalizzazione delle NPs-PS 44nm (Fig. 27 B).

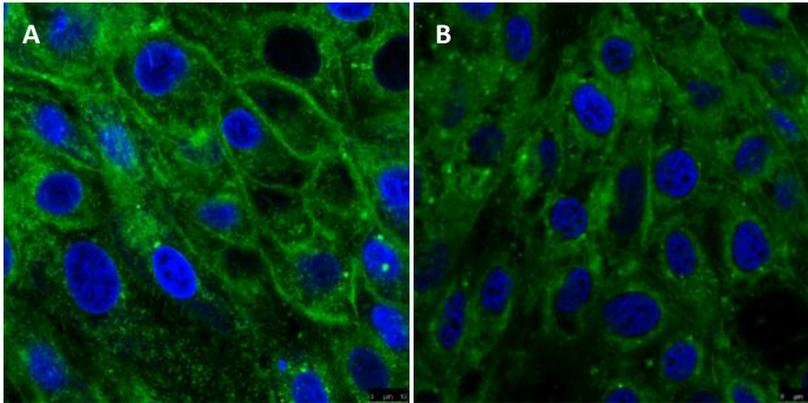


Fig. 26: Internalizzazione di NPs-PS da 44nm 10 μ g/mL in assenza (A) e in presenza (B) di Sodio azide 0,9mM. (verde NPs, blu nuclei). Barra 10 μ m.

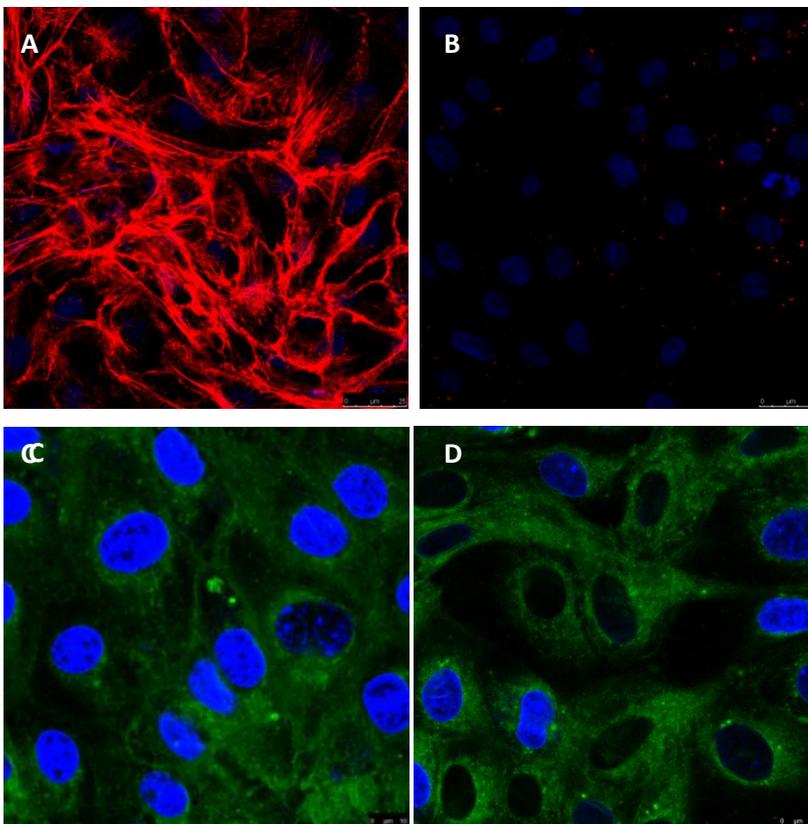


Fig. 27: Struttura dei filamenti actinici in monostrati di BOEC, in assenza (A) e in presenza (B) di Latrunculina A, evidenziati dalla Falloidina rodaminata. Internalizzazione di NPs-PS da 44nm 10µg/mL in assenza (C) e in presenza (D) Latrunculina A. (verde NPs-PS, blu nuclei, rosso Filamenti actinici) Barra 25 µm (A,B), 10µm (C,D).

Il blocco dei meccanismi ATP-dipendenti mediante trattamento alla temperatura di 4°C mette in evidenza un'inibizione dell'internalizzazione di NPs-PS 44nm 10µg/mL di circa il 40% rispetto al relativo campione controllo trattato alla temperatura fisiologica di 38,8°C (Fig. 28).

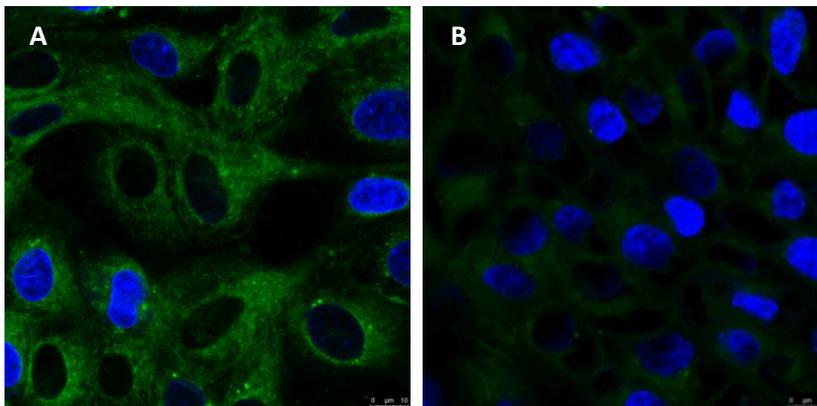


Fig. 28: Internalizzazione di NPs-PS da 44nm 10µg/mL in monostrati di BOEC incubati alla temperatura di 38,8°C (A) o alla temperatura di 4°C (B). (verde NPs-PS, blu nuclei). Barra 25 µm.

Le analisi spettrofluorimetriche non evidenziano alcuna inibizione dell'ingresso di NPs-PS 44nm 10µg/mL nei monostrati, in seguito ai diversi trattamenti, ad eccezione del trattamento a 4°C. Esso infatti risulta in grado di indurre una riduzione di circa il 40% dell'ingresso di NPs-PS, in accordo con le analisi d'immagini (Fig. 29).

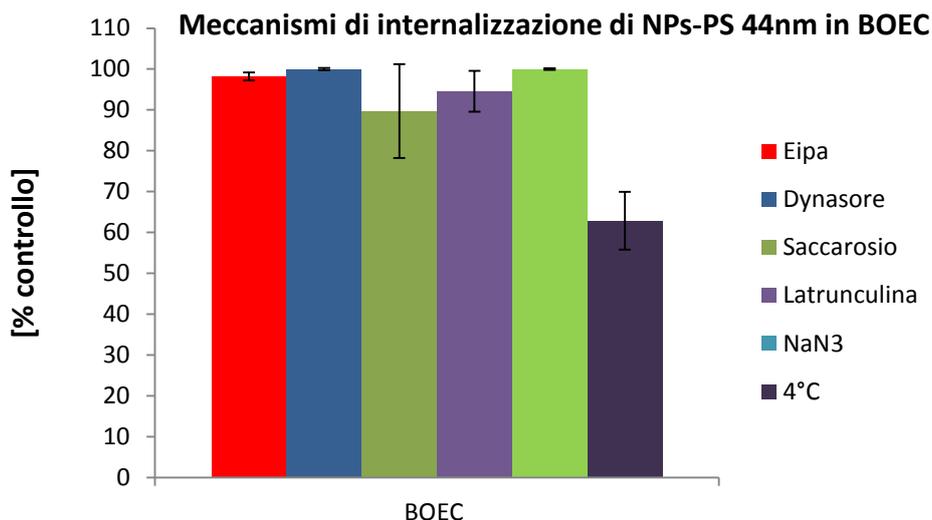
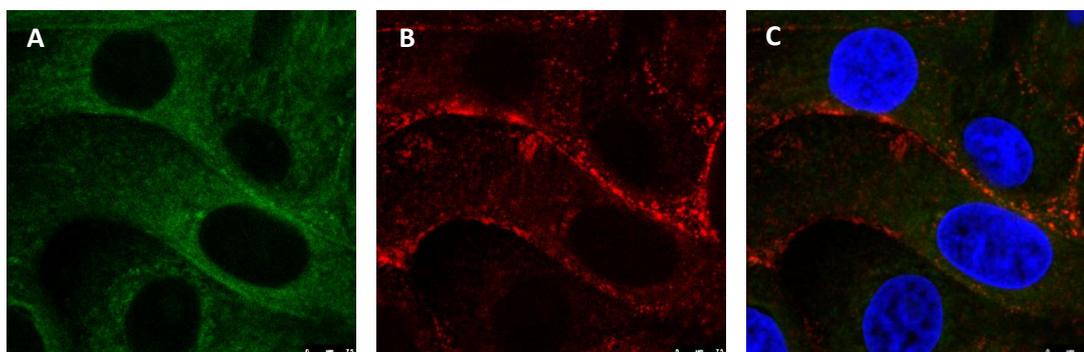


Fig. 29: Internalizzazione di NPs-PS 44nm 10 μ g/mL in monostrati di BOEC confluenti dopo trattamento con i diversi inibitori.

4. Immunofluorescenza indiretta

Le immagini ottenute al microscopio confocale dei monostrati di BOEC sottoposti a immunofluorescenza indiretta evidenziano un diffuso segnale verde dovuto alle NPs nettamente distinto dal segnale rosso corrispondente alle vescicole rivestite da caveolina o da clatrina rodaminata. Quest'ultimo, infatti, risulta fortemente particolato e localizzato sia in corrispondenza della membrana plasmatica che del citoplasma. Tali risultati evidenziano un'assenza di co-localizzazione tra le NPs-PS 44nm internalizzate e le vescicole endocitotiche rivestite da caveolina o da clatrina (Fig. 30).



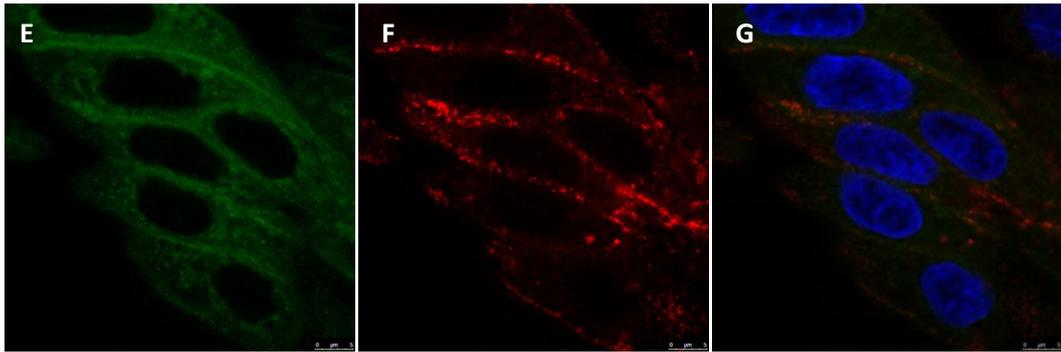


Fig. 30: Immunofluorescenza indiretta. Monostrati di BOEC pre-incubati con NPs-PS-44nm 10 μ g/mL (A,E) e trattati con Ab anti-clatrina o anti-caveolina (B,F) rispettivamente; Merge (C,G). (verde NPs-PS, rosso Ab anti-clatrina/caveolina, blu nuclei). Barra 7,5 μ m (A,B,C); 5 μ m (D,E,F).

5. Rilascio di NPs-PS da 44nm da BOEC

Le analisi d'immagine evidenziano un rilascio di NPs-PS 44nm da parte dei monostrati di BOEC, in tempi molto brevi, infatti circa il 40% delle NPs internalizzate è rilasciato entro 1min di incubazione in mezzo di coltura fresco. Dopo 3ore di incubazione è raggiunta una condizione di plateau in cui circa l'75% delle NPs-PS 44nm internalizzate è rilasciata nel mezzo fresco, e nessun nuovo incremento intracellulare è osservato in tali cellule fino a 12ore (Fig. 31).

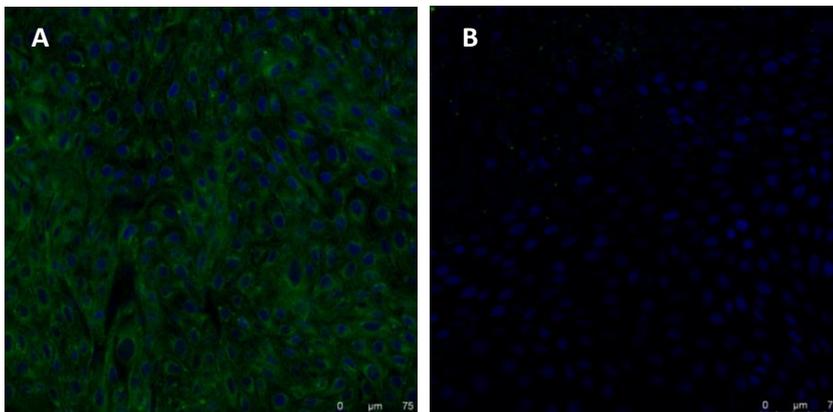


Fig. 31: Internalizzazione di NPs-PS 44nm in BOEC a confluenza dopo 30min di incubazione (A); Rilascio di NPs-PS 44nm da monostrato di BOEC a confluenza dopo 3ore di incubazione in mezzo fresco (B). (verde NPs-PS, blu Nuclei); Barra 75 μ m.

6. Cinetica di rilascio di NPs-PS da 44nm da BOEC

L'analisi della cinetica di rilascio di NPs-PS da 44nm da BOEC, mediante analisi spettrofluorimetrica, evidenzia tempi di rilascio molto brevi, infatti circa il 40% delle NPs internalizzate è rilasciato entro 1min e il 50% dopo 10min di incubazione in mezzo fresco. Il rilascio delle NPs raggiunge un picco massimo di circa il 75% dopo 3ore di incubazione e nessun nuovo incremento di NPs è osservato in tali cellule fino a 12ore (Fig. 32), in accordo alle analisi d'immagine.

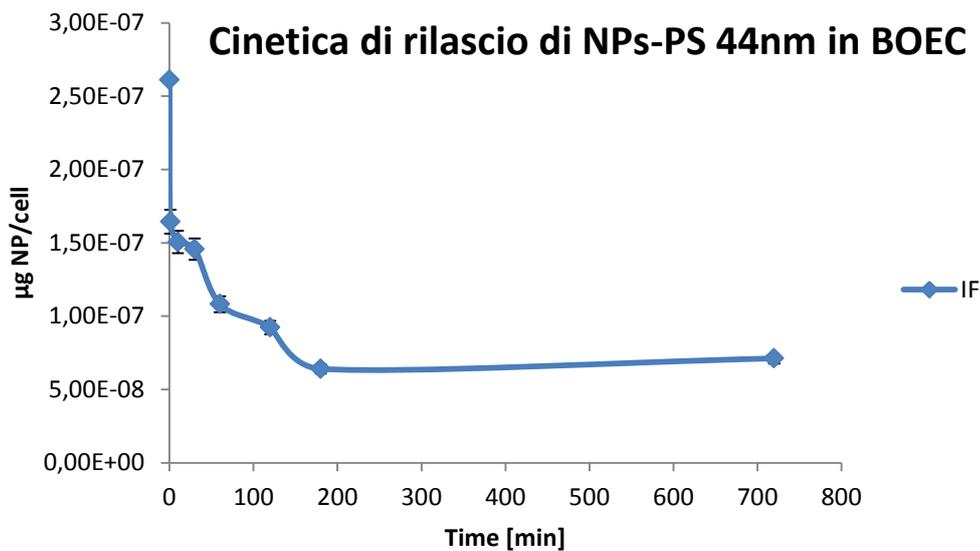


Fig. 32: Cinetica di rilascio di NPs-PS da 44nm da monostrati di BOEC

DISCUSSIONE

Crescente è l'interesse dell'ingegneria dei materiali riguardo la capacità di internalizzazione di nanoparticelle polimeriche biodegradabili e non, da impiegare come specifici vettori in applicazioni biomediche.

Tuttavia essendo presenti in letteratura dati controversi sulle caratteristiche chimico-fisiche che devono avere le nanoparticelle per un loro efficiente e sicuro impiego in campo biomedico, risulta indispensabile, prima di una loro applicazione in biomedicina, effettuare studi approfonditi. (SCENIHR 2007, 2009; EPA 2007; FDA 2006, 2008).

Finora la maggior parte degli studi sull'"uptake" delle NPs sono stati effettuati su linee cellulari immortalizzate, mentre rari sono gli studi condotti sulle più sensibili colture primarie. Infatti studi effettuati sulle cellule mesoteliali normali

hanno evidenziato che queste, rispetto alle cellule mesoteliali trasformate, sono molto più suscettibili a danni al DNA, dopo esposizione a nanotubi di carbonio (Pacurari et al., 2008).

Alla luce di questi dati, per superare i problemi legati all'utilizzo di NPs differenti per caratteristiche chimico-fisiche e di diversi sistemi biologici, nel presente lavoro di tesi lo studio è stato focalizzato sull'uptake di NPs di polistirene da 44 e 100nm su un unico tipo di coltura cellulare primaria.

In particolare è stata analizzata la cinetica di ingresso/rilascio delle NPs, le vie di internalizzazione impiegate e la loro localizzazione intracellulare in colture primarie di cellule epiteliali oviduttali bovine (BOEC).

I dati ottenuti nel presente studio dimostrano che 1) NPs-PS 44nm sono efficientemente internalizzate in BOEC in accordo a una cinetica di saturazione; 2) NPs-PS 100nm non sono internalizzate in BOEC; 3) NPs-PS 44nm sono internalizzate mediante processi ATP-independenti; 4) NPs-PS 44nm non mostrano alcuna co-localizzazione con vescicole endocitotiche rivestite da clatrina o caveolina; 5) NPs-PS 44nm sono efficientemente rilasciate da BOEC.

Le analisi al microscopio confocale evidenziano un'efficiente internalizzazione di NPs-PS 44nm in BOEC, con una localizzazione esclusivamente citoplasmatica. In particolare è osservato un diffuso segnale fluorescente, raramente sottoforma di cluster localizzato intorno alla regione perinucleare. Tali dati suggeriscono la presenza di meccanismi di esclusione delle NPs da parte del nucleo, in accordo con la maggior parte degli autori (Dausend et al., 2008; Liu et al., 2011; Larsen et al., 2012; Mu et al., 2012; Helinor et al., 2010; Chithrani et al., 2006).

In letteratura, tuttavia sono presenti dati controversi sull'uptake delle NPs da parte del nucleo, dovuti principalmente alla taglia delle NPs (Frohlich et al., 2009; Berry et al., 2007; Oh et al., 2011; Pantè and Kann, 2002; Fuller et al., 2008). Le analisi quantitative d'immagine e spettrofluorimetriche mostrano un rapido incremento dell'ingresso esclusivamente di NPs-PS da 44nm all'aumentare del tempo di incubazione, raggiungendo una condizione di plateau dopo 20min, in accordo ad una cinetica di saturazione (Reix et al., 2012). Tali risultati sono in accordo con studi precedenti che mostrano un significativo incremento dell'ingresso di NPs da 14-100nm per le prime 2ore a seconda della taglia. (Desai et al., 1997; Chithrani et al., 2006).

Pertanto tali dati confermano un'influenza della taglia sull'uptake di NPs di polistirene in colture primarie di cellule epiteliali oviduttali bovine; in accordo con studi riportati da altri autori su differenti sistemi cellulari (Zauner et al., 2001; Prabha et al., 2002; Lai et al., 2007).

Oltre le complesse interazioni bio-fisico-chimiche della superficie delle NPs con le membrane cellulari, il diametro delle NPs sembra essere un fattore discriminante nel promuovere l'internalizzazione nelle cellule (Nel et al., 2009).

E' noto che variazioni della taglia delle NPs possono alterare le cinetiche di rilascio dei farmaci o i fenomeni di trasporto attraverso le barriere biologiche, così come la farmacocinetica del composto all'interno del corpo umano. (Hillyer et al., 2001; Lamprecht et al., 2002).

Pertanto adeguate conoscenze riguardo i meccanismi di internalizzazione impiegati dalle nanoparticelle, risultano fondamentali per una loro efficiente applicazione nei sistemi di rilascio di agenti di terapeutici.

A tal fine il mio interesse è stato focalizzato sullo studio dei meccanismi d'ingresso impiegati da tali NPs-PS 44nm in BOEC.

L'endocitosi è un processo di internalizzazione di macromolecole che avviene attraverso la formazione di vescicole derivate dall'invaginazione della membrana plasmatica. Questo processo è generalmente diviso in due principali categorie: la fagocitosi (internalizzazione di grandi particelle) e pinocitosi (internalizzazione di fluido e soluti). La fagocitosi è tipica delle cellule di mammifero, come macrofagi, monociti e neutrofili. La pinocitosi può essere suddivisa in quattro parti: in macropinocitosi, in endocitosi clatrina-dipendente e caveolina dipendente e infine in endocitosi clatrina e caveolina indipendente.

La via d'internalizzazione delle NPs potrebbe avvenire attraverso diversi processi endocitotici che finora, non risultano ancora ben identificati (Davda et al., 2002; Missirlis et al., 2006; Park et al., 2006).

In tale progetto gli esperimenti per la comprensione dei meccanismi d'ingresso delle NPs venivano effettuati utilizzando inibitori di specifiche vie d'internalizzazione. Queste droghe sono state impiegate per un massimo di 1 ora, poiché bloccando una via di internalizzazione potrebbero attivarsi vie endocitotiche alternative (Harush-Frenkel et al., 2007; Conner et al., 2003), infatti studi riportavano che cellule Hela dinamina-“defective” erano capaci di

internalizzare transferrina mediante una via pinocitotica clatrina-indipendente (Damke et al., 1995).

Nel presente studio al fine di analizzare il ruolo della macropinosi e dell'endocitosi dinamica-dipendente nell'internalizzazione di NPs-PS 44nm sono stati scelti gli inibitori 5-(N-ethyl-Nisopropyl) amiloride (EIPA) e dynasore, rispettivamente. L'Eipa è un potente e specifico inibitore della pompa Na^+/H^+ , la cui attività è fondamentale per la formazione di macropinosomi (Mercer et al., 2008).

L'inibitore dynasore è stato identificato tra circa 16000 sostanze come molecola in grado di inibire specificamente l'azione della dinamina senza influenzare la vitalità cellulare (Macia et al., 2006). La dinamina è un enzima GTP-dipendente coinvolto nell'endocitosi clatrina e caveolina dipendente e in alcuni processi lipid raft-mediati (Kirkham et al., 2005). Uno dei trattamenti impiegati per l'inibizione della formazione delle fossette rivestite nell'endocitosi è l'esposizione delle cellule a mezzi ipertonici (Nieland et al., 2005), quale il saccarosio (Heuser et al., 1989; Panyam et al., 2002; Qaddoumi et al., 2003).

Le analisi d'immagine, in accordo a quelle spettrofluorometriche, dimostrano che il trattamento con dynasore, eipa e saccarosio non sono in grado di bloccare significativamente l'"uptake" delle NPs-PS 44nm in BOEC, evidenziando una sua indipendenza dai processi dipendenti dalla dinamina, dalla macropinosi e dall'endocitosi clatrina dipendente; in accordo con studi che dimostrano che NPs-PS non sono internalizzate attraverso endocitosi da cellule epiteliali alveolari di ratto (Yacobi et al., 2010) e da cellule Hela (Hao et al., 2012); e in contrasto con Dausend et al., 2008 e Kim et al., 2006, che ne evidenziano, invece, un coinvolgimento in cellule Hela e A549, rispettivamente. Al fine di verificare effettivamente il coinvolgimento di processi attivi nell'"uptake" di NPs-PS 44nm nel mio sistema cellulare, sono state impiegate differenti sostanze capaci di inibire i meccanismi ATP-dipendenti.

La sodio azide è un inibitore della fosforilazione ossidativa comunemente utilizzata per inibire i processi attivi sia in vitro che in vivo. Essa infatti agisce inibendo la citocromo C ossidasi, l'ultimo enzima nella catena di trasporto di elettroni mitocondriale, pertanto è responsabile di una diminuzione della concentrazione intracellulare di ATP (Torchilin et al., 2001).

La latrunculina A è un inibitore della polimerizzazione dell'actina, (Morton et al., 2000), pertanto essendo l'actina coinvolta nella maggior parte dei processi endocitotici (Merrifield et al., 2004; Kaksonen et al., 2006), l'impiego di inibitori dell'actina può inibire i processi endocitotici ATP dipendenti (Panyam et al., 2002).

E' noto che diverse proteine ed enzimi siano sensibili alla temperatura, dunque, i processi energia dipendenti risultano inibiti dalle basse temperature (Iacopetta et al., 1983; Saraste et al., 1986), infatti, a basse temperature, i meccanismi di "uptake" endocitotici/pinocitotici di molecole "tracer" come la calceina, venivano completamente bloccati (Verma et al., 2008).

I miei dati non mostrano alcuna riduzione significativa dell'"uptake" di NPs-PS 44nm in BOEC dopo trattamento con sodio azide e latrunculina, in accordo quest'ultimo con Panyam et al., 2002; mentre una significativa inibizione di circa il 40% ($P < 0,01$) è stata riscontrata dopo trattamento alla temperatura di 4°C; in accordo con la maggior parte dei precedenti studi (Dausend et al., 2008; Panyam et al., 2002; Dos Santos et al., 2011; Hao et al., 2012; Ruiz et al., 2011). Tali dati risultano confermati dalla mancata co-localizzazione tra le NPs-PS 44nm e le vescicole endocitotiche rivestite da clatrina/caveolina, in accordo con diversi autori (Qaddoumi et al., 2003; Davda et al., 2002; Huang et al., 2002; Panyam and Labhasetwar 2003; Panyam et al., 2002; Foster et al., 2001; Suh et al., 1998). Presi tutti insieme, tali risultati dimostrano chiaramente che l'ingresso di NPs-PS 44nm in BOEC avviene nonostante l'inibizione dell'endocitosi clatrina/dinamina dipendente, della macropinosi, della polimerizzazione dei filamenti actinici e il blocco dei processi ATP-dipendenti. Pertanto il decremento dell'ingresso di NPs in BOEC dopo trattamento a 4°C potrebbe dipendere da una gelificazione dei lipidi della membrana plasmatica a tale temperatura o da una diminuzione dei moti Brownian. Tali studi mostrano dunque la capacità delle NPs-PS 44nm di attraversare la membrana plasmatica delle BOEC in maniera energia-indipendente, probabilmente attraverso interazioni dirette con il doppio strato lipidico come riportato nello studio su cellule epiteliali alveolari di ratto (Yacobi et al., 2010). Infatti i gruppi carichi negativamente sulla superficie delle NPs-PS 44nm, come misurato attraverso la tecnica del "dynamic light scattering (DLS)", potrebbero inizialmente interagire con i residui carichi positivamente presenti sulla membrana plasmatica, permettendo la penetrazione e l'interazione delle

regioni idrofobiche delle NPs col doppio strato lipidico (Rothen-Rutishauser et al., 2006). La traslocazione delle NPs potrebbe avvenire, poi, mediante vie non specifiche, compresa la diffusione, l'utilizzo di canali transmembrana, e attraverso forze elettrostatiche, di van der Waals o interazioni steriche, strettamente dipendenti dalle caratteristiche della superficie delle NPs (Rothen-Rutishauser et al., 2006).

Un ulteriore scopo del presente lavoro è stato quello di analizzare l'eventuale rilascio di NPs-PS 44nm da monostrati di BOEC. I dati mostrano un rapido rilascio delle NPs già dopo i primi minuti d'incubazione in accordo alla rapida cinetica d'internalizzazione. Il rilascio delle NPs raggiunge un picco massimo di circa il 75% dopo 3ore di incubazione e nessun nuovo incremento di NPs veniva osservato in tali cellule fino a 12ore, in accordo con i dati riportati da Panyam and Labhasetwar, 2012.

Tutti questi dati nel complesso dimostrano che l'uptake e il rilascio di NPs dalle BOEC risulta fortemente dipendente dalle loro caratteristiche chimico-fisiche, in particolar modo dalla taglia, in accordo con precedenti studi (Lai et al., 2007, Liu et al., 2011; Chithrani et al., 2006).

In conclusione i dati qui ottenuti, forniscono un contributo alla comprensione dei meccanismi di internalizzazione e rilascio delle NPs e mettono in evidenza che ogni sistema cellula-NPs necessita di accurate analisi specifiche. I risultati ottenuti in questi diversi sistemi permetterebbero di creare un database utile alla comprensione di tali interazioni. Dunque nel prossimo futuro ulteriori studi finalizzati alla comprensione dei meccanismi di uptake delle NPs saranno necessari prima di un loro efficiente e sicuro impiego nelle diverse applicazioni terapeutiche.

-CAPITOLO 7-
EFFETTI CITOTOSSICI DI NANOPARTICELLE.
SVILUPPO EMBRIONALE BOVINO IN VITRO: SAGGIO
PREDITTIVO DI NANOTOSSICITÀ

INTRODUZIONE

Negli ultimi anni crescente è l'interesse della comunità scientifica riguardo la progettazione e lo sviluppo di nanomateriali da impiegare in campo biomedico, ottico ed elettronico. Tuttavia l'utilizzo di tali materiali potrebbe presentare un rischio per la salute dei produttori e dei consumatori, infatti, numerosi studi hanno evidenziato che a livello nanometrico il materiale d'origine presenta caratteristiche chimico-fisiche, che conferiscono citotossicità (Lewinski et al., 2008). Studi tossicologici preliminari su sistemi nanoparticellari hanno identificato le caratteristiche strutturali chiave, importanti per la comprensione delle interazioni nanomateriali-sistemi biologici (Kirchner et al., 2005; Kotov et al., 2009), come la composizione chimica del "core" delle nanoparticelle (Samia et al., 2003; Kirchner et al., 2005), la taglia del core (Meng et al., 2007; Guo et al., 2008), e lo "shell" dei ligandi (Hoshino et al., 2004).

Inoltre a causa della loro taglia estremamente ridotta, i nanomateriali possiedono un'elevata area superficiale in rapporto al volume, che li rende fortemente reattivi. Tale reattività potrebbe potenzialmente condurre a una tossicità dovuta a interazioni dannose con i sistemi biologici e l'ambiente (Oberdorster et al., 2005b).

La maggior parte degli studi in vitro su colture cellulari, mostrava che alcune nanoparticelle erano in grado di indurre stress ossidativo (Oberdorster et al., 2005a; McCarthy, 2012), interazione col DNA (Singh et al., 2009; Mu et al., 2012), stimolazione di secrezione di proteine infiammatorie, riduzione della vitalità e morte cellulare (Waters, 2009; Chen et al., 2004).

Tuttavia, il comportamento delle NPs verso i sistemi biologici e i loro effetti tossici non sono ancora pienamente compresi. Dati controversi sono presenti in letteratura, queste discrepanze riscontrate possono essere ricondotte alle differenti NPs utilizzate, alle diverse condizioni sperimentali e sistemi biologici in vitro e in vivo. Dunque identificare le caratteristiche chimico-fisiche delle nanoparticelle necessarie per un loro sicuro impiego in campo biomedico e sviluppare un sensibile e predittivo saggio tossicologico per tali nanomateriali risulta indispensabile prima di una loro applicazione terapeutica. (SCENIHR 2007, 2009; EPA 2007; FDA 2006, 2008).

Sinora, la maggior parte degli studi è stata effettuata su diverse linee cellulari somatiche in vitro, dimostrando che NPs differenti per caratteristiche chimico-fisiche

possono indurre una bassa/alta o dose-dipendente citotossicità. Rare sono le analisi effettuate su sistemi cellulari più sensibili, quali la coltura di cellule germinali o di embrioni nei mammiferi.

Studi preliminari hanno evidenziato effetti tossici di diverse NPs su cellule staminali spermatogoniali (Braydich-Stolle et al., 2010), su spermatozoi (Guo, et al., 2009) di topo in maniera dose e taglia-dipendente (Taylor, 2012), sullo sviluppo follicolare nel topo (Xu, 2012), e infine su embrioni di zebrafish (Bai et al., 2010 a,b) e di topo (Fynewever et al., 2007). Tuttavia ulteriori indagini sono necessarie al fine di analizzare gli effetti citotossici delle diverse NPs sulle cellule germinali e sullo sviluppo embrionale.

Negli ultimi anni numerosi studi hanno evidenziato l'estrema suscettibilità dello sviluppo embrionale pre-impianto a diversi fattori ambientali, sia in vivo (es. l'alimentazione materna) che in vitro (es. la coltura embrionale) (Fleming et al., 2004; Sinclair and Singh, 2007; Thompson et al., 2007; Watkins et al., 2008a). Recenti lavori, infatti, evidenziavano che il programma intrinseco dell'embrione sembra rispondere a fattori estrinseci all'ambiente materno regolando lo sviluppo embrionale mediante meccanismi cellulari, fisiologici ed epigenetici.

Queste risposte all'ambiente potrebbero influenzare sia lo sviluppo embrionale precoce sia quello tardivo e addirittura postnatale.

Alla luce di queste osservazioni in tale lavoro di tesi sono stati studiati gli eventuali effetti tossici di differenti NPs a diverse concentrazioni, su gameti ed embrioni bovini in vitro. In particolare sono stati analizzati gli effetti citotossici sia sulla cinetica spermatica, sia sullo sviluppo embrionale bovino in vitro. A tal fine è stato studiato lo sviluppo embrionale in vitro valutando: 1) le percentuali di segmentazione; 2) le percentuali di sviluppo fino allo stadio di 8 cellule e di blastocisti; 3) la qualità delle blastocisti in termini di numero medio di cellule; 4) la percentuale dei nuclei con DNA frammentato. Lo sviluppo embrionale in vitro è un processo estremamente sensibile a fattori esterni, pertanto uno sviluppo fino allo stadio di blastocisti in vitro rappresenta un ottimo test di funzionalità cellulare in vivo. Dunque tale studio potrebbe porre le basi per validare lo sviluppo embrionale in vitro come un sensibile e predittivo modello biologico per saggiare la tossicità delle nanoparticelle prima di un loro impiego in ambito clinico.

MATERIALI E METODI

1. Nanoparticelle

1.1 Nanoparticelle di polistirene

Nanoparticelle di polistirene (PS-NPs) non modificate fluorescenti nel verde (468/508nm) con diametro di 44nm sono state acquistate dalla Duke Scientific Corporation. Il polistirene ha una densità di 1.05g/cm³ e un indice di rifrazione di 1.59@589nm (25°C). Le sospensioni acquose contengono 1% di NPs e tracce di surfattante. Le NPs fluorescenti sono particelle polimeriche che utilizzano il processo Firefli per incorporare e legare fortemente i fluorofori alla matrice polimerica. Questo metodo produce intensi colori fluorescenti, minimizza la fotodecolorazione e previene la lisciviazione del colorante in mezzi acquosi.

1.2 Nanoparticelle di acido poli(D,L-lattico-co-glicolico) e polietilene glicole

Nanoparticelle di acido poli(D,L-lattico-co-glicolico) e polietilene glicole (PLGA/PEG-NPs) coniugate con rodamina di 65nm sono state sintetizzate mediante una tecnica di diffusione modificata a doppia emulsione-solvente, dissolvendo copolimeri di rodamina-PLGA e PEG-PLGA (1:1 w/w) nella fase organica di emulsione (10% w/v). Il copolimero PLGA-PEG è stato sintetizzato attraverso una reazione accoppiata tra PLGA and PEG similmente a una procedura precedentemente riportata (Lee et al., 2006). Il polimero PLGA è stato coniugato alla rodamina in presenza di N-(3-Dimethylaminopropyl)-N'-ethylcarbodiimide hydrochloride (EDC-HCl) e ethyl diphosphonic acid (EDPA) in 5 ml di diclorometano anidro (DCM) in atmosfera di azoto. La miscela di reazione è stata posta in agitazione per 24ore. Successivamente il PLGA (0.2 g) amminato è stato coniugato a rodamina (38.4 mg) con EDC-HCl (15.5 mg) ed EDPA (10.4 mg) in 1 ml DMF anidro. La miscela di reazione è stata posta in agitazione per 24ore a RT, protetta dalla luce, in atmosfera di azoto. Il polimero è stato precipitato in soluzione acquosa e filtrato. Il materiale solido risultante è stato dissolto in DCM e la soluzione polimerica è stata sottoposta a 3 lavaggi in acqua. Successivamente la soluzione DCM è stata versata in sodio solfato anidro, posto in agitazione overnight e in fine precipitata e lavata con metanolo. Il PLGA-rodamina è stato utilizzato per preparare nanoparticelle fluorescenti per le analisi di internalizzazione, localizzazione e citotossicità (Biondi et al., 2012).

1.3 Nanoparticelle di ossido di silicio

Nanoparticelle sferiche di ossido di silicio (SiO₂-NPs) con diametro di 20nm, non legate a fluorofori, sono state acquistate dalla MK Nano Impex Corporation. Le sospensioni acquose contengono NPs al 5%.

1.4 Misure di determinazione del potenziale zeta e della taglia delle nanoparticelle

Il potenziale zeta, la taglia e la distribuzione della taglia delle NPs-PS da 44nm e NPs-PLGA/PEG 65nm sono state determinate mediante la tecnica del “dynamic scattering light” (DSL). Per le analisi una sospensione di 0.1 mg mL⁻¹ di NPs in acqua distillata (12 corse per ogni campione) è stata sottoposta all’analisi mediante uno ZetaSizer Nano ZS, Malvern Instruments, Malvern, UK.

2. Internalizzazione di NPs-PS da 44-100nm e di NPs-PLGA/PEG da 65nm in cellule germinali bovine.

2.1 Recupero di ovociti bovini e maturazione ovocitaria in vitro

Le ovaie sono state prelevate durante la macellazione di bovini di razza Charolais sani non gravidi di 16-18 mesi e trasportate in laboratorio a secco a 30°C. I complessi cumulo ooforo ovocita (COCs) sono stati prelevati tramite aspirazione dei singoli follicoli mediante un aspiratore automatico connesso a un ago da infusione da 19 gocce e lavati in Hepes-buffered medium, Mezzo 199 (4530 Sigma) supplementato con Hepes 10mM, Polivinil alcol 0.5mg/mL e gentamicina 50µg/mL.

I COCs sono stati maturati in Mezzo 199 supplementato con gentamicina 50µg/mL, amfotericina B 1µg/mL, fetal calf serum (FCS) 10% e Epidermal growth factor (EGF) 10ng/mL per 22-24h a 38.5°C, 5% CO₂, 95% umidità. La selezione dei COCs maturati in vitro di buona qualità è stata effettuata allo stereomicroscopio. Dopo lavaggi estensivi in Hepes-buffered medium, gruppi di COCs o ovociti decumulati meccanicamente con flexipet, sono stati incubati in IVF-TALP in presenza di NPs-PS 44 o 100nm 10µg/mL o NPs-PLGA/PEG 65nm 10µg/mL per tempi stabiliti a 38.5°C, 5% CO₂, 95% umidità. A intervalli di 1ora i COCs o gli ovociti venivano lavati in PBS 1X e allestiti per l’osservazione al microscopio confocale (TS SP 5, Leica) con laser 405 (UV/HOECHST), 488

(green) e 543 (red) al fine di analizzare l'internalizzazione delle diverse NPs fluorescenti.

2.2 Preparazione del liquido seminale bovino.

Seme bovino crioconservato proveniente da 3 tori diversi (0.5 ml paillette; approssimativamente 40×10^6 spermatozoi per paillette; motilità dopo scongelamento $>70\%$), ottenuto da Inseme S.p.a (San Giuliano Saliceta, Modena, Italia), è stato usato in tutti gli esperimenti. Il seme è stato scongelato in un bagnetto termostato a 38.8°C per 30s e successivamente lavato in Hepes Buffered Tyrode supplementato con NaHCO_3 25.78 mM, sodio lattato 22 mM, piruvato 1.03 mM, Hepes 6.71mM, gentamicina $50\mu\text{g/mL}$, a 170g per 10 min.

Successivamente il pellet è stato risospeso in 1ml di mezzo Hepes Buffered Tyrode (IVF-TALP) supplementato con NaHCO_3 25.78 mM, sodio lattato 22 mM, piruvato 1.03 mM, BSA EFAP 6mg/mL, gentamicina $50\mu\text{g/mL}$, e sottoposto alla valutazione della concentrazione e della percentuale di motilità mediante la camera emocitometro e il sistema d'analisi computerizzato (SCA).

La soluzione spermatica alla concentrazione di 2×10^6 motili/mL è stata incubata in mezzo IVF-TALP in presenza di NPs-PS 44 o 100nm $10\mu\text{g/mL}$ o di PLGA/PEG 65nm $10\mu\text{g/mL}$ per tempi stabiliti a 38.5°C , 5% CO_2 , 95% umidità. Al termine dell'incubazione la soluzione spermatica è stata incubata con Hoechst 33358 $10\mu\text{g/mL}$ per 10min a $38,8^\circ\text{C}$, capace di colorare di blu scuro i nuclei non vitali e di azzurro chiaro i nuclei vitali. Successivamente è stata lavata in DPBS 1X a 170g per 10 min e allestita per l'osservazione al microscopio confocale (TS SP 5, Leica) con laser 405 (UV/HOECHST), 488 (green) e 543 (red), al fine di analizzare l'internalizzazione delle diverse NPs fluorescenti.

3. Sistema computerizzato per l'analisi di parametri spermatici (SCA)

In commercio vi sono numerosi sistemi che utilizzano l'analisi di immagini digitalizzate per la valutazione automatica della concentrazione, della motilità e delle caratteristiche del movimento degli spermatozoi. Questo nuovo settore dell'andrologia è oggi noto come esame computerizzato del liquido seminale (SCA). I differenti apparecchi SCA hanno dimostrato alti livelli di precisione ed

attendibilità, usando differenti metodologie di classificazione degli spermatozoi. Lo SCA negli anni è stato principalmente testato sull'uomo, soprattutto nei centri di fertilità, provando a valutare la qualità degli spermatozoi da impiegare nella fecondazione in vitro per correlare tale qualità (in termini di motilità e morfologia) con la fertilità. L'interesse per questa tecnica, soprattutto in medicina veterinaria, è principalmente mirato in ambito clinico ad accertare la fertilità del seme, ma anche in campo sperimentale ad accertare gli effetti delle droghe sulla fertilità.

3.1 Descrizione del sistema computerizzato per l'analisi (SCA)

Lo SCA consiste in un'attrezzatura specializzata che include un microscopio a contrasto di fase, una videocamera ad alta risoluzione, un videoregistratore, un monitor, un computer dotato di un software specifico per la gestione dei dati, un tavolino termostato, in grado di garantire una temperatura costante degli spermatozoi da analizzare, e una stampante. L'analisi della sospensione spermatica viene effettuata al microscopio utilizzando una camera di Makler precedentemente riscaldata.

Dal microscopio l'immagine viene trasferita, mediante la videocamera, al monitor dove può essere controllata dall'operatore; dal monitor l'immagine viene poi inviata al software di elaborazione del computer, il quale trasforma l'immagine reale in traccia elettronica (digitalizzazione). La videocamera, dunque, documenta le immagini in movimento delle cellule spermatiche, mentre il computer le digitalizza. La digitalizzazione è il processo con cui pixels video (punti costituenti un'immagine) vengono codificati come numeri. L'immagine più semplice monocromatica possiede solo due colori, bianco e nero, in modo che i pixels possono essere on oppure off. Questo processo viene indicato come "digitalizzazione binaria". Se un'immagine monocromatica comprende un'ombra di grigio, ciascun pixel ha un valore numerico su questa scala dei grigi che può avere 256 livelli (combinazioni). Molti sistemi computerizzati (SCA) utilizzano per l'analisi un'immagine digitalizzata binaria, per cui una soglia del livello dei grigi o valore di intensità deve essere determinata per identificare il livello che separa i due ranges di intensità, o valore della scala dei grigi. È possibile, ovviamente, un ampio margine di errore quando si determina la soglia ottimale

della testa degli spermatozoi per ottenere la massima distinzione fra le teste degli spermatozoi e il fondo. Se il settaggio è troppo lontano in un senso, molti piccoli detriti presenti nel fondo saranno digitalizzati come oggetti spuri. Si possono quindi verificare errori nella classificazione degli oggetti, dovuti ai criteri utilizzati per il settaggio. L'immagine digitalizzata dello spermatozoo è costituita da un contorno che appare sul monitor accanto alla cellula osservata in "real-time". I contorni vengono messi a fuoco grazie al controllo del "threshold" (toni di grigio). La scelta del threshold permette all'operatore di eliminare le immagini del materiale particellato più piccolo, il cui effetto di disturbo può essere ulteriormente attenuato inserendo un filtro di fondo.

Le coordinate digitalizzate dei pixels che definiscono i contorni di ogni testa di spermatozoo sono trasmesse ad un personal computer che provvede a determinare la posizione del suo centroide, ossia la posizione media definita da due coordinate x ed y di un gruppo di pixels. Dalla serie di immagini, ciascuna contenente un numero di centroidi, il programma SCA deve plottare il movimento di ciascun oggetto, che è stato identificato come testa di spermatozoo, da un frame al successivo, attraverso l'intera sequenza. La creazione di queste "traiettorie" viene raggiunta definendo la massima distanza che uno spermatozoo può aver compiuto tra un frame e il successivo. Questa distanza massima, che viene calcolata da una velocità massima fornita al programma, viene, quindi, divisa per la velocità dei video frames, per definire il raggio di una circonferenza che è disegnata intorno alla testa dello spermatozoo in un determinato video frame, successivamente proiettato nel video frame seguente. Ogni centroide, che cade in questo cerchio, viene considerato il centroide della cellula che era stato proiettato dall'immagine video precedente. I due centroidi sono uniti a formare una traiettoria (Fig. 33).

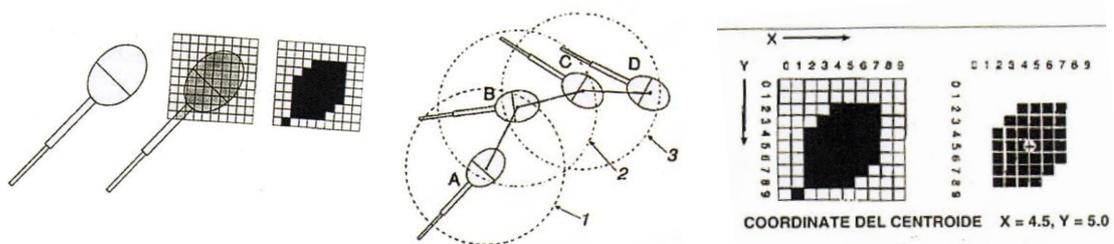


Fig. 33: Sistema computerizzato per l'analisi di parametri spermatici (SCA)

Questo procedimento viene ripetuto per tutta la sequenza dei video frames per ricostruire la traiettoria della cellula in esame.

Quando il centroide non si muove tra frames successivi, viene considerato non motile. Un programma, di solito, richiede assenza di movimento per un certo numero di video frames (3-4), prima di considerare la cellula come immotile.

Altri parametri da valutare attentamente sono la velocità minima e massima della cellula. L'indicazione della velocità minima è di estrema importanza perché permette allo strumento di non considerare motili tutte quelle cellule che potrebbero avere dei lievi movimenti passivi, derivanti, ad esempio, da urti con altri spermatozoi. La velocità massima non deve avere un valore troppo elevato per evitare di collegare tra di loro traiettorie di cellule diverse.

Le caratteristiche cinetiche che derivano dall'analisi del centroide della testa sono:

(a) Velocità curvilinea VCL

La velocità curvilinea (VCL) è calcolata sommando tutti i segmenti determinati dalle successive posizioni della testa lungo tutto il tragitto compiuto dallo spermatozoo. In questo modo, la velocità curvilinea costituisce la proiezione a due dimensioni della reale traiettoria tridimensionale elicoidale dello spermatozoo, come viene rilevata dal tempo di risoluzione della metodica di immagine utilizzata. I valori della VCL sono espressi in micrometri per secondo con un decimale.

(b) Velocità lineare VSL

La velocità lineare (VSL) rappresenta la velocità di progressione della cellula. Viene determinata dal punto di partenza a quello di arrivo della traiettoria che viene esaminata. I valori di VSL sono espressi in micrometri per secondo.

(c) Ampiezza dello spostamento laterale della testa ALH

L'ampiezza dello spostamento laterale della testa dello spermatozoo (ALH) viene calcolata sulla base delle ampiezze delle deviazioni laterali, rispetto all'asse di progressione della cellula. I valori di ALH sono espressi come la larghezza lungo tutto il tragitto in micrometri con l'aggiunta di un decimale.

(d) Velocità media della traiettoria VAP

La velocità media della traiettoria (VAP) è la velocità con cui lo spermatozoo compie il tragitto medio. Dal momento che la traiettoria media può essere determinata in vari modi, compresa l'interpolazione visiva, il metodo utilizzato

per la sua determinazione deve essere sempre indicato con precisione. I suoi valori sono espressi in micrometri per secondo, con l'aggiunta di un decimale.

Tre sono gli indici di progressione, espressi come percentuale, che possono essere determinati in base alle tre misure della velocità sopra descritte:

- 1) Linearità (LIN): $VSL/VCL \times 100$
- 2) Rettilinearità (STR): $VSL/VAP \times 100$
- 3) Oscillazione (WOB): $VAP/VCL \times 100$

La descrizione più completa del movimento dello spermatozoo è quella che analizza in maniera dettagliata il battito della coda, dal momento che proprio la formazione e la propagazione delle onde lungo la coda nemaspermica generano la forza propulsiva dello spermatozoo.

e) Frequenza dei battiti (della coda)

La frequenza dei battiti della coda nemaspermica (BCF) è il numero delle volte che la traiettoria curvilinea attraversa la traiettoria media per unità di tempo. Le osservazioni sul battito della coda sono di fondamentale importanza per la descrizione della motilità iperattivata degli spermatozoi.

3.1.1 Settaggio dello SCA

I settaggi del sistema differiscono da specie a specie. L'accuratezza dell'uso della camera di conta (es Makler), del numero dei campi da osservare, i campioni esaminati, la temperatura alla quale le misure sono realizzate, il tempo trascorso tra campionamento e analisi, e molti altri fattori possono influenzare drammaticamente i risultati. In tutti gli studi che coinvolgono Lo SCA, è necessario avere informazioni dettagliate riguardo al tempo di acquisizione delle immagini, il tempo delle tracce e il numero delle celle da campionare, la profondità della camera di conta utilizzata, la versione del software da utilizzare, il microscopio ottico. Per evidenziare eventuali errori del sistema è, comunque, indispensabile eseguire l'analisi computerizzata in parallelo con quella microscopica.

3.1.2 Fonti di errori nei sistemi SCA

3.1.2.1 Riconoscimento dell'oggetto

In relazione alla grandezza e talora alla forma, l'oggetto (digitalizzato) è considerato come testa di spermatozoo o come oggetto diverso. Se due o più teste nemaspermiche sono in contatto o molto vicine tra loro, potranno essere digitalizzate come un singolo oggetto che, risultando troppo grande per essere considerato come testa di un singolo spermatozoo, sarà eliminato dall'analisi. Inoltre, detriti rifrangenti con dimensioni simili a quelle di una testa di uno spermatozoo, verranno erroneamente considerati come teste nemaspermiche. Questi problemi, comuni a tutti i sistemi computerizzati attualmente disponibili, si traducono in una erronea valutazione della concentrazione spermatica.

3.1.2.2 Movimento

Se due spermatozoi entrano in collisione, essi si ostacoleranno reciprocamente nel loro movimento. Lo stesso problema si presenterà qualora lo spermatozoo contatti grossi frammenti di detriti o un'altra cellula. Nei sistemi SCA, che eliminano le cellule dall'analisi quando queste entrano in collisione o si avvicinano alla stessa posizione, si commette errore, in quanto viene fatta una sottostima della concentrazione nemaspermica. La conseguenza di questi "algoritmi della collisione" è che sono altamente dipendenti dalla concentrazione. Da quanto detto, si evince che questi sistemi computerizzati attualmente disponibili non sono in grado di fornire misurazioni accurate sulla concentrazione degli spermatozoi e sulla loro motilità. Questo però, non deve essere di preclusione alle importanti applicazioni che derivano dai sistemi SCA nell'analisi del movimento degli spermatozoi che si sta rivelando un ulteriore ed importante parametro per la determinazione del potenziale di funzionalità nemaspermica.

4. Esperimenti di citotossicità di NPs-PS di 44-100nm, di NPs-PLGA/PEG di 65nm, NPs-SiO₂ di 20nm su spermatozoi bovini

Colture in vitro di spermatozoi bovini sono state utilizzate per studiare l'eventuale citotossicità di differenti concentrazioni di NPs-PS di 44-100nm, di

NPs-PLGA/PEG di 65nm e NPs-SiO₂ di 20nm sulla motilità totale, progressiva e sui parametri cinetici.

La soluzione spermatica è stata incubata alla concentrazione di 2×10^6 motili/mL in mezzo IVF-TALP in presenza di NPs-PS 44nm (10µg/mL-100µg/mL); di NPs-PS 100nm (10µg/mL-100µg/mL); di PLGA/PEG-NPs da 65nm (10µg/mL-50µg/mL); NPs-SiO₂ di 20nm (10µg/mL-100µg/mL) o delle medesime concentrazioni di surfattante, a 38.8°C, 5% CO₂. I valori della motilità spermatica e dei relativi parametri cinetici sono stati acquisiti mediante l'utilizzo del sistema d'analisi computerizzato (SCA) a intervalli di 1ora. Al termine di ogni incubazione è stata saggiata la vitalità cellulare mediante l'Eosin Test, colorazione capace di evidenziare in rosso gli spermatozoi non vitali.

5. Esperimenti di citotossicità di NPs-PS di 44nm, di NPs-PLGA/PEG di 65nm e di NPs-SiO₂ di 20nm sullo sviluppo embrionale bovino in vitro.

5.1 Fecondazione e sviluppo embrionale bovino in vitro

Una volta maturati in vitro, gruppi selezionati di 50 COCs, sono stati inseminati con 1×10^6 spermatozoi motili/mL, in 500µl di IVF-TALP per 18-20 ore a 38.5°C, 5% CO₂. Successivamente i COCs sono stati trasferiti in 1ml di terreno tamponato con HEPES e agitati per 2 minuti su "vortex" al fine di rimuovere meccanicamente le cellule del cumulo. Gli ovociti sono stati recuperati, lavati in SOF medium (Gardner et al., 1994) supplementato con FCS 5% e incubati in gruppi da 50 in 700µl di SOF in presenza di NPs o della medesima concentrazione di surfattante a 38.5°C, 6% CO₂, 5% O₂, 89% N₂ per 8 giorni. In particolare sono state saggiate differenti concentrazioni di NPs-PS 44nm (10µg/mL-100µg/mL), di NPs-PLGA/PEG 65nm (10µg/mL-50µg/mL), e di NPs-SiO₂ 20nm (10µg/mL-100µg/mL).

La percentuale di segmentazione è stata valutata allo stereomicroscopio al giorno +3 di sviluppo. Al giorno +8 di sviluppo, gli embrioni sono stati fissati in paraformaldeide 4% per 4ore a RT e sottoposti a marcatura con il colorante nucleare Hoechst 33342 10µg/mL per 7 min a RT. Gli embrioni fissati sono stati posti su vetrini portaoggetto per l'osservazione al microscopio invertito a epifluorescenza (Nikon TE 2000) e confocale (Leica TS SP5) con laser 405 (UV/HOECHST), 488 (green) e 543 (red). È stata valutata l'internalizzazione

delle NPs fluorescenti, le percentuali di segmentazione, le percentuali di sviluppo allo stadio embrionale di 8 cellule e di blastocisti. La qualità delle blastocisti è stata valutata in termini di numero medio di cellule e di percentuali di nuclei con DNA frammentato.

5.2. *Tunel assay*

Il saggio Tunel (terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP nick-end labeling) è stato effettuato su blastocisti, al fine di analizzare la percentuale di frammentazione del DNA dopo trattamento con le diverse NPs.

Al giorno +8 di sviluppo, le blastocisti sono state fissate in paraformaldeide per 4ore a RT, lavate in PBS supplementato con 3mg/mL polvinil alcool (PVA) e incubate in sodio citrato 0,1% supplementato con Triton X 100 0.1% per 30min a 4°C (Gualtieri et al., 2009). Successivamente gli embrioni sono stati lavati per 3 volte con PBS-PVA e incubati con la soluzione Tunel (Invitrogen) per 1 ora a 37°C. Dopo tale incubazione gli embrioni sono stati lavati in PBS-PVA, colorati con Hoechst 33342 1µg/mL per 30min a RT e allestiti per l'osservazione al microscopio a epifluorescenza (Nikon) e al microscopio confocale Leica TS SP5, al fine di valutare la qualità delle blastocisti in termini di percentuale di nuclei con DNA frammentato.

6. *Analisi statistica*

I dati sono stati valutati mediante il modello dell'analisi della varianza (ANOVA) seguita dal test delle differenze significative di Tukey per i confronti tra più campioni. I dati in percentuale sono stati comparati mediante il test χ^2 o test esatto di Fisher. I dati statisticamente significativi sono stati definiti come $P < 0.05$, mentre quelli altamente significativi come $P < 0.01$.

RISULTATI

1. *Misure di determinazione del potenziale zeta e della taglia delle nanoparticelle*

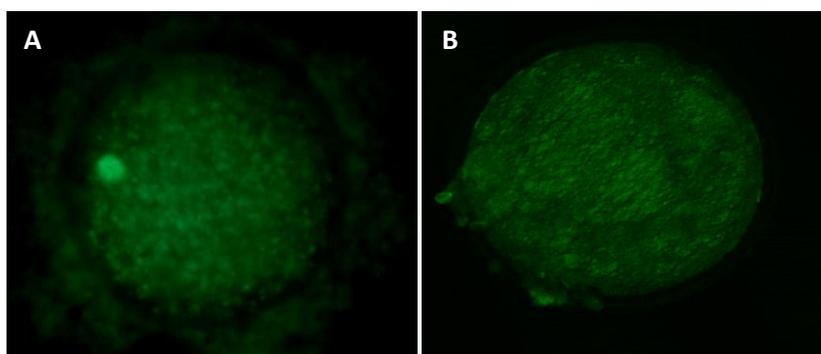
I valori delle analisi al DLS delle NPs-PS da 44nm e NPs PLGA/PEG 65nm sono di seguito riportati (Fig. 34).

	ζ potenziale zeta (mV)	Taglia (nm)	PDI (indice di polidispersità)
NPs-PS 44nm	-25.25 ± 5.26	43.67 ± 1.08	0.09
NPs-PLGA/PEG 65nm	-33.42 ± 2.66	65.71 ± 1.12	0.08

Fig. 34: Valori del potenziale zeta, della taglia e dell'indice di polidispersità di NPs-PS da 44nm e NPs-PLGA/PEG da 65nm ottenuti mediante analisi DLS

2. Internalizzazione di NPs-PS 44-100nm e NPs-PLGA/PEG 65nm in ovociti bovini

Le immagini al microscopio confocale mostrano che le NPs-PS da 44nm fluorescenti nel verde sono efficientemente internalizzate sia nelle cellule del cumulo che nel citoplasma degli ovociti bovini maturi dopo 1ora di incubazione. In particolare il segnale si presenta diffuso e omogeneo (Fig. 35 A, B). In contrasto le NPs-PS fluorescenti nel rosso da 100nm dopo 1ora e fino a un massimo di 15ore non sono internalizzate né dalle cellule del cumulo né dall'ovocita (Fig. 35 C, D). Le NPs-PLGA/PEG coniugate a rodamina da 65nm sono internalizzate sia nelle cellule del cumulo che nel citoplasma degli ovociti bovini maturi dopo 1ora di incubazione, ma a differenza delle NPs-PS da 44nm, il segnale fluorescente si presenta per la maggior parte sottoforma di "cluster" (Fig. 35 E, F).



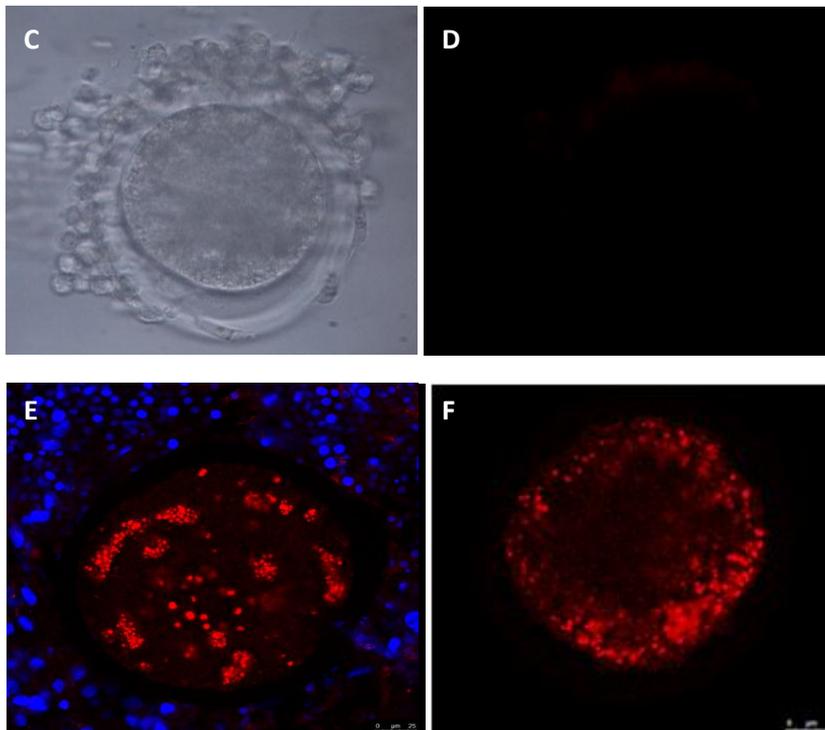
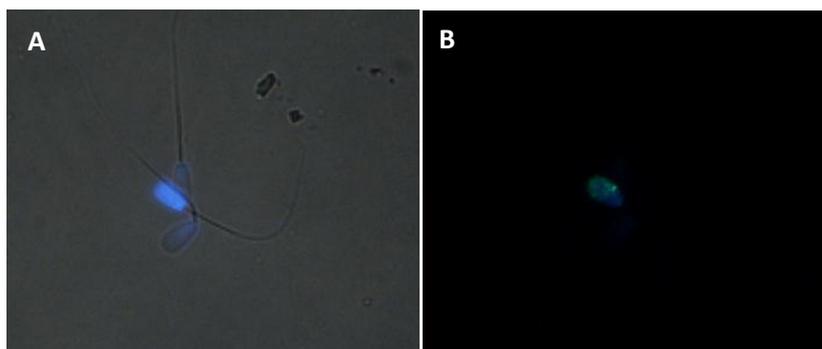


Fig. 35: Internalizzazione di NPs-PS da 44nm (A,B) e 100nm (C,D) e di NPs-PLGA/PEG da 65nm (E,F) in COCs o ovociti bovini maturi, rispettivamente, dopo 1h di incubazione. (blu nuclei; verde NPs-PS 44nm; rosso NPs-PLGA/PEG 65nm).

3. Internalizzazione di NPs-PS 44-100nm e NPs-PLGA/PEG 65nm in spermatozoi bovini

Immagini al microscopio a epifluorescenza evidenziano che sia le NPs-PS da 44nm, che da 100nm fino a 5h di incubazione non sono internalizzate dagli spermatozoi bovini vitali, ma bensì esclusivamente da spermatozoi con membrana plasmatica destabilizzata, come evidenziato dalla colorazione nucleare con Hoechst 33258. In contrasto le NPs-PLGA/PEG coniugate a rodamina da 65nm risultano internalizzate unicamente dagli spermatozoi bovini vitali dopo 1ora di incubazione, in particolar modo il segnale si evidenzia in corrispondenza esclusivamente del tratto intermedio (Fig. 36).



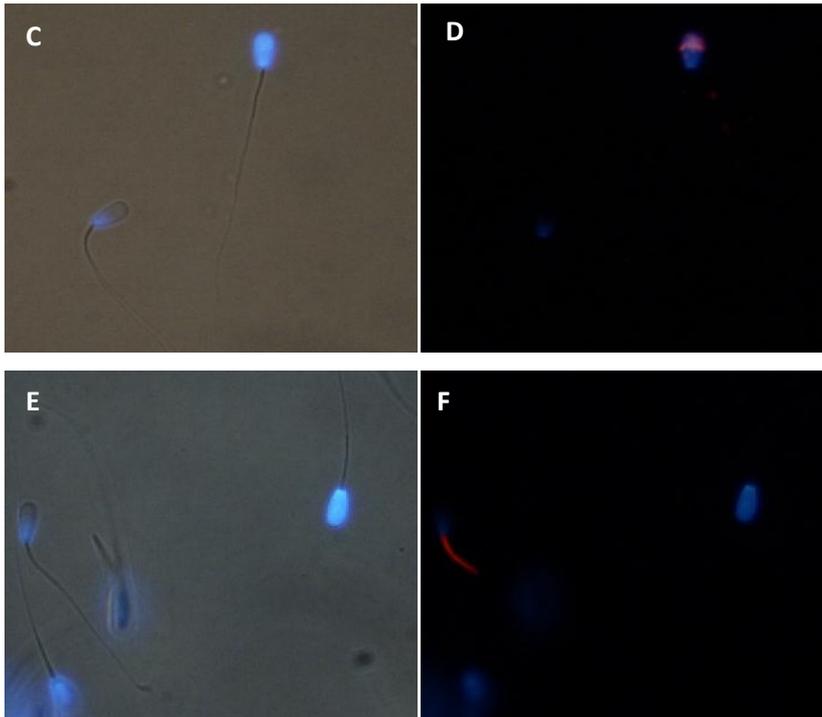


Fig. 36: spermatozoi bovini incubati in presenza di NPs-PS da 44nm (A, B) e 100nm (C, D) e NPs-PLGA/PEG da 65nm (E,F). (blu nuclei; verde NPs-PS 44nm; rosso NPs-PS 100nm e NPs-PLGA/PEG 65nm).

4. Esperimenti di citotossicità di NPs sulla cinetica e vitalità di spermatozoi bovini.

4.1 NPs-PS di 44-100nm

Le analisi allo SCA della cinetica spermatica evidenziano una riduzione altamente significativa della percentuale di spermatozoi motili totali e progressivi di circa il 20% dopo 3 ore di incubazione in presenza di NPs-PS da 44nm sia alla concentrazione di 10 μ g/mL che di 100 μ g/mL. Dopo 4 ore di incubazione la motilità dei campioni trattati con la concentrazione più bassa (10 μ g/mL) di NPs rimane invariata, mentre si riduce significativamente del 40% in seguito trattamento con la più alta concentrazione (100 μ g/mL).

A 5 ore dall'incubazione si verifica un abbassamento altamente significativo della motilità totale e progressiva di circa il 40% e il 50% in seguito a trattamento con NPs alla concentrazione di 10 e di 100 μ g/mL, rispettivamente (Fig. 37, 38). Dopo 5 ore di incubazione a tali decrementi della motilità corrispondeva una riduzione della vitalità di circa 1 volta (10 μ g/mL) e 1,5 volte (100 μ g/mL) rispetto ai relativi controlli. Per quanto riguarda i parametri cinetici, nessuna differenza significativa è riscontrata in

seguito a trattamento dei campioni con le differenti concentrazioni di NPs-PS da 44nm (Fig. 39-41).

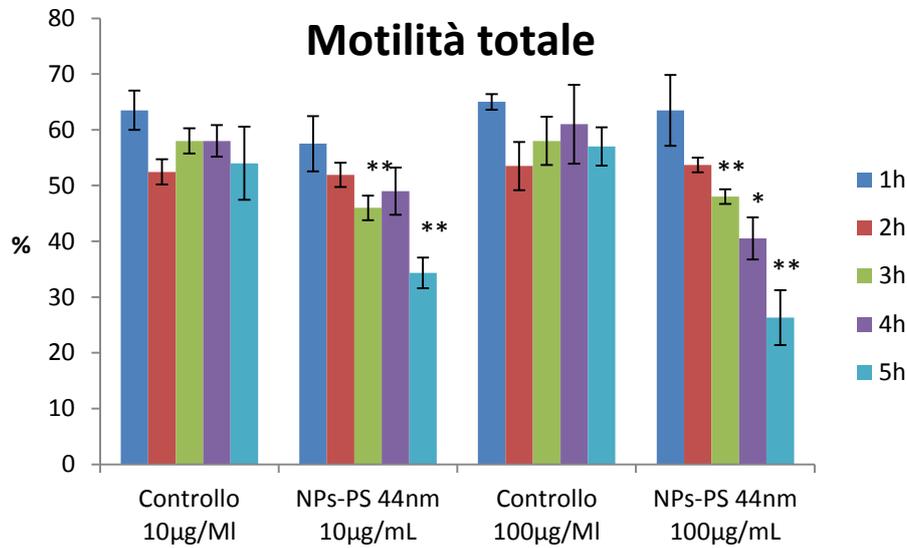


Fig. 37: % della Motilità totale di spermatozoi bovini nel tempo, in seguito a incubazione in assenza (controllo) o presenza di NPs-PS 44nm 10µg/mL o 100µg/mL.

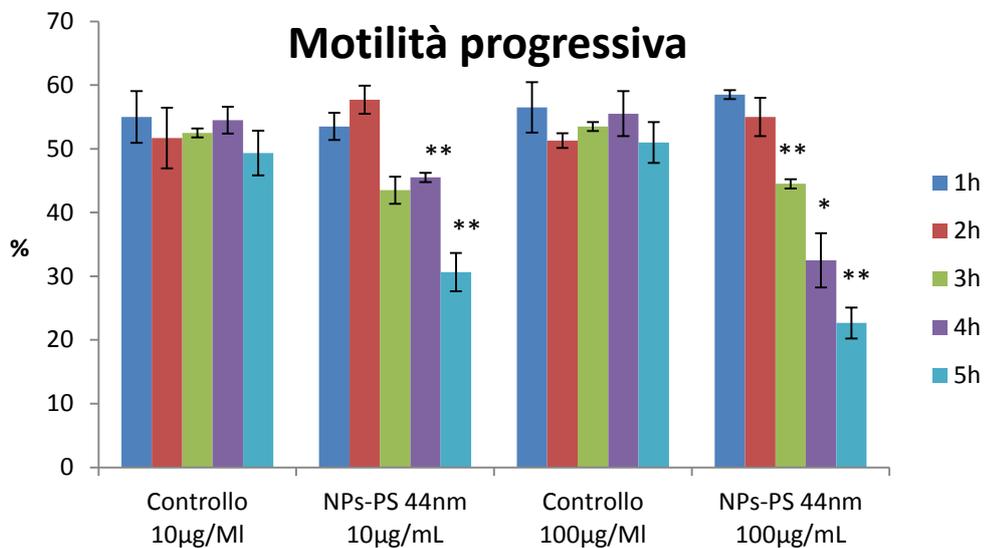


Fig. 38: % della Motilità progressiva di spermatozoi bovini nel tempo, in seguito a incubazione in assenza (controllo) o presenza di NPs-PS 44nm 10µg/mL o 100µg/mL.

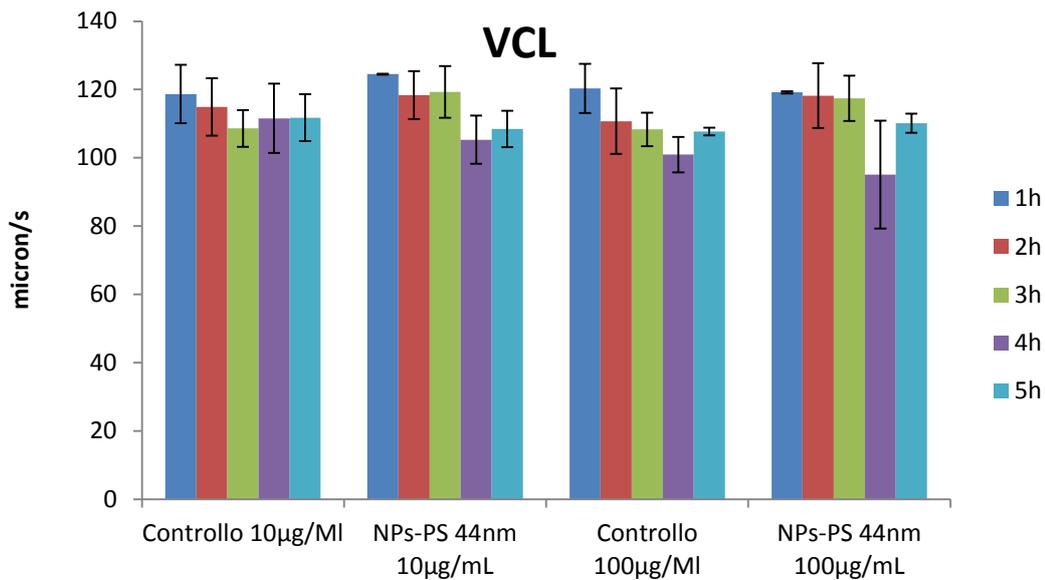


Fig. 39: % della Velocità curvilinea (VCL) di spermatozoi bovini nel tempo, in seguito a incubazione in assenza (controllo) o presenza di NPs-PS 44nm 10µg/mL o 100µg/mL.

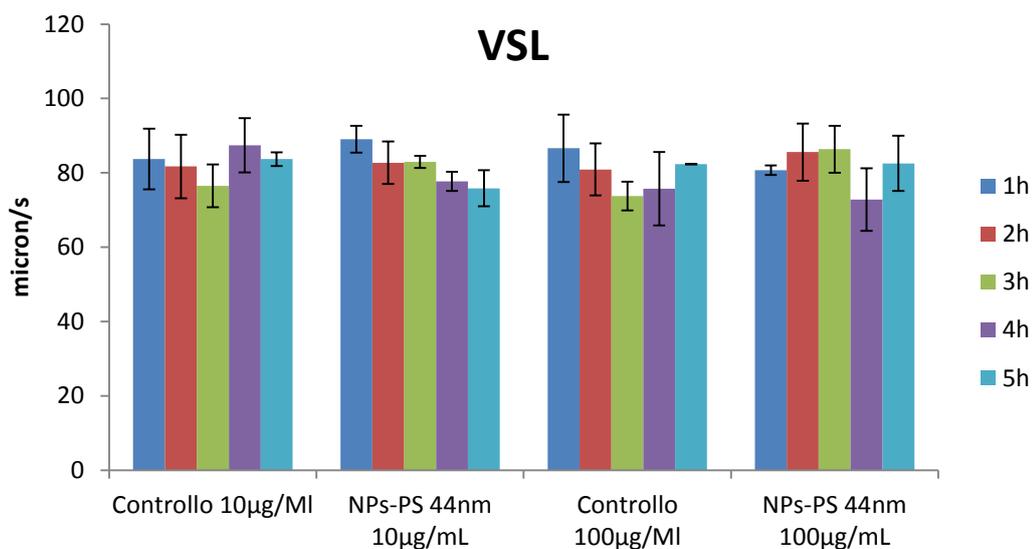


Fig. 40: % della Velocità lineare (VSL) di spermatozoi bovini nel tempo, in seguito a incubazione in assenza (controllo) o presenza di NPs-PS 44nm 10µg/mL o 100µg/mL.

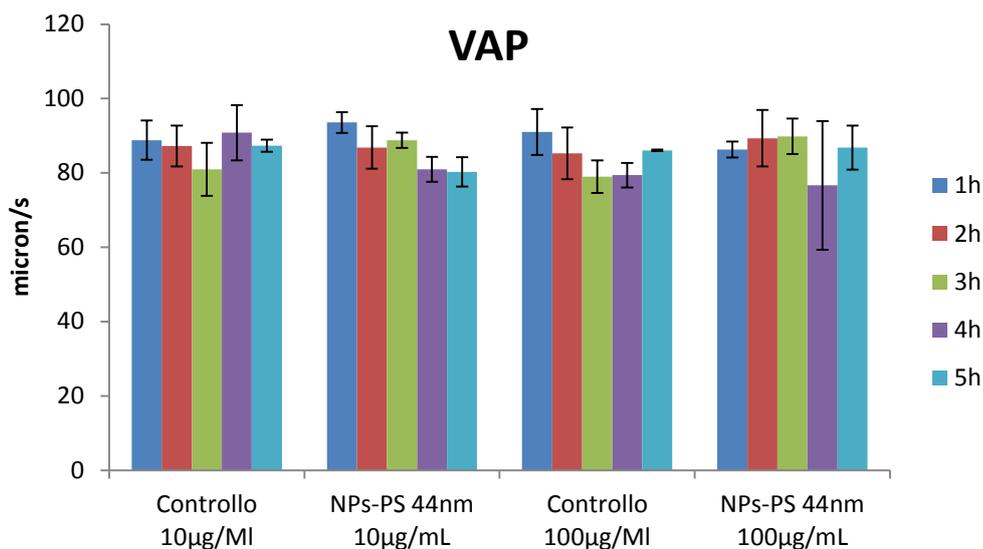


Fig. 41: % della Velocità media (VAP) di spermatozoi bovini nel tempo, in seguito a incubazione in assenza (controllo) o presenza di NPs-PS 44nm 10µg/mL o 100µg/mL.

Per quanto concerne il trattamento del liquido seminale con NPs-PS da 100nm alla concentrazione di 10 e 100µg/mL, i risultati evidenziano una riduzione significativa della percentuale di spermatozoi motili totali e progressivi di circa il 20% a partire dalle 2ore e fino alle 3ore di incubazione esclusivamente alla concentrazione più bassa (10µg/mL). Dopo 4ore e fino a 5ore d'incubazione si evidenzia una riduzione altamente significativa di circa il 40% e il 30%, rispettivamente, della motilità spermatica totale e progressiva in seguito a trattamento con la concentrazione di 10µg/mL (Fig. 42,43). Dopo 5 ore di incubazione a tali decrementi della motilità corrisponde una riduzione della vitalità di circa 1 volta rispetto ai relativi controlli.

Per quanto riguarda i parametri cinetici, una riduzione altamente significativa di circa il 15% è riscontrata dopo 3ore di incubazione in seguito a trattamento dei campioni con le NPs-PS da 100nm alla concentrazione di 10µg/mL (Fig. 44-46).

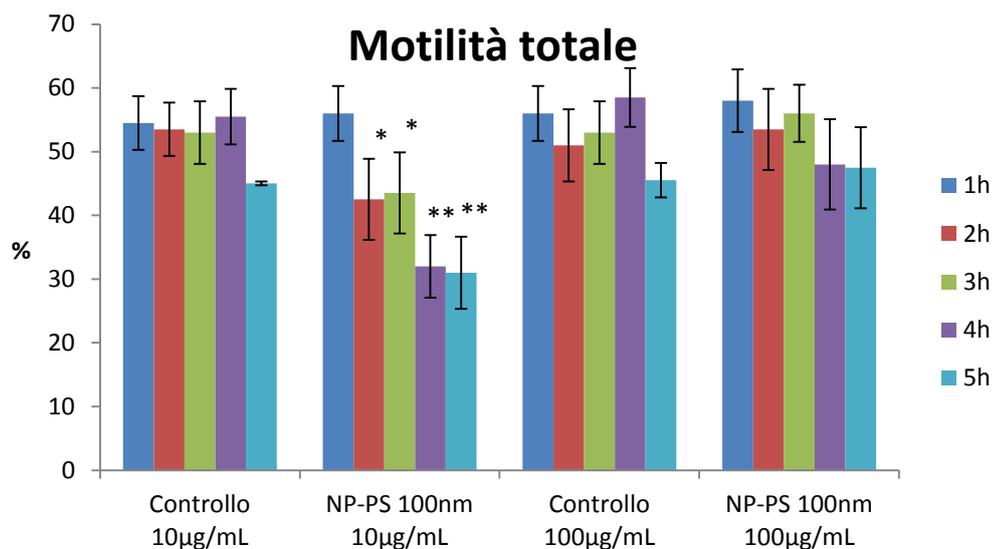


Fig. 42: % della Motilità totale di spermatozoi bovini nel tempo, in seguito a incubazione in assenza (controllo) o presenza di NPs-PS 100nm 10µg/mL o 100µg/mL.

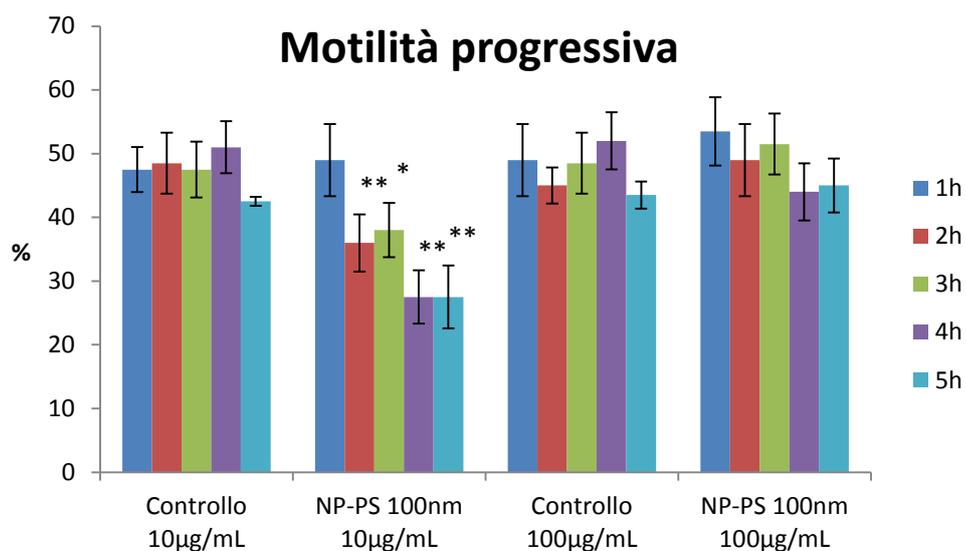


Fig. 43: % della Motilità progressiva di spermatozoi bovini nel tempo, in seguito a incubazione in assenza (controllo) o presenza di NPs-PS 100nm 10µg/mL o 100µg/mL.

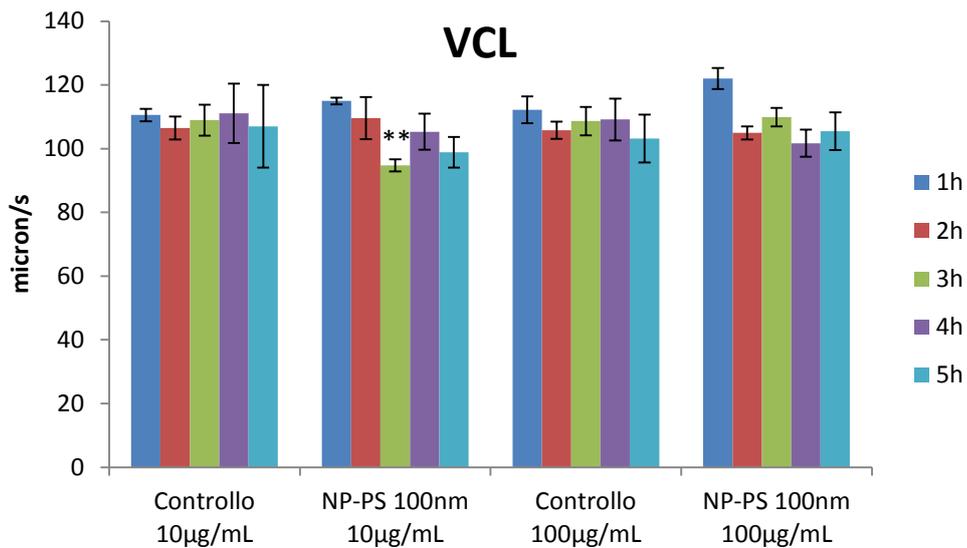


Fig. 44: % della Velocità curvilinea (VCL) di spermatozoi bovini nel tempo, in seguito a incubazione in assenza (controllo) o presenza di NPs-PS 100nm 10µg/mL o 100µg/mL.

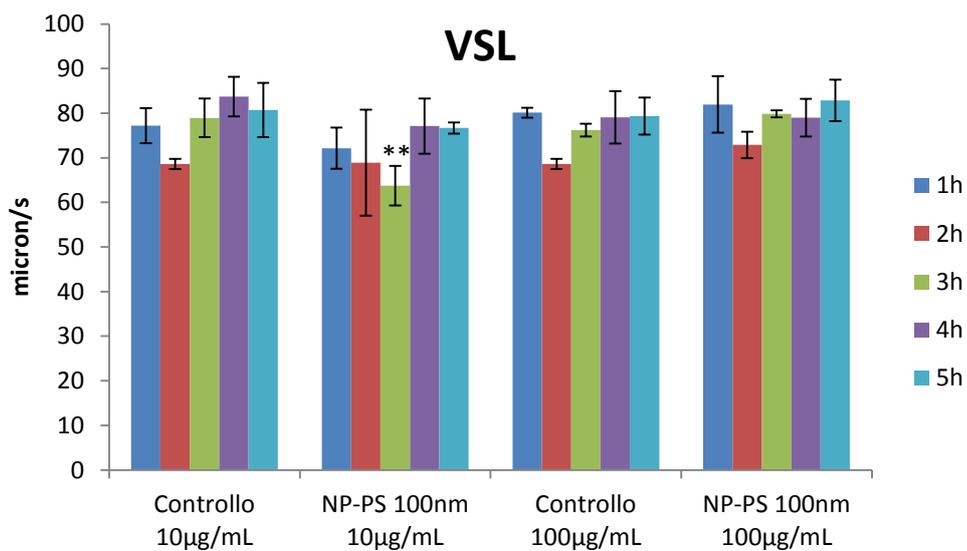


Fig. 45: % della Velocità lineare (VSL) di spermatozoi bovini nel tempo, in seguito a incubazione in assenza (controllo) o presenza di NPs-PS 100nm 10µg/mL o 100µg/mL.

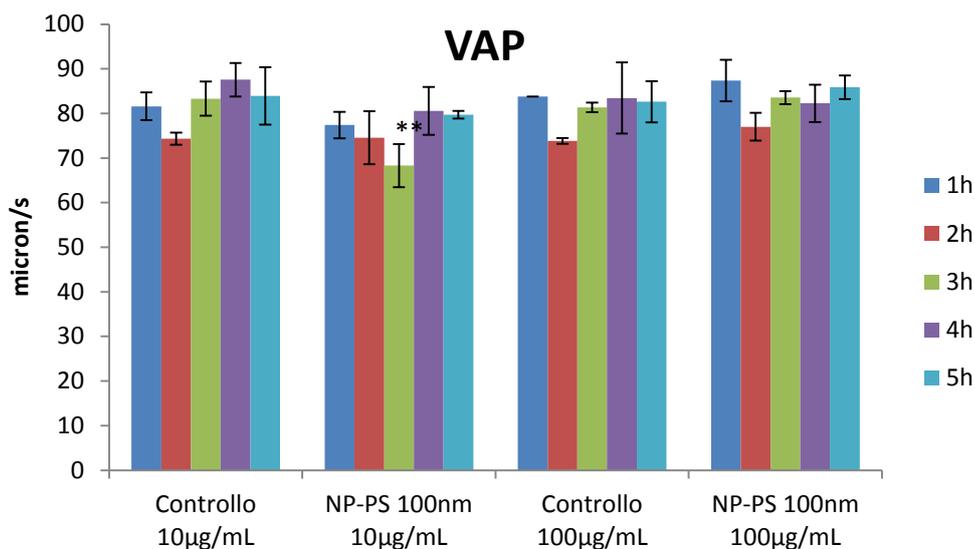


Fig. 46: % della Velocità media (VAP) di spermatozoi bovini nel tempo, in seguito a incubazione in assenza (controllo) o presenza di NPs-PS 100nm 10µg/mL o 100µg/mL.

4.2. NPs-PLGA/PEG di 65nm

Le analisi allo SCA della cinetica spermatica mostrano una riduzione altamente significativa della percentuale di spermatozoi motili totali e progressivi di circa il 40% dopo 4 ore e fino a 5 ore di incubazione in presenza di NPs-PLGA/PEG da 65nm esclusivamente alla concentrazione più alta (50µg/mL) (Fig. 47,48). Dopo 5 ore di incubazione a tali decrementi della motilità corrisponde una riduzione della vitalità di circa 1,2 volte rispetto ai relativi controlli. Per quanto riguarda i parametri cinetici, una riduzione significativa del valore di VCL di circa il 25% è riscontrata dopo 4 ore in seguito a trattamento con la concentrazione di 10µg/mL e di circa il 10% di tutti i parametri dopo 5ore di trattamento sia con NPs alla concentrazione di 10 che di 50µg/mL (Fig. 49-51).

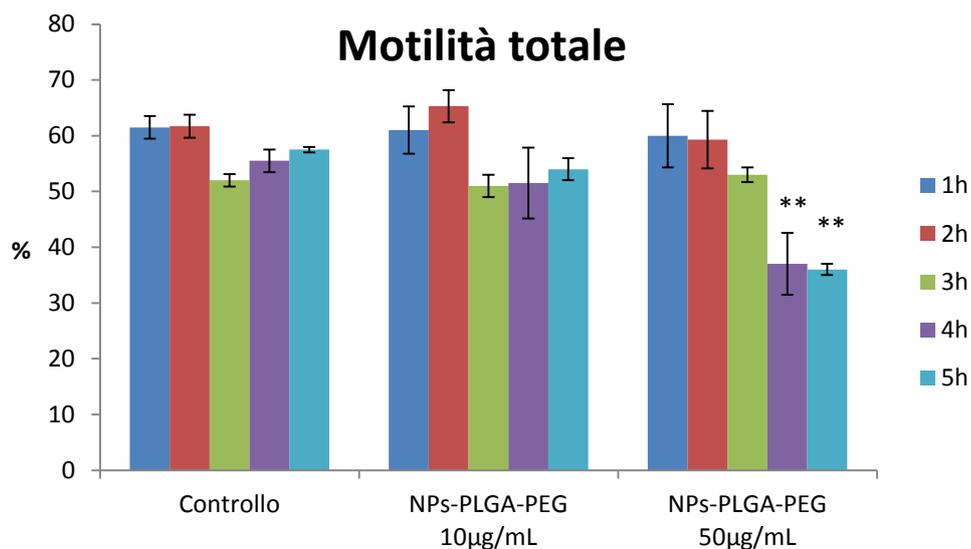


Fig. 47: % della Motilità totale di spermatozoi bovini nel tempo, in seguito a incubazione in assenza (controllo) o presenza di NPs-PLGA/PEG 65nm 10µg/mL o 50µg/mL.

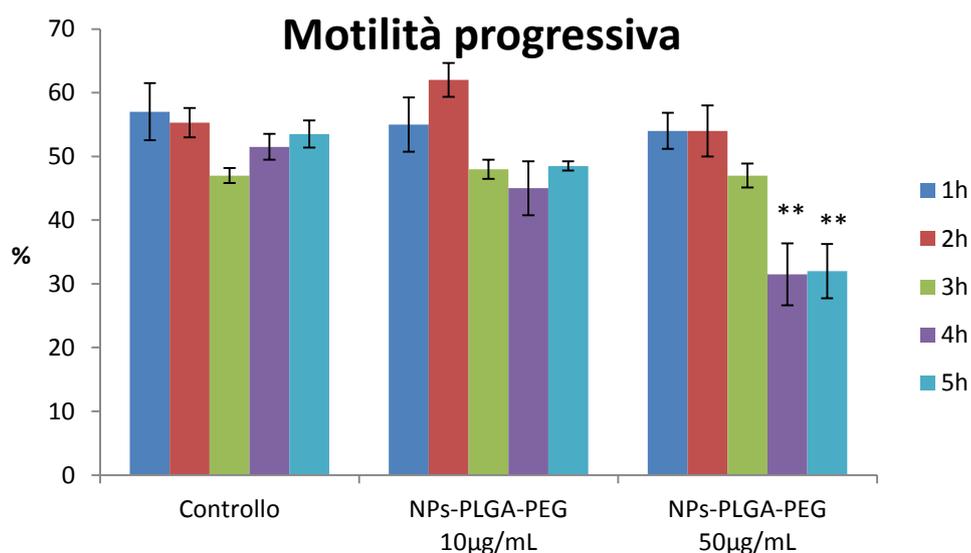


Fig. 48: % della Motilità progressiva di spermatozoi bovini nel tempo, in seguito a incubazione in assenza (controllo) o presenza di NPs-PLGA/PEG 65nm 10µg/mL o 50µg/mL.

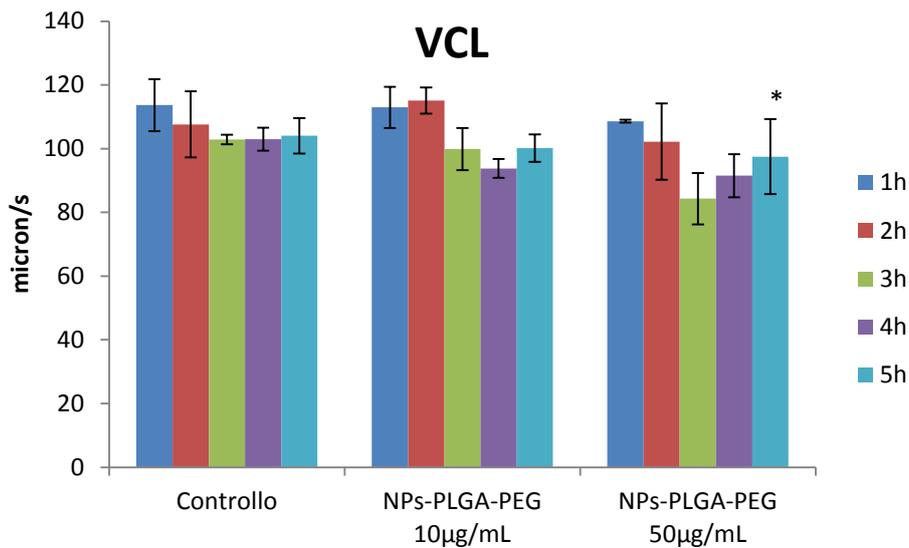


Fig. 49: % della Velocità curvilinea (VCL) di spermatozoi bovini nel tempo, in seguito a incubazione in assenza (controllo) o presenza di NPs-PLGA/PEG 65nm 10µg/mL o 50µg/mL.

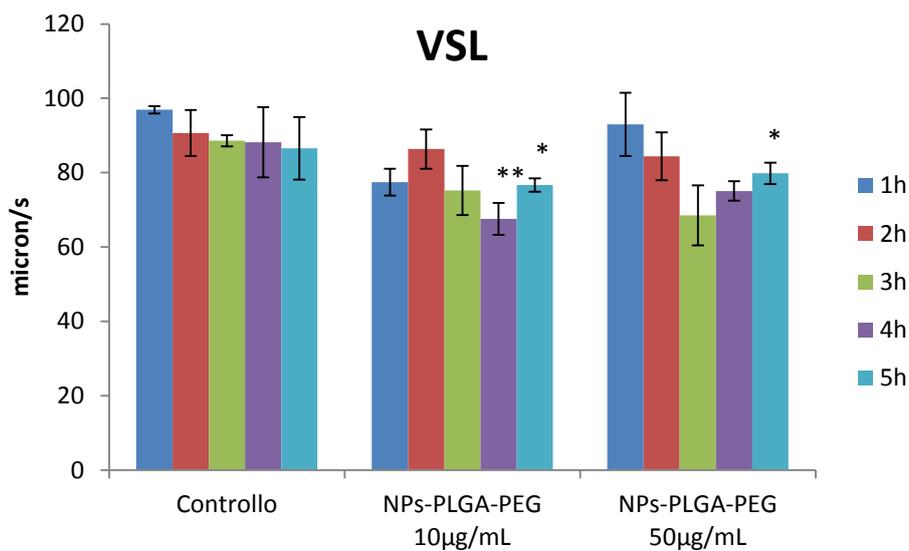


Fig. 50: % della Velocità lineare (VSL) di spermatozoi bovini nel tempo, in seguito a incubazione in assenza (controllo) o presenza di NPs-PLGA/PEG 65nm 10µg/mL o 50µg/mL.

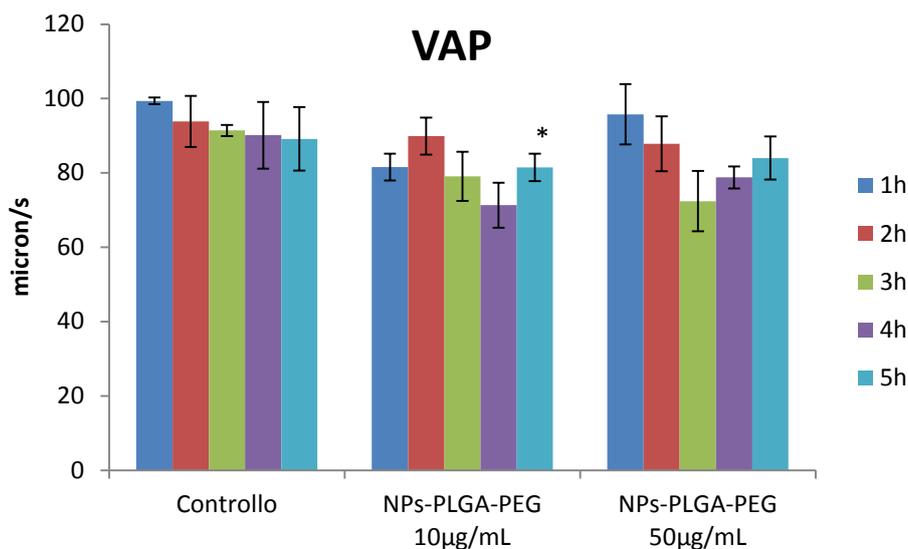


Fig. 51: % della Velocità media (VAP) di spermatozoi bovini nel tempo, in seguito a incubazione in assenza (controllo) o presenza di NPs-PLGA/PEG 65nm 10µg/mL o 50µg/mL.

4.3. NPs-SiO₂ di 20nm

Le analisi computerizzate della cinetica spermatica evidenziano una riduzione significativa della percentuale di spermatozoi motili progressivi di circa il 20% dopo 2 ore di incubazione in presenza di NPs-SiO₂ 20nm alla concentrazione più alta di 100µg/mL.

Dopo 3 ore di trattamento con tale concentrazione di NPs si riscontra un decremento altamente significativo della percentuale di spermatozoi motili totali e progressivi di circa il 50%, che aumenta al 60% circa dopo 4 ore, per poi stabilizzarsi al 50% dopo 5 ore. Solo dopo 4 ore si evidenzia una riduzione significativa di circa il 30% anche della motilità totale e progressiva dei campioni trattati con NPs-SiO₂ 20nm alla concentrazione più bassa di 10µg/mL, che non subisce, però, ulteriori variazioni fino a 5 ore di trattamento (Fig. 52,53). Dopo 4 e 5 ore di incubazione a tali decrementi della motilità corrisponde una riduzione della vitalità di circa 1 volta (10µg/mL) e 1,5 volte (100µg/mL) rispettivamente, rispetto ai relativi controlli.

Per quanto riguarda i parametri cinetici, una riduzione significativa di circa il 15% è riscontrata dopo 3ore in seguito a trattamento dei campioni con NPs alla concentrazione di 100µg/mL. Dopo 4 ore si evidenzia una riduzione significativa del 20% e del 10% circa in seguito a incubazione con NPs-SiO₂ 20nm alla concentrazione di 10µg/mL e 100µg/mL, rispettivamente. A 5 ore si riscontra

decremento significativo del 30% e 40% circa in seguito a trattamento dei campioni con NPs-SiO₂ 20nm alla concentrazione di 10 e 100µg/mL, rispettivamente (Fig. 54-56).

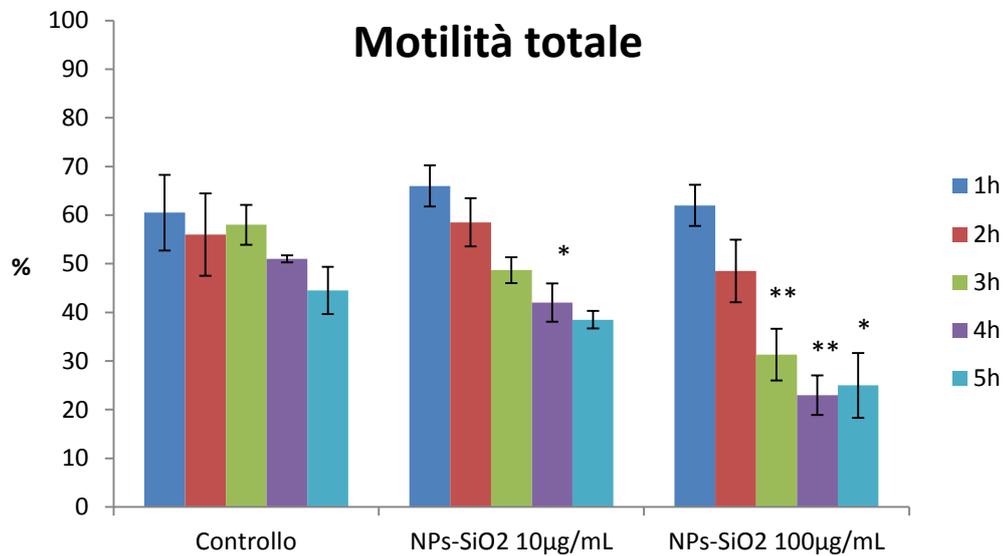


Fig. 52: % della Motilità totale di spermatozoi bovini nel tempo, in seguito a incubazione in assenza (controllo) o presenza di NPs-SiO₂ 20nm 10µg/mL o 100µg/mL.

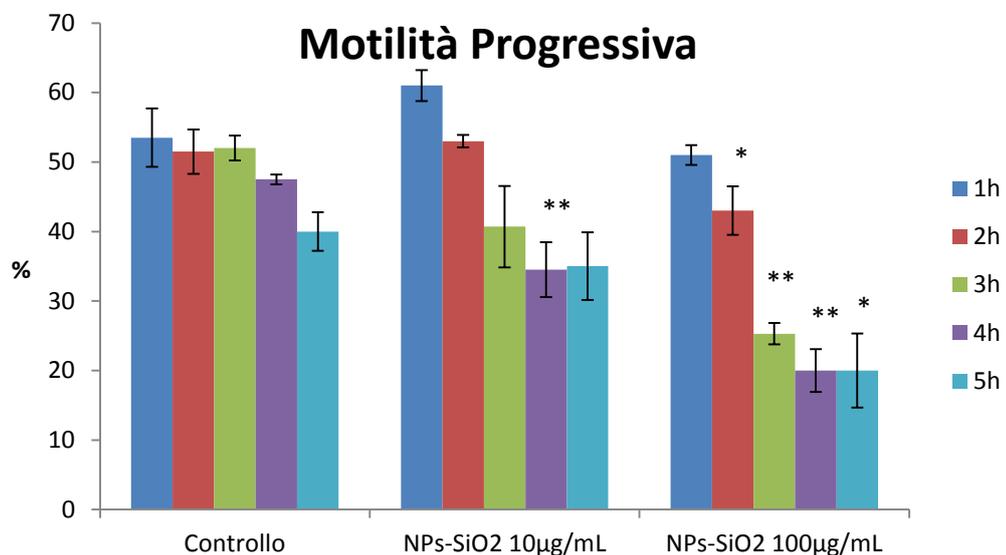


Fig. 53: % della Motilità progressiva di spermatozoi bovini nel tempo, in seguito a incubazione in assenza (controllo) o presenza di NPs-SiO₂ 20nm 10µg/mL o 100µg/mL.

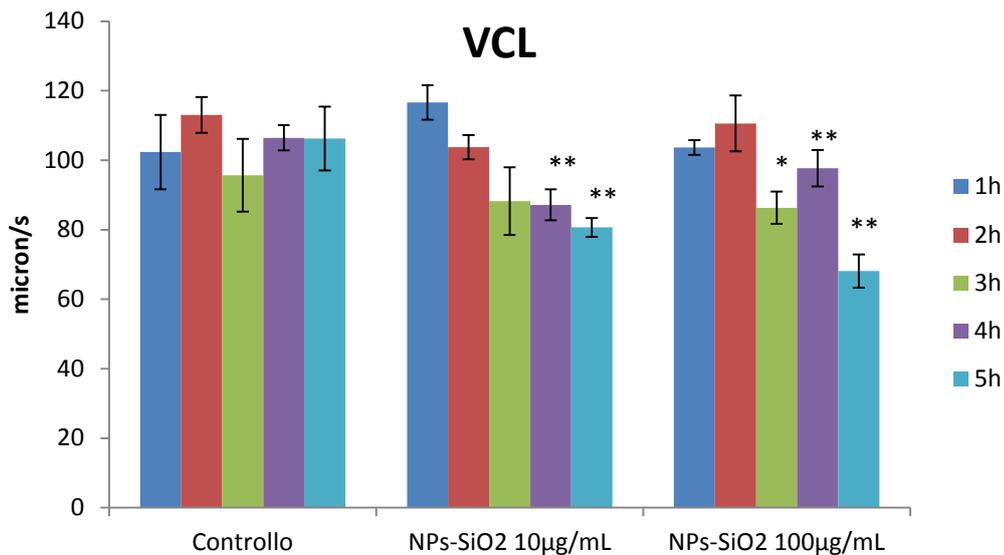


Fig. 54: % della velocità curvilinea (VCL) di spermatozoi bovini nel tempo, in seguito a incubazione in assenza (controllo) o presenza di NPs-SiO₂ 20nm 10µg/mL o 100µg/mL.

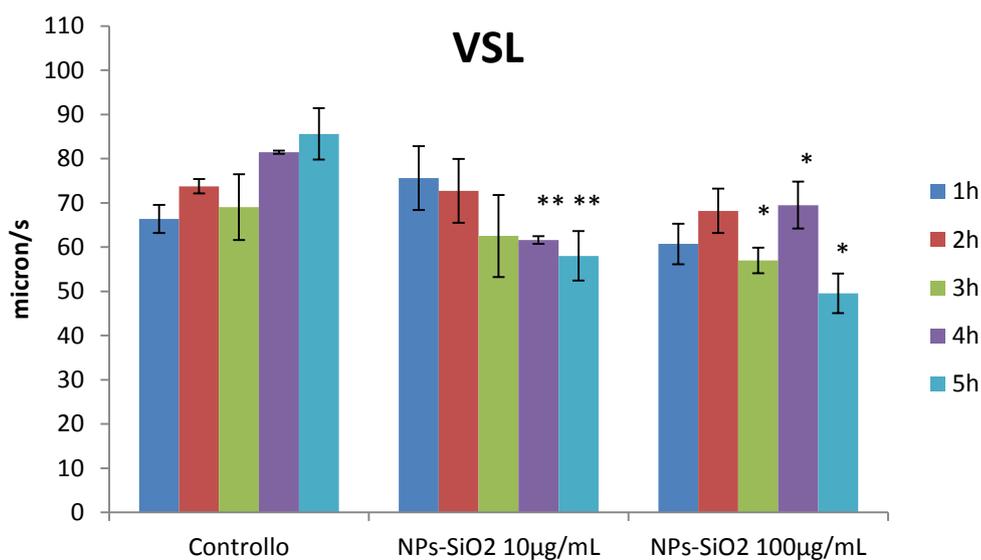


Fig. 55: % della velocità lineare (VSL) di spermatozoi bovini nel tempo, in seguito a incubazione in assenza (controllo) o presenza di NPs-SiO₂ 20nm 10µg/mL o 100µg/mL.

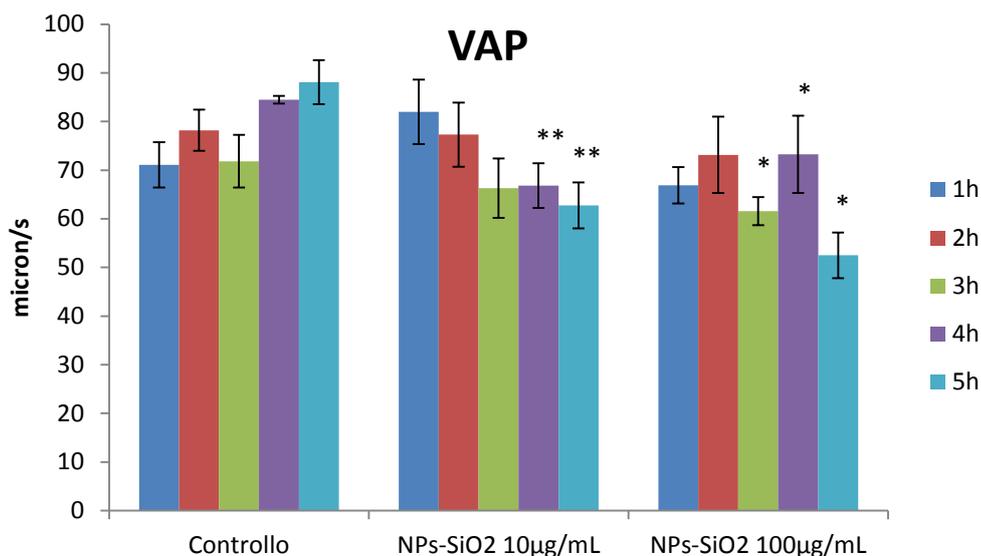


Fig. 56: % della velocità media (VAP) di spermatozoi bovini nel tempo, in seguito a incubazione in assenza (controllo) o presenza di NPs-SiO₂ 20nm 10µg/mL o 100µg/mL.

5. Esperimenti di citotossicità di NPs-PS di 44nm, NPs-PLGA/PEG-rod 65nm e NPs-SiO₂ di 20nm sullo sviluppo embrionale bovino in vitro.

Lo studio è stato effettuato su un totale di 1524 COCs.

Lo “z-sectioning” al microscopio confocale mostra che le NPs-PS 44nm (Fig. 57 A, B) e NPs-PLGA/PEG 65nm (Fig. 57 D, E) sono efficientemente internalizzate dagli embrioni fino allo stadio di blastocisti (giorno +8 di sviluppo), con localizzazione esclusivamente citoplasmatica. In particolare le NPs-PS 44nm presentano un segnale verde diffuso, mentre le NPs-PLGA/PEG-rod 65nm un segnale rosso sottoforma di “cluster”, come evidenziato dalle immagini ad alto ingrandimento (obiettivo 63x, zoom 3,9) (Fig. 57 E). Tale dato risulta confermato dalle analisi ultrastrutturali al microscopio elettronico a trasmissione, che mostrano NPs sottoforma di “cluster” localizzate in vescicole e vacuoli citoplasmatici (Fig. 58 B, C, D).

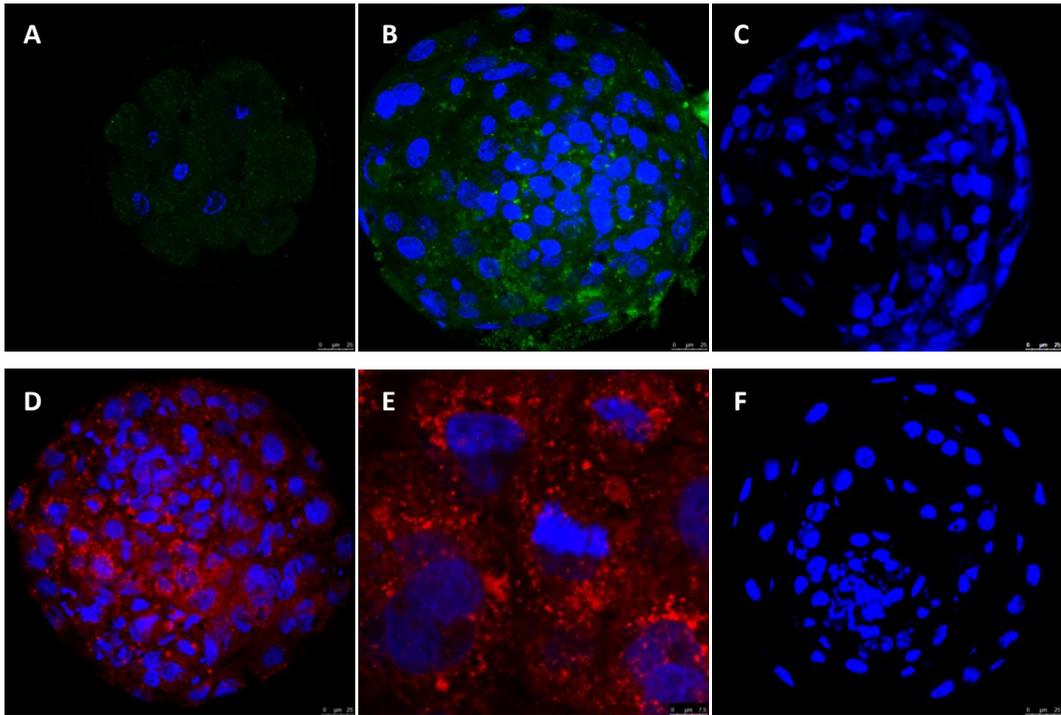


Fig. 57: Immagini al microscopio confocale di embrioni bovini trattati dal giorno +1 in presenza di : NPs-PS 44nm (A morula, B blastocisti) o in assenza (C); NPs-PLGA/PEG 65nm (D,E), o in assenza (F). Barra 25um (A, B, C, D, F); 7,5 um (E). (blu nuclei, verde NPs-PS 44nm, rosso NPs-PLGA/PEG 65nm)

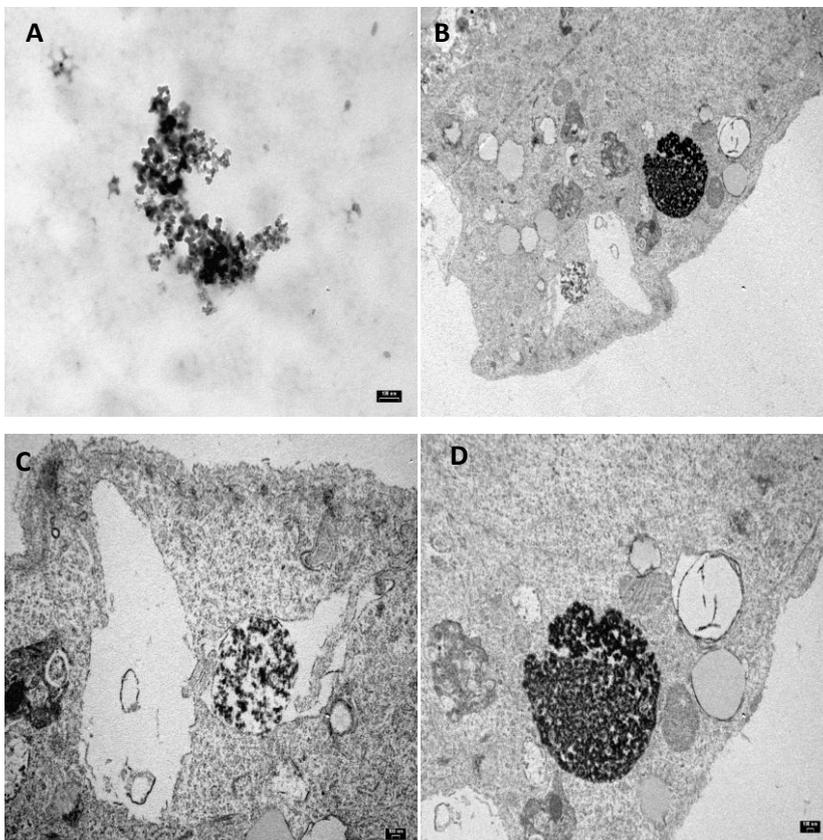


Fig 58: Localizzazione di NPs-PLGA/PEG-rod 65nm in blastocisti bovine, mediante microscopia elettronica a trasmissione (B,C,D). Sospensione di NPs-PLGA/PEG-rod 65nm assolute (A). Barra 100nm.

Il trattamento degli embrioni, al giorno +1 di sviluppo, con differenti concentrazioni di NPs-PS 44nm (10µg/mL-100µg/mL), NPs-PLGA/PEG 65nm (10µg/mL-50µg/mL) e NPs-SiO₂ 20nm (10µg/mL-100µg/mL) non influenza la loro competenza di segmentazione valutata al giorno +3 di sviluppo, rispetto ai campioni controllo. Tuttavia i risultati mostrano un effetto citotossico esclusivamente delle più alte concentrazioni di NPs sullo sviluppo embrionale fino allo stadio di 8 cellule (giorno +3) e di blastocisti (giorno +8). In particolare nel caso del trattamento con NPs-PS 44nm 100µg/mL le percentuali risultano essere per le 8 cellule: trattato 28,4% vs controllo 64,3% (riduzione del 62%), P<0,01; e per le blastocisti: trattato 13,7% vs controllo 25% (riduzione del 45%) P=0,05 (Fig. 59). In seguito a trattamento con NPs-PLGA/PEG 65nm 50µg/mL le percentuali risultano essere per le 8 cells: trattato 40% vs controllo 60% (riduzione del 44%), P<0,05; e per le blastocisti: trattato 34% vs controllo 46,6% (riduzione del 28%), P<0,05 (Fig. 60); mentre in seguito ad incubazione con NPs-SiO₂ 20nm 100µg/mL risultano 8 cells: trattato 45,9% vs controllo 68,4% (riduzione del 33%), P<0,01; e blastocisti: trattato 17,8% vs controllo 44,2% (riduzione del 60%), P<0,01) (Fig. 61).

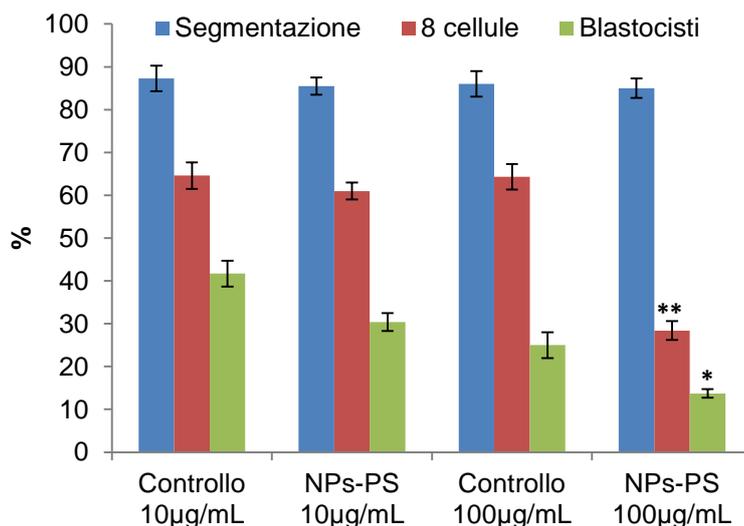


Fig. 59: Percentuali di segmentazione, di embrioni a 8 cellule e di blastocisti, in assenza (controllo) o presenza di NPs-PS 44nm alle concentrazioni di 10µg/mL e 100µg/mL.

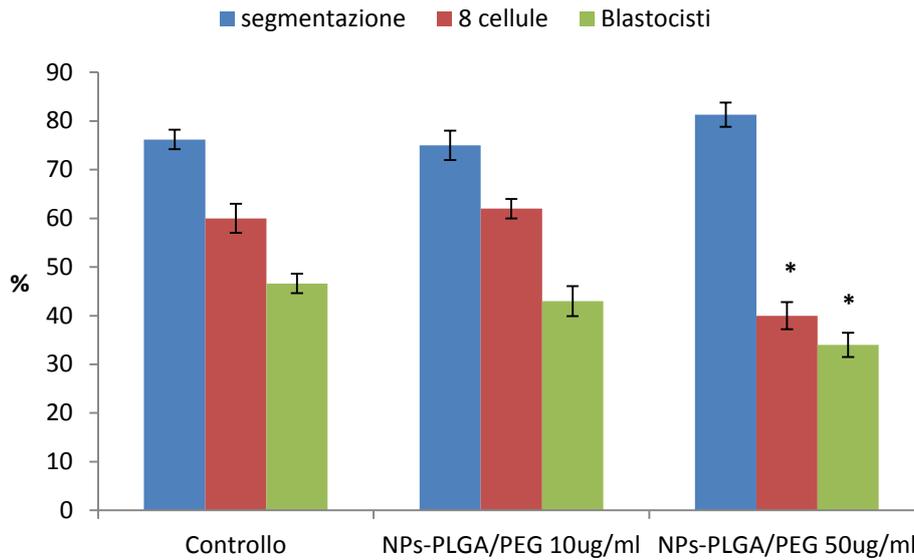


Fig. 60: Percentuali di segmentazione, di embrioni a 8 cellule e di blastocisti, in presenza di NPs-PLGA/PEG 65nm alle concentrazioni di 10µg/mL e 50µg/mL o in assenza (controllo).

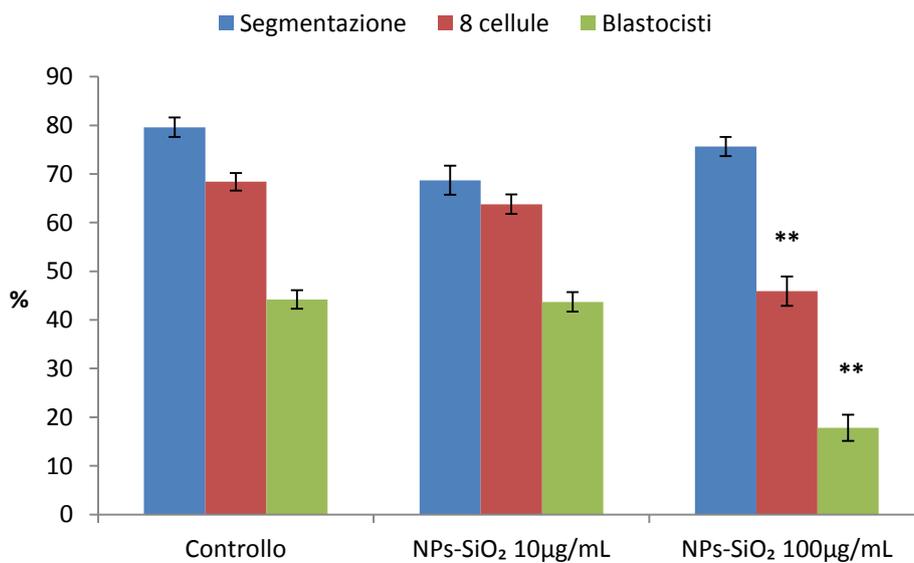


Fig. 61: Percentuali di segmentazione, di embrioni a 8 cellule e di blastocisti, in presenza di NPs-SiO₂ 20nm alle concentrazioni di 10µg/mL e 100µg/mL o in assenza (controllo).

La qualità delle blastocisti è stata analizzata valutando il numero medio di cellule e, mediante “Tunel assay”, la percentuale di nuclei con DNA frammentato. I dati ottenuti indicano che, in presenza di alte concentrazioni di NPs, nonostante la percentuale di sviluppo a blastocisti sia significativamente diminuita, la qualità delle blastocisti ottenute non differisce per numero di cellule e frammentazione del DNA rispetto ai controlli (Fig. 62, 63, 64).

<i>Numero medio di cellule delle blastocisti</i>	NPs-PS 100µg/mL	NPs- PLGA/PEG 50µg/mL	NPs-SiO₂ 100µg/mL
Controllo	103,43±44,57	132±65	102±33
Trattato	98,36±29,64	134± 40	116,5±35,6

Fig. 62: Numero medio di cellule delle blastocisti ottenute in assenza (controllo) o in presenza di NPs-PS 44nm 100µg/mL, NPs-PLGA/PEG 65nm 50µg/mL, NPs-SiO₂ 20nm 100µg/mL.

<i>% di nuclei delle blastocisti con DNA frammentato</i>	NPs-PS 100µg/mL	NPs- PLGA/PEG 50µg/mL	NPs-SiO₂ 100µg/mL
Controllo	8,3%±3,7	7,09%±4,14	9,68%±4,46
Trattato	7,9%±3,3	7,06%± 3,44	8,7%±3,98

Fig. 63: % di nuclei con DNA frammentato delle blastocisti ottenute in assenza (controllo) o in presenza di NPs-PS 44nm 100µg/mL, NPs-PLGA/PEG 65nm 50µg/mL, NPs-SiO₂ 20nm 100µg/mL.

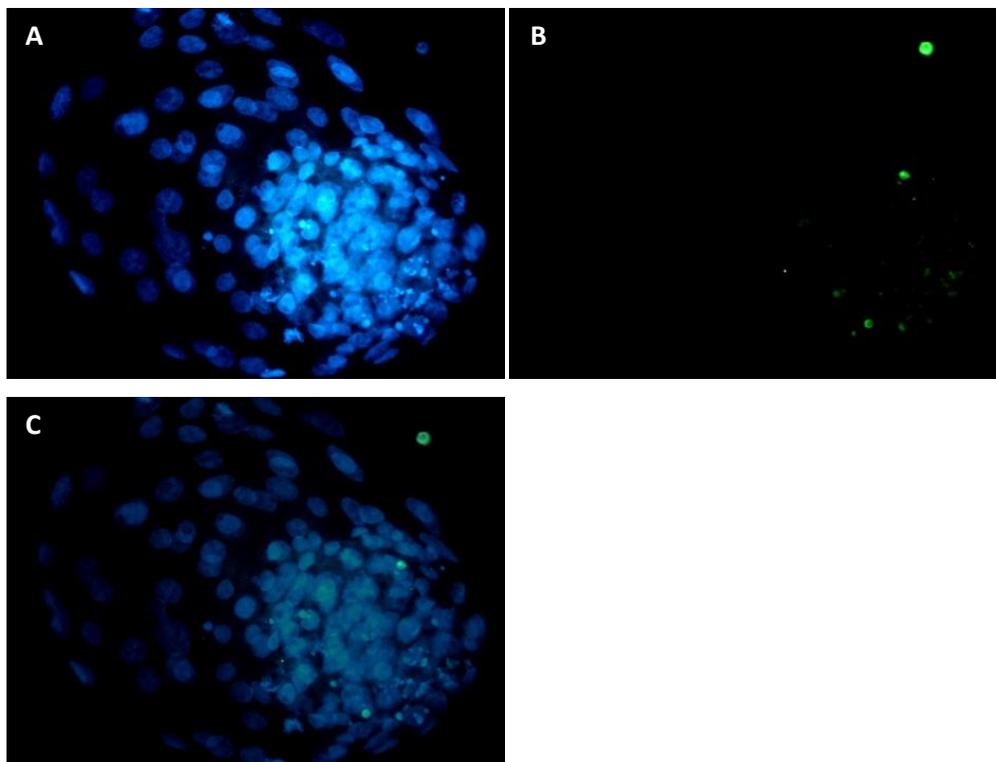


Fig. 64: Blastocisti sottoposte a “Tunel assay” per la valutazione della percentuale di nuclei con DNA frammentato. Colorazione in blu dei nuclei delle blastocisti con Hoechst 33342 (A), in verde dei nuclei Tunel positivi (B), Merge (C).

DISCUSSIONE

Negli ultimi anni la comunità scientifica è sempre più impegnata a capire se le stesse caratteristiche dei nanomateriali (NMTs) sfruttate dalla ricerca e dall'industria, quali l'elevata area superficiale, la reattività e la capacità di penetrare le membrane cellulari, possano determinare effetti negativi sull'ambiente e sull'uomo (Aillon et al., 2009). Infatti per la loro taglia estremamente ridotta, i nanomateriali possiedono un'elevata area superficiale in rapporto al volume, che li rende fortemente reattivi. Tale reattività potrebbe potenzialmente condurre a una tossicità dovuta a interazioni dannose con i sistemi biologici e l'ambiente (Oberdorster et al., 2005b). La maggior parte degli studi in vitro su cellule somatiche, mostrava che alcune nanoparticelle erano in grado di indurre stress ossidativo (Oberdorster et al., 2005a; McCarthy, 2012), interazione col DNA (Singh et al., 2009; Mu et al., 2012), stimolazione di secrezione di proteine infiammatorie, riduzione della vitalità e morte cellulare (Waters, 2009; Chen et al., 2004). Tuttavia attualmente non esiste in letteratura una visione univoca sugli eventuali effetti citotossici delle diverse NPs, queste discrepanze possono essere ricondotte all'eterogeneità delle NPs e dei sistemi biologici impiegati e soprattutto all'assenza di saggi nanotossicologici specifici e appropriati. Numerosi sono a oggi, infatti, i test tossicologici in vitro e in vivo utilizzati per valutare gli effetti citotossici dei differenti nanomateriali. Tuttavia, studi di nanotossicologia, evidenziano che alcune caratteristiche delle NPs come l'alta capacità di assorbimento, l'idrofobicità, la carica superficiale, le proprietà ottiche e magnetiche o le attività catalitiche possono interferire con i test usati in tossicologia, portando così a risultati fuorvianti. Rimane, quindi prioritario per una completa applicazione di questa biotecnologia l'identificazione delle caratteristiche chimico-fisiche delle NPs per un loro efficiente e sicuro impiego in campo biomedico. A tal fine, risulta indispensabile prima di una loro applicazione terapeutica, l'identificazione di un sensibile e predittivo saggio di nanotossicità (SCENIHR 2007, 2009; EPA 2007; FDA 2006, 2008).

Uno studio approfondito della letteratura ha evidenziato che per rispondere in maniera esaustiva allo studio della tossicità delle NPs era necessario saggiare NPs modello a diverse concentrazioni su sistemi cellulari molto più sensibili di quelli somatici. Pertanto, gli esperimenti condotti sono stati finalizzati alla comprensione degli effetti citotossici di diverse NPs sui gameti ed embrioni nel modello animale bovino. Negli ultimi anni numerosi studi hanno evidenziato l'estrema

suscettibilità dello sviluppo embrionale pre-impianto a diversi fattori ambientali, sia in vivo (es. l'alimentazione materna) che in vitro (es. la coltura embrionale) (Fleming et al., 2004; Sinclair and Singh, 2007; Thompson et al., 2007; Watkins et al., 2008a). Il programma intrinseco dell'embrione, infatti, sembra rispondere a fattori estrinseci all'ambiente materno, regolando di conseguenza lo sviluppo embrionale mediante meccanismi cellulari, fisiologici ed epigenetici. Queste risposte all'ambiente potrebbero influenzare sia lo sviluppo embrionale precoce sia quello tardivo e addirittura postnatale.

In particolare è stata analizzata la citotossicità delle NPs sulla motilità e cinetica di spermatozoi in coltura e sullo sviluppo embrionale bovino in vitro. Tale analisi è stata condotta valutando le percentuali di segmentazione, di sviluppo fino allo stadio di 8 cellule e di blastocisti. La qualità delle blastocisti è stata valutata analizzando sia il numero medio di cellule, che la percentuale di nuclei con DNA frammentato, mediante "Tunnel assay". Questo metodo (Gavrieli et al., 1992), è stato già impiegato in letteratura per la valutazione della frammentazione del DNA in blastocisti di topo (Brison and Schultz, 1997; Moley et al., 1998).

La scelta della NPs da utilizzare come modello è ricaduta sulle nanoparticelle di polistirene (NPs-PS) da 44 e 100nm, già impiegate come particelle "pioniere" in studi in vitro (Geiser et al., 2005; Papageorgiou et al., 2007) e in vivo (Brown et al., 2001; Demoy et al., 1997; Fernandez-Urrusuno et al., 1995; Gibaud et al., 1996; Kanai et al., 1996; Nemmar et al., 2002; Yacobi et al., 2008) a causa della bassa immunogenicità ed alla possibilità di modificarne taglia e superficie in un ampio "range" (Zauner et al., 2001; Win et al., 2005; Menei et al., 1994). Le nanoparticelle di silicio (NPs-SiO₂) da 20nm, sono state utilizzate in questo studio perchè ritenute appropriate per il trasporto di farmaci o di geni (Coti et al., 2009; Vinu et al., 2005) grazie alla loro elevata biocompatibilità, bassa elettro-attività in mezzo acquoso e alla possibilità di modificarne facilmente la superficie. Inoltre l'affinità di tali NPs per il doppio strato lipidico e la possibilità di essere passivamente internalizzate le rendono un ottimo "target" per studi tossicologici e di "drug delivery" (Mamaeva et al., 2012). Al fine di studiare l'eventuale citotossicità di NPs biodegradabili sono state utilizzate nanoparticelle di poly(D,L-lactic-co-glycolic acid) e polyethylene glycol (NPs-PLGA/PEG) da 65 nm, che sono caratterizzate da un'elevata biocompatibilità, biodegradabilità e sono considerate un ottimo sistema di trasporto di geni, di farmaci o di agenti di contrasto (Duncan, 2006; Lammers et al., 2010; Grund, 2011).

I principali risultati ottenuti in questo studio evidenziano che 1) Le NPs-PS da 44nm e le NPs PLGA/PEG da 65nm sono internalizzate dagli ovociti, a differenza delle NPs-PS da 100nm; 2) Le NPs-PS da 44-100nm non sono internalizzate dagli spermatozoi, a differenza delle NPs PLGA/PEG 65nm; 3) L'incubazione con NPs-PS da 44-100nm, NPs PLGA/PEG da 65nm, NPs SiO₂ da 20nm determina un decremento della cinetica e vitalità spermatica bovina dose dipendente; 4) le NPs-PS da 44nm e le NPs PLGA/PEG 65nm sono internalizzate dagli embrioni bovini fino al giorno + 8 di sviluppo, con una localizzazione esclusivamente citoplasmatica; 5) Il trattamento con differenti concentrazioni di NPs-PS 44nm, NPs PLGA/PEG 65nm e NPs SiO₂ 20nm non influenza la competenza di segmentazione degli embrioni; ma 6) determina una riduzione delle percentuali di embrioni allo stadio di 8 cellule e di blastocisti in maniera dose-dipendente; tuttavia 7) la qualità di blastocisti in termini di numero medio di cellule e di percentuale di nuclei con DNA frammentato non è influenzata.

I risultati ottenuti in tale lavoro di tesi mostrano una forte influenza della taglia delle NPs sul processo di internalizzazione cellulare, evidenziando l'importanza dell'impiego di NPs di dimensioni estremamente ridotte, al fine di poterle utilizzare come vettori biomedici o diagnostici. La taglia nanometrica di questi nanovettori offre, infatti, unici vantaggi per il "drug delivery", quali quello di poter penetrare profondamente nei tessuti attraverso i piccoli capillari, attraversare la fenestrazione presente nel rivestimento epiteliale ed infine essere internalizzati dalle cellule (Vinogradov et al., 2002). I dati riportati nel presente studio evidenziano esclusivamente un'internalizzazione delle NPs inferiori ai 100nm in ovociti ed esclusivamente di NPs PLGA/PEG 65nm in spermatozoi bovini, evidenziando un ingresso delle NPs fortemente dipendente dalle caratteristiche delle NPs, in particolar modo dalla taglia, in accordo alle analisi effettuate su differenti linee cellulari (Zauner et al., 2001; Prabha et al., 2002; Lai et al., 2007).

I tossicologi ritengono che, poiché i NMTs presentano proprietà chimico-fisiche differenti dagli stessi materiali di dimensioni atomiche o super-micrometriche, essi debbano essere testati e regolamentati in modo specifico. Tuttavia, a oggi, non esistono ancora protocolli standard e regolamentazioni internazionali sulla progettazione, sull'utilizzo e sulla valutazione tossicologica dei NMTs (SCENIHR 2007, 2009; EPA 2007; FDA 2006, 2008). Pertanto risulta necessario individuare

sensibili e predittive strategie di “screening” di tossicità per accertare il potenziale rischio legato all’impiego delle NPs in biomedicina.

I risultati riportati in questo studio evidenziano un effetto citotossico dose-dipendente delle diverse NPs sulla percentuale di motilità totale, progressiva e sui parametri cinetici di spermatozoi bovini, in accordo con studi precedenti su spermatozoi murini e umani incubati con NPs-TiO₂ (Guo et al., 2009) e NPs-Ag e NPs-Au (Moretti et al., 2012). Dati contrastanti sono mostrati dagli studi di Ben-David Makhluf et al., 2006 che non evidenziano, infatti, alcuna riduzione significativa della motilità spermatica dopo incubazione con nanoparticelle magnetiche. In particolare, nel caso delle NPs-PS 100nm, in grado di determinare una significativa riduzione esclusivamente alla concentrazione più bassa (10µg/mL), i dati sono in accordo con precedenti studi che evidenziano che alte concentrazioni di NPs possono andare incontro a un alto grado di aggregazione capace di ridurre l’efficienza d’internalizzazione nelle cellule (Panyam et al., 2002; Panyam and Labhasetwar, 2003; Davda and Labhasetwar, 2002; Panagi et al., 2001) e la “clearance” nei fluidi corporei (Panagi et al., 2001).

Lo sviluppo embrionale in vitro rappresenta un processo biologico estremamente sensibile agli insulti esterni che consente, inoltre, di monitorare eventuali effetti tossici nel tempo, fino a 8 giorni di coltura, superando le limitazioni legate al “breve-termine” tipiche delle colture di cellule somatiche in vitro. I risultati ottenuti in tale lavoro di tesi mostrano la presenza delle NPs fluorescenti negli embrioni fino allo stadio di blastocisti al giorno +8 di sviluppo, con localizzazione esclusivamente citoplasmatica, in accordo con i dati ottenuti sulle BOEC e con studi precedenti effettuati su cellule somatiche (Dausend et al., 2008; Liu et al., 2011; Larsen et al., 2012). In particolare analisi ultrastrutturali evidenziano che le NPs PLGA/PEG 65nm risultano fortemente aggregate e localizzate in vescicole e vacuoli citoplasmatici, in accordo con Panyam et al., 2002.

In letteratura le rare analisi nanotossicologiche effettuate sullo sviluppo embrionale nei mammiferi in vitro, hanno evidenziato risultati contrastanti, dipendenti dalle proprietà chimico-fisiche delle NPs impiegate. In particolare, studi in vitro sul topo, hanno evidenziato una embriotossicità in seguito a trattamento con NPs di poliacrilonitrile, ma non con NPs-PS (Fynewever et al., 2007). Recenti studi hanno inoltre mostrato che l’esposizione in vitro a NPs di argento induce apoptosi e un ritardo dello sviluppo precoce embrionale post-impianto dopo trasferimento in topo ospite (Li et al., 2010).

E' in questo contesto che si inserisce il presente studio di tesi che prevede la comprensione delle caratteristiche chimico fisiche delle NPs necessarie per una applicazione biomedica e diagnostica sicura per la salute umana. A tal fine il sensibile processo biologico dello sviluppo embrionale in vitro potrebbe rappresentare un appropriato saggio di nanotossicità. I risultati ottenuti nel presente lavoro di tesi evidenziano una forte influenza della dose delle diverse NPs sui conseguenti effetti citotossici. In particolare l'incubazione con le più alte concentrazioni di NPs determinano una significativa riduzione delle percentuali di embrioni allo stadio di 8 cellule e di blastocisti, che non differiscono per numero medio di cellule e percentuale di nuclei con DNA frammentato nei due campioni.

Considerati tutti assieme, i risultati ottenuti nella presente tesi evidenziano un effetto citotossico delle NPs-PS 44nm, NPs-PLGA/PEG 65 nm e NPs-SiO₂ 20nm sui gameti maschili e sullo sviluppo embrionale bovino in vitro in maniera dose dipendente, in accordo con i precedenti studi su cellule germinali maschili (Braydich-Stolle et al., 2010; Guo et al., 2009; Taylor, 2012) ed embrioni (Ringwood et al., 2009; Asharani et al., 2011; Bai et al., 2010b) che mostrano un effetto citotossico dipendente sia dalla dose che dalle caratteristiche chimico-fisiche delle NPs. Lo sviluppo embrionale in vitro è un processo molto sensibile allo stress ambientale (Fleming et al., 2004; Sinclair and Singh, 2007; Thompson et al., 2007; Watkins et al., 2008a), pertanto il raggiungimento dello stadio di blastocisti in vitro è un eccellente saggio di funzionalità cellulare in vivo. Recenti studi, infatti, dimostrano l'esistenza di una buona correlazione tra i danni cellulari causati da NPs-Ag su linfociti umani in vitro e su topo in vivo (Ghosh et al., 2012).

Lo sviluppo embrionale in vitro nel modello animale bovino, potrebbe, pertanto rappresentare un sensibile e predittivo saggio tossicologico necessario per saggiare i nuovi nanomateriali, prima di una loro applicazione in biomedicina. Tale saggio consentirebbe la creazione di banche dati necessarie per la classificazione e caratterizzazione di ogni tipo di NPs in relazione ai sistemi biologici.

-CAPITOLO 8-
CONCLUSIONI

Nel presente lavoro di tesi l'impiego di NPs "modello" ha mostrato una forte influenza delle loro caratteristiche chimico-fisiche sulle interazioni NPs-sistemi biologici. In particolar modo la taglia e la dose delle NPs impiegate risultano condizionare fortemente l'ingresso di tali NPs nei sistemi cellulari analizzati e la loro citotossicità. La dimensione nanometrica delle NPs da impiegare come nanovettori di farmaci e geni, consente loro di penetrare profondamente nei tessuti attraverso i capillari ed essere internalizzate dalle cellule. La rapida diffusione passiva delle NPs osservata nel presente studio, tuttavia, evidenzia il rischio di una loro localizzazione "incontrollata" anche in tessuti sani, determinando così gravi effetti collaterali sistemici. Dunque risulta indispensabile la comprensione delle modifiche superficiali da apportare alle NPs, necessarie per un riconoscimento specifico tra tessuto "target"-nanomateriale. Numerosi studi sono rivolti all'individuazione di sensibili e predittive strategie di "screening" di tossicità delle NPs. Lo sviluppo embrionale bovino in vitro è un processo molto suscettibile agli stress ambientali, pertanto, il raggiungimento dello stadio di blastocisti in vitro rappresenta un ottimo saggio di funzionalità cellulare in vivo. I dati ottenuti in questo lavoro di tesi evidenziano un effetto citotossico dose-dipendente delle NPs sulla percentuale di embrioni in grado di raggiungere il sensibile stadio di 8 cellule e lo stadio ultimo di blastocisti. Il presente studio, dunque, pone l'attenzione sulla possibilità di impiegare lo sviluppo embrionale bovino in vitro come appropriato saggio tossicologico capace di predire la tossicità di nuovi nanomateriali, prima di una loro applicazione in biomedicina.

Nel complesso i risultati ottenuti nel presente lavoro di tesi contribuiscono validamente alla comprensione delle proprietà chimico-fisiche da considerare nella progettazione e realizzazione di innovativi nanomateriali da impiegare in maniera efficiente e sicura in campo biomedico. Tuttavia risulta fondamentale creare un "database" di informazioni necessarie per la classificazione e caratterizzazione di ogni tipo di NPs in relazione ai sistemi biologici, prima di una applicazione della nanobiotecnologia in campo clinico.

REFERENZE BIBLIOGRAFICHE

- Aillon K.L.**, Xie Y., El-Gendy N., Berkland C.J., Forrest M.L.. Effects of nanomaterial physicochemical properties on in vivo toxicity. *Adv Drug Deliv Rev.* (2009); 61(6):457-66.
- Alan D.O.**, Parker L., Seymour L.W.. Laterally stabilized complexes of DNA with linear reducible polycations: strategy for triggered intracellular activation of DNA delivery vectors. *J. Am. Chem. Soc.* 124 (2002); 8–9.
- Alexis F.**, Pridgen E., Molnar L.K., Farokhzad O.C.. Factors affecting the clearance and biodistribution of polymeric nanoparticles. *Mol Pharm* (2008); 5:505–15.
- Asharani P.V.**, Lianwu Y., Gong Z., Valiyaveetil S. Comparison of the toxicity of silver, gold and platinum nanoparticles in developing zebrafish embryos. *Nanotoxicology.* (2011); 5(1):43-54.
- Asharani P.V.**, Xinyi N., Hande M.P., Valiyaveetil S. DNA damage and p53-mediated growth arrest in human cells treated with platinum nanoparticles. *Nanomedicine* (2010); 5:51–64
- ASTM E 2456-06.** Terminology for nanotechnology. ASTM International; 2006.
- Audouy S.A.**, de Leij L.F., Hoekstra D., Molema G., In vivo characteristics of cationic liposomes as delivery vectors for gene therapy, *Pharm. Res.* (11) (2002) 1599–1605.
- Baccetti B.**, Collodel G., Piomboni P.. Apoptosis in human ejaculated sperm cells (notulae seminologicae 9). *J Submicrosc Cytol Pathol.* (1996);28(4):587-96
- Bai W.**, Tian W., Zhang Z., He X., Ma Y., Liu N., Chai Z.,. Effects of copper nanoparticles on the development of zebrafish embryos. *J Nanosci Nanotechnol.* (2010b); 10(12):8670-6
- Bai W.**, Zhang Z., Tian W., He X., Ma Y., Zhao Y., Chai Z.. Toxicity of zinc oxide nanoparticles to zebrafish embryo: a physicochemical study of toxicity mechanism. *Journal of Nanoparticle* (2010 a); Research Volume 12, Issue 5, pp 1645-1654.
- Balercia M.D.**, Buldreghini E., Vignini A., Tiano L., Paggi F., Amoroso S., Ricciardo-Lamonica G., Boscaro M., Lenzi A. and Littaru G.P. Coenzyme Q10 treatment in infertile men with idiopathic asthenozoospermia: a placebo-controlled, double-blind randomized trial. *Fertility and Sterility.* (2009); 91(5):1785-1792.
- Bar-Ilan O.**, Albrecht R.M., Fako V.E., Furgeson D.Y.. Toxicity assessments of multisized gold and silver nanoparticles in zebrafish embryos. *Small.* (2009); 5(16):1897-910.

Ben-David Makhluf S., Qasem R., Rubinstein S., Gedanken A., Breitbart H. Loading magnetic nanoparticles into sperm cells does not affect their functionality. *Langmuir*. (2006); 22(23):9480-2.

Berry C. C. and Curtis A. S G. Functionalisation of magnetic nanoparticles for applications in biomedicine. *J. Phys. D* (2003); *Appl. Phys.* 36 R198

Berry C.C., de la Fuente J.M., Mullin M., Chu S.W., Curtis A.S.. Nuclear localization of HIV-1 tat functionalized gold nanoparticles. *IEEE Trans Nanobioscience*. (2007); 6(4):262-9.

Biondi M., Guarnieri D., Yu H., Belli V., Netti P. A.. Sub-100 nm biodegradable nanoparticles: in vitro release features and toxicity testing in 2D and 3D cell cultures 2013 *Nanotechnology* 24 045101 doi:10.1088/0957-4484/24/4/045101

Borenfreund E. and Puerner J.A. Toxicity determined in vitro by morphological alterations and neutral red absorption. *Toxicology letters* (1985); 24(2-3):119-124

Bottini M., Bruckner S., Nika K., Bottini N., Bellucci S., Magrini A., Bergamaschi A., Mustelin T.. Multi-walled carbon nanotubes induce T lymphocyte apoptosis. *Toxicology letters*. (2006); Volume 160, Issue 2, 5, Pages 121–126

Boudreau N.J. and Jones P.L. Extracellular matrix and integrin signalling: the shape of things to come. *Biochem J.* (1999); 1;339 (Pt 3):481-8.

Boudreau, N., Sympton, C. J., Werb, Z., Bissell, M. J. Suppression of ICE and Apoptosis in Mammary Epithelial Cells by Extracellular Matrix. *Science* (1995); 267(5199): 891–893.

Boudreau, N., Werb, Z. and Bissell, M. J. Suppression of apoptosis by basement membrane requires three-dimensional tissue organization and withdrawal from the cell cycle. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* (1996); 93, 3509±3513

Braydich-Stolle L.K., Lucas B., Schrand A., Murdock R.C., Lee T., Schlager J.J., Hussain S.M., Hofmann M.C.. Silver nanoparticles disrupt GDNF/Fyn kinase signaling in spermatogonial stem cells. *Toxicol Sci.* (2010); 116(2):577-89.

Brison D.R. and Schultz R.M. Apoptosis during mouse blastocyst formation: evidence for a role for survival factors including TGF- α . *Biology of Reproduction* (1997); 56 1088–1096.

Brown D.M., Wilson M.R., MacNee W., Stone V., Donaldson K. Size-dependent proinflammatory effects of ultrafine polystyrene particles: a role for surface area and oxidative stress in the enhanced activity of ultrafines. *Toxicol Appl Pharmacol.* (2001); Sep 15;175(3):191-9.

- Brown M.D.**, Schatzlein A.G., Uchegbu I.F.. Gene delivery with synthetic (non viral) carriers, *Int. J. Pharm.* (2001); 229 1–21.
- Champion J.A. and Mitragotri S.** Role of target geometry in phagocytosis. *Proc Nat Acad Sci USA.* (2006); 103:4930–4.
- Chithrani B.D.**, Ghazani A.A., Chan W.C. Determining the size and shape dependence of gold nanoparticle uptake into mammalian cells. *Nano Lett* (2006); 6(4):662–668.
- Chouly, C.**, Pouliquen, D., Lucet, I., Le Jeune, J. J., and Jallet, P., Development of superparamagnetic nanoparticles for MRI: effect of particle size, charge and surface nature on biodistribution. *J. Microencapsulation* (1996); Vol. 13, No. 3 , Pages 245-255
- Clark P.R. and Hersh E.M.**, Cationic lipid-mediated gene transfer: current concepts, *Curr. Opin. Mol. Ther.* 1 (1999); 158–176.
- Cohen G.M.** Caspases: the executioners of apoptosis. *Biochem J.* (1997); 326 (Pt 1):1-16.
- Cohen H.**, Levy R.J., Gao J., Fishbein I., Kousaev V., Sosnoski S., Slomkowski S.. Sustained delivery and expression of DNA encapsulated in polymeric nanoparticles. *Gene Ther.* (2000); 7 1896–1905.
- Colagar A.H., Marzony E.T., Chaichi M.J.**. Zinc levels in seminal plasma are associated with sperm quality in fertile and infertile men. *Nutr Res.* (2009); 29(2):82-88
- Conner S.D. and Schmid S.L.** Regulated portals of entry into the cell. *Nature.* (2003); 6;422(6927):37-44
- Contreras-Ruiz L.**, de la Fuente M., Párraga J. E., López-García A., Fernández I., Seijo B., Sánchez A., Calonge M., Diebold Y.. Intracellular trafficking of hyaluronic acid-chitosan oligomerbased nanoparticles in cultured human ocular surface cells *Molecular Vision* (2011); 17:279-290
- Cortez C.**, Tomaskovic-Crook E., Johnston A.P.R., Scott A.M., Nice E.C., Heath J.K., Caruso F.. Influence of size, surface, cell line, and kinetic properties on the specific binding of A33 antigen-targeted multilayered particles and capsules to colorectal cancer cells. *ACS Nano* 2007;1:93–102.
- Coti K.K.**, Belowich M.E., Liong M., Ambrogio M.W., Lau Y.A., Khatib H.A., Zink J.I., Khashab N.M., Stoddart J.F.: Mechanised nanoparticles for drug delivery. *Nanoscale* (2009); 1:16–39.

- Crotts G. and Park T.G.**. Protein delivery from poly(lactic-co-glycolic acid) biodegradable microspheres: release kinetics and stability issues. *J Microencapsul.* (1998); 15(6):699-713.
- Curtis A.S.G.**, Casey B., Gallagher J.O., Pasqui D., Wood M.A., Wilkinson C.D.W.. Substratum nanotopography and the adhesion of biological cells. Are symmetry or regularity of nanotopography important?, *Biophysical Chemistry* (2001); 94, 275-283.
- Dalby, M. J.**, Biggs, M. J., Gadegaard, N., Kalna, G., Wilkinson, C. D. & Curtis, A. S. Nanotopographical stimulation of mechanotransduction and changes in interphase centromere positioning. *J. Cell. Biochem.* (2007) 100, 326–338.
- Danke H.**, Baba T., van der Blik A.M., Schmid S.L.. Clathrin-independent pinocytosis is induced in cells overexpressing a temperature-sensitive mutant of dynamin. *J Cell Biol.* (1995); 131(1):69-80.
- Dausend J.**, Musyanovych A., Dass M., Walther P.. Uptake Mechanism of Oppositely Charged Fluorescent Nanoparticles in HeLa Cells Hubert Schrezenmeier, Katharina Landfester, Volker Mailander .*Macromol. Biosci.* (2008); 8, 1135–1143,
- Davda J. and Labhasetwar V.**. Characterization of nanoparticle uptake by endothelial cells, *Int. J. Pharm.* (2002); 233 51–59.
- De Smedt S.C.**, Demeester J., Hennink W.E.. Cationic polymer based gene delivery systems, *Pharm. Res.* (2000); 17 113–126.
- Decuzzi P.**, Godin B., Tanaka T., Lee S.Y., Chiappini C., Liu X., Ferrari M.. Size and shape effects in the biodistribution of intravascularly injected particles. *J Control Release* (2010);141:320–7.
- Del Rio D., Stewart A.J., Pellegrini N.**. A review of recent studies on malondialdehyde as toxic molecule and biological marker of oxidative stress. *Nutr. Metab. Cardiovasc. Dis.* (2005); 15(4), 316–328
- Demoy M.**, Gibaud S., Andreux J.P., Weingarten C., Gouritin B., Couvreur P.. Splenic trapping of nanoparticles: complementary approaches for in situ studies. *Pharm Res.* (1997); 14(4):463-8.
- den Braber, E. T.**, de Ruijter, J. E., Ginsel, L. A., von Recum, A. F., Jansen, J. A. Orientation of ECM protein deposition, fibroblast cytoskeleton, and attachment complex components on silicone microgrooved surfaces. *J. Biomed. Mater. Res.* (1998); 40, 291–300.

- Des Rieux A.**, Fievez V., Garinot M., Schneider Y.J., Pr at V.. Nanoparticles as potential oral delivery systems of proteins and vaccines: a mechanistic approach. *J Control Release*. (2006); 116(1):1-27.
- Desai M.P.**, Labhasetwar V., Walter E., Levy R.J., Amidon G.L. The mechanism of uptake of biodegradable microparticles in caco-2 cells is size dependent. *Pharm Res* (1997); 14(11):1568–1573
- Deshpande D.**, Blezinger P., Pillai R., Duguid J., Freimark B., Rolland A.. Target specific optimization of cationic lipid-based systems for pulmonary gene therapy, *Pharm. Res.* (1998); 15:1340–1347.
- Di Virgilio A.L.**, Reigosa M., Arnal P.M., Fernández Lorenzo de Mele M. Comparative study of the cytotoxic and genotoxic effects of titanium oxide and aluminium oxide nanoparticles in Chinese hamster ovary (CHO-K1) cells. *J Hazard Mater* (2010); 177:711–8.
- Dike, L. E. and Ingber, D. E.** Integrin-dependent induction of early growth response genes in capillary endothelial cells *J. Cell Sci.* (1996); 109, 2855±2863
- Dinarello C.A.** Proinflammatory cytokines. *Chest*. (2000); 118(2):503-8
- Ding C.** Minimum redundancy feature selection from microarray gene expression data. *J. Bioinform. Comput. Biol.* (2005); **03**, 185.
- Discher D.E.**, Janmey P., Wang Y.L.. Tissue cells feel and respond to the stiffness of their substrate. *Science*. (2005); 18;310(5751):1139-43.
- dos Santos T.**, Varela J., Lynch I., Salvati A., Dawson K. A.. Effects of Transport Inhibitors on the Cellular Uptake of Carboxylated Polystyrene Nanoparticles in Different Cell Lines. *PLoS ONE* (2011); 6(9): e24438
- Duncan R.** Polymer conjugates as anticancer nanomedicines. *Nat Rev Cancer*. (2006); 6(9):688–701.
- Ellington J.E.** The bovine oviduct and its role in reproduction: a review of the literature. *Cornell Veterinarian* (1991); 81 313–328.
- Engler A. J.**, Sen S., Sweeney H. L. and Discher, D. E. Matrix elasticity directs stem cell lineage specification. *Cell* (2006); 126, 677–689.
- Environmental Protection Agency (EPA).** Nanotechnology White Paper (EPA/100/B-07/001, Washington, DC, Office of the Science Advisor, February 2007)
- Ernster L. and Forsmark-André P.** Ubiquinol: an endogenous antioxidant in aerobic organisms. *Clin Invest* (1993); 71:S 60-S 65

- Fairbairn D.W.**, Olive P.L., O'Neill K.L.. The comet assay: a comprehensive review. *Mutat Res.* (1995); 339(1):37-59.
- Farin P.W.**, Piedrahita J.A., Farin C.E.. Errors in development of fetuses and placentas from in vitro-produced bovine embryos. *Theriogenology.* (2006); 65:178–191.
- Favre N.**, Bordmann G., Rudin..Comparison of cytokine measurements using ELISA, ELISPOT and semi-quantitative RT-PCR. *Journal of immunological methods* (1997); Volume 204, Issue 1, Pages 57–66.
- Fernandez-Urrusuno R.**, Fattal E., Porquet D., Feger J., Couvreur P. Evaluation of liver toxicological effects induced by polyalkylcyanoacrylate nanoparticles *Toxicol Appl Pharmacol.* (1995); 130(2):272-9.
- Festenstein G.N. and Morton R.A.**. Provitamin D in animal tissues. *Biochem J.* (1955). 60(1): 22–25
- Fiorito S.**, Serafino A., Andreola F., Bernier P.. Effects of fullerenes and single-wall carbon nanotubes on murine and human macrophages. *Carbon* (2006);44, 1100–1105.
- Flahaut E.**, Durrieu M.C., Remy-Zolghadri M., Bareille R., Baquey Ch.. Investigation of the cytotoxicity of CCVD carbon nanotubes towards human umbilical vein endothelial cells. *Carbon* (2006); Volume 44, Issue 6, , Pages 1093–1099
- Fleming T.P.**, Kwong W.Y., Porter R., Ursell E., Fesenko I., Wilkins A., Miller D.J., Watkins A.J., Eckert J.J.. The embryo and its future. *Biol Reprod.* (2004); 71:1046–1054.
- Foged C.**, Brodin B., Frokjaer S., Sundblad A.. Particle size and surface charge affect particle uptake by human dendritic cells in an in vitro model. *Int J Pharm* (2005); 298:315–22.
- Food and Drug Administration (FDA)**. Public meeting on nanotechnology. October 10, 2006, Bethesda Maryland.
- Food and Drug Administration (FDA)**. Nanotechnology Public Meeting. September 8, 2008. Rockville, Maryland.
- Foster K.A.**, Yazdanian M., Audus K.L.. Microparticulate uptake mechanisms of in-vitro cell culture models of the respiratory epithelium, *J. Pharm. Pharmacol.* (2001); 53,57–66.
- Frisch S. M. and Ruoslahti E.**. Integrins and anoikis. *Curr. Opin. Cell Biol.* (1997); 9, 701±706

- Fröhlich E.**, Samberger C., Kueznik T., Absenger M., Roblegg E., Zimmer A., Pieber T.R.. Cytotoxicity of nanoparticles independent from oxidative stress. *J Toxicol Sci.* (2009); 34(4):363-75.
- Fuller J.E.**, Zugates G.T., Ferreira L.S., Ow H.S., Nguyen N.N., Wiesner U.B., Langer R.S.. Intracellular delivery of core-shell fluorescent silica nanoparticles. *Biomaterials.* (2008); 29(10):1526-32. Epub 2007 Dec 21.
- Fynewever T.L.**, Agcaoili E.S., Jacobson J.D., Patton W.C., Chan PJ. In vitro tagging of embryos with nanoparticles. *J Assist Reprod Genet.* (2007); 24(2-3):61-5.
- Gardner D.K.**, Lane M., Spitzer A., Batt P.A.. Enhanced rates of segmentazione and development for sheep zygotes cultured to the blastocyst stage in vitro in the absence of serum and somatic cells: amino acids, vitamins, and culturing embryos in groups stimulate development. *Biol Reprod.* (1994); 50(2):390-400.
- Garnett M.C.** Gene delivery systems using cationic polymers. *Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Syst.* (1999); 16 147–207.
- Gaubert H. E. and Frey W.** Highly parallel fabrication of nanopatterned surfaces with nanoscale orthogonal biofunctionalization imprint lithography. *Nanotechnology* (2007); 18, 135 101–135 107.
- Gavrieli Y.**, Sherman Y., Ben-Sasson S.A.. Identification of programmed cell death in situ via specific labeling of nuclear DNA fragmentation. *Journal of Cell Biology* (1992); 119 493–501.
- Geiser M.**, Rothen-Rutishauser B., Kapp N., Schürch S., Kreyling W., Schulz H., Semmler M., Im Hof V., Heyder J., Gehr P. Ultrafine particles cross cellular membranes by nonphagocytic mechanisms in lungs and in cultured cells. *Environ Health Perspect.* (2005); 113(11):1555-60.
- Georges P. C. and Janmey, P. A.** Cell typespecific response to growth on soft materials. *J. Appl. Physiol.* (2004); 98, 1547–1553.
- Ghosh M.**, J M, Sinha S., Chakraborty A., Mallick S.K., Bandyopadhyay M., Mukherjee A., In vitro and in vivo genotoxicity of silver nanoparticles. *Mutat Res.* (2012); 12;749(1-2)
- Gibaud S.**, Demoy M., Andreux J.P., Weingarten C., Gouritin B., Couvreur P.. Cells involved in the capture of nanoparticles in hematopoietic organs. *J Pharm Sci.* (1996); 85(9):944-50.
- Gill D.R.**, Southern K.W., Mofford K.A., Seddon T., Huang L., Sorgi F., Thompson A., Macvinish L.J., Ratcliff R., Bilton D., Lane D.J., Littlewood J.M., Webb A.K.,

Middleton P.G., Colledge W.H., Cuthbert A.W., Evans M.J., Higgins C.F., Hyde S.C.. A placebo-controlled study of liposome-mediated gene transfer to the nasal epithelium of patients with cystic fibrosis, *Gene Ther.* (1997); 4 199–209.

Gottesman M. M. and Pastan I. Biochemistry of multidrug resistance mediated by the multidrug transporter. *Annu. Rev. Biochem.* (1993); 62, 385.

Gottlieb R.A. Mitochondria and apoptosis. *Biol Signals Recept.* (2001); 10(3-4):147-61.

Gratton S.E.A., Ropp P.A., Pohlhaus P.D., Luft J.C., Madden V.J., Napier M.E., DeSimone J. M. The effect of particle design on cellular internalization pathways. *Proc Nat Acad Sci USA* (2008); 105:11613–8.

Green D.R. and Reed J.C. Mitochondria and apoptosis. *Science.* (1998); 281(5381):1309-12.

Gref R., Luck M., Quellec P., Marchand M., Dellacherie E., Harnisch S., Blunk T., Muller R.H. 'Stealth' corona-core nanoparticles surface modified by polyethylene glycol (PEG): influences of the corona (PEG chain length and surface density) and of the core composition on phagocytic uptake and plasma protein adsorption. *Colloids Surf B Biointerfaces.* (2000); 18(3-4):301-313.

Grund S., Bauer M., Fischer D. Polymers in drug delivery – state of the art and future trends. *Adv Eng Mater.* (2011); Volume 13, Issue 3, pages B61–B87,

Gualtieri R., Iaccarino M., Mollo V., Prisco M., Iaccarino S., Talevi R. Slow cooling of human oocytes: ultrastructural injuries and apoptotic status. *Fertil Steril* (2009); 91(4):1023-34.

Guo L., Bussche A.V., Buechner M., Yan A., Kane A. B., Hurt R. H. Adsorption of essential micronutrients by carbon nanotubes and the implications for nanotoxicity testing. *Small* (2008); 4(6):721–727

Guo L.L., Liu X.H., Qin D.X., Gao L., Zhang H.M., Liu J.Y., Cui Y.G. Effects of nanosized titanium dioxide on the reproductive system of male mice. *Zhonghua Nan Ke Xue* (2009); 15(6):517-22.

Guzman L.A., Labhasetwar V., Song C., Jang Y., Lincoff A.M., Levy R., Topol E.J. Local intraluminal infusion of biodegradable polymeric nanoparticles. A novel approach for prolonged drug delivery after balloon angioplasty. *Circulation* (1996); 94, 1441–1448.

Halliwell B. and Chirico S. Lipid peroxidation: its mechanism, measurement, and significance. *J. Bacteriol.* (2012); 194: 5065-5072

Halliwell B. and Gutteridge J.M.C. Role of free radicals and catalytic metal ions in human diseases: An overview. *Methods Enzymol.* (1990); 186 1-86

Hans M.L.; Lowman A.M.. Biodegradable nanoparticles for drug delivery and targeting. *Current Opinion in Solid State & Materials Science* (2002); Volume: 6, Issue: 4, pp. 319-327

Harush-Frenkel O., Debotton N., Benita S., Altschuler Y.. Targeting of nanoparticles to the clathrin-mediated endocytic pathway. *Biochem Biophys Res Commun.* (2007); 353(1):26-32.

Haslam G., Wyatt D., Kitos P.A.. Estimating the number of viable animal cells in multi-well cultures based on their lactate dehydrogenase activities. *Cytotechnology* (2000); Volume 32, Issue 1, pp 63-75

Hassan H.M. and Fridovich I. Regulation of the synthesis of catalase and peroxidase in *Escherichia coli*. *J. Biol.Chem.* (1978); 253, 6445–6450.

Helinor J. J , Semmler-Behnke M., Brown D. M., Kreyling W., Tran L., Stone V.. Evaluating the uptake and intracellular fate of polystyrene nanoparticles by primary and hepatocyte cell lines in vitro. *Toxicology and Applied Pharmacology* (2010); 242 66-78

Heslinga M.J., Mastria E.M., Eniola-Adefeso O. Fabrication of biodegradable spheroidal microparticles for drug delivery applications. *J Control Release* (2009); 138:235–42.

Heuser J.E. and Anderson R.G.W.. Hypertonic media inhibit receptor-mediated endocytosis by blocking clathrin-coated pit formation. *J Cell Biol* (1989); 108, 389-400.

Hillyer J.F., Albrecht R.M. Gastrointestinal persorption and tissue distribution of differently sized colloidal gold nanoparticles. *J Pharm Sci.* (2001); 90(12):1927-36.

Hirsch L.R., Stafford R.J., Bankson J.A., Sershen S.R., Rivera B., Price R.E., Hazle J.D., Halas N.J., West J.L.. Nanoshell-mediated near-infrared thermal therapy of tumors under magnetic resonance guidance. *Proc Natl Acad Sci U S A.* (2003);100(23):13549-54.

Holm P., Walker S.K., Seamark R.F. Embryo viability, duration of gestation and birth weight in sheep after transfer of in vitro matured and in vitro fertilized zygotes cultured in vitro or in vivo. *J Reprod Fertil.* (1996); 107:175–181

Hoshino A., Fujioka K., Oku T., Suga M., Sasaki Y. F., Ohta T., Yasuhara M., Suzuki K., Yamamoto K.. Physicochemical properties and cellular toxicity of

nanocrystal quantum dots depend on their surface modification. *Nano Lett* (2004); 4(11):2163–2169

Hu L., Mao Z., Gao C.. Colloidal particles for cellular uptake and delivery. *J Mater Chem* (2009); 19:3108–15.

Huang M., Ma Z., Khor E., Lim L.Y.. Uptake of FITC-chitosan nanoparticles by A549 cells, *Pharm. Res.* (2002); 19 1488–1494.

Hunter R.H. Reflections upon sperm–endosalpingeal and sperm– zona pellucida interactions in vivo and in vitro. *Reproduction in Domestic Animals* (2003); 38 147–154.

Iacopetta B.J. and Morgan E.H. The kinetics of transferrin endocytosis and iron uptake from transferrin in rabbit reticulocytes. *Journal of Biological Chemistry* (1983); 258: 9108–9115.

II International Consensus Conference on Biomaterials, Chester, Gran Bretagna, 1991.

Ingber D.E. Mechanical control of tissue morphogenesis during embryological development. *Int.J. Dev. Biol.* (2006); 50: 255-266.

Jalil R., Nixon J.R.. Biodegradable poly(lactic acid) and poly(lactide-co-glycolide) microcapsules: problems associated with preparative techniques and release properties. *J Microencapsul* (1990); 7(3):297-325.

Jia G. , Wang H., Yan L., Wang X. , Pei R., Yan T., Zhao Y., Guo X.. Cytotoxicity of Carbon Nanomaterials: Single-Wall Nanotube, Multi-Wall Nanotube, and Fullerene *Environ. Sci. Technol.*, (2005); 39 (5), pp 1378–1383

Jones P. L., Boudreau N., Myers C. A., Erickson H. P., Bissell, M. J.. Tenascin-C inhibits extracellular matrix-dependent gene expression in mammary epithelial cells. Localization of active regions using recombinant tenascin fragments *J. Cell Sci.* (1995); 108, 519±527

Kaksonen M., Toret C.P., Drubin D.G.. Harnessing actin dynamics for clathrin-mediated endocytosis. *Nat Rev Mol Cell Biol.* (2006); 7(6):404–14.

Kam N.W., O'Connell M., Wisdom J.A., Dai H.. Carbon nanotubes as multifunctional biological transporters and near-infrared agents for selective cancer cell destruction. *Proc Natl Acad Sci U S A.* (2005); 102(33):11600-5.

Kanai M., Murata Y., Mabuchi Y., Kawahashi N., Tanaka M., Ogawa T., Doi M., Soji T., Herbert D.C.. In vivo uptake of lecithin-coated polystyrene beads by rat hepatocytes and sinusoidal endothelial cells. *Anat Rec.* (1996); 244(2):175-81.

- Keselowsky B.G.**, Collard D.M., Garcia A.J.. Surface chemistry modulates focal adhesion composition and signaling through changes in integrin binding. *Biomaterials* (2004); 25(28):5947-54.
- 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., Cho M.H.. Cellular uptake of magnetic nanoparticle is mediated through energy-dependent endocytosis in A549 cells. *J Vet Sci.* (2006); 7(4):321-6.
- King M.A.**. Detection of dead cells and measurement of cell killing by flow cytometry. *J Immunol Methods.* (2000); 243(1-2):155-66.
- Kirchner C.**, Liedl T., Kudera S., Pellegrino T., Muñoz Javier A., Gaub H.E., Stölzle S., Fertig N., Parak W.J.. Cytotoxicity of colloidal CdSe and CdSe/ZnS nanoparticles. *Nano Lett* (2005); 5(2):331–338.
- Kirkham M. and Parton R.G.**. Clathrin-independent endocytosis: new insights into caveolae and non-caveolar lipid raft carriers. *Biochim Biophys Acta.* (2005); 1746(3):349-63.
- Kostarelos K.**, Lacerda L., Pastorin G., Wu W., Wieckowski S., Luangsivilay J., Godefroy S., Pantarotto D., Briand J.P., Muller S., Prato M., Bianco A.. Cellular uptake of functionalized carbon nanotubes is independent of functional group and cell type. *Nat Nanotechnol.* (2007); 2(2):108-13.
- Kotov N.A.**, Winter J.O., Clements I.P., Jan E., Timko B.P., Campidelli S., Pathak S., Mazzatenta A., Lieber M.C., Prato M., Bellamkonda V.R., Silva G.A., Kam S.W.N., Patolsky F., Ballerini L.. Nanomaterials for neural interfaces. *Adv Mater* (2009); 21(40):3970–4004.
- Kowaltowski A.J. and Vercesi A.E.**. Mitochondrial damage induced by conditions of oxidative stress. *Free Radic Biol Med.* (1999); 26(3-4):463-471
- Kroll A.**, Pillukat Mike H., Hahn D.. Current in vitro methods in nanoparticle risk assessment: Limitations and challenges. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* (2009); Volume 72, Issue 2, June, Pages 370–377
- Kuo P.Y.**, Saltzman W.M.. Novel systems for controlled delivery of macromolecules, *Crit. Rev. Eukaryotic Gene Expr.* (1996); 6 (1) 59–73.
- Labhasetwar V.**, Song C., Levy R.J.. Nanoparticle drug delivery for restenosis, *Adv. Drug Del. Rev.* (1997); 24 63–85.
- Labhasetwar V.**, Bonadio J., Goldstein S.A., Levy R.J., Gene transfection using biodegradable nanospheres: results in tissue culture and a rat osteotomy model, *Colloids Surfaces B: Biointerfaces* (1999); 16 281–290.

- Lai D.Y.** Toward toxicity testing of nanomaterials in the 21st century: a paradigm for moving forward. *Wiley Interdiscip Rev Nanomed Nanobiotechnol.* (2012); 4(1):1-15.
- Lai S.K.**, Hida K., Man S.T., Chen C., Machamer C., Schroer T.A., Hanesa J.. Privileged delivery of polymer nanoparticles to the perinuclear region of live cells via a non-clathrin, non-degradative pathway. *Biomaterials.* (2007); 28(18):2876–84.
- Laitenen M.**, Hartikainen J., Hitunen M.O., Eranene J., Kiviniemi M., Narvanen O., Makinen K., Manninen H., Syvanne M., Martin J.F., Laakso M., Yla-Hertuala S.. Catheter-mediated vascular endothelial growth factor gene transfer to human coronary arteries after angioplasty. *Hum. Gene Ther.* (2000); 11, 263–270.
- Lammers T.**, Subr V., Ulbrich K., Hennink W.E., Storm G., Kiessling F.. Polymeric nanomedicines for image-guided drug delivery and tumortargeted combination therapy. *Nano Today.* (2010); 5:197–212.
- Lamprecht A.**, Bouligand Y., Benoit J.P.. New lipid nanocapsules exhibit sustained release properties for amiodarone. *J Control Release.* (2002); 84(1-2):59-68.
- Larsen J.D.**, Ross N.L., Sullivan M.O.. Requirements for the nuclear entry of polyplexes and nanoparticles during mitosis. *J Gene Med.* (2012) Volume 14, Issue 9-10, pages 580–589
- Lee K.Y.**, I.C. Kwon, Y.-H. Kim, W.H. Jo, S.Y. Jeong, Preparation of chitosan self-aggregates as a gene delivery system, *J. Controlled Release* 51 (1998) 213–220.
- Lee S. J.**, Han B. R., Park S. Y., Han D. K., Kim S. C.. Sol–gel transition behavior of biodegradable three-arm and four-arm star-shaped PLGA–PEG block copolymer aqueous solution. *Journal of Polymer Science Part A-Polymer Chemistry* (2006); Volume 44, Issue 2, pages 888–899.
- Lee J. N.**, Jiang X., Ryan D., Whitesides G. M.. Compatibility of mammalian cells on surfaces of poly(dimethylsiloxane). *Langmuir* (2004); 20, 11684–11691.
- Peyton S. R. and Putnam A. J.** Extracellular matrix rigidity governs smooth muscle cell motility in a biphasic fashion. *J. Cell. Physiol.* (2005) 204, 198–209.
- Lewinski N.**, Colvin V., Drezek R.. Cytotoxicity of nanoparticles. *Small.* (2008); 4(1):26-49.
- Li J., Foote R., Simkin M.** Development of rabbit zygotes cultured in protein-free medium with catalase, taurine, or superoxiden dismutase. *Biol. Reprod.*, (1993); 49, 33±37.

Li P.W., Kuo T.H., Chang J.H., Yeh J.M., Chan W.H.. Induction of cytotoxicity and apoptosis in mouse blastocysts by silver nanoparticles. *Toxicol Lett.* (2010); 197(2):82-7.

Liu F. and Huang L. Development of non-viral vectors for systemic gene delivery, *J. Controlled Release* (2002); 17 (78) 259–266.

Liu W.F. and Chen C.S. Engineering biomaterials to control cell function. *Materials today.* (2005); vol.8, number 12:28-35.

Liu Y., Li W., Lao F., Liu Y., Wang L., Bai R., Zhao Y., Chen C.. Intracellular dynamics of cationic and anionic polystyrene nanoparticles without direct interaction with mitotic spindle and chromosomes. *Biomaterials.* (2011); 32(32):8291-303.

Lo C. M., Wang H. B., Dembo M., Wang, Y. L. Cell movement is guided by the rigidity of the substrate. *Biophys. J.* (2000); 79, 144–152.

Luo D. and Saltzman W.M. Synthetic DNA delivery systems. *Nat Biotechnol.* (2000); 18(1):33-7.

Macia E., Ehrlich M., Massol R., Boucrot E., Brunner C., Kirchhausen T.. Dynasore, a cell-permeable inhibitor of dynamin. *Dev Cell.* (2006); 10(6):839-50.

Maheshwari A., Han S., Mahato R.I., Kim S.W., Biodegradable polymer-based interleukin-12 gene delivery: role of induced cytokines, tumor infiltrating cells and nitric oxide in anti-tumor activity, *Gene Ther.* (2002); 9 1075–1084.

Mailander V. and Landfester K. Interaction of nanoparticles with cells. *Biomacromolecules* (2009); 10:2379–400.

Makino K., Yamamoto N., Higuchi K., Harada N., Ohshima H., Terada H.. Phagocytic uptake of polystyrene microspheres by alveolar macrophages: effects of the size and surface properties of the microspheres. *Colloid Surf B* (2003); 27:33–9.

Malich G., Markovic B., Winder C.. The sensitivity and specificity of the MTS tetrazolium assay for detecting the in vitro cytotoxicity of 20 chemicals using human cell lines. *Toxicology* (1997); Volume 124, Issue 3, Pages 179–192

Mamaeva V., Sahlgren C., Lindén M.. Mesoporous silica nanoparticles in medicine-Recent advances. *Adv Drug Deliv Rev.* (2012). pii: S0169-409X(12)00248-7.

McCarthy J. Mechanisms of toxicity of amorphous silica nanoparticles on human lung submucosal cells in vitro: protective effects of fisetin. *Chem Res Toxicol.* (2012); 25 (10), pp 2227–2235

McConnell J.M. and Petrie L. Mitochondrial DNA turnover occurs during preimplantation development and can be modulated by environmental factors. *Reprod Biomed Online*. (2004); 9:418–424.

Menei P., Croue A., Daniel V., Pouplard-Barthelaix A., Benoit J.P.. Fate and biocompatibility of three types of microspheres implanted into the brain. *J Biomed Mater Res* (1994); 28:1079–85

Meng H., Chen Z., Xinga G., Yuana H., Chena C., Zhaoa F., Zhanga C., Zhao Y. Ultrahigh reactivity provokes nanotoxicity: explanation of oral toxicity of nano-copper particles. *Toxicol Lett* (2007); 175(1–3):102–110

Mercer J. and Helenius A. Vaccinia virus uses macropinocytosis and apoptotic mimicry to enter host cells. *Science* (2008); 320 (5875) 531–535.

Meredith J. B., Fazeli B., Schwartz M. A.. The extracellular matrix as a cell survival factor *Mol. Biol. Cell* (1993); 4, 953±961

Miller C.R., Bondurant B., McLean S.D., McGovern K.A., O'Brien D.F.. Liposome-cell interactions in vitro: effect of liposome surface charge on the binding and endocytosis of conventional and sterically stabilized liposomes. *Biochemistry* (1998); 37:12875–83.

Missirlis D., Kawamura R., Tirelli N., Hubbell J.A.. Doxorubicin encapsulation and diffusional release from stable, polymeric, hydrogel nanoparticles, *Eur. J. Pharm. Sci.* (2006); 29 (2) 120–129.

Moghimi S.M., Hunter A.C., Murray J.C.. Long-circulating and target specific nanoparticles: theory to practice, *Pharmacol. Rev.* (2001); 53 283–318.

Moley K.H., Chi M.M.-Y., Knudson C.M., Korsmeyer S.J., Mueckler M.M., Hyperglycemia induces apoptosis in pre-implantation embryos through cell death effector pathways. *Nature Medicine* (1998); 4 1421–1424.

Monteiro-Riviere N.A. and Inman A.O. Challenges for assessing carbon nanomaterial toxicity to the skin. *Carbon*. (2006); Volume 44, Issue 6, Pages 1070–1078

Moretti E., Terzuoli G., Renieri T., Iaconi F., Castellini C., Giordano C., Collodel G.. In vitro effect of gold and silver nanoparticles on human spermatozoa. *Andrologia*. (2012) Nov 1. [Epub ahead of print]

Morton W. M., Ayscough K. R., and McLaughlin P. J.. Latrunculin alters the actin-monomer subunit interface to prevent polymerization. *Nat. Cell Biol.* (2000); 2:376–378.

- Mosmann T.** Rapid Colorimetric Assay for Cellular Growth and Survival: Application to Proliferation and Cytotoxicity Assays *Journal of Immunological Methods*, (1983); 65 55-63 55
- Mu Q.**, Hondow N.S., Krzemi Ski L., Brown A.P., Jeuken L.J., Routledge M.N.. Mechanism of cellular uptake of genotoxic silica nanoparticles. Part Fibre Toxicol. (2012); 23;9(1):29.
- Muller J.**, Huaux F., Moreau N., Misson P., Heilier J.F., Delos M., Arras M., Fonseca A., Nagy J.B., Lison D.. Respiratory toxicity of multi-wall carbon nanotubes. *Toxicol Appl Pharmacol.* (2005); Volume 207, Issue 3, Pages 221–231
- Nel A. E.**, Mädler L., Velegol D., Xia T., Hoek E. M. V., Somasundaran P., Klaessig F., Castranova V., Thompson M.. Understanding biophysicochemical interactions at the nano–bio interface. *Nature Materials* (2009); 8, 543 - 557
- Nemmar A.**, Hoylaerts M.F., Hoet P.H., Dinsdale D., Smith T., Xu H., Vermeylen J., Nemery B.. Ultrafine particles affect experimental thrombosis in an in vivo hamster model. *Am J Respir Crit Care Med.* (2002); 166(7):998-1004.
- Nieland T.J.**, Ehrlich M., Krieger M., Kirchhausen T.. Endocytosis is not required for the selective lipid uptake mediated by murine SR-BI. *Biochim Biophys Acta* (2005); 1734, 44-51.
- Niemann H. and Wrenzycki C.** Alterations of expression of developmentally important genes in preimplantation bovine embryos by *in vitro* culture conditions: implications for subsequent development. *Theriogenology.* (2000); 53:21–34.
- Nohl H.**, Jordan W., Hegner D. Identification of free hydroxyl radicals in respiring rat heart mitochondria by spin trapping with the nitron . DMPO. *FEBS Lett.* (1981); 123:241–244.
- O'Brien P. J.**, Irwin W., Diaz D., Howard-Cofield E., Krejsa C. M., Slaughter M. R., Gao B., Kaludercic N., Angeline A., Bernardi P., Brain P., Hougham C.. High concordance of drug-induced human hepatotoxicity with in vitro cytotoxicity measured in a novel cell-based model using high content screening. *Archives of Toxicology* (2006); Volume 80, Issue 9, pp 580-604
- Oakley C. and Brunette D.M.** The sequence of alignment of microtubules, focal contacts and actin filaments in fibroblasts spreading on smooth and grooved titanium substrata. *J. Cell. Sci.* (1993); 106; 343-54.
- Oakley C.**, Jaeger N.A.F., Brunette D.M.. Sensitivity of fibroblasts and their cytoskeletons to substratum topographies: topographic guidance and topographic

compensation by micromachined grooves of different dimensions. *Exp. Cell. Res.* (1997); 234, 413-424.

Oberdorster G., Maynard A., Donaldson K., Castranova V., Fitzpatrick J., Ausman K., Carter J., Karn B., Kreyling W., Lai D., Olin S., Monteiro-Riviere N., Warheit D., Yang, H.. Principles for characterizing the potential human health effects from exposure to nanomaterials: elements of a screening strategy. *Part. Fibre Toxicol.* (2005a); 2, 8–43.

Oberdorster G., Oberdorster E., Oberdorster J.. Nanotoxicology: an emerging discipline evolving from studies of ultrafine particles. *Environ. Health Perspect.* (2005b); 113, 823–839.

Oh E., Delehanty J.B., Sapsford K.E., Susumu K., Goswami R., Blanco-Canosa J.B., Dawson P.E., Granek J., Shoff M., Zhang Q., Goering P.L., Huston A., Medintz I.L.. Cellular uptake and fate of PEGylated gold nanoparticles is dependent on both cell-penetration peptides and particle size. *ACS Nano.* (2011); 5(8):6434-48.

Ohara P.T. and R.C. Buck, Contact guidance in vitro: a light, transmission, and scanning electron microscopic study, *Exp. Cell. Res.* (1979); 121 235-49.

Oligino T.J., Yao Q., Ghivizzani S.C., Robbins P.. Vector systems for gene transfer to joints, *Clin. Orthop.* (2000); 379 S17–S30.

Pacurari M., Yin X.J., Zhao J., Ding M., Leonard S.S., Schwegler-Berry D., Ducatman B. S., Sbarra D., Hoover M. D., Castranova V., Vallyathan V.. Raw single-wall carbon nanotubes induce oxidative stress and activate MAPKs, AP-1, NF-kappaB, and Akt in normal and malignant human mesothelial cells. *Environ Health Perspect* (2008); 116:1211–7.

Panagia Z., Beletsia A., Evangelatosb G., Livanioub E., Ithakissiosa D.S., Avgoustakis K.. Effect of dose on the biodistribution and pharmacokinetics of PLGA and PLGA–mPEG nanoparticles. *International Journal of Pharmaceutics.* (2001); Volume 221, Issues 1–2, 19, Pages 143–152

Panté N. and Kann M. Nuclear pore complex is able to transport macromolecules with diameters of about 39 nm. *Mol Biol Cell.* (2002); 13(2):425-34.

Panyam J., Zhou W.Z., Prabha S., Sahoo S.K., Labhasetwar V.. Rapid endo-lysosomal escape of poly(DL-lactide-co-glycolide) nanoparticles: implications for drug and gene delivery. *FASEB J.* (2002); 16(10):1217-26.

Panyam J. and Labhasetwar V. Biodegradable nanoparticles for drug and gene delivery to cells and tissue. *Advanced Drug Delivery Reviews* (2012); 64 61–71.

- Panyam J. and Labhasetwar V.** Dynamics of endocytosis and exocytosis of poly(D,L-lactide-co-glycolide) nanoparticles in vascular smooth muscle cells, *Pharm. Res.* (2003); 20,212–220.
- Panyam J., Zhou W.Z., Prabha S., Sahoo S. K., Labhasetwar V.** Rapid endo-lysosomal escape of poly(DL-lactide-co-glycolide) nanoparticles: implication for drug and gene delivery. *The FASEB Journal* (2002); volume 16, pag.1217-1226.
- Papageorgiou I., Brown C., Schins R., Singh S., Newson R., Davis S., Fisher J., Ingham E., Case C.P.** The effect of nano- and micron-sized particles of cobalt-chromium alloy on human fibroblasts in vitro. *Biomaterials.* (2007); 28(19):2946-58.
- Park J.S., Han T.H., Lee K.Y., Han S.S., Hwang J.J., Moon D.H., Kim S.Y., Cho Y.W.** N-Acetyl histidine-conjugated glycol chitosan self-assembled nanoparticles for intracytoplasmic delivery of drugs: Endocytosis, exocytosis and drug release. *J. Control Release* (2006); 115 (1) 37–45
- Pawar K. and Kaul G.** Toxicity of titanium oxide nanoparticles causes functionality and DNA damage in buffalo (*Bubalus bubalis*) sperm in vitro. *Toxicol Ind Health.* (2012) [Epub ahead of print]
- Pelham Jr R. J. and Wang Y.** Cell locomotion and focal adhesions are regulated by substrate flexibility. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* (1997); 94, 13 661–13 665.
- Petros R.A. and DeSimone J.M.** Strategies in the design of nanoparticles for therapeutic applications. *Nat Rev Drug Discov.* (2010); 9(8):615-27.
- Pistoleri G. F., Caudana R., Cittadini G., Garlaschi G.** La risonanza magnetica; “Fiocco rosa” nella diagnostica mediante immagini. *Federazione medica- XXXVIII-8.* 1985-887.
- Ponti J., Sabbioni E., Munaro B., Broggi F., Marmorato P., Franchini F., Colognato R. and Rossi F.** Genotoxicity and morphological transformation induced by cobalt nanoparticles and cobalt chloride: an in vitro study in Balb/3T3 mouse fibroblasts. *Mutagenesis* (2009); 24:439–45.
- Pouliquen D., Perroud H., Calza F., Jallet P., Le Jeune J. J.** Investigation of the magnetic properties of iron oxide nanoparticles used as contrast agent for MRI. *Magn Reson Med.* (1992); 24(1):75-84.
- Pouton C.W., Seymour L.W.** Key issues in non-viral gene delivery. *Adv. Drug Deliv.* (2001); Rev. 46 187–203.
- Pozzi Mucelli R.** Considerazioni sui mezzi di contrasto per risonanza magnetica. *Radio1 Med* 107 2004 (suppl al N. 4); 32-33.

- Prabha S.**, Wen-Zhong Zhoua, Jayanth Panyama, Vinod Labhasetwar. Size-dependency of nanoparticle-mediated gene transfection: studies with fractionated nanoparticles. *International Journal of Pharmaceutics* (2002); Volume 244, Issues 1–2, 5 September, Pages 105–115
- Prego C.**, García M., Torres D., Alonso M.J.. Transmucosal macromolecular drug delivery. *J Control Release*. (2005); 101(1-3):151-62.
- Qaddoumi M.G.**, Gukasyan H.J., Davda J., Labhasetwar V., Kim K.J., Lee V.H.. Clathrin and caveolin-1 expression in primary pigmented rabbit conjunctival epithelial cells: role in PLGA nanoparticle endocytosis, *Mol. Vis.* (2003); 9 559–568.
- Quong D. and Neufeld R.J.**. DNA protection from extracapsular nucleases, within chitosan or poly-L-lysine-coated alginate beads, *Biotechnol Bioeng.* (1998); 60 124–134.
- Rana B.**, Michoulson D., Xie Y., Bucher N. L., Farmer S. M. Cell-extracellular matrix interactions can regulate the switch between growth and differentiation in rat hepatocytes: reciprocal expression of C/EBP alpha and immediate-early growth response transcription factors. *Mol. Cell. Biol.* (1994); 14, 5858±5869
- Ravagnan L.**, Roumier T., Kroemer G.. Mitochondria, the killer organelles and their weapons. *J Cell Physiol.* (2002); 192(2):131-7.
- Reed J.C.**. Bcl-2 family proteins: regulators of apoptosis and chemoresistance in hematologic malignancies. *Semin Hematol.* (1997); 34(4 Suppl 5):9-19.
- Reix N.**, Parat A., Seyfritz E., Van Der Werf R., Epure V., Ebel N., Danicher L., Marchioni E., Jeandidier N., Pinget M., Frère Y., Sigrist S.. In vitro uptake evaluation in Caco-2 cells and in vivo results in diabetic rats of insulin-loaded PLGA nanoparticles. *nt J Pharm.* (2012); 1;437(1-2):213-20.
- Rejman J.**, Oberle V., Zuhorn I.S., Hoekstra D.. Size-dependent internalization of particles via the pathways of clathrin- and caveolae-mediated endocytosis. *Biochem J.* (2004); Jan 1;377(Pt 1):159-69.
- Ringwood A.H.**, Levi-Polyachenko N., Carroll D.L.. Fullerene exposures with oysters: embryonic, adult, and cellular responses. *Environ Sci Technol.* (2009); 15;43(18):7136-41.
- Ronneberger B.**, Kao W.J., Anderson J.M., Kissel T. In vivo biocompatibility study of ABA triblock copolymers consisting of poly(L-lactic-co-glycolic acid) A blocks attached to central poly(oxyethylene) B blocks. *J Biomed Mater Res.* (1996); 30(1):31-40.

Ross A., Morriss M., Khairy Y., Khalaf P., Braude A., Coomarasamy T., El-Toukhy: A systematic review of the effect of oral antioxidants on male infertility. *Reproductive BioMedicine Online*. (2010); 20(6): 711–723

Rothen-Rutishauser B.M., Schurch S., Haenni B., Kapp N., Gehr P.. Interaction of fine particles and nanoparticles with red blood cells visualized with advanced microscopic techniques. *Environ Sci Technol* (2006); 40(14):4353–4359

Saltzman W.M. Drug delivery: engineering principles for drug therapy. Oxford, New York: Oxford University Press. (2001); 38: 36-38.

Samia A.C.S., Chen X.B., Burda C.. Semiconductor quantum dots for photodynamic therapy. *J Am Chem Soc* (2003); 125(51):15736–15737.

Saraste J., Palade G.E., Farquhar M.G. Temperature-sensitive steps in the transport of secretory proteins through golgi-complex in exocrine pancreatic cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* (1986); 83: 6425–6429.

Schädlich A., Caysa H., Mueller T., Tenambergen F., Rose C., Göpferich A., Kuntsche J., Mäder K.. Tumor accumulation of NIR fluorescent PEG-PLA nanoparticles: impact of particle size and human xenograft tumor model. *ACS Nano*. (2011); 5(11):8710-20.

Scientific Committee on Emerging and Newly Identified Health Risks (SCENIHR). Opinion on the Appropriateness of the risk assessment methodology in accordance with the technical guidance documents for new and existing substances for assessing the risks of nanomaterials. The 19th plenary on 21-22 June 2007

Scientific Committee on Emerging and Newly Identified Health Risks (SCENIHR). Opinion on: Risk Assessment of Products of nanotechnologies. The 28th plenary meeting of 19 January 2009.

Selivanova G. and Wiman K.G.. p53: a cell cycle regulator activated by DNA damage. *Advances in Cancer Research*. (1995); Volume 66, Pages 143–180

Selvan S. T., Tan T. T., Ying Robust J. Y.. Non-Cytotoxic, Silica-Coated CdSe Quantum Dots with Efficient Photoluminescence. *Advanced Materials* (2005); Volume 17, Issue 13, pages 1620–1625.

Shinkai M. Functional magnetic particles for medical application. *J Biosci Bioeng*. (2002); 94(6):606-13.

Shvedova A., Castranova V., Kisin E., Schwegler-Berry D., Murray A., Gandelsman V., Maynard A., Baron P.. Exposure to carbon nanotube material:

assessment of nanotube cytotoxicity using human keratinocyte cells. *Journal of Toxicology and Environmental Health* (2003); Volume 66, Issue 20,

Sinclair K.D., McEvoy T.G., Maxfield E.K., Maltin C. A., Young L. E., Wilmot I., Broadbent P. J., Robinson J. J.. Aberrant fetal growth and development after *in vitro* culture of sheep zygotes. *J Reprod Fertil.* (1999); 116:177–186.

Sinclair K.D., Young L.E., Wilmot I., McEvoy T.G.. In-utero overgrowth in ruminants following embryo culture: lessons from mice and a warning to men. *Hum Reprod.* (2000); 15(Suppl. 5):68–86.

Sinclair K.D. and Singh R. Modelling the developmental origins of health and disease in the early embryo. *Theriogenology.* (2007); 67:43–53.

Singh N., Manshian B., Jenkins G.J., Griffiths S.M., Williams P.M., Maffei T.G., Wright C.J., Doak S.H.. NanoGenotoxicology: the DNA damaging potential of engineered nanomaterials. *Biomaterials.* (2009); 30(23-24):3891-914.

Sionov R.V., Moallem E., Berger M., Kazaz A., Gerlitz O., Ben-Neriah Y., Oren M., Haupt Y.. c-Abl neutralizes the inhibitory effect of Mdm2 on p53. *J Biol Chem.* (1999); 274(13):8371-4.

Smith S.L., Everts R.E., Sung L.Y., Fuliang D.u., Raymond L., Henderson B., Rodriguez-Zas S. L., Nedambale T. L., Renard J.P., Lewin H. A., Yang X., Tian X. C. Gene expression profiling of single bovine embryos uncovers significant effects of *in vitro* maturation, fertilization and culture. *Mol Reprod Dev.* (2009); 76(5):523.

Song Y.K and Liu D. Free liposomes enhance the transfection activity of DNA/lipid complexes *in vivo* by intravenous administration, *Biochim. Biophys. Acta* (1998); 1372 (1) 141–150.

Soppimath K.S., Aminabhavi T.M., Kulkarni A.R., Rudzinski W.E.. Biodegradable polymeric nanoparticles as drug delivery devices. *J Control Release.*(2001); 70(1-2):1-20.

Srebrow A., Friedmann Y., Ravanpay A., Daniel C. W., Bissell M. J. Expression of Hoxa-1 and Hoxb-7 is regulated by extracellular matrix-dependent signals in mammary epithelial cells *J. Cell. Biochem.* (1998); 69, 377±391

Stromblad S., Becker J. C., Yerba M., Brooks P. C., Cheresh, D. A. Suppression of p53 activity and p21WAF1/CIP1 expression by vascular cell integrin alphaVbeta3 during angiogenesis. *J. Clin. Invest.* (1996); 98, 426±433

Suh H., Jeong B., Rathi R., Kim S.W.. Regulation of smooth muscle cell proliferation using paclitaxel-loaded poly(ethylene oxide)-poly(lactide/ glycolide) nanospheres, *J. Biomed. Mater. Res.* (1998); 42 331–338.

Surai P.F., Kutz E., Wishart G.J., Noble R.C., Speake B.K. The relationship between the dietary provision of alpha-tocopherol and the concentration of this vitamin in the semen of chicken: Effects on lipid composition and susceptibility to peroxidation. *Journal of Reproduction and Fertility* (1997) 110, 47-51

Susin S.A., Lorenzo H.K., Zamzami N., Marzo I., Brenner C., Larochette N., Prévost M.C., Alzari P.M., Kroemer G.. Mitochondrial release of caspase-2 and -9 during the apoptotic process. *J Exp Med.* (1999); 189(2):381-94.

Taylor U., Barchanski A., Garrels W., Klein S., Kues W., Barcikowski S., Rath D., Toxicity of gold nanoparticles on somatic and reproductive cells. *AdvExp Med Biol.* (2012); 733:125-33.

Thompson J.G., Mitchell M., Kind K.L.. Embryo culture and long-term consequences. *Reprod Fertil Dev.* (2007);19:43–52.

Thouas G.A., Trounson A.O., Jones G.M. Developmental effects of sublethal mitochondrial injury in mouse oocytes. *Biol Reprod.* (2006); 74:969–977.

Toduka Y., Toyooka T, Ibuki Y. Flow cytometric evaluation of nanoparticles using side-scattered light and reactive oxygen species-mediated fluorescence-correlation with genotoxicity. *Environ Sci Technol.* (2012); 46(14):7629-36.

Torchilin V.P., Rammohan R., Weissig V., Levchenko T.S.. TAT peptide on the surface of liposomes affords their efficient intracellular delivery even at low temperature and in the presence of metabolic inhibitors. *Proc Natl Acad Sci USA* (2001); 98:8786-91.

Tzvetkova-Chevolleau T., Ste´phanou A., Fuard D., Ohayon J., Schiavone P. and Tracqui P. The motility of normal and cancer cells in response to the combined influence of the substrate rigidity and anisotropic microstructure. *Biomaterials* (2008); 29, 1541–1551.

Van Beers B. E., Pringot, J., Gallez, B.. Iron oxides as contrast agents for MRI of the liver. *J Radiol.* (1995); 76(11):991-5.

Vandeputte C., Guizon I., Genestie-Denis I., Vannier B., Lorenzon G.. A microtiter plate assay for total glutathione and glutathione disulfide contents in cultured/isolated cells: performance study of a new miniaturized protocol. *Cell Biology and Toxicology* December (1994); Volume 10, Issue 5-6, pp 415-421

- Ventre M.**, Causa F., Netti P.A.. Determinants of cell-material crosstalk at the interface: towards engineering of cell instructive materials. *J R Soc Interface*.(2012); 9(74):2017-32.
- Verma A.**, Uzun O., Hu Y., Hu Y., Han H.S., Watson N., Chen S., Irvine D.J., Stellacci F.. Surface-structure-regulated cell-membrane penetration by monolayer-protected nanoparticles. *Nat Mater.* (2008); 7(7):588-95.
- Vinogradov S.V.**, Bronich T.K., Kabanov A.V.. Nanosized cationic hydrogels for drug delivery : preparation, propeties and interactions with cells, *Adv. Drug Del. Rev.* (2002); 54, 223-233.
- Vinu A.**, Hossain K.Z., Ariga K.. Recent advances in functionalization of mesoporous silica. *J NanosciNanotechnol* (2005); 5:347–371.
- Vogel V. and Sheetz M.** Local force and geometrysensing regulate cell functions. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* (2006); 7, 265–275.
- Wang H. B.**, Dembo M., Wang Y. L.. Substrate flexibility regulates growth and apoptosis of normal but not transformed cells. *Am. J. Physiol. Cell Physiol* (2000); 279, C1345–C1350.
- Wankhede M.**, Bouras A., Kaluzova M., Hadjipanayis C. G. Magnetic nanoparticles: an emerging technology for malignant brain tumor imaging and therapy. *Expert Rev Clin Pharmacol.* (2012); 5(2): 173–186.
- Waters K.M.**, Masiello L.M., Zangar R.C., Tarasevich B.J., Karin N..J, Quesenberry R.D., Bandyopadhyay S., Teeguarden J.G., Pounds J.G., Thrall B.D.. Macrophage responses to silica nanoparticles are highly conserved across particle sizes. *Toxicol Sci.* (2009); 107(2):553-69.
- Watkins A.J.**, Papenbrock T., Fleming T.P.. The preimplantation embryo: handle with care. *Semin Reprod Med.* (2008a); 26:175–185.
- Watkins A.J.**, Ursell E., Panton R., Papenbrock T., Hollis L., Cunningham C., Wilkins A., Perry V.H., Sheth B., Kwong W.Y., Eckert J.J., Wild A.E., Hanson M.A., Osmond C., Fleming T.P.. Adaptive responses by mouse early embryos to maternal diet protect fetal growth but predispose to adult onset disease. *Biol Reprod.* (2008b); 78:299–306.
- Weiss P.**, Cell contact. *Int. Rev. Cytol.* (1958); 7, 391-423.
- Wells D.N.**, Misica P.M., Tervit H.R.. Production of cloned calves following nuclear transfer with cultured adult mural granulosa cells. *Biol Reprod.* (1999); 60:996–1005.

- Wilkinson P.C.**, Shields J.M., Haston W.S.. Contact guidance of human neutrophil leukocytes. *Exp. Cell. Res.* (1982); 140 55-62.
- Win K.Y. and Feng S.S.** Effects of particle size and surface coating on cellular uptake of polymeric nanoparticles for oral delivery of anticancer drugs. *Biomaterials* (2005); 26:2713–22.
- Winer J. P.**, Janmey P. A., McCormick M. E., Funaki M. Bone marrow-derived human mesenchymal stem cells become quiescent on soft substrates but remain responsive to chemical or mechanical stimuli. *Tissue Eng. Part A.* (2009); 15, 147–154.
- Wise J.P. Sr**, Goodale B.C., Wise S.S., Craig G.A., Pongan A.F., Walter R.B., Thompson W.D., Ng A.K., Aboueissa A.M., Mitani H., Spalding M.J., Mason M.D.. Silver nanospheres are cytotoxic and genotoxic to Wsh cells. *AquatToxicol* (2009); 97(1):34–41.
- Wiwanitkit V.**, Sereemasapun A., Rojanathanes R.. Effect of gold nanoparticles on spermatozoa: the first world report. *Fertil Steril.* (2009); 91(1):e7-8.
- Wolf B.B. and Green D.R.** Suicidal tendencies: apoptotic cell death by caspase family proteinases. *J Biol Chem.* (1999); 274(29):20049-52.
- Wolff J.A**, Malone R.W., Williams P., Chong W., Acsadi G., Jani A., Felgner P.L.. Direct gene transfer into mouse muscle in vivo. *Science* (1990); 247 1465–1468.
- Wolff S.P. and Dean R.T.** Fragmentation of proteins by free radicals and its effect on their susceptibility to enzymic hydrolysis. *Biochem J.* (1986); 234(2): 399–403.
- Wong Shi Kam N.** , Jessop T. C. , Wender P. A. , Dai H.. Nanotube Molecular Transporters: Internalization of Carbon Nanotube–Protein Conjugates into Mammalian Cells, *J. Am. Chem. Soc.*, (2004); 126 (22), pp 6850–6851
- Wyllie A.H.**, Kerr J.F., Currie A.R.. Cell death: the significance of apoptosis. *Int Rev Cytol.* (1980); 68:251-306.
- Hao X., Wu J., Shan Y., Cai M., Shang X., Jiang J., Wang H.** Caveolae-mediated endocytosis of biocompatible gold nanoparticles in living Hela cells. *J. Phys.: Condens. Matter* (2012); 24(16):164207
- Xu G.**, Lin S., Law W.C., Roy I., Lin X., Mei S., Ma H., Chen S., Niu H., Wang X., The Invasion and Reproductive Toxicity of QDs-Transferrin Bioconjugates on Preantral Follicle in vitro. *Theranostics.* (2012); 2(7):734-45.

- Yacobi N.R.**, Demaio L., Xie J., Hamm-Alvarez S.F., Borok Z., Kim K.J., Crandall E.D.. Polystyrene nanoparticle trafficking across alveolar epithelium. *Nanomedicine*. (2008); 4(2):139-45.
- Yacobi N.R.**, Malmstadt N., Fazlollahi F., DeMaio L., Marchelletta R., Hamm-Alvarez S.F., Borok Z., Kim K.J., Crandall E.D. Mechanisms of alveolar epithelial translocation of a defined population of nanoparticles. *Am J Respir Cell Mol Biol* (2010); 42(5):604–614
- Yamawaki H. and Naoharu Iwai N.** Cytotoxicity of water-soluble fullerene in vascular endothelial cells. *Am J Physiol Cell Physiol* (2006) vol. 290 no. 6 C1495-C1502
- Yim E. K.**, Reano R. M., Pang S. W., Yee A. F., Chen C. S., Leong, K. W. Nanopattern-induced changes in morphology and motility of smooth muscle cells. *Biomaterials* (2005); 26, 5405–5413.
- Yoo H.S.**, Lee K.H., Oh .J.E, Park T.G.. In vitro and in vivo anti-tumor activities of nanoparticles based on doxorubicin-PLGA conjugates. *J Control Release*. (2000); 68(3):419–431.
- Yoo J.W.**, Doshi N., Mitragotri S.. Endocytosis and intracellular distribution of PLGA particles in endothelial cells: effect of particle geometry. *Macromol Rapid Commun* 2010;31:142–8.
- Zaari N**, Rajagopalan P, Kim SK, Engler AJ, Wong JY. Photopolymerization in Microfluidic Gradient Generators: Microscale Control of Substrate Compliance to Manipulate Cell Response *Advanced Materials* Vol. 16, Issue 23-24, December 2004, 2133-2137
- Zabner J.**, A.J. Fasbender, T. Moninger, K.A. Poellinger, M.J. Welsh, Cellular and molecular barriers to gene transfer by a cationic lipid, *J. Biol. Chem.* 270 (32) (1995) 18997–19007.
- Zauner W.**, Farrow N.A., Haines A.M.R.. In vitro uptake of polystyrene microspheres: effect of particle size, cell line and cell density. *J Control Release* 2001;71:39–51.
- Zelphati O.**, Wang Y., Kitada S., Reed J.C., Felgner P.L., Corbeil J., Intracellular delivery of proteins with a new lipid-mediated delivery system, *J Biol Chem*. (2001); 276(37):35103-10

Zhang Y., Chirmule N., Gao G.p., Qian R., Croyle M., Joshi B., Tazelaar J. and Wilson J.M.. Acute cytokine response to systemic adenoviral vectors in mice is mediated by dendritic cells and macrophages. *Mol Ther.* (2001); 3: 697–707.

Zheng S., Newton G.L., Gonick,G. Fahey RC, Ward JF. Radioprotection of DNA by thiols: relationship between the net charge on a thiol and its ability to protect DNA. *Radiat Res.* (1988); 114(1):11-27.

Zhu X. and Assoian R. K. Integrin-dependent activation of MAP kinase: a link to shape-dependent cell proliferation. *Mol. Biol. Cell.* (1995); 6, 273±282