

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

**SCUOLA DI DOTTORATO IN SCIENZE FILOSOFICHE**



**DOTTORATO DI RICERCA IN BIOETICA**

**XXVI CICLO**

**ASPETTI BIOLOGICI E BIOETICI DEGLI EFFETTI DELLE  
NANOPARTICELLE SULL'AMBIENTE E SULLA SALUTE UMANA.**

Tutor

Ch.mo Prof. Roberto Gualtieri

Coordinatore

Ch.ma Prof.ssa Emilia D'Antuono

Candidata

Dott.ssa Sabrina Braun

**ANNO ACCADEMICO 2011-2014**

# INDICE

<b>INTRODUZIONE</b>	Pag 4
<b>1. NANOTECNOLOGIA E NANOPARTICELLE</b>	Pag 5
1.1 Nanoscienza e Nanotecnologia	Pag 6
1.2 Nanoparticelle: definizione ed origine	Pag 9
<b>2. PARTICOLATO ED EFFETTI SULL'UOMO E SULL'AMBIENTE</b>	Pag 11
2.1 Particolato atmosferico	Pag 12
2.2 Effetti del particolato atmosferico sulla salute umana	Pag 15
2.3 Effetti del particolato atmosferico sull'ambiente	Pag 22
2.4 Misura dell'esposizione	Pag 27
<b>3. NANOPARTICELLE INGEGNERIZZATE E LORO APPLICAZIONI</b>	Pag 30
3.1 Produzione e classificazione delle nanoparticelle ingegnerizzate	Pag 31
3.2 Applicazioni nanotecnologiche delle nanoparticelle	Pag 35
3.2.1 Applicazioni biomediche delle nanoparticelle	Pag 39
3.2.1.1 Nanobiotecnologia e caratteristiche delle nanoparticelle utilizzate in campo biomedico	Pag 39
3.2.1.2 Drug delivery	Pag 45
3.2.1.3 Gene therapy	Pag 48
3.2.1.4 Ipertermia	Pag 51

3.2.1.5 Risonanza magnetica	Pag 54
3.2.1.6 Ingegneria tissutale	Pag 56
4. NANOTECNOLOGIA E TOSSICITA'	Pag 62
4.1 Nanotossicologia	Pag 63
4.2 Caratteristiche chimico-fisiche e tossicità delle nanoparticelle	Pag 66
4.3 Effetti delle nanoparticelle ingegnerizzate sulla salute umana	Pag 70
4.4 Tossicità delle nanoparticelle in campo biomedico	Pag 82
4.5 Effetti delle nanoparticelle ingegnerizzate sull'ambiente	Pag 89
5. NANOTECNOLOGIA ED ETICA	Pag 95
5.1 Implicazioni etiche della nanotecnologia	Pag 96
<b>DISCUSSIONE</b>	Pag 101
<b>BIBLIOGRAFIA</b>	Pag 120

# **INTRODUZIONE**

**CAPITOLO 1**  
**NANOTECNOLOGIA E NANOPARTICELLE**

## 1.1 NANOSCIENZA E NANOTECNOLOGIA.

Il concetto di nanoscienza è stato coniato per la prima volta dal fisico Richard Feynman nel 1960 (Feynman, 1960) nel discorso intitolato *“There’s plenty of room at the bottom- An invitation to enter a new field of physics”*, durante il quale avanzò l’ipotesi che si sarebbero potuti costruire dispositivi di varia natura, agendo direttamente sulla posizione degli atomi nella materia (Feynman, 1960).

Il termine nanotecnologia è stato coniato invece per la prima volta, ventisette anni dopo, da Kim Eric Drexler nel libro intitolato *“Engines of creation: the coming era of nanotechnology”* (Drexler, 1986).

Attualmente, non esiste ancora una definizione universalmente accettata per nanoscienze e nanotecnologie, ma ve ne sono molte simili tra loro. Secondo la Royal Society & The Royal Academy of Engineering (UK) (2004) *“Nanoscience is the study of phenomena and manipulation of materials at atomic, molecular and macromolecular scales, where properties differ significantly from those at a larger scale”* e *“Nanotechnology is the design, characterisation, production and application of structures, devices and systems by controlling shape and size at nanometre scale”*. Analoga risulta essere la definizione di nanotecnologia data dalla National Nanotechnology Initiative (USA) (NNI, 2006) *“Nanotechnology is the understanding and control of matter at dimensions of roughly 1 to 100 nanometres, where unique phenomena enable novel applications... At this level, the physical, chemical, and biological properties of materials differ in fundamental and valuable ways from the properties of individual atoms and molecules or bulk matter”*.

In sintesi le nanoscienze costituiscono il punto di incontro di discipline diverse che vanno dalla fisica quantistica, alla chimica supramolecolare, dalla scienza dei materiali, alla biologia. Le nanotecnologie, invece, puntano a sfruttare e ad applicare i metodi e le conoscenze derivanti dalle nanoscienze. Esse fanno riferimento ad un insieme di tecnologie, tecniche e processi che richiedono un approccio multidisciplinare e che, basandosi sulla manipolazione della materia su scala atomica e molecolare, prevedono la creazione e utilizzazione di materiali, dispositivi e sistemi con dimensioni a livello nanometrico, i così detti nanoprodotti. Questi ultimi hanno dimensioni molto ridotte, comprese tra gli 1 e 100nm (1nm è un milionesimo di metro). Le prospettive rivoluzionarie associate alla nanotecnologie derivano dal fatto che, a queste dimensioni ridotte, comportamenti e caratteristiche della materia cambiano drasticamente rispetto a dimensioni maggiori, in tal modo le nanotecnologie rappresentano un modo

radicalmente nuovo di produzione di materiali, strutture e dispositivi con proprietà e funzionalità grandemente migliorate o del tutto nuove.

Le nanotecnologie trovano applicazione in tutti i settori produttivi. Numerosi sono i prodotti derivanti dal loro utilizzo, alcuni già disponibili sul mercato, altri in procinto di esserlo. Il loro numero è in costante crescita. Negli ultimi otto anni, la produzione di NP è aumentata notevolmente: è stato stimato infatti che finora sono stati realizzati 1628 prodotti nanotecnologici impiegati nei settori più disparati (The Project on Emerging Nanotechnologies Consumer Products Inventory, 2013) (Fig 1).

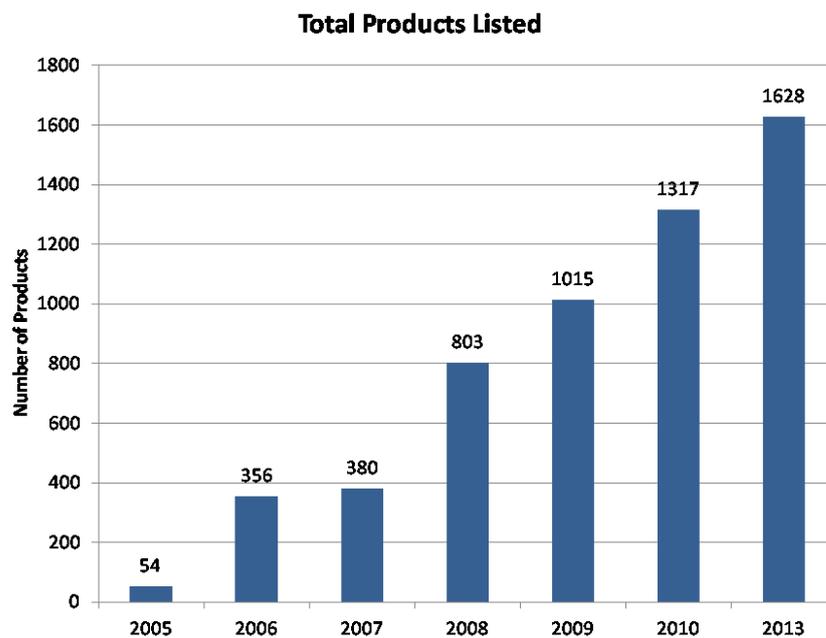


Fig. 1: numero di prodotti nanotecnologici dal 2005 al 2013.

I principali produttori dei prodotti nanotecnologici sono gli Stati Uniti, che allo stato attuale hanno realizzato ben 741 nanoprodotto, seguiti poi dall'Europa (UK, Francia, Germania, Finlandia, Svizzera, Italia, Svezia, Danimarca), con 440 nanoprodotto, dall'Est Asiatico (incluso Cina, Taiwan, Korea, Giappone), con 276 nanoprodotto, ed infine da altri paesi (Australia, Canada, Messico, Israele, Nuova Zelanda, Malesia, Thailandia, Singapore, Filippine), con 86 nanoprodotto (The Project on Emerging Nanotechnologies Consumer Products Inventory, 2013) (Fig 2).

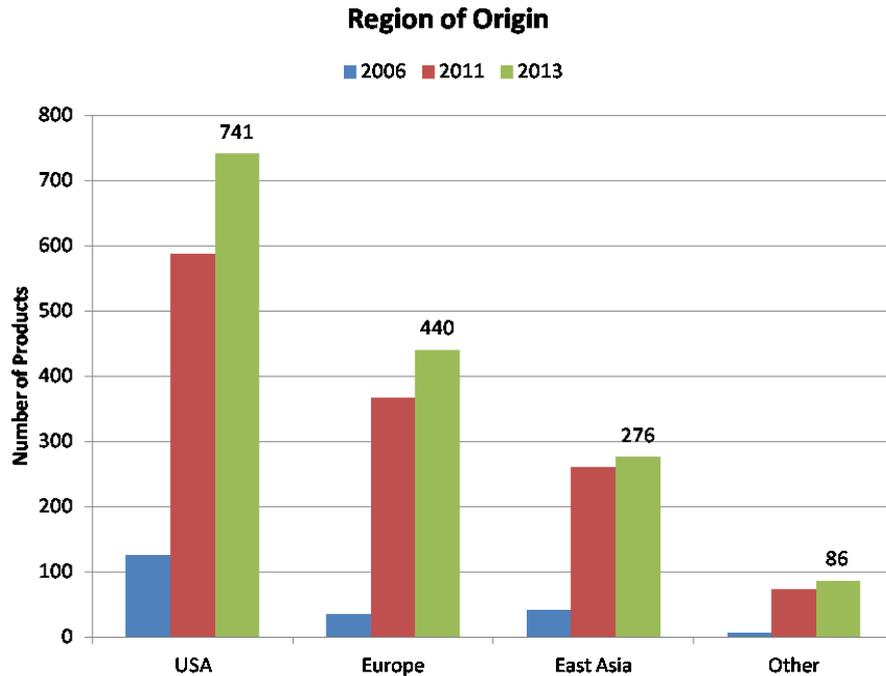


Fig. 2: numero di nanoprodotto nei diversi paesi negli anni 2006, 2011 e 2013.

Tra i nanoprodotto si possono annoverare nanoparticelle per vernici, tessuti, cosmetici ed alimenti, nanocompositi come “hard disks” per registrazione di dati ad altissima densità o “chips” di memoria, dispositivi fotonici, superfici autopulenti, sistemi avanzati per la somministrazione mirata di farmaci, protesi mediche più resistenti e con migliorata biocompatibilità, materiali innovativi per i sistemi di produzione e stoccaggio dell’energia. In poche parole, le applicazioni delle nanotecnologie sono potenzialmente infinite e rivolte praticamente a tutti i settori produttivi, ciò fa sì che le nanotecnologie possano contribuire in maniera decisiva alla promozione di uno sviluppo sostenibile. Il mercato delle nanotecnologie sembra raggiungere effettivamente dimensioni veramente enormi. La sua crescita è straordinaria: è stato stimato infatti che dopo il 2015 essa sarà pari a più di 1000 miliardi di dollari (The Project on Emerging Nanotechnologies Consumer Products Inventory, 2013).

## 1.2 NANOPARTICELLE: DEFINIZIONE ED ORIGINE

Secondo la American Society for Testing and Materials (ASTM, 2006), si definiscono con il termine di nanoparticelle (NPs) particelle aventi dimensioni comprese tra 1 e 100nm (Fig 3).



Fig. 3: Nanoparticelle

Le NP differiscono tra loro per dimensione, origine, forma (sferica, tubulare, filamentosa o irregolare), composizione, e possono esistere allo stato disperso o in forma fusa, aggregata e agglomerata.

Le ridotte dimensioni delle NPs fanno sì che esse posseggano proprietà e caratteristiche differenti da quelle possedute dagli stessi componenti aventi dimensioni maggiori (i così detti “bulk materials” o macroparticelle) (Borm et al, 2006; Poma and Di Giorgio, 2008). Tali proprietà sono attribuibili all'aumentato rapporto tra l'area di superficie e il numero per unità di massa delle NPs che implica una maggiore reattività chimica, una maggiore resistenza e conducibilità elettrica e, potenzialmente, una più accentuata attività biologica. Ciò fa sì che esse seguano leggi fisiche a metà tra la fisica classica e la fisica quantistica (Marconi, 2006). Inoltre va sottolineato che grazie alle forze adesive di superficie le NPs possono interagire con altre NPs formando aggregati o agglomerati di dimensioni maggiori (Mohanraj and Chen, 2006). Gli aggregati sono costituiti da NPs tenute insieme da forze molto stabili, mentre gli agglomerati sono costituiti da NPs tenute insieme da forze deboli come forze di Van der Waals, elettrostatiche o di tensione superficiale. La tendenza a formare aggregati e/o agglomerati comporta una riduzione

dell'reattività chimica delle NPs facendo sì che esse assumano comportamenti e proprietà simili alle macroparticelle.

A seconda della loro origine esse vengono classificate in: naturali ed antropogeniche (Guzman et al, 2006). Le prime sono una componente chiave del nostro ecosistema; sono prodotte da nanofossili (Southam and Donald, 1999) vulcani, processi chimici di combustione (incendi) (Banfield et al, 1990), agenti microbici (Labrenz, et al, 2000) e da componenti di sedimenti acquatici (sale marino) (Van der Zee, et al, 2003; Garvie, and Buseck, 2004). Le seconde invece, così chiamate in quanto sono prodotte dall'uomo, vengono a loro volta distinte, a seconda se sono prodotte volontariamente o involontariamente, in NPs intenzionali e non intenzionali (Guzman et al, 2006; Marconi, 2006). Le NPs non intenzionali provengono da sorgenti di combustione ad alta temperatura come inceneritori, fonderie, cementifici, gas di scarico delle automobili e riscaldamento domestico, fumo di sigarette, mentre quelle intenzionali, dette anche ingegnerizzate, sono frutto della nanotecnologia. Si tratta di metalli, semiconduttori, polimeri, ecc.. che sono utilizzati in diversi settori (settore agricolo, elettronico, biomedico, farmaceutico, cosmetico, alimentare ecc...). (Fig 4)

Naturali	Antropogeniche	
	<i>Non intenzionali</i>	<i>Intenzionali</i>
Incendi	Motori a combustione interna	Nanoparticelle ingegnerizzate:
Vulcani	Centrali elettriche	<i>Nanomateriali di carbonio</i>
	Inceneritori	<i>Nanomateriali metallici</i>
	Jet di aeroplani	<i>Dendrimeri</i>
	Fumi metallici (siderurgia)	<i>Compositi</i>
	Fumi polimerici	
	Altri fumi	
	Superfici riscaldate	
	Cottura	
	Motori elettrici	

Fig. 4: Principali fonti di NPs.

La principale differenza tra le particelle antropogeniche non intenzionali ed intenzionali è la natura polidispersa e chimicamente complessa delle prime, rispetto alle caratteristiche di monodispersione e precisa composizione chimica delle seconde (Cyrus et al, 2003).

**CAPITOLO 2**  
**PARTICOLATO ED EFFETTI SULL'UOMO E**  
**SULL'AMBIENTE**

## 2.1 PARTICOLATO ATMOSFERICO

L'uomo è da sempre esposto alle NPs, dato che molte di esse sono di origine naturale. Tuttavia, l'esposizione alle NPs è cresciuta notevolmente nell'ultimo secolo a causa del crescente sviluppo industriale. Oggigiorno, le NPs costituiscono una cospicua parte del particolato atmosferico urbano, detto anche aerosol urbano. Con tale termine si intende l'insieme di particelle solide o liquide disperse nell'atmosfera, con dimensioni comprese tra pochi nanometri e decine di micron (EPA, Environmental Protection Agency-USA, [www.epa.gov](http://www.epa.gov)). La composizione chimica del particolato è costituita da ioni inorganici (solfati, nitrati, ammonio), da carbonio elementare ed organico, da metalli come piombo, zinco, rame ecc.. e da acqua.

Le particelle che concorrono alla formazione del particolato sono sia di origine naturale (particelle di roccia e di suolo erose, sollevate o risospese dal vento, materiale organico e ceneri derivanti da incendi boschivi o da eruzioni vulcaniche, pollini e residui vegetali, spore, spray marino, resti di insetti) che antropogenica non intenzionale (particelle derivanti da impianti industriali e di riscaldamento, da emissione di auto, dall'usura del manto stradale e dei freni, dallo smaltimento dei rifiuti). Il rapporto fra questi fattori varia molto a seconda dei luoghi. Nelle aree urbane le proporzioni tra questi fattori sono sbilanciate a favore dei fattori antropogenici non intenzionali, dove sono senza dubbio le emissioni delle industrie, del riscaldamento domestico, della combustione dei motori delle auto, dei fumi di tabacco, e degli inceneritori a costituire l'apporto preponderante (Cyrus et al, 2003)

L'immissione diretta delle particelle nell'atmosfera viene definita particolato primario, mentre si definisce particolato secondario quel particolato costituito da particelle originate dalla conversione di gas, immessi in atmosfera, (monossido di carbonio, ossidi di zolfo e di azoto ecc...), in particelle solide mediante processi di nucleazione. Si tratta di processi tramite i quali radicali presenti in fase gassosa si aggregano per costituire particelle più grandi. Entrambi i tipi di particolato, primario e secondario, svolgono un importante ruolo tra gli inquinanti atmosferici a causa dei loro effetti negativi sulla salute umana e per il forte impatto ambientale (Fig. 5).

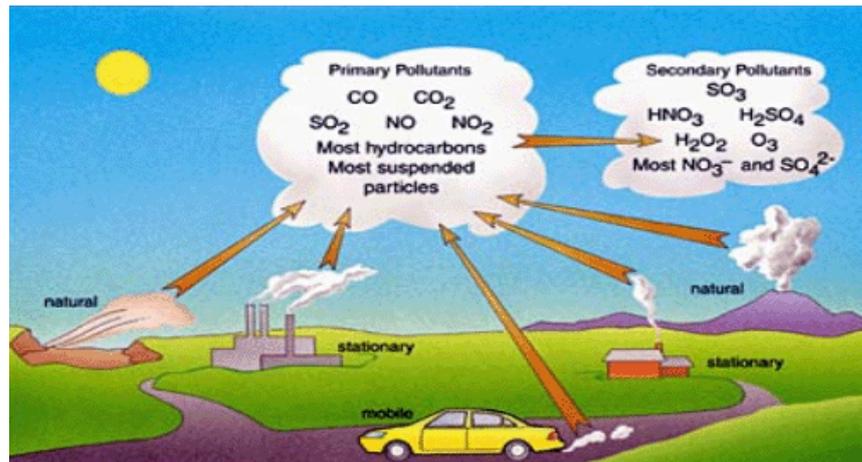


Fig. 5: Particolato primario e secondario prodotto da fonti naturali ed antropogeniche non intenzionali.

Le particelle che costituiscono il particolato differiscono oltre che per composizione ed origine, anche per forma, densità, e dimensione. Le dimensioni delle particelle rappresentano però il parametro più importante da prendere in considerazione per comprenderne il comportamento ed il tempo di residenza nell'atmosfera (Marconi, 2003)

Attualmente si utilizza un identificativo formale delle dimensioni, il Particulate Matter (PM) seguito dal diametro aerodinamico massimo delle particelle, che rappresenta il diametro equivalente di una particella perfettamente sferica di densità unitaria (1g/cm<sup>3</sup>) che ha le stesse proprietà inerziali della particella in esame nelle medesime condizioni di temperatura, pressione e umidità relativa.

Sulla base delle dimensioni le particelle vengono così suddivise (Organizzazione Mondiale della Sanità, Oms, 2000) in :

- **Particolato grossolano:** particolato di dimensioni superiori ai 10 µm.
- **PM<sub>10</sub>** – particolato formato da particelle inferiori a 10µm.
- **PM<sub>2,5</sub>** – particolato fine con diametro inferiore a 2,5 µm.
- **PM<sub>0,1</sub>**- particolato ultrafine (PUF), detto anche nanoparticolato, con diametro inferiore a 0,1 µm.

Il particolato grossolano è costituito da particelle di grosse dimensioni derivate essenzialmente da processi meccanici (erosione, risospensione meccanica o eolica, macinazione), che tendono a sedimentare in tempi brevi (ore o minuti), ritrovandosi così vicino alle sorgenti di emissione.

Il particolato fine si forma per processi di nucleazione, di coagulazione o di condensazione di particelle ultrafini. La coagulazione e la condensazione sono processi che prevedono la produzione di particelle di dimensioni maggiori a partire dall'interazione ed aggregazione di particelle di dimensioni minori. Tra le particelle che costituiscono il particolato fine si annoverano solfati, nitrati, ione ammonio, carbonio elementare ed organico, e particelle di origine biologica come spore fungine, lieviti, batteri.

Infine, il particolato ultrafine è costituito da prodotti della nucleazione di vapori sovrasaturi (biossido di zolfo e di azoto, ammoniaca, e prodotti della combustione).

## 2.2 EFFETTI DEL PARTICOLATO ATMOSFERICO SULLA SALUTE UMANA

Secondo i dati sull'inquinamento dell'aria pubblicati, nel 2011, dall'Oms "l'inquinamento atmosferico raggiunge livelli pericolosi per la salute in numerose città" (WHO, [www.who.int](http://www.who.int)). Lo studio Oms è senza precedenti e riguarda i dati relativi alle concentrazioni medie di PM<sub>10</sub> di 1.100 città di 91 Paesi, tra le quali le capitali ed i centri con più di 100mila abitanti. I dati sulla qualità dell'aria sono stati ottenuti da fonti pubbliche nazionali o comunali, basate sui risultati dei controlli della qualità dell'aria effettuati in ogni città. Essi si basano su misurazioni effettuate dal 2003 al 2010 (Fig 6).

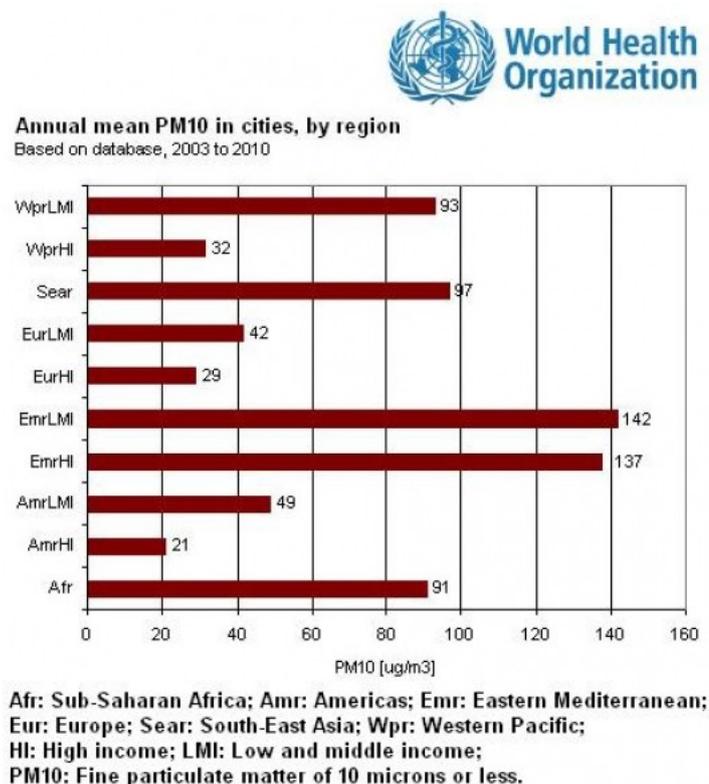


Fig 6: dati relativi alla concentrazione media annua di PM<sub>10</sub> in tutto il mondo, negli anni 2003-2010.

Nelle linee guida l'Oms fissa una soglia per la qualità dell'aria che prevede una concentrazione massima annuale di PM<sub>10</sub> di 20µg/m<sup>3</sup>, ma i dati pubblicati dall'agenzia dell'Onu per la salute dimostrano che in diverse città questa concentrazione raggiunge fino a 300 µg/m<sup>3</sup>. Tale concentrazione è aumentata notevolmente negli anni 2008-2009.

In media, solo qualche città presenta valori conformi alle linee guida dell'Oms. Per il 2008, è stato stimato a 1,34 milioni il numero di decessi prematuri attribuibili all'inquinamento atmosferico in città. Se i valori fossero stati dappertutto conformi alle linee guida dell'Oms, 1,09 milioni di vite avrebbero potuto essere salvate in quell'anno. Secondo l'Oms il particolato più nocivo per la salute umana è rappresentato però dal particolato fine ed ultrafine, in quanto in grado di penetrare nei polmoni, entrare nella circolazione sanguigna e provocare malattie respiratorie e cardiovascolari. Purtroppo solo per alcune città sono disponibili i dati relativi al PM<sub>2,5</sub>, dai quali è emerso che ogni anno più di 2 milioni di persone muoiono a causa dell'inalazione di particolato fine presente nell'aria. Per questo motivo l'Oms ritiene di approfondire gli studi in materia di PM<sub>2,5</sub> e PM<sub>0,1</sub>, chiede una maggiore informazione e sensibilizzazione sui rischi dell'inquinamento atmosferico e di mettere in opera efficaci politiche per controllarlo e gestirlo in modo corretto, in modo da ridurre notevolmente il numero di persone che soffrono di malattie respiratorie e cardiache. L'Oms ha stabilito come media annuale massima di concentrazione di PM<sub>2,5</sub> 10 µg/m<sup>3</sup>. Attualmente numerosi Paesi sono privi di regolamentazione sulla qualità dell'aria e, quando ne hanno una, le norme nazionali e la loro applicazione variano considerevolmente. Al fine di salvaguardare la salute umana, negli USA l'EPA nel 2012 ha regolamentato il PM<sub>2,5</sub>, stabilendo come standard per la qualità dell'aria un valore massimo pari a 12µg/m<sup>3</sup> (EPA, [www.epa.gov](http://www.epa.gov)). In Europa, la Direttiva 2008/50/CE del Parlamento europeo e del Consiglio del 21 maggio 2008, relativa alla qualità dell'aria, stabilisce come valore massimo annuo per PM<sub>10</sub> 40 µg/m<sup>3</sup> e prevede che nel 2015 il valore massimo annuo per PM<sub>2,5</sub> sia 25 µg/m<sup>3</sup>, raggiungendo poi 20 µg/m<sup>3</sup> nell'anno 2020 (Gazzetta Ufficiale dell'Unione Europea, 2008). La presente direttiva istituisce misure volte a:

- definire e stabilire obiettivi di qualità dell'aria, al fine di ridurre gli effetti nocivi per la salute e per l'ambiente;
- valutare la qualità dell'aria negli Stati membri sulla base di metodi e criteri comuni;
- garantire che le informazioni sulla qualità dell'aria siano messe a disposizione del pubblico;
- mantenere la qualità dell'aria, laddove sia buona, e migliorarla ove non lo sia;
- promuovere una maggiore cooperazione tra gli Stati membri nella lotta contro l'inquinamento atmosferico.

Con tale Direttiva gli Stati membri si impegnano a rispettare i valori soglia di PM e, qualora questi siano superati, devono provvedere ad elaborare piani di azione volti a sospendere le attività che contribuiscono al superamento di queste soglie (la circolazione dei veicoli a motore, i lavori di costruzione, l'attività degli impianti industriali, ecc).

La Direttiva europea relativa alla qualità dell'aria è attuata in Italia dal Decreto Legislativo n°155 del 13 agosto del 2010.

Al giorno d'oggi, gli studi presenti in letteratura riguardo la tossicità del particolato atmosferico sulla salute umana sono in genere di tre tipi: studi epidemiologici, che mirano ad individuare le possibili correlazioni tra le concentrazioni di particelle presenti in atmosfera e gli effetti sulla salute umana; studi sperimentali in vivo, effettuati su animali, ed in vitro condotti su colture cellulari, che mirano ad individuare e comprendere i meccanismi biologici attraverso i quali l'esposizione al particolato può provocare effetti nocivi sull'uomo. Dall'analisi di questi studi appare in maniera evidente che non è possibile generalizzare un profilo tossicologico per le NPs atmosferiche, in quanto NPs differenti per caratteristiche chimico-fisiche hanno in genere proprietà tossicologiche differenti. Ecco perché risulta utile valutare caso per caso ogni tipo di NPs.

Tre sono le vie di ingresso delle particelle presenti nell'aria nel corpo umano: la via respiratoria, cutanea e gastro-intestinale.

### *ASSORBIMENTO RESPIRATORIO*

Numerosi studi condotti sia in vivo che in vitro dimostrano che l'inalazione è la principale via di esposizione, mentre ancora poco si conosce circa l'assorbimento delle NPs cutaneo e gastro-intestinale (Warheit et al, 2007). In tal modo l'apparato respiratorio rappresenta il primo organo bersaglio. Studi epidemiologici nella popolazione mostrato una stretta associazione tra livelli atmosferici di particelle ed incrementi di morbilità e mortalità per patologie respiratorie (Peters et al, 1997; Wichmann et al, 2000; Penttinen et al, 2001; Ibald-Mulli et al, 2002 ), ed hanno inoltre fornito fondate indicazioni di possibili effetti cancerogeni per il polmone (Vineis et al, 2004). Le particelle si depositano nelle vie respiratorie, attraverso un processo di diffusione che risulta essere facilitato dal fattore dimensionale delle stesse (Zhang et al 2005). Quelle di dimensioni maggiori che costituiscono il particolato grossolano si

depositano a livello del tratto respiratorio superiore non riuscendo a superare la laringe (particolato sedimentabile), le  $PM_{10}$  e  $PM_{2,5}$  raggiungono il tratto naso-faringeo e tracheobronchiale (rispettivamente particolato inalabile e toracico), dove sono successivamente espulse mediante meccanismi di “clearance” muco-ciliare, mentre le  $PM_{0,1}$  (NPs) penetrano nel tratto respiratorio inferiore, in particolare nella regione alveolare (particolato respirabile), (Nel et al, 2006). Qui le NPs possono o essere fagocitate dai macrofagi, il che comporta una severa risposta di flogosi polmonare (Gardiner et al, 2001), oppure traslocare in siti extrapolmonari, attraverso il circolo sanguigno, raggiungendo così organi come cuore, fegato e cervello (Gwinn and Vallyathan, 2006) (Fig 7).

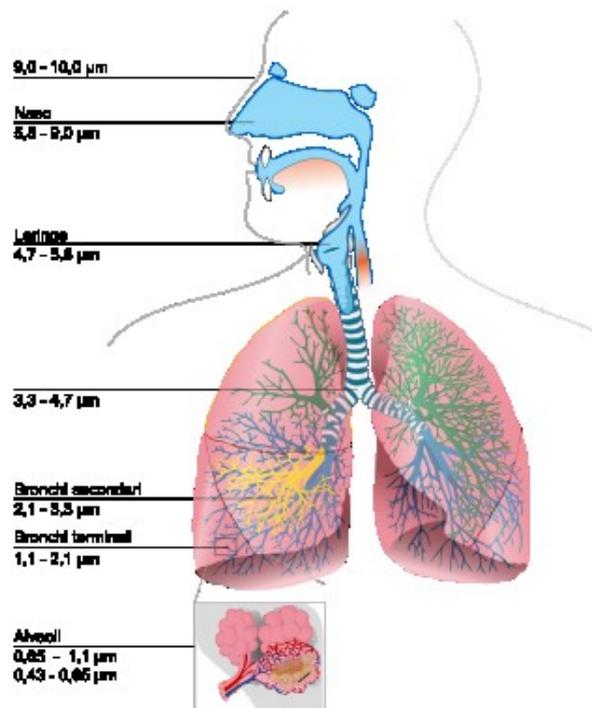


Fig 7: Penetrazione delle particelle nell'apparato respiratorio.

Le patologie polmonari indotte dalle NPs (bronchiti, asma, tracheiti, cancro ecc...) sono correlate allo stress ossidativo, che induce attivazione di numerosi fattori trascrizionali che vanno ad attivare la trascrizione di geni proinfiammatori, quali i geni che codificano per le interleuchine 6 ed 8 e per il fattore di necrosi tumorale (IL-8, IL-6 e TNF $\alpha$ ) (Nel et al., 2006).

## *ASSORBIMENTO CUTANEO*

Un'altra importante via attraverso cui le particelle atmosferiche possono penetrare nell'organismo umano è la pelle. Sebbene la presenza di abrasioni o lacerazioni cutanee rappresenti una via di ingresso per le particelle, Tinkle e collaboratori (2003) hanno dimostrato che anche la pelle integra, se impegnata in movimenti di flessione, può rappresentare una via di penetrazione per le particelle di dimensioni micrometriche e nanometriche, le quali possono depositarsi nell'epidermide. L'epidermide rappresenta una barriera protettiva per il derma sottostante particolarmente ricco di sangue, vasi linfatici e cellule dendritiche. Lo strato epidermico a differenza del derma, non essendo vascolarizzato, rappresenta "l'ambiente" in cui le NPs potrebbero potenzialmente alloggiarsi e non essere suscettibili di rimozione ad opera di processi di fagocitosi. La capacità delle NPs di attraversare la pelle è determinata dalla capacità di penetrare lo strato corneo, per poter esercitare la tossicità negli strati più profondi. La penetrazione e l'assorbimento di NPs dipende dalla struttura chimica delle stesse, solo le particelle liposolubili sono in grado di muoversi attraverso la componente lipidica intercellulare e raggiungere le cellule dello strato corneo, dei follicoli piliferi e dei dotti di escrezione sudorale (Holsapple et al, 2005).

Le NPs di dimensioni notevolmente ridotte possono però giungere al derma (Ryman-Rasmussen et al. 2007) Una volta penetrate nel derma le NPs possono raggiungere i vasi linfatici, trasportate dai macrofagi e dalle cellule dendritiche. Dal circolo linfatico si suppone poi che le NPs possano accedere al circolo sanguigno ed essere distribuite a tutto il corpo (Gwinn MR et al., 2006).

## *ASSORBIMENTO GASTRO-INTESTINALE*

Le NPs possono entrare nell'organismo in seguito all'ingestione di cibi o acque contaminati (Lomer et al. 2002). Si tratta principalmente di silicati e biossido di titanio. Una volta ingerite per via orale, possono essere assorbite attraverso le placche linfatiche di Peyer e da qui possono traslocare nei tessuti non linfatici dell'intestino. Tale traslocazione è strettamente correlata a due fattori intrinseci delle NPs: la dimensione fisica e la composizione; ciò vuol dire che le NPs di piccole dimensioni e quelle aventi caratteristiche di idrofobicità vengono assorbite più facilmente. Una volta assorbite esse

possono o venire attaccate dai normali processi digestivi (Chen Z et al. 2006) oppure possono migrare attraverso il circolo sanguigno in altri organi e tessuti, quali fegato, milza, sangue, rene e midollo osseo. Tale migrazione è influenzata dalle proprietà chimico-fisiche delle NPs come dimensione, forma, composizione e carica.

### *DISTRIBUZIONE DELLE NPs*

Una volta assorbite a livello respiratorio, cutaneo e gastro-intestinale, le NPs possono giungere nella circolazione sistemica e migrare successivamente in diversi organi e tessuti. E' stato dimostrato che le NPs nell'uomo entrano nel circolo sanguigno in un minuto (Nemmar et al, 2002). La traslocazione attraverso la circolazione sistemica induce la produzione di citochine e diversi fattori di crescita, tra i quali si può annoverare quello di derivazione piastrinica, da parte dei fibroblasti interstiziali. L'attivazione piastrinica, l'interazione con i globuli rossi e la produzione di citochine e chemochine può indurre disturbi della coagulazione (Oberdörster et al, 2005). Gli effetti cardiovascolari possono essere considerati come il corollario di una sequenza di eventi che origina da un'iniziale assorbimento delle NPs, procede con l'instaurarsi di una risposta sistemica acuta, alla quale si associano un'aumentata attività dei fattori della coagulazione tra i quali il fibrinogeno (Pekkanen et al, 2000) e termina con difetti di perfusione, episodi di ischemia e infarto del miocardio (Seaton et al, 1995). Studi epidemiologici riportano che un'esposizione prolungata a NPs atmosferiche può provocare addirittura morte per problemi cardiovascolari (Pope et al, 2004).

Dalla circolazione sistemica le NPs possono raggiungere altri organi e apparati; il fegato rappresenta il maggior sito di distribuzione, seguito dalla milza e da altri organi del sistema reticolo endoteliale (Akerman et al, 2002). Il danno epatico, indotto dalle nanoparticelle si caratterizza per la presenza di processi flogistici, necrosi e lesioni istologiche. Il danno epatocellulare origina dall'attivazione del citocromo P450, che comporta la perossidazione delle membrane lipidiche, l'inibizione della sintesi proteica, la disregolazione dell'omeostasi del calcio e l'attivazione di enzimi coinvolti in processi apoptotici (Oberdörster et al, 2005).

Dall'analisi della letteratura emerge anche una capacità neurotossica delle NPs. Sono presenti due ipotesi differenti circa la modalità con cui le NPs possono penetrare nel sistema nervoso centrale (SNC). La prima prevede una traslocazione delle nanoparticelle dalle vie aeree superiori agli assoni neurali, attraverso il nervo olfattivo (Oberdörster et

al, 2005). La traslocazione attraverso il nervo olfattivo è giustificata dalla notevole vicinanza tra la mucosa nasale olfattiva e il bulbo olfattivo, condizione che favorisce un rapido trasporto neuronale.

La seconda ipotesi descrive il passaggio delle NPs dalla circolazione sistemica all'SNC mediante la barriera emato-encefalica (BEE), grazie a meccanismi di diffusione passiva o di trasporto endocitotico carriers mediato (Lockman et al, 2002). Lo studio condotto da Calderon-Garciduenas e collaboratori (2002) su animali, circa gli effetti neurotossici delle NPs, ha dimostrato l'instaurarsi di processi flogistici e alterazioni neurodegenerative della mucosa e del bulbo olfattivo, dei neuroni corticali e subcorticali, apoptosi delle cellule gliali della sostanza bianca, insorgenza di placche non neuritiche e di ammassi neurofibrillari; tali alterazioni sembrano essere dovute alla capacità NPs di generare stress ossidativo. Inoltre vi sono due vie di traslocazione neuronali addizionali per le NPs: il nervo trigemino e i nervi sensoriali tracheobronchiali. Studi condotti in modelli animali dimostrano che NPs instillate per via intranasale e intratracheale possono raggiungere l'SNC attraverso questi due nervi e indurre disturbi cardiovascolari (Hunter and Dey, 1998; Hunter and Udem, 1999). Qualunque sia la via attraverso cui le NPs raggiungono il SNC, il processo di traslocazione neuronale dipende dalle loro caratteristiche. (Oberdörster et al, 2005).

In letteratura sono presenti anche studi riguardanti la genotossicità delle NPs atmosferiche. NPs di biossido di titanio sono in grado di indurre alterazioni mitotiche, mutazioni cromosomiche e danni a carico del Dna, connessi alla produzione di specie reattive dell'ossigeno, che possono indurre anche all'apoptosi, ossia alla morte cellulare programmata (Rahman et al, 2002).

## 2.3 EFFETTI DEL PARTICOLATO ATMOSFERICO SULL' AMBIENTE

Oltre ad incidere negativamente sulla salute umana, il particolato atmosferico rappresenta un vero e proprio pericolo anche per l'ambiente, divenendo così oggetto di studi ecotossicologici.

Con il termine ecotossicologia si intende *“una branca della tossicologia che studia gli effetti tossici, causati dal particolato, sui costituenti degli ecosistemi, animali (incluso l'uomo), vegetali e microrganismi, in un contesto globale”* (Truhaut, 1977). Il suo sviluppo è incrementato notevolmente in seguito al progresso industriale, che ha indotto ad analizzare i rischi ambientali ed ecologici associati all'inquinamento dell'aria. Secondo l'EPA ([www.epa.gov](http://www.epa.gov)) gli effetti ambientali del particolato atmosferico possono essere suddivisi in due gruppi: effetti sulla visibilità e sul clima/microclima ed effetti sugli ecosistemi, che rappresentano l'insieme di organismi biologici ed ambiente in cui vivono (Fig 8).

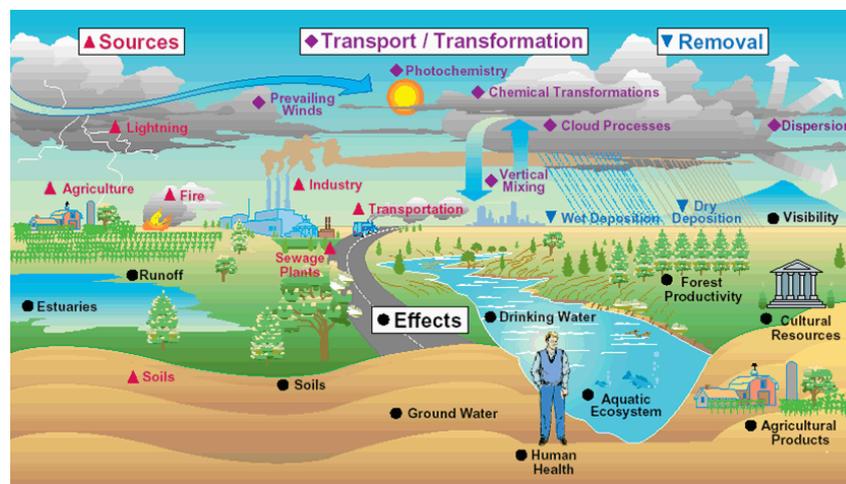


Fig 8: Rappresentazione schematica delle fonti e degli effetti ambientali del particolato atmosferico

## *EFFETTI SULLA VISIBILITA' E SUL CLIMA E MICROCLIMA*

La visibilità atmosferica è correlata all'assorbimento e alla riflessione della radiazione solare ad opera delle particelle atmosferiche. Tale assorbimento e/o riflessione dipendono dalla dimensione e composizione chimica delle particelle e dalla lunghezza d'onda della radiazione stessa. Maggiore è l'inquinamento atmosferico, maggiore è il numero di particelle in grado di riflettere la luce solare, ciò ha come conseguenza un decremento della visibilità, che si osserva maggiormente nelle aree abitative ed industriali (Huang et al, 2009; Chang, 2009). Tra gli inquinanti maggiormente responsabili di questa riduzione vi sono i solfati: essi provocano una dispersione della luce solare soprattutto in condizioni di umidità.

In tal modo, il particolato atmosferico influenza direttamente il bilancio energetico terrestre, a cui è correlato il clima. L'effetto climatico dipende dalla quantità di energia luminosa riflessa (backscattering) rispetto a quella assorbita. Le particelle atmosferiche riflettono la luce solare in maniera più efficiente rispetto agli oceani o alle terre emerse, portando ad un raffreddamento della superficie della Terra, in quanto fungono da nuclei di condensazione per le nuvole, aumentandone la probabilità di formazione. Dall'altra parte però alcuni tipi di NPs atmosferiche possono contribuire anche positivamente al riscaldamento della Terra, in quanto assorbono la radiazione infrarossa.

Il particolato ha effetti anche sul microclima urbano: infatti, nei centri urbani l'inquinamento dell'aria contribuisce all'effetto "isola di calore", inibendo la perdita di radiazioni ad onde lunghe durante la notte, facendo sì che le città siano più calde.

Inoltre l'inquinamento atmosferico è correlato anche ad un aumento delle precipitazioni nelle aree urbane: le particelle immesse nell'aria in seguito alle attività umane, fungendo da nuclei di condensazione, favoriscono la formazione di nubi e nebbie. In tal modo ricadendo sotto forma di pioggia, esse inquinano il suolo e le acque, provocando un disastro ambientale che si ripercuote sull'intera catena alimentare.

Variazioni delle condizioni climatiche giocano un ruolo importante, inoltre, nel determinare le concentrazioni di ozono. Si tratta di un gas presente negli strati più alti dell'atmosfera (troposfera) che si forma in seguito a reazioni che avvengono tra le particelle atmosferiche in presenza della luce solare e che ha il compito di assorbire e trattenere parte dell'energia solare (Kinney, 2008). La sua produzione aumenta nelle giornate calde, quando l'aria è stagnante, al contrario, è limitata nei giorni nuvolosi, freddi, con pioggia o vento (Jacob and Winner, 2009).

## *EFFETTI SUGLI ECOSISTEMI*

Le particelle presenti nell'aria possono essere trasportate per lunghe distanze dal vento e possono depositarsi sul suolo o nelle acque, mediante processi di sedimentazione oppure ricadendo sotto forma di pioggia. La sedimentazione è il processo secondo il quale ogni particella tende a cadere e depositarsi sotto l'azione della forza di gravità. Questo fenomeno riguarda le particelle più grandi, mentre quelle più piccole tendono a restare sospese sotto l'azione dei venti e delle correnti. Come già precedentemente esposto, le particelle atmosferiche contribuiscono alla formazione di nubi e quindi anche ad un aumento delle precipitazioni, in particolar modo all'acidificazione delle piogge, associata all'emissione di solfati e nitrati, che abbassano notevolmente il pH delle piogge. Le piogge acide hanno un impatto ambientale notevole. Tra gli effetti che possono provocare si annovera l'acidificazione di laghi e torrenti, la modifica dell'equilibrio dei nutrienti nelle acque costiere e nei bacini fluviali, la riduzione dei nutrienti nel suolo, danni alle foreste e alle coltivazioni agricole, e conseguenze sulla biodiversità degli ecosistemi (Lovett et al, 2009).

Gli effetti ecotossicologici delle piogge acide sono più chiaramente visibili negli ambienti acquatici, come ad esempio corsi d'acqua, laghi e paludi. La maggior parte dei laghi e corsi d'acqua ha un pH compreso tra 6 e 8. Le piogge acide acidificano i corsi d'acqua che hanno una bassa capacità tamponante, ossia bassa capacità di neutralizzare i composti acidi, e ne influenzano di conseguenza le specie acquatiche che vi vivono. Infatti, le piogge acide inducono il rilascio di alluminio dal letto dei corsi d'acqua, che è altamente tossico per le specie di organismi acquatici che li popolano (Driscoll et al. 2001; Lovett et al, 2009). Ciò può avere effetti più o meno gravi sui pesci come alterazione del peso corporeo, riduzione del numero e in alcuni casi estinzione delle specie ittiche, influenzando di conseguenza la biodiversità (Jenkins et al, 2007). Non tutti gli animali acquatici sono sensibili all'acidificazione delle acque: ad esempio la rana riesce a tollerare bene un pH acido rispetto alla trota. In generale i pesci più giovani sono più sensibili al pH acido, ma per alcune specie anche gli adulti lo sono. Oltre ad incidere negativamente sulle specie ittiche, il pH delle acque influenza anche le piante acquatiche, in tal modo specie di pesci, pur tollerando l'abbassamento di pH, possono essere fortemente danneggiati. L'abbassamento del pH riduce inoltre la concentrazione di carbonio organico disciolto (Monteith et al 2007), ciò permette alla luce di penetrare in profondità, incrementando la crescita di alghe sui fondali ed, in aggiunta l' aumento

della visibilità comporta un'alterazione dei rapporti preda-predatore (Yan et al. 2008). Il carbonio organico disciolto svolge una funzione importante: complessandosi con l'alluminio ne riduce la tossicità. L'acidificazione delle acque quindi riducendo la quantità di carbonio incrementa di conseguenza la tossicità dovuta al rilascio di alluminio.

Un'ulteriore problema riguardante i corpi idrici è quello dell'eutrofizzazione (Lovett et al, 2009). Il termine eutrofizzazione deriva dal greco eutrophia (eu = "buono", trophòs = "nutrimento"), che indica una condizione di ricchezza di sostanze nutritive nell'ambiente acquatico, dovuta ad un'abbondanza di inquinanti atmosferici come nitrati e solfati. L'eccessiva disponibilità di tali sostanze comporta la proliferazione incontrollata di alghe (sia tossiche che non). Il loro aumento numerico presso la superficie dello specchio d'acqua comporta a sua volta una diminuzione della disponibilità di ossigeno, rendendo l'ambiente acquatico inospitale per le specie vegetali ed animali. La fioritura di alghe in tal modo inficia la salute di pesci e crostacei e compromette le piante acquatiche (fanerogame) e le barriere coralline, inducendo così alterazioni dell'intera catena alimentare. Secondo la National Oceanic and Atmospheric Administration (NOAA) questo fenomeno riguarda gli ecosistemi costieri ed può avere ripercussioni sulla salute umana: pesci o frutti di mare contaminati possono rappresentare un vero e proprio rischio per l'uomo.

Altro effetto ecotossicologico delle piogge acide riguarda gli ecosistemi terrestri. Il rallentamento della crescita delle foreste (Asli and Neumann, 2009), la caduta delle foglie in periodi estivi ed in casi estremi la morte di singoli alberi, piante o addirittura di intere aree forestali sono attribuibili alle piogge acide. Queste però non sembrano essere l'unica causa, ad esse si associano altri fattori quali insetti, siccità e clima freddo. Le piogge acide possono contaminare il suolo direttamente oppure indirettamente, scorrendo nei corsi d'acqua. I danni del suolo dipendono dalla sua capacità tamponante: a parità di quantità di pioggia acida un suolo che ha maggior capacità tamponante sarà meno sensibile ai danni indotti da questa. Tale capacità è correlata allo spessore e alla composizione del suolo. Le piogge acide provocano indebolimento degli alberi, limitazione delle sostanze nutritive presenti nel terreno e rilascio dal terreno di sostanze tossiche. L'indebolimento degli alberi può essere provocato da danni alle foglie (le foglie avendo un rapporto superficie/volume elevato, assorbono grandi quantità di NPs presenti nell'aria attraverso gli stomi), che comportano in casi estremi anche l'inibizione della fotosintesi, o alle radici, mediante inibizione della formazione di peli radicali o

deformazione delle radici stesse (Yin et al, 2011). I danni a carico delle piante dipendono oltre che dalla concentrazione anche dalla composizione chimico-fisica delle NPs atmosferiche (Dietz and Herth, 2011). Le piogge acide lavano via le sostanze nutritive dal terreno, allontanandole dalle piante che quindi non avendone più a disposizione rallentano la loro crescita, oppure inducono il rilascio di alluminio dal terreno, che risulta essere tossico per le specie vegetali (Lovett et al, 2009). L'effetto negativo delle piogge acide sulla vegetazione a sua volta si ripercuote negativamente sulla catena alimentare e quindi anche sulla salute umana: vegetali contaminati (frutta e verdura) rappresentano un pericolo per la salute delle specie animali e dell'uomo. L'ingestione di alimenti vegetali ed animali, contaminati dalle NPs atmosferiche, può compromettere la salute umana. In tal modo appare necessaria una valutazione approfondita della trasferibilità delle NPs atmosferiche all'uomo attraverso la catena alimentare

## 2.4 MISURA DELL'ESPOSIZIONE

La considerevole quantità di dati riguardo gli effetti delle NPs atmosferiche sulla salute umana e sull'ambiente ha incrementato notevolmente negli ultimi anni gli studi sullo sviluppo di sistemi atti a misurarne l'esposizione. Per la valutazione dell'esposizione diversi sono i parametri da prendere in considerazione, quali la concentrazione, l'area di superficie e il chimismo superficiale delle NPs (Marconi, 2006).

Diversi strumenti sono utilizzati per la misurazione della concentrazione delle NPs, quali contatori a condensazione di particelle, analizzatori a mobilità differenziale, misuratori di particelle a scansione di mobilità, contatori ottici e impattatori a bassa pressione.

### *CONTATORI A CONDENSAZIONE DI PARTICELLE (Cpc)*

Si tratta di contatori che consentono l'analisi in tempo reale di NPs con dimensioni comprese tra 7 e 100 nm. L'aerosol nanoparticellare viene fatto passare attraverso una camera sovrasatura di vapore, contenente una sostanza, quale alcool butilico o isopropilico, a tensione di vapore nota, utilizzata come saturatore; successivamente il flusso viene sottoposto a raffreddamento, in seguito al quale si ottiene la condensazione del vapore sulle NPs. In tal modo sulla superficie delle NPs si formano goccioline di vapore (droplet), che fanno aumentare la dimensione della NPs stessa. A questo punto le NPs, aumentate di dimensioni, sono analizzate attraverso un sensore ottico che misura il coefficiente di diffusione della luce (*tight scattering*). Si ottiene la concentrazione di NPs espressa come NPs/cm<sup>3</sup>. Un limite di questa metodica è che, se la sovrasaturazione del vapore è molto elevata, la risposta dei Cpc non è sensibile alla composizione delle particelle misurate.

I Cpc sono suddivisi in Cpc a detenzione diretta e indiretta. Quelli a detenzione diretta determinano le concentrazioni delle NPs dal conteggio individuale dei droplet formati in seguito alla condensazione, mentre quelli a detenzione indiretta ne determinano la concentrazione attraverso misurazione della luce attenuata o della luce diffusa che attraversa la nube costituita dalla condensazione del vapore.

### *ANALIZZATORI A MOBILITÀ DIFFERENZIALE (Differential Mobility Analyser, Dma):*

Si tratta di strumenti che analizzano particelle cariche elettricamente con dimensioni comprese tra 5-800nm. Tali particelle sono suddivise in classi dimensionali uniformi, in relazione alla loro mobilità elettrica. Successivamente mediante l'impiego di un Cpc si procede alla misura della loro concentrazione numerica (Poluzzi et al, 2006; Bouwer et al, 2004)

### *MISURATORE DI PARTICELLE A SCANSIONE DI MOBILITÀ (Scanning Mobility Particle Sizers, Smps)*

Sono spettrometri costituiti da un Dma e un Cpc, che misurano la concentrazione di particelle con dimensioni comprese tra 3-800 nm. Le particelle fatte passare attraverso due elettrodi o una nube di ioni generati da una sorgente radioattiva; questo passaggio causa la migrazione delle particelle in funzione della loro carica e del loro diametro. Le particelle separate in questo modo vengono conteggiate mediante un Cpc. Questo strumento permette di valutare il numero di particelle in funzione della dimensione (Bartolucci and Cottica, 2006). La più recente versione dell'Smps è il Fast Mobility Particle Sizer (Fmps), che consente di ottenere la distribuzione dimensionale ancora più rapidamente (in pochi secondi, rispetto a qualche minuto dello SMPS) e, grazie ad una serie di elettrometri come sensori della carica delle particelle, evita l'uso della sorgente radioattiva.

### *CONTATORE OTTICO DI PARTICELLE*

In questo strumento l'aerosol particellare in esame viene fatto passare attraverso una camera trasparente con spessore ridotto; un laser attraversa la cella e, in funzione del tempo e della velocità di flusso del campione, eccita il sensore tante più volte, quanto più pulito risulterà il campione stesso. La quantità di luce intercettata sarà direttamente proporzionale al numero di particelle opache che si sono interposte con la sorgente di luce.

## IMPATTATORI A BASSA PRESSIONE DEL TIPO ELPI

Questi apparecchi consentono la misurazione della concentrazione di NPs con diametro compreso tra 6,8 nm e 10 µm, dopo averle caricate elettricamente. La loro carica in ogni stadio di impatto viene misurata da un elettrometro multicanale. L'analisi si basa sulla separazione inerziale e sulla carica delle NPs.

Oltre alla concentrazione, per la valutazione dell'esposizione è necessario anche misurare l'area di superficie delle NPs, ciò è da attribuire al fatto che diversi studi tossicologici sostengono che essa sia correlata con i potenziali effetti biologici (Maynard and Zimmer, 2002; Moshhammer and Neuberger, 2003). L'area superficiale può essere misurata attraverso l'uso dell'epifaniometro e dei caricatori a diffusione.

### *EPIFANIOMETRO*

È uno strumento in cui all'aerosol nanoparticellare viene addizionato il radioisotopo  $^{211}\text{Pb}$  in fase gassosa. Esso è in grado di misurare la radioattività generata da ioni aderenti alla superficie delle particelle, la quale risulta essere proporzionale all'area superficiale attiva delle stesse (Mc Murry, 2000).

### CARICATORE A DIFFUSIONE

Con questo dispositivo si misura la radioattività generata da ioni positivi unipolari aderenti alla superficie delle particelle, la quale risulta essere proporzionale all'area superficiale delle stesse.

Sia l'epifaniometro che il caricatore a diffusione presentano però uno svantaggio: sono soggetti a possibili errori se le particelle aerodisperse sono dotate di cariche. Tuttavia studi di laboratorio hanno mostrato una buona correlazione tra le misure di area superficiale derivate dall'uso di questi strumenti e quelle derivate dalla microscopia elettronica a trasmissione (TEM) per particelle con dimensioni inferiori a 100nm (Ku and Maynard, 2005).

**CAPITOLO 3**  
**NANOPARTICELLE INGEGNERIZZATE E LORO**  
**APPLICAZIONI**

### 3.1 PRODUZIONE E CLASSIFICAZIONE DELLE NANOPARTICELLE INGEGNERIZZATE

La produzione volontaria di NPs destinate alla nanotecnologia (NPs ingegnerizzate) viene realizzata attraverso due processi chimico-fisici differenti: l'approccio "discendente" detto anche "*top down*" e quello "ascendente" denominato anche "*bottom up*". Il primo approccio consiste nel ridurre con metodi fisici le dimensioni delle strutture verso livelli nano. Il secondo approccio invece utilizza piccoli componenti, normalmente molecole o aggregati di queste, come "building blocks" per realizzare nanostrutture, sia di tipo inorganico che organico (Fig 9). Allo stato attuale le tecniche "*top down*" sono quelle generalmente più consolidate, mentre per ciò che riguarda le tecniche "*bottom up*" si è ancora in genere in una fase di sviluppo, nonostante esse possono offrire aspettative maggiori.



Fig 9: Approccio top down e bottom up per la produzione di NPs.

Entrambi i tipi di approcci consentono di produrre NPs differenti non solo per dimensione, compresa nel range di 100nm, ma anche per forma e composizione.

## FORMA

A seconda della forma le NPs si distinguono in tre categorie: nanopolveri, fullereni e nanotubi.

I fullereni sono delle gabbie sferiche formate da un arrangiamento ordinato di strutture esagonali e pentagonali di atomi di carbonio. La quantità di poligoni presenti e la loro relativa proporzione determinano le dimensioni e la forma del fullereni. I fullereni maggiormente utilizzati, costituiti da 60 atomi di carbonio, hanno ad esempio forma sferica (Singh and Nalwa, 2007) (Fig 10).

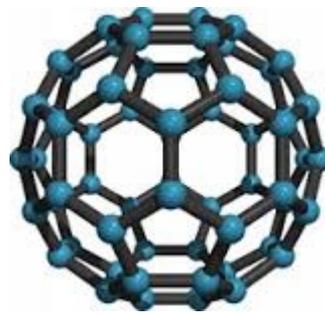


Fig. 10: Fullerene

I nanotubi possono avere parete singola o multipla. Quelli a parete singola possono essere descritti come un tubo costituito da uno strato di carbonio arrotolato su se stesso e racchiuso alle due estremità da due calotte emisferiche. Il loro diametro generalmente non supera i 10 nm. Quelli a parete multipla sono costituiti da più nanotubi a parete singola concentrici (Fig 11).

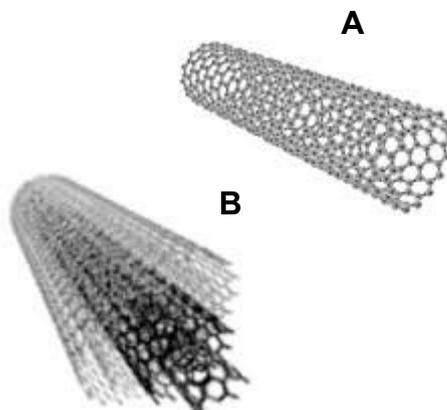


Fig. 11: Nanotubi a parete singola (A) e a parete multipla (B)

## COMPOSIZIONE

In base alla composizione è possibile distinguerle in 4 categorie: NPs di carbonio, NPs di metalli, dendrimeri e compositi.

Le NPs di carbonio sono composti principalmente da carbonio, di solito nella forma di sfere vuote o ellissoidi (fullereni) o tubi (nanotubi).

Le NPs composte da metalli includono quantum dots, nanogold, nanosilver e ossidi di metalli come il biossido di titanio. Un quantum dot è un cristallo semiconduttore altamente impaccato di centinaia o migliaia di atomi, e le cui dimensioni sono nell'ordine da alcuni nanometri a alcune centinaia di nanometri. Al variare delle dimensioni dei quantum dots, variano le loro proprietà ottiche, e sono utilizzati per la loro capacità di emettere fluorescenze diverse (Fig 12).

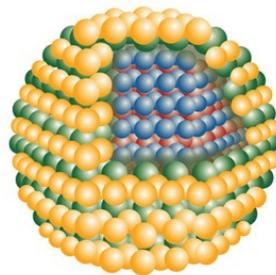


Fig. 12: Quantum dot

I dendrimeri sono polimeri costituiti da unità ramificate di forma globulare costruite in modo iterativo, che si possono variamente disegnare per conferire specifiche funzioni. Al loro interno i dendrimeri presentano cavità in cui possono essere incluse molecole (Fig. 13).

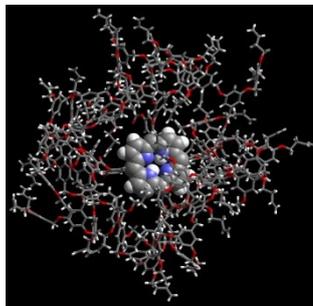


Fig. 13: Dendrimer

Infine, i compositi sono ottenuti combinando fra loro solidi di diversa natura e spesso costituiti da una matrice (metallica, polimerica o ceramica) che viene rinforzata con particelle di dimensioni nanometriche. Questa unione permette di ottenere sistemi ibridi con proprietà meccaniche, termiche e elettriche intermedie a quelle dei singoli costituenti e quindi materiali più resistenti, leggeri, poco sensibili alla corrosione, all'usura abrasiva.

### 3.2 APPLICAZIONI NANOTECNOLOGICHE DELLE NANOPARTICELLE

La crescente applicazione delle NPs nei settori tecnologici più disparati è da attribuire alle caratteristiche dimensionali di queste (Lines, 2008). Infatti le ridotte dimensioni fanno sì che esse abbiano caratteristiche magnetiche, ottiche, termiche, elettriche e quanto-meccaniche differenti da quelle degli stessi materiali di dimensioni maggiori, in tal modo queste possono essere utilizzate per fabbricare materiali e sistemi con proprietà del tutto nuove.

Secondo The Project on Emerging Nanotechnologies Consumer Products Inventory (2013) le NPs trovano impiego in diversi settori quali: salute e fitness, elettrodomestico, automobilistico, elettronico ed informatico, alimentare ecc. (Tabella 1). Ciò fa sì che le nanotecnologie siano i principali promotori dello sviluppo tecnologico del XXI secolo, in grado di influenzare tutti i settori produttivi e la stessa vita quotidiana.

<b>Aree di utilizzo</b>	<b>Applicazioni</b>
Salute e fitness	Cosmetici, abbigliamento, sport, cura della persona, creme solari...
Elettrodomestici	Batterie, frigoriferi, condizionatori, lavatrici...
Automobile	Pneumatici, catalizzatori, accessori e finiture, lucidatura per auto...
Elettronica e informatica	Processori, hard-disk, cuffie, display, pulitori antibatterici per pc...
Cibo e bevande	Attrezzi da cucina, contenitori per cibi, integratori per minerali e vitamine...
Prodotti per bambini	Peluche e biberon antibatterici, giocattoli...
Casa e giardino	Materiali da costruzione e rivestimento, prodotti per la casa, purificatori, pitture anti-graffio...
Varie	Rivestimenti e trattamenti superficiali

Tabella 1: settori ed impiego delle NPs ingegnerizzate.

I dati della Lux Research (2008) riportano che il mercato dei prodotti nanotecnologici è stato pari a 147 miliardi di dollari nel 2007 e 310 miliardi di dollari nel 2008, stima che sembra possa crescere fino a 3000 miliardi di dollari dopo il 2015.

Le NPs utilizzate nei vari settori differiscono per la forma e la composizione. Generalmente le nanopolveri vengono usate in quattro settori: elettronico ed informatico, salute e fitness, casa e giardino, cibo e bevande. Nanopolveri di silice e di alluminio trovano impiego negli abrasivi per la lucidatura e la pulizia dei dischi rigidi dei PC, mentre nanopolveri di ossido di zinco o di biossido di titanio sono utilizzate nelle creme protettive solari con lo scopo di migliorare l'azione schermante ai raggi UV. Le nanopolveri a base di ossido di ferro o di biossido di titanio conferiscono alle vernici ed alle tinture nelle quali vengono disperse miglior resistenza al graffio, maggiore facilità di pulizia e maggiore resistenza ai solventi organici. Proprio per l'azione schermante ai raggi UV, le nanopolveri di biossido di titanio sono utilizzate anche nell'industria alimentare per contenitori ed imballaggi alimentari, e, grazie alla loro brillantezza, sono usate come chiarificanti in bevande (Istituto di Ricerche Farmacologiche Mario Negri, 2008).

L'impiego dei nanotubi e dei fullereni è invece molto più esteso, nonostante molte delle loro caratteristiche siano in parte ignote. Attualmente sono impiegati nell'industria cosmetica (creme protettive solari), elettronica (transistor), metallurgica (leghe e metalli leggeri e resistenti), automobilistica (additivi di vernici antigraffio e nelle mescole dei pneumatici) e negli attrezzi sportivi (nelle scioline per sci, nelle mazze da golf e nelle racchette e palle da tennis). (Istituto di Ricerche Farmacologiche Mario Negri, 2008).

Per quanto riguarda la composizione, la maggior parte delle NPs utilizzate nei settori nanotecnologici sono nanoparticelle di argento, seguite poi da NPs di titanio (incluso anche quelle di biossido di titanio), carbone, silicio, zinco (incluso anche l'ossido di zinco) ed infine oro (The Project on Emerging Nanotechnologies Consumer Products Inventory, 2013) (Fig 14).

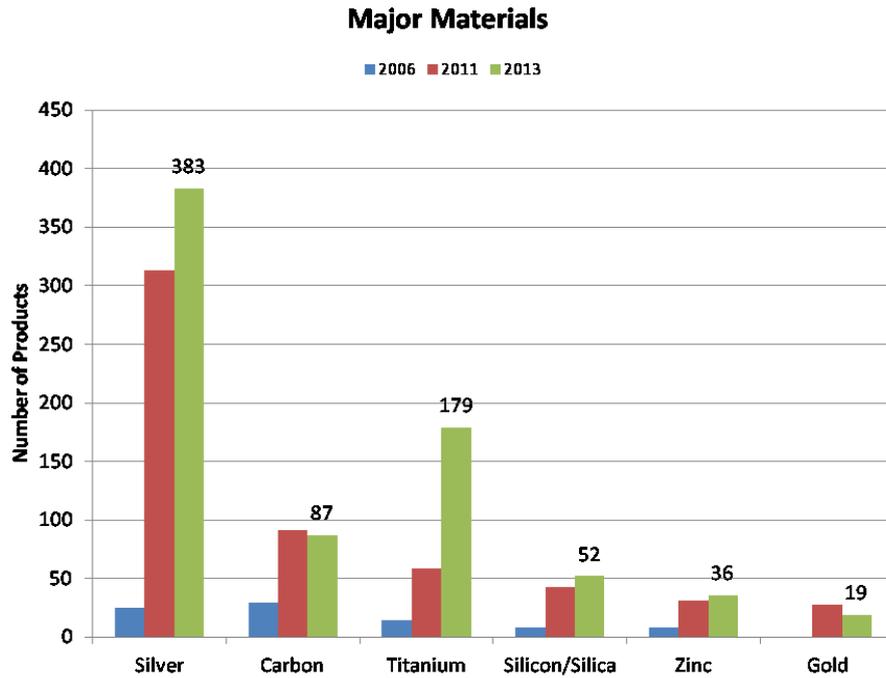


Fig 14: Composizione delle NPs impiegate nei settori nanotecnologici.

Attualmente il settore nanotecnologico più sviluppato è quello della salute e del fitness che annovera ben 788 nanoprodotti (The Project on Emerging Nanotechnologies Consumer Products Inventory, 2013) (Fig. 15).

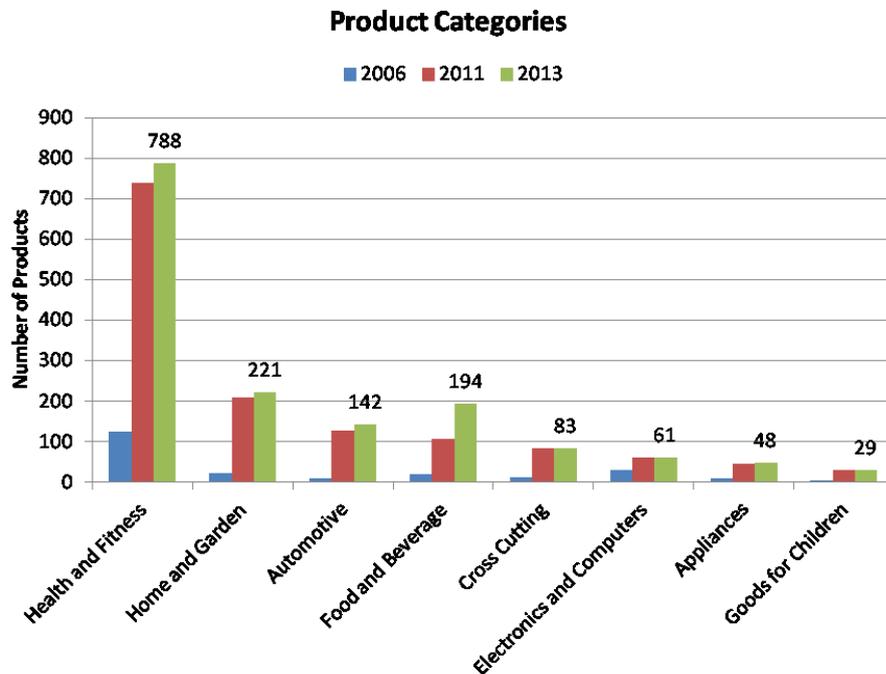


Fig. 15: Numero di prodotti nei diversi settori nanotecnologici negli anni 2006, 2011 e 2013.

In questo settore le NPs vengono impiegate per la produzione di prodotti per la cura personale, vestiti, cosmetici e creme solari (The Project on Emerging Nanotechnologies Consumer Products Inventory, 2013) (Fig. 16).

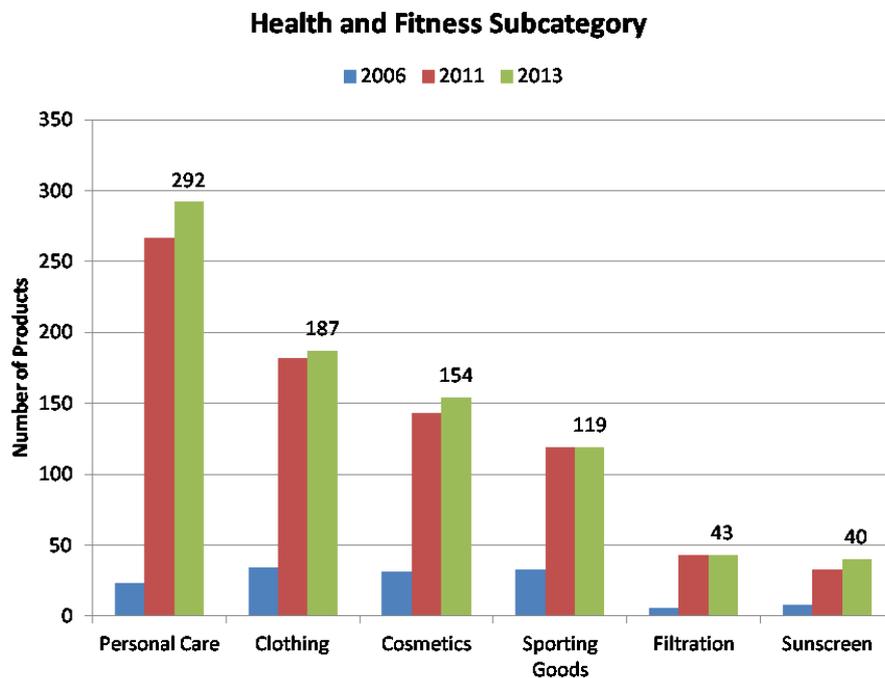


Fig 16: numero di nanoproducti nelle diverse sottocategorie del settore salute e fitness.

Nella sottocategoria dei prodotti per la cura personale, stimati nel 2013 a circa 292, rientrano i prodotti per la cura della salute (The Project on Emerging Nanotechnologies Consumer Products Inventory, 2013). Tra questi si possono annoverare NPs per il trasporto selettivo di farmaci e di oligonucleotidi (drug delivery e gene therapy), NPs per la costruzione di scaffold ossia di supporti tridimensionali utili per la rigenerazione di tessuti danneggiati (ingegneria tissutale) ed infine NPs per la diagnostica, dove sono utilizzate come mezzi di contrasto per migliorare le tecniche di imaging, quali la risonanza magnetica nucleare. Ciò ha permesso lo sviluppo della nanomedicina ossia di una medicina letteralmente rivoluzionata basata sull'utilizzo di strumenti diagnostici più efficaci e sistemi di cura innovativi, che possono incrementare lo sviluppo di terapie personalizzate. In tal modo le applicazioni delle NPs in nanomedicina hanno un impatto notevole non solo dal punto di vista economico ma anche e soprattutto dal punto di vista sociale.

### 3.2.1 APPLICAZIONI BIOMEDICHE DELLE NANOPARTICELLE

#### 3.2.1.1 NANOBIOTECNOLOGIA E CARATTERISTICHE DELLE NANOPARTICELLE UTILIZZATE IN CAMPO BIOMEDICO

Negli ultimi anni la comunità scientifica internazionale sta focalizzando la propria attenzione sulla nanobiotecnologia. Si tratta di una nuova disciplina che nasce dal connubio della biotecnologia e della nanotecnologia, con lo scopo di creare materiali di scala nanometrica che possano interagire con le strutture biologiche umane. Tali nanomateriali trovano impiego nella nanomedicina, in particolar modo nel drug delivery e nella gene therapy rispettivamente come vettori per la veicolazione di farmaci o di materiale genetico, nell'ingegneria tissutale come supporti per la rigenerazione di tessuti e nella diagnostica come agenti di contrasto per tecniche di bioimaging.

L'impiego delle NPs nelle scienze biomediche è da attribuire alle loro ridotte dimensioni che fanno sì che possano essere confrontate con le entità biologiche. Basti pensare che le NPs hanno dimensioni comprese nel range di 100nm mentre un virus ha dimensioni tra i 10 e i 150nm, una proteina tra i 5 e i 50nm, ed un gene arriva ad avere una lunghezza tra i 10 e i 100nm ed uno spessore di circa 2nm (Fig 17).

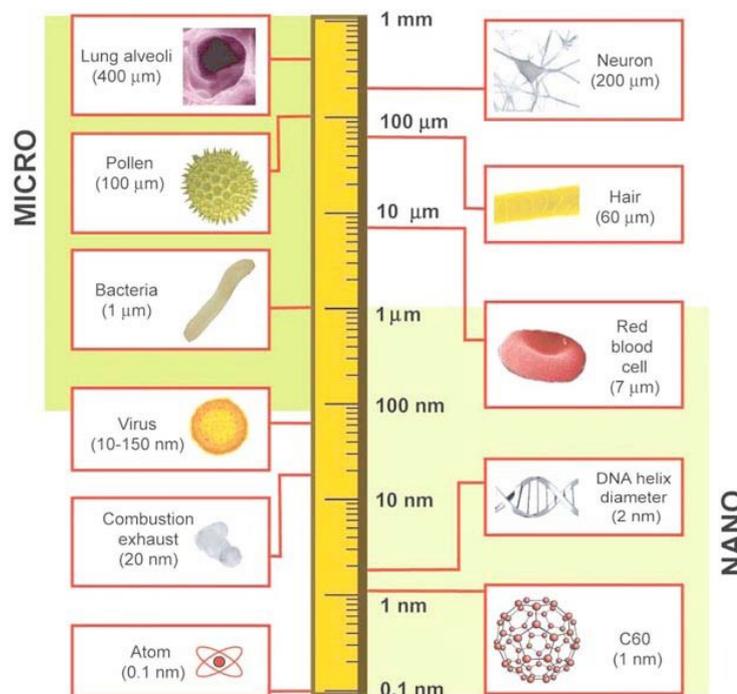


Fig. 17: dimensioni delle nanoparticelle a confronto con le dimensioni delle componenti biologiche.

La loro taglia nanometrica le consente dunque di 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). Naturalmente l'interazione e l'ingresso dell' NPs nelle cellule e nei compartimenti sub-cellulari dipende dalle loro proprietà specifiche, come la taglia, la forma, la carica, proprietà che è necessario controllare e modificare opportunamente per un loro impiego nelle applicazioni terapeutiche (Petros and De Simone, 2010).

Le NPs utilizzate nelle applicazioni biomediche 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 nanomateriali polimerici sono suddivisi in due categorie : naturali e sintetici, ognuna delle quali presenta specifici vantaggi e svantaggi (Tabella 2).

<b>NATURALI</b>	<b>SINTETICI</b>
Collagene	acido poliglicolico (PGA)
Fibrina	acido polilattico (PLA)
Acido ialuronico	acido polilattico co- glicolico (PLGA)
Chitosano	polietilenglicole (PEG)
Gelatina	polistirene (PS)
Alginato di sodio	poliestere
Albumina	poliammine

Tabella 2: tipologie di materiali naturali e sintetici delle NPs usate in campo biomedico

Le nanoparticelle naturali sono generalmente di natura proteica (il collagene, la fibrina, ecc..) o polisaccaridica (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. D'altro canto, però, questi materiali presentano alcuni inconvenienti, come la composizione variabile, la scarsa prestazione meccanica, il limitato tempo di permanenza, inteso come elevata velocità di degradazione e/o di assorbimento, e, soprattutto nel caso di materiali di derivazione animale, problemi relativi all'immunogenicità.

I materiali sintetici (ad es. il polistirene, il polietilenglicole, poliestere, ecc.), la cui produzione e lavorazione è cresciuta in seguito allo sviluppo di nuove tecnologie di sintesi e di trasformazione, invece, hanno una struttura chimica simile ai polimeri naturali, presentano bassi costi di produzione, ottima riproducibilità ed alte prestazioni meccaniche. Il maggiore svantaggio di questi materiali è che non vengono riconosciuti dalle cellule in maniera specifica. Questo problema può essere superato modificando i polimeri sintetici in modo da garantirne l'interazione con le cellule. 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.

Diversi sono i requisiti che una NP deve possedere per essere utilizzata in campo biomedico. Tra questi si possono annoverare:

- la biofunzionalità
- la biocompatibilità
- la biodegradabilità
- la bioattivazione
- il targeting cellula-specifico

La biofunzionalità è la proprietà che un nanomateriale deve possedere per riprodurre una determinata funzione biologica nel corpo umano. Ad esempio nell'ingegneria tissutale questa si riferisce alla capacità che il nanomateriale ha di svolgere la funzione del tessuto sostituito per un periodo prolungato di tempo.

La biocompatibilità, invece, è correlata all'atossicità, cioè alla capacità delle NPs di essere ben tollerate nel corpo, continuando a svolgere la loro funzione per l'intera durata dell'applicazione. Normalmente il corpo umano attiva numerosi e complessi meccanismi biologici che hanno la funzione di difenderlo nei confronti dei materiali estranei, con cui viene in contatto, ritenuti dannosi. Tali meccanismi di difesa, sebbene indispensabili per la sopravvivenza di un individuo, costituiscono il principale ostacolo all'applicazione biomedica delle NPs. Proprio per questo motivo i primi nanomateriali impiegati in biomedicina erano inerti (nanomateriali di prima generazione). Tuttavia nessun materiale inerte, che sia tollerato passivamente dall'organismo e non stimoli una

incorporazione ed un riconoscimento, può assicurare la stabilità delle sue prestazioni per lunghi periodi di tempo. Pertanto ai nanomateriali di prima generazione bioinerti, si sono sostituiti i materiali di seconda generazione, ossia biodegradabili. La biodegradabilità si riferisce alla capacità delle NPs di essere facilmente metabolizzate dall'organismo. Tra i materiali biodegradabili si possono annoverare i poliesteri a base di acido lattico (PLA) e i loro copolimeri con acido glicolico (PLGA), destrano e chitosano (Tabella 3).

<b>MATERIALI BIOCOMPATIBILI</b>
Acido polilattico (PLA)
Acido poliglicolico (PGA)
Acido polilattico-co-glicolico (PLGA)
Polietilenglicole (PEG)

Tabella 3: materiali biodegradabili delle NPs biomediche

I polimeri 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 (Lammers et al., 2010; Grund, 2011).

Ai nanomateriali di seconda generazione sono poi succeduti quelli di terza generazione ossia quelli dotati di bioattività, cioè materiali in grado di massimizzare l'interazione con le cellule e quindi di interagire "attivamente" con queste; interazione che se da un lato assicura la stabilità del materiale, dall'altro lato è in grado di indurre risposte cellulari e tissutali che a loro volta possono causare un processo di degradazione del biomateriale stesso. Nell'ingegneria tissutale la bioattivazione ha il compito di favorire l'adesione o la migrazione cellulare mentre nel drug delivery o nella gene therapy di favorire o inibire l'internalizzazione in specifiche cellule. La bioattività può essere indotta da:

- trattamenti superficiali del nanomateriale che possono essere distinti in due categorie: modifiche che alterano chimicamente o fisicamente gli atomi o le molecole presenti sulla superficie e rivestimenti della superficie con materiali di diversa composizione.

- introduzione nel nanomateriale di molecole biologicamente attive, al fine di indurre nelle cellule bersaglio uno specifico programma. Tra queste molecole vi sono fattori ed inibitori di crescita, fattori angiogenici e/o agenti immunosoppressori.

Nell'ingegneria tissutale un metodo impiegato per la bioattivazione dei polimeri usati come scaffold è l'adsorbimento proteico (Keselowsky, 2004). Le cellule messe a contatto con la superficie di un biomateriale devono per prima cosa aderire, la qualità di questa adesione, da cui dipenderà la successiva capacità cellulare di proliferare, migrare e differenziare, dipende dalle proteine adesive adsorbite al materiale, generalmente si tratta di proteine della matrice extracellulare (ECM). Il processo di adsorbimento proteico è fortemente influenzato dalle proprietà fisico-chimiche del nanomateriale, dalla natura e dal folding proteico, che influenza l'esposizione o meno di siti di contatto con la superficie del nanomateriale, e dalla soluzione in cui la proteina è disciolta. Questi fattori determinano il modo in cui le proteine sono adsorbite al materiale e, in particolare, determinano l'orientamento di queste e, di conseguenza, anche il comportamento cellulare. I nanomateriali vengono bioattivati usando brevi sequenze peptidiche legate in modo covalente al materiale. L'utilizzo di queste brevi sequenze è da attribuire al fatto che i recettori cellulari riconoscono un dominio molto ristretto della proteina adsorbita. 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 18).

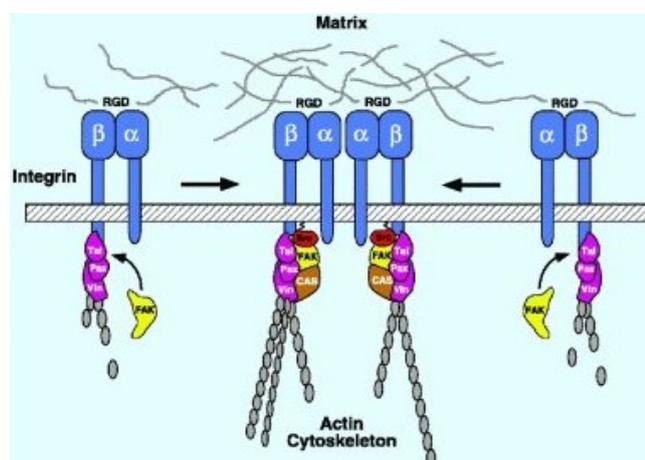


Fig 18: Interazione tra integrine ed il sito di legame RGD.

Diversi sono i limiti dei nanomateriali pretrattati con proteine:

- 1) le proteine adsorbite vanno incontro a denaturazione e il grado di denaturazione e quindi di attività proteica è difficilmente prevedibile, in quanto dipende da numerose variabili,
- 2) le proteine possono modificare la propria attività sia interagendo con altre proteine contenute nel mezzo di coltura sia in seguito ad attività enzimatica e biosintetica operata dalle cellule con cui entrano in contatto.
- 3) l'adsorbimento proteico può essere reversibile: la proteina, una volta adesa, può staccarsi dal substrato o essere spiazzata da altre proteine presenti in soluzione o ancora andare incontro a cambiamenti conformazionali.
- 4) la configurazione spaziale e l'orientamento assunto dalle proteine adsorbite può mascherare siti interessati nel legame con i recettori cellulari, provocando una riduzione dei siti di legame disponibili ai recettori stessi.

Un altro requisito importante per l'impiego in nanomedicina delle NPs è il targeting cellula-specifico, ciò consente alle NPs di agire solo sulle cellule bersaglio, e non a livello sistemico, evitando possibili effetti collaterali. Ad esempio nel drug delivery, nanoparticelle usate come vettori per la veicolazione di farmaci antitumorali, possono essere indirizzate solo alle cellule malate legando sulla loro superficie molecole guida come anticorpi.

### 3.2.1.2 DRUG DELIVERY

Negli ultimi anni, l'interesse crescente della tecnologia nei confronti della farmacologia ha consentito lo sviluppo di nuove forme di somministrazione di farmaci, a basso e alto peso molecolare, detti sistemi a rilascio controllato (CRS). Si tratta di sistemi polimerici di diversa natura, le cui proprietà fisico-chimiche possono essere modificate al fine di ottenere un rilascio del farmaco nel tempo, mediante una cinetica desiderata. Le caratteristiche dei CRS sono: la capacità di evitare la degradazione del farmaco, di rilasciare il farmaco al sito di azione, minimizzando gli effetti collaterali (targeting cellula-specifico), di realizzare l'efficacia terapeutica mediante un'unica somministrazione per l'intera durata della terapia e di controllare le concentrazioni del farmaco nello spazio e nel tempo (Biondi et al., 2008).

Il riconoscimento del CRS può riguardare o un determinato tipo cellulare di uno specifico organo o un determinato antigene di superficie di una specifica cellula (Berry and Curtis, 2003).

Per quanto riguarda l'efficacia terapeutica, la concentrazione di un farmaco deve essere mantenuta all'interno di un certo "range", al di sopra del quale il farmaco è tossico e al di sotto del quale è privo di efficacia.

Nella terapia farmacologica tradizionale, che richiede somministrazioni multiple del farmaco ed alte dosi di questo, vi è una continua fluttuazione della concentrazione di rilascio del farmaco nel tempo, con picchi e depressioni in cui la concentrazione è superiore o inferiore al range. I CRS consentono di superare questo limite. Il più semplice modello di CRS è quello del rilascio costante del farmaco detto anche rilascio ad ordine zero, che consente di bypassare le continue fluttuazioni dei livelli del farmaco nel tempo, mantenendone la concentrazione costante. Tuttavia non è facile mantenere costante la concentrazione del farmaco nel range terapeutico per un lungo periodo di tempo, motivo per cui sono stati messi a punto sistemi a rilascio controllato, quali il "drug delivery system" (Fig 19).

(A)

(B)

(C)

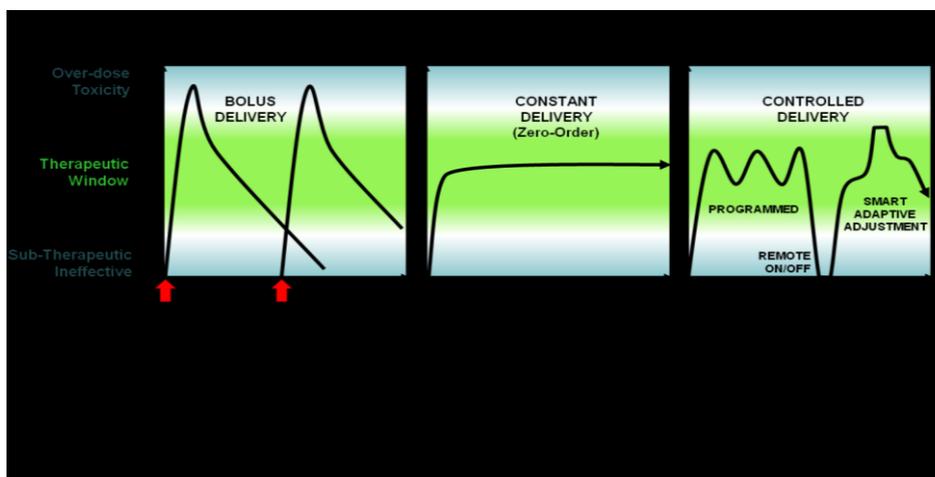


Fig.19: Profili dei livelli di farmaco nel tempo in una terapia farmacologica tradizionale (A); in una terapia a rilascio costante (rilascio ad ordine zero) (B); in una terapia a rilascio controllato (C).

Nel drug delivery il farmaco è incapsulato all'interno di un sistema nanoparticellare. Esso, a seconda della tecnica di produzione, può essere localizzato o nella cavità interna di questo sistema, si tratta in tal caso di nanocapsule ossia di sistemi polimerici usati per la veicolazione di farmaci molto tossici, oppure essere disperso nella matrice polimerica, si tratta in tal caso di nanosfere. Numerosi sono i vantaggi ottenuti dall'utilizzo di sistemi a base di NPs per la somministrazione dei farmaci che consentono di superare i limiti imposti dalla terapia farmacologica tradizionale. Infatti essi, grazie alle ridotte dimensioni, penetrano facilmente nei tessuti e nelle cellule, circoscrivono l'effetto biologico del farmaco su un determinato tipo cellulare, ed agiscono sulla cinetica di questo consentendone un rilascio prolungato nel tempo, migliorandone dunque l'efficacia e riducendone la tossicità. In tal modo le NPs rappresentano un metodo del tutto innovativo di somministrazione di farmaci ma anche uno strumento promettente per la veicolazione di farmaci non più in uso sia a causa della loro veloce degradazione sia a causa del mancato accesso ai loro bersagli intracellulari.

Le NPs impiegate nel drug delivery system devono possedere come requisiti fondamentali la biocompatibilità e la biodegradabilità. Tra i polimeri biodegradabili si possono annoverare l'acidopolilattico (PLA) e l'acido polilattico-co-glicolico (PLGA).

Quest'ultimo, oltre ad essere impiegato come vettore per la veicolazione di farmaci, è anche usato come vettore per la veicolazione di materiale genetico e come agente di contrasto. Nel caso del drug delivery, cambiando la composizione dei comonomeri e il peso molecolare del PLGA, è possibile controllare la velocità di rilascio di farmaci (Yoo et al., 2000). Rispetto al PLA, il PLGA è più idrofilico e modificazioni nella sua composizione, come una riduzione del rapporto acido lattico/glicolico, comportano un aumento progressivo della sua idrofilicità che, a sua volta, determina un maggior richiamo d'acqua con conseguente riduzione dei tempi di degradazione (Jalil and Nixon, 1990). Per questo motivo, sono attualmente disponibili in commercio polimeri di PLGA caratterizzati da tempi di degradazione in vivo che possono variare da 3 settimane fino a raggiungere un massimo di un anno. Uno degli inconvenienti da evitare nei sistemi di drug delivery, somministrati per via endovenosa, è la rimozione delle NPs mediante 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. La rimozione di NPs, da parte dei monociti-macrofagi, comincia con l'assorbimento di proteine sulla superficie particellare. Per evitare questo problema, è possibile rivestire le NPs con un polimero idrofilico, non ionico, il polietilenglicole (PEG), che consente di evitare così il riconoscimento da parte del sistema reticolo-endoteliale (Gref et al., 2000).

### 3.2.1.3 GENE THERAPY

La terapia genica consiste nell'utilizzo di vettori che siano in grado di veicolare materiale genetico in specifiche cellule al fine di correggere o supplementare geni deficienti responsabili dell'insorgere di determinate malattie. Un'efficace sistema di gene therapy deve possedere alcune caratteristiche fondamentali quali: la capacità di evitare l'interazione del DNA terapeutico con le cellule del sangue e con le cellule endoteliali vascolari, la capacità di proteggere il materiale genetico trasportato dalla degradazione ad opera delle nucleasi seriche, fino al raggiungimento delle cellule bersaglio (Quong and Neufeld, 1998), deve essere piccolo abbastanza da consentire la sua internalizzazione in queste cellule ma, allo stesso tempo, deve evitare il processamento da parte del sistema endosoma-lisosoma ed entrare direttamente nel nucleo.

Due sono le classi di vettori utilizzati nella gene therapy: i vettori virali e quelli non virali.

Tra i vettori virali si annoverano i retrovirus, herpes simplex virus, lentivirus, adenovirus e virus adeno-associati (Oligino et al., 2000). L'utilizzo di questi vettori però presenta vantaggi e svantaggi. Tra i vantaggi ci sono l'alto tasso di trasfezione e la rapida trascrizione del materiale esogeno inserito nel genoma virale, mentre tra gli svantaggi vi sono due problemi, uno correlato alle ridotte dimensioni di questi vettori, per cui solo piccole sequenze di DNA esogeno possono essere inserite nel genoma virale, un'altro correlato alla sicurezza, come la possibilità di ricombinazione virale endogena, di effetti oncogenici e di risposte immunitarie (Lee et al., 1998). Infatti, studi condotti da Zhang (2001) e Higginbotham (2002) hanno riportato che gli adenovirus inducono il rilascio e/o la produzione di diverse citochine pro-infiammatorie, interagendo con le cellule del sistema reticoloendoteliale. Proprio per evitare i problemi relativi alla sicurezza dei vettori virali, sono stati sviluppati sistemi di trasporto di materiale genetico alternativi, quali i vettori non virali, che presentano vantaggi in termini di facilità d'uso e di produzione in larga scala.

Il sistema non virale più semplice per veicolare materiale genetico è quello che si basa sull'iniezione diretta di DNA nudo all'interno di uno specifico tessuto. Due sono i principali problemi correlati all'iniezione di DNA nudo: la più facile degradazione ad opera delle nucleasi seriche, alla quali è esposto, è un più basso livello di espressione genica rispetto ai vettori virali.

Tra i vettori non virali più noti usati in terapia genica vi sono i fosfolipidi e i polimeri, che grazie alla loro carica positiva, sono in grado di interagire elettrostaticamente con la carica negativa del materiale genetico trasportato, formando dei complessi. Sostanzialmente questi vettori devono essere in grado di diffondere nel corpo, sfuggire all'attacco dei macrofagi ed internalizzare nelle cellule (Kuo and Saltzman, 1996), per poi raggiungere il nucleo dove il DNA esogeno può essere trascritto (Zabner et al., 1995).

I liposomi formati da fosfolipidi cationici presentano i seguenti vantaggi: bassa immunogenicità, facilità di preparazione (Deshpande et al., 1998), e trasporto diretto di DNA esogeno all'interno della cellula, mediante interazione con le membrane cellulari aventi carica negativa (Zelphati et al., 2001). Gli svantaggi associati al loro utilizzo riguardano la citotossicità in vitro (Brown et al., 2001) e la bassa efficienza di trasfezione rispetto ai vettori virali (Audouy et al., 2002), a causa della loro eliminazione da parte delle proteine del siero.

I polimeri si comportano in maniera abbastanza simile ai liposomi con qualche caratteristica differente. Rispetto ai vettori virali, i polimeri mostrano bassa immunogenicità e facilità di preparazione come i liposomi (Deshpande, 1998), ma rispetto a quest'ultimi sono più stabili e capaci di condensare maggiormente il DNA (De Smedt et al., 2000). Inoltre come i liposomi, presentano problemi correlati alla citotossicità e alla bassa efficienza di trasfezione, rispetto ai vettori virali (Garnett, 1999), problemi che devono essere risolti prima del loro utilizzo come vettori per la veicolazione di materiale genetico.

Negli ultimi anni, il progresso della nanotecnologia ha permesso di sviluppare sistemi di trasporto mirato di materiale genetico basati sull'utilizzo di NPs, in grado di preservare il DNA esogeno dalla degradazione enzimatica fino al raggiungimento del tessuto bersaglio (Moghimi et al., 2001). Le ridotte dimensioni delle NPs fanno sì che esse possano penetrare in profondità nei tessuti attraverso i capillari, attraversare la fenestrazione presente nel rivestimento epiteliale, ed essere internalizzate efficientemente dalle cellule per poi giungere al nucleo. Per ottenere un targeting specifico le NPs possono essere coniugate a specifici ligandi in grado di indirizzarle a tessuti o organi bersaglio (Moghimi et al., 2001), mentre, per far sì che una volta internalizzate possano raggiungere il nucleo, è possibile legare alla loro superficie specifici segnali, come il segnale di localizzazione nucleare (NLS), che ne incrementa l'efficienza di trasfezione genica.

Studi condotti da Panyam and Labhasetwar (2012) hanno dimostrato che le ridotte dimensioni e una distribuzione di taglia uniforme delle NPs sono fondamentali per incrementare l'espressione genica. Inoltre l'utilizzo di NPs nella terapia genica consente di superare il limite della tossicità dei vettori, che spesso limita la dose di DNA che può essere rilasciata. Sebbene la quantità di DNA nelle nanoparticelle (1:50 w/w) è relativamente più bassa di quella in polimeri cationici (da 1:0.4 a 1:6) o sistemi lipidici (da 1:2 a 1:6), studi condotti in modelli animali in vivo hanno dimostrato la biocompatibilità a lungo termine delle NPs pertanto, la loro dose può essere incrementata al fine di rilasciare una quantità adeguata di DNA, evitando il problema della nanotossicità (Labhasetwar et al., 1999).

### 3.2.1.4 IPERTERMIA

Con il termine ipertermia si intende il riscaldamento di tessuti biologici a temperature superiori a quella fisiologica, mediante l'uso di onde elettromagnetiche, comprese nell'intervallo di frequenze che va dalle microonde alle onde corte, sino alle onde lunghe. Al giorno d'oggi viene utilizzata una frequenza di 13,56 MHz, che consente di innalzare la temperatura di tessuti più profondi da 41° a 45°C. Tale aumento della temperatura consente di contrastare la crescita e la proliferazione delle cellule maligne, quali le cellule tumorali, motivo per cui l'ipertermia viene utilizzata in campo oncologico per la cura dei tumori. In particolare, è stato dimostrato che la radioterapia e la chemioterapia, se usate in associazione con trattamenti di ipertermia, possono avere, a parità di dose, una maggiore efficacia terapeutica o conservare la stessa efficacia ma a dosi inferiori. Il calore prodotto dall'ipertermia potenzia gli effetti della radio e chemioterapia sul tumore, senza aumentarne gli effetti collaterali, consentendo dunque il controllo della crescita tumorale. Tale controllo è reso possibile proprio dalle caratteristiche di neovascolarizzazione del tumore. Infatti, i vasi tumorali, privi dell'impalcatura muscolare, non permettono, per mancanza di elasticità, una vasodilatazione fisiologica che consente un'adeguata dissipazione del calore introdotto. Di conseguenza il calore, generato in seguito ad ipertermia, rimane intrappolato nelle cellule tumorali, cosa che comporta sia l'attivazione di caspasi che, degradando il DNA, portano la cellula cancerosa all'apoptosi sia alla liberazione di citochine che, stimolando l'arrivo in situ dei leucociti, aumentano la risposta immunitaria contro le cellule tumorali (Berry and Curtis, 2003).

I vantaggi dell'associazione dell'ipertermia con la radioterapia non sono del tutto noti, ma tra questi si possono annoverare gli effetti citotossici provocati dal calore, come la scarsa nutrizione per via vascolare, la carenza di ossigeno ed l'aumentata acidità in corrispondenza della massa tumorale. Inoltre l'utilizzo dell'ipertermia in associazione alla radioterapia può essere vantaggioso per distruggere cellule tumorali radio resistenti, in quanto il calore può indurre un effetto radio sensibilizzante.

I vantaggi dell'associazione dell'ipertermia con la chemioterapia sono due: l'aumento di temperatura provocato dall'ipertermia incrementa la permeabilità della membrana cellulare, che consente una maggiore internalizzazione dei farmaci nella cellula ed inoltre induce la denaturazione delle proteine cellulari che non sono più in grado di

attaccare il farmaco, di conseguenza viene potenziata l'azione tossica del farmaco e si riduce il fenomeno della chemioresistenza cellulare.

Uno degli inconvenienti da non sottovalutare nel trattamento di ipertermia è la possibilità di provocare un aumento della temperatura non solo a livello delle cellule cancerose ma anche delle cellule sane adiacenti. Per ovviare a questo problema, sono state messe a punto terapie ipertermiche che prevedono l'uso di NPs. Queste, 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, quindi, è molto difficile (Shinkai, 2002).

Shinkai (2002) ha messo a punto un tipo di ipertermia denominata ipertermia magnetofluida. Si tratta di un'iniezione per via intravenosa di NPs magnetiche, che sottoposte ad un campo magnetico alternato di frequenza dell'ordine delle onde radio FM, si riscaldano dissipando calore, danneggiando così le cellule di carcinomi mammari di ratti. Dal momento che solo le NPs assorbono l'energia fornita dal campo magnetico, questa tecnica risulta essere vantaggiosa in quanto evita di danneggiare tessuti sani.

Al fine di circoscrivere l'aumento di temperatura indotto dall'ipertermia ai soli tessuti cancerosi, attualmente si sta cercando di legare alla superficie di NPs specifiche molecole, come siRNA, anticorpi o peptidi, che consentino alle NPs di legare solamente le cellule tumorali ed essere internalizzate solo da queste. Ad esempio, nanotubi di carbonio possono essere indirizzati specificamente a cellule cancerose mediante rivestimento con molecole di vitamina folato. I recettori di queste molecole sono sovraespressi solo nelle cellule tumorali, che quindi sono le uniche cellule in grado di internalizzare i nanotubi (Kam et al, 2005). Anche gli anticorpi possono essere usati per indirizzare NPs a cellule maligne. Ad esempio si possono legare alla superficie delle NPs anticorpi diretti contro i recettori EGFRvIII, tipici delle cellule cancerose (Wankhede et al., 2012)

Tra le patologie neoplastiche attualmente trattabili con l'ipertermia vi sono i tumori alla mammella, i melanomi, i sarcomi, le adenopatie superficiali, e tumori profondi quale quello alla prostata, al pancreas, al fegato, all'utero, alla vescica, al retto, i tumori genitali femminili, i tumori all'addome superiore e ai polmoni (Fig 20).

PATOLOGIE NEOPLASTICHE TRATTABILI CON IPERTERMIA	
TUMORI SUPERFICIALI	TUMORI PROFONDI
Melanomi	Polmone Pleura
Epiteliomi	Pancreas Pelvi
Sarcomi parti molli	Fegato Ossa profonde
Metastasi cutanee	Colon Reni
Tumori ossei superficiali	Stomaco Vescica
Tumori tessuti connettivali	Cervello Lingua-Faringe
Pacchetti linfonodali	Testa-Collo Laringe
Recidive superficiali	Prostata Massiccio facciale
	Mandibola Guance
	Arti Organi genitali maschili
	Organi genitali femminili

Fig 20: Tumori trattabili con ipertermia.

### **3.2.1.5 RISONANZA MAGNETICA**

Una tecnica di imaging diagnostico all'avanguardia è la risonanza magnetica nucleare (RMN). Si tratta di una moderna tecnica diagnostica, ampiamente usata in medicina, che fornisce immagini tridimensionali dettagliate del corpo umano, consentendo così la visualizzazione e di conseguenza la diagnosi di molte malattie ed alterazione degli organi interni, tra cui anche i tumori. Grazie alla capacità di indirizzare ad una diagnosi precoce, essa da un lato riduce il bisogno di ricorrere ad interventi di chirurgia diagnostica e dall'altro lato permette al medico di mettere in pratica un rapido trattamento della malattia.

La RMN consta di un grande magnete, in grado di circondare completamente il paziente, di onde radio e di un computer. L'utilizzo di onde radio è il grande vantaggio di questa metodica in quanto consente ad essa di non essere dannosa per il paziente, a differenza delle tecniche radiografiche che, invece, fanno uso di raggi X, estremamente nocivi per la salute umana.

Il corpo umano è costituito da moltissimi atomi, i cui protoni, in condizioni normali, ruotano in modo del tutto casuale. Il magnete della RMN crea un forte e stabile campo magnetico, che determina l'allineamento di tutti i protoni nello stesso verso, e la rotazione di tutti nello stesso senso. Quando un segnale di frequenza radio viene inviato all'interno del campo magnetico, generato dal magnete, si ha un disallineamento dei protoni, che termina quando il segnale cessa. Ciò fa sì che i protoni ritornino alla loro posizione allineata, rilasciando energia. L'energia rilasciata dai protoni, che sono stati disturbati, viene poi misurata da una spirale di ricezione e viene anche misurato il tempo che i protoni impiegano a ritornare nella loro posizione allineata. Queste misurazioni forniscono le informazioni riguardo al tipo di tessuto al quale appartengono i protoni, e le sue condizioni. Tali informazioni sono usate da un computer per costruire un'immagine anatomica su uno schermo TV.

Per implementare le immagini ottenute mediante RMN è possibile iniettare, per via endovenosa al paziente, 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 si distinguono in due categorie: paramagnetici e superparamagnetici. Entrambi sono caratterizzati da ioni metallici legati a chelanti, capaci di ridurre la tossicità intrinseca.

I mezzi di contrasto paramagnetici sono costituiti da ioni metallici come ferro, manganese e lantanidi, caratterizzati dalla presenza di elettroni spaiati nella configurazione elettronica più esterna (Pozzi Mucelli, 2004). Il mezzo di contrasto paramagnetico extracellulare più utilizzato in RMN è il gadolinio, generalmente impiegato per valutare l'integrità della barriera emato-encefalica o la vascolarizzazione di una lesione. I chelanti del gadolinio non specifici tendono ad accumularsi rapidamente nel fegato, permettendo così di ottenere immagini in breve tempo (Berry and Curtis, 2003).

I mezzi di contrasto superparamagnetici invece sono in genere rappresentati da particelle di ossido di ferro con dimensioni variabili dai 30 ai 300 nm. In base alle dimensioni tali particelle sono distinte in SPIO (superparamagnetic iron oxide) ed USPIO (ultrasmall superparamagnetic iron oxide). Le particelle SPIO hanno dimensioni superiori a 50nm, mentre quelle USPIO inferiori ai 50nm (Pozzi Mucelli, 2004). 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, ma anche da midollo osseo e milza (Van Beers et al., 1995). Esse hanno forma irregolare e sono in grado di assorbire molta luce, ciò determina una riduzione dell'intensità del segnale nei tessuti sani in quanto, a differenza di quelli patologici, sono caratterizzati da un sistema reticolo endoteliale. Questo è il motivo per cui i mezzi di contrasto superparamagnetici sono detti negativi, mentre quelli paramagnetici positivi (Pozzi Mucelli, 2004).

### 3.2.1.6 INGEGNERIA TISSUTALE

Negli ultimi anni è aumentato l'interesse della ricerca scientifica nei confronti della medicina rigenerativa, che è una medicina relativamente nuova e fortemente interdisciplinare focalizzata sulla riparazione, rigenerazione e sostituzione di cellule, tessuti o organi per ripristinare funzionalità fisiologiche compromesse a causa di malattie. Il trattamento di queste patologie legate al malfunzionamento o alla perdita di funzionalità di organi e tessuti prevede l'impiego di due principali strategie: l'introduzione di protesi artificiali e il trapianto di organi. La prima è una strategia tradizionale che presenta limiti intrinseci: le protesi usate come sistema artificiale in sostituzione di un organo o di un tessuto possono non comportare il recupero di tutte le funzioni dell'organo o del tessuto. Un approccio diverso è quello del trapianto che, nonostante consenta di recuperare tutte le funzionalità dell'organo o del tessuto da sostituire, presenta due grandi problemi: il primo è il rigetto, ossia una risposta immunitaria negativa dell'organismo ricevente nei confronti dell'organo trapiantato, ed il secondo è la scarsissima disponibilità di organi.

I progressi raggiunti sia nelle metodologie di coltura cellulare che nello sviluppo di nuovi biomateriali hanno consentito di superare le limitazioni imposte dalle protesi artificiali e dai trapianti ed hanno orientato l'interesse della medicina rigenerativa all'ingegneria tissutale. Essa è una disciplina nella quale convergono le conoscenze di ingegneria e quelle delle scienze della vita con lo scopo di creare sostituti biologici in grado di riparare o rigenerare tessuti biologici. L'ingegneria tissutale dunque rappresenta un nuovo tipo di biotecnologia che apre la strada a nuove possibilità di cura, migliorando la qualità di vita dei pazienti. Ad oggi, essa ha raggiunto, numerosi traguardi rigenerando e riparando tessuti relativamente semplici, quali tessuto epiteliale, cartilagineo, osseo, cardiaco (Ungaro et al, 2005; Orlova et al, 2011).

L'ingegneria tissutale prevede l'utilizzo di una matrice tridimensionale come scaffold su cui far crescere cellule, che possono essere sia cellule specifiche del tessuto da riparare e/o rigenerare sia cellule staminali, indotte poi a proliferare e a differenziarsi mediante specifici segnali. In tal modo si genera un tessuto in vitro che poi può essere impiantato in vivo (Fig 21).

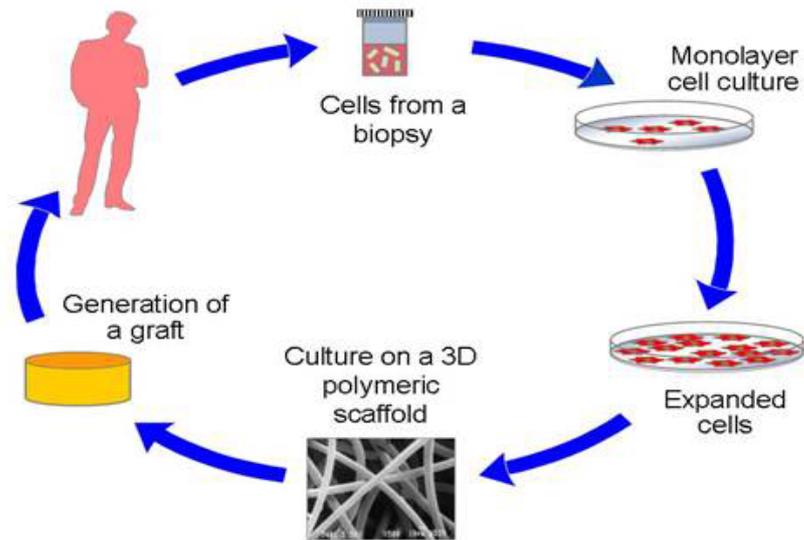


Fig 21: Coltura cellulare in vitro su scaffold polimerici tridimensionali e successivo impianto in vivo.

Lo scaffold utilizzato è rappresentato da sistemi nanostrutturati (metallici, ceramici ma generalmente a matrice polimerica sia naturale che artificiale), ed ha lo scopo di mimare la matrice extracellulare (ECM), sostenendo e promuovendo la crescita e l'organizzazione di cellule in tessuti funzionali.

La ECM costituisce il microambiente in cui sono immerse le cellule ed è composta da un'intricata rete di macromolecole, che non solo rappresenta l'impalcatura meccanica in grado di stabilizzare la struttura fisica dei tessuti ma gioca anche un ruolo chiave nella regolazione del comportamento cellulare, consentendone l'adesione, la crescita, la proliferazione, la migrazione e la funzione metabolica delle cellule.

Le due principali classi di macromolecole che compongono la matrice sono i proteoglicani e le proteine fibrose. I proteoglicani sono sistemi fibrillari che stabilizzano la matrice in ambiente acquoso costituendo una struttura intricata e interconnessa. Le proteine si dividono in due gruppi a seconda della loro funzione: proteine strutturali e funzionali. Le proteine strutturali sono il collagene, che costituisce l'intelaiatura della matrice che sostiene le cellule, conferendone stabilità meccanica, e l'elastina, che conferisce flessibilità e resilienza. Le proteine funzionali, come la fibronectina e la laminina, invece sono proteine che favoriscono l'adesione cellulare (Fig 22).

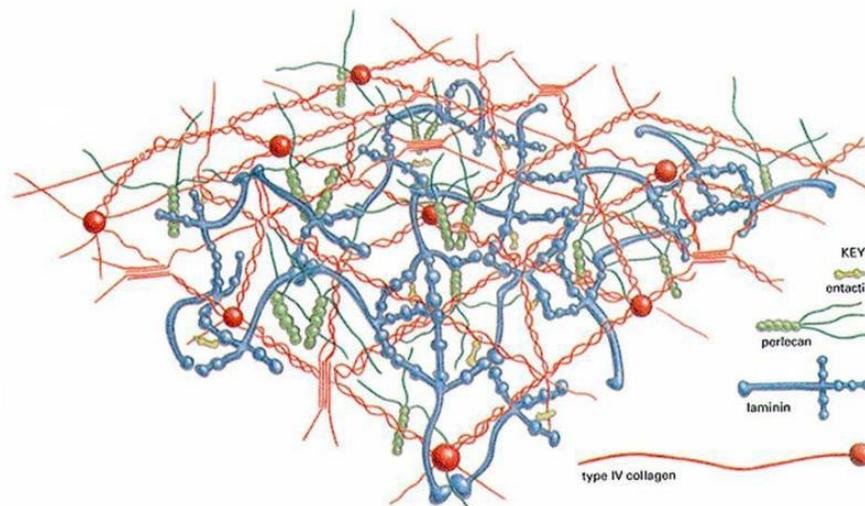


Fig 22: Struttura della matrice extracellulare

La struttura e le proprietà chimico-fisiche dei nanomateriali impiegati come scaffold nell'ingegneria tissutale sono fondamentali per cercare di mimare al meglio le caratteristiche della ECM. In tal modo un biomateriale per applicazioni di ingegneria tissutale deve possedere oltre alle classiche caratteristiche dei nanomateriali ingegnerizzati utilizzati in campo biomedico, quali biocompatibilità, biodegradabilità e bioattivazione, altri requisiti che gli permettono di interagire efficacemente con le cellule, regolandone il comportamento.

Fondamentali per lo sviluppo di materiali innovativi da usare nell'ingegneria tissutale sono, non solo le loro proprietà chimiche, quali la natura e la presenza di segnali biochimici, ma soprattutto le proprietà meccaniche dello scaffold. Le attività cellulari, come l'adesione, la proliferazione e la migrazione cellulare, dipendono da queste proprietà. I tessuti del corpo umano possiedono rigidità molto variabili: se quantificate in termini di modulo di Young, si può passare dai 18 kPa del tessuto osseo, ai 2.5 kPa del tessuto cerebrale. Malattie, come i tumori, alterano la rigidità dei tessuti, che risulta essere più elevata rispetto agli omologhi tessuti sani (Liu and Chen, 2005). Studi recenti hanno riportato che l'elevata rigidità provoca alterazioni nella migrazione cellulare: fibroblasti normali e immortalizzati presentano "spreading" differente quando esposti a combinati stimoli topografici e meccanici (Tzvetkova-Chevolleau et al., 2008). Inoltre, è noto anche che stimoli meccanici prodotti dal rimodellamento del citoscheletro delle cellule possono influenzare la morfogenesi dei tessuti durante lo sviluppo

embrionale (Ingber, 2006). Pertanto, ne consegue che non solo le proprietà meccaniche del substrato influenzano il comportamento cellulare ma anche che le stesse cellule, mediante modificazioni del citoscheletro, influenzano il substrato (Discher et al., 2005; Vogel and Sheetz, 2006).

Inizialmente lo studio delle correlazione tra le proprietà meccaniche del substrato e il comportamento cellulare è stato effettuato su polimeri naturali, le cui proprietà meccaniche, come ad esempio l'elasticità, potevano essere modulate cambiandone la concentrazione. Tuttavia ciò non ha fornito risultati del tutto soddisfacenti, in quanto non si capiva se il differente comportamento cellulare fosse dovuto alla variazione di elasticità o ai cambiamenti di natura chimica del substrato. Pertanto, la comprensione dell'interazione tra substrato-cellule è stata possibile grazie all'utilizzo di polimeri sintetici come il PEG e la poliacrilammide (PAAM), in grado 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). La rigidità meccanica dei substrati influenza notevolmente l'adesione cellulare: in particolare, substrati più rigidi consentono adesioni cellulari più stabili, rispetto a substrati meno rigidi (Georges and Janmey, 2004). Inoltre, la rigidità influisce anche sulla proliferazione e migrazione cellulare: substrati più rigidi provocano un incremento della proliferazione e un decremento della migrazione (Wang et al., 2000; Pelham et al., 1997). Anche il differenziamento cellulare è influenzato dalle proprietà meccaniche del substrato: cellule staminali mesenchimali coltivate su substrati di PAAM dotati di rigidità elevata, tipica del cervello, muscolo o osso, differenziano rispettivamente in neuroni, mioblasti e osteoblasti; mentre rimangono quiescenti se coltivate su substrati meno rigidi (Engler et al., 2006; Winer et al., 2009).

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

La struttura topografica del substrato è un altro parametro da prendere in considerazione per la costruzione di scaffold nell'ingegneria tissutale. È infatti noto che le attività e le funzioni cellulari sono influenzate da questa struttura e rispondono all'ondulazione dei nanomateriali, generalmente attraverso deformazione e distensione delle membrane. Ciò non è da considerarsi un artefatto in vitro, in quanto anche in vivo si riscontra questa influenza: il comportamento cellulare è infatti influenzato significativamente dalla topografia dei substrati naturali. Le membrane basali sono forse l'esempio di substrato di

origine naturale più diffuso in ambito biologico. Considerato che le membrane basali possiedono una complessa topografia tridimensionale derivante dalla presenza di pori, fibre, canali e altri elementi superficiali di dimensioni nanometriche, è ragionevole ipotizzare che anche la struttura della loro superficie contribuisca in qualche modo alla determinazione di comportamenti cellulari specifici. Similmente a quanto accade per substrati di origine naturale, anche substrati sintetici con composizione chimica nota e con caratteristiche superficiali controllate possono influenzare il comportamento cellulare. Numerose sono le tecniche di fabbricazione di substrati sintetici che consentono di ottenere una specifica topografia superficiale, contrassegnata dalla presenza di uno o più elementi topografici, distribuiti sulla superficie con una certa densità. In base alla distribuzione di tali elementi, essa può essere caratterizzata o meno da proprietà quali la simmetria e/o la regolarità. Gli elementi topografici riproducibili sulla superficie di un materiale possono avere diverse dimensioni e diverse forme, come scanalature, griglie, gradini, pozzi, nodi, protrusioni e fori. In esperimenti con linee cellulari, la tipologia di elementi topografici maggiormente impiegata è quella dei canali. Questi esperimenti hanno evidenziato che molti tipi cellulari tendono ad allinearsi all'asse principale dei canali stessi (Ohara and Buck, 1979) e che spesso anche l'organizzazione delle componenti citoscheletriche, come microtubuli e microfilamenti, e dei contatti focali risulta orientata nella stessa direzione (Oakley and Brunette, 1993). Il grado di allineamento cellulare nella direzione individuata dai canali dipende in modo complesso dalle caratteristiche proprie della struttura topografica e comporta una riorganizzazione citoscheletrica.

Oltre a riarrangiamenti citoscheletri, la presenza di canali può influenzare anche la migrazione cellulare (Wilkinson et al., 1982).

Altri elementi topografici di rilievo sono i pori. Nell'utilizzo di uno scaffold per ingegneria tissutale, particolare attenzione va posta nei riguardi della dimensione e della interconnettività dei pori del nanomateriale. Infatti, un nanomateriale altamente poroso ed interconnesso favorisce non solo la proliferazione e la migrazione cellulare ma anche uno scambio efficiente di nutrienti e metaboliti. Il successo della penetrazione cellulare all'interno dello scaffold è spesso però determinato anche dalle condizioni di coltura, che svolgono un ruolo cruciale nell'adesione e distribuzione cellulare sullo scaffold (Thevenot et al, 2008; Yasuda et al, 2004; Almaraz and Athanasiou, 2004).

Un'ulteriore caratteristica che un nanomateriale deve possedere per fungere da supporto per la rigenerazione tissutale e per cercare di simulare al meglio la ECM è la capacità di

rilasciare fattori che favoriscano le attività cellulari, come i fattori di crescita ed i fattori angiogenici. È noto infatti che la ECM funge anche da deposito di numerosi fattori proteici, che possono essere rilasciati in accordo ai bisogni cellulari (Dvir et al, 2011). Generalmente il rilascio si ottiene in vivo in risposta a stimoli locali, come cambiamenti di pH o in seguito ad attività enzimatica. Proprio per questo motivo, nei substrati ingegnerizzati si cerca di integrare sistemi in grado di rilasciare fattori con una cinetica controllata (CRS). Questi fattori possono essere incapsulati nello scaffold o legati mediante legami covalenti od elettrostatici ad esso (Gabriel et al, 2012) e successivamente rilasciati in seguito alla biodegradazione del nanomateriale. Per proteggere però i fattori dai solventi, che potrebbero alterarne la funzione o provocarne il distacco, questi vengono incapsulati in biglie di alginato (Qi et al, 2006), in nanoparticelle polimeriche (Chen et al, 2012) o in liposomi (Mickova et al, 2012), incapsulazione in grado di controllarne anche la cinetica di rilascio. In tal modo usare sistemi che consentano il rilascio di fattori angiogenici permette di superare uno dei maggiori limiti dei processi di rigenerazione tissutale ossia la necessità di favorire lo sviluppo di una rete di vasi sanguigni e quindi di favorire la vascolarizzazione (Freeman and Cohen, 2009).

**CAPITOLO 4**  
**NANOTECNOLOGIA E TOSSICITA'**

## 4.1 NANOTOSSICOLOGIA

L'avvento delle nanotecnologie è considerato la maggior innovazione ingegneristica dalla rivoluzione industriale (Gwinn MR et al., 2006). Esse infatti prevedono nel prossimo futuro di riformare ogni branca della tecnologia e di rendere disponibile un'infinità di nuovi prodotti commerciali in grado di rivoluzionare ogni aspetto della vita umana, motivo per cui le nanotecnologie hanno attratto interesse crescente e notevoli investimenti. Negli ultimi anni lo sviluppo esponenziale e le molteplici applicazioni hanno aumentato però i timori sui rischi associati al loro impiego. L'esigenza diffusa di avere informazioni chiare ed obiettive sui potenziali rischi connessi al loro utilizzo ha condotto così al rapido sviluppo di una nuova disciplina, che prende il nome di nanotossicologia, il cui obiettivo è la valutazione della sicurezza delle NPs (Donaldson et al, 2004).

La nanotossicologia pone le proprie basi storiche proprio sullo studio della tossicità delle NPs antropogeniche non intenzionali (Oberdörster et al, 2005), responsabili di molte patologie respiratorie e cardiovascolari connesse all'inquinamento atmosferico (Dennekamp et al, 2002; Marconi et al, 2006), ma oggi le competenze di questa disciplina si sono estese anche al campo dei nanomateriali ingegnerizzati e quindi alle NPs antropogeniche intenzionali (Oberdörster, 2009). La nanotossicologia in particolare si occupa della valutazione dei potenziali effetti tossici delle NPs ingegnerizzate per la salute umana e per l'ambiente (Donaldson et al, 2004; Lewinski et al, 2008). Per quanto riguarda la salute umana, essa si occupa della valutazione sia degli effetti connessi all'esposizione e alla manipolazione delle NPs, effetti che dunque riguardano i produttori ed i consumatori; sia degli effetti dovuti al loro impiego nel campo biomedico.

In particolar modo la nanotossicologia dal punto di vista della salute umana si pone i seguenti obiettivi (Manzo et al, 2012):

- Caratterizzare processi e fattori che determinano l'esposizione a NPs nei produttori
- Censire i processi produttivi e le realtà industriali che comportano esposizione professionale o ambientale a NPs ingegnerizzati
- Identificare l'esposizione del pubblico a nanomateriali presenti in prodotti di consumo

- Caratterizzare la tossicità dei nanomateriali nei prodotti di consumo che li contengono
- Esplorare i meccanismi cellulari e molecolari che determinano la tossicità ed i rapporti tra caratteristiche fisico-chimiche e tossicità
- Definire l'effettiva dimensione al di sotto della quale compaiono le nuove proprietà tipiche della nanoscala, qualora ciò sia possibile è necessario verificare se questo limite dimensionale valga per qualsiasi tipo di nanomateriale
- Migliorare la conoscenza sui processi che governano assorbimento e trasporto dei nanomateriali nell'organismo umano
- Sviluppare test validati per la valutazione tossicologica dei nanomateriali in vitro, in vivo e in silico
- Determinare le specificità negli effetti e nel meccanismo d'azione delle principali classi di nanomateriali

Invece, dal punto di vista ambientale la nanotossicologia si propone di (Manzo et al, 2012):

- Caratterizzare gli effetti dei nanomateriali sulle varie componenti dell'ecosistema
- Identificare le fonti di rilascio ambientale di NPs, i meccanismi di rilascio dai prodotti e gli scenari di esposizione
- Determinare fattori e meccanismi che governano il trasporto di nanomateriali nell'ambiente
- Identificare le eventuali trasformazioni che i nanomateriali subiscono nell'ambiente durante l'intero ciclo di vita (sviluppo, produzione, utilizzo, fino allo smaltimento finale).
- Identificare gli eventuali passaggi che i nanomateriali possono avere lungo la catena trofica degli organismi.
- Studiare le dinamiche dei nanomateriali lungo la filiera alimentare.

Sulla base di quanto appena esposto, la nanotossicologia per ottenere le informazioni sugli effetti avversi delle NPs, prevede l'elaborazione di adeguate linee di ricerca come programmi scientifici, studi sul campo ecc..., volti a ridurre le incertezze nel campo nanotecnologico. A tal proposito diversi paesi hanno commissionato a comitati ed agenzie l'elaborazione di strategie per la definizione del rischio per la salute e per l'ambiente. Tra questi si possono annoverare l'EPA (USA), la "Food and Drug Administration" (USA) e il "Scientific Committee on Emerging and Newly Identified

Health Risks” (SCENIHR- Europa) ( EPA 2007; FDA 2006, 2008; SCENIHR 2007, 2009).

In tal modo la nanotossicologia assume un ruolo centrale nelle scienze della prevenzione in quanto cerca di fornire certezze e di rendere meno aleatorio lo sviluppo di prodotti nanotecnologici per la collettività, che altrimenti nell’incertezza si fermerebbero allo stadio delle aspettative. Così la nanotossicologia assume un compito importante per mitigare la tossicità dei prodotti, ad esempio per lo sviluppo di materiali innovativi meno tossici dei prodotti convenzionali o di farmaci più vantaggiosi di quelli già in uso (Ellenbacker and Tsai, 2011).

Da quanto detto finora, emerge quindi un ruolo centrale della nanotossicologia come riferimento scientifico per la prevenzione dei rischi e per lo sviluppo responsabile di un settore tecnologico considerato vitale in ragione delle attese ricadute industriali e socio-economiche (Bernardini et al, 2011; Manzo, 2011).

## 4.2 CARATTERISTICHE CHIMICO-FISICHE E TOSSICITA' DELLE NANOPARTICELLE

Gli effetti tossici delle NPs ingegnerizzate riguardo la salute umana e l'ambiente sono correlati alle innovative caratteristiche chimico-fisiche di queste, attribuibili alle loro ridotte dimensioni (Maynard et al, 2011). E' infatti noto che le stesse caratteristiche chimico-fisiche che rendono le NPs estremamente vantaggiose per le applicazioni nanotecnologiche, possono essere causa di tossicità, comportando effetti biologi unici e del tutto nuovi (Nel et al 2006). Motivo per cui risulta inappropriata la valutazione del rischio dei materiali in forma di NPs basandosi sui dati di tossicità riguardanti i materiali in forma "bulk". L'orientamento prevalente è dunque quello di considerare il materiale in forma di NPs come un materiale nuovo, ciò richiede quindi anche l'utilizzo di metodi di valutazione del rischio nuovi rispetto a quelli tradizionali utilizzati per il risk assessment dei materiali di dimensioni maggiori.

Tra le proprietà chimico-fisiche di un nanomateriale, oltre alle dimensioni, si possono annoverare: area superficiale, reattività superficiale, stato di aggregazione/agglomerazione, composizione, carica superficiale, energia superficiale, solubilità, forma, porosità.

Le ridotte dimensioni delle NPs hanno speciale importanza sotto il profilo tossicologico: diminuendo le dimensioni aumenta l'area superficiale (Borm et al, 2006; Warheit, 2008) e quindi la quota di atomi o molecole esposti sulla superficie (Nel et al, 2006, Yang et al, 2008; Manzo et al, 2012). Ciò può influenzare tanto la carica quanto la composizione superficiale e l'attività catalitica della superficie stessa, oltre ad aumentare il numero di potenziali gruppi reattivi sulla superficie cellulare (Nel et al, 2006; Warheit, 2008; Warheit et al, 2008; Nel et al, 2009). Come conseguenza, è ipotizzabile che i gruppi reattivi sulla superficie modifichino l'attività biologica della NP e siano perciò rilevanti nel definirne la tossicità. A parità di composizione chimica, quindi, l'area di superficie per unità di massa appare un parametro estremamente rilevante nel definire la tossicità di una NP (Oberdorster et al, 2005). Oltre alle piccole dimensioni, anche la porosità contribuisce al significativo aumento dell'area superficiale (Powers et al, 2006).

La reattività superficiale dipende, inoltre, dalla composizione chimica stessa, dalla carica superficiale, dall'attività catalitica, dalla capacità di assorbimento e desorbimento di molecole, dalle imperfezioni dei cristalli e dalle impurezze (Oberdorster et al, 2005; Yang et al, 2008; Nel et al, 2009; Aillon et al, 2009). Se in alcuni casi un'augmentata

reattività superficiale, con conseguente aumentata attività biologica, produce effetti positivi, per esempio nel caso di veicolazione e rilascio intracellulare di sostanze terapeutiche, grazie ad un'alta capacità di penetrazione delle NPs, in altri casi possono manifestarsi effetti tossici, come induzione di stress ossidativo e citotossicità (Oberdorster et al, 2005; Nel et al, 2006; Yang et al, 2008), in altri casi ancora effetti positivi e tossici contemporaneamente (Oberdorster et al, 2005; Yang et al, 2008). Infine, la reattività superficiale risulta fondamentale nel definire le interazioni tra NP e macromolecole biologiche (proteine, elementi del citoscheletro, collagene, strutture di membrana, recettori, DNA, ecc.).

Le dimensioni e la chimica/reattività superficiale influenzano anche la tossicocinetica delle particelle dopo la loro deposizione a livello alveolare (Oberdorster et al, 2005; Powers et al, 2006a; Balbus et al, 2007).

Oltre ad influenzare la reattività superficiale, le ridotte dimensioni sono in grado di creare nelle NPs piani cristallini discontinui, ciò comporta un aumento del numero di difetti strutturali e la modifica della configurazione elettronica del materiale (Nel et al, 2006).

Anche lo stato di aggregazione o agglomerazione può influire sulla tossicità delle NPs, a causa di un aumento del raggio aerodinamico e di una riduzione dell'area superficiale complessiva occupata dalle NPs. In tal modo il comportamento degli aggregati/agglomerati diviene assimilabile a quello di particelle di dimensioni maggiori (Tsuji et al, 2006; Borm et al, 2006). Lo stato di aggregazione o agglomerazione dipende, oltre che dal numero delle NP e dalla loro composizione, anche dalle proprietà del mezzo in cui esse si trovano (pH, forza ionica, materiale organico disciolto nel mezzo stesso) (Christian et al, 2008).

Un altro fattore tossicologico di notevole rilevanza è la composizione dalla quale, oltre a dipendere lo stato di aggregazione/agglomerazione, dipende anche l'assorbimento di molecole biologiche e la distribuzione e la biopersistenza nell'organismo.

La carica superficiale delle NPs assume particolare importanza nell'interazione tra con le molecole biologiche e nella capacità di penetrazione attraverso le membrane cellulari. Le membrane cellulari infatti sono cariche negativamente a pH fisiologico, e questo favorisce la penetrazione di NPs cariche positivamente per via di interazioni elettrostatiche (Nel et al, 2009).

Anche l'energia superficiale influenza l'interazione NPs-molecola biologica. Infatti NPs ad energia superficiale bassa (idrofobiche) vengono assorbite in modo aspecifico,

provocando unfolding proteico, alterazione della componente lipidica delle membrane cellulari e sono internalizzate facilmente a livello epiteliale. Mentre NPs ad energia superficiale alta (idrofiliche), in particolare quelle con bassa carica negativa o neutra, hanno bassa affinità per le proteine e sono difficilmente internalizzate (Nel et al, 2009; Elder et al, 2009).

Le caratteristiche di superficie delle NPs finora riportate possono essere modificate mediante l'utilizzo di rivestimenti in grado di ridurre la reattività, prevenire l'aggregazione ed agglomerazione, favorendone, quindi, la dispersione e mantenendone inalterate le proprietà di interesse.

Un aspetto importante da valutare negli studi tossicologici è anche la solubilità, dalla quale dipende anche l'organo bersaglio della NP. La presenza di ioni metallici in NP solubili può provocare effetti deleteri per la salute umana, dovuti proprio all'effetto tossico di tali ioni (Borm et al, 2006; Balbus et al, 2007). Ad esempio studi sugli animali riguardanti NPs di grande interesse industriale, come i nanotubi, hanno dimostrato che la loro esposizione provoca gli stessi effetti polmonari osservati per altre fibre notoriamente tossiche, quali l'asbesto; tossicità che sembra associata alle impurezze metalliche ( $Al_2O_3$ ,  $Fe_2O_3$ ,  $TiO_2$ ), presenti nei nanotubi come conseguenza della loro lavorazione (Oberdorster G et al, 2005).

Dall'altra parte è necessaria anche la valutazione della biodegradabilità delle NPs, da cui dipende la biopersistenza di queste. Se da un lato NPs non biodegradabili possono accumularsi negli organi e nelle cellule, causando alterazioni biologiche a lungo termine; dall'altro lato NPs biodegradabili possono portare ad un'inattesa tossicità a causa di prodotti di degradazione tossici (Aillon et al, 2009).

Per quanto riguarda l'influenza della forma delle NPs nei confronti della tossicità, ancora pochi sono gli studi a riguardo. È stato dimostrato ad esempio che nanomateriali della stessa composizione ma di differente forma mostrano comportamenti differenti. Ad esempio, NPs sferiche d'oro sono meglio internalizzate di nanotubi d'oro (Chithrani et al, 2006). Studi condotti in vivo hanno dimostrato che nanotubi di carbonio a parete singola mostrano una citotossicità polmonare, seguita poi da una risposta infiammatoria, maggiore rispetto ai nanotubi a parete multipla o ai fullereni (Huczko et al, 2001; Montiero-Riviere et al, 2005)

Dall'analisi delle proprietà chimico-fisiche delle NPs appare in maniera evidente che non è possibile generalizzarne un profilo tossicologico, in quanto NPs differenti per

caratteristiche chimico-fisiche hanno in genere proprietà tossicologiche differenti. Ecco perché risulta utile valutare caso per caso ogni tipo di NPs.

Da quanto appena esposto ne consegue che gli studi nanotossicologici richiedono innanzitutto un'attenta classificazione delle NPs dal punto di vista fisico-chimico, in quanto è proprio dalle loro caratteristiche che dipende la tossicità (Nel et al, 2006; Nel et al, 2009, Fischer et al, 2007; Xia et al, 2009). In tal modo se da un lato la caratterizzazione delle NPs richiede l'uso di tecniche talvolta sofisticate e non ancora completamente ottimizzate (Murdock et al, 2008; Hasselov et al, 2008), dall'altro lato permette di valutare in modo appropriato il rischio di esposizione e conseguentemente di predisporre misure di prevenzione e di protezione per la salute umana e per l'ambiente.

### **4.3 EFFETTI DELLE NANOPARTICELLE INGEGNERIZZATE SULLA SALUTE UMANA**

La produzione e l'utilizzo crescente di nanomateriali ingegnerizzati in diversi settori occupazionali ha indotto molti gruppi di ricerca ad analizzarne i possibili effetti biologici sulla salute umana, sia dei produttori che dei consumatori. A tal proposito, la valutazione di questi effetti più che basarsi su studi epidemiologici, i quali mostrano diverse difficoltà nello stimare l'esposizione dei soggetti a rischio, si basa su studi effettuati in vitro o in vivo, su animali quali il topo.

In particolar modo, questi studi si basano principalmente sulla valutazione dei rischi di nanomateriali già presenti o che saranno a breve immessi in commercio, quali nanotubi a parete singola o multipla, fullereni, NPs metalliche e quantum dot.

Le vie di esposizione delle NPs presenti nei prodotti di consumo, così come le NPs costituenti il particolato atmosferico, sono tre: apparato respiratorio, cutaneo e gastrointestinale.

#### *ASSORBIMENTO RESPIRATORIO*

La più importante via di assorbimento delle NPs è quella respiratoria (Maynard et al, 2004). Essa riguarda principalmente i produttori che inalano NPs durante i processi di fabbricazione.

Come avviene per le particelle ultrafini atmosferiche, la deposizione di NP ingegnerizzate nel tratto respiratorio è determinata dal loro diametro. Essa in particolare può riguardare la regione tracheobronchiale, extra-toracica ed alveolare. In quest'ultima regione si depositano NPs di diametro minore.

La tossicità e la tossicocinetica delle NPs inalate, oltre a dipendere dal fattore dimensionale di queste, dipende anche dalle altre caratteristiche chimico-fisiche. Yang et al (2008) ha individuato però alcune caratteristiche comuni utili per definire l'interazione tra polmoni e NP. Inizialmente, le particelle vengono incorporate nel fluido che ricopre la superficie epiteliale alveolare, (*epithelial lining fluid*,(ELF), con un'efficienza inversamente proporzionale alle dimensioni (Geiser et al, 2003). Le particelle più solubili si dissolvono in situ mentre quelle insolubili non sono assorbite rapidamente, ma possono subire una traslocazione fisica, in base alla regione dove sono depositate (Oberdorster et al, 2005) e ai sistemi difensivi dell'organismo. A questo punto, diversi

meccanismi possono quindi attivarsi: trasporto mucociliare, fagocitosi da parte dei macrofagi ed endocitosi (Gumbleton, 2001; Arredouani et al, 2004). Il trasporto mucociliare riguarda le alte vie respiratorie, mentre la fagocitosi e l'endocitosi sono i meccanismi prevalenti di trasporto delle NPs depositate nelle basse vie respiratorie e quindi negli alveoli (Sibille and Reynold, 1990). I macrofagi sono in grado di fagocitare particelle di grandi dimensioni (microparticelle) ma non di piccole dimensioni, che in tal modo eludono il sistema macrofagico (Chono et al, 2006), motivo per cui queste interagiscono con le cellule epiteliali. La capacità di eludere il sistema macrofagico è influenzata anche dalla forma delle NPs: NPs fibrose come i nanotubi sfuggono più facilmente ai macrofagi, e si immettono nella circolazione sanguigna. L'endocitosi delle NPs si ritiene che avvenga mediante caveole, che sono dei micro domini delle membrane cellulari, contenenti caveolina1, espressi dai capillari dei polmoni e dalle cellule alveolari. Ciò però non è stato ancora dimostrato in vivo (Rejman et al, 2004). In tal modo le caveole trasportano le NPs dai polmoni al sangue (Oberdorster G et al, 2005; Rejman J et al, 2004).

Studi condotti in vivo dimostrano che, a livello respiratorio, le NPs siano in grado di provocare la comparsa di un'importante risposta infiammatoria polmonare acuta, la formazione di lesioni granulomatose ed enfisematose, la deposizione di collagene con conseguente fibrosi interstiziale e induzione di un significativo stress ossidativo. Ciò è stato dimostrato da Shvedova et al (2008) e da Muller et al (2005) in topi, mediante aspirazione faringea, esposizione inalatoria o instillazione intratracheale.

Invece gli studi condotti in vitro dimostrano una diminuzione della vitalità e proliferazione cellulare, nonché un incremento della produzione di ROS e dello stress ossidativo intra ed extra cellulare. Ad esempio in cellule bronchiali epiteliali umane, nanotubi di carbonio a parete singola mostrano effetti citotossici, quali diminuzione della vitalità cellulare, riduzione dei livelli di glutatione ed aumento della produzione di radicali idrossilici. Tali effetti sembrano però attribuibili alla presenza di impurezze metalliche come il ferro ed il nichel (Shvedova et al 2007), infatti nanotubi purificati non inducono la produzione di ROS nei macrofagi alveolari (Kagan et al, 2006). La produzione di ROS si ritiene che sia dovuta ad un'alterazione della catena mitocondriale respiratoria (Asharani et al, 2009). La capacità di provocare alterazione della catena mitocondriale dipende però anche dalla composizione chimica delle NPs. Secondo Park et al (2008) la produzione di Ros indurrebbe l'attivazione delle caspasi ed il conseguente innesco dell'apoptosi, mediante la quale le NPs realizzerebbero il loro effetto

citotossico. In fibroblasti polmonari l'esposizione a NPs induce un aumento anche della proliferazione cellulare e della produzione di collagene, ciò confermerebbe quindi un ruolo dei nanomateriali nelle reazioni fibrogene osservate in studi in vivo (Wang et al, 2008).

La citotossicità evidenziata dagli esperimenti in vitro è correlata sia al grado di solubilizzazione ed alla carica superficiale delle NPs (Sayes et al, 2004), che alla dose e al tempo (Sayes et al, 2006). Ad esempio in cellule di carcinoma polmonare umano si osservano effetti citotossici solo a concentrazioni elevate di TiO<sub>2</sub>(100ug/ml) (Sayes et al, 2006) mentre nelle stesse cellule ed in condizioni sperimentali simili Simon-Deckers et al, 2008 hanno riscontrato, seppur lievi, degli effetti citotossici anche a concentrazioni inferiori ai 100ug/ml. Questi risultati contrastanti potrebbero essere spiegati dalle differenti caratteristiche delle NPs, cosa che è stata dimostrata anche in vivo (Warheit et al, 2007). Lo stato di aggregazione influenza il comportamento delle NPs, riducendone la tossicità: a parità di dose somministrata una NP è in grado di indurre una risposta infiammatoria maggiore rispetto a quella della stessa NP allo stato aggregato (Kobayashi et al, 2009)

In tal modo gli effetti delle NPs ingegnerizzate sul sistema respiratorio hanno suggerito di limitarne l'utilizzo industriale e le possibili applicazioni pratiche.

### *ASSORBIMENTO CUTANEO*

Un'altra via di assorbimento è rappresentata dalla cute. Tale via riguarda sia i produttori, che manipolano NPs durante i processi di fabbricazione, sia i consumatori, durante l'utilizzo di prodotti in commercio contenenti NPs.

La cute, con un'estensione di circa 1,5m<sup>2</sup> nell'adulto, costituisce una barriera difficilmente superabile dalle NP (Argyle et al., 2009). Ciò è dovuto alla sostanziale impermeabilità dello strato superficiale della cute (epidermide), mentre lo strato sottostante (derma) ha una ricca irrorazione sanguigna e contiene abbondanti macrofagi tissutali, vasi linfatici, cellule dendritiche, e cinque differenti tipi di terminazioni nervose di tipo sensitivo. Proprio per la caratteristica strutturale dell'epidermide, l'assorbimento cutaneo delle NPs è favorito da lacerazioni presenti nella pelle danneggiata (Larese et al, 2009) oppure in seguito all'utilizzo di detergenti irritanti e sostanze chimiche, che ne facilitano la penetrazione. Uno studio condotto da Rouse et (2007) ha dimostrato però

anche la capacità delle NPs di penetrare nella cute intatta, in seguito a movimenti di flessione.

Finora l'effetto delle NP sembra essere circoscritto solo all'epidermide, in quanto non vi sono prove sperimentali che dimostrano che le NPs ingegnerizzate possano oltrepassare l'epidermide e raggiungere il derma. Si suppone che qualora esse riuscissero ad avere accesso al derma verrebbero trasportate dal sangue e convogliate nel sistema linfatico e nei linfonodi, provocando una risposta immunitaria.

Attualmente la maggior parte delle informazioni disponibili circa la tossicità cutanea delle NPs deriva dall'industria farmaceutica e riguarda le NPs di ossido di zinco (ZnO) e di biossido di titanio (TiO<sub>2</sub>), usate per la formulazione di prodotti cosmetici come creme solari, detergenti e shampoo. Poche sono le informazioni riguardanti le altre tipologie di NPs, che richiedono dunque ulteriori studi.

L'esposizione cutanea a NPs può determinare effetti locali sulla cute, sia irritativi che allergici, o essere una via d'ingresso nel circolo sistemico.

Molte sono le evidenze per diversi tipi di NPs circa l'effetto di tipo irritativo-infiammatorio (Kishore et al, 2009; Monteiro-Riviere et al., 2005; Witzmann and Monteiro-Riviere et al., 2006); mentre attualmente non vi sono dati sulla potenziale allergicità delle NPs, anche se alcune informazioni possono far ipotizzare un aumentato rischio in seguito all'esposizione a NPs metalliche. Tale effetto allergico sembra riguardare principalmente le NPs contenenti metalli allergici come cobalto, nichel e cromo, anche se non vi sono ora disponibili dati che attestino questa ipotesi. Di conseguenza non dovrebbero indurre una risposta allergica le NPs contenenti metalli non allergenici come oro ed argento, ma anche questo è da studiare. Dati preliminari dimostrano che i fullereni inibiscono la risposta allergica mediata dalle IgE, sia in vivo che in vitro, inibendo il rilascio di istamina (Ryan et al, 2007)

La grande quantità di dati disponibile circa gli effetti tossici delle NPs penetrate attraverso la cute deriva da studi effettuati in vitro su cheratinociti e fibroblasti. Studi condotti da Shevedova et al (2003) e da Zhang et al (2007) hanno dimostrato in cheratinociti che i nanotubi di carbonio a parete singola causano stress ossidativo, perdita di vitalità, alterazioni macroscopiche e rilascio dell'interleuchina-8 alle dosi di NPs più elevate, suggerendo una reazione irritativa dose-dipendente. Tali effetti dipendono anche dal grado di funzionalizzazione della NPs: uno studio di Sayes et al (2006a) mostra infatti una minore citotossicità in fibroblasti, riducendo il grado di funzionalizzazione delle NPs. Inoltre il contatto cutaneo giornaliero con nanotubi di

carbonio è in grado di indurre flogosi cutanea caratterizzata da rash a carico del dorso delle mani, degli spazi interdigitali e del volto, nonché fenomeni di ipercheratosi, attribuiti all'attivazione della risposta infiammatoria e allo stress ossidativo (Chou et al, 2002).

Effetti tossici sui cheratinociti e sui fibroblasti, quali inibizione della proliferazione e alterazioni morfologiche, sono stati riscontrati anche per le NPs di argento, rilasciate da capi di vestiario (Paddle-Ledinek et al, 2006). Ciò è in contrasto con le conoscenze finora ottenute riguardanti tali NPs, le quali vengono largamente impiegate nell'abbigliamento proprio per l'attività antimicrobica.

Le NPs di TiO<sub>2</sub> e ZnO sono le NPs più diffuse ed utilizzate nelle creme schermanti solari in quanto bloccano i raggi UV in modo efficiente, ma non presentano il colorito biancastro tipico delle creme costituite da particelle di dimensioni maggiori. Tali NPs sono in grado di penetrare solo nello stato corneo dell'epidermide e non gli strati profondi di questa (Tan et al, 1996; Schulz et al., 2002; Mavon et al., 2007; Cross et al., 2007). Non è però da escludere che nelle condizioni di flessione o quando la cute è lesa queste NPs siano in grado di penetrare in profondità nella cute. La penetrazione di queste NP a livello degli strati profondi dell'epidermide aprirebbe nuovi quesiti sulla loro sicurezza in quanto le piccole dimensioni e l'elevata superficie potrebbero determinare sulle cellule e sul sistema immunitario effetti diversi rispetto ai materiali con dimensione maggiore. Le piccole dimensioni possono aumentare la capacità di interagire a livello intercellulare e a livello del DNA e l'elevata superficie può aumentare la loro capacità di svolgere azione immunitaria e di agire come apteni inducendo reazioni allergiche o autoimmuni (Newman et al., 2009), ma gli studi attuali sono ancora troppo pochi per dare un giudizio definitivo su tali sostanze.

In vitro è stato dimostrato che entrambi i tipi di NPs mostrano effetti citotossici ed infiammatori (Sayes et al, 2006b; Yuan et al, 2010). A livello cellulare, esse comportano produzione di ROS ed danni al DNA (Uchino et al, 2002; Hidaka et al, 2006). Questi effetti non sono stati riscontrati dal gruppo di Dufour (2006). Sulla base di questi dati discordanti, un gruppo di studiosi della L'Oreal (Nohynek et al., 2009) ha analizzato il rischio legato all'uso di NP negli schermi per raggi ultravioletti UV, concludendo che le evidenze scientifiche suggeriscono come le NPs utilizzate oggi nelle formulazioni cosmetiche e negli schermi solari non presentino rischi per la cute o per la salute, mentre svolgono azione protettiva contro gli effetti negativi della radiazione UV, compreso il cancro.

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

Allo stato attuale tutte le creme solari contengano NP, motivo per cui l'Unione Europea sta predisponendo un'etichettatura specifica per questi prodotti nell'ambito delle nuove direttive sull'uso dei cosmetici.

La FDA nel 1999 aveva approvato l'immissione in commercio di cosmetici contenenti NP senza nuova etichettatura, ma ora, sulla base dei risultati più recenti ottenuti a riguardo, sta rivedendo le sue posizioni. Nel 2007 un gruppo di lavoro ha infatti proposto una serie di linee guida per le nuove immissioni in commercio, che prevedano nuovi test per la sicurezza e maggiori informazioni scientifiche da fornire prima di autorizzare la commercializzazione dei nuovi cosmetici contenenti NP.

#### *ASSORBIMENTO GASTRO-INTESTINALE*

La terza via di assorbimento delle NPs è rappresentata dall'apparato gastro-intestinale. Esse possono essere ingerite deglutendo il muco che incorpora e ripulisce le NPs depositate lungo il tratto respiratorio, nonché mediante assunzione di cibi ed acqua contaminati, o all'uso di dentifrici e prodotti farmaceutici, ed infine, nel caso dei produttori, anche per contatto con mani e superfici contaminate (Lomer MC et al, 2002; Tiede K et al, 2008). Per quanto riguarda l'assunzione delle NPs attraverso il cibo essa è connessa non solo al fatto che le NPs vengono impiegate ad esempio nell'industria alimentare per la fabbricazione di contenitori e prodotti d'imballaggio, ma anche al fatto che le NPs ingegnerizzate sono disperse nell'ambiente, in tal modo captate dai diversi organismi animali e vegetali entrano nella catena alimentare, costituendo dei contaminanti involontari degli alimenti (Boxall et al, 2007). Questo è il motivo per cui recentemente si sta focalizzando l'attenzione sulla valutazione della trasferibilità delle NPs all'uomo attraverso la catena alimentare. In particolare, analizzando il passaggio di NPs dall'acqua ai pesci e dal suolo ai prodotti vegetali e da questi agli animali da carne o da latte.

Attualmente pochi sono gli studi riguardanti le NPs assorbite a livello gastroenterico. Tali studi riguardano animali da laboratorio, per quanto riguarda l'uomo studi a riguardo sono praticamente assenti.

Gli studi condotti sui ratti hanno dimostrato che le NPs possono essere assorbite attraverso le placche di Peyer del piccolo intestino (Jani et al, 1990; O'Hagan, 1996; Gullberg et al, 2006) ma si suppone anche le NP possano essere assorbite dagli enterociti intestinali (Carr et al, 1996; Hillyer and Albrecht, 2001; Des Rieux et al, 2006). Tale assorbimento è influenzato dalle caratteristiche quali carica e dimensione delle NPs (Jani et al, 1990; Florence, 1997; Hussain et al, 2001; Gaumet et al, 2009).

Una volta assorbite esse possono o venire attaccate dai normali processi digestivi oppure possono migrare attraverso il circolo sanguigno in altri organi e tessuti, quali fegato, milza, sangue, rene e midollo osseo. (Hillyer and Albrecht, 2001)

#### *DISTRIBUZIONE DELLE NPs*

Dopo essere state assorbite a livello respiratorio, cutaneo e gastro-intestinale, le NPs ingegnerizzate possono giungere nel sangue per poi migrare in diversi organi ed apparati, quali rene, muscoli, milza e femore (Singh et al, 2006) (Fig)

Relativamente agli effetti a livello di organo e di apparato, la maggior parte degli studi si è concentrata sulla tossicità relativa al sistema nervoso, cardiovascolare ed immunitario.

#### *EFFETTI SUL SISTEMA NERVOSO CENTRALE*

Le NPs, assorbite principalmente attraverso la via inalatoria, hanno la capacità di raggiungere il SNC mediante due diversi meccanismi. Questi meccanismi sono il trasporto trans-sinaptico e la captazione attraverso la BEE (Lai et al., 2000; Borm et al., 2006). Mediante il meccanismo di trasporto trans-sinaptico, le NPs possono essere captate direttamente nel SNC attraverso le terminazioni nervose della mucosa nasale (nervo olfattivo e nervo trigemino) e tracheobronchiale (afferenze del nervo vago) (Oberdorster et al, 2004; Muller et al, 2004; Kreuter et al, 2004). La captazione delle NPs dalla BBE avviene nei casi in cui questa risulta essere danneggiata, come nel caso di ipertensione o di encefalomielite.

Di tutte le barriere endoteliali, la BEE è la più serrata e in condizioni normali costituisce un meccanismo di difesa che protegge il SNC dall'esposizione a sostanze veicolate dal sangue. Caratteristiche di superficie delle NPs e stati morbosi come ipertensione ed encefalomieliti possono alterare la BEE e favorire la penetrazione delle NPs, con conseguente tossicità per il SNC (Muldoon et al, 1999).

Studi condotti in vivo hanno dimostrato che le NPs trasportate mediante il nervo olfattivo al SNC sono in grado di indurre stress ossidativo, che provoca perossidazione lipidica (Oberdorster et al, 2004), di attivare la risposta infiammatoria, in seguito a modificazione dell'espressione genica delle citochine pro infiammatorie e delle chemochine (Tin-Tin-Win-Shwe et al, 2006) e di indurre il rilascio di neurotrasmettitori (glutammato e glicina) nel fluido extracellulare (Tin-Tin-Win-Shwe et al, 2008). Il rilascio di questi neurotrasmettitori potrebbe causare la produzione di citochine pro infiammatorie da parte delle cellule immunitarie della microglia.

Le NPs veicolate dal sangue sono in grado di alterare le proprietà delle membrane delle cellule endoteliali e di distruggere le giunzioni occludenti (tight junctions) della BBE. Effetti che sono correlati all'induzione di stress ossidativo (Chen et al, 2008). Gli effetti delle NPs sulla BBE oltre a dipendere dalle dimensioni dipendono anche dalla composizione e dalle cariche superficiali. Per quanto riguarda la composizione questi effetti sono maggiori nel caso di nanotubi di carbonio rispetto a NPs metalliche (Chen et al, 2008). Per quanto riguarda, invece, la carica, Lockman (2004) nei suoi studi ha dimostrato che NPs con carica neutra o bassa concentrazione anionica di cariche superficiali, non alterano l'integrità della BBE, al contrario alte concentrazioni anioniche o cationiche di superficie inducono alterazione della BBE.

In generale studi condotti sia in vivo, in diversi modelli animali, che in vitro su cellule neuronali e gliali di derivazione animale ed umana, hanno dimostrato notevoli effetti neurotossici mediati dallo stress ossidativo quali: riduzione della vitalità, apoptosi, infiammazione, perdita di adesione e rallentamento della crescita cellulare, alterazioni delle membrane, incremento dei lisosomi e dilatazione del reticolo endoplasmatico ruvido (Li et al, 2009 ; Long et al, 2007; Au et al, 2007, Ma et al, 2010, Shimizu et al, 2009, Wang et al 2009). La riduzione della vitalità cellulare sembra avere un effetto dose dipendente ed è correlata anche al tipo di NPs, in tal senso le NPs di ossido di zinco sono più tossiche di quelle di ossido di manganese (Lai et al, 2008). La perdita di adesione e il rallentamento della crescita dipendono dal tipo cellulare analizzato: infatti, ciò si verifica negli astrociti immaturi ma non in quelli maturi (Au et al, 2007).

Recentemente è stato dimostrato che le NPs sono in grado di indurre la morte delle cellule neuronali mediante un meccanismo definito eccito-tossicità. Tale meccanismo è dovuto al fatto che lo stress ossidativo indotto dalle NPs inibisce la capacità dei sinaptosomi di captare il glutammato, di conseguenza l'eccessiva concentrazione di glutammato extracellulare comporta un'esposizione prolungata dei neuroni a questo neurotrasmettitore eccitatorio, che sarebbe alla base del danno cellulare e della morte dei neuroni (Alekseenko et al, 2008).

### *EFFETTI CARDIOVASCOLARI*

L'interesse nei confronti degli effetti cardiovascolari delle NPs ingegnerizzate scaturisce dalla correlazione tra elevati livelli di NPs presenti nel particolato atmosferico e malattie cardiovascolari, quali infarto, ictus ed aritmia (Mossman et al, 2007). Gli effetti delle NPs ingegnerizzate sul sistema cardiovascolare sono due: diretto ed indiretto. Nell'effetto diretto il danno cardiovascolare è attribuito alla capacità delle NPs di interagire direttamente con cellule, quali quelle endoteliali e le piastrine, e con proteine della coagulazione; mentre l'effetto indiretto è da attribuire alla biopersistenza delle NPs a livello polmonare, cosa che induce un processo infiammatorio cronico locale con rilascio di fattori infiammatori, che a loro volta causano un'inflammatione sistemica.

La maggior parte degli studi nanotossicologici circa questi effetti deriva da nanotubi di carbonio, mediante i quali è stato possibile concludere che le NPs inducono ipercoagulabilità, formazione di ateromi, infiammazione sistemica, disfunzione/danno endoteliale (incluso il danno ossidativo) ed alterazioni dell'attività cardiovascolare regolata dal sistema nervoso autonomo.

In vitro, sia i nanotubi di carbonio a parete singola che quelli a parete multipla sono in grado di provocare un aumento dell'aggregazione delle piastrine e quindi un'ipercoagulazione (Radomski et al, 2005), che potrebbe essere la causa di ischemie nell'uomo (Ben-Dor et al, 2009). Tale risultato è stato confutato in uno studio condotto in vivo in topi da Nemmar et al (2007), dove la coagulazione era solo parzialmente aumentata e tendeva a regredire nel tempo. Questi risultati mostrano che per quanto riguarda l'effetto delle NPs sulle piastrine è necessario ancora indagare. Entrambi gli autori hanno inoltre dimostrato in vivo ed in vitro un coinvolgimento dei nanotubi sulla formazione di trombi a livello della carotide (Ben-Doret al, 2009; Nemmar et al, 2007).

Le NPs sono coinvolte anche nella formazione di placche aterosclerotiche. Infatti in topi geneticamente predisposti ad aterosclerosi, in seguito ad esposizioni polmonari ripetute a nanotubi a parete singola, sono state riscontrate tali placche (Li et al, 2007). Va però tenuto presente che la comparsa di queste placche oltre a riguardare topi geneticamente modificati e predisposti ad aterosclerosi, prevedeva anche una dieta iperlipidica per questi topi. Infatti con una dieta standard il danno aterosclerotico era inferiore. Questi risultati però sembrano suggerire che questo danno cardiovascolare potrebbe riguardare persone obese e che abbiano una forte familiarità con malattie cardiovascolari. La formazione di placche aterosclerotiche non è da sottovalutare in quanto nell'uomo è ormai certo che eventi ischemici, quali infarto del miocardio ed ictus, si determinano nel contesto di una malattia aterosclerotica, che può portare alla formazione di trombi, che causano occlusione dei vasi arteriosi.

L'infiammazione indotta a livello cardiovascolare sembra essere associata all'attivazione della via del complemento, che è coinvolta nella maggior parte dei processi infiammatori umani, al rilascio di interleuchine e all'aumento di espressione di geni-proinfiammatori (Salvador-Morales et al, 2006; Erdely et al, 2009).

Per quanto riguarda le cellule endoteliali vascolari, le NPs inducono un incremento della selectina E, che è una molecola di adesione espressa solo sulle cellule endoteliali attivate, e che gioca un ruolo chiave nei processi iniziali di aterosclerosi (Erdely et al, 2009); ed inducono danno ossidativo al DNA mitocondriale (Li et al, 2007).

Infine l'esposizione a NPs determina anche alterazione della regolazione dell'attività cardiaca, come frequenza cardiaca e pressione arteriosa, da parte del sistema nervoso autonomo (Legramante et al, 2009). Numerose sono le evidenze che alterazioni della regolazione dell'attività cardiaca sono responsabili di morte improvvise, nonché di recidive di infarto e di aritmie (La Rovere et al, 1998)

### *EFFETTI IMMUNOLOGICI*

I dati relativi agli effetti immunologici indotti dalle NPs sono molto scarsi e riguardano principalmente studi in vivo. Due sono i meccanismi attraverso i quali le NPs possono indurre danni al sistema immunitario. Il primo meccanismo prevede che le NPs, una volta raggiunta la circolazione sistemica, interagiscano con le proteine circolanti o esposte sulla superficie cellulare, determinando l'esposizione di residui amminoacidici

normalmente non esposti (epitopi) con la possibilità di una risposta autoimmunitaria (Labarre et al., 2005). Il secondo meccanismo invece prevede che le NPs interferiscano con i processi di opsonizzazione, responsabili dell'eliminazione di sostanza estranee al corpo, come microrganismi (Moghim and Patel, 1998).

Le NPs in particolare sono in grado di attivare il complesso di istocompatibilità di tipo 1 e 2. Ciò è stato dimostrato in vivo somministrando per via sottocutanea nanotubi a parete singola e multipla a topi per un periodo prolungato di tre mesi (Koyama et al, 2006).

Altri studi invece dimostrano che le NPs sono in grado anche di reprimere la risposta immunitaria dei linfociti T (immunità cellulo-mediata), cosa che comporta la riduzione della capacità di combattere le infezioni (Mitchell et al, 2007).

Oltre all'immunità cellulo-mediata, anche l'immunità innata può essere alterata dalle NPs. Infatti, studi effettuati da Shvedova et al (2008) hanno riportato che l'esposizione di topi a nanotubi comporta una riduzione dell'attività dei macrofagi polmonari. Ciò indica quindi che le NPs aumentano la recettività alle infezioni.

Al contrario di quanto appena esposto, Dumortier et al (2006) non ha riscontrato alcuna effetto dei nanotubi sui linfociti B e T e sui macrofagi. Probabilmente l'assenza di effetti sul sistema immunitario è da attribuire al fatto che in questo studio i nanotubi utilizzati erano funzionalizzati e ciò modifica le caratteristiche chimico-fisiche di questi.

Le NPs sembrano coinvolte anche in alcune patologie immunitarie, di cui ne aumentano il decorso secondo una modalità dose-dipendente, come ad esempio l'amiloidosi (Linse et al, 2007)

### *ESCREZIONE DELLE NPs*

Il corpo umano non ha sviluppato dei veri e propri sistemi in grado di eliminare le NPs adsorbite. Ciò è dovuto al fatto che solo nell'ultimo secolo l'uomo è stato esposto, in seguito al crescente sviluppo della nanotecnologia, a grandi quantità di NPs.

Attualmente pochi sono gli studi atti a valutare il destino metabolico delle NPs. Esperimenti effettuati sui ratti hanno riportato che alcuni tipi di NPs possono essere eliminati attraverso l'urina e le feci. In questi casi l'eliminazione avviene o mediante filtrazione a livello glomerulare e successiva rimozione tramite le urine, oppure se le NPs vengono assorbite a livello del fegato, mediante secrezione con la bile

nell'intestino, seguita poi da rimozione attraverso le feci. (Choi et al., 2007; Lipka et al, 2010)

#### **4.4 TOSSICITA' DELLE NANOPARTICELLE IN CAMPO BIOMEDICO**

Dal momento che NPs impiegate nei settori più disparati provocano effetti tossici sulla salute dei produttori e dei consumatori, negli ultimi anni la nanotossicologia sta focalizzando la sua attenzione anche sulla potenziale tossicità di NPs impiegate nelle applicazioni biomediche sulla salute umana. In tal modo la valutazione della tossicità di queste NPs ne garantisce la sicurezza prima della loro applicazione in campo biomedico, sia in diagnosi che in terapia (El-Ansary and Al-Daihan, 2009; Chaloupka et al, 2010; Markides et al, 2012; Wahajuddin and Arora, 2012 ).

Allo stato attuale i dati presenti in letteratura circa gli effetti di queste NPs sono controversi, tale discrepanza è da ricondurre alla differenti dosi utilizzate, alle diverse caratteristiche chimico fisiche delle NPs impiegate, ai differenti sistemi biologici e alle differenti condizioni sperimentali usate (Choi and Wang, 2011; Markides et al, 2012). La maggior parte dei dati circa la tossicità delle NPs biomediche deriva da linee cellulari somatiche sia normali che tumorali (Asare et al, 2012; Mironava et al, 2013, Yang et al, 2013).

In generale dagli studi effettuati su queste cellule si evince che le NPs utilizzate in diagnosi e terapia inducono: aumento (Wahajuddin and Arora, 2012) o riduzione della proliferazione cellulare (Sun et al, 2013, Ahamed et al,2013, Asare et al, 2012), riduzione della vitalità cellulare (Ahamed et al,2013), aumento della risposta infiammatoria (Wahajuddin and Arora, 2012), apoptosi (Sun et al, 2013, Ahamed et al,2013, Asare et al, 2012; Kanagesan et al, 2103;Meena et al, 2012), danni al DNA (Wahajuddin and Arora, 2012; Ahamed et al,2013; Yang et al, 2013), necrosi (Asare et al, 2012), cambiamenti nella morfologia cellulare (Hussain et al, 2005; Mironava et al, 2013), rimodellamento del citoscheletro (Apopa et al, 2009; Wahajuddin and Arora, 2012) o distruzione di questo (Pisanic et al, 2007) ed infine riduzione dei contatti intracellulari (Pisanic et al, 2007) . Alla base di questi effetti tossici appare evidente un meccanismo comune che riguarda l'interazione delle NPs con i mitocondri, che ha come conseguenza l'induzione di stress ossidativo. (Hsin et al, 2008; Apopa et al, 2009; Kim et al, 2011; Meena et al, 2012; Wahajuddin and Arora, 2012 Ahamed et al,2013). L'incremento delle specie reattive dell'ossigeno, causato dallo stress ossidativo, fa sì che queste possano interagire con diverse molecole biologiche, come proteine, enzimi, lipidi ed acidi nucleici, provocando notevoli danni cellulari (Kim et al, 2011; Khaing Oo et al,

2012). In particolare, l'interazione di queste specie reattive con i lipidi provoca perossidazione lipidica (Meena et al, 2012; Ahamed et al, 2013). Per quanto riguarda le NPs magnetiche, la produzione delle specie reattive sembra essere associata al rilascio degli ioni metallici dal core della NP o alla degradazione enzimatica della NP stessa (Mahmoundi et al, 2012). La capacità delle NPs di indurre stress ossidativo può senz'altro però essere utilizzata nelle terapie anticancro, per distruggere cellule malate (Khaing Oo et al, 2012).

La maggior parte dei danni cellulari indotti dalle NPs biomediche dipende dalla concentrazione d'uso di queste. Studi in vitro in diverse linee cellulari hanno infatti dimostrato che la citotossicità, la genotossicità, lo stress ossidativo sono dose-dipendenti (Meena et al, 2012; Ahamed et al, 2013; Sun et al, 2013; Asare et al, 2013; Kanagesan et al, 2103).

Le caratteristiche chimico fisiche delle NPs sono particolarmente responsabili della tossicità delle NPs per le applicazioni biomediche. Tra queste caratteristiche si possono annoverare la taglia, la composizione, la carica superficiale. Per quanto riguarda la taglia, molti lavori in vitro ed in vivo dimostrano che la tossicità delle NPs è taglia-dipendente (Sun et al, 2013; Yang et al, 2013; Shimizu et al, 2012). Nello specifico, NPs di taglia ridotta sono quelle più tossiche rispetto a quelle di taglia superiore (Shimizu et al, 2012; Frohlich et al, 2012; Liu et al, 2011); si ritiene che ciò sia dovuto al fatto che le NP più piccole siano maggiormente internalizzate a livello cellulare (Choi and Wang, 2011).

NPs differenti per composizione mostrano effetti tossicologici differenti sulla stessa linea cellulare. Ad esempio, la tossicità delle NPs di argento è notevolmente più elevata delle NPs di manganese nella linea cellulare neuroendocrina PC-12 (Hussain et al, 2006). La citotossicità delle Nps di argento è confermata anche da studi effettuati da Asare te al. (2013), secondo cui essa è maggiore di quella di NPs di biossido di titanio nelle cellule testicolari. Studi condotti su cellule umane epiteliali bronchiali ed alveolari, hanno permesso di stabilire che le NPs biocompatibili non sono esenti da effetti tossici per le cellule, come lo stress ossidativo e l'attivazione della risposta infiammatoria. In particolare NP di PLGA sono meno tossiche di NPs di biossido di silicio e di ossido di ferro, cosa che potrebbe essere attribuita alla biodegradabilità delle NPs di PLGA (Guadagnini et al, 2013).

Anche la carica superficiale sembra essere un importante caratteristica da valutare per la sicurezza delle NPs nelle applicazioni biomediche. NPs di polistirene cariche

positivamente, per la presenza di gruppi amminici di superficie, sono in grado di indurre maggiori effetti tossici rispetto alle stesse NPs cariche negativamente, per la presenza di gruppi carbossilici di superficie. Tali NPs cationiche inducono un ritardo della fase G1 del ciclo cellulare, un decremento dell'espressione delle cicline D ed E, ed alterano l'integrità di membrana (Liu et al, 2011). Questi danni alle membrane cellulari indotti dalle NPs di polistirene ammino-modificate sono stati riscontrati anche negli studi di Ruenaroengsak et al (2012). Le NPs cationiche di polistirene sono anche responsabili di altri effetti tossici, come l'apoptosi, mediante attivazione delle caspasi 3,7 ed 9, i cambiamenti morfologici dei lisosomi e dei mitocondri, che portano alla produzione di specie reattive dell'ossigeno (Bexiga et al, 2011). Anche gli studi di Yang (2013) hanno mostrato che gli effetti tossici delle NPs sono dipendenti dalla carica superficiale di queste: le NPs con gruppi carichi positivamente sono più tossiche rispetto a quelle che presentano cariche superficiali negative.

Anche l'utilizzo di differenti linee cellulari rende difficile delineare un preciso profilo tossicologico delle NPs. Guadagnini et al (2013) hanno dimostrato che le cellule umane epiteliali bronchiali sono più sensibili alla tossicità indotta da NPs di biossido di silicio e di ossido di ferro rispetto a cellule epiteliali alveolari. La tossicità delle NPs inoltre può essere differente a seconda se si tratta di una linea cellulare somatica normale o tumorale. Studi condotti da Miranova et al (2013) hanno dimostrato che NPs metalliche risultano essere più tossiche in cellule tumorali (cellule cancerose della mammella) piuttosto che in cellule normali (cheratinociti), provocando un incremento del numero di vacuoli intracellulari e cambiamenti morfologici. Una maggiore tossicità in cellule cancerose (cellule epatiche umane) è stata riscontrata anche da Faedmaleki et al (2012), rispetto a cellule normali (epatociti primari di topo): nelle cellule tumorali infatti le NPs di argento mostrano un effetto inibitorio della crescita cellulare 44 volte maggiore rispetto alle cellule primarie. NPs di polistirene invece sembrano essere maggiormente tossiche in cellule normali (fibroblasti embrionali di topo) piuttosto che in cellule cancerose (cellule Hela) (Li et al, 2011).

Diversi sono i metodi impiegati per la valutazione della tossicità delle NPs. 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 spettrofotoniche. 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. Ancora sono impiegati saggi di vitalità "LIVE/DEAD", come quello che include la acetossimetil-calceina (calceina AM) e l'etidio omodimero. 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) 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.

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. Il saggio di vitalità basato sulla valutazione dell'attività mitocondriale più utilizzato è il 3-(4,5-dimetiltiazolo-2-yl)-2,5-difenil tetrazolio bromide (MTT). 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.

Esistono inoltre saggi deputati all'analisi dello stress ossidativo indotto dall'utilizzo di nanoparticelle. Tra questi vi è quello del glutatione (GSH), il quale analizza i livelli di GSH, un importante antiossidante ossidato a glutatione disolfuro (GSSG) in presenza di specie reattive dell'ossigeno. In particolare tale saggio analizza i livelli di glutatione utilizzando il composto 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). 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.

Per lo studio degli effetti genotossici delle nanoparticelle, molti test analizzano la presenza di danni al DNA mediante citometria di flusso, 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. 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, grazie all’uso di ioduro di propidio, come intercalante del DNA.

Studi nanotossicologici presenti in letteratura dimostrano che i diversi saggi utilizzati per testare gli effetti tossici delle NPs possono spesso dare risultati differenti circa la tossicità di queste, ciò dipende non solo dalla sensibilità del saggio utilizzato ma anche dalle caratteristiche delle NPs stesse. Esperimenti condotti da Vijayakumar and Ganesan (2012) hanno dimostrato che saggi come l’MTT, LDH e il “Neutral red” mostrano una sensibilità differente circa la tossicità delle NPs d’oro. Guadagnini et al (2013) ha invece riportato che lo ioduro di propidio è molto più efficace dell’MTT nel testare la tossicità di differenti NPs biocompatibili in cellule epiteliali umane. Inoltre la citometria a flusso può non essere un efficace sistema di valutazione della nanotossicità, dal momento che il distacco delle cellule dalla piastra di coltura, richiesto per l’applicazione di questa tecnica, può compromettere la stessa vitalità cellulare (Choin and Wang, 2011).

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. Le NPs ad esempio possono interagire con le molecole di colorante o di fluoroforo, utilizzate nei saggi tossicologici, e ciò altera l’assorbanza o la fluorescenza di queste (Choin and Wang, 2011). Inoltre NPs a base di carbonio possono interferire con le classiche analisi citotossiche come l’MTT, infatti queste interagendo con i sali di tetrazolio, riducono la quantità libera di questi, causando risultati falsi negativi (Kroll et al., 2009).

Pertanto alla luce di quanto esposto ne consegue che la valutazione della tossicità delle NPs in campo biomedico richiede l’utilizzo contemporaneo di più saggi tossicologici per uno stesso tipo di NPs o ancor meglio richiede lo sviluppo di strategie di “screening” di tossicità più sensibili e predittive, atte ad accertare il potenziale rischio legato all’impiego delle NPs, evitando risultati tossicologici inesatti e fuorvianti.

Attualmente pochi sono gli studi riguardanti la tossicità di NPs biomediche su sistemi biologici più sensibili, quali le cellule germinali sia maschili che femminili e lo sviluppo embrionale. Studi preliminari effettuati su spermatozoi umani, di bufalo e di ratto hanno dimostrato effetti tossici dose dipendenti (Taylor et al, 2012, Moretti et al, 2013; Pawar and Kaul, 2012; Gromadzka-Ostrowska et al, 2012). In particolare in spermatozoi umani, NPs di oro e di argento hanno un effetto dose dipendente sulla motilità e sulla vitalità (Moretti et al, 2013). Tale effetto sulla vitalità è stato anche riscontrato in

spermatozoi di bufalo trattati con NPs di biossido di titanio, dove oltre alla vitalità viene anche inficiata l'integrità della membrana e la frammentazione del DNA. Indicando quindi che le NPs non compromettono solo la funzionalità ma causano anche la frammentazione del DNA spermatico (Pawar and Kaul, 2012). Studi condotti in vivo in ratti hanno dimostrato che la somministrazione intravenosa di NPs di argento comporta un decremento della quantità di spermatozoi epididimali taglia, dose e tempo dipendente, oltre ad indurre frammentazione del Dna (Gromadzka-Ostrowska et al, 2012) L'unico dato circa la tossicità delle NPs sui gameti femminili deriva da uno studio di Xu et al (2012), condotto nei topi, secondo cui quantum dots coniugati a transferrina hanno effetti tossici sullo sviluppo follicolare e sulla maturazione ovocitaria, provocando un ritardo nella formazione dell'antro e una diminuzione della quantità di ovociti con il primo globulo polare.

Solo negli ultimi anni si sta focalizzando l'attenzione sull'utilizzo dello sviluppo embrionale come saggio per la valutazione della tossicità delle NPs prima della loro applicazione in campo biomedico. E' infatti noto che lo sviluppo embrionale pre-impianto è molto sensibile a diversi fattori ambientali, sia in vivo, come l'alimentazione materna, che in vitro, come la coltura embrionale (Fleming et al., 2004; Sinclair and Singh, 2007; Thompson et al., 2007; Watkins et al., 2008). Tali fattori ambientali sono in grado provocare effetti sullo sviluppo embrionale sia a breve termine che a lungo termine, influenzando così sia lo sviluppo embrionale precoce che quello tardivo e addirittura postnatale. Tra gli effetti a breve termine vi sono cambiamenti dell'espressione genica, stress metabolico, apoptosi, modificazioni epigenetiche ed alterazione dei pathways di signalling intracellulare; mentre tra gli effetti a lungo termine si annoverano riduzione della capacità d'impianto, alterazioni della crescita e dello sviluppo fetale ma anche della crescita postnatale ed aumentando la predisposizione a malattie nell'adulto (Fleming et al, 2004).

I pochi studi sullo sviluppo embrionale riguardano gli embrioni di zebrafish e di topo.

Per quanto riguarda zebrafish, esperimenti condotti da Lee et al, (2012) hanno dimostrato effetti tossici taglia e dose dipendente delle NPs di argento sullo sviluppo embrionale. Mortalità e malformazioni morfologiche si riscontrano infatti alle dosi più elevate e all'utilizzo di NPs di dimensioni maggiori. Tali mortalità ed malformazioni morfologiche dose dipendenti associate all'esposizione a NPs di argento sono state rilevate in studi di Asharani et al (2011) , dove le NPs provocano anomalie cardiache, difetti circolatori ed assenza o malformazioni agli occhi. Tali effetti non sono invece

stati riscontrati in seguito all'esposizione di embrioni di zebrafish con NPs di oro (Asharani et al, 2011). Alterazioni della schiusa, difetti cardiovascolari e alterazioni del nuoto sono invece gli effetti negativi dovuti all'esposizione continua di embrioni di zebrafish a quantum dots (Zhang et al, 2012). Anche le NPs biocompatibili come quelle di chitosano sono responsabili di numerosi danni allo sviluppo embrionale: esse provocano una riduzione del tasso di schiusa ed un incremento della mortalità dose dipendente, oltre che malformazioni alla spina dorsale ed edema pericardico. Inoltre in embrioni di zebrafish esposti a tali NPs si osserva un numero elevato di cellule morte, un' overespressione di specie reattive dell'ossigeno e della heat shock protein 70, indicando quindi che tali NPs provocano uno stress fisiologico (Hu et al, 2011). Anche il comportamento larvale sembra essere influenzato dall'esposizione alle NPs. Tale comportamento persiste nell'adulto ed è associato all'esposizione a NPs di oro coniugate a differenti gruppi funzionali con differente carica (Truong et al, 2012)

Per quanto riguarda il topo, studi condotti in vitro su embrioni allo stadio di blastocisti hanno dimostrato che l'esposizione a NPs di argento induce un decremento del numero totale di cellule ed un aumento della percentuale di cellule apoptotiche delle blastocisti. Inoltre dopo aver trasferito in vivo le blastocisti trattate, si osserva una riduzione dei tassi di impianto ed una diminuzione del peso fetale, indicando che il trattamento in vitro con NPs altera lo sviluppo post-impianto (Li et al, 2010). Studi in vivo effettuati esponendo femmine di topo gravide a NPs hanno dimostrato che esse sono in grado di provocare malformazioni fetali, come difetti vascolari, e di indurre stress ossidativo. Infatti un aumento delle specie reattive dell'ossigeno è stato riscontrato sia nei feti malformati che nella placenta di questi (Pietroiusti et al, 2011)

Alla luce di quanto appena esposto è possibile dedurre quindi che lo sviluppo embrionale rappresenta un sensibile e predittivo saggio di valutazione della tossicità delle NPs, prima di un loro utilizzo in biomedicina.

## **4.5 EFFETTI DELLE NANOPARTICELLE INGEGNERIZZATE SULL'AMBIENTE**

Oltre ad incidere negativamente sulla salute umana, le NPs ingegnerizzate possono avere effetti tossici anche per l'ambiente. L'ambiente, infatti, può essere esposto a NPs durante tutti gli stadi del loro ciclo vitale, ad esempio durante la produzione, il trasporto e lo stoccaggio, durante l' utilizzo e lo smaltimento. A ciò bisogna poi aggiungere che molte NPs sono utilizzate per scopi ambientali, ad esempio per le bonifiche, per la costruzioni di filtri per il trattamento dell'acqua e per inibire la crescita di alghe nei sistemi acquatici (Biswas and Wu, 2005).

Nell'ambiente, le NPs possono essere rilasciate nell'aria, nell'acqua e nel suolo, ciò fa sì che esse entrino in contatto con diversi organismi sia acquatici che terrestri. Molti studi sperimentali mostrano che le NP ingegnerizzate disperse nell'ambiente possono avere effetti tossici sugli organismi ambientali (Moore, 2006; Friedrichs and Sculte, 2006, Navarro et al, 2008; Handy et al, 2008; Baun et al, 2008). In tal modo le NPs accumulate nelle diverse specie animali e vegetali possono influenzare l'intera catena alimentare e giungere così anche all'uomo (Radhika Rajasree et al, 2010) Generalmente però questi studi sono stati effettuati in condizioni di laboratorio spinte, a concentrazioni di NPs molto superiori a quelle effettivamente previste, in base alle produzioni attuali di NPs dalle nanotecnologie. Motivo per cui, Boxall (2007) ritiene che il rischio ambientale delle NPs ingegnerizzate in condizioni effettive, non di laboratorio, sia da ritenere minimo. A tal proposito sono necessari ulteriori studi per valutare la tossicità delle NPs alle effettive concentrazioni.

Dagli studi finora effettuati emerge che la tossicità ambientale delle NPs dipende da una serie di fattori, quali la concentrazione, le caratteristiche chimico-fisiche, la tendenza a formare aggregati, oppure ad interagire con composti organici naturali rilasciati da piante, alghe e funghi (proteine, polisaccaridi, acidi nucleici) (Navarro et al, 2008). L'interazione con questi composti comporta alterazioni delle proprietà superficiali delle NPs, che a loro volta influenzano la tendenza a formare aggregati e la deposizione di queste.

Anche l'ambiente è però in grado di influenzare le NPs, che in esso si disperdono. Infatti, una volta immerse nell'ambiente, le NPs, mediante processi biologici, possono o essere degradate oppure possono subire modificazioni delle loro caratteristiche chimico-fisiche (EPA, [www.epa.gov](http://www.epa.gov)). Naturalmente la biodegradazione è fortemente dipendente

dalle caratteristiche del materiale (Filley et al, 2005). Le modificazioni delle caratteristiche delle NPs riguardano principalmente le NPs metalliche (rame, silicio, zinco) che sono trasformate in ossidi, i quali possono essere molto più tossici del corrispondente metallo libero (EPA, [www.epa.gov](http://www.epa.gov)).

### *NPS NELL'ARIA*

Il destino delle NPs nell'aria dipende da tre fattori: il tempo di persistenza delle NPs nell'aria, l'interazione con altre particelle o molecole presenti in atmosfera e la distanza che queste riescono a percorrere nell'aria (Aitken et al, 2009). I processi fondamentali da considerare per le NPs disperse in atmosfera sono la diffusione, la tendenza a formare agglomerati e la forza gravitazionale. Questi sono gli stessi processi che vengono considerati per lo studio del particolato ultrafine (Wiesner et al, 2006).

Per quanto riguarda il tempo di persistenza delle NPs nell'aria, è necessario considerare che queste seguono le leggi della diffusione dei gas. La loro diffusione è inversamente proporzionale al diametro, ciò comporta quindi che NPs con diametro minore hanno un tempo di persistenza maggiore nell'atmosfera, al contrario invece NPs con diametro maggiore tendono a sedimentare sotto la forza di gravità. La tendenza di NPs di piccole dimensioni a formare aggregati di dimensioni maggiori può facilitarne la sedimentazione (Dennekamp et al, 2002). La sedimentazione delle NPs fa sì che esse si depositino nelle acque e sul suolo, cosa che comporta l'interazione con gli ecosistemi acquatici e terrestri.

Le NPs ingegnerizzate rilasciate nell'aria possono inoltre interagire con particelle già presenti nell'aria (contaminanti ambientali), interazione che può alterare la tossicità di entrambe, incrementandola o diminuendola (Navarro et al, 2008).

### *NPS NELL'ACQUA*

Diversi fattori determinano il destino delle NPs nell'acqua: la solubilità, la reattività con altre sostanze e l'interazione con alcuni processi biologici (EPA, [www.epa.gov](http://www.epa.gov)). Nelle acque, le NPs possono o meno essere soggette a degradazione biotica o abiotica, che ne consente l'eliminazione. I processi abiotici di degradazione delle NPs sono l'idrolisi e la fotocatalisi (Colvin, 2003). La fotocatalisi riguarda le NPs che si trovano sul pelo dell'acqua e che quindi sono esposte alla luce solare. Se da un lato questo processo

consente di rimuovere alcuni tipi di NPs, dall'altro lato può anche cambiare le proprietà chimiche di altre NPs (Colvin, 2003). Al contrario di quanto appena esposto, alcune NPs insolubili possono essere stabilizzate negli ambienti acquatici. Hoon et al (2007) ha dimostrato che nanotubi di carbonio in presenza di composti organici naturali sono stabili in acqua per un mese. La stessa cosa vale anche per i fullereni che in acqua sono insolubili ma se formano aggregati possono permanere negli ambienti acquatici per lunghi periodi (EPA, [www.epa.gov](http://www.epa.gov)). Anche i rivestimenti delle NPs (*coatings*) con composti organici ed inorganici, come il citrato, la cisteina, il sodio-dodecilsolfato, che influenzano la carica superficiale delle NPs, possono agire nella stabilizzazione delle NPs in sospensioni acquose (Mafune et al, 2000).

Il trasporto invece delle NPs nell'acqua dipende dagli acidi umici, che possono interagire con esse e trasportarle per lunghe distanze (Moore, 2006).

Allo stato attuale gli studi di tossicità delle NPs negli ambienti acquatici riguardano il fitoplankton, le alghe e i pesci.

Per quanto riguarda il fitoplankton, le NPs inducono una inibizione dei tassi di crescita, del fotosistema II e del contenuto di clorofilla a (Miao et al, 2007). Ciò si ripercuote sull'intera catena alimentare; in quanto il fitoplankton risulta alla base di questa catena e si occupa di sintetizzare sostanze organiche a partire da sostanze inorganiche, utilizzando la radiazione solare. Per i test ecotossicologici spesso viene utilizzato un invertebrato, si tratta di un crostaceo planctonico, *Daphnia magna*, in quanto particolarmente sensibile alle NPs. NPs a base di carbonio o di ossido di titanio alterano il nuoto di questo crostaceo e ne inducono la morte. Questo effetto sulla vitalità è però influenzato dai metodi di preparazione delle NPs (Lovern and Klaper, 2006). L'influenza dei metodi di preparazione delle NPs sulla riduzione della vitalità è stata anche riscontrata in molti invertebrati marini (Radhika Rajasree et al, 2010). Effetti sulla capacità riproduttiva, sono stati riscontrati in seguito all'esposizione di *Daphnia magna* a fullereni (Oberdorster et al, 2006)

Le NPs vengono internalizzate dalle alghe attraverso le pareti cellulari, che sono semipermeabili, consentendo il passaggio solo di particelle di piccola taglia. L'internalizzazione delle NPs nelle alghe comporta un aumento del peso di queste, che induce le alghe a sedimentare, cosa che riduce notevolmente la disponibilità di luce per effettuare la fotosintesi. Ciò comporta dunque la riduzione della biomassa disponibile per le specie acquatiche (Huang et al, 2005). Inoltre le NPs possono anche alterare la crescita delle alghe (Hund-Rinke and Simon, 2006)

L'assorbimento delle NPs dalle specie acquatiche avviene attraverso le branchie o attraverso le superfici epiteliali esterne (Bevim et al, 2012). Una volta assorbite le Nps sono in grado di distribuirsi nel sangue e da qui poi nel cervello, nel fegato e nei testicoli (Kashiwada, 2006) A livello di questi organi, l'internalizzazione cellulare delle NPs avviene principalmente mediante endocitosi (Bevim et al, 2012). Il principale meccanismo attraverso il quale si manifestano gli effetti tossici delle NPs sui pesci sembra essere lo stress ossidativo. Ciò è stato dimostrato in zebrafish da Usenko et al (2008); dal cui studio si è evinto che fullereni alterano l'espressione di geni coinvolti nella risposta allo stress. In aggiunta, ciò induce un alterazione dei geni coinvolti nello sviluppo, nel ciclo cellulare (inclusi quelli dell'apoptosi) e nella trasduzione del segnale. Lo stress ossidativo è inoltre la causa di danni al DNA in medaka (Chae et al, 2009) e di perossidazione lipidica a livello cerebrale nella spigola (Oberdorster, 2004) L'esposizione a NPs nell'acqua inoltre influisce lo sviluppo larvale di zebrafish, diminuendo la schiusa e la sopravvivenza, causando danni tissutali ed edema pericardico. Questi effetti dipendono dalla composizione delle NPs e sono correlati allo stress ossidativo; infatti il trattamento con sostanze antiossidanti mitiga tali effetti (Zhu et al, 2007 e 2008).

Oltre alla composizione anche la dose e la tendenza a formare aggregati possono inoltre influenzare la nanotossicità. Nps di argento sono in grado di causare anomalie e mortalità dose-dipendente in zebrafish (Lee et al, 2007) mentre aggregati di nanotubi provocano una riduzione dei tassi di schiusa di questo pesce, correlata ad ipossia dovuta al fatto che i nanotubi ostacolano l'uptake di ossigeno (Cheng et al, 2007). La tossicità dei nanotubi è stata anche riscontrata nell'anfibio *Xenopus Laevis*, in quanto essi bloccano il tratto respiratorio ed intestinale (Mouchet et al, 2008).

### *NPS NEL SUOLO*

Il comportamento delle NPs nel suolo è altamente variabile e dipende dalle loro caratteristiche chimico-fisiche. Alcune NPs possono interagire con particelle del suolo e diventare completamente inerti ed immobili (EPA, [www.epa.gov](http://www.epa.gov)), altre invece che non hanno interagito con le componenti del suolo possono penetrare facilmente in esso, grazie alla loro taglia ridotta, attraverso i pori ed interagire con le radici delle piante e con le ife funginee. Anche le caratteristiche del suolo come ad esempio i pori, la

composizione e le differenze di cariche elettriche, possono influenzare la mobilità delle NPs e la tendenza a formare aggregati negli ambienti terrestri.

Così come negli ambienti marini, anche nel suolo, le NPs più esposte in superficie possono essere soggette a fenomeni di fotocatalisi (Colvin, 2003)

Gli studi riguardanti gli effetti ecotossicologici delle NPs ingegnerizzate sono effettuati su batteri, funghi, piante e lombrichi. Ancora non sono disponibili dati riguardanti la tossicità delle NPs sugli animali terrestri, il cui assorbimento dovrebbe avvenire principalmente attraverso l'inalazione e l'ingestione.

Le NPs mostrano un'azione antifunginea e antibatterica, ciò non solo altera notevolmente la simbiosi che coinvolge funghi, batteri e piante ma incide anche sul ruolo protettivo dei funghi nei confronti delle piante contro i fitopatogeni e lo stress ossidativo (Navarro et al, 2008). Gli effetti avversi delle NPs nei confronti dei funghi e dei batteri, oltre a ripercuotersi sulle piante, si ripercuotono anche sugli animali, in quanto funghi e batteri rappresentano gli alimenti di molti animali terrestri (Navarro et al, 2008). NPs, come i quantum dots, non provocano la morte dei batteri bensì si accumulano in essi, cosa che ne comporta il trasferimento attraverso la catena alimentare (Navarro et al, 2008).

L'assorbimento delle NPs da parte delle piante può riguardare sia le radici (Li et al, 2008; Hirschmüller et al, 2009) che le foglie (Smitha et al, 2012), questo perché le piante sono esposte sia alle NPs presenti nel suolo che a quelle presenti nell'aria. L'assorbimento dalle radici avviene attraverso le pareti cellulari, che sono permeabili solo a NPs di piccole dimensioni. Diverse NPs, come i nanotubi e quelle di alluminio, inibiscono la crescita delle radici (Canas et al, 2008; Yang et al, 2005). L'internalizzazione delle NPs nelle cellule della radice comporta l'interazione di queste con diversi organelli cellulari (reticolo endoplasmatico e Golgi) e l'alterazione di vari processi metabolici, dovuta alla produzione di specie reattive dell'ossigeno (Navarro et al, 2008).

L'assorbimento delle NPs dalle foglie dipende dall'area fogliare ed avviene attraverso gli stomi. L'accumulo di NPs nei tessuti stomali altera gli scambi gassosi, provocando un riscaldamento fogliare (Smitha et al, 2012; Da Silva et al, 2006). Inoltre la deposizione delle NPs a livello fogliare riduce la capacità delle foglie di captare la luce solare e quindi di effettuare la fotosintesi.

Gli studi nanotossicologici delle NPs nei lombrichi riguardano *Eisenia veneta* e *Caenorhabditis elegans*. L'ingestione di nanotubi in *Eisenia veneta* provoca effetti sulla

sua capacità riproduttiva. Questi effetti sono stati riscontrati anche in *Caenorhabditis elegans*, utilizzando diversi tipi di NPs, le quali sono in grado anche di influenzare la crescita di questo nematode (Wang et al, 2009). Gli effetti sulla capacità riproduttiva nel caso di NPs di alluminio sono da attribuire allo stress ossidativo (Roh et al, 2009).

L'alterazione della riproduzione di questi nematodi, che giocano un ruolo chiave nella catena trofica, può in tal modo rappresentare un rischio da evitare in quanto comporta un sbilancio ecologico (Scott-Fordsmand et al, 2008).

**CAPITOLO 5**  
**NANOTECNOLOGIA ED ETICA**

## 5.1 IMPLICAZIONI ETICHE DELLA NANOTECNOLOGIA

Lo sviluppo crescente della nanotecnologia e le sue notevoli applicazioni nei settori più disparati, a partire da quello elettronico, alimentare, cosmetico, dell'abbigliamento fino ad arrivare a quello biomedico, hanno suscitato negli ultimi anni notevoli questioni etiche. Tali implicazioni etiche sono da attribuire al fatto che alcuni materiali a base di NPs sono prodotti in massa e già disponibili in commercio, basti pensare ai cosmetici, alle creme solari, ai disinfettanti, e, nel campo biomedico, alle valvole cardiache, agli impianti e alle protesi dentarie (Sudarenikov, 2012; Spagnolo and Daloiso, 2009).

Il principale problema etico dell'utilizzo delle NPs riguarda il rapporto rischi- benefici. E' infatti noto che se da un lato le proprietà dei nanomateriali risultano essere estremamente promettenti per i numerosi benefici, ad esempio nel caso della nanomedicina la diagnosi e la terapia di varie malattie, dall'altro lato essi non sono esenti dai rischi, che riguardano sia la salute umana che l'ambiente, e che allo stato attuale non sono del tutto conosciuti (Sudarenikov, 2012, Aala et al, 2008, Berger, 2008). Proprio per questo motivo è necessario valutare i rischi che i nanomateriali comportano per la salute dei produttori, dei consumatori, dei pazienti e per l'ambiente ed ottenere così un giusto equilibrio tra benefici e rischi. Il diritto alla salute umana e il rispetto per l'ambiente devono essere le priorità fondamentali nell'ambito nanotecnologico. Ciò prevede dunque di agire in base al principio di precauzione, il quale consente uno sviluppo sostenibile, etico e sicuro della nanotecnologia, evitando di arrecare danni a persone, animali e piante. Questo è quanto previsto dal codice di condotta della Commissione Europea per la ricerca responsabile nell'ambito della nanoscienza e della nanotecnologia (Commissione delle Comunità Europee, 2008). Il principio di precauzione consente quindi di prevederne gli impatti sulla salute e sull'ambiente e di prendere le dovute precauzioni affinché tali effetti avversi non si manifestino. L'obiettivo prioritario di questo codice di condotta è proprio quello di favorire i benefici ambientali e sociali.

Il codice di condotta prevede che le attività di ricerca nel campo delle nanoscienze e delle nanotecnologie, favorendo il benessere della società e dell'ambiente e limitandone i rischi, debbano essere comprensibili al pubblico e debbano essere svolte con i migliori standard scientifici possibili, includendo le buone pratiche di laboratorio; e che la governance di queste attività debba essere guidata dai principi di apertura a tutte le parti in causa (finanziatori della ricerca, ricercatori, soggetti ed organizzazioni che si

interessano o partecipano alla ricerca), di trasparenza e di rispetto del diritto legittimo di accesso all'informazione. Infatti essa dovrebbe consentire la partecipazione ai processi decisionali di tutte le parti in causa che partecipano o hanno un interesse nelle attività di ricerca nel campo delle nanoscienze e delle nanotecnologie (Commissione delle Comunità Europee, 2008).

Altro principio previsto dal codice di condotta della Commissione Europea è quello della responsabilità, secondo cui i ricercatori e gli enti di ricerca debbano essere responsabili degli eventuali impatti ambientali, sociali ed umani delle loro ricerche (Commissione delle Comunità Europee, 2008).

Per uno sviluppo responsabile della nanotecnologia non sono solo necessari la comunicazione e il dibattito tra le diverse parti coinvolte nell'attività di ricerca, ma è anche necessario divulgare i risultati ottenuti da queste ricerche al pubblico, fornendo informazioni ad esempio ai consumatori oppure, nel caso della nanomedicina, ai pazienti. L'informazione ai consumatori può essere fornita attraverso un'adeguata etichettatura dei prodotti in commercio. Tale etichettatura consente al consumatore di essere a conoscenza della presenza di NPs nel prodotto. Dal momento che non sono ancora del tutto noti i rischi per la salute, l'etichettatura non solo rende il consumatore consapevole della composizione del prodotto, che quindi può scegliere di acquistarlo e/o utilizzarlo, ma sottrae da qualunque responsabilità il produttore. L'etichettatura in tal modo mette in pratica il principio di precauzione, cosicché solo il consumatore risulta responsabile di un eventuale danno indotto dal nanomateriale (Sudarenskov, 2012). Attualmente l'etichettatura riguarda principalmente i prodotti alimentari e cosmetici (Commissione Europea, 2012; FDA, [www.fda.gov](http://www.fda.gov))

La nanotecnologia, nel campo biomedico, pone un grande questione bioetica che è quello del consenso informato. Tramite questo consenso, è possibile fornire l'informazione al paziente sui benefici ed i rischi in seguito all'utilizzo delle NPs per una diagnosi o per una terapia. In tal modo il paziente è consapevole degli eventuali rischi che potrebbe incorrere in caso di trattamento con prodotti a base di NPs. Il consenso informato come nel caso dell'etichettatura sottrae da ogni responsabilità il medico. Allo stato attuale però, non è facile richiedere o fornire il consenso informato a causa delle enormi lacune che vi sono circa i rischi connessi all'applicazione biomedica delle NPs (Sudarenskov, 2012).

Il progresso nanotecnologico nei paesi ricchi e sviluppati pone un grande problema etico che è quello della nano-povertà. La continua espansione della nanotecnologia potrebbe

accentuare il divario tra paesi ricchi e sviluppati e quelli poveri ed in via di sviluppo. In tal modo i benefici della nanotecnologia potrebbero riguardare solo i paesi industrializzati emarginando ulteriormente quelli sottosviluppati. Molti ritengono però che investimenti nel campo della nanotecnologia nei paesi poco sviluppati potrebbero ridurre questo divario ed essere economicamente vantaggiosi (Aala et al, 2008, Comitato Nazionale per la Bioetica, 2006).

Molte sono poi le questione bioetiche che scaturiscono dalle applicazioni biomediche delle NPs (Resnik DB and Tinkle SS, 2007). In particolare le implicazioni etiche sono diverse a seconda se si tratta di nanomedicina diagnostica (tecniche di bioimaging) o nanomedicina terapeutica (gene therapy, drug delivery, ingegneria tissutale) (Bawa and Summer, 2007).

La nanomedicina diagnostica se da un lato offre numerosi vantaggi perché individua mediante tecniche di bioimaging alterazioni cellulari, come una mutazione genetica, dall'altro lato induce a rivedere e riconsiderare il significato di malattia. Molte sono le domande infatti che pone la medicina diagnostica, come ad esempio: la presenza in una cellula di una mutazione genetica, conosciuta essere responsabile di una malattia, può essere una diagnosi o è un semplice fattore di rischio? Quante cellule devono presentare tale mutazione per diagnosticare una malattia? A tali domande è difficile dare una risposta, al punto che nessuno sa come definire, diagnosticare o individuare una malattia, basandosi sull'utilizzo di un sistema estremamente sensibile come quello delle NPs. La malattia potrebbe essere individuata in questo modo, ma è importante non dimenticare che le tecnologie diagnostiche richiedono di rivedere il significato di malattia (Bawa and Summer, 2007).

Lo sviluppo della nanomedicina diagnostica potrebbe portare in futuro alla creazione di dispositivi (chip) in grado di monitorare e collezionare una grande quantità di dati del paziente riguardanti le attività cellulari e gli eventi biochimici all'interno di organi, tessuti o singole cellule (*lab on a chip technology*). Questa grande quantità di informazioni potrebbe essere trasmessa ad un sistema medico elettronico in grado di registrarla. In tal modo se da un lato sarà possibile un continuo controllo della salute del paziente, dall'altro lato ci sarà il problema della gestione di questa grande quantità di informazioni e della riservatezza di queste, in modo tale da non violare la privacy del paziente (Comitato Nazionale per la Bioetica, 2006, Visciano, 2011). Molti sostengono inoltre che l'utilizzo di questi chip in futuro potrebbe più che riguardare le applicazioni biomediche, servire per monitorare ogni momento della vita umana. Si tratta di uno

scenario avveniristico ma tecnologicamente possibile (Comitato Nazionale per la Bioetica, 2006).

La nanomedicina terapeutica pone un grande problema etico che è quello di utilizzare le NPs, ad esempio nel drug delivery, nella gene therapy e nell'ingegneria tissutale, non per curare una malattia ma semplicemente per un miglioramento illecito delle prestazioni del corpo. La medicina terapeutica quindi deve essere usata esclusivamente per migliorare la qualità di vita del paziente e non per un miglioramento non terapeutico degli esseri umani (Bawa and Summer, 2007; Visciano, 2011).

Un problema etico riguardante l'ingegneria tissutale è quello dell'origine delle cellule da coltivare sul nanomateriale usato come scaffold per la rigenerazione e/ riparazione di tessuti danneggiati. Le cellule potrebbero essere prelevate da un tessuto donatore ed in tal caso è necessario il consenso informato oppure potrebbero essere di origine embrionale e ciò prevederebbe la distruzione degli embrioni (Spagnolo and Daloiso, 2009).

Da quanto appena esposto ne consegue la necessità di protocolli standard di valutazione del rischio, che potrebbero essere messi in atto dopo aver effettuato una completa caratterizzazione delle proprietà chimico-fisiche delle NPs, e di regolamentazioni internazionali sulla progettazione, sull'utilizzo e in particolare sulla valutazione tossicologica di tali NPs. Queste regolamentazioni dovrebbero tener conto degli aspetti etici e sociali delle nanotecnologie e dovrebbero stabilire se o meno queste tecnologie innovative possano rappresentare un bene per esseri umani e per l'ambiente, riducendone al minimo i rischi. In questo modo la regolamentazione potrà assicurare uno sviluppo nanotecnologico responsabile, che tenga conto sia dei benefici che dei rischi. Per mettere in pratica ciò sarebbe dunque necessario un approccio proattivo alla gestione del rischio, una eventuale revisione delle legislazioni esistenti e la cooperazione e il coordinamento tra i vari organismi pubblici, industria e ricerca a livello internazionale. Tutto ciò va completato con una informazione ed un dialogo con il pubblico corrette ed affidabili, che rassicurino e prevengano l'insorgere di pregiudizi.

Allo stato attuale non esiste una regolamentazione internazionale per la nanotecnologia. A tal riguardo diversi paesi stanno applicando, revisionando ed implementando le attuali regolamentazioni. Ad esempio nella "Communication on the Second Regulatory Review on Nanomaterials" del 3 ottobre 2012, la Commissione Europea afferma che per regolamentare i nanomateriali ed i rischi ad essi associati relativi alla salute, alla sicurezza e all'ambiente, possono essere utilizzati gli attuali decreti legislativi

riguardanti i prodotti chimici, la protezione dei lavoratori e la tutela dell'ambiente. In tal modo i rischi connessi all'utilizzo dei nanomateriali possono ritenersi affrontati nell'ambito del quadro normativo europeo vigente. Però oltre ad un'applicazione corretta della normativa esistente, sono necessarie anche revisioni e modifiche che ne consentono di estenderne l'applicazione ai nanomateriali. Al fine di elaborare, modificare e soprattutto applicare in maniera efficace la legislazione, secondo la Commissione Europea occorre migliorare la base delle conoscenze scientifiche, soprattutto per quanto riguarda la valutazione dei rischi, che dovrebbe essere effettuata caso per caso (Commissione Europea, 2012).

## **DISCUSSIONE**

Negli ultimi anni la comunità scientifica ha mostrato particolare interesse per le nanotecnologie. Si tratta di un insieme di tecnologie, tecniche e processi che, basandosi sulla manipolazione della materia su scala atomica e molecolare, prevedono la creazione e utilizzazione di materiali, dispositivi e sistemi con dimensioni di livello nanometrico, i così detti nanoprodotti (Royal Society & The Royal Academy of Engineering, 2004). Questi sono costituiti da particelle di dimensioni comprese tra 1 e 100nm, definite con il nome di nanoparticelle (NPs) (American Society for Testing and Materials, 2006). Le prospettive rivoluzionarie associate alla nanotecnologie derivano dal fatto che, a queste dimensioni ridotte, comportamenti e caratteristiche della materia cambiano drasticamente rispetto a dimensioni maggiori, in tal modo le nanotecnologie rappresentano un modo radicalmente nuovo di produzione di materiali, strutture e dispositivi con proprietà e funzionalità notevolmente migliorate o del tutto nuove (National Nanotechnology Initiative , 2006). Proprio per questi motivi, le applicazioni delle nanotecnologie sono potenzialmente infinite e rivolte praticamente a tutti i settori produttivi. Ciò fa sì che esse possano contribuire in maniera decisiva alla promozione di uno sviluppo sostenibile. In tal modo, le nanotecnologie rappresentano i principali promotori del progresso tecnologico del XXI secolo, in grado di influenzare tutti i settori produttivi e la stessa vita quotidiana. Infatti, numerosi sono i prodotti derivanti da queste tecnologie innovative, alcuni già disponibili sul mercato, altri in procinto di esserlo. Il loro numero è in costante crescita ed è stato stimato che finora sono stati realizzati 1628 prodotti nanotecnologici impiegati nei settori più disparati (The Project on Emerging Nanotechnologies Consumer Products Inventory, 2013). Tra i settori produttivi in cui trovano impiego le NPs si possono annoverare: il settore della salute e fitness, elettrodomestico, automobilistico, elettronico ed informatico, alimentare ecc. (The Project on Emerging Nanotechnologies Consumer Products Inventory, 2013). NPs ad esempio possono essere impiegate per la realizzazione di cosmetici, creme solari, abbigliamento sportivo, frigoriferi, lavatrici, vernici e catalizzatori per auto, hard-disk e display per computer, attrezzi da cucina e contenitori per cibi e bevande ecc.. (The Project on Emerging Nanotechnologies Consumer Products Inventory, 2013). Il settore allo stato attuale più sviluppato e che annovera ben 788 nanoprodotti è quello della salute e del fitness, nel quale rientrano anche i prodotti per la cura della salute (The Project on Emerging Nanotechnologies Consumer Products Inventory, 2013). Tra quest'ultimi si possono annoverare NPs utilizzabili nel drug delivery e nella gene therapy rispettivamente per il trasporto selettivo, mediante targeting cellula-specifico, di

farmaci e di oligonucleotidi (Yoo et al, 2000; Moghimi et al., 2001; Panyam and Labhasetwar, 2012), NPs nell'ingegneria tissutale per la costruzione di scaffold ossia di supporti tridimensionali utili per la rigenerazione di tessuti danneggiati (Ungaro et al, 2005; Orlova et al, 2011) ed infine NPs per la diagnostica, utilizzate come mezzi di contrasto per migliorare tecniche di imaging, quali la risonanza magnetica nucleare (Pozzi Mucelli, 2004). Ciò ha permesso lo sviluppo di una medicina letteralmente rivoluzionata, la così detta nanomedicina, che si basa sull'utilizzo di strumenti diagnostici più efficaci e sistemi di cura innovativi, che possono incrementare lo sviluppo di terapie personalizzate. In tal modo le applicazioni delle NPs in nanomedicina hanno un impatto notevole non solo dal punto di vista economico ma anche e soprattutto dal punto di vista sociale. L'impiego delle NPs nel campo biomedico è da attribuire alle ridotte dimensioni, che fanno sì che esse possano interagire con le entità biologiche. Infatti, la loro taglia nanometrica le consente di penetrare profondamente nei tessuti attraverso i fini capillari, attraversare la fenestrazione presente nel rivestimento endoteliale ed essere catturate efficientemente dalle cellule (Vinogradov et al., 2002). Naturalmente l'interazione e l'ingresso delle NPs nelle cellule e nei compartimenti sub-cellulari dipende dalle loro proprietà specifiche, come la taglia, la forma, la carica, proprietà che è necessario controllare e modificare opportunamente per un loro impiego nelle applicazioni terapeutiche (Petros and De Simone, 2010).

Lo sviluppo esponenziale delle nanotecnologie nei settori più disparati e le loro molteplici applicazioni hanno aumentato però i timori sui possibili rischi associati al loro impiego. Ciò ha portato allo sviluppo di una nuova disciplina che prende il nome di nanotossicologia, il cui obiettivo è la valutazione dei potenziali effetti tossici delle NPs frutto della nanotecnologia, denominate anche ingegnerizzate o antropogeniche intenzionali, per la salute umana e per l'ambiente (Donaldson et al, 2004; Lewinski et al, 2008). Al fine di elaborare strategie per la definizione del rischio per la salute e per l'ambiente, diversi paesi hanno istituito comitati ed agenzie. Tra questi si possono annoverare l' Environmental Protection Agency (USA), la "Food and Drug Administration" (USA) e il "Scientific Committee on Emerging and Newly Identified Health Risks" (SCENIHR- Europa) (EPA 2007; FDA 2006, 2008; SCENIHR 2007, 2009). Ed è proprio nell'ambito degli studi nanotossicologici che si è inserita quest'attività di dottorato, la quale ha focalizzato la propria attenzione sugli aspetti biologici e bioetici degli effetti delle NPs sulla salute umana e sull'ambiente.

E' infatti noto che le stesse innovative caratteristiche chimico-fisiche delle NPs (area superficiale, reattività superficiale, stato di aggregazione/agglomerazione, composizione, carica superficiale, solubilità, forma e porosità), che rendono queste estremamente vantaggiose per le applicazioni nanotecnologiche e che sono attribuibili alle loro ridotte dimensioni (Maynard et al, 2011), possono essere causa di tossicità, comportando effetti biologici unici e del tutto nuovi (Nel et al, 2006). Questo è il motivo per cui risulta inappropriata la valutazione del rischio dei materiali in forma di NPs basandosi sui dati di tossicità riguardanti materiali con dimensioni maggiori. L'orientamento prevalente è dunque quello di considerare il materiale in forma di NPs come un materiale nuovo, ciò richiede quindi anche l'utilizzo di metodi di valutazione del rischio nuovi rispetto a quelli tradizionali, utilizzati per la valutazione del rischio dei materiali di dimensioni maggiori.

L'interesse della nanotossicologia nei confronti degli effetti negativi che le NPs ingegnerizzate potrebbero avere sull'uomo e sull'ambiente, scaturisce da precedenti studi riguardanti la tossicità di NPs, principalmente di biossido di zinco e di azoto, correlate all'inquinamento atmosferico. Si tratta di NPs che costituiscono il particolato ultrafine, denominato anche particulate matter 0,1 (PM 0,1), per le dimensioni inferiori a 0,1 $\mu$ m, e che sono sia di origine naturale, provenienti da esplosioni vulcaniche o da incendi, che di origine antropogenica non intenzionale, provenienti da sorgenti di combustione ad alta temperatura come inceneritori, fonderie, cementifici, gas di scarico delle automobili, riscaldamento domestico e fumo di sigarette (Guzman et al, 2006). Quest'ultime sono quelle maggiormente responsabili dell'inquinamento atmosferico nelle aree urbane (Cyrus et al, 2003). Diversi studi hanno riportato una correlazione tra gli elevati livelli di queste NPs nell'aria e patologie respiratorie e cardiovascolari (Dennekamp et al, 2002; Marconi et al, 2006). La principale via di esposizione di queste NPs è quella respiratoria. A livello respiratorio, esse inducono stress ossidativo e reazioni infiammatorie in grado di provocare patologie quali bronchiti, asma, tracheiti e addirittura cancro (Nel et al, 2006). Le altre vie di assorbimento delle NPs atmosferiche sono quella cutanea, mediante contatto diretto (Holsapple et al, 2005; Ryman-Rasmussen et al. 2007) e quella gastrointestinale, mediante ingestione di cibi o acqua contaminati (Lomer et al. 2002). Una volta assorbite a livello respiratorio, cutaneo e gastro-intestinale, le NPs atmosferiche possono giungere nella circolazione sistemica, provocando ad esempio alterazioni della coagulazione (Oberdörster et al, 2005) a cui seguono difetti di perfusione, episodi di ischemia e infarto del miocardio (Seaton et al,

1995), che possono in alcuni casi provocare anche la morte (Pope et al, 2004); per poi migrare successivamente in diversi organi e tessuti, come fegato, milza, sistema reticolo endoteliale (Akerman et al, 2002) ed anche nel sistema nervoso centrale (Oberdörster et al, 2005; Lockman et al, 2002), dove provocano processi flogistici, necrosi, apoptosi e lesioni istologiche, spesso correlati allo stress ossidativo (Oberdörster et al, 2005; Calderon- Garciduenas et al, 2002)

Secondo l' EPA, gli effetti ecotossicologici delle NPs atmosferiche possono essere suddivisi in due gruppi: effetti sulla visibilità e sul clima/microclima ed effetti sugli ecosistemi ([www.epa.gov](http://www.epa.gov)). Gli effetti sulla visibilità sono da attribuire al fatto che le NPs riflettono la luce solare, ciò ha come conseguenza un decremento della visibilità, che si osserva maggiormente nelle aree abitative ed industriali (Huang et al, 2009; Chang, 2009). L'effetto climatico è da attribuire al fatto che la riflessione della luce da parte delle NPs provoca un raffreddamento della superficie terrestre e dal fatto che queste favoriscono la formazione di nuvole, in quanto fungono da nuclei di condensazione. Il particolato ha effetti anche sul microclima urbano: infatti, nei centri urbani l'inquinamento dell'aria contribuisce all'effetto "isola di calore", inibendo la perdita di radiazioni ad onde lunghe durante la notte, facendo sì che le città siano più calde. La capacità delle NPs di favorire la formazione delle nubi non solo incrementa le precipitazioni ma anche l'acidificazione delle piogge, correlata all'emissione di solfati e nitrati. Le piogge acide hanno un impatto ambientale notevole, in quanto acidificano laghi e torrenti, modificano l'equilibrio dei nutrienti nelle acque costiere e nei bacini fluviali, incrementano la crescita di alghe, riducono i nutrienti nel suolo, inducono il rilascio di sostanze tossiche dal letto dei corsi d'acqua e dal suolo, ad esempio l'alluminio, provocano danni alle foreste e alle coltivazioni agricole. Ciò, se da un lato, si ripercuote sulla biodiversità degli ecosistemi sia acquatici che terrestri (Lovett et al, 2009), in quanto provoca alterazioni del peso, riduzione del numero e in alcuni casi estinzione delle specie ittiche (Jenkins et al, 2007), danni alle foglie, che possono comportare anche l'inibizione della fotosintesi, o danni alle radici, come inibizione della formazione di peli radicali o deformazione delle radici stesse (Yin et al, 2011); dall'altro lato si riflette sull'intera catena alimentare e quindi anche sulla salute umana: prodotti animali e vegetali contaminati da NPs atmosferiche rappresentano un pericolo per la salute dell'uomo. E' necessario inoltre sottolineare che l'entità ambientale dipende dalla concentrazione così come dalla composizione chimico-fisica delle NPs atmosferiche (Dietz and Herth, 2011).

Per quanto riguarda la salute umana, gli studi nanotossicologici delle NPs ingegnerizzate sono centrati a valutarne gli effetti sulla salute sia dei produttori che dei consumatori. La valutazione di questi effetti più che basarsi su studi epidemiologici, i quali mostrano diverse difficoltà nello stimare l'esposizione dei soggetti a rischio, si basa su studi effettuati in vitro o in vivo, su animali quali il topo. In particolar modo, essi si basano principalmente sulla valutazione dei rischi di nanomateriali già presenti o che saranno a breve immessi in commercio, quali nanotubi a parete singola o multipla, fullereni, NPs metalliche e quantum dot. Così come le NPs costituenti il particolato atmosferico, le vie di esposizione delle NPs ingegnerizzate sono tre: respiratoria, cutanea e gastrointestinale, e tra queste la maggiore via di esposizione è rappresentata da quella respiratoria, che riguarda principalmente i produttori nei processi di fabbricazione. A livello respiratorio, l'assorbimento delle NPs dipende dal fattore dimensionale di queste, in base al quale si depositano nelle diverse regioni polmonari (tracheobronchiale, extra-toracica ed alveolare). Studi condotti in vivo dimostrano come, a livello respiratorio, le NPs siano in grado di provocare la comparsa di un'importante risposta infiammatoria polmonare acuta, la formazione di lesioni granulomatose ed enfisematose, la deposizione di collagene con conseguente fibrosi interstiziale e induzione di un significativo stress ossidativo (Shvedova et al; 2008; Muller et al, 2005). Studi condotti in vitro su cellule polmonari dimostrato che le NPs sono in grado di provocare diminuzione della vitalità e proliferazione cellulare, nonché un incremento dello stress ossidativo (Shvedova et al 2007). Tale stress ossidativo è associato ad un'alterazione della catena mitocondriale respiratoria (Asharani et al, 2009), e sembra essere responsabile del meccanismo apoptotico (Park et al, 2008). La citotossicità evidenziata delle NPs a livello respiratorio è correlata alle caratteristiche chimico-fisiche delle NPs, come lo stato di aggregazione (Kobayashi et al, 2009), il grado di solubilizzazione e la carica superficiale (Sayes et al, 2004), oltre che alla dose e al tempo (Sayes et al, 2006).

L'assorbimento cutaneo delle NPs ingegnerizzate riguarda sia i produttori, che manipolano NPs durante i processi di fabbricazione, sia i consumatori, durante l'utilizzo di prodotti in commercio contenenti NPs. Poiché la cute rappresenta una barriera difficilmente superabile, dovuta all'impermeabilità dello stato superficiale di questa (epidermide), la penetrazione delle NPs a livello cutaneo è facilitata da lacerazioni presenti nella pelle danneggiata (Larese et al, 2009) oppure in seguito all'utilizzo di detergenti irritanti e sostanze chimiche. Anche se uno studio condotto da Rouse et al. (2007) ha dimostrato che le NPs sono in grado di penetrare nella cute intatta, in seguito a

movimenti di flessione. Finora l'effetto delle NPs a livello cutaneo sembra essere circoscritto solo all'epidermide, in quanto non vi sono ancora prove sperimentali che dimostrano che le NPs ingegnerizzate possano oltrepassare l'epidermide e raggiungere il derma sottostante. Molte sono le evidenze per diversi tipi di NPs circa l'effetto di tipo irritativo-infiammatorio (Kishore et al, 2009; Monteiro-Riviere et al., 2005; Witzmann and Monteiro-Riviere et al., 2006). Ad esempio, il contatto cutaneo giornaliero con nanotubi di carbonio è in grado di indurre flogosi cutanea caratterizzata da rash a carico del dorso delle mani, degli spazi interdigitali e del volto, nonché fenomeni di ipercheratosi, attribuiti all'attivazione della risposta infiammatoria e allo stress ossidativo (Chou et al, 2002). Tale risposta infiammatoria dose-dipendente associata allo stress ossidativo, ad alterazioni morfologiche ed una riduzione della vitalità, è stata riscontrata anche in studi in vitro in cheratinociti (Shevedova et al, 2003; Zhang et al, 2007). Questi effetti dipendono però dal grado di funzionalizzazione della NP (Sayes et al, 2006a). Effetti simili in cheratinociti e fibroblasti sono stati riscontrati anche per NPs di argento, utilizzate nel settore dell'abbigliamento (Paddle-Ledinek et al, 2006). Attualmente la maggior parte delle informazioni disponibili circa la tossicità cutanea delle NPs deriva dall'industria farmaceutica e riguarda le NPs di ossido di zinco e di biossido di titanio, usate per la formulazione di prodotti cosmetici come creme solari, detersivi e shampoo. In vitro esse mostrano effetti citotossici ed infiammatori (Sayes et al, 2006b; Yuan et al, 2010), associati a stress ossidativo e a danni al DNA (Uchino et al, 2002; Hidaka et al, 2006). Questi effetti non sono stati riscontrati dal gruppo di Dufour (2006). Sulla base di questi dati discordanti, un gruppo di ricercatori della L'Oreal (Nohynek et al., 2009) ha analizzato il rischio legato all'uso di NPs di ossido di zinco e biossido di titanio negli schermi per raggi ultravioletti UV, concludendo che le evidenze scientifiche suggeriscono come le NPs utilizzate oggi nelle formulazioni cosmetiche e negli schermi solari non presentino rischi per la cute o per la salute, mentre svolgono azione protettiva contro gli effetti negativi della radiazione UV, compreso il cancro.

L'assorbimento gastrointestinale delle NPs ingegnerizzate può avvenire mediante deglutizione del muco che incorpora e ripulisce le NPs depositate lungo il tratto respiratorio, nonché mediante assunzione di cibi ed acqua contaminati, o grazie all'uso di dentifrici e prodotti farmaceutici, ed infine, nel caso dei produttori, anche per contatto con mani e superfici contaminate (Lomer et al, 2002; Tiede et al, 2008). Per quanto riguarda l'assunzione delle NPs attraverso il cibo essa è connessa non solo al fatto che le NPs vengono impiegate ad esempio nell'industria alimentare per la fabbricazione di

contenitori e prodotti d'imballaggio, ma anche al fatto che le NPs ingegnerizzate sono disperse nell'ambiente, in tal modo captate dai diversi organismi animali e vegetali entrano nella catena alimentare, costituendo dei contaminanti involontari degli alimenti (Boxall et al, 2007). Attualmente pochi sono gli studi riguardanti le NPs assorbite a livello gastroenterico, che riguardano principalmente animali da laboratorio, come i ratti. Gli studi condotti sui ratti hanno dimostrato che le NPs possono essere assorbite attraverso le placche di Peyer del piccolo intestino (Gullberg et al, 2006) ma si suppone anche che le NPs possano essere assorbite dagli enterociti intestinali (Hillyer and Albrecht, 2001; Des Rieux et al, 2006). Tale assorbimento è influenzato dalle caratteristiche, quali carica e dimensione delle NPs (Jani et al, 1990; Florence, 1997; Hussain et al, 2001; Gaumet et al, 2009).

Dopo essere state assorbite a livello respiratorio, cutaneo e gastro-intestinale, le NPs ingegnerizzate possono giungere nel sangue per poi migrare in diversi organi ed apparati, quali rene, muscoli, milza e femore (Singh et al, 2006). Relativamente agli effetti a livello di organo e di apparato, la maggior parte degli studi presenti in letteratura ha preso in considerazione la tossicità sul sistema nervoso, cardiovascolare ed immunitario.

Le NPs, assorbite principalmente attraverso la via inalatoria, hanno la capacità di raggiungere il sistema nervoso centrale mediante il trasporto trans-sinaptico, attraverso le terminazioni nervose della mucosa nasale (nervo olfattivo e nervo trigemino) e tracheobronchiale (afferenze del nervo vago), e mediante captazione attraverso la barriera ematoencefalica, che avviene principalmente quando questa è danneggiata in caso di ipertensione o di encefalomielite. (Lai et al., 2000; Borm et al., 2006). Studi condotti in vivo hanno dimostrato che le NPs trasportate mediante il nervo olfattivo sono in grado di indurre stress ossidativo, che provoca perossidazione lipidica (Oberdorster et al, 2004), di attivare la risposta infiammatoria (Tin-Tin-Win-Shwe et al, 2006) e di indurre il rilascio di neurotrasmettitori nel fluido extracellulare (Tin-Tin-Win-Shwe et al, 2008). Le NPs veicolate dal sangue invece sono in grado di alterare le proprietà delle membrane delle cellule endoteliali e di distruggere le giunzioni occludenti (tight junctions) della barriera ematoencefalica. Effetti che sono correlati all'induzione di stress ossidativo (Chen et al, 2008) e che dipendono anche dalla composizione e dalle cariche superficiali delle NPs (Chen et al, 2008; Lockman, 2004). Tale stress ossidativo riscontrato sia in studi condotti in vivo che in vitro, ad esempio in cellule neuronali e gliali, provoca notevoli effetti neurotossici quali: riduzione della vitalità, apoptosi,

infiammazione, perdita di adesione e rallentamento della crescita cellulare, alterazioni delle membrane, incremento dei lisosomi e dilatazione del reticolo endoplasmatico ruvido (Li et al, 2009 ; Long et al, 2007; Au et al, 2007, Ma et al, 2010, Shimizu et al, 2009, Wang et al 2009). Tali effetti oltre a dipendere dal tipo di NP, dipendono anche dalle linee cellulari analizzate (Au et al, 2007; Lai et al, 2008).

Gli effetti riconosciuti delle NPs ingegnerizzate sul sistema cardiovascolare sono due: diretto ed indiretto. Nell'effetto diretto il danno cardiovascolare è attribuito alla capacità delle NPs di interagire direttamente con cellule, quali quelle endoteliali e le piastrine, e con proteine della coagulazione; mentre l'effetto indiretto è da attribuire alla biopersistenza delle NPs a livello polmonare, cosa che induce un processo infiammatorio cronico locale con rilascio di fattori infiammatori, che a loro volta causano un'infiammazione sistemica. La maggior parte degli studi nanotossicologici circa questi effetti è riferita ai nanotubi di carbonio, mediante i quali è stato possibile concludere che le NPs inducono ipercoagulabilità (Radomski et al, 2005), formazione di placche aterosclerotiche (Li et al, 2007), infiammazione sistemica (Salvador-Morales et al, 2006; Erdely et al, 2009), disfunzione/danno endoteliale (incluso il danno ossidativo) (Erdely et al, 2009; Li et al, 2007) ed alterazioni dell'attività cardiaca, come la frequenza cardiaca e la pressione arteriosa, regolate dal sistema nervoso autonomo (Legramante et al, 2009). La formazione di placche aterosclerotiche non è da sottovalutare in quanto nell'uomo è ormai certo che eventi ischemici, quali infarto del miocardio ed ictus, si determinano nel contesto di una malattia aterosclerotica, che può portare alla formazione di trombi, che causano occlusione dei vasi arteriosi. Inoltre non sono neanche da sottovalutare le alterazioni dell'attività cardiaca che sono responsabili di morte improvvise, nonché di recidive di infarto e di aritmie.

I dati relativi agli effetti immunologici indotti dalle NPs ingegnerizzate sono molto scarsi e riguardano principalmente studi in vivo. Due sono i meccanismi attraverso i quali le NPs possono indurre danni al sistema immunitario. Il primo meccanismo prevede che le NPs, una volta raggiunta la circolazione sistemica, interagiscano con le proteine circolanti o esposte sulla superficie cellulare, determinando l'esposizione di residui amminoacidici normalmente non esposti (epitopi) con la possibilità di una risposta autoimmunitaria (Labarre et al., 2005). Il secondo meccanismo invece prevede che le NPs interferiscano con i processi di opsonizzazione, responsabili dell'eliminazione di sostanza estranee al corpo, come microrganismi (Moghim and Patel, 1998). Tra i danni riscontrati a livello immunitario si possono annoverare alterazioni

della risposta immunitaria cellulo-mediata ad opera dei linfociti T (Mitchell et al, 2007) e della risposta immunitaria innata ad opera dei macrofagi (Shvedova et al; 2008), ciò rende dunque l'organismo incapace di combattere le infezioni. Il grado di funzionalizzazione delle NPs sembra essere responsabile degli effetti sul sistema immunitario (Dumortier et al, 2006).

Oltre ad incidere negativamente sulla salute umana, le NPs ingegnerizzate possono avere effetti tossici anche per l'ambiente. L'ambiente, infatti, può essere esposto a NPs durante tutti gli stadi del loro ciclo vitale, ad esempio durante la produzione, il trasporto e lo stoccaggio, durante l'utilizzo e lo smaltimento. A ciò bisogna poi aggiungere che molte NPs sono utilizzate per scopi ambientali, ad esempio per le bonifiche, per la costruzione di filtri per il trattamento dell'acqua e per inibire la crescita di alghe nei sistemi acquatici (Biswas and Wu, 2005). Nell'ambiente, le NPs possono essere rilasciate nell'aria, nell'acqua e nel suolo, ciò fa sì che esse entrino in contatto con diversi organismi, provocando notevoli danni sia alle specie acquatiche che terrestri (Moore, 2006; Friedrichs and Sculte, 2006, Navarro et al, 2008; Handy et al, 2008; Baun et al, 2008). In tal modo le NPs accumulate nelle diverse specie animali e vegetali possono influenzare l'intera catena alimentare e giungere così anche all'uomo (Radhika Rajasree et al, 2010). Dagli studi finora effettuati emerge che la tossicità ambientale delle NPs dipende da una serie di fattori, quali la concentrazione, le caratteristiche chimico-fisiche, la tendenza a formare aggregati, oppure ad interagire con composti organici naturali rilasciati da piante, alghe e funghi (proteine, polisaccaridi, acidi nucleici) (Navarro et al, 2008).

Allo stato attuale gli studi di tossicità delle NPs negli ambienti acquatici riguardano il fitoplancton, le alghe e i pesci, in particolare due noti modelli, zebrafish e medaka. Per quanto riguarda il fitoplancton, le NPs inducono una inibizione dei tassi di crescita, del fotosistema II e del contenuto di clorofilla A (Miao et al, 2007). Ciò si ripercuote sull'intera catena alimentare; in quanto il fitoplancton risulta alla base di questa catena e si occupa di sintetizzare sostanze organiche a partire da sostanze inorganiche, utilizzando la radiazione solare. Le NPs ingegnerizzate provocano alterazioni della crescita (Hund-Rinke and Simon, 2006) ed aumento del peso delle alghe, che ne induce la sedimentazione con conseguente riduzione dell'attività fotosintetica (Huang et al, 2005). Gli studi tossicologici condotti in zebrafish e medaka dimostrano che le NPs sono in grado di indurre stress ossidativo, che a sua volta provoca alterazioni dei geni coinvolti nello sviluppo, nel ciclo cellulare (inclusi quelli dell'apoptosi), nella trasduzione del segnale, (Usenko et al, 2008) e danni al DNA (Chae et al, 2009). Inoltre

in zebrafish lo stress ossidativo influisce sullo sviluppo larvale, diminuendo i tassi di schiusa e di sopravvivenza, causando danni tissutali ed edema pericardico. Tutti questi effetti dipendono dalla composizione delle NPs (Zhu et al, 2007 e 2008), dalla dose e dalla tendenza a formare aggregati (Lee et al, 2007; Cheng et al, 2007)

Gli studi riguardanti gli effetti ecotossicologici delle NPs ingegnerizzate negli ambienti terrestri sono effettuati su batteri, funghi, piante e lombrichi, come *Eisenia veneta* e *Caenorhabditis elegans*. Ancora non sono disponibili dati riguardanti la tossicità delle NPs sugli animali terrestri, il cui assorbimento dovrebbe avvenire principalmente attraverso l'inalazione e l'ingestione. Le NPs mostrano un'azione antifungina e antibatterica, ciò non solo altera notevolmente la simbiosi che coinvolge funghi, batteri e piante ma incide anche sul ruolo protettivo dei funghi nei confronti delle piante contro i fitopatogeni e lo stress ossidativo (Navarro et al, 2008). Gli effetti avversi delle NPs nei confronti dei funghi e dei batteri, oltre a ripercuotersi sulle piante, si ripercuotono anche sugli animali, in quanto funghi e batteri rappresentano gli alimenti di molti animali terrestri (Navarro et al, 2008). L'accumulo inoltre di NPs nei batteri ne comporta il trasferimento attraverso la catena alimentare (Navarro et al, 2008).

Per quanto riguarda le piante, le NPs inibiscono la crescita delle radici (Canas et al, 2008; Yang et al, 2005), riducono la capacità delle foglie di captare la luce solare e quindi di effettuare la fotosintesi ed alterano gli scambi gassosi, provocando un riscaldamento fogliare (Smitha et al, 2012; Da Silva et al, 2006).

Le NPs ingegnerizzate inoltre provocano nei lombrichi alterazioni della crescita e della capacità riproduttiva (Wang et al, 2009). Le alterazioni della capacità riproduttiva sono da attribuire allo stress ossidativo (Roh et al, 2009) e dal momento che questi giocano un ruolo chiave nella catena trofica, rappresentano un rischio da evitare in quanto comportano un sbilancio ecologico (Scott-Fordsmand et al, 2008).

Dal momento che NPs impiegate nei settori più disparati provocano effetti tossici sulla salute dei produttori e dei consumatori, negli ultimi anni la nanotossicologia sta focalizzando la sua attenzione anche sulla potenziale tossicità di NPs impiegate nelle applicazioni biomediche sulla salute umana. In tal modo la valutazione della tossicità di queste NPs ne può garantire la sicurezza prima della loro applicazione in campo biomedico, sia in campo diagnostico che terapeutico (El-Ansary and Al-Daihan, 2009; Chaloupka et al, 2010; Markides et al, 2012; Wahajuddin and Arora, 2012). Attualmente, i dati presenti in letteratura circa gli effetti di queste NPs sono controversi, tale discrepanza è da ricondurre alla differenti dosi utilizzate, alle diverse caratteristiche

chimico fisiche delle NPs impiegate, ai differenti sistemi biologici e alle differenti condizioni sperimentali usate (Choi and Wang, 2011; Markides et al, 2012). In tal modo, delineare un preciso profilo tossicologico delle NPs risulta alquanto difficile. La maggior parte dei dati circa la tossicità delle NPs biomediche deriva da linee cellulari somatiche, sia normali che tumorali (Asare et al, 2012; Mironava et al, 2013, Yang et al, 2013).

In generale, da studi effettuati su cellule somatiche si evince che le NPs utilizzate in nanomedicina inducono: aumento (Wahajuddin and Arora, 2012) o riduzione della proliferazione cellulare (Sun et al, 2013, Ahamed et al,2013, Asare et al, 2012), riduzione della vitalità cellulare (Ahamed et al,2013), aumento della risposta infiammatoria (Wahajuddin and Arora, 2012), apoptosi (Sun et al, 2013, Ahamed et al,2013, Asare et al, 2012; Kanagesan et al, 2103;Meena et al, 2012), danni al DNA (Wahajuddin and Arora, 2012; Ahamed et al,2013; Yang et al, 2013), necrosi (Asare et al, 2012), cambiamenti nella morfologia cellulare (Hussain et al, 2005; Mironava et al, 2013), rimodellamento del citoscheletro (Apopa et al, 2009; Wahajuddin and Arora, 2012) o distruzione di questo (Pisanic et al, 2007) ed infine riduzione dei contatti intracellulari (Pisanic et al, 2007). Alla base di questi effetti tossici sembra esserci un meccanismo comune che riguarda l'interazione delle NPs con i mitocondri, a cui segue un'induzione di stress ossidativo. (Hsin et al, 2008; Apopa et al, 2009; Kim et al, 2011; Meena et al, 2012; Wahajuddin and Arora, 2012 Ahamed et al,2013). Le specie reattive dell'ossigeno, così prodotte, sono in grado di interagire con diverse molecole biologiche, quali proteine, enzimi, lipidi ed acidi nucleici, provocando notevoli danni cellulari (Kim et al, 2011; Khaing Oo et al, 2012).

Ad oggi, pochi sono gli studi riguardanti la tossicità di NPs biomediche su sistemi biologici più sensibili, quali le cellule germinali maschili e femminili e lo sviluppo embrionale. Studi preliminari effettuati su spermatozoi umani, di bufalo e di ratto hanno dimostrato effetti tossici dose dipendenti (Taylor et al, 2012, Moretti et al, 2013; Pawar and Kaul, 2012; Gromadzka-Ostrowska et al, 2012). In particolare in spermatozoi umani, NPs di oro e di argento hanno un effetto dose dipendente sulla motilità e sulla vitalità (Moretti et al, 2013). Oltre alla vitalità, il trattamento con NPs può influire anche sulla frammentazione del DNA spermatico, come riscontrato in spermatozoi di bufalo trattati con NPs di biossido di titanio (Pawar and Kaul, 2012).

L'unico dato riguardo la nanotossicità sui gameti femminili deriva da uno studio di Xu et al (2012), condotto nei topi, secondo cui quantum dots coniugati a transferrina

influenzano lo sviluppo follicolare e la maturazione ovocitaria, provocando un ritardo nella formazione dell'antro e una diminuzione della quantità di ovociti maturi.

Solo negli ultimi anni, alcuni gruppi di ricerca stanno focalizzando l'attenzione sull'utilizzo dello sviluppo embrionale come saggio per la valutazione della tossicità delle NPs, prima della loro applicazione in campo biomedico. E' infatti risaputo che lo sviluppo embrionale pre-impianto nei mammiferi è molto sensibile a diversi fattori ambientali, sia in vivo, come l'alimentazione materna, che in vitro, come la coltura embrionale (Fleming et al., 2004; Sinclair and Singh, 2007; Thompson et al., 2007; Watkins et al., 2008). Tali fattori sono in grado provocare effetti sullo sviluppo embrionale sia a breve termine (cambiamenti dell'espressione genica, stress metabolico, apoptosi, modificazioni epigenetiche ed alterazione dei pathways di signalling intracellulare) che a lungo termine (riduzione della capacità d'impianto, alterazioni della crescita e dello sviluppo fetale ma anche della crescita postnatale ed aumento della predisposizione a malattie nell'adulto), influenzando così sia lo sviluppo embrionale precoce che quello tardivo e addirittura la vita postnatale (Fleming et al, 2004).

I pochi studi sullo sviluppo embrionale riguardano gli embrioni di zebrafish e di topo. Lo sviluppo embrionale di zebrafish in seguito ad esposizione a diverse NPs (NPs di argento, oro, quantum dots, chitosano) risulta alterato. Si osserva infatti un incremento dei tassi di mortalità e di malformazioni morfologiche (Lee et al, 2012; Asharani et al, 2011; Hu et al, 2011), un ritardo nella schiusa (Hu et al, 2011; Zhang et al, 2012), alterazioni del nuoto (Zhang et al, 2012) e del comportamento larvale (Truong et al, 2012). Studi condotti su embrioni di topo hanno dimostrato che l'esposizione di femmine gravide a NPs è in grado di provocare malformazioni fetali e di indurre stress ossidativo (Pietrojusti et al, 2011). Mentre da studi condotti in vitro, esponendo embrioni allo stadio di blastocisti a NPs di argento, è emerso che le NPs causano una riduzione del numero totale di cellule ed un incremento della percentuale di cellule apoptotiche delle blastocisti. Tale trattamento in vitro è in grado inoltre di alterare lo sviluppo post-impianto, provocando una riduzione dei tassi di impianto ed una diminuzione del peso fetale (Li et al, 2010).

Proprio per la carenza di dati circa la tossicità delle NPs biomediche relativa ai gameti e agli embrioni, il gruppo di ricerca presso il quale ho svolto quest'attività di dottorato ha focalizzato la sua attenzione negli ultimi anni sulla valutazione della tossicità in vitro di tre differenti NPs sugli spermatozoi e sullo sviluppo embrionale nel modello animale bovino. La scelta di questo modello animale è da attribuire alla facile reperibilità, alla

grande disponibilità di materiale biologico e all'elevato grado di omologia con il meccanismo riproduttivo umano. Le NPs utilizzate sono state quelle di polistirene da 44nm coniugate a fluoresceina isotiocianato (NPs-PS), di silicio da 20nm (NPs-SiO<sub>2</sub>) e di acido polilatticocoglicolico e polietilen glicole (in rapporto 1:1) da 65nm coniugate a rodamina (NPs-PLGA/PEG).

Le NPs-PS non sono né biocompatibili né biodegradabili e sono largamente impiegate come particelle “pioniere” in studi in vitro (Geiser et al., 2005; Papageorgiou et al., 2007) e in vivo (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 NPs-SiO<sub>2</sub> sono utilizzate per il trasporto di farmaci o di geni, grazie alla loro elevata biocompatibilità, bassa elettro-attività in mezzo acquoso e alla possibilità di modificarne facilmente la superficie (Coti et al., 2009; Vinu et al., 2005). Le NPs-PLGA/PEG sono invece biocompatibili e biodegradabili e sono un ottimo sistema di trasporto di geni, di farmaci o di agenti di contrasto (Duncan, 2006; Lammers et al., 2010; Grund, 2011).

Le concentrazioni utilizzate per testare la tossicità di queste tre differenti NPs sono state ricavate da studi presenti in letteratura e sono state 10 e 100µg/ml per le NPs-PS e le NPs-SiO<sub>2</sub> e 10 e 50µg/ml per le NPs-PLGA/PEG. Prima di valutarne la tossicità, tali NPs sono state caratterizzate mediante “dynamic light scattering”, che ha permesso di analizzarne il potenziale zeta e la taglia.

In particolare le NPs testate sono state incubate con gli spermatozoi fino a 5 ore, mentre gli embrioni, ottenuti dalla fecondazione di ovociti bovini maturati in vitro con seme bovino opportunamente preparato, sono stati incubati in mezzo di coltura con NPs dal giorno 1 al giorno 8 di sviluppo embrionale.

Per la valutazione dei potenziali effetti tossici delle NPs sugli spermatozoi sono stati presi in considerazione la motilità totale e progressiva, i parametri cinetici, quali velocità lineare, curvilinea e media, mediante l'ausilio del sistema computerizzato di analisi d'immagine SCA (Sperm Class Analyzer), e la vitalità, mediante Eosin test, colorazione capace di evidenziare in rosso gli spermatozoi non vitali. Per quanto riguarda lo sviluppo embrionale sono state valutate le percentuali di segmentazione e di embrioni allo stadio di otto cellule, al giorno 3 di sviluppo embrionale, e di blastocisti, al giorno 8 di sviluppo embrionale. Inoltre è stata valutata anche la qualità delle blastocisti in termini di numero medio di cellule e percentuale di nuclei con DNA frammentato, rispettivamente

mediante colorazione con hoechst 33342, un'intercalante del DNA che consente di colorare in blu i nuclei di cellule vive e morte, e saggio Tunel.

Per verificare se gli eventuali effetti sugli spermatozoi e sugli embrioni, fossero realmente da attribuire alla tossicità delle NPs e non al mezzo nel quale queste sono disciolte, sono stati effettuati dei campioni controllo: si tratta di spermatozoi ed embrioni cimentati con i surfattanti, alle medesime concentrazioni presenti nei campioni trattati con le NPs. Nel caso di NPs-SiO<sub>2</sub> e di NPs-PLGA/PEG il surfattante è l'acqua, mentre nel caso di NP-PS la composizione del surfattante non è nota in quanto protetta da brevetto ed è quindi stato ricavato effettuando una ultrafiltrazione delle NPs.

I risultati ottenuti hanno mostrato un effetto citotossico dose-dipendente delle diverse NPs sulla motilità totale e progressiva degli spermatozoi, a partire da 2, 3 e 4 ore rispettivamente per NPs-SiO<sub>2</sub>, NP-PS e NPs-PLGA/PEG. A ciò si è aggiunta una riduzione significativa dose dipendente dei parametri cinetici, solo in seguito all'incubazione con NPs-SiO<sub>2</sub> e NPs-PLGA/PEG. Anche la vitalità risultava influenzata dalla maggiore concentrazione di NPs, essa si riduceva di 1,5 volte per le NP-PS e per le NPs-SiO<sub>2</sub> e di 1,2 volte per le NPs-PLGA/PEG. Inoltre le analisi al microscopio ad epifluorescenza, mediante colorazione delle sospensioni spermatiche con hoechst 33258, colorante di cellule non vitali, hanno permesso di stabilire che le NP-PS sono internalizzate solo negli spermatozoi non vitali, mentre le NPs-PLGA/PEG si localizzano solo negli spermatozoi vitali a livello del tratto intermedio. I risultati riguardo l'effetto dose-dipendente delle NPs sulla motilità e sulla vitalità spermatica nel modello animale bovino sono in accordo con studi precedenti su spermatozoi murini ed umani incubati rispettivamente con NPs di biossido di titanio (Guo et al., 2009) e NPs di argento e d'oro (Moretti et al., 2013). L'effetto sulla vitalità è inoltre in accordo con lo studio di Pawar and Kaul (2012), condotto su spermatozoi di bufalo. Dati contrastanti si evincono invece da studi condotti da Ben-David Makhluף (2006) in spermatozoi bovini, dove non si osserva alcuna riduzione significativa della motilità spermatica, dopo incubazione con NPs magnetiche.

Per quanto riguarda gli embrioni bovini, i risultati ottenuti mostrano che il trattamento con entrambe le concentrazioni di NP-PS, di NPs-SiO<sub>2</sub> e di NPs-PLGA/PEG non altera le percentuali di segmentazione al giorno 3 di sviluppo embrionale, che risultano simili agli embrioni controllo. Solo il trattamento con la più alta concentrazione di NPs influenza invece le percentuali di embrioni allo stadio di otto cellule ed allo stadio di blastocisti, rispettivamente al giorno 3 e al giorno 8. Tale trattamento non danneggia

però la qualità delle blastocisti né in termini di numero medio di cellule né di percentuali di nuclei con DNA frammentato. Inoltre le analisi a livello di microscopia laser confocale hanno mostrato una localizzazione citoplasmatica delle NPs-PS e delle NPs-PLGA/PEG fino al giorno 8 di sviluppo embrionale. In particolare le NPs-PS sono localizzate nel citoplasma in maniera diffusa mentre le NPs-PLGA/PEG sono localizzate, in maniera aggregata, in vescicole e in vacuoli citoplasmatici, come si evince anche dalle analisi ultrastrutturali da noi condotte ed in accordo con gli studi di Panyam (2002).

In generale, i dati sullo sviluppo embrionale mostrano un effetto embriotossico dose dipendente di tutte le NPs testate solo sulle percentuali di embrioni ad otto cellule e di blastocisti. L'effetto tossico riscontrato è in accordo con studi condotti su embrioni di topo o di zebrafish esposti a NPs-PS o a NPs-SiO<sub>2</sub> (Fynewever et al, 2007; Nelson et al, 2010; Duan et al, 2013). Il motivo per cui il trattamento con NP-PS, NPs-SiO<sub>2</sub> e NPs-PLGA/PEG non influenza la qualità delle blastocisti potrebbe essere attribuito al fatto che l'effetto tossico delle NPs si manifesta solo sugli embrioni che hanno di partenza basse potenzialità di sviluppo. Ciò è in disaccordo con quanto riportato da Li (2010), secondo cui il trattamento in vitro di embrioni di topo allo stadio di blastocisti con NPs di argento influisce sulla qualità embrionale, in quanto induce un decremento del numero totale di cellule ed un aumento della percentuale di cellule apoptotiche delle blastocisti.

In tal modo lo sviluppo embrionale nel modello animale bovino rappresenta un sensibile e predittivo saggio di tossicità in vitro, che consente di monitorare eventuali effetti tossici delle NPs nel tempo, fino ad 8 giorni di coltura, superando le limitazioni legate al saggio di tossicità a breve termine rappresentato dalle colture in vitro di cellule somatiche. Ciò fa sì che il raggiungimento dello stadio di blastocisti in vitro rappresenti un eccellente test di funzionalità in vivo. Recenti studi hanno infatti riportato una buona correlazione tra effetti tossici in vitro ed in vivo (Ghosh et al, 2012).

I benefici e i rischi, derivanti dalle applicazioni nanotecnologiche delle NPs nei settori più disparati, hanno fatto sì che queste siano oggetto negli ultimi anni di numerose questioni etiche.

Per quanto riguarda i benefici, il progresso nanotecnologico nei paesi ricchi e sviluppati pone un grande problema etico che è quello della nano-povertà. L'espansione continua della nanotecnologia potrebbe accentuare il divario tra paesi ricchi e sviluppati e quelli

poveri ed in via di sviluppo. In tal modo i benefici della nanotecnologia potrebbero riguardare solo i paesi industrializzati, emarginando ulteriormente quelli sottosviluppati. Molti però ritengono che investimenti nel campo della nanotecnologia nei paesi sottosviluppati potrebbero ridurre questo divario ed essere vantaggiosi dal punto di vista economico (Aala et al, 2008, Comitato Nazionale per la Bioetica, 2006).

A causa dei rischi che possono comportare sia per la salute umana che per l'ambiente, molti dei quali allo stato attuale non sono del tutto conosciuti, le NPs hanno suscitato un rilevante problema etico che riguarda il rapporto rischi-benefici del loro impiego (Sudarenikov, 2012, Aala et al, 2008, Berger, 2008). Per assicurare uno sviluppo responsabile delle nanotecnologie, i rischi devono essere limitati in modo da far prevalere i benefici. Le priorità fondamentali nell'ambito nanotecnologico devono essere il diritto alla salute umana e il rispetto per l'ambiente. Ciò prevede dunque di agire in base al "principio di precauzione", il quale consente uno sviluppo sostenibile, etico e sicuro delle nanotecnologie, evitando di arrecare danni a persone, animali e piante. Questo è quanto previsto dal codice di condotta della Commissione Europea per la ricerca responsabile nell'ambito della nanoscienza e delle nanotecnologie (Commissione delle Comunità Europee, 2008). Il "principio di precauzione" consente quindi di prevedere gli impatti delle nanotecnologie sulla salute e sull'ambiente e di prendere le dovute precauzioni affinché non si manifestino effetti avversi. L'obiettivo prioritario di questo codice di condotta è dunque quello di favorire i benefici ambientali e sociali.

Il codice di condotta prevede che le attività di ricerca nel campo delle nanoscienze e delle nanotecnologie debbano essere svolte secondo i migliori standard scientifici possibili, includendo le buone pratiche di laboratorio, e debbano prevedere un'attiva comunicazione e un acceso dibattito tra le diverse parti in esse coinvolte (Commissione delle Comunità Europee, 2008). Un altro principio previsto dal codice di condotta della Commissione Europea è quello della responsabilità, secondo cui i ricercatori e gli enti di ricerca debbano essere responsabili degli eventuali impatti ambientali, sociali ed umani delle loro ricerche (Commissione delle Comunità Europee, 2008). Per uno sviluppo responsabile della nanotecnologia, è inoltre necessario, secondo il codice di condotta, che i ricercatori e gli enti di ricerca divulgino i risultati ottenuti dalle loro ricerche al pubblico, fornendo informazioni ai consumatori oppure, nel caso della nanomedicina, ai pazienti. L'informazione ai consumatori può essere fornita attraverso un'adeguata etichettatura dei prodotti in commercio, etichettatura che consente al consumatore di essere a conoscenza della presenza di NPs nel prodotto. Dal momento che non sono

ancora del tutto noti i rischi per la salute, l'etichettatura non solo rende il consumatore consapevole della composizione del prodotto, che quindi può scegliere di acquistarlo e/o utilizzarlo, ma sottrae da qualunque responsabilità il produttore. L'etichettatura in tal modo mette in pratica il "principio di precauzione", cosicché solo il consumatore risulta responsabile di un eventuale danno indotto dal nanomateriale (Sudarenkov, 2012). Attualmente l'etichettatura riguarda principalmente i prodotti alimentari e cosmetici (Commissione Europea, 2012; FDA, [ww.fda.gov](http://www.fda.gov)). La nanotecnologia, nel campo biomedico, pone un grande questione bioetica che è quella del consenso informato. Tramite questo consenso, è possibile fornire l'informazione al paziente sui benefici ed i rischi in seguito all'utilizzo delle NPs per diagnosi o terapia. In tal modo il paziente è consapevole degli eventuali rischi in cui potrebbe incorrere in caso di trattamento con prodotti a base di NPs. Il consenso informato, come nel caso dell'etichettatura, sottrae da ogni responsabilità il medico (Sudarenkov, 2012).

Vi sono poi altre questioni bioetiche rilevanti che scaturiscono dalle applicazioni biomediche delle NPs (Resnik and Tinkle, 2007).

La nanomedicina terapeutica pone un grande problema etico che è quello di utilizzare le NPs, ad esempio nel drug delivery, nella gene therapy e nell'ingegneria tissutale, non per curare una malattia ma semplicemente per un miglioramento non terapeutico delle prestazioni del corpo. Ciò è in contrasto con l'obiettivo primario di tale branca della nanomedicina che è quello di migliorare la qualità di vita del paziente e non di comportare un miglioramento a fini non terapeutici degli esseri umani (Bawa and Summer, 2007; Visciano, 2011).

Un problema etico riguardante l'ingegneria tissutale è quello dell'origine delle cellule da coltivare sul nanomateriale usato come scaffold per la rigenerazione e/o riparazione di tessuti danneggiati. Le cellule potrebbero essere prelevate da un tessuto donatore ed in tal caso è necessario il consenso informato oppure potrebbero essere di origine embrionale, cosa che comporterebbe la distruzione degli embrioni (Spagnolo and Daloiso, 2009), suscitando così ulteriori questioni etiche.

Alla luce di quanto appena esposto, ne consegue la necessità per le applicazioni nanotecnologiche, seppur notevolmente vantaggiose in diversi settori, di protocolli standard di valutazione del rischio, che potrebbero essere messi in atto dopo aver realizzato una completa caratterizzazione delle proprietà chimico-fisiche delle NPs, che dovrebbe essere effettuata analizzando caso per caso ogni singola NP. A tal proposito, gli studi nanotossicologici sui gameti maschili ed ancor più sullo sviluppo embrionale,

secondo quanto emerge dai risultati ottenuti dal gruppo di ricerca presso il quale ho svolto l'attività di dottorato, sembrano rappresentare un ottimo test per la valutazione tossicologica di NPs prima della loro applicazione in biomedicina. In tal modo, protocolli standard di valutazione del rischio consentirebbero lo sviluppo di regolamentazioni internazionali, allo stato attuale assenti, sulla progettazione, sull'utilizzo e in particolare sulla valutazione tossicologica di tali NPs, che dovrebbero tener conto degli aspetti etici e sociali delle nanotecnologie e dovrebbero stabilire se o meno queste tecnologie innovative possano rappresentare un bene per esseri umani e per l'ambiente, riducendone al minimo i rischi. In questo modo la regolamentazione potrà assicurare uno sviluppo nanotecnologico responsabile, che tenga conto sia dei benefici che dei rischi. Per mettere in pratica ciò sarebbe dunque necessario un approccio proattivo alla gestione del rischio, una eventuale revisione delle legislazioni esistenti e la cooperazione e il coordinamento tra i vari organismi pubblici, industria e ricerca a livello internazionale. Tutto ciò va complementato con una informazione ed un dialogo con il pubblico corretti ed affidabili, che rassicurino e prevengano l'insorgere di pregiudizi.

## **BIBLIOGRAFIA**

Aala M., Larijani B., Zahedi F. *Bioethical issues of nanotechnology at a glance*. 2008. Iranian J Publ Health. A supplementary issue on Bioethics. 37,1:12-17.

Ahamed M, Alhadlaq HA, Alam J, Khan MA, Ali D, Alarafi S. *Iron oxide nanoparticle-induced oxidative stress and genotoxicity in human skin epithelial and lung epithelial cell lines*. 2013. Curr Pharm Des. 19(37):6681-90.

Aillon KL, Xie Y, El-Gendy N, Berkland CJ, Forrest ML. *Effects of nanomaterial physicochemical properties on in vivo toxicity*. 2009. Adv Drug Deliv Rev. 61:457-66.

Aitken, R.; Creely, K.; Tran, C. *Nanoparticles: An Occupational Hygiene Review*. 2004. Available online: <http://www.hse.gov.uk/research/rrpdf/rr274.pdf>

Aitken, R.; Hankin S.; Ross, B.; Tran, C.; Stone, V.; Fernandes, T.; Donaldson K. ; Duffin, R.; Chaudhry, Q.; Wilkins, T.; Wilkins, S.; Levy, L.; Rocks, S.; Maynard, A. *EMERGNANO: A Review of Completed and Near Completed Environment, Health and Safety Research on Nanomaterials and Nanotechnology*. 2009. Available online: <http://randd.defra.gov.uk/>

Akerman M.E., Chan W.C., Laakkonen R., Bhatia S.N, Ruoslahti E.. *Nanocrystal targeting in vivo*. 2002. Proc Natl Acad Sci Usa. 99: 12617-21.

Alekseenko AV, Waseem TV, Fedorovich SV. *Ferritin, a protein containing iron nanoparticles, induces reactive oxygen species formation and inhibits glutamate uptake in rat brain synaptosomes*. 2008. Brain Res 1241:193-200.

Almarza AJ and Athanasiou KA. *Seeding techniques and scaffolding choice for tissue engineering of the temporomandibular joint disk*. 2004. Tissue Eng. 10(11-12):1787-95.

Apopa P.L., Qian Y., Shao R., Guo N.L., Schwegler-Berry D., Pacurari M., Porter D., Shi X., Vallyathan V., Castranova V., Flynn D.C. *Iron oxide nanoparticles induce human microvascular endothelial cell permeability through reactive oxygen species production and microtubule remodeling*. 2009. Particle and Fibre Toxicology. 6:1.

Argyle V and Robinson B. *Are nanoparticles safe ?* 2006. Chemistry in New Zealand. 2006.12-5.

Arredouani M, Yang Z, Ning Y, Qin G, Soininen R, Tryggvason K, et al. *The scavenger receptor MARCO is required for lung defense against pneumococcal pneumonia and inhaled particles.* 2004. J Exp Med. 200:267-72.

Asare N, Instanes C, Sandberg WJ, Refsnes M, Schwarze P, Kruszewski M, Brunborg G. *Cytotoxic and genotoxic effects of silver nanoparticles in testicular cells.* 2012. Toxicology. 291(1-3):65-72.

Asharani PV, Lianwu Y, Gong Z, Valiyaveetil S. *Comparison of the toxicity of silver, gold and platinum nanoparticles in developing zebrafish embryos.* 2011. Nanotoxicology. 5(1):43-54.

Asharani PV, Low Kah Mun G, Hande MP, Valiyaveetil S. *Cytotoxicity and genotoxicity of silver nanoparticles in human cells.* 2009. ACS Nano. 3(2):279-90.

Asli, S. and Neumann P.M. *Colloidal suspensions of clay or titanium dioxide NPs can inhibit leaf growth and transpiration via physical effects on root water transport.* 2009. Plant Cell Environ. 32, 577– 584

American Society for Testing and Materials, ASTM E 2456-06. *Terminology for nanotechnology.* 2006. ASTM International.

Au C, Mutkus L, Dobson A, Riffle J, Lalli J, Aschner M. *Effects of nanoparticles on the adhesion and cell viability on astrocytes.* 2007. Biol Trace Elem Res. 120:248-56.

Audouy S.A, de Leij L.F., Hoekstra D., Molema G. *In vivo characteristics of cationic liposomes as delivery vectors for gene therapy.* 2002. Pharm. Res. (11):1599–1605.

Balbus JM, Maynard AD, Colvin VL, Castranova V, Daston GP, Denison RA, et a. *Meeting report: hazard assessment for nanoparticles-report from an interdisciplinary workshop.* 2007. Environ Health Perspect.;115:1654-9.

Banfield J.F., Veblen D.R., Jones B.F.. *Transmission electromicroscopy of subsolidus oxidation and weathering olivine*. 1990. *Contrib Mineral Petrol.* 106: 110-23.

Bartolucci G.B., Cottica D. *Caratterizzazione degli inquinanti aerodispersi e valutazione dell'esposizione*. 2006. *G Ital Med Erg.* 3: 252-7.

Baun A, Hartmann NB, Grieger K, Kusk KO: *Ecotoxicity of engineered nanoparticles to aquatic invertebrates: a brief review and recommendations for future toxicity testing*. 2008. *Ecotoxicol.* 17:387-395.

Bawa Raj MS and Summer Johnson. *The ethical dimension of nanomedicine*. 2007. *Med Clin N Am.* 91:881-887.

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

Ben-Dor I, Kleiman NS, Lev E. *Assessment, mechanisms, and clinical implications of variability in platelet response to aspirin and clopidogrel therapy*. 2009. *Am J Cardiol.* 104:227-33.

Berger M. *Ethical aspects of nanotechnology in medicine*. 2008. [www.nanotech.org.uk](http://www.nanotech.org.uk)

Bernardini G., Cattaneo A.G., Sabbioni E., Di Gioacchino M., Chiariva-Internati M., Gornati R. *Toxicology of Engineered Metal Nanoparticles*. 2011. *Handbook Of Systems Toxicology*, Ed. Daniel A. Casciano and Saura C. Sahu. Jhon Wiley & Sons Ltd.

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

Bevim K, Geo K., Kamarov V., Xin H., Saih L. *Aquatic environmental impacts of engineered nanoparticles (ENPs)*. 2012. *Advanced Engineerig and Applied Sciences:An InternationalJournal.* 1(1):16-21.

Bexiga MG, Varela JA, Wang F, Fenaroli F, Salvati A, Lynch I, Simpson JC, Dawson KA. *Cationic nanoparticles induce caspase 3-, 7- and 9-mediated cytotoxicity in a human astrocytoma cell line.* 2011. *Nanotoxicology.* 5(4):557-67.

Biondi M., Ungaro F., Quaglia F., Netti P.A. *Controlled drug delivery in tissue engineering.* 2008. *Adv Drug Deliv Rev.* 60(2):229-42.

Biswas P. and Wu C.Y. *Nanoparticles and the environment.* 2005. *J. Air Waste Manag. Assoc.* 55:708-746.

Borm PJA., Robbins D., Haubold S., Kuhlbusch T., Fissan H., Donaldson K., Schins R., Stone V., Kreyling W., Lademann J., Krutmann J., Warheit D., Oberdorster E. *The potential risks of nanomaterials: a review carried out for ECETOC.* 2006. *Particle and Fibre Toxicology.* 3:11.

Bouwer D.H., Gijssbers J.H.J., Lurvink M.W.M.. *Personal exposure to ultrafine particles in the workplace: exploring sampling techniques and strategies.* 2004. *Ann Occup Hyg.* 5: 439-53.

Brown M.D, Schatzlein A.G., Uchegbu I.F. *Gene delivery with synthetic (non viral) carriers.* 2001. *Int. J. Pharm.* 229 1–21.

Calderon-Garciduehas L., Azzarelli B., Acuna H., Garda R., Gambling TM, Osnaya N., Monroy S, DEL Tizapantzi MR, Carson JL, Villarreal-Calderon A, Rewcastle B. *Air pollution and brain damage.* 2002. *Toxicol Pathol.* 30: 373-89.

Canas JE, Long M, Nations S, Vadan R, Dai L, Luo M, Ambikapathi R, Lee EH, Olszyk D: *Effects of functionalized and nonfunctionalized single-walled carbon nanotubes on root elongation of selected crop species.* 2008. *Environ Toxicol Chem* 2008, 27:1922-1931.

Carr KE, Hazzard RA, Reid S, Hodges GM. *The effect of size on uptake of orally administered latex microparticles in the small intestine and transport to mesenteric lymph nodes.* 1996. *Pharm Res.* 13:1205-9.

- Chae YJ, Pham CH, Lee J, Bae E, Yi J, Gu MB. *Evaluation of the toxic impact of silver nanoparticles on Japanese medaka (Oryzias latipes)*. 2009. *Aquat Toxicol* 94: 320–327.
- Chaloupka K, Malam Y, Seifalian AM. *Nanosilver as a new generation of nanoproduct in biomedical applications*. 2010. *Trends Biotechnol.* 28(11):580-8.
- Chang D, Song Y, Liu B. *Visibility trends in six megacities in China 1973–2007*. 2009. *Atmospheric Research.* 94 (2): 161–167.
- Chen L, Yokel RA, Hennig B, Toborek M: *Manufactured aluminum oxide nanoparticles decrease expression of tight junction proteins in brain vasculature*. 2008. *J Neuroimmune Pharmacol.* 3(4):286-95.
- Chen M, Gao S, Dong M, Song J, Yang C, Howard KA, Kjemis J, Besenbacher F. *Chitosan/siRNA nanoparticles encapsulated in PLGA nanofibers for siRNA delivery*. 2012 *ACS Nano.* 6:4835-4844.
- Chen Z, Meng H, Xing G, Chen C, Zhao Y, Jia G, Wang T, Yuan H, Ye C, Zhao F, Chai Z, Zhu C, Fang X, Ma B, Wan L. *Acute toxicological effects of copper nanoparticles in vivo*. 2006. *Toxicol Lett.* 163(2):109-20.
- Cheng J, Flahaut E, Cheng SH *Effect of carbon nanotubes on development zebrafish (Danio rerio) embryos*. 2007. *Environ Toxicol Chem* 26: 708–716.
- Chithrani, B.D., Ghazani, A.A., Chan,W.C.W. *Determining the size and shape dependence of gold nanoparticle uptake into mammalian cells*. 2006. *Nano Lett.* 4, 662–668.
- Choi HS, Liu W, Misra P, Tanaka E, Zimmer JP, Itty Ipe B, Bawendi MG, Frangioni JV. *Renal clearance of quantum dots*. 2007. *Nat Biotechnol.* 25(10):1165-70.
- Choi J. and Wang N.S. *Nanoparticles in Biomedical Applications and Their Safety Concerns*. 2011. *Biomedical Engineering - From Theory to Applications*, book edited by Reza Fazel-Rezai, ISBN 978-953-307-637-9. Chapter 13.

Chono S, Tanino T, Seki T, Morimoto K. *Influence of particle size on drug delivery to rat alveolar macrophages following pulmonary administration of ciprofloxacin incorporated into liposomes*. 2006. *J Drug Target*. 14:557-66.

Chou C.C., Riviere J.E., Monteiro-Riviere N.A.. *Differential relationship between the carbon chain length of jet fuel aliphatic hydrocarbons and their ability to induce cytotoxicity vs. interleukin-8 release in human epidermal keratinocytes*. 2002. *Toxicol Sci*. 69: 226-33.

Christian P, Von der Kammer F, Baalousha M, Hofmann T. *Nanoparticles: structure, properties, preparation and behaviour in environmental media*. 2008. *Ecotoxicology*. 17:326-43.

Colvin, V. *The potential environmental impact of engineered nanoparticles*. 2003. *J. Nat. Biotechnol*. 21, 1166-1170.

Comitato Nazionale per la Bioetica. *Nanoscienza e nanotecnologia*. 2006. [www.governo.it/bioetica/testi/Nanoscienze\\_Nanotecnologie.pdf](http://www.governo.it/bioetica/testi/Nanoscienze_Nanotecnologie.pdf)

Commissione delle Comunità Europee. *Commission Recommendation of 07/02/2008 on a code of conduct for responsible nanosciences and nanotechnologies research*. Brussels, 07/02/2008.

Commissione Europea. *Communication from the Commission to the European Parliament, the Council and the European Economic and Social Committee. Second Regulatory Review on Nanomaterials*. Brussels, 03/10/2012.

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.

Cross SE, Innes B, Roberts M, Tsuzuki T, Robertson TA, McCormick P. *Human skin penetration of sunscreen nanoparticles: In-vitro assessment of a novel micronized Zinc Oxide formulation*. 2007. *Skin Pharmacol Physiol*. 20:148-54.

Cyrus J., Stolzel M., Heinrich J., Kreyling W.G., Menzel N., Wittmaack K., Tuch T., Wichmann H.E. *Elemental composition and sources of fine and ultrafine ambient particles in Erfur, Germany*. 2003. *Sci Tot Environ*. 305: 143-56.

Da Silva LC, Oliva MA, Azevedo AA, De Araujo JM. *Responses of restinga plant species to pollution from an iron pelletization factory*. 2006. *Water, Air, Soil Pollut* 175:241–256.

De Smedt S.C., Demeester J., Hennink W.E.. *Cationic polymer based gene delivery systems*. 2000. *Pharm. Res*. 17: 113–126.

Dennekamp, M.; Mehenni, O.; Cherrie, J.; Seaton, A. *Exposure to ultrafine particles and PM 2.5 in different micro-environments*. 2002. *Ann. Occup. Hyg.* 46, 412-414.

Des Rieux A, Fievez V, Garinot M, Schneider YJ, Preat V . *Nanoparticles as potential oral delivery systems of proteins and vaccines: a mechanistic approach*. 2006. *J Control Release*. 116:1-27.

Deshpande D, Blezinger P, Pillai R, Duguid J, Freimark B, Rolland A. *Target specific optimization of cationic lipid-based systems for pulmonary gene therapy*. 1998. *Pharm Res*. 15(9):1340-7.

Dietz KJ and Herth S. *Plant nanotoxicology*. 2011. *Trends Plant Sci*. 16(11):582-9.

Discher D.E., Janmey P., Wang Y.L. *Tissue cells feel and respond to the stiffness of their substrate*. 2005. *Science*. 18;310(5751):1139-43.

Donaldson, K., Stone, V., Tran, C.L., Kreyling, W., Borm, P.J.A. *Nanotoxicology*. 2004. *Occup. Environ. Med.* 61, 727–728.

Drexler E. *Engines of Creation: The Coming Era of Nanotechnology* .1986. Anchor Books, New York.

Driscoll, C.T., Lawrence G.B., Bulger A.J., Butler T.J., Cronan C.S., Eagar C., Lambert K.F., Likens G.E., Stoddard G.L., Weathers K.C. *Acidic deposition in the northeastern United States: sources and inputs, ecosystem effects, and management strategies*. 2001. *Bioscience* 51: 180–198.

Duan JI, Yu Y, Shi H, Tian L, Guo C, Huang P, Zhou X, Peng S, Sun Z. *Toxic effects of silica nanoparticles on zebrafish embryos and larvae*. 2013. *PLoS One*. 8(9):e74606.

Dufur EK, Kumaravel T, Nohynek GJ, Kir- kland D, Toutain H. *Clastogenicity, photoclastogenicity or pseudo-photo-clasto-genicity: genotoxic effects of zinc oxide in the dark, in preirradiated or simultaneously irradiated Chinese hamster ovary cells*. 2006. *Mutat Res.* (607) 215-24.

Dumortier H, Lacotte S, Pastorin G, Marega R, Wu W, Bonifazi D, Briand J-P, Prato M, Muller S, Bianco A. *Functionalized carbon nanotubes are non-cytotoxic and preserve the functionality of primary immune cells*. 2006. *Nano Lett.* 6(7):1522-8.

Duncan R. *Polymer conjugates as anticancer nanomedicines*. 2006. *Nat Rev Cancer*. 6(9):688–701.

Dvir T, Timko BP, Kohane DS, Langer R. *Nanotechnological strategies for engineering complex tissues*. 2011. *Nat Nanotechnol.* 6:13-22.

El-Ansary A. and Al-Daihan S. *On the Toxicity of Therapeutically Used Nanoparticles: An Overview*. 2009. *Journal of Toxicology*. Article ID 754810, 9 pages.

Elder A, Vidyasagar S, DeLouise L. *Physicochemical factors that affect metal and metal oxide nanoparticle passage across epithelial barriers*. 2009. *Nanomed Nanobiotech.* 1:434-50.

Ellenbacker M and Tsai S. *Engineered nanoparticles: safer substitutes for toxic materials, or a new hazard?* 2011. *J Clean Prod.* 19: 483-487.

Engler A. J., Sen S., Sweeney H. L. and Discher, D. E. *Matrix elasticity directs stem cell lineage specification*. 2006. *Cell*. 126, 677–689.

Environmental Protection Agency (EPA), USA, [www.epa.gov](http://www.epa.gov).

Environmental Protection Agency (EPA). *Nanotechnology White Paper* (EPA/100/B-07/001, Washington, DC, Office of the Science Advisor, February 2007)

Erdely A, Hulderman T, Salmen R, Liston A, Zeidler-Erdely PC, Schwegler-Berry D, Castranova V, Koyama S, Kim YA, Endo M, Simeonova PP. *Cross-talk between lung and systemic circulation during carbon nanotube respiratory exposure. Potential biomarkers*. 2009. *Nano Lett*. 9(1):36-43.

Faedmaleki F. , Shirazi F.H., Rastegar H., Salarian A. *Toxicity effect of silver nanoparticles on mice liver primary cell culture and hepg2 cell line*. 2012. *Research in Pharmaceutical Sciences*. 7(5).

Feynman R. *There's plenty of room at the bottom*. 1960. *Engineering and Science*, Vol. 23, No. 5, February, pp. 22-36.

Filley, T.; Ahn, M.; Held, B.; Blanchette, R. *Investigations of fungal mediated (C60-C70) fullerene decomposition*. 2005. *Div. Environ. Chem*. 45, 446-450.

Fischer HC and Chan WCW. *Nanotoxicity: the growing need for in vivo study*. 2007. *Curr Opin Bio- tech*. 18:565-71.

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*. 2004. *Biol Reprod*. 71:1046–1054.

Florence AT. *The oral absorption of micro- and nanoparticulates: neither exceptional nor unusual*. 1997. *Pharm Res*. 14:259-66.

Food and Drug Administration (FDA). *Nanotechnology Public Meeting*. September 8, 2008. Rockville, Maryland.

Food and Drug Administration (FDA). *Public meeting on nanotechnology*. October 10, 2006, Bethesda Maryland.

Food and Drug Administration (FDA). [www.fda.gov](http://www.fda.gov)

Freeman I and Cohen S. *The influence of the sequential delivery of angiogenic factors from affinity-binding alginate scaffolds on vascularization*. 2009. *Biomaterials*. 30:2122-2131.

Friedrichs S and Schulte J. *Environmental, health and safety aspects of nanotechnology – implications for the R&D in (small) companies*. 2007. *Science and Technology of Advanced Materials* 8: 12-18.

Fröhlich E, Meindl C, Roblegg E, Griesbacher A, Pieber TR. *Cytotoxicity of nanoparticles is influenced by size, proliferation and embryonic origin of the cells used for testing*. 2012. *Nanotoxicology*. 6(4):424-39.

Fynnewever T.L, Agcaoili E.S., Jacobson J.D., Patton W.C., Chan PJ. *In vitro tagging of embryos with nanoparticles*. 2007. *J Assist Reprod Genet*. 24(2-3):61-5.

Gabriel D, Dvir T, Kohane D.S. *Delivering bioactive molecules as instructive cues to engineered tissues*. 2012. *Expert Opin Drug Deliv*. 9:473-492.

Gardiner K., vanTongeren M., Harrington M.. *Respiratory health effects from exposure to carbon black: results of the phase 2<sup>nd</sup> and 3<sup>rd</sup> cross sectional studies in the European carbon black manufacturing industry*. 2001. *Occup Environ Med*. 58: 496-503.

Garnett M.C. *Gene delivery systems using cationic polymers*. 1999. *Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Syst*. 16 147–207.

Garvie L.A.J., Buseck RR. *Nanosized carbon-rich grains in carbonaceous chondrite meteorites*. 2004. *Earth Planet Sci Lett*. 224: 431-9.

Gaumet M, Gurny R, Delie F. *Localization and quantification of biodegradable particles in an intestinal cell model: the influence of particle size*. 2009. Eur J Pharm Sci. 36:465-73.

Gazzetta Ufficiale dell'Unione Europea, 2008. <http://eur-lex.europa.eu>

Geiser M, Schruch S, Gehr P. *Influence of surface chemistry and topography of particles on their immersion in the lung's surface-lining layer*. 2003. J Appl Physiol. 94:1793-801.

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*. 2005. Environ Health Perspect. 113(11):1555-60.

Georges P. C. and Janmey, P. A. *Cell typespecific response to growth on soft materials*. 2004. J. Appl. Physiol. 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*. 2012. Mutat Res. 12;749(1-2)

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*. 2000. Colloids Surf B Biointerfaces. 18(3-4):301-313.

Gromadzka-Ostrowska J, Dziendzikowska K, Lankoff A, Dobrzyńska M, Instanes C, Brunborg G, Gajowik A, Radzikowska J, Wojewódzka M, Kruszewski M. *Silver nanoparticles effects on epididymal sperm in rats*. 2012. Toxicol Lett. 214(3):251-8.

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

Guadagnini R, Moreau K, Hussain S, Marano F, Boland S. *Toxicity evaluation of engineered nanoparticles for medical applications using pulmonary epithelial cells*. 2013. *Nanotoxicology*. [Epub ahead of print]

Gullberg E, Keita AV, Salim SY, Andersson M, Caldwell KD, Soderholm JD, Artursson P. *Identification of cell adhesion molecules in the human follicle-associated epithelium that improve nanoparticle uptake into the Peyer's patches*. 2006. *J Pharmacol Exp Ther*. 319:632-9.

Gumbleton M. *Caveolae as potential macro- molecule trafficking compartments within alveolar epithelium*. 2001. *Adv Drug Deliv Rev*. 49:281-300.

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*. 2009. *Zhonghua Nan Ke Xue*. 15(6):517-22.

Guzman K.A.D., Taylor M.R., Banfield J. *Environmental risk of nanotechnology: national nanotechnology initiative funding, 2000-2004*. 2006. *Environ Sci Technol*. 40: 1401-7.

Gwinn MR, Vallyathan V *Nanoparticles: health effects--pros and cons*. 2006. *Environ Health Perspect*. 114(12):1818-25.

Handy RD, Henry TB, Scown TM, Johnston BD, Tyler CR: *Manufactured nanoparticles: their uptake and effects on fish—a mechanistic analysis*. 2008. *Ecotoxicol*. 17:396-409.

Hasselov M, Readman JW, Ranville JF, Tiede K. *Nanoparticle analysis and characterization methodologies in environmental risk assessment of engineered nanoparticles*. 2008. *Ecotoxicology*. 17:344-61

Hidaka H, Kobayashi H, Kolke T, Sato T, Serpone N. *DNA damage photoinduced by cosmetic pigments and sunscreen agents under solar exposure and artificial UV illumination*. 2006. *J Oleo Sci*. 55:249-61.

- Higginbotham JN, Seth P, Blaese RM, Ramsey WJ. *The release of inflammatory cytokines from human peripheral blood mononuclear cells in vitro following exposure to adenovirus variants and capsid*. 2002. Hum Gene Ther. 13(1):129-41.
- Hillyer JF and Albrecht RM. *Gastrointestinal persorption and tissue distribution of differently sized colloidal gold nanoparticles*. 2001. J Pharm Sci. 90(12):1927-36.
- Hischemöller A, Nordmann J, Ptacek P, Mummenhoff K, Haase M: *In-vivo imaging of the uptake of upconversion nanoparticles by plant roots*. 2009. J Biomed Nanotechnol . 5(3):278-284.
- Hoet PH, Bröske-Hohlfeld I, Salata OV. *Nanoparticles - known and unknown health risks*. 2004. J Nanobiotechnology. 2(1):12.
- Holsapple M.R., Farland. W.H., Landry TD, Monteiro-Riviere N.A., Carter J.M., Walker N.J., Thomas K.V. *Research strategies for safety evaluation on nanomaterials, part II: toxicological and safety evaluation on nanomaterials, current challenges and data needs*. 2005. Toxicological Sciences. 88: 12-7.
- Hoon, H.; Fortner, J.; Hughes, J.; Kim, J. *Natural organic matter stabilizes carbon nanotubes in the aqueous phase*. 2007. Environ. Sci. Techn. 41, 179-184.
- Hsin YH, Chen CF, Huang S, Shih TS, Lai PS, Chueh PJ. *The apoptotic effect of nanosilver is mediated by a ROS- and JNK-dependent mechanism involving the mitochondrial pathway in NIH3T3 cells*. 2008. Toxicol Lett. 179(3):130-9.
- Hu YL, Qi W, Han F, Shao JZ, Gao JQ. *Toxicity evaluation of biodegradable chitosan nanoparticles using a zebrafish embryo model*. 2011. Int J Nanomedicine. 6:3351-9.
- Huang CP, Cha DK, Ismat SS *Progress report: short-term chronic toxicity of photocatalytic nanoparticles to bacteria, algae, and zooplankton*. 2005 University of Delaware

Huang W, Tan J, Kan H, Zhao N, Song W, Song G, Chen G, Jiang L, Jiang C, Chen R, Chen B. *Visibility, air quality and daily mortality in Shanghai, China*. 2009. *Sci Total Environ*. 407(10):3295-300.

Huczko A, H Lange, E Calko, H Grubeck-Jaworska, P Droszez. *Physiological testing of carbon nanotubes: Are they asbestos-like ?* 2001. *Fullerene Sci Technol*. 9 (2), 251-254.

Hund-Rinke K, Simon M. *Ecotoxic effect of photocatalytic active nanoparticles (TiO<sub>2</sub>) on algae and daphnids*. 2006. *Environ Sci Poll Res* 13: 225–232.

Hunter D.D, Udem B.J. *Identification and substance P content of vagai afferent neurons innervating the epithelium of the guinea pig trachea*. 1999. *Am J Respir Crit Care Med*. 159: 1943-8.

Hunter D.D., Dey R.D. *Identification and neuropeptide content of trigeminal neurons innervating the rat nasal epithelium*. 1998. *Neuroscience*. 83: 591-9.

Hussain N, Jaitley V, Florence AT. *Recent advances in the understanding of uptake of microparticulates across the gastrointestinal lymphatics*. 2001. *Adv Drug Deliv Rev*. 50:07-42.

Hussain S.M., Hess K.L., Gearhart M.j., Geiss K.T., Schlager J.J. *In vitro toxicology of nanoparticles in BRL 3A rat liver cells*. 2005. *Toxicology in Vitro*. 19(7):975-983.

Hussain SM, Javorina AK, Schrand AM, Duhart HM, Ali SF, Schlager JJ. *The interaction of manganese nanoparticles with PC-12 cells induces dopamine depletion*. 2006. *Toxicol Sci*. 92(2):456-63.

Ibald-Mulli A, HE Wichmann, W Kreyling, A Peters. *Epidemiological evidence on health effects of ultrafine particles*. 2002. *J Aerosol Med*. 15, 189-201.

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

Istituto di Ricerche Farmacologiche Mario Negri, *Nanoparticelle negli alimenti ed effetti sulla salute umana*. 2008.

Jacob D.J. and Winner D.A. *Effect of climate change on air quality*. 2009. Atmospheric Environment 43: 51–63

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

Jani P, Halbert GW, Langridge J, Florence AT . *Nanoparticle uptake by the rat gastrointestinal mucosa: quantitation and particle size dependency*.1990. J Pharm Pharmacol. 42:821-6.

Jenkins J., Roy K.M., Driscoll C.T., Buerkett C. *Acid Rain and the Adirondacks: An Environmental History*. 2007. Cornell University Press. Ithaca, NY.

Kagan VE, Tyurina YY, Tyurin VA, Konduru NV, Potapovich AI, Osipov AN, et al. *Direct and indirect effects of single walled carbon nanotubes on RAW 264.7 macrophages: role of iron*. 2006. Toxicol Lett. 165(1):88- 100.

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*. 2005. Proc Natl Acad Sci U S A. 102(33):11600-5.

Kanagesan S., Hashim M., Tamilselvan S., Alitheen N. B., Ismail I., Bahmanrokh G. *Cytotoxic Effect of Nanocrystalline MgFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub> Particles for Cancer Cure*. 2013. Journal of Nanomaterials Article ID 865024, 8 pages.

Kashiwada S. *Distribution of nanoparticles insee-through Medaka (Oryza latipes)*. 2006. Enviromental Health Perspectives. 114(11):1697-1702.

Keselowsky B.G., Collard D.M., Garcia A.J. *Surface chemistry modulates focal adhesion composition and signaling through changes in integrin binding*. 2004. *Biomaterials*. 25(28):5947-54.

Khaing Oo MK, Yang Y, Hu Y, Gomez M, Du H, Wang H. *Gold nanoparticle-enhanced and size-dependent generation of reactive oxygen species from protoporphyrin IX*. 2012. *ACS Nano*. 6(3):1939-47.

Kim T., Momin E., Choi J, Yuan K, Zaidi H, Kim J, Park M, Lee N, McMahon MT, Quinones-Hinojosa A, Bulte JW, Hyeon T, Gilad AA. *Mesoporous silica-coated hollow manganese oxide nanoparticles as positive T1 contrast agents for labeling and MRI tracking of adipose-derived mesenchymal stem cells*. 2011. *J Am Chem Soc*. 133(9):2955-61

Kinney P.L. *Climate change, air quality, and human health*. 2008 *Am J Prev Med*. 35(5): 459–467.

Kishore AS, Surekha P, Murthy B. *Assessment of the dermal and ocular irritation potential of multi-walled carbon nanotubes by using in vitro and in vivo methods*. 2009. *Toxicol Letters*. 191(2-3):268-74.

Koyama S, Endo M, Kim Y-A, Hayashi T, Ya-nagisawa T, Osaka K, Koyama H, Haniu H, Kuroiwa N. *Role of systemic T-cells and histopathological aspects after subcutaneous implantation of various carbon nanotubes in mice*. 2006. *Carbon*. 44:1079-92.

Kreuter J. *Influence of the surface properties on nanoparticle-mediated transport of drugs to the brain*. 2004. *J Nanosci Nanotechnol*. 4:484-8.

Kroll A., Pillukat Mike H., Hahn D.. *Current in vitro methods in nanoparticle risk assessment: Limitations and challenges*. 2009. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. 72(2):370–377

- Ku B.K. and Maynard A.D. *Comparing aerosol surface-area measurement of monodisperse ultrafine silver agglomerates using mobility analysis, transmission electron microscopy and diffusion charging*. 2005. *J Aerosol Sci.* 36(9), 1108-1124
- Kuo P.Y., Saltzman W.M.. *Novel systems for controlled delivery of macromolecules*. 1996. *Crit. Rev. Eukaryotic Gene Expr.* 6 (1) 59–73.
- La Rovere MT, Bigger Jr JT, Marcus FI, Mortara A, Schwartz PJ. *Baroreflex sensitivity and heart rate variability in the prediction of total cardiac mortality after myocardial infarction*. 1998. *Lancet.* 351:478-84.
- Labarre D, Vauthier C, Chauvierre C, Petri B, Muller R, Chehimm MM. *Interactions of blood proteins with poly(isobutylcyanoacrylate) nanoparticles decorated with a polysaccharidic brush*. 2005. *Biomaterials.* 26:5075-81.
- Labhasetwar V., Bonadio J., Goldstein S.A., Levy R.J. *Gene transfection using biodegradable nanospheres: results in tissue culture and a rat osteotomy model*. 1999. *Colloids Surfaces B: Biointerfaces* . 16: 281–290.
- Labrenz M., Druschel G.K., Thomsen-Ebert T, Gilbert B., Welch S.A., Kemner K.M., Logan G.A., Summons R.E., De Stasio G., Bond RL, Lai B., Kelly S.D., Banfield J.F.. *Formation of sphalerite (ZnS) deposits in natural biofilms of sulfate-reducing bacteria*. 2000. *Science.* 290: 1744-7.
- Lai JC, Lai MB, Jandhyam S, Dukhande VV, Bhushan A, Daniels CK, Leung SW. *Exposure to titanium dioxide and other metallic oxide nanoparticles induces cytotoxicity on human neural cells and fibroblasts*. 2008. *Int J Nanomedicine.* 3:533-45.
- Lai JC, Minski MJ, Chan AW, Lim L. *Interrelations between manganese and other metal ions in health and disease*. 2000. *Met Ions Biol Syst.* 37:123-56.
- Lammers T., Subr V., Ulbrich K., Hennink W.E., Storm G., Kiessling F. *Polymeric nanomedicines for image-guided drug delivery and tumortargeted combination therapy*. 2010. *Nano Today.* 5:197–212.

Larese Filon F, D'Agostin F, Crosera M, Adami G, Renzi N, Bovenzi M, Maina G. *Human skin penetration of silver nanoparticles through intact and damaged skin*. 2009. *Toxicol*. 255:33-7.

Lee J. N., Jiang X., Ryan D., Whitesides G. M.. *Compatibility of mammalian cells on surfaces of poly(dimethylsiloxane)*. 2004. *Langmuir*. 20, 11684–11691.

Lee K.Y., Kwon I.C., Kim Y.H., Jo W.H., Jeong S.Y. *Preparation of chitosan self-aggregates as a gene delivery system*. 1998. *J. Controlled Release* 51:213–220.

Lee KJ, Browning LM, Nallathamby PD, Desai T, Cherukuri PK, Xu XH. *In vivo quantitative study of sized-dependent transport and toxicity of single silver nanoparticles using zebrafish embryos*. 2012. *Chem Res Toxicol*. 25(5):1029-46.

Lee Kl., Nallathamby PD., Browning LM., Osgood CJ., Xu XHN. *In vivo imaging of transport and biocompatibility of single silver nanoparticles in early development of zebrafish embryos*. 2007. *ACS Nano* 1:133-143.

Legramante JM, Valentini F, Magrini A, Palleschi G, Sacco S, Iavicoli I, Pallante M, Moscone D, Galante A, Bergamaschi E, Bergamaschi A, Pietroiusti A. *Cardiac autonomic regulation after pulmonary exposure to carbon nanotubes*. 2009. *Hum Exp Toxicol*. 28:369-75.

Lewinski, N., Colvin, V., Drezek, R. *Cytotoxicity of nanoparticles*. 2008. *Small* 4, 26–49.

Li PW, Kuo TH, Chang JH, Yeh JM, Chan WH. *Induction of cytotoxicity and apoptosis in mouse blastocysts by silver nanoparticles*. 2010. *Toxicol Lett*. 197(2):82-7.

Li X, Xu S, Zhang Z, Schluesener HJ. *Apoptosis induced by titanium dioxide nanoparticles in cultured murine microglia N9 cells*. 2009. *Chinese Sci Bull*. 54:3830-6.

Li Z, Hulderman T, Salmen R, Chapman R, Leonard SS, Young S-H, Shvedova A, Luster MI, Simeonova PP. *Cardiovascular effects of pulmonary exposure to single-wall carbon nanotubes*. 2007. *Environ Health Persp*. 115:377-82.

Lin D, Xing B. *Root uptake and phytotoxicity of ZnO nanoparticles*. 2008. *Environ Sci Technol* 42(15):5580-5585.

Lines MG. *Nanomaterials for practical functional uses*. 2008. *J Alloys Comp*. 449: 242-245.

Linse S, Cabaleiro-Lago C, Xue W-F, Lynch I, Lindman S, Thulin E, Radford SE, Dawson KA. *Nucleation of protein fibrillation by nanoparticles*. 2007. *PNAS*. 8691-7.

Lipka J, Semmler-Behnke M, Sperling RA, Wenk A, Takenaka S, Schleh C, Kissel T, Parak WJ, Kreyling WG. *Biodistribution of PEG-modified gold nanoparticles following intratracheal instillation and intravenous injection*. 2010. *Biomaterials*. 31(25):6574-81.

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*. 2011. *Biomaterials*. 32(32):8291-303.

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

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

Lockman PR, Koziara JM, Mumper RJ, Allen DD. *Nanoparticle surface charges alter blood-brain barrier integrity and permeability*. 2004. *J Drug Target* . 12:635-41.

Lockman RR., Mumper R.J., Khan M.A, Alien D.D.. *Nanoparticle technology for drug delivery across the blood-brain barrier*. 2002. *Drug Dev Ind Pharm*. 28: 1-12.

Lomer MC, Thompson RP, Powell JJ. *Fine and ultrafine particles of the diet: influence on the mucosal immune response and association with Crohn's disease*. 2002. Proc Nutr Soc. 61(1):123-30.

Long TC, Tajuba J, Sama P, Saleh N, Swartz C, Parker J, Hester S, Lowry GV, Veronesi B. *Nanosized titanium dioxide stimulates reactive oxygen species in brain microglia and damages neurons in vitro*. 2007. Environ Health Perspect. 115:1631-7.

Lovern and Klaper. *Daphnia magna mortality when exposed to titanium oxide and fullerene (C60) nanoparticles*. 2006. Environmental Toxicology and Chemistry. 23(4):1132-1137.

Lovett G.M, Tear T.H, Evers D.C, Findlay S.E, Cosby B.J, Dunscomb J.K, Driscoll C.T, Weathers K.C. *Effects of air pollution on ecosystems and biological diversity in the eastern United States*. 2009. Ann N Y Acad Sci. 1162:99-135.

Lux Research. *Overhyped technology starts to reach potential: nanotech to impact \$ 3.1 trillion in manufactured goods in 2015*. 2008. Lux Research Inc, New York.

Ma L, Liu J, Li N, Wang J, Duan Y, Yan J, Liu H, Wang H, Hong F. *Oxidative stress in the brain of mice caused by translocated nano- particulate TiO<sub>2</sub> delivered to the abdominal cavity*. 2010. Biomaterials. 31:99-105.

Mafune F, Kohno J, Takeda Y, Kondow T, Sawabe H. *Structure and stability of silver nanoparticles in aqueous solution produced by laser ablation*. 2000. J Phys Chem B 104:8333–8337.

Mahmoundi M., Hofmann H., Rothen-Rutishauser B., Petri-Fink A. *Assessing the in vitro and in vivo toxicity of superparamagnetic iron oxide nanoparticles*. 2012. Chem. Rev. 112(4):2323-38.

Manzo L. *Nanotoxicology contributes to responsible innovation*. 2011. Nanotechitaly. 153-154.

Manzo L., Bernardini G., Castellini C., Renieri T., Trevisan N., Di Gioacchino M., Sabbioni E. *Nanotossicologia concetti e applicazione*. 2012. Informazioni della Difesa 2.

Marconi A. *Materiale particellare aerodisperso: definizioni, effetti sanitari, misura e sintesi delle indagini ambientali effettuate a Roma*. 2003. Istituto Superiore della Sanità. 39: 329-42.

Marconi A. *Particelle fini, ultrafini e nanoparticelle in ambiente di vita e di lavoro: possibili effetti sanitari e misura dell'esposizione inalatoria*. 2006. G Ital Med Lav Erg. 28: 258-65.

Markides H., Rotherham M., El Haj A. J. *Biocompatibility and Toxicity of Magnetic Nanoparticles in Regenerative Medicine*. 2012. Journal of Nanomaterials. Article ID 614094, 11 pages

Mavon A, Miquel C, Lejeune O, Payre B, Moretto P. *In vitro percutaneous absorption and in vivo stratum corneum distribution of an organic and mineral sunscreen*. 2007. Skin Pharmacol Physiol. 20:10-20.

Maynard A.D. and Zimmer A.T. *Evaluation of grinding aerosols in terms of alveolar dose: The significance of using mass, surface-area and number metrics*. 2002. Ann Occup Hyg . 46 (Suppl. 1), 320-322.

Maynard AD, Baron PA, Foley M, Shvedova AA, Kissin ER, Castranova V. *Exposure to carbon nanotube material: aerosol release during the handling of unrefined single-walled carbon nanotubes*. 2004. J Toxicol Environ Health A. 67:87-107.

Maynard AD, Warheit DB, Philbert MA., *The new toxicology of sophisticated materials. Nanotoxicology and beyond*. 2011. Toxicol Sci, 120: S109-S129.

Me Murry R.H. *A review of atmospheric aerosol measurements*. 2000. Atmos environ. 3: 1959-99.

Meena R., Pal R., Pradhan S.N., Rani M., Paulraj R. *Comparative study of TiO<sub>2</sub> and TiSiO<sub>4</sub> nanoparticles induced oxidative stress and apoptosis of HEK-293 cells.* 2012. *Adv. Mat. Lett.* 3(6): 459-465

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

Miao AJ, Quigg A, Schwehr K, Xu C, Santschi P *Engineered silver nanoparticles (ESNs) in coastal marine environments: bioavailability and toxic effects to the phytoplankton *Thalassiosira weissflogii*.* 2007. 2nd International conference on the environmental effects of nanoparticles and nanomaterials, 24<sup>th</sup>–25<sup>th</sup> September, London UK

Mickova A, Buzgo M, Benada O, Rampichova M, Fisar Z, Filova E, Tesarova M, Lukas D, Amler E. *Core/shell nanofibers with embedded liposomes as a drug delivery system.* 2012. *Biomacromolecules.* 13:952-962.

Mironava T, Simon M, Rafailovich MH, Rigas B. *Platinum folate nanoparticles toxicity: cancer vs. normal cells.* 2013. *Toxicol In Vitro.* 27(2):882-9

Mitchell LA, Gao J, Wal RV, Gigliotti A, Burchiel SW, McDonald JD. *Pulmonary and systemic immune response to inhaled multiwalled carbon nanotubes.* 2007. *Toxicol Sci.* 100(1):203-14.

Moghimi SM, Patel HM. *Serum-mediated recognition of liposomes by phagocytic cells of the reticuloendothelial system. The concept of tissue specificity.* 1998. *Adv Drug Delivery Rev.* 32:45-61.

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

Mohanraj VJ., Chen Y. *Nanoparticles – A Review.* 2006. *Trop. J. of Pharm. Res.* 5 (1): 561-573.

Monteiro-Riviere NA, Nemanich RJ, Inman AO, Wang YY, Riviere JE. *Multi-walled carbon nanotubes interactions with human epidermal keratinocytes*. 2005. *Toxicology Letters*. 155:377-84.

Monteith, D.T., Stoddard J.L., Evans C.D., de Wit H.A, Forsius M., Høgåsen T., Wilander A., Skjelkvåle B.L., Jeffries D.S., Vuorenmaa J., Keller B., Kopáček J., Vesely J. *Dissolved organic carbon trends resulting from changes in atmospheric deposition chemistry*. 2007. *Nature*. 450: 537–540.

Moore, M. *Do nanoparticles present ecotoxicological risks for the health of the aquatic environment?* 2006. *Environ. Int.* 32, 967-976.

Moretti E, Terzuoli G, Renieri T, Iacoponi F, Castellini C, Giordano C, Collodel G. *In vitro effect of gold and silver nanoparticles on human spermatozoa*. 2013. *Andrologia*. 45(6):392-6.

Moshhammer H. and Neuberger M. *The active surface of suspended particles as a predictor of lung function and pulmonary symptoms in Austrian school children*. 2003. *Atmos Environ*. 37, 1737-1744.

Mossman BT, Borm PJ, Castranova V, Costa DL, Donaldson K, Kleeberger SR. *Mechanisms of action of inhaled fibers, particles and nanoparticles in lung and cardiovascular disease*. 2007. *Particle and Fibre Toxicology*. 4:1-6

Mouchet F, Landois P, Sarremejean E, Bernard G, Puech P, Pinelli E, Flahaut E, Gauthier L. *Characterisation and in vivo ecotoxicity evaluation of double-wall carbon nanotubes in larvae of the amphibian *Xenopus laevis**. 2008. *Aquat Toxicol* 87: 127–137.

Muldoon LL, Pagel MA, Kroll RA, Roman-Goldstein S, Jones RS, Neuwelt EA: *A physiological barrier distal to the anatomic bloodbrain barrier in a model of transvascular delivery*. 1999. *Am J Neuroradiol*. 20:217-22.

- Muller J, Huaux F, Moreau N, Misson P, Heilier JF, Delos M, Arras M, Fonseca A, Nagy JB, Lison D. *Respiratory toxicity of multi-wall carbon nanotubes*. 2005. *Toxicol Appl Pharmacol*. 207:221-31.
- Muller RH, Keck CM. *Drug delivery to the brain – realization by novel drug carriers*. 2004. *J Nanosci Nanotechnol*. 4:471-83.
- Murdock RC, Braydich-Stolle L, Schrand AM, Schlager JJ, Hussain SM. *Characterization of nanomaterial dispersion in solution prior to in vitro exposure using dynamic light scattering technique*. 2008. *Toxicol Sci*. 101:239-53.
- Navarro E, Baun A, Behra R, Hartmann NB, Filser J, Miao AJ, Quigg A, Santschi PH, Sigg L. *Environmental behavior and ecotoxicity of engineered nanoparticles to algae, plants, and fungi*. 2008. *Ecotoxicol*. 17:372-386.
- Nel A, Xia T, Mädler L, Li N. *Toxic potential of materials at the nanolevel*. 2006. *Science*. 311: 622-627.
- Nel AE, Madler L, Velegol D, Xia T, Hoek EM, Somasundaran P, Klaessing F, Castranova V, Thompson M. *Understanding biophysicochemical interactions at the nanobio interface*. 2009. *Nat Mater*. 8 (7):543-57.
- Nelson SM, Mahmoud T, Beaux M, Shapiro P, McIlroy DN, Stenkamp DL. *Toxic and teratogenic silica nanowires in developing vertebrate embryos*. 2010. *Nanomedicine*. 6(1):93-102.
- Nemmar A, Hoet PHM, Vandervoort P, Dinsdale D, Nemery B, Hoylaers MF. *Enhanced peripheral thrombogenicity after lung inflammation is mediated by platelet-leukocyte activation: role of P-selectin*. 2007. *J Thromb Haemost*. 5:1217-26.
- 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*. 2002. *Am J Respir Crit Care Med*. 166(7):998-1004.

Nemmar, A., P. H. Hoet, B. Vanquickenborne, D. Dinsdale, M. Thomeer, M. F. Hoylaerts, H. Vanbilloen, L. Mortelmans, and B. Nemery. *Passage of inhaled particles into the blood circulation in humans*. 2002. *Circulation* 105:411-4.

Newman MD, Stotland M and Ellis JI. *The safety of nanosized particles in titanium dioxide and zinc oxide – based sunscreens*. 2009. *J Am Acad Dermatol*. 61:685-692.

NNI, Roco M.C. *National Nanotechnology Initiative: past, present and future?*. 2006.

Nohynek GJ, Antignac E, Re T, Toutain H. *Safety assessment of personal care products/cosmetics and their ingredients*. 2009. *Toxicol Appl Pharmacol*.

O'Hagan DT. *The intestinal uptake of particles and implications for drug and antigen delivery*. 1996. *J Anat*. 189 (Pt 3):477-82.

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*. 1993. *J. Cell. Sci*. 106; 343-54.

Oberdörster E. *Manufactured nanomaterials (fullerenes, C60) induce oxidative stress in the brain of juvenile largemouth bass*. 2004. *Environ Health Perspect* 112: 1058–1062.

Oberdörster E, Zhu SQ, Blickley TM, McClellan-Green P, Haasch ML. *Ecotoxicology of carbon-based engineered nanoparticles: effects of fullerene (C-60) on aquatic organisms*. 2006. *Carbon* 44: 1112–1120.

Oberdörster G, Sharp Z, Elder AP, Gelein R, Kreyling W, Cox C: *Translocation of inhaled ultrafine particles to the brain*. 2004. *Inhal Toxicol*. 16:437-45.

Oberdörster G., Maynard A., Donaldson K., Castranova V., Fitzpathck 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*. 2005. *Part Fibre Toxicol*. 2: 8.

- Oberdörster G., Oberdörster E., Oberdörster J. *Nanotoxicology: an emerging discipline evolving from studies of ultrafine particles*. 2005. *Environ Health Perspect.* 113: 823-39.
- Oberdörster G. *Safety assessment of nanotechnology and nanomedicine: concepts of nanotoxicology*. 2009. *J Int Med.* 267: 89-105.
- Ohara P.T. and Buck R.C. *Contact guidance in vitro: a light, transmission, and scanning electron microscopic study*. 1979. *Exp. Cell. Res.* 121, 235-49.
- Oligino T.J., Yao Q., Ghivizzani S.C., Robbins P. *Vector systems for gene transfer to joints*. 2000. *Clin. Orthop.* 379 S17–S30.
- Organizzazione Mondiale della Sanità (OMS) - *Air Quality Guidelines for Europe-Second Edition*. 2000
- Orlova Y, Magome N, Liu L, Chen Y, Agladze K. *Electrospun nanofibers as a tool for architecture control in engineered cardiac tissue*. 2011. *Biomaterials.* 32:5615-5624.
- Paddle-Ledinek JE, Nasa Z, Cleland HJ. *Effect of different wound dressings on cell viability and proliferation*. 2006. *Plast Reconstr Surg.* 117:110S-8S.
- Panyam J. and Labhasetwar V. *Biodegradable nanoparticles for drug and gene delivery to cells and tissue*. 2012. *Advanced Drug Delivery Reviews* 64: 61–71.
- 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*. 2002. *FASEB J.* 16(10):1217-26.
- 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*. 2007. *Biomaterials.* 28(19):2946-58.
- Park EJ, Choi J, Park YK, Park K. *Oxidative stress induced by cerium oxide nanoparticles in cultured BEAS-2B cells*. 2008. *Toxicology.* 245(1-2):90-100.

Pawar K, Kaul G. *Toxicity of titanium oxide nanoparticles causes functionality and DNA damage in buffalo (Bubalus bubalis) sperm in vitro*. 2012. *Toxicol Ind Health*. [Epub ahead of print]

Pekkanen J., Brunner E.J., Anderson H.R., Tiittanen R, Atkinson R.W. *Daily concentrations of air pollution and plasma fibrinogen in London*. 2000. *Occup Environ Med*. 57: 818-22.

Pelham Jr R. J. and Wang Y. *Cell locomotion and focal adhesions are regulated by substrate flexibility*. 1997. *Proc. Natl Acad. Sci*. 94, 13 661–13 665.

Penttinen P, KL Timonen, P Tittanen, A Mirme, J Ruuskanen, J Pekkanen. *Ultrafine particles in urban air and respiratory health among adult asthmatics*. 2001. *Eur Respir J*. 17, 428-435.

Peters A, H R Wichmann, T Tuch, J Heinrich, J Heyder. *Respiratory effects are associated with the number of ultrafine particles*. 1997. *Am. J. Respir. Crit. Care Med*. 155, 1376-1383.

Petros R.A. and DeSimone J.M. *Strategies in the design of nanoparticles for therapeutic applications*. 2010. *Nat Rev Drug Discov*. 9(8):615-27.

Peyton S. R. and Putnam A. J. *Extracellular matrix rigidity governs smooth muscle cell motility in a biphasic fashion*. 2005. *J. Cell. Physiol*. 204, 198–209.

Pietrojusti A, Massimiani M, Fenoglio I, Colonna M, Valentini F, Palleschi G, Camaioni A, Magrini A, Siracusa G, Bergamaschi A, Sgambato A, Campagnolo L. *Low doses of pristine and oxidized single-wall carbon nanotubes affect mammalian embryonic development*. 2011. *ACS Nano*. 5(6):4624-33.

Pisanic II T.R., Blackwell J.D., Shubayev V.I., Finones R.R., Jin S. *Nanotoxicity of iron oxide nanoparticles internalization in growing neurons*. 2007. *Biomaterials*. 28(16):2572-2581.

Poluzzi V., Ricciardelle I., Maccone C. *Il monitoraggio ambientale di polveri ultrafini e nanoparticelle*. 2006. Arpa Emilia Romagna, Eccellenza ecosistemi urbani e industriali. Ferrara.

Poma A., Di Giorgio ML. *Toxicogenomics to Improve Comprehension of the Mechanisms Underlying Responses of In Vitro and In Vivo Systems to Nanomaterials: A Review*. 2008. *Curr Genomics*. 9(8):571–585.

Pope CA, RT Burnett, GD Thurston, MJ Thun, EE Calle, D Krewski, JJ Godleski. *Cardiovascular mortality and long-term exposure to particulate air pollution : epidemiological evidence of general pathophysiological pathways of disease*. 2004. *Circulation*. 109 (1), 71-74.

Powers KW, Brown SC, Krishna VB, Wasdo SC, Moudgil BM, Roberts SM.. *Research strategies for safety evaluation of nanomaterials. Part VI. Characterization of nanoscale particles for toxicological evaluation*. 2006. *Toxicol Sci*. 90:296-303.

Pozzi Mucelli R. *Considerazioni sui mezzi di contrasto per risonanza magnetica*. 2004. *Radio1 Med* 107 ( suppl al N. 4 ); 32-33.

Qi H, Hu P, Xu J, Wang A: *Encapsulation of drug reservoirs in fibers by emulsion electrospinning: morphology characterization and preliminary release assessment*. 2006. *Biomacromolecules*. 7:2327-2330.

Quong D. and Neufeld R.J. *DNA protection from extracapsular nucleases, within chitosan or poly-L-lysine-coated alginate beads*. 1998. *Biotechnol Bioeng*. 60:124–134.

Radhika Rajasree S.R, Ganesh Kumar V., Stanley Abraham L., Inbakandan D. *Studies of the toxicological effects of engineered nanoparticles in environment-a review*. 2010. *Journal on Applied Bioengineering*. Vol 2,N 4.

Radomski A, Jurasz P, Alonso-Escolano D, Drews M, Morandi M, Malinski T, Radomski MD. *Nanoparticle-induced platelet aggregation and vascular thrombosis*. 2005. *Br J Pharmacol*. 146:882-93.

Rahman Q., Lohani M., Dopp E., Pemsel H., Jonas L., Weiss D.G., Schiffmann D. *Evidence that ultrafine titanium dioxide induces micronuclei and apoptosis in Syrian hamster embryo fibroblasts*. 2002. *Environ Health Perspect*. 110: 797-800.

Rejman J, Oberle V, Zuhorn IS, Hoekstra D. *Size- dependent internalization of particles via the pathways of clathrin- and caveolae-mediated endocytosis*. 2004. *Biochem J*. 377:159-69.

Resnik DB and Tinkle SS. *Ethical issues in clinical trials involving nanomedicine*. 2007. *Contemporary Clinical Trials*. 28: 433–441.

Roh JY, Sim SJ, Yi J, Park K, Chung KH, Ryu DY, Choi J *Ecotoxicity of silver nanoparticles on the soil nematode *Caenorhabditis elegans* using functional ecotoxicogenomics*. 2009. *Environ Sci Technol* 3: 3933–3940.

Rouse JG, Yang J, Ryman-Rasmussen JP, Bar- ron AR, Monteiro-Riviere NA. *Effects of mechanical flexion on the penetration of fullerene amino acid-derivatized peptide nanoparticles through skin*. 2007. *Nano Lett*. 7:155-60.

Ruenraroengsak P, Novak P, Berhanu D, Thorley AJ, Valsami-Jones E, Gorelik J, Korchev YE, Tetley TD. *Respiratory epithelial cytotoxicity and membrane damage (holes) caused by amine-modified nanoparticles*. 2012. *Nanotoxicology*. 6(1):94-108

Ryan JJ, Bateman HR, Gomez G, Norton SK. *Fullerene nanomaterials inhibit the allergic resposte*. 2007. *J Immunol*. 1;665-72.

Ryman-Rasmussen JP, Riviere JE, Monteiro-Riviere NA. *Surface coatings determine cytotoxicity and irritation potential of quantum dot nanoparticles in epidermal keratinocytes*. 2007. *J Invest Dermatol*. 127(1):143-53.

Salvador-Morales C, Flahaut E, Sim E, Sloan J, Green MLH, Sim RB. *Complement activation and protein adsorption by carbon nanotubes*. 2006. *Mol Imm.* 43:193-201.

Sayes C, Fortner J, Guo W, Lyon D, Boyd A, Ausman K, Tao Y, Sitharaman B, Wilson J, Hughes J, West J, Colvin V. *The differential cytotoxicity of water-soluble fullerenes*. 2004. *Nano Letters.* 4(10):1881-7.

Sayes CM, Liang F, Hudson JL, Mendez J, Guo W, Beach JM, Moore VC, Doyle CD, West JL, Billups WE, Ausman KD, Colvin VL. *Functionalization density dependence of single-walled carbon nanotubes cytotoxicity in vitro*. 2006. *Toxicol Lett.* 161:135-42.

Sayes CM, Wahi R, Preetha AK, Liu Y, Jennifer LW, Kevin DA, David BW, Vicki LC. *Correlating nanoscale titania structure with toxicity: a cytotoxicity and inflammatory response study with human dermal fibroblasts and human lung epithelial cells*. 2006. *Toxicol Sci.* 92:174-85.

Schulz J, Hohenberg H, Pflücker F, Gartner E, Will, T, Pfeifer S, Wepf R, Wendel V, Gers-Barlag H, Wittern KP. *Distribution of sunscreens on skin*. 2002. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 54 (Suppl 1):S157-63.

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 19<sup>th</sup> 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 28<sup>th</sup> plenary meeting of 19 January 2009.

Scott-Fordsmand JJ, Krogh PH, Schaefer M, Johansen A: *The toxicity testing of double-walled nanotubes-contaminated food to Eisenia veneta earthworms*. 2008. *Ecotoxicol Environ Safet.* 71:616-619.

Seaton A, Mac Nee W, Donaldson K, Godden D. *Particulate air pollution and acute health effects*. 1995. *Lancet*. 345: 176-8.

Shimizu M, Tainaka H, Oba T, Mizuo K, Umezawa M, Takeda K. *Maternal exposure to nanoparticulate titanium dioxide during the prenatal period alters gene expression related to brain development in the mouse*. 2009. *Part Fibre Toxicol*. 6:20-7.

Shimizu Y, Isoda K, Tezuka E, Yufu T, Nagai Y, Ishida I, Tezuka M. *Influence of 50-nm polystyrene particles in inducing cytotoxicity in mice co-injected with carbon tetrachloride, cisplatin, or paraquat*. 2012. *Pharmazie*. 67(8):712-4.

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

Shvedova AA, Castranova V, Kisin ER, Schwegler-Berry D, Murray AR, Gandelsman VZ, Maynard A, Baron P. *Exposure to carbon nanotube material: assessment of nanotube cytotoxicity using human keratinocyte cells*. 2003. *J Toxicol Environ Health A*. 24;66(20):1909-26.

Shvedova AA, Fabisiak JP, Kisin ER, Murray AR, Roberts JR, Tyurina YY, Antonini JM, Feng WH, Kommineni C, Reynolds J, Bar-chowsky A, Castranova V, Kagan VE. *Sequential exposure to carbon nanotubes and bacteria enhances pulmonary inflammation and infectivity*. 2008. *Am J Resp Cell Mol Biol*. 38:579-90.

Shvedova AA, Kisin E, Murray AR, Johnson VJ, Gorelik O, Arepalli S, Hubbs AF, Mercer RR, Keohavong P, Sussman N, Jin J, Yin J, Stone S, Chen BT, Deye G, Maynard A, Castranova V, Baron PA, Kagan VE. *Inhalation versus aspiration of single walled carbon nanotubes in C57BL/6 mice: inflammation, fibrosis, oxidative stress and mutagenesis*. 2008. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 295:L552-65.

Shvedova AA, Sager T, Murray A, Kisin E, Porter DW, Leonard SS. *Critical issues in the evaluation of possible effects resulting from airborne nanoparticles*. 2007. Philadelphia: Informa Healthcare. In N. Monteiro-Riviere & L. Train (Eds.), *Nanotechnology: Characterization, Dosing and Health Effects*. 221-32.

Sibille Y, Reynolds HY. *Macrophages and polymorphonuclear neutrophils in lung defense and injury*. 1990. *Am Rev Resp Dis*. 141:471-501.

Simon-Deckers A, Gouget B, Mayne-L'hermite M, Herlin-Boime N, Reynaud C, Carrière M. *In vitro investigation of oxide nanoparticle and carbon nanotube toxicity and intracellular accumulation in A549 human pneumocytes*. 2008. *Toxicology*. 253(1-3):137-46.

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

Singh R, Pantarotto D, Lacerda L, Pastorin G, Klumpp C, Prato M, Bianco A, Kostarelos K. *Tissue distribution and blood clearance rates of intravenously administered carbon nanotube radiotracers*. 2006. *Proc Natl Acad Sci USA*. 103:3357-62.

Singh R, Pantarotto D, Lacerda L, Pastorin G, Klumpp C, Prato M, Bianco A, Kostarelos K. *Tissue biodistribution and blood clearance rates of intravenously administered carbon nanotube radiotracers*. 2006. *PNAS*. 103(9): 3357-3362.

Singh S, Nalwa HS. *Nanotechnology and health safety – Toxicity and risk assessment of nanostructured materials on human health*. 2007. *J Nanosci Nanotechnol* . 7(9): 3048-3070.

Smitha S., Gupta S.K., Bartnova A., Dusinska M., Gutleb A.C., Rahman Q. *Nanoparticles in the environment: assessment using causal diagram approach*. 2012. *Environmental Health*. 11(suppl 1):S13.

Southam G., Donald R.. *A structural comparison of bacterial microfossils vs. 'nanobacteria' and nanofossils*. 1999. *Earth Science Reviews*. 48: 251-64.

Spagnolo A.G. and Daloiso V. *Outlining ethical issues innanotechnologies*. 2009. *Bioethics*. 23,7:394-402.

Sudarenkov V. *Nanotechnology: balancing benefits and risks to public health and the environment*. Committee on Social Affairs, Health and Sustainable Development. 2012.

Sun X., Wang Z., Zhai S., Cheng Y., Liu J., Liu B. *In vitro cytotoxicity of silver nanoparticles in primary rat hepatic stellate cells*. 2013. *Molecular Medicine Reports*. Volume 8, issue 5.

Tan MH, Commens CA, Burnett L, Snitch PJ. *A pilot study on the percutaneous absorption of microfine titanium dioxide from sunscreens*. 1996. *Australas. J Dermatol*. 37:185-7.

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

The Project on Emerging Nanotechnologies Consumer Products Inventory. 2013. [www.nanotechproject.org](http://www.nanotechproject.org).

The Royal Society & The Royal Academy of Engineering. *Nanoscience and nanotechnologies: opportunities and uncertainties*. 2004.

Thevenot P, Nair A, Dey J, Yang J, Tang L. *Method to Analyze Three-Dimensional Cell Distribution and Infiltration in Degradable Scaffolds*. 2008. *Tissue Eng Part A*.

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

Tiede K, Boxall ABA, Tear SP, Lewis J, David H, Hasselov M. *Detection and characterization of engineered nanoparticles in food and the environment*. 2008. *Food Add Contam*. 25:795-821.

Tinkle S.S., Antonini J.M., Rich B.A, Roberts J.R., Salmen R., De Pree K., Adkins E.J.. *Skin as a route of exposure and sensitization in chronic beryllium disease*. 2003. *Environ Health Perspect*. 111: 1202-8.

Tin-Tin-Win-Shwe, Mitsushima D, Yamamoto S, Fukushima A, Funabashi T, Kobayashi T, Fujimaki H. *Changes in neurotransmitter levels and proinflammatory cytokine mRNA expressions in the mice olfactory bulb following nanoparticle exposure.* 2008. *Toxicol Appl Pharmacol.* 226:192-8.

Tin-Tin-Win-Shwe, Yamamoto S, Ahmed S, Kakeyama M, Kobayashi T, Fujimaki H. *Brain cytokine and chemokine mRNA expression in mice induced by intranasal instillation with ultrafine carbon black.* 2006. *Toxicol Lett.* 163:153-160

Truhaut, R. *Eco-toxicology—objectives, principles and perspectives.* 1977. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 1, 151–173.

Truong L, Sali KS, Miller JM, Hutchison JE, Tanguay RL. *Persistent adult zebrafish behavioral deficits results from acute embryonic exposure to gold nanoparticles.* 2012. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol.* 155(2):269-74.

Tsuji JS, Maynard AD, Howard PC, James JT, Lam CW, Warheit DB, Santamaria AB. *Research strategies for safety evaluation of nanomaterials, part IV: risk assessment of nanoparticles.* 2006. *Toxicol Sci.* 89:42-50.

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.* 2008. *Biomaterials.* 29, 1541–1551.

Uchino H, Minamikawa-Tachino R, Kristian T, Perkins G, Narazaki M, Siesjo BK, Shibasaki F. *Differential neuroprotection by ciclosporin A and FK506 following ischemia corresponds with differing abilities to inhibit calcineurin and the mitochondrial permeability transition.* 2002. *Neurobiol Dis.* 10:219-233.

Ungaro F., Biondi M., Indolfi L., De Rosa G., La Rotonda M.I., Quaglia F., Netti P. *Bioactivated polymer scaffolds for tissue engineering.* 2005. *Biomaterials- Topics in Tissue Engineering, Vol 2.* Eds. N. Ashammakhi & R.L. Reis © 2005.

Usenko CY, Harper SL, Tanguay RL. *Fullerene C60 exposure elicits an oxidative stress response in embryonic zebrafish*. 2008. *Toxicol Appl Pharmacol* 229: 44–55.

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

Van der Zee C., Roberts D.R., Racourt D.G., Slomp C.R. *Nahogoethite is the dominant reactive oxyhydroxide phase in lake and marine sediments*. 2003. *Geology*. 31: 993-6.

Vijayakumar S. and Ganesan S. *In Vitro Cytotoxicity Assay on Gold Nanoparticles with Different Stabilizing Agents*. 2012. *Journal of Nanomaterials* Article ID 734398, 9 pages

Vinogradov S.V., Bronich T.K., Kabanov A.V. *Nanosized cationic hydrogels for drug delivery : preparation, properties and interactions with cells*. 2002. *Adv. Drug Del. Rev.* 54, 223-233.

Vineis P, Forastiere F, Hoek G, Lipsett M. *Outdoor air pollution and lung cancer : recent epidemiologic evidence*. *Int J Cancer* 2004; 111, 647-652.

Vinu A., Hossain K.Z., Ariga K. *Recent advances in functionalization of mesoporous silica*. 2005. *J Nanosci Nanotechnol*. 5:347–371.

Visciano S. *Nanotechnologies, bioethics and human dignity*. 2011. *J Int Bioethique*. 22(1):17-36.

Vogel V, Sheetz M. *Local force and geometry sensing regulate cell functions*. 2006. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 7(4):265-75.

Wahajuddin and Arora S. *Superparamagnetic iron oxide nanoparticles: magnetic nanoplatforms as drug carriers*. 2012. *Int J Nanomedicine*. 7:3445-71.

Wang B, Feng WY, Zhu MT, Wang Y, Wang M, Gu YQ, Ouyang H, Wang H, Li M, Zhao Y, Chai Z, Wang H. *Neurotoxicity of low-dose repeatedly intranasal instillation of*

*nano- and submicron-sized ferric oxide particles in mice.* 2009. *J Nanoparticle Res.* 11:41-53.

Wang H, Wick RL, Xing B *Toxicity of nanoparticulate and bulk ZnO, Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> and TiO<sub>2</sub> to the nematode Caenorhabditis elegans.* 2009. *Environ Pollut* 157: 1171–1177.

Wang H. B., Dembo M., Wang Y. L. *Substrate flexibility regulates growth and apoptosis of normal but not transformed cells.* 2000. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 279, C1345–C1350.

Wang L, Castranova V, Rojanasakul Y, Lu Y, Scabilloni J, Mercer RR. *Direct fibrogenic effects of dispersed single walled carbon nanotubes on human lung fibroblasts.* 2008. *Toxicologist.* 102:A1499.

Wankhede M., Bouras A., Kaluzova M., Hadjipanayis C. G. *Magnetic nanoparticles: an emerging technology for malignant brain tumor imaging and therapy.* 2012. *Expert Rev Clin Pharmacol.* 5(2): 173–186.

Warheit DB, Borm PJ, Hennes C, Lademann J. *Testing strategies to establish the safety of nanomaterials: conclusions of an ECETOC workshop.* 2007. *Inhal Toxicol.* 19(8):631-43.

Warheit DB, Sayes CM, Reed KL, Swain KA. *Health effects related to nanoparticle exposures: environmental, health and safety considerations for assessing hazards and risks.* 2008. *Pharmacol Ther.* 120:35-42.

Warheit DB. *How meaningful are the results of nanotoxicity studies in the absence of adequate material characterization?* 2008. *Toxicol Sci.* 101:183-5.

Watkins A.J., Papenbrock T., Fleming T.P.. *The preimplantation embryo: handle with care.* 2008. *Semin Reprod Med.* 26:175–185.

Wichmann HE, Peters A. *Epidemiological evidence of the effects of ultrafine particle exposure.* 2000. *Phil. Trans. R. Soc. London.* A358, 2751-2769.

Wiesner, M.; Lowry, G.; Alvarez, P.; Dionysiou, D.; Biswas, P. *Assessing the role of manufactured nanomaterials*. 2006. *Environ. Sci. Tech.*, 40, 4336-4345.

Wilkinson P.C., Shields J.M., Haston W.S. *Contact guidance of human neutrophil leukocytes*. 1982. *Exp. Cell. Res.* 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*. 2005. *Biomaterials* 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*. 2009. *Tissue Eng. Part A.* 15, 147–154.

Witzmann FA and Monteiro-Riviere NA. *Multi-walled carbon nanotube exposure alters protein expression in human keratinocytes*. 2006. *Nanomedicine.* 2:158-68.

World Health Organization, [www.who.int](http://www.who.int)

Xia T, Li N, Nel AE. *Potential health impact of nanoparticles*. 2009. *Annu Rev Public Health.* 30:137-50.

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*. 2012. *Theranostics.* 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*. 2008. *Nanomedicine.* 4(2):139-45.

Yan, N.D., Somers K.M., Girard R.E., Paterson A.M., Keller W. B., Ramcharan C.W., Rusak J.A., Ingram R., Morgan G.E., Gunn J.M. *Longterm trends in zooplankton of Dorset, Ontario, lakes: the probable interactive effects of changes in pH, total*

*phosphorus, dissolved organic carbon, and predators*. 2008. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* **65**: 862– 877.

Yang L, Watts DJ: *Particle surface characteristics may play an important role in phytotoxicity of alumina nanoparticles*. 2005. *Toxicol Lett* . 158:122-132.

Yang W, Peters JI, Williams III RO. *Inhaled nanoparticles - A current review*. 2008. *Int J Pharm.* 356:239-47.

Yang W.J., Lee J.H., Hong S.C. , Lee J., Lee J., Han D.W. *Difference between Toxicities of Iron Oxide Magnetic Nanoparticles with Various Surface-Functional Groups against Human Normal Fibroblasts and Fibrosarcoma Cells*. 2013. *Materials*. 6(10):4689-4706.

Yasuda K, Inoue S, Tabata Y. *Influence of culture method on the proliferation and osteogenic differentiation of human adipo-stromal cells in nonwoven fabrics*. 2004. *Tissue Eng.* 10(9-0):1587-96.

Yin L, Cheng Y, Espinasse B, Colman BP, Auffan M, Wiesner M, Rose J, Liu J, Bernhardt ES. *More than the ions: the effects of silver nanoparticles on *Lolium multiflorum**. 2011. *Environ. Sci. Technol.* 45, 2360–2367

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*. 2000. *J Control Release.* 68(3):419–431.

Yuan JH, Chen Y, Zha HX, Song LJ, Li CY, Li JQ, Xia XH. *Determination, characterization and cytotoxicity on HELF cells of ZnO nano- particles*. 2010. *Colloids Surf B Biointerfaces.* 76(1):145-50.

Zaari N, Rajagopalan P, Kim S.K, Engler A.J, Wong J.Y. *Photopolymerization in Microfluidic Gradient Generators: Microscale Control of Substrate Compliance to Manipulate Cell Response*. 2004. *Advanced Materials* Vol. 16, Issue 23-24, 2133-2137.

Zabner J., Fasbender A.J., Moninger T., Poellinger K.A., Welsh M.J. *Cellular and molecular barriers to gene transfer by a cationic lipid*. 1995. *J. Biol. Chem.* 270 (32):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*. 2001. *J Control Release.* 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*. 2001. *J Biol Chem.* 276(37):35103-10

Zhang LW, Zeng L, Barron AR, Monteiro-Riviere NA. *Biological interactions of functionalized single-wall carbon nanotubes in human epidermal keratinocytes*. 2007. *Int J Toxicol.* 26:103-13

Zhang W, Lin K, Miao Y, Dong Q, Huang C, Wang H, Guo M, Cui X. *Toxicity assessment of zebrafish following exposure to CdTe QDs*. 2012. *J Hazard Mater.* 213-214:413-20.

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

Zhang Z., Kleinstreuer C., Donohue J.F., Kim C.S. *Comparison of micro and nano-size particle depositions in a human upper airway model*. 2005. *Journal of Aerosol Science.* 36: 211-33.

Zhang, W. *Nanoscale iron particles for environmental remediation: an overview*. 2003. *J. Nanopart. Res.* 5, 323-332.

Zhu X, Zhu L, Duan Z, Qi R, Li Y, Lang Y *Comparative toxicity of several metal oxide nanoparticle aqueous suspensions to zebrafish (Danio rerio) early developmental stage*. 2008. *J Environ Sci Health A* 43: 278–284.

Zhu X, Zhu L, Li Y, Duan Z, Chen W, Alvarez PJJ *Developmental toxicity in zebrafish (Danio rerio) embryos after exposure to manufactured nanomaterials: buckminsterfullerene aggregates (nC60) and fullerol*. 2007. *Environ Toxicol Chem* 26: 976–979.