

ALMA MATER STUDIORUM-UNIVERSITÀ DI BOLOGNA
SCUOLA DI FARMACIA, BIOTECNOLOGIE E SCIENZE MOTORIE
CORSO DI LAUREA IN BIOTECNOLOGIE

**VALUTAZIONE DELLA LOCALIZZAZIONE E DELLA TOSSICITÀ DI
NANOPARTICELLE DI SILICE FLUORESCENTI SU LINEE
CELLULARI TUMORALI UMANE**

Presentata da:
Giorgia Palladino

Matricola n°
0000683935

Relatore:
Prof. Giampaolo Zuccheri

Correlatore:
Dott.ssa Chiara Barattini

Anno accademico 2015/2016

1 - Scopo della tesi	3
2 - Introduzione	4
2.1 - Le nanoparticelle	4
2.1.1 - Applicazioni in campo biomedico	5
2.1.2 - Nanoparticelle AcZon	6
3 - Materiali e metodi	7
3.1 - Nanoparticelle	7
3.2 - Colture cellulari.....	8
3.3 - Analisi della vitalità cellulare.....	8
3.3.1 - Metodica enzimatica	8
3.3.2 - Metodica per esclusione	9
3.4 - Protocollo per l'analisi della vitalità cellulare	10
3.4.1 - Metodica enzimatica	10
3.4.2 - Metodica per esclusione	11
3.5 - Protocollo per la valutazione dell'uptake	13
4 - Risultati e discussione	15
4.1 - Studi preliminari.....	15
4.2 - Saggio di vitalità	15
4.3 - Valutazione della localizzazione.....	22
4.4 - Discussione	28
5 - Conclusioni	30
5.1 - Prospettive future	30
6 - Bibliografia	31
7 - Ringraziamenti	32

1 - Scopo della tesi

Le nanoparticelle di silice fluorescenti fanno parte del nuovo campo di ricerca delle nanotecnologie, attualmente tra i più interessanti soprattutto per le possibili applicazioni in campo biomedico/diagnostico. Per sfruttare le applicazioni di queste nanoparticelle è importante innanzitutto capire il loro comportamento dopo il contatto con le cellule, ovvero che cosa implica questa interazione e quali sono gli effetti delle nanoparticelle sulle cellule. Proprio per rispondere a queste domande, lo scopo che questa tesi si ripropone è quello di valutare l'attività di *uptake* delle cellule nei confronti di tali nanoparticelle e il loro possibile effetto citotossico.

Per verificare l'attività di *uptake* delle cellule abbiamo utilizzato 4 diverse linee cellulari tumorali umane e abbiamo studiato il comportamento delle nanoparticelle all'interno delle cellule grazie all'utilizzo del microscopio a fluorescenza. Grazie all'utilizzo della microscopia a fluorescenza abbiamo potuto valutare se le particelle sono in grado di penetrare nel nucleo, soprattutto ad alte concentrazioni o a lunghi tempi di incubazione. Per questa valutazione abbiamo effettuato incubazioni a concentrazioni crescenti di nanoparticelle e a tempi di incubazione sempre più lunghi. Inoltre, abbiamo coltivato le cellule sia in condizioni di crescita ottimali, aggiungendo il terreno con FBS (*Fetal Bovine Serum*), che in condizioni subottimali, senza l'aggiunta di FBS nel terreno, perché abbiamo ipotizzato che le proteine presenti nell'FBS potessero disporsi come una corona esternamente alle cellule, ostacolando l'*uptake* delle nanoparticelle. Infine, abbiamo valutato se le diverse linee cellulari avessero dei comportamenti diversi nei confronti dell'internalizzazione delle nanoparticelle.

Per quanto riguarda la valutazione di un possibile effetto citotossico delle nanoparticelle, invece, abbiamo effettuato dei saggi di vitalità cellulare, anche in questo caso utilizzando 4 linee cellulari differenti. Come per l'analisi in microscopia, abbiamo effettuato l'incubazione a concentrazioni crescenti di nanoparticelle, a tempi di incubazione sempre più lunghi e in condizioni ottimali, aggiungendo FBS al terreno, o subottimali, senza FBS. Queste variazioni nelle condizioni di incubazione erano necessarie per capire se la vitalità cellulare potesse dipendere da un'alta concentrazione di nanoparticelle, da lunghi tempi di incubazione e dalla presenza o assenza di FBS e se l'effetto fosse diverso a seconda della linea cellulare sottoposta al trattamento.

2 - Introduzione

2.1 - Le nanoparticelle

Le nanotecnologie comprendono lo sviluppo di tecnologie per la sintesi e la caratterizzazione di strutture che abbiano almeno una dimensione compresa tra 1 e 100 nm e sono uno dei campi di ricerca attualmente più interessanti e con molteplici possibili applicazioni, tra le quali sono di particolare interesse quelle in campo biomedico. L'importanza delle nanotecnologie, infatti, è legata anche alla possibilità di queste strutture di interagire in maniera peculiare con le macromolecole presenti a livello cellulare e, quindi, con le cellule stesse, grazie all'affinità dimensionale (Niemeyer, 2001).

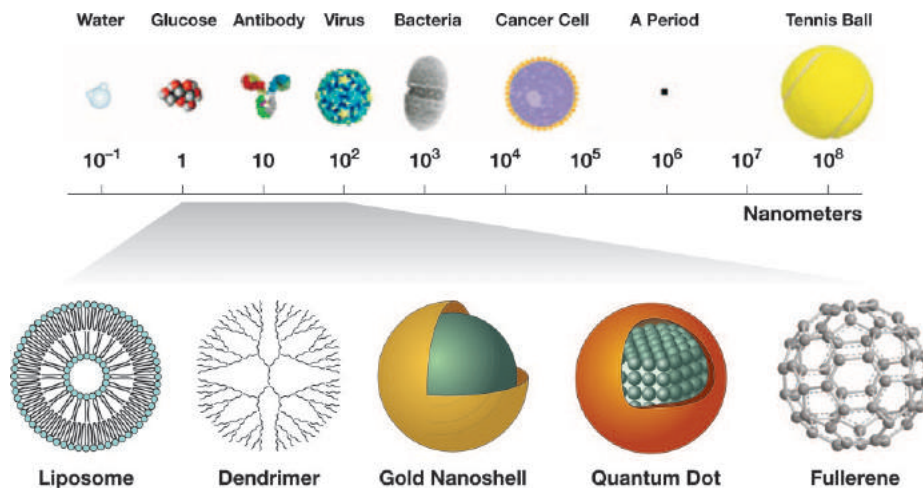


Fig. 2.1.1 - Dimensione delle nanoparticelle confrontata con oggetti familiari. McNail SE. Nanotechnology for the biologist. Journal of Leukocyte Biology, vol. 78, September 2005.

Il campo delle nanotecnologie è un ambito di ricerca molto vasto, perché i materiali impiegati e le nanostrutture finali che si possono ottenere sono molto diversificate e hanno impieghi tra i più disparati. Tra le diverse nanotecnologie a disposizione, ci concentreremo in particolare sulla descrizione delle nanoparticelle, grazie ai grandi vantaggi che queste offrono nel campo dell'analisi biologica. Le nanoparticelle sono definite come una dispersione di particolato o come particelle solide con una dimensione solitamente compresa tra i 10 e i 100 nm. A seconda del metodo con cui vengono sintetizzate, esse si dividono in nanosfere o nanocapsule. Mentre le nanocapsule sono sistemi in cui una molecola o un farmaco può essere confinato all'interno di una cavità circondata da una membrana, le nanosfere sono sistemi in cui la molecola d'interesse è uniformemente dispersa all'interno della cavità (Mohanraj VJ, 2006). Negli ultimi anni, poi, sono state ideate nanoparticelle rivestite con polimeri idrofilici, come il PEG (poli-etilene glicole), che possono essere utilizzate nel campo della *drug delivery* (Rio-Echevarria IM, 2010) grazie alla loro capacità di rimanere in circolazione per un periodo di tempo prolungato, di avere come bersaglio determinati organi o tessuti e di trasportare molecole come proteine o peptidi.

Esistono diversi vantaggi offerti dall'utilizzo delle nanoparticelle. Il primo è la possibilità di manipolare in modo relativamente semplice la loro dimensione e le caratteristiche della loro superficie, per modificarne l'interazione con l'ambiente biologico. Un secondo vantaggio è la possibilità di modularne la degradazione, che dipende dal materiale di cui esse sono costituite. Ancora, le nanoparticelle possono essere indirizzate contro un *target* mirato coniugandole con un ligando specifico e, in particolare, possono avere un impiego molto importante nel campo della *drug delivery* (Mohanraj VJ, 2006). Anche i farmaci somministrati per via sistemica possono essere indirizzati verso uno specifico *target*, ma il vantaggio delle nanoparticelle è che possono essere indirizzate verso più di un *target* specifico e, soprattutto, hanno la funzione di isolare il farmaco dall'ambiente biologico fin quando esso non raggiunge il sito, o i siti, d'azione (De Jong, 2008). Questo permette non solo di abbassare le dosi necessarie alla terapia, ma anche di far agire il farmaco solo sulle cellule malate.

Nonostante questi numerosi vantaggi, le nanoparticelle presentano anche dei limiti: la loro

piccola dimensione può portarle ad aggregarsi, cambiandone le caratteristiche chimico-fisiche, ed essa può essere un limite anche per la grandezza delle molecole che devono essere incluse al loro interno.

La dimensione delle particelle e la distribuzione della dimensione delle nanoparticelle all'interno dello stesso campione sono le caratteristiche più importanti da tenere in considerazione. Infatti, questi parametri influenzano la loro distribuzione *in vivo*, il loro destino biologico, la tossicità e l'abilità di essere indirizzate verso un bersaglio specifico. In generale, è stato osservato che le nanoparticelle hanno un tasso di internalizzazione maggiore, da parte delle cellule, rispetto alle microparticelle ed esse possono anche interagire con un maggior numero di target biologici, grazie alla loro dimensione.

Un'altra caratteristica che può influenzare il comportamento delle nanoparticelle è lo ζ *potential*, cioè il parametro che descrive la loro carica superficiale. Questo parametro riflette il potenziale elettrico delle nanoparticelle ed è influenzato sia dalla loro composizione chimica che dal mezzo in cui sono disperse. È stato dimostrato che le nanoparticelle con uno ζ *potential* di (+/-) 30 mV sono più stabili in sospensione, in quanto la carica superficiale previene l'aggregazione (Couvreur P, 2002).

2.1.1 - Applicazioni in campo biomedico

Abbiamo detto che le nanotecnologie possono essere impiegate in campo biomedico per vari scopi. Tra le prime applicazioni che sono state studiate citiamo l'utilizzo dei liposomi come veicoli per la *drug-delivery*. I liposomi, che hanno un diametro compreso tra i 50 e i 70 nm, vengono internalizzati velocemente dai macrofagi, che poi portano il liposoma e il farmaco in esso incluso sul sito d'azione. Una volta raggiunto tale sito, si verifica la fusione tra la membrana liposomiale

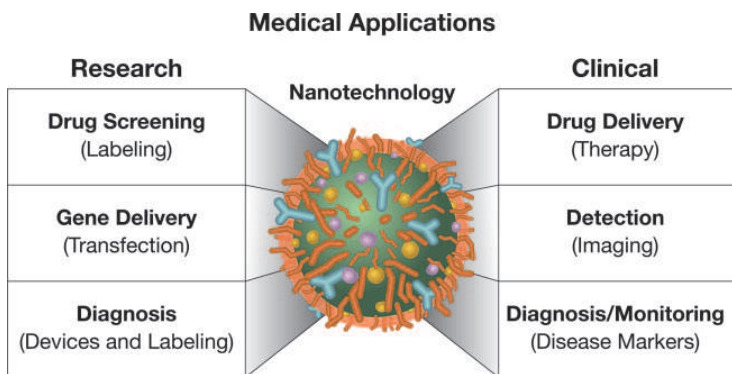


Fig. 2.1.1.1 - Applicazione delle nanotecnologie in campo medico. McNail SE. Nanotechnology for the biologist. Journal of Leukocyte Biology, vol. 78, September 2005.

e quella cellulare, dato che hanno la stessa organizzazione fosfolipidica, così che il farmaco venga rilasciato solo sulle cellule bersaglio. Oltre ai liposomi, anche diverse varietà di nanoparticelle, come i dendrimeri, possono essere utilizzate in questa applicazione. Questo approccio per la *drug-delivery* è altamente selettivo ed è in grado di ridurre i costi delle terapie farmacologiche e le sofferenze dei pazienti, grazie ad un'azione più mirata del farmaco (Nikalje AP, 2015).

Anche la terapia contro il cancro ha beneficiato dell'utilizzo dei liposomi, grazie all'incorporazione al loro interno della doxorubicina. In questo caso è stato effettuato il *coating* con PEG sulla superficie del liposoma e questo ha provocato una diminuzione significativa dell'*uptake* da parte dei macrofagi, permettendo al liposoma di raggiungere la zona del tumore. Visto che è diventato piuttosto semplice modificare la superficie esterna delle nanoparticelle con diverse molecole, sono stati amplificati gli utilizzi delle nanoparticelle perché, grazie alla funzionalizzazione, è possibile indirizzarle contro dei *target* cellulari specifici.

Un'applicazione più recente delle nanoparticelle è l'*imaging in vivo*. Infatti, le nanoparticelle magnetiche o le nanoparticelle d'oro possono essere utilizzate come mezzo di contrasto per gli ultrasuoni o la risonanza magnetica nucleare. Grazie a questa tecnica, attualmente si è riusciti a rilevare delle micrometastasi con diametro minore di 2 mm che è il limite di rilevazione della PET

(tomografia a emissione di positroni), ovvero la più sensibile tecnica di *imaging* utilizzata fino ad oggi (McNail SE, 2005).

Ancora, le nanoparticelle possono essere utilizzate come sonde fluorescenti, dato che la loro superficie esterna può essere funzionalizzata utilizzando un anticorpo, o un peptide, per dirigerle verso un tipo cellulare specifico. Questa tecnica può essere sfruttata, ad esempio, per rilevare la presenza di batteri patogeni, anche a bassissime concentrazioni, nel cibo o in campioni biologici (Wang L, 2006).

In conclusione, possiamo dire che le aspettative riguardo all'applicazione delle nanotecnologie in campo medico sono altissime ma, attualmente, non è stata ancora ben definita la sicurezza di tali materiali. Per questo motivo occorre valutare accuratamente i benefici e i rischi riguardo all'utilizzo delle nanotecnologie e devono essere svolti ulteriori studi per capire l'effetto delle nanotecnologie in ambiente biologico e, quindi, sulle cellule. Comunque, grazie ai progressivi sviluppi ottenuti con lo studio di questi materiali è plausibile che, in futuro, le nanotecnologie giocheranno un ruolo chiave nel trattamento delle malattie umane.

2.1.2 - Nanoparticelle AcZon

AcZon, azienda biotecnologica di Bologna, sviluppa e commercializza nanoparticelle e *nanoprob*es che possono essere utilizzati in applicazioni bioanalitiche. Per quanto riguarda lo scopo di questa tesi, ci concentriamo sulle nanoparticelle di silice fluorescenti con una struttura *core-shell*.

I vantaggi nell'utilizzo della silice come materiale di costruzione per le nanoparticelle sono diversi. Prima di tutto, la silice è un materiale inerte agli stimoli fotofisici ed è trasparente sia alle radiazioni ultraviolette che alle radiazioni nel visibile. Questo significa che tutte le proprietà fotochimiche delle nanoparticelle di silice sono dipendenti solo dalle molecole che si trovano all'interno della nanoparticella o da quello che si trova sulla sua superficie. Inoltre, un altro vantaggio della silice è quello di essere intrinsecamente biocompatibile.

Non entreremo nel dettaglio della sintesi delle nanoparticelle utilizzate per lo scopo di questa tesi, in quanto questa era già stata effettuata precedentemente nei laboratori AcZon. In generale, possiamo dire che la sintesi delle nanoparticelle in AcZon segue il metodo di Stöber, che consiste in uno *step* di idrolisi, in cui il nucleofilo è un gruppo OH^- , e uno di condensazione. Entrambi gli *step* possono essere descritti come sostituzioni nucleofile ($\text{S}_\text{N}2$) sull'atomo di silice. In particolare, il metodo AcZon è un processo *one-pot* che sfrutta l'utilizzo di surfattanti per formare delle micelle isolate in cui possano svolgersi entrambi gli *step* della reazione. Questi surfattanti sono molecole anfipatiche a lunga catena e, in solvente acquoso, formano delle micelle sferiche che funzionano come dei bioreattori, in cui vengono confinate le reazioni di idrolisi e condensazione. La dimensione delle nanoparticelle sintetizzate, quindi, dipende sia dalla natura del surfattante che dalla concentrazione di surfattante e di organosilano.

La preparazione di nanoparticelle dopate con fluorocromi è possibile grazie alla modificazione della struttura del fluoroforo, a cui viene aggiunto un gruppo in grado di far legare covalentemente il fluoroforo con la matrice di silice. Anche la funzionalizzazione della superficie delle nanoparticelle con PEG e altri gruppi, come NH_2 , deriva dalla modificazione dei surfattanti con un gruppo che renda possibile il legame covalente tra la particella e quello che deve essere legato all'esterno. In particolare, anche se le nanoparticelle di silice AcZon hanno uno ζ potential poco negativo (circa -6 mV), che potrebbe causarne la precipitazione, esse rimangono monodisperse in soluzione, senza formare aggregati, grazie all'ingombro sterico causato dal rivestimento di PEG. Per ottenere nanosonde fluorescenti, infine, le nanoparticelle di silice AcZon vengono funzionalizzate con gruppi amminici e coniugate con biomolecole.

3 - Materiali e metodi

3.1 - Nanoparticelle

Dimensione (nm)	15,76 ± 0,12
Indice di polidispersione	< 0,047 ± 0,08
Concentrazione fluoroforo prima della filtrazione (µM)	143,0
λ massimo di assorbimento (nm)	556
λ massimo di emissione (nm)	576
ζ potenzial (mV)	- 6,3 ± 1,7
Funzionalizzazione	NO

Tab. 3.1.1 - Tabella riassuntiva delle caratteristiche tecniche delle nanoparticelle utilizzate.

Dato che prima di utilizzare le nanoparticelle occorre filtrarle in ambiente sterile con filtri con pori 0,22 µm in PES (polietersulfone, Sigma-Aldrich, Massachusetts), abbiamo effettuato un'analisi spettrofotometrica per capire se, dopo la filtrazione, la loro concentrazione è cambiata, ovvero se abbiamo perso nanoparticelle durante la filtrazione.

Impostiamo nello strumento 2 valori di assorbanza:

- 280 nm, massimo di assorbimento fisso per le proteine
- 556 nm, massimo di assorbimento delle nanoparticelle

Prepariamo 2 campioni di nanoparticelle effettuando una diluizione 1:25, cioè diluendo 20 µL di nanoparticelle in 480 µL di H₂O e, per ogni campione, ripetiamo due volte la lettura. Poi, uniamo i 2 campioni in un unico terzo campione ed effettuiamo due letture anche di questo. Riportiamo i valori ottenuti nella tabella sottostante.

	Assorbanza 280 nm	Assorbanza 556 nm
Campione 1	0,134	0,274
	0,132	0,273
Campione 2	0,136	0,281
	0,137	0,281
Campione 3	0,134	0,277
	0,136	0,276

Tab. 3.1.2 - Tabella riassuntiva delle assorbanze delle nanoparticelle utilizzate.

Dopo aver misurato le assorbanze, lo strumento traccia lo spettro di assorbimento e vediamo che, in realtà, il picco di assorbimento massimo è 0,274 a 557 nm. Considerando che il coefficiente di estinzione molare del fluorocromo (ϵ) è 434 M⁻¹cm⁻¹, possiamo calcolare la concentrazione totale del fluorocromo seguendo la formula:

$$\frac{1}{\epsilon} * (\text{media assorbanze a 560 nm}) * (\text{fattore di diluizione}) = 23,05 * 0,277 * 25 = 159,7 \mu\text{M}$$

Dato che la concentrazione iniziale del fluoroforo era 143,0 µM e, dopo la filtrazione, tale concentrazione diventa 159,7 µM, possiamo descrivere questo aumento come un errore dovuto al fatto che la ripetitività della misurazione non è affidabile, ma questo dato ci dice che non abbiamo perso nanoparticelle durante la filtrazione.

3.2 - Colture cellulari

In entrambi i protocolli abbiamo utilizzato linee cellulari tumorali umane.

Linea cellulare	Origine	Modalità di crescita
Colo320	Adenocarcinoma colon-rettale	Adesione
MCF7	Adenocarcinoma mammario	Adesione
MOLT4	Leucemia linfoblastica acuta	Sospensione
Jurkat	Leucemia acuta a cellule T	Sospensione

Tab. 3.2.1 - Tabella riassuntiva delle caratteristiche delle linee cellulari utilizzate.

Le condizioni colturali delle cellule sono quelle standard, cioè in incubazione a 37 °C e al 5% di CO₂.

Il terreno utilizzato per la coltura è RPMI 1640 con L-Glutamina (EuroClone, Italia) addizionato con l'1% di penicillina/streptomicina e col 10% di FBS (*Fetal Bovine Serum*). La penicillina (EuroClone, Italia) ci viene fornita ad una concentrazione di 10000 U/mL e la streptomicina ad una concentrazione di 10000 mg/L.

Prima dell'utilizzo, abbiamo scomplementato l'FBS (EuroClone, Italia) con un trattamento di 30 minuti a 56 °C nel bagnetto termostato per inattivare le proteine del complemento.

La metodica di passaggio utilizzata per le cellule in adesione è quella classica con tripsina/EDTA (Sigma-Aldrich). La tripsina ci viene fornita ad una concentrazione 10X di 5 g/L insieme con EDTA tetrasodico 2 g/L. Prima dell'utilizzo, diluiamo questa soluzione in PBS (*Phosphate Buffered Saline*) per ottenere una concentrazione 1X. Il PBS viene preparato nei laboratori AcZon ad una concentrazione 20X (sodio fosfato 0,2 M, NaCl 3 M). Prima dell'utilizzo, viene diluito fino alla concentrazione 1X (sodio fosofato 10 mM, NaCl 150 mM), che ha un pH di 7,35 ± 0,05.

3.3 - Analisi della vitalità cellulare

I saggi per misurare la proliferazione, la vitalità e la citotossicità vengono utilizzati per monitorare la risposta e la salute delle cellule in coltura dopo un trattamento.

I saggi per la proliferazione cellulare possono monitorare il numero di cellule nel tempo, il numero di divisioni cellulari, l'attività metabolica o la sintesi del DNA. Invece, la conta cellulare effettuata con saggi di vitalità, come il *Trypan Blue* o la calceina-AM, può indicare sia la percentuale di proliferazione che la percentuale di cellule vitali.

Per il protocollo di valutazione della vitalità cellulare, in particolare, abbiamo utilizzato due metodi diversi.

3.3.1 - Metodica enzimatica

Il primo metodo sfrutta un kit commerciale pronto all'uso, il *Cell Counting Kit - 8* (CCK-8, Dojindo Molecular Technologies, Maryland). Questo sfrutta un sale di tetrazolio solubile in acqua, il WST-8 [2-(2-metossi-4-nitrofenil)-3-(4-nitrofenil)-5-(2,4-disulfofenil)-2H-tetrazolio, sale monosodico], che viene ridotto, in presenza di un *carrier* elettronico ad un colorante formazano solubile in soluzioni acquose, di colore arancione. In particolare, WST-8 viene ridotto da una deidrogenasi cellulare (figura 3.3.1.1), per cui la quantità di colorante formazano prodotto dalla deidrogenasi (di cui si può misurare l'assorbanza a 450 nm) è direttamente proporzionale al numero di cellule

vive.

In realtà, la deidrogenasi cellulare coinvolta nella reazione di riduzione non è una sola, perché vengono coinvolte la maggior parte delle deidrogenasi della cellula. Questo, teoricamente, permette al kit di essere molto sensibile nella misurazione della vitalità cellulare.

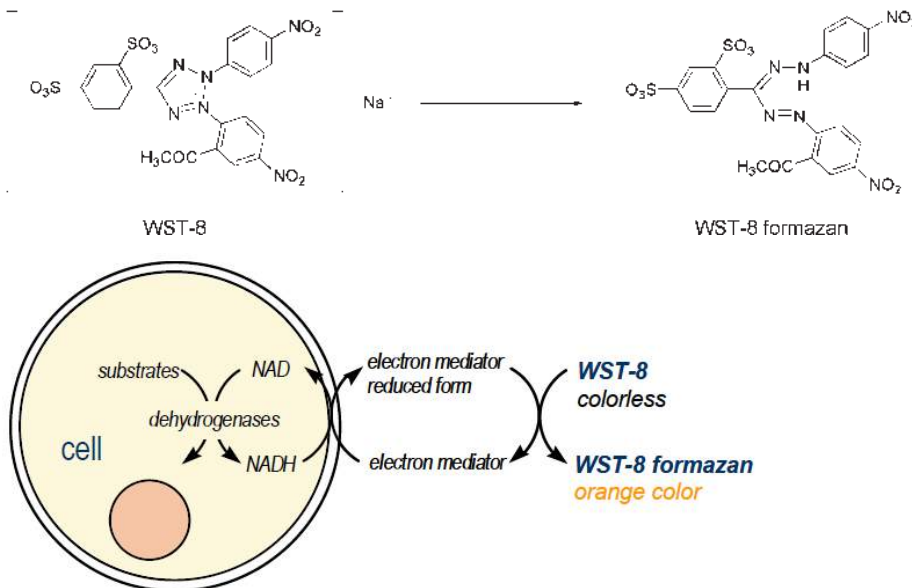


Fig. 3.3.1.1 - Meccanismo d'azione della deidrogenasi cellulare utilizzata nel kit CCK-8. *Technical Manual Cell Counting Kit CCK-8 (Cell proliferation assay and cytotoxicity assay).*

Dopo aver misurato l'assorbanza dei campioni trattati con il kit a 450 nm con un lettore di micropiastre, possiamo calcolare il *survival rate* dei campioni grazie alla formula che ci viene fornita dagli ideatori del kit:

$$survival\ rate\ (\%) = \frac{(A_s - A_b)}{(A_c - A_b)} * 100$$

I termini dell'equazione corrispondono a:

- A_s = assorbanza del campione, ovvero cellule + sostanza da testare + CCK-8
- A_b = assorbanza del bianco, ovvero sostanza da testare + CCK-8
- A_c = assorbanza del controllo negativo, ovvero cellule + CCK-8

In realtà, nel protocollo utilizzato non abbiamo usato la formula fornita dagli ideatori, bensì una formula leggermente modificata da noi. Dato che il campione che abbiamo analizzato con il kit è un campione colorato, abbiamo utilizzato due bianchi diversi, uno per comparare il trattato con un bianco a cui erano state somministrate le nanoparticelle (in modo che risultasse anch'esso colorato) e un controllo negativo a tutti gli effetti, senza nanoparticelle. La formula che risulta da questa modifica è:

$$survival\ rate\ (\%) = \frac{(A_s - A_b)}{(A_c - A_t)} * 100$$

I singoli termini dell'equazione, in questo caso, corrispondono a:

- A_s = assorbanza del campione, ovvero cellule + nanoparticelle + CCK-8
- A_b = assorbanza del bianco, ovvero nanoparticelle + CCK-8
- A_c = assorbanza del controllo negativo, ovvero cellule + terreno + CCK-8
- A_t = assorbanza del terreno, ovvero terreno + CCK-8

3.3.2 - Metodica per esclusione

Il secondo metodo utilizzato per la valutazione della vitalità cellulare si basa sul colorante cellulare *Trypan Blue 0,4%* (GIBCO, Massachusetts). Questo colorante sfrutta il principio per cui le cellule vitali, avendo la membrana cellulare intatta, non sono permeabili a questa sostanza

colorata, mentre le cellule morte, con la membrana danneggiata, sono permeabili per cui risultano colorate di blu. Grazie alla colorazione blu possiamo quindi distinguere le cellule morte da quelle vitali, che appaiono traslucide. Lo svantaggio di questa metodica è dovuto al fatto che le cellule in stadi precoci di apoptosi non presentano la membrana danneggiata, per cui vengono conteggiate come vive.

La conta cellulare, dopo la colorazione con *Trypan Blue* 0,4%, è stata effettuata o al microscopio invertito a contrasto di fase, nel caso di cellule cresciute in adesione, oppure utilizzando la camera di Neubauer, nel caso di cellule in sospensione.

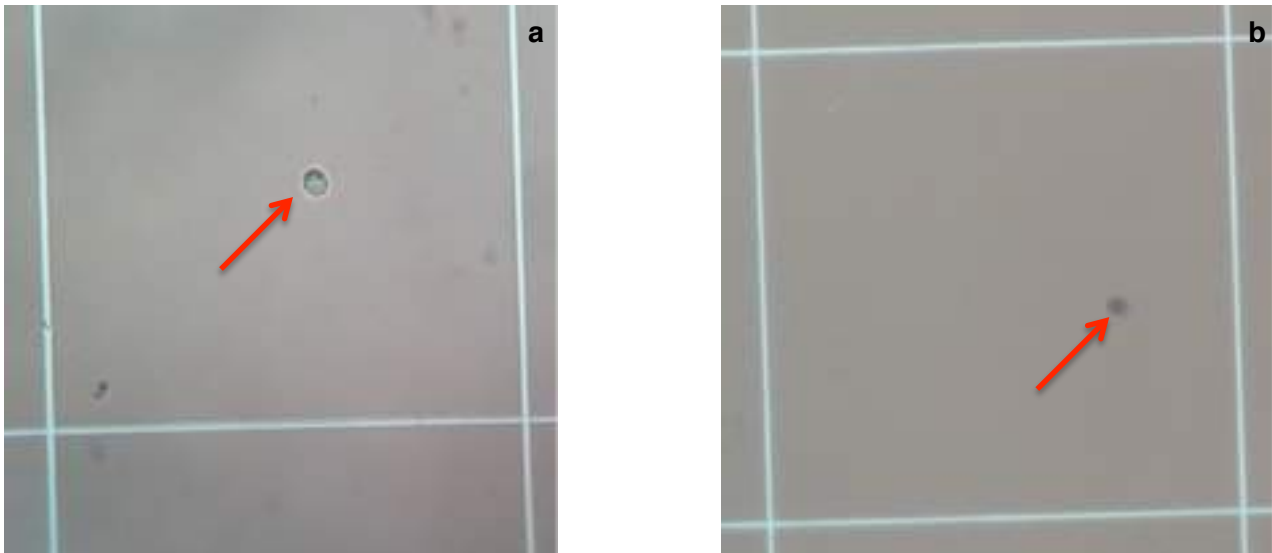


Fig. 3.3.2.1 - Immagine della camera di Neubauer. (a) La freccia indica una cellula viva; (b) La freccia indica una cellula morta.

3.4 - Protocollo per l'analisi della vitalità cellulare

Nel protocollo effettuato utilizziamo due metodi per l'analisi della vitalità cellulare. Il primo metodo sfrutta un kit commerciale pronto all'uso, cioè il *Cell Counting Kit - 8* (CCK-8), mentre il secondo è un metodo ad esclusione che sfrutta la colorazione con *Trypan Blue*.

In entrambi i casi, l'obiettivo è la valutazione della citotossicità delle nanoparticelle di silice a concentrazioni diverse (0,072, 0,72 e 3,6 mg/mL), a diversi tempi di incubazione, (1h, 4h, 24h e 48h) e su diverse linee cellulari. Inoltre, testiamo la citotossicità sia in presenza che in assenza di FBS nel mezzo di coltura.

3.4.1 - Metodica enzimatica

Per la valutazione della vitalità cellulare con la metodica enzimatica utilizziamo il kit CCK-8 applicando lo stesso protocollo a tutte le linee cellulari, sia in adesione (MCF7) che in sospensione (Jurkat).

Per ogni tempo di incubazione (1h, 4h, 24h e 48h) è previsto l'allestimento di 1 piastra da 96 pozzetti a fondo piatto di cellule coltivate con FBS e una di cellule coltivate senza FBS, per un totale di 8 piastre per linea cellulare. All'interno di ogni piastra vengono allestiti i seguenti pozzetti di campioni e controlli, ognuno in triplicato:

- nanoparticelle diluite 1:2, a concentrazione finale 3,6 mg/mL, senza cellule
- nanoparticelle diluite 1:10, a concentrazione finale 0,72 mg/mL, senza cellule
- nanoparticelle diluite 1:100, a concentrazione finale 0,072 mg/mL, senza cellule
- terreno senza cellule
- cellule
- nanoparticelle diluite 1:2, a concentrazione finale 3,6 mg/mL, con cellule
- nanoparticelle diluite 1:10, a concentrazione finale 0,72 mg/mL, con cellule
- nanoparticelle diluite 1:100, a concentrazione finale 0,072 mg/mL, con cellule

La piastra viene allestita seguendo lo schema sottostante:

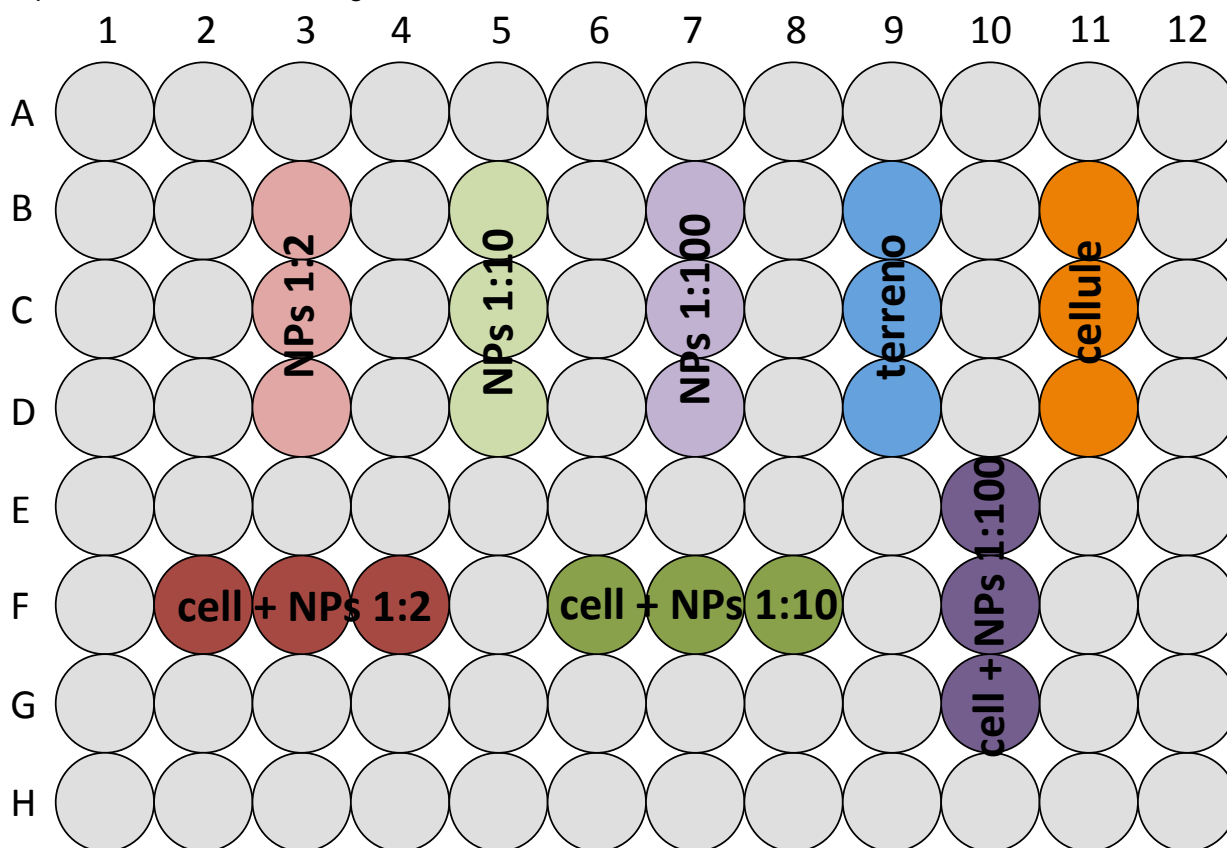


Fig. 3.4.1.1 - Schema dei pozzetti utilizzati per l'analisi della vitalità cellulare con kit CCK-8.

Prepariamo tutti i campioni utilizzando la stessa quantità di terreno, per non creare delle variabili dovute alla quantità maggiore o minore di nutrienti, e aggiungiamo PBS per arrivare a volume. Terminata l'incubazione, aggiungiamo ad ogni pozzetto 10 μ L del reagente CCK-8 senza formare bolle, che potrebbero compromettere la lettura dell'assorbanza. Dopo la somministrazione del kit, le piastre vengono riportate in incubatore per 1h. Finita questa seconda incubazione effettuiamo la lettura dell'assorbanza di ogni campione al lettore di piastre, misurando l'assorbanza a 450 nm in duplicato per ogni piastra.

Calcoliamo la *survival rate* dei campioni come da formula:

$$survival\ rate\ (\%) = \frac{(A_s - A_b)}{(A_c - A_t)} * 100$$

3.4.2 - Metodica per esclusione

Il secondo metodo utilizzato per la valutazione della vitalità cellulare si basa sul colorante cellulare *Trypan Blue* 0,4%. In questo caso il protocollo è leggermente diverso se stiamo trattando con cellule adese (MCF7 e Colo320) o cellule in sospensione (Jurkat e MOLT4). In entrambi i casi allestiamo 4 micropiastre da 96 pozzetti a fondo piatto, una per ogni tempo di incubazione con nanoparticelle. All'interno di ogni piastra vengono allestiti i seguenti pozzetti, ognuno in triplicato:

- nanoparticelle diluite 1:2, a concentrazione finale 3,6 mg/mL, con cellule senza FBS
- nanoparticelle diluite 1:10, a concentrazione finale 0,72 mg/mL, con cellule senza FBS
- nanoparticelle diluite 1:100, a concentrazione finale 0,072 mg/mL, con cellule senza FBS
- cellule senza FBS
- nanoparticelle diluite 1:2, a concentrazione finale 3,6 mg/mL, con cellule con FBS
- nanoparticelle diluite 1:10, a concentrazione finale 0,72 mg/mL, con cellule con FBS
- nanoparticelle diluite 1:100, a concentrazione finale 0,072 mg/mL, con cellule con FBS
- cellule con FBS

Le piastre vengono allestite secondo lo schema sottostante :

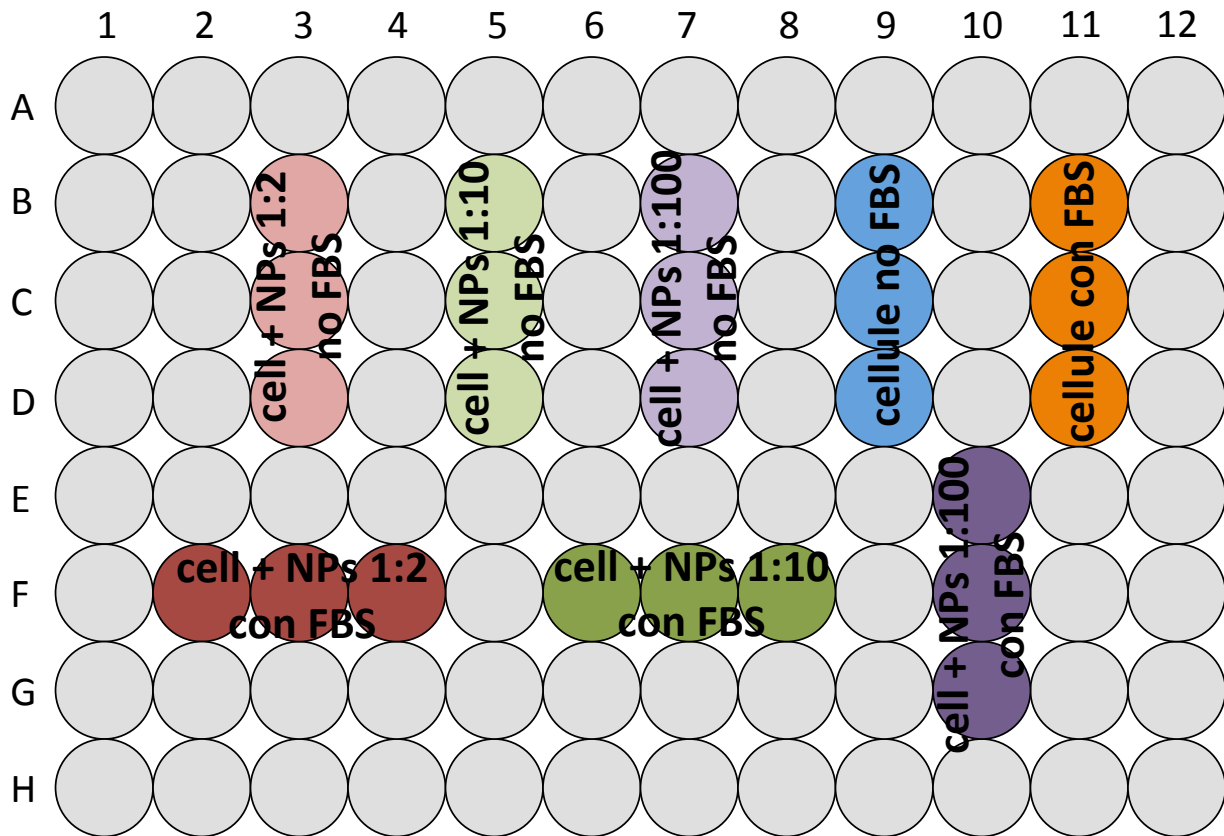


Fig. 3.4.2.1 - Schema dei pozzetti utilizzati per l'analisi della vitalità cellulare con Trypan Blue 0,4%.

Anche in questo caso, prepariamo tutte le diluizioni utilizzando la stessa quantità di terreno, per non creare delle variabili dovute alla quantità maggiore o minore di nutrienti, e aggiungiamo PBS per arrivare a volume.

Nel caso in cui trattiamo con cellule in adesione, piastriamo 10000 cellule per micropozzetto 24h prima del trattamento con nanoparticelle, in modo che le cellule abbiano tempo di aderire. Avvenuta l'adesione, eliminiamo il terreno dai pozzetti e somministriamo in ognuno 100 µL della diluizione di nanoparticelle corrispondente o di solo terreno, determinando l'inizio dell'incubazione.

Invece, se trattiamo con cellule in sospensione diluiamo le cellule direttamente nelle soluzioni di nanoparticelle o nel terreno, considerando un numero di cellule pari a 120000 (10000 cell/pozzetto * 3 pozzetti * 4 tempi di incubazione) per ogni soluzione. Poi, di ogni soluzione distribuiamo 100 µL nei pozzetti corrispondenti.

Una volta fatta partire l'incubazione con le nanoparticelle, lasciamo le piastre in incubatore a 37 °C e 5% CO₂.

Terminata l'incubazione, nel caso delle cellule in adesione eliminiamo per inversione il contenuto del pozzetti. Dopo di che, utilizziamo una sospensione all'80% di *Trypan Blue* e 20% di terreno completo, per uniformarci al protocollo delle cellule in sospensione, per effettuare la conta. Quindi, somministriamo ad ogni pozzetto 30 µL di soluzione di *Trypan Blue* e svuotiamo i pozzetti con una pipetta. Infine, effettuiamo la conta direttamente all'interno dei micropozzetti al microscopio invertito a contrasto di fase, sia per non stressare le cellule con un trattamento con tripsina/EDTA per staccarle, sia per non introdurre nuove variabili che potrebbero modificare la conta.

Per quanto riguarda le cellule in sospensione, invece, prepariamo una eppendorf per ogni diluizione e, in ognuna, somministriamo 80 µL di *Trypan Blue*. Poi, in ogni eppendorf diluiamo 20 µL di sospensione cellulare dopo aver risospeso il contenuto dei 3 pozzetti corrispondenti ad ogni diluizione e averli uniti in un unico pozzetto. Infine, effettuiamo la conta nella camera di

Neubauer.

Per calcolare il *survival rate* dei campioni, ovvero per equiparare questo metodo a esclusione con il metodo enzimatico del kit, abbiamo effettuato due misurazioni. Per ogni campione e per il bianco abbiamo calcolato la vitalità assoluta in percentuale, data dalla formula:

$$\text{vitalità assoluta (\%)} = \frac{\text{cell totali} - \text{cell morte}}{\text{cell totali}} * 100$$

Dopo di che, la formula applicata per calcolare il *survival rate* è la seguente:

$$\text{survival rate (\%)} = \frac{\text{vitalità assoluta del campione}}{\text{vitalità assoluta del bianco}} * 100$$

3.5 - Protocollo per la valutazione dell'uptake

La valutazione dell'uptake delle nanoparticelle viene effettuata al microscopio a fluorescenza, sfruttando la fluorescenza emessa dal colorante nucleare Hoechst 33342 (ThermoFisher, Massachusetts) e dalla rodamina contenuta nelle nanoparticelle. Utilizziamo due protocolli leggermente diversi a seconda che lavoriamo con cellule in adesione o in sospensione.

Per ogni tempo di incubazione (1h, 4h, 24h e 48h) di ogni linea cellulare è previsto l'allestimento di piastre con pozzetti da 1 mL di *working volume* allestite secondo lo schema sottostante:

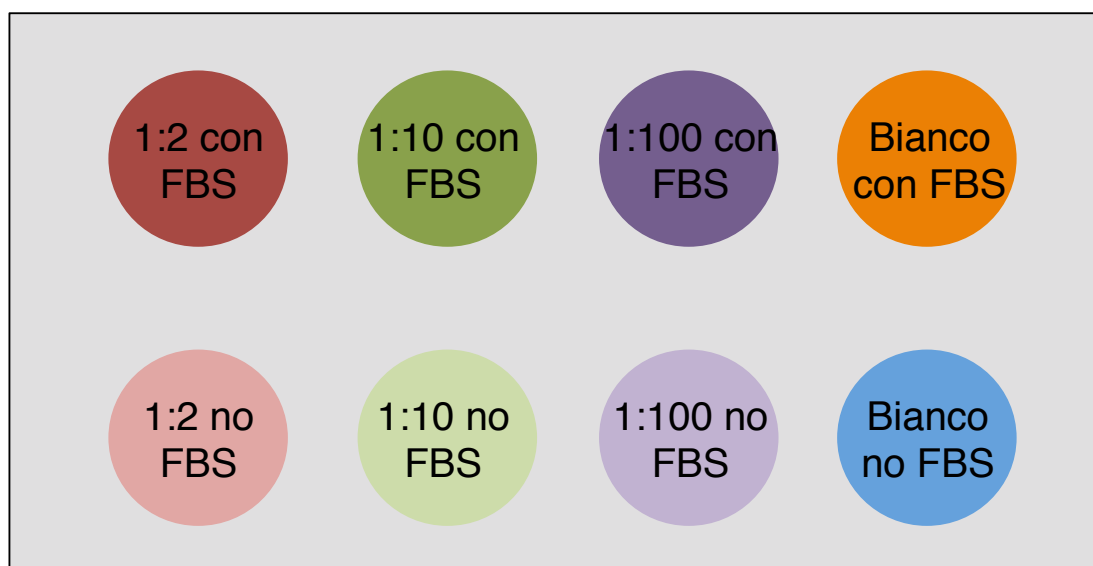


Fig. 3.5.1 - Schema dei pozzetti utilizzati per l'analisi dell'uptake delle nanoparticelle.

Prepariamo tutte le diluizioni utilizzando la stessa quantità di terreno, per non creare delle variabili dovute alla quantità maggiore o minore di nutrienti, e portiamo a volume con PBS.

Nel caso in cui trattiamo con cellule in adesione, 24h prima del trattamento con nanoparticelle piastriamo 800000 cellule sul vetrino coprioggetto che abbiamo posizionato sul fondo del pozzetto, in modo che le cellule abbiano tempo di aderire. Avvenuta l'adesione, eliminiamo il terreno dai pozzetti e somministriamo in ognuno 1 mL della diluizione di nanoparticelle corrispondente o di solo terreno, determinando l'inizio dell'incubazione.

Invece, se trattiamo con cellule in sospensione, diluiamo direttamente le cellule nelle soluzioni di nanoparticelle o nel terreno, considerando un numero di cellule pari a 3200000 (800000 cell/pozzetto * 1 pozzetti * 4 tempi di incubazione) in 4 mL di ogni soluzione. Poi, di ogni soluzione distribuiamo 1 mL nei pozzetti corrispondenti.

Una volta fatta partire l'incubazione con le nanoparticelle, lasciamo le piastre in incubatore a 37 °C e 5% CO₂.

Terminata l'incubazione, il protocollo si differenzia a seconda se trattiamo con cellule adese o

sospese. Per quanto riguarda le cellule adese, eliminiamo il terreno esausto contenente le nanoparticelle non internalizzate. Il *layer* cellulare viene lavato 2 volte con PBS 1X e, dopo i lavaggi, viene somministrato 1 mL/pozzetto di soluzione di Hoechst (concentrazione finale 8 $\mu\text{g/ml}$, preparato diluendo 6 μl di soluzione madre in 9 mL di PBS). La piastra viene lasciata in incubazione per 10 minuti a temperatura ambiente e al buio. Terminata l'incubazione viene scartato il colorante e vengono nuovamente effettuati 2 lavaggi con PBS 1X. I vetrini sono montati sui portaoggetto e fissati con smalto per le unghie.

Nel caso di cellule sospese, terminata l'incubazione mettiamo il contenuto di ogni pozzetto in un tubo da centrifuga da 15 mL ed effettuiamo i seguenti passaggi:

- centrifughiamo le cellule per 5 minuti a 1100 rpm
- scartiamo il surnatante contenente le nanoparticelle non internalizzate ed effettuiamo un lavaggio con PBS 1X sterile
- centrifughiamo nuovamente per 5 minuti a 1100 rpm e scartiamo il surnatante
- somministriamo in ogni tubo 1 mL di Hoechst (la soluzione è preparata allo stesso modo delle cellule in adesione), in cui risospendiamo bene le cellule. Lasciamo in incubazione per 10 minuti a temperatura ambiente e al buio
- centrifughiamo nuovamente le cellule e scartiamo il surnatante, che contiene il colorante
- risospendiamo le cellule e posizioniamo 10 μL di ogni campione su un corrispondente vetrino portaoggetto. Copriamo con il coprioggetto e fissiamo con smalto per unghie

Completato l'allestimento dei vetrini, li osserviamo al microscopio a fluorescenza.

Modello microscopio	NIKON OPTIPHOT-2
Modello fotocamera	NIKON digital sight DS-Fi1
Lampada	Mercurio
Filtri	NIKON DM580
	Omega optical INC. XF 1009/25
Obbiettivi	40X/0.65 160/0.17
	100X/1.25 oil 160/0.17
Software di acquisizione delle immagini	NIS-elements

Tab. 3.5.1 - Caratteristiche tecniche del microscopio a fluorescenza.

4 - Risultati e discussione

4.1 - Studi preliminari

Da esperimenti precedentemente effettuati in AcZon si era cercato di descrivere il comportamento della linea cellulare SkBr3 (adenocarcinoma mammario) in merito all'internalizzazione di nanoparticelle di silice fluorescenti non funzionalizzate. Per capire in quanto tempo avviene l'*uptake* era stata effettuata un'analisi al citofluorimetro a tempi di incubazione con nanoparticelle crescenti, in particolare 2h, 4h e 24h.

Dall'analisi al citofluorimetro si nota che non c'è una variazione dei parametri fisico-morfologici delle cellule, nonostante abbiano internalizzato le nanoparticelle, e questo significa che, probabilmente, tali nanoparticelle sono troppo piccole per essere rilevate con lo strumento. Inoltre, da questo esperimento si vede che, già dopo solo 2h di incubazione, il livello di fluorescenza è significativo; questo vuol dire che l'*uptake* è un processo veloce e anche tempi brevi di incubazione il segnale fluorescente è alto. Infatti, dall'analisi al citofluorimetro risulta che la fluorescenza rimane pressoché invariata, come intensità, sia dopo 2h che dopo 4h di incubazione. Si vede, invece, un incremento della fluorescenza dopo 24h di incubazione, il che significa che a lungo termine le cellule hanno continuato ad internalizzare le nanoparticelle e sono arrivate lentamente ad uno stato stazionario, ovvero al punto in cui non riescono più ad internalizzare ulteriori nanoparticelle (Fig. 4.1.1).

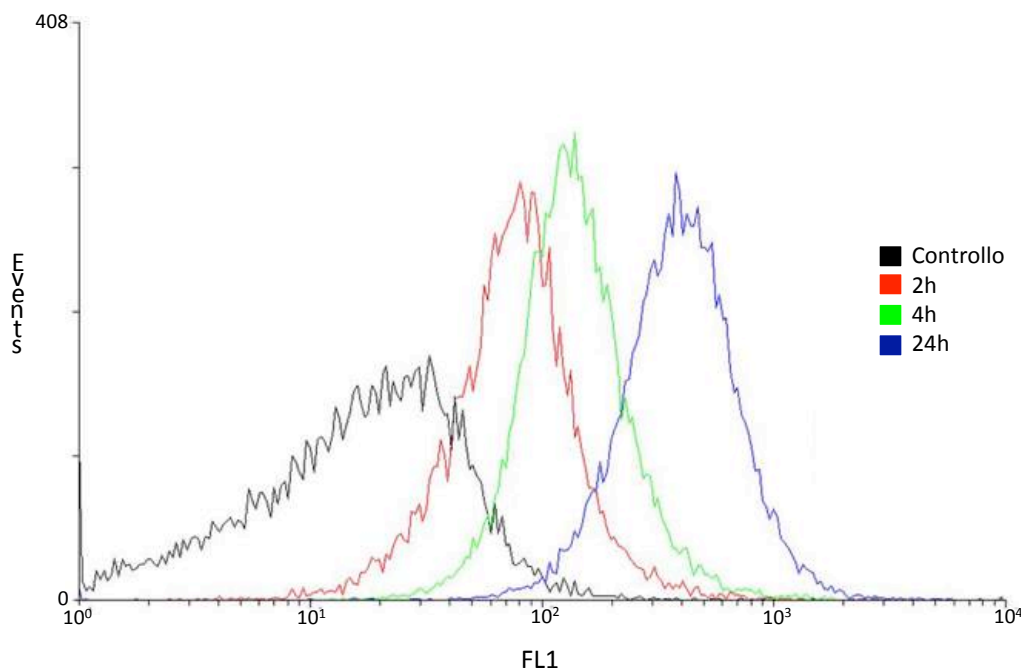


Fig. 4.1.1 - Analisi citofluorimetrica per la valutazione delle tempistiche di uptake sulla linea cellulare SkBr3.

4.2 - Saggio di vitalità

Esperimenti precedentemente effettuati in AcZon avevano cercato di valutare un eventuale effetto citotossico delle nanoparticelle di silice sulla linea cellulare tumorale SkBr3 (adenocarcinoma mammario) utilizzando il *Cell Counting Kit-8* CCK-8. Da questi esperimenti è risultato che le particelle non hanno un effetto citotossico ma, in alcuni casi, si è notato un incremento dell'attività mitogena delle cellule. Questo dato non è stato ritenuto affidabile poiché il risultato dato dal kit poteva essere compromesso dalla non uniformità della distribuzione delle cellule nei pozzetti di coltura. In ogni caso, dato che questo effetto mitogeno non si era verificato in tutti i campioni, il kit era stato ritenuto un metodo troppo poco ripetibile per la valutazione dell'effetto citotossico delle nanoparticelle.

Dati questi risultati precedenti, abbiamo deciso di valutare la vitalità cellulare usando sempre lo stesso kit ma su linee cellulari diverse, per capire se i risultati erano dipendenti dalla linea cellulare utilizzata o dal kit stesso.

Possiamo riassumere in due tabelle (Tab. 4.2.1, 4.2.2) tutti i valori di *survival rate* ottenuti utilizzando il kit CCK-8. Il *survival rate* è stato calcolato utilizzando la formula:

$$survival\ rate\ (\%) = \frac{(A_s - A_b)}{(A_c - A_t)} * 100$$

MCF7	Concentrazione NPs (mg/mL)	Survival rate (%)			
		1h	4h	24h	48h
con FBS	NPs 0,072	303,3	216,1	151,2	96,8
	NPs 0,72	331,4	320,4	141,5	92,8
	NPs 3,6	250,4	172,0	71,2	83,0
senza FBS	NPs 0,072	352,7	189,7	216,1	451,2
	NPs 0,72	152,3	165,3	177,7	210,7
	NPs 3,6	173,3	122,9	94,5	236,9

Tab. 4.2.1 - Tabella riassuntiva dei valori di *survival rate* ottenuti utilizzando il kit enzimatico CCK-8 sulla linea cellulare MCF7.

Jurkat	Concentrazione NPs (mg/mL)	Survival rate (%)			
		1h	4h	24h	48h
con FBS	NPs 0,072	284,8	74,9	33,6	129,4
	NPs 0,72	254,6	124,1	36,0	55,2
	NPs 3,6	304,6	166,5	50,6	22,9
senza FBS	NPs 0,072	80,8	60,1	7,3	341,9
	NPs 0,72	80,8	101,1	7,0	-192,2
	NPs 3,6	127,1	168,6	383,2	134,5

Tab. 4.2.2 - Tabella riassuntiva dei valori di *survival rate* ottenuti utilizzando il kit enzimatico CCK-8 sulla linea cellulare Jurkat.

Come possiamo vedere dalla tabella, i valori di vitalità cellulare non sono riconducibili a nessun tipo di andamento comune. In particolare, supponendo che le nanoparticelle incrementino l'attività metabolica delle cellule o l'attività mitogena, anche senza la conferma statistica vediamo che non è plausibile avere un incremento di questi parametri molto superiore al 100% a tempi di incubazione brevi, come 1h e 4h, perché il tempo di duplicazione delle cellule eucariotiche supera le 24h. Dati questi fattori, abbiamo constatato che il kit non è un mezzo affidabile e ripetibile per la valutazione dell'attività cellulare e abbiamo deciso di non tener conto di tali risultati.

Questo è il motivo che ci ha spinti ad utilizzare un saggio di vitalità cellulare diverso, cioè un metodo ad esclusione che si basa sul colorante cellulare *Trypan Blue* 0,4%.

Considerando che abbiamo utilizzato 4 linee cellulari differenti, possiamo dividere i dati ottenuti per ogni linea cellulare. In particolare, in ogni tabella (Tab. 4.2.3, 4.2.4, 4.2.5, 4.2.6) confrontiamo la vitalità di ogni campione:

$$vitalità\ assoluta\ (\%) = \frac{cell\ totali - cell\ morte}{cell\ totali} * 100$$

Tale vitalità viene considerata valutando 3 fattori diversi:

- concentrazione di nanoparticelle con cui abbiamo incubato il campione (senza NPs, 0,072 mg/mL, 0,72 mg/mL e 3,6 mg/mL)
- durata dell'incubazione (1h, 4h, 24h, 48h)
- presenza o assenza di FBS nel mezzo di coltura

Vediamo che i valori di vitalità dei campioni sono coerenti con quelli dei bianchi, sia nel caso in cui abbiamo un'alta vitalità cellulare (Colo320, MCF7 e MOLT4) che una bassa vitalità (Jurkat), la quale potrebbe essere stata causata dai problemi durante il congelamento o lo scongelamento

della linea cellulare utilizzata. Inoltre, vediamo un incremento della mortalità a tempi di incubazione prolungati nelle linee cellulari Jurkat (24h e 48h), MCF7 (48h) e MOLT4 (48h senza FBS), ma anche in questo caso i valori sono sempre coerenti con quelli dei bianchi. Possiamo attribuire questo calo della vitalità al fatto che non abbiamo mai sostituito il terreno di incubazione, per cui le cellule possono essere andate in sofferenza a causa della mancanza di nutrienti.

MCF7	Concentrazione NPs (mg/mL)	Vitalità (%)			
		1h	4h	24h	48h
con FBS	Bianco	92,0	92,6	91,3	82,2
	NPs 0,072	93,2	92,2	91,9	86,5
	NPs 0,72	91,9	92,4	88,5	85,3
	NPs 3,6	91,9	90,6	91,3	80,3
senza FBS	Bianco	86,4	84,7	92,8	83,1
	NPs 0,072	88,2	85,4	91,0	83,4
	NPs 0,72	91,0	94,0	92,0	83,3
	NPs 3,6	92,6	91,8	91,1	81,4

Tab. 4.2.3 -
Rappresentazione della vitalità cellulare della linea MCF7.

Colo320	Concentrazione NPs (mg/mL)	Vitalità (%)			
		1h	4h	24h	48h
con FBS	Bianco	97,9	97,5	98,2	96,8
	NPs 0,072	97,7	99,1	96,5	96,3
	NPs 0,72	99,6	99,0	96,9	96,0
	NPs 3,6	99,7	96,8	96,6	97,0
senza FBS	Bianco	85,1	89,4	95,5	94,7
	NPs 0,072	97,6	93,1	97,0	93,5
	NPs 0,72	98,9	96,0	96,6	94,0
	NPs 3,6	98,2	91,4	95,9	91,8

Tab. 4.2.4 -
Rappresentazione della vitalità cellulare della linea Colo320.

MOLT4	Concentrazione NPs (mg/mL)	Vitalità (%)			
		1h	4h	24h	48h
con FBS	Bianco	95,0	78,9	81,7	91,4
	NPs 0,072	100,0	93,8	82,9	91,3
	NPs 0,72	81,2	85,0	90,8	90,7
	NPs 3,6	93,8	83,8	85,1	92,1
senza FBS	Bianco	87,5	83,3	75,0	69,0
	NPs 0,072	86,6	91,7	83,8	78,9
	NPs 0,72	94,4	83,3	83,8	76,0
	NPs 3,6	92,8	91,7	86,6	76,7

Tab. 4.2.5 -
Rappresentazione della vitalità cellulare della linea MOLT4.

Jurkat	Concentrazione NPs (mg/mL)	Vitalità (%)			
		1h	4h	24h	48h
con FBS	Bianco	25,8	28,5	13,1	10,7
	NPs 0,072	26,8	23,4	14,1	11,1
	NPs 0,72	24,3	27,6	15,0	14,5
	NPs 3,6	32,5	30,7	13,6	13,7
senza FBS	Bianco	27,2	24,0	16,7	15,0
	NPs 0,072	20,7	22,5	9,5	15,6
	NPs 0,72	28,2	17,4	13,7	17,9
	NPs 3,6	28,1	21,2	11,0	16,0

Tab. 4.2.6 -
Rappresentazione della vitalità cellulare della linea Jurkat.

Dato che abbiamo utilizzato la stessa tipologia di nanoparticelle su tutti i campioni, possiamo considerare la dimensione delle nanoparticelle e il grado di PEGilazione dello *shell* delle nanoparticelle costanti. I fattori principali che, invece, possono influenzare il comportamento e la vitalità delle cellule sono:

- il tipo cellulare, dato che siamo in presenza di cellule adese, adenocarcinomi, e sospese, linfociti e linfoblasti. Sia la diversa origine del differenziamento cellulare che il tipo di crescita può incidere sull'interazione delle cellule con le nanoparticelle
- presenza o assenza di FBS, per capire se la presenza di FBS ostacola o meno l'internalizzazione delle nanoparticelle
- concentrazione delle nanoparticelle, perché la risposta fisiologica della cellula può essere influenzata dal quantitativo di nanoparticelle presenti nel mezzo di incubazione
- tempo di incubazione, perché la risposta fisiologica della cellula può cambiare a seconda di quanto tempo la cellula rimane in contatto con le nanoparticelle

Analizzando tutti questi fattori, possiamo raggruppare i risultati di *survival rate* ottenuti in 4 tabelle, riportando la media e la deviazione standard (SD) di ogni campione (Tab. 4.2.7, 4.2.8, 4.2.9, 4.2.10).

MCF7	Concentrazione NPs (mg/mL)	1h		4h		24h		48h	
		Survival rate (%)	SD (%)	Survival rate (%)	SD (%)	Survival rate (%)	SD (%)	Survival rate (%)	SD (%)
con FBS	NPs 0,072	101,2	1,9	99,6	1,7	100,6	0,9	105,2	0,8
	NPs 0,72	99,9	4,7	99,8	5,4	97,0	2,2	103,8	1,1
	NPs 3,6	99,8	1,8	97,9	3,3	99,9	5,3	97,7	2,6
senza FBS	NPs 0,072	102,1	3,2	100,9	0,4	98,1	1,1	100,4	3,6
	NPs 0,72	105,3	3,5	111,1	2,2	99,2	1,2	100,2	5,4
	NPs 3,6	107,2	1,1	108,5	2,5	98,2	4,3	98,0	2,0

Tab. 4.2.7 - Rappresentazione del *survival rate* medio e della SD della linea MCF7.

Colo320	Concentrazione NPs (mg/mL)	1h		4h		24h		48h	
		Survival rate (%)	SD (%)	Survival rate (%)	SD (%)	Survival rate (%)	SD (%)	Survival rate (%)	SD (%)
con FBS	NPs 0,072	99,8	1,1	101,7	0,5	98,3	1,1	99,5	2,1
	NPs 0,72	101,6	0,5	101,6	1,4	98,7	0,4	99,2	0,9
	NPs 3,6	101,8	0,5	99,3	0,4	98,4	0,8	100,3	1,7
senza FBS	NPs 0,072	114,6	0,8	104,2	1,7	101,6	0,8	98,7	2,4
	NPs 0,72	116,2	0,4	107,4	1,3	101,2	0,6	99,3	0,1
	NPs 3,6	115,4	2,5	102,3	0,7	100,4	1,7	96,9	2,9

Tab. 4.2.8 - Rappresentazione del *survival rate* medio e della SD della linea Colo320.

MOLT4	Concentrazione NPs (mg/mL)	1h		4h		24h		48h	
		Survival rate (%)	SD (%)	Survival rate (%)	SD (%)	Survival rate (%)	SD (%)	Survival rate (%)	SD (%)
con FBS	NPs 0,072	105,3	0,0	118,8	8,8	101,6	2,3	100,0	1,4
	NPs 0,72	85,5	26,5	107,7	7,1	111,2	1,2	99,2	5,7
	NPs 3,6	98,7	8,8	106,2	2,8	104,2	9,3	100,8	2,3
senza FBS	NPs 0,072	99,0	1,3	110,0	11,8	111,7	2,8	114,2	1,6
	NPs 0,72	108,0	7,8	100,0	0,0	111,7	5,3	110,0	1,3
	NPs 3,6	106,1	10,0	110,0	11,8	115,5	1,3	111,0	9,4

Tab. 5.2.9 - Rappresentazione del *survival rate* medio e della SD della linea MOLT4.

Jurkat	Concentrazione NPs (mg/mL)	1h		4h		24h		48h	
		Survival rate (%)	SD (%)	Survival rate (%)	SD (%)	Survival rate (%)	SD (%)	Survival rate (%)	SD (%)
con FBS	NPs 0,072	103,7	11,3	82,1	10,8	107,9	12,1	103,4	3,2
	NPs 0,72	94,1	6,1	96,6	12,4	114,4	7,1	135,2	4,8
	NPs 3,6	125,9	3,5	107,7	5,7	103,4	3,5	127,5	5,6
senza FBS	NPs 0,072	76,2	4,4	93,5	1,5	57,3	0,6	103,7	6,3
	NPs 0,72	103,6	0,6	72,5	1,1	82,0	0,9	119,4	0,4
	NPs 3,6	103,3	12,3	88,0	8,1	66,2	0,7	106,8	0,9

Tab. 5.2.10 - Rappresentazione del *survival rate* medio e della SD della linea Jurkat.

Per confrontare eventuali differenze tra i diversi campioni elaboriamo 4 grafici per ogni linea cellulare, corrispondenti ai 4 diversi tempi di incubazione (Fig. 4.2.1, 4.2.2, 4.2.3, 4.2.4).

Vediamo che, in generale, i valori di *survival rate* (campione/bianco * 100) si aggirano attorno al 100%, indipendentemente dai tempi di incubazione e dalla concentrazione di nanoparticelle. Abbiamo analizzato i nostri dati con il test statistico *T di Student*, che ci descrive i dati come non significativi per $p < 0,01$. Questo significa che le nanoparticelle non hanno un effetto citotossico. Al contrario dei precedenti esperimenti effettuati con il kit *CCK-8*, non vediamo nessun effetto mitogeno stimolato dalle nanoparticelle e, considerando che i risultati sono costanti indipendentemente dalla linea cellulare, possiamo ritenere il saggio per esclusione con *Trypan Blue* 0,4% affidabile e i risultati ripetibili.

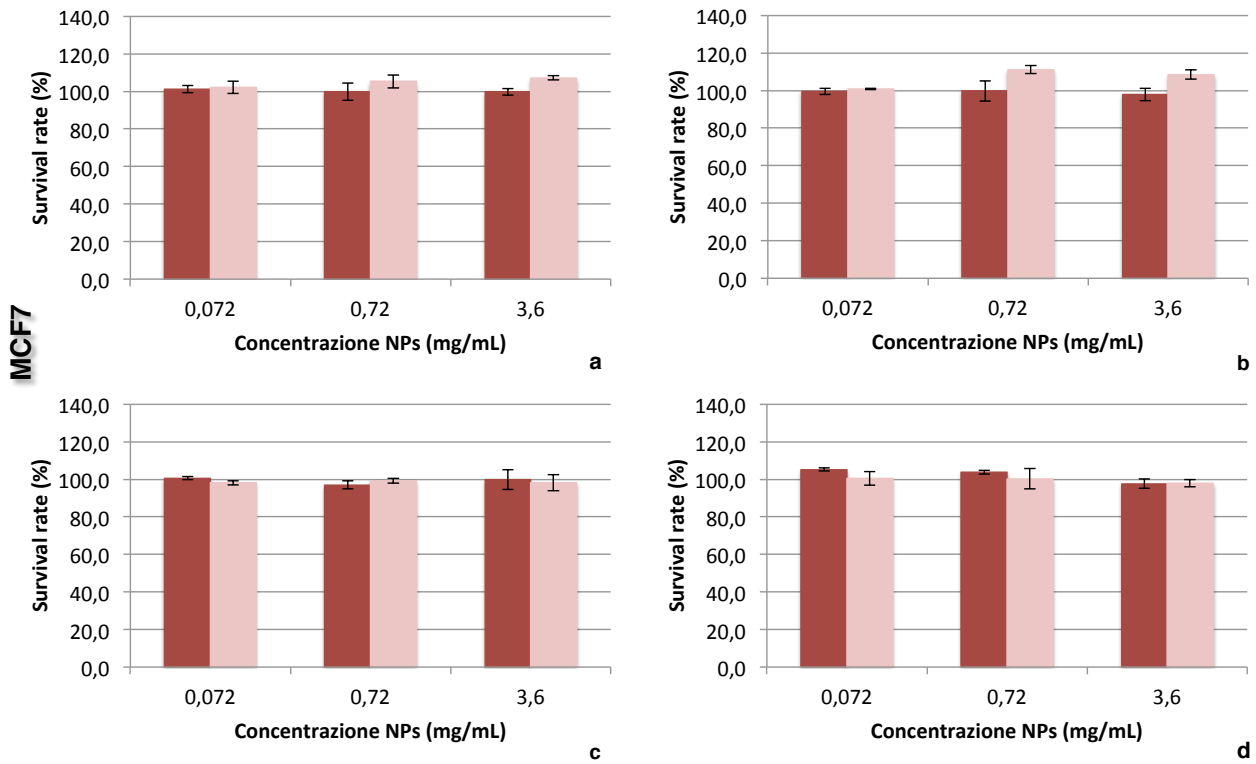


Fig. 4.2.2 – Rappresentazione del *survival rate* della linea cellulare MCF7. (a) incubazione 1h con NPs; (b) incubazione 4h con NPs; (c) incubazione 24h con NPs; (d) incubazione 48h con NPs:
 ● campioni con FBS
 ● campioni senza FBS

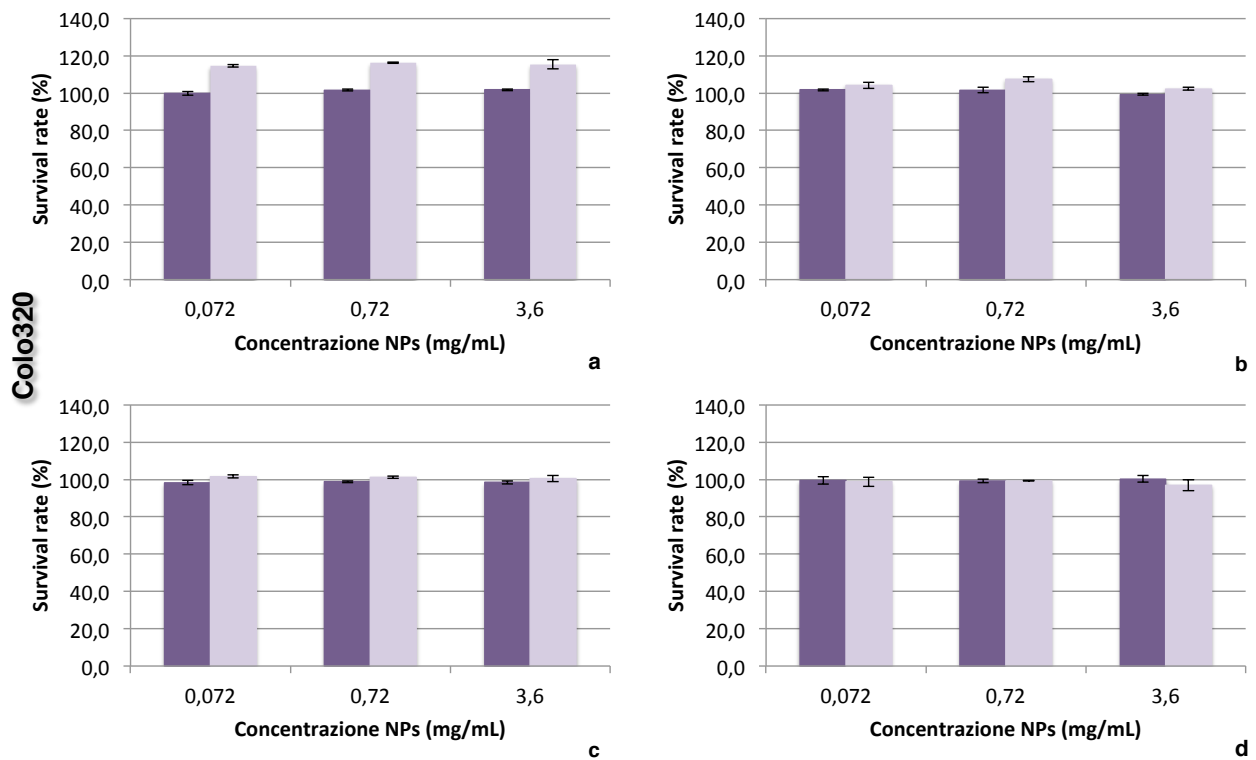


Fig. 4.2.1 – Rappresentazione del *survival rate* della linea cellulare Colo320. (a) incubazione 1h con NPs; (b) incubazione 4h con NPs; (c) incubazione 24h con NPs; (d) incubazione 48h con NPs:
 ● campioni con FBS
 ● campioni senza FBS

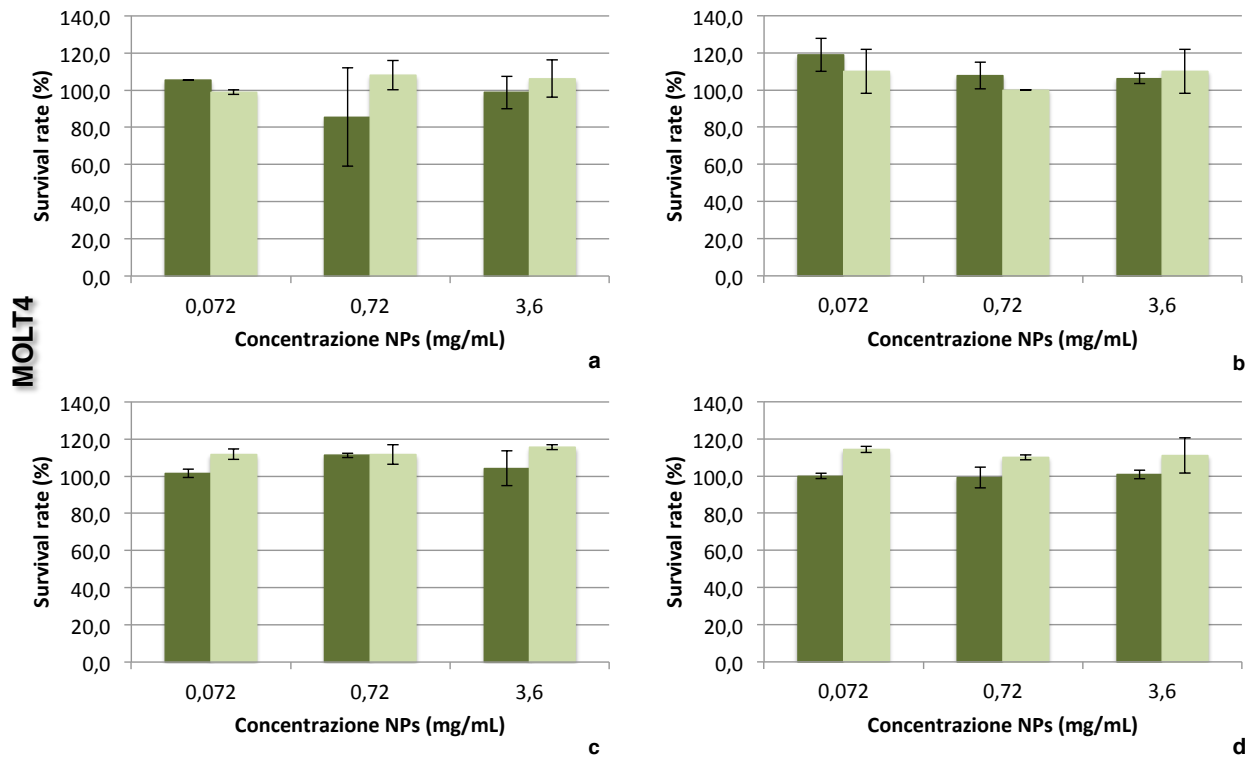


Fig. 4.2.3 – Rappresentazione del *survival rate* della linea cellulare MOLT4. (a) incubazione 1h con NPs; (b) incubazione 4h con NPs; (c) incubazione 24h con NPs; (d) incubazione 48h con NPs:

- campioni con FBS
- campioni senza FBS

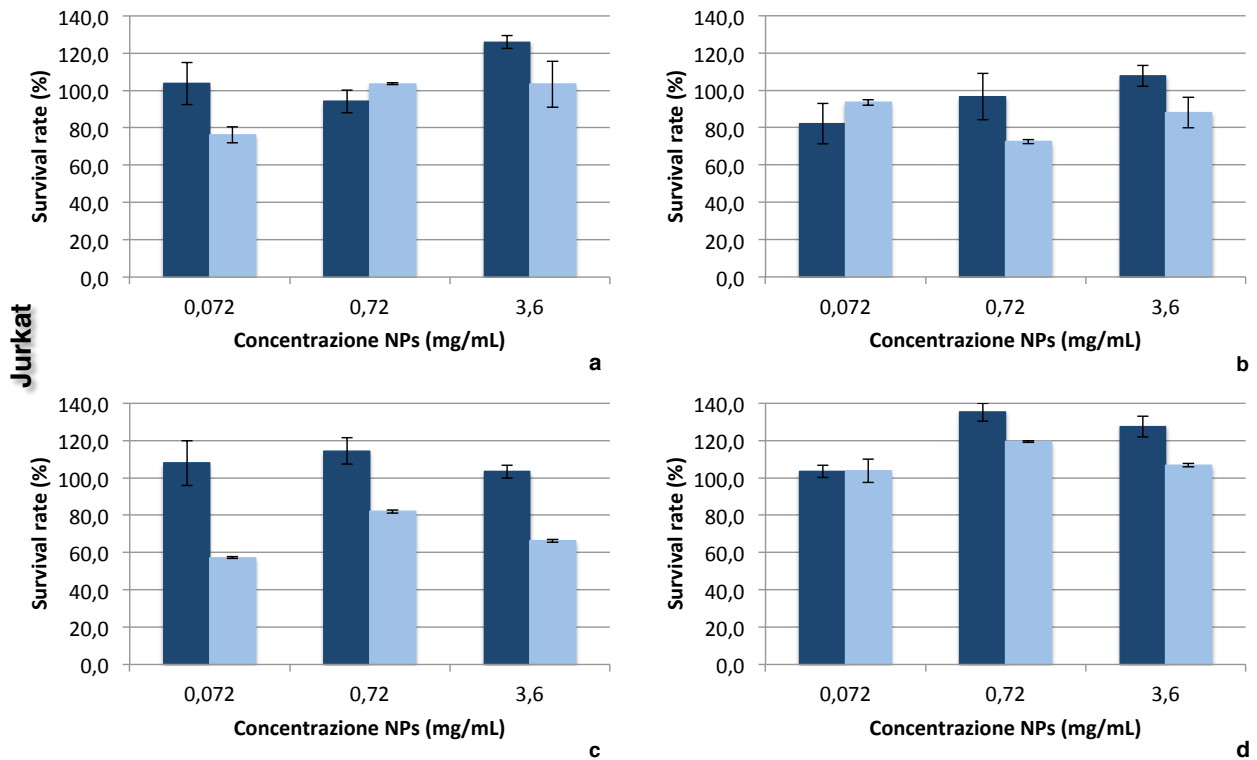


Fig. 4.2.4 – Rappresentazione del *survival rate* della linea cellulare Jurkat. (a) incubazione 1h con NPs; (b) incubazione 4h con NPs; (c) incubazione 24h con NPs; (d) incubazione 48h con NPs:

- campioni con FBS
- campioni senza FBS

4.3 - Valutazione della localizzazione

Da esperimenti precedenti effettuati presso i laboratori AcZon, è risultato che l'*uptake* delle nanoparticelle è un processo attivo.

Sappiamo che le cellule sono in grado di attuare differenti *pathways* di endocitosi per l'internalizzazione attiva di sostanze dall'esterno ma, dato che alcuni enzimi coinvolti nell'endocitosi vengono inibiti a 4 °C, si è provato a incubare le cellule con le nanoparticelle sia alla temperatura ottimale (37 °C) che a 4 °C. Anche se non sono stati fatti esperimenti successivi per capire a quale *pathway* di endocitosi sia riconducibile l'*uptake* delle nanoparticelle, è noto che il processo di internalizzazione viene inibito se l'incubazione viene effettuata a 4 °C.

In particolare è stata utilizzata la linea cellulare MCF7, sottoponendola ad un'incubazione di 2h con nanoparticelle funzionalizzate con NH₂.

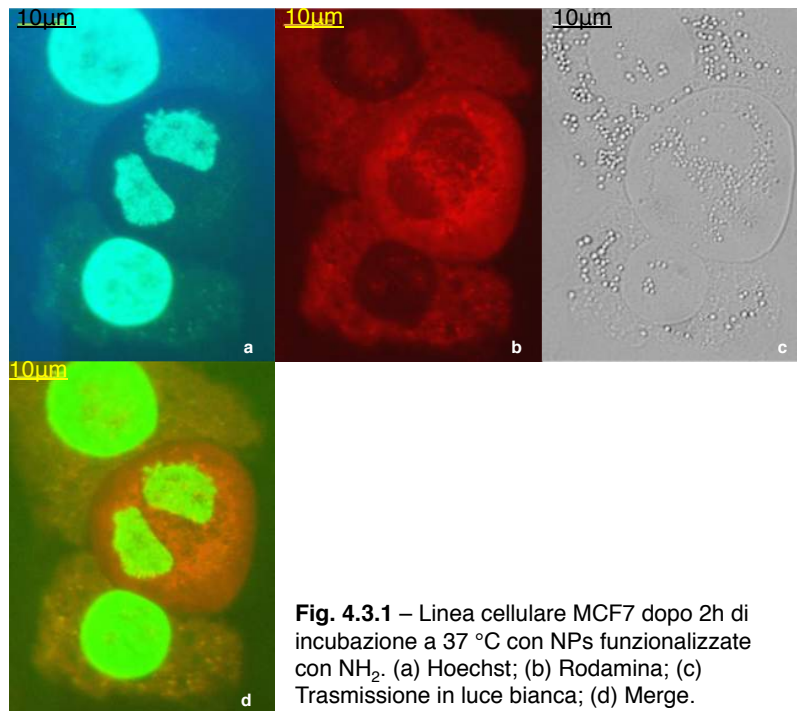


Fig. 4.3.1 – Linea cellulare MCF7 dopo 2h di incubazione a 37 °C con NPs funzionalizzate con NH₂. (a) Hoechst; (b) Rodamina; (c) Trasmissione in luce bianca; (d) Merge.

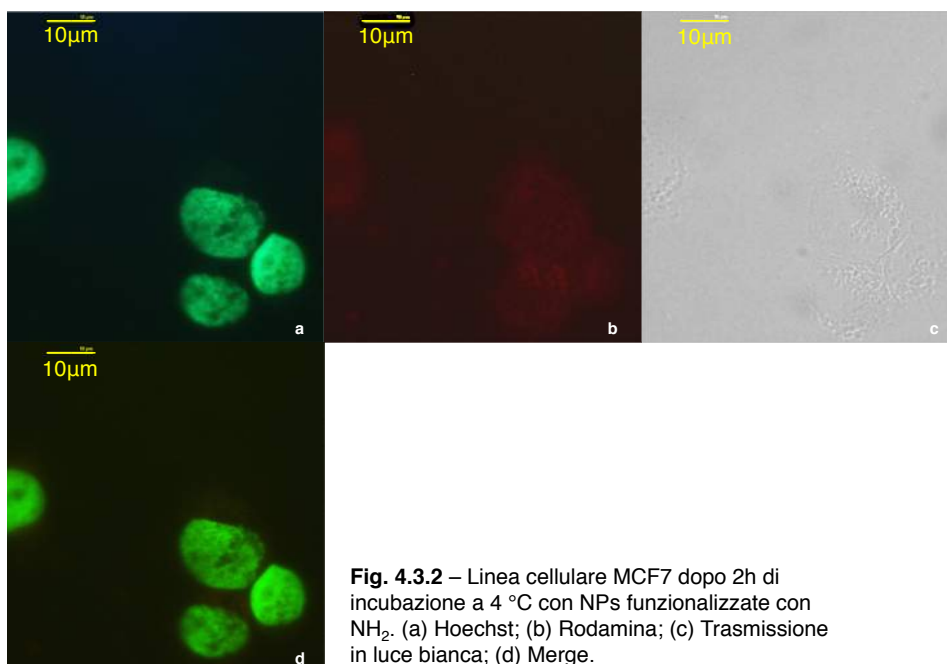


Fig. 4.3.2 – Linea cellulare MCF7 dopo 2h di incubazione a 4 °C con NPs funzionalizzate con NH₂. (a) Hoechst; (b) Rodamina; (c) Trasmissione in luce bianca; (d) Merge.

Si è visto che i campioni incubati a 37 °C effettuano l'internalizzazione delle nanoparticelle, mentre i campioni incubati a 4 °C presentano una debole colorazione aspecifica dovuta alle nanoparticelle, in quanto tale colorazione non è presente nel bianco. Questa colorazione aspecifica può essere causata da diversi fattori:

- ci possono essere *pathway* di *uptake* attivi che non sono stati inibiti, oppure sono stati riattivati, a seguito dell'abbassamento della temperatura
- può essere presente un legame aspecifico tra l'esterno della cellula e le nanoparticelle, dovuto all'utilizzo di nanoparticelle funzionalizzate con gruppi NH₂
- presenza di *pathway* di *uptake* passivi

Dato che la colorazione dovuta alle nanoparticelle a 4 °C risulta trascurabile rispetto a quella evidenziata dall'incubazione a 37 °C, si è giunti alla conclusione che l'*uptake* delle nanoparticelle sia un processo prevalentemente attivo.

Sempre da esperimenti precedenti effettuati in AcZon, si è evidenziato che la localizzazione nelle nanoparticelle su una linea cellulare tumorale di adenocarcinoma mammario (SkBr3) è citoplasmatica e, nel caso di incubazioni brevi, è stata notata la distribuzione delle nanoparticelle in granuli e non come fluorescenza diffusa, il che potrebbe far pensare ad un'internalizzazione in vescicole.

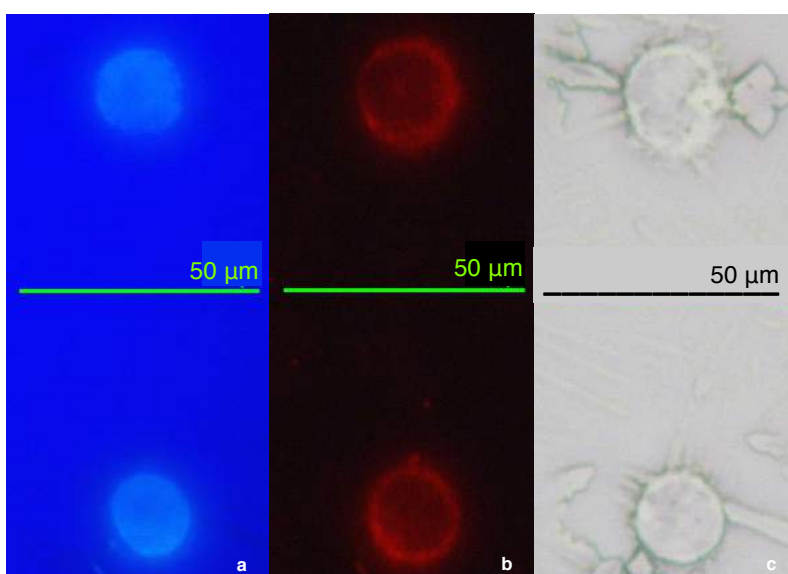


Fig. 4.3.3 – Linea cellulare SkBr3 dopo 4h di incubazione a 37 °C con NPs non funzionalizzate. (a) Hoechst; (b) Rodamina; (c) Trasmissione in luce bianca.

Basandoci su questi esperimenti precedenti, quindi, abbiamo approfondito i risultati ottenuti utilizzando diverse linee cellulari su cui effettuare l'incubazione con nanoparticelle, per capire se l'*uptake* e la localizzazione delle nanoparticelle nella cellula sono processi dipendenti dalla linea cellulare utilizzata o meno.

Possiamo analizzare i risultati ottenuti confrontando le immagini a seconda delle differenti linee cellulari utilizzate. Analizzando tutte le immagini, notiamo che né la presenza o assenza di FBS nel mezzo di incubazione, né i diversi tempi di incubazione hanno influito sull'*uptake* delle nanoparticelle. Infatti, in tutti i campioni si nota la fluorescenza dovuta alla rodamina, che è più o meno intensa dipendentemente dalla concentrazione di nanoparticelle a cui è stata effettuata l'incubazione. Quindi, le immagini che riportiamo sotto sono un estratto di tutte le immagini effettuate e le abbiamo scelte in quanto abbiamo ritenuto fossero le più significative (tutte le immagini sottostanti possono essere paragonate per intensità di fluorescenza sia del colorante nucleare che della rodamina, in quanto sono sempre stati utilizzati gli stessi parametri). Ordiniamo le immagini partendo dalla concentrazione di nanoparticelle 0,072 mg/mL, sia con ingrandimento 40X che 100X, per poi passare alla concentrazione 0,72 mg/mL e 3,6 mg/mL.

Linea cellulare MCF7

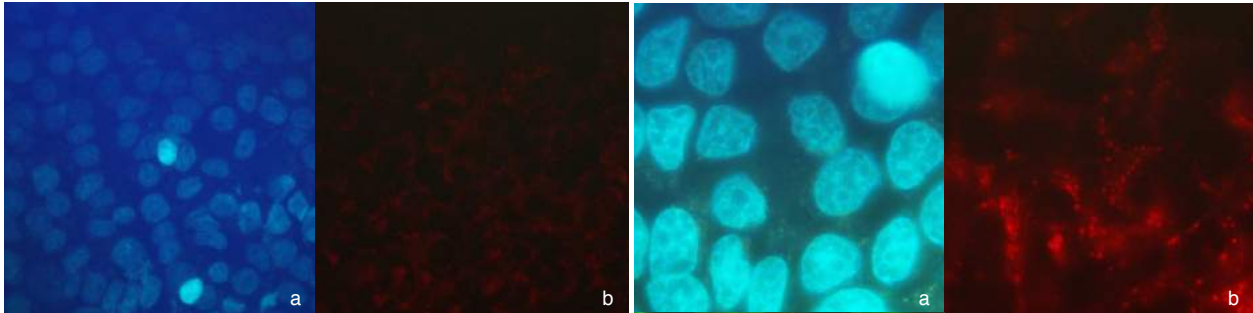


Fig. 4.3.4 – 24h di incubazione, NPs 0,072 mg/mL con FBS, obiettivo 40X. (a) Hoechst; (b) Rodamina; (c) Merge.

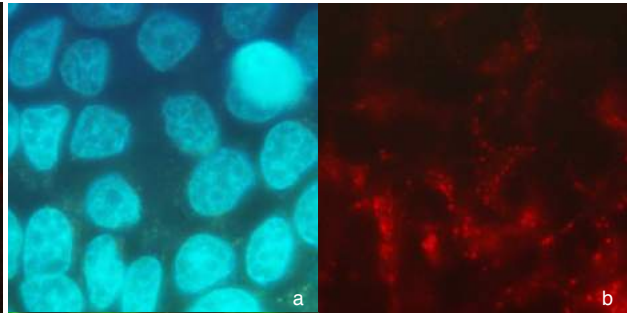


Fig. 4.3.5 – 24h di incubazione, NPs 0,072 mg/mL con FBS, obiettivo 100X. (a) Hoechst; (b) Rodamina; (c) Merge.

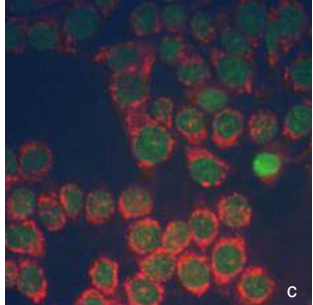
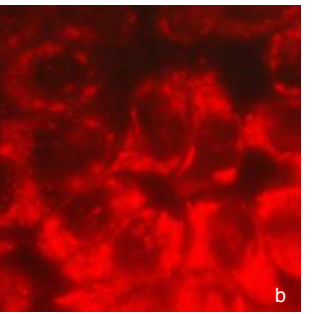
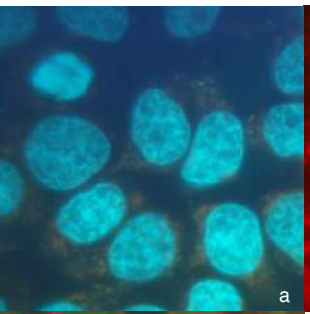
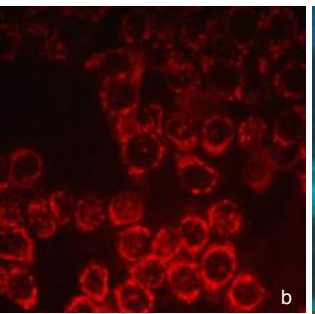
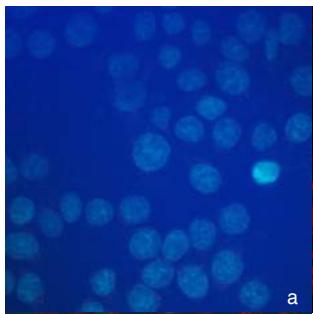
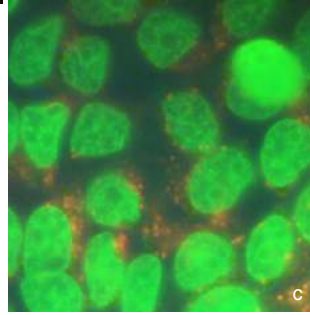
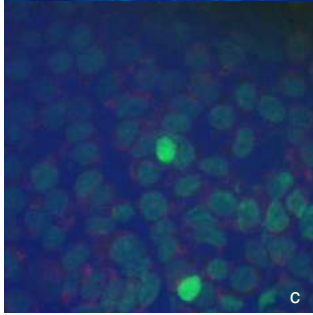


Fig. 4.3.6 – 4h di incubazione, NPs 0,72 mg/mL senza FBS, obiettivo 40X. (a) Hoechst; (b) Rodamina; (c) Merge.

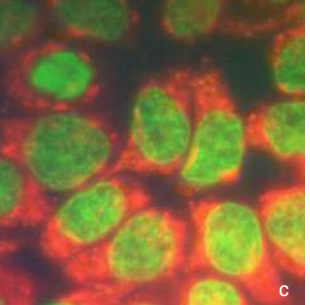


Fig. 4.3.7 – 24h di incubazione, NPs 0,72 mg/mL senza FBS, obiettivo 100X. (a) Hoechst; (b) Rodamina; (c) Merge.

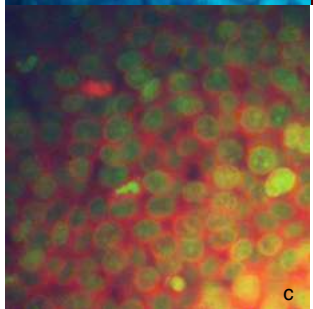
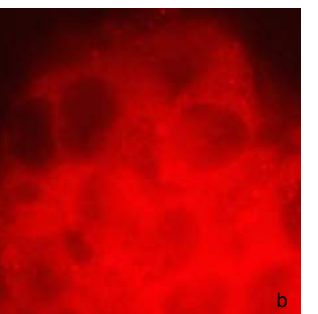
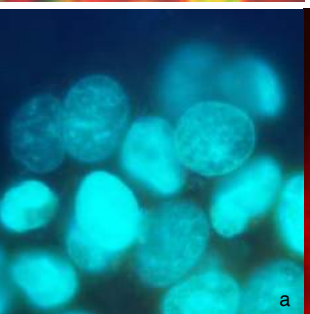
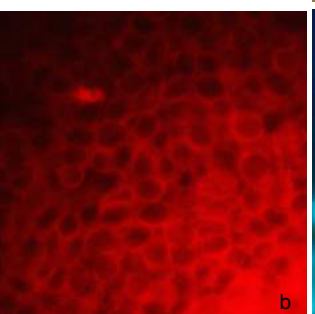
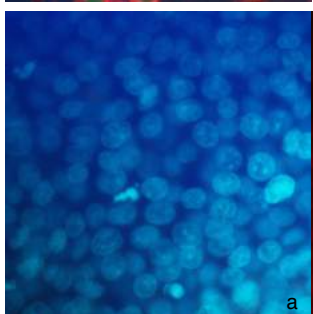


Fig. 4.3.8 – 4h di incubazione, NPs 3,6 mg/mL senza FBS, obiettivo 40X. (a) Hoechst; (b) Rodamina; (c) Merge.

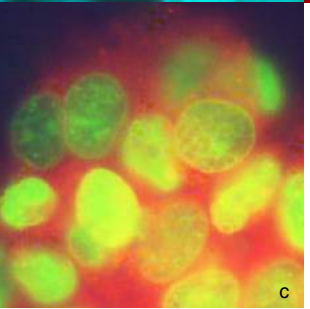
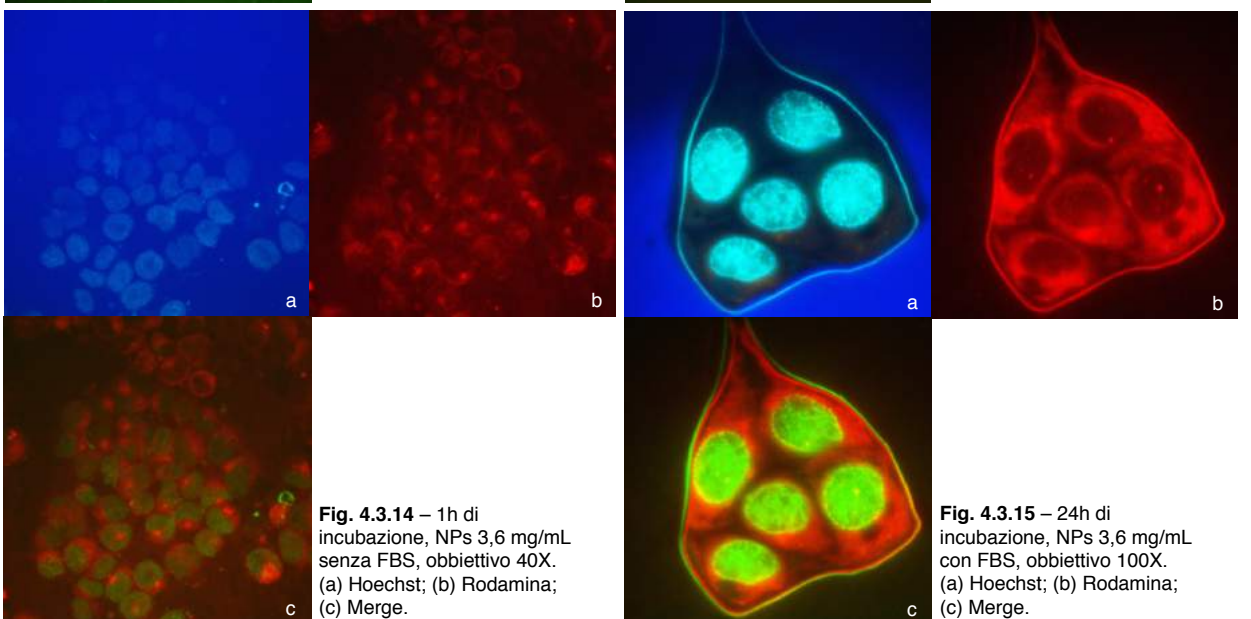
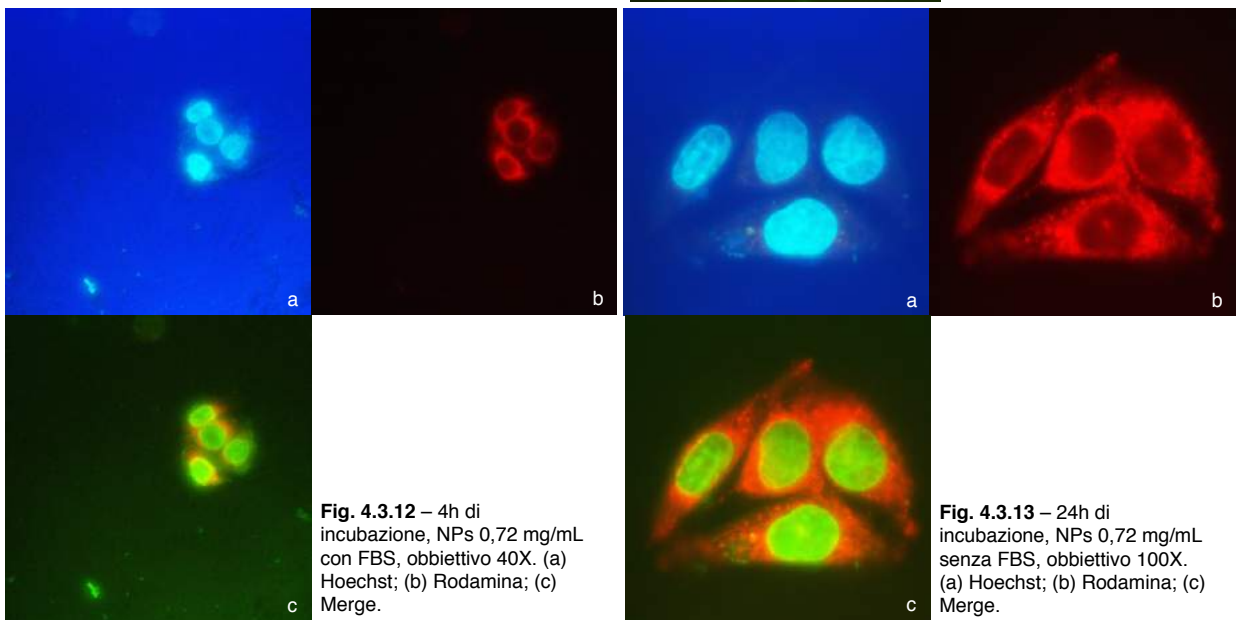
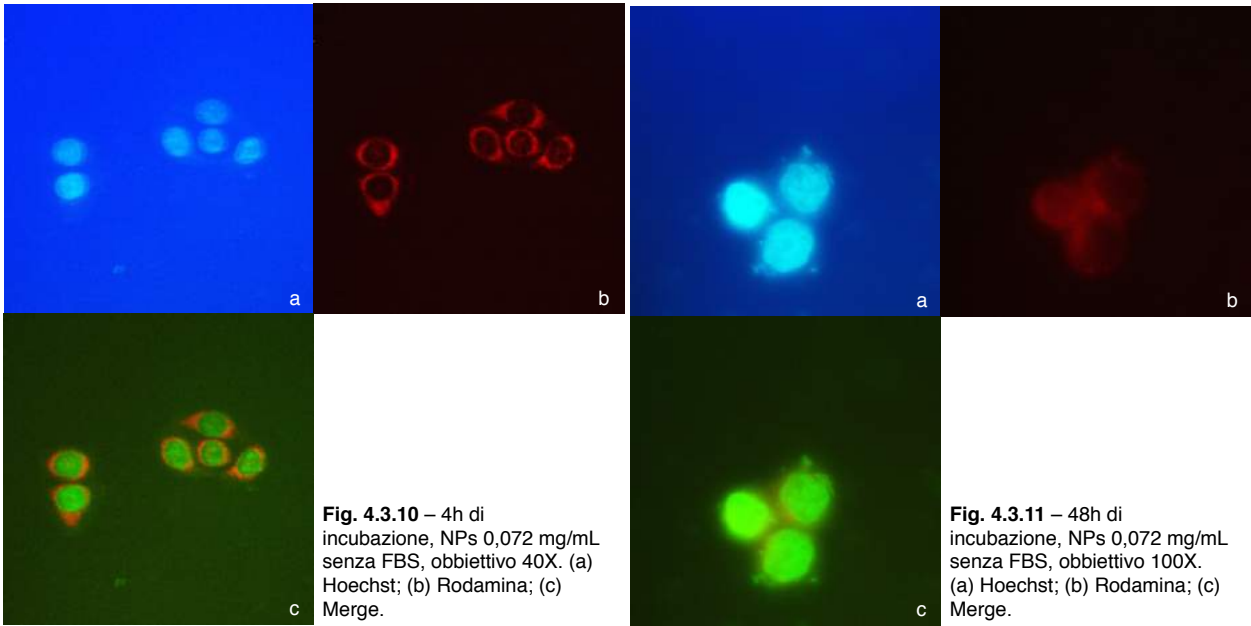


Fig. 4.3.9 – 4h di incubazione, NPs 3,6 mg/mL con FBS, obiettivo 100X. (a) Hoechst; (b) Rodamina; (c) Merge.

Linea cellulare Colo320



Linea cellulare MOLT4

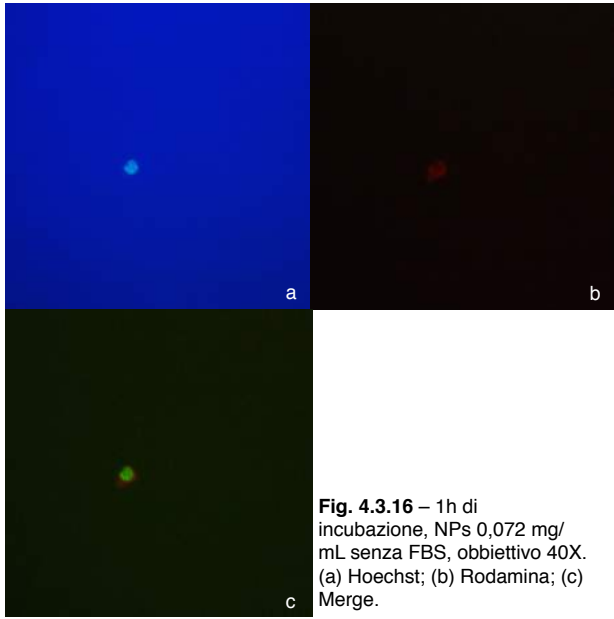


Fig. 4.3.16 – 1h di incubazione, NPs 0,072 mg/mL senza FBS, obiettivo 40X. (a) Hoechst; (b) Rodamina; (c) Merge.

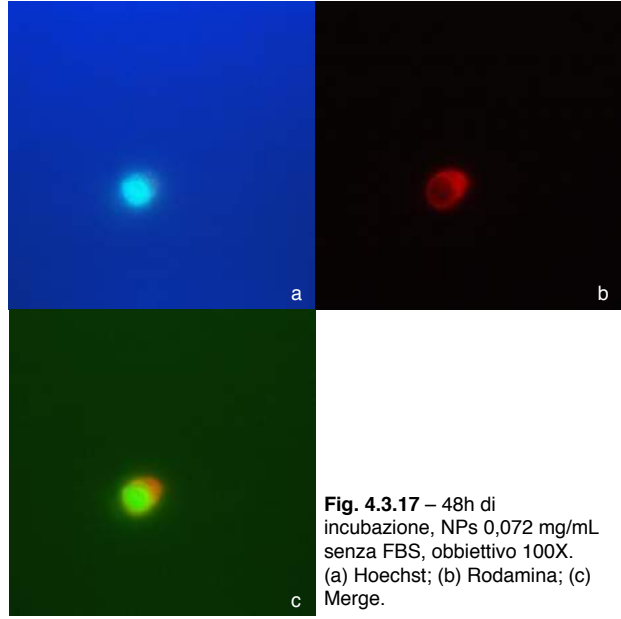


Fig. 4.3.17 – 48h di incubazione, NPs 0,072 mg/mL senza FBS, obiettivo 100X. (a) Hoechst; (b) Rodamina; (c) Merge.

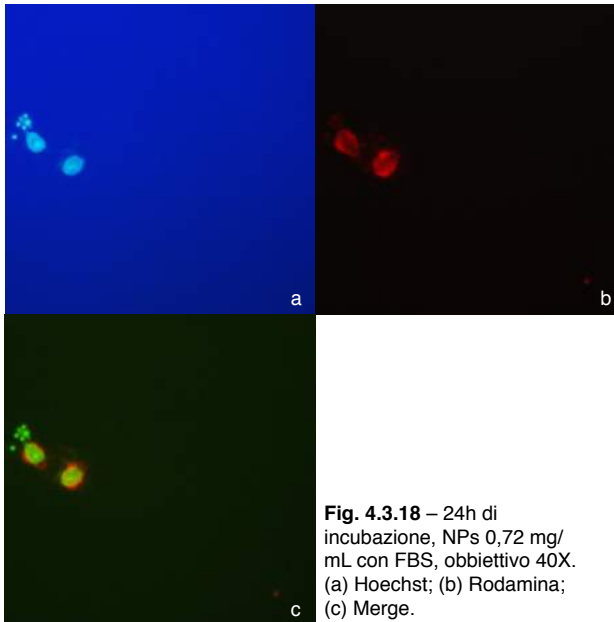


Fig. 4.3.18 – 24h di incubazione, NPs 0,72 mg/mL con FBS, obiettivo 40X. (a) Hoechst; (b) Rodamina; (c) Merge.

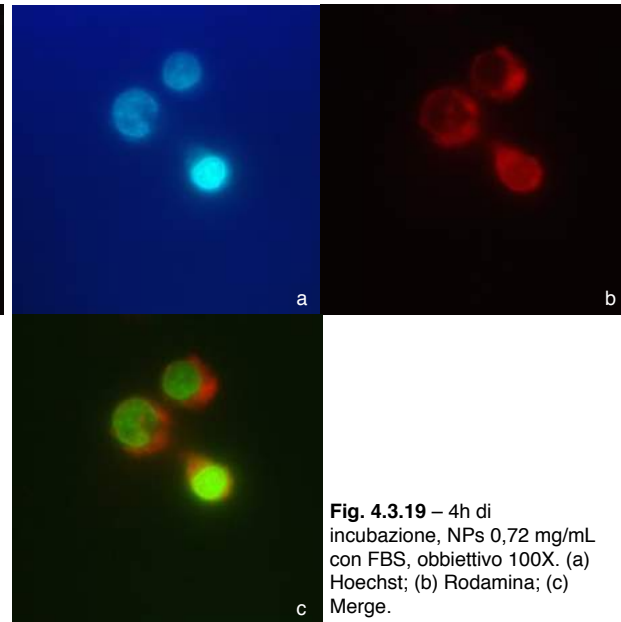


Fig. 4.3.19 – 4h di incubazione, NPs 0,72 mg/mL con FBS, obiettivo 100X. (a) Hoechst; (b) Rodamina; (c) Merge.

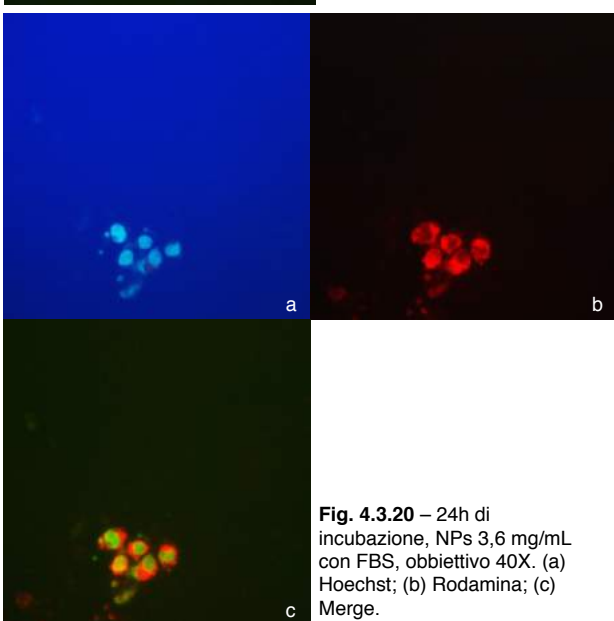


Fig. 4.3.20 – 24h di incubazione, NPs 3,6 mg/mL con FBS, obiettivo 40X. (a) Hoechst; (b) Rodamina; (c) Merge.

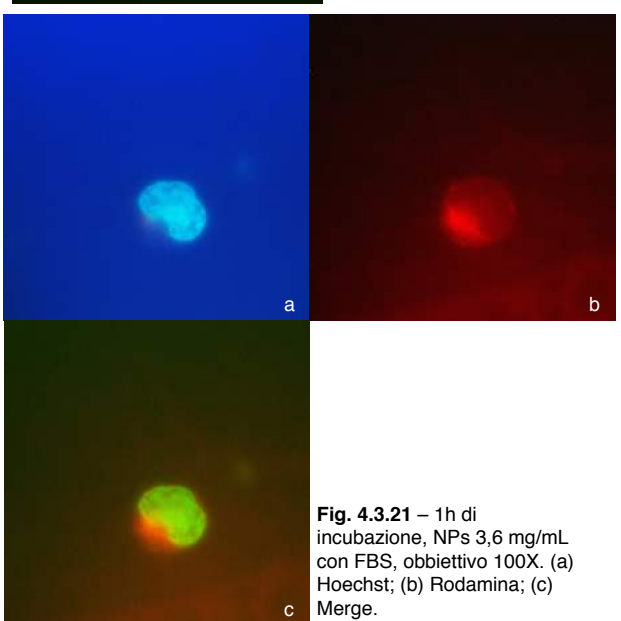
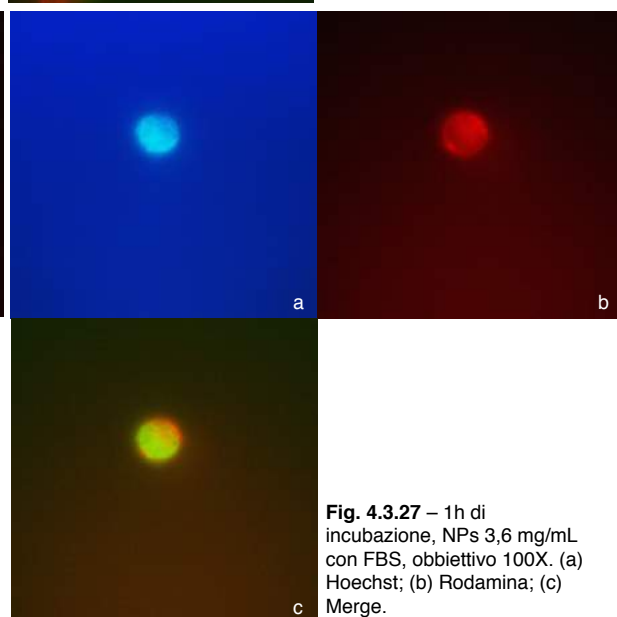
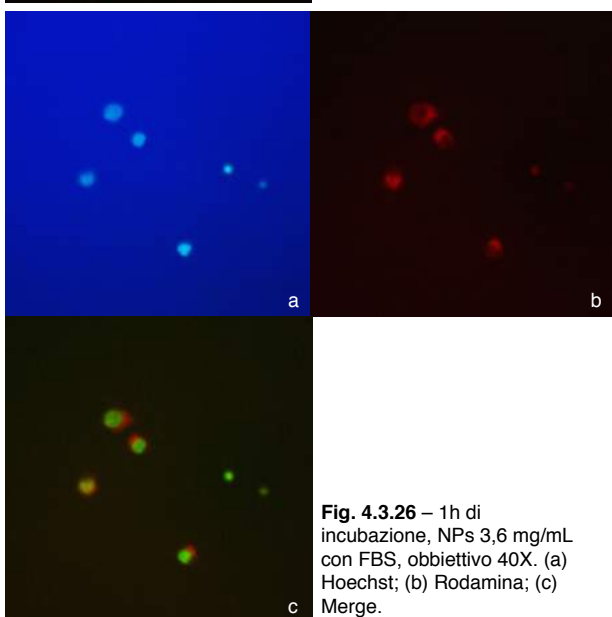
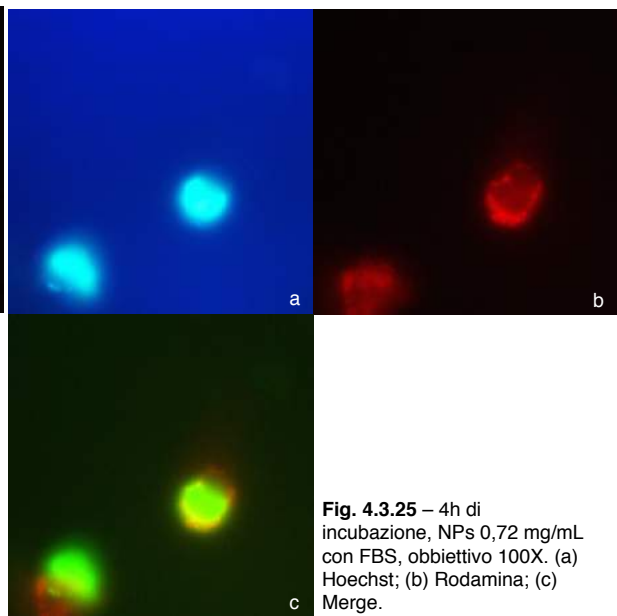
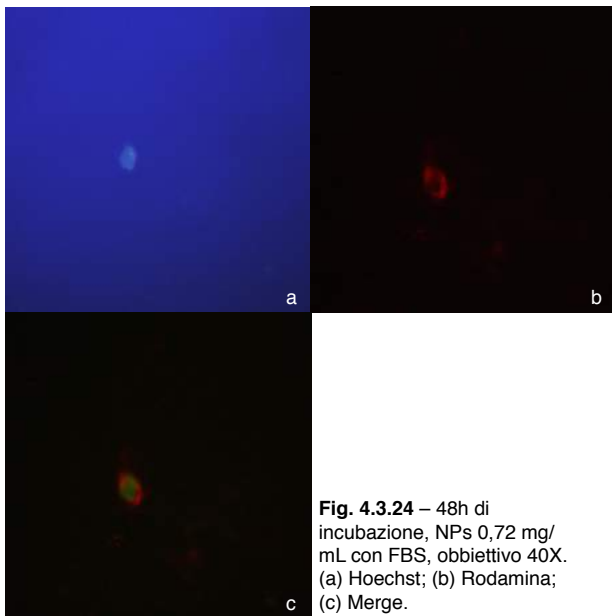
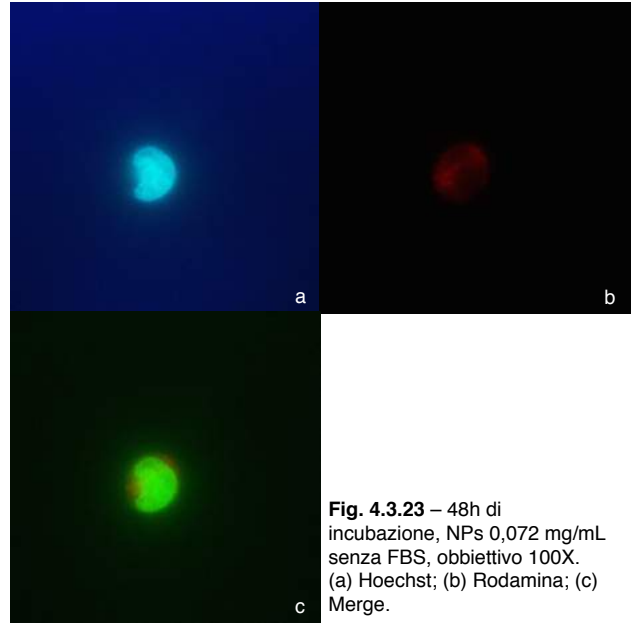
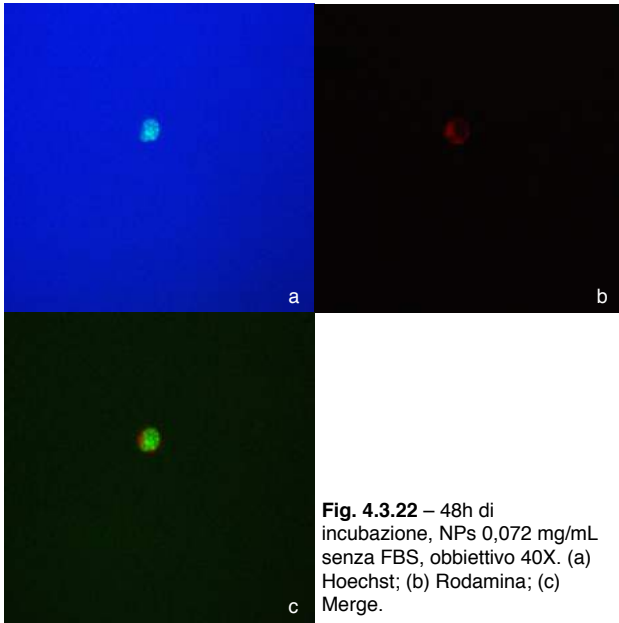


Fig. 4.3.21 – 1h di incubazione, NPs 3,6 mg/mL con FBS, obiettivo 100X. (a) Hoechst; (b) Rodamina; (c) Merge.

Linea cellulare Jurkat



Le immagini analizzate ci mostrano che la distribuzione delle nanoparticelle è citoplasmatica, in quanto si nota che la porzione del nucleo, quella evidenziata con Hoechst, è più scura e non rossa. In alcune immagini sembra che la fluorescenza si espanda parzialmente anche nel nucleo, ma potrebbe essere un artefatto dovuto alla presenza di una porzione di citoplasma al di sopra del nucleo e la cui fluorescenza va a coprire la porzione nucleare sottostante.

Anche se sarebbero necessari ulteriori accertamenti con strumenti che permettano di analizzare porzioni più sottili delle cellule, che non sono a disposizione nei laboratori AcZon, per verificare che la fluorescenza non sia effettivamente presente nel nucleo, possiamo dire con relativa sicurezza che le nanoparticelle non funzionalizzate non sembrano entrare nel nucleo, per cui non interagiscono con il materiale genetico.

Inoltre, in alcune immagini sembra che le nanoparticelle siano organizzate all'interno di vescicole nella cellula, mentre nella maggioranza dei casi la fluorescenza è diffusa e non sono presenti granuli. Visto che questa organizzazione che sembra vescicolare non è dipendente dal tempo di incubazione né è caratteristica di una determinata linea cellulare, oltre al fatto che è un fenomeno sporadico, possiamo pensare che sia un fenomeno casuale e non ripetibile dovuto a qualche variazione nelle condizioni di incubazione.

4.4 - Discussione

In letteratura sono riportati diversi lavori per cercare di determinare l'effetto, tossico o meno, di vari tipi di nanoparticelle su diverse linee cellulari, mentre in altri si cerca di determinare la localizzazione e il livello di internalizzazione di tali nanoparticelle.

Un esempio, per quanto riguarda l'analisi della tossicità, sono i risultati di Wu Y. e altri (Wu Y, 2015), che hanno approfondito il comportamento di nanoparticelle di silice non PEGilate su linee cellulari tumorali umane, in particolare HeLa (adenocarcinoma della cervice uterina) e MGC80-3 (adenocarcinoma gastrico). In questo esperimento è stato dimostrato che le nanoparticelle di silice utilizzate, che hanno un diametro di circa 20 nm, vengono internalizzate da entrambe le linee cellulari, ma hanno un effetto citotossico che è dipendente sia dalla dose di nanoparticelle che dal tempo di incubazione. È stato utilizzato il saggio di vitalità cellulare MTT (3-[4,5-dimetiltiazol-2-ile]-2,5-dipententetrazolio bromide) per dimostrare che le cellule MGC80-3 sono più suscettibili all'effetto delle nanoparticelle, per cui la loro vitalità diminuisce a partire da concentrazioni minori di nanoparticelle e tempi di incubazioni più brevi rispetto alle cellule HeLa.

Oltre al saggio di vitalità, in questo esperimento è stata valutata anche l'induzione dell'apoptosi da parte delle nanoparticelle, utilizzando un colorante nucleare: mentre le cellule che non sono state sottoposte al trattamento mostrano nuclei rotondi con cromatina omogenea, le cellule trattate mostrano la morfologia tipica dei nuclei apoptotici, con la cromatina condensata e il nucleo frammentato.

Chang JS. e altri (Chang JS, 2007) dimostrano invece che la linea cellulare HeLa non presenta alterazioni metaboliche significative dopo un'incubazione di 48h con nanoparticelle, mentre i fibroblasti polmonari e della pelle sono più sensibili al contatto con nanoparticelle, anche se sembra che le nanoparticelle silice-chitosano siano maggiormente biocompatibili rispetto alle nanoparticelle silice-TEOS.

Questo risultato è in accordo con il lavoro di Blechinger J. e altri (Blechinger J, 2013), secondo i quali la somministrazione di nanoparticelle di silice PEGilate su cellule tumorali della linea HeLa non ne altera la vitalità né a tempi brevi di incubazione (2h e 4h), né a tempi più lunghi (24h). Inoltre, non è stata evidenziata un'alterazione delle attività metaboliche delle cellule, come una variazione della produzione di ATP. Al contrario, gli esperimenti effettuati su cellule dell'endotelio vascolare umano (HUVEC) hanno rivelato che l'internalizzazione delle nanoparticelle provoca delle alterazioni metaboliche delle cellule, in quanto si ha una diminuzione della produzione di ATP a causa di una ridotta attività mitocondriale. Su questa linea cellulare l'effetto tossico delle nanoparticelle è stato verificato grazie all'analisi in citofluorimetria, dopo colorazione con ioduro di propidio.

Il lavoro di Blechinger è interessante anche per quanto riguarda l'analisi dell'*uptake* delle

nanoparticelle. In questo articolo viene riportato che l'internalizzazione di nanoparticelle di silice non PEGilate da parte di cellule HeLa è molto lento entro le prime 4h di incubazione, mentre aumenta esponenzialmente tra le 4 e le 10h. Mentre subito dopo l'internalizzazione le nanoparticelle si trovano uniformemente distribuite nel citoplasma, è stato osservato che, con il passare del tempo, esse tendono a disporsi nella zona perinucleare, il che dimostra che esiste un trasporto attivo delle nanoparticelle all'interno della cellula.

Infine è stato visto, grazie a specifici inibitori, che nelle cellule HeLa il *pathway* predominante per l'internalizzazione delle nanoparticelle è quello clatrina-dipendente.

L'assenza di tossicità dopo il trattamento con nanoparticelle viene confermata anche dal lavoro di Cheng X. e altri, in cui le linee cellulari tumorali RAW 264.7 (leucemia murina di Abelson indotta da virus) e HepG2 (carcinoma epatocellulare) sono state trattate con nanoparticelle d'oro rivestite da una corona proteica per 24h. Per ogni trattamento sono stati allestiti due campioni, uno in incubazione con terreno DMEM (*Dulbecc's Modified Eagle Medium*) privo di siero e uno in incubazione con terreno DMEM completo, al 10% di FBS, e in tutti i trattamenti la vitalità cellulare è rimasta inalterata.

Inoltre, dato che sia le RAW 264.7 che le HepG2 sono linee cellulari immortalizzate, sono stati effettuati gli stessi trattamenti anche su epatociti primari e macrofagi primari, utilizzando una concentrazione di nanoparticelle di 50 µg/mL, ed è stato visto che, anche in questo caso, non si verifica una diminuzione della vitalità cellulare.

Per quanto riguarda l'analisi dell'internalizzazione, questo lavoro dimostra la presenza di siero nel terreno è responsabile della diminuzione dell'*uptake* delle nanoparticelle in entrambe le linee cellulari, ma soprattutto nella linea RAW 264.7, e questo risultato suggerisce che il livello di internalizzazione delle nanoparticelle varia a seconda della linea cellulare utilizzata.

Alla luce dei nostri risultati e dopo aver analizzato il panorama della letteratura scientifica, è evidente come non esista ancora una risposta univoca riguardo alla tossicità e alla localizzazione di materiale nanoparticolato a livello cellulare. Possiamo dire che, sicuramente, i danni indotti da nanoparticelle sono dipendenti soprattutto dalla natura intrinseca del materiale di cui esse sono costituite, com'era prevedibile, ma anche dalla tipologia cellulare con cui esse vengono messe in contatto.

Anche per quanto riguarda la localizzazione e il trasporto di tali nanoparticelle all'interno delle cellule, possiamo dire che esistono delle differenze dovute al tipo di materiale utilizzato e alla linea cellulare, anche se sembra plausibile che esista un *pathway* predominante di internalizzazione, ovvero quello clatrina-dipendente.

Sicuramente lo studio dell'interazione tra materiale nanoparticolato e cellule deve essere ulteriormente approfondito per capire in che modo questa nanotecnologia all'avanguardia può essere utilizzata, ma ogni risultato ottenuto ci permette di fare dei progressi nella comprensione del comportamento dei nanomateriali.

5 - Conclusioni

5.1 - Prospettive future

Una nuova applicazione in cui le nanoparticelle di silice fluorescenti AcZon hanno delle grandissime potenzialità è il *tracking* delle cellule staminali mesenchimali umane nella terapia contro il cancro, in particolare la possibilità di seguire la migrazione e la biodistribuzione di tali cellule.

Le cellule staminali (SCs) sono definite come cellule non specializzate e capaci sia di mantenere le loro caratteristiche di staminalità che di differenziarsi in tipi cellulari diversi. Le cellule staminali embrionali (ESCs) possono essere definite come cellule pluripotenti e derivano dall'*inner cell mass* della blastocisti embrionale. Anche l'organismo adulto, però, possiede un *pool* di cellule staminali multipotenti che possono essere isolate dal midollo osseo, dal tessuto adiposo, dalla placenta e dal cordone ombelicale. Queste cellule, definite cellule staminali mesenchimali (MSCs), possono differenziarsi, sotto appropriati stimoli, in condrociti, osteoblasti, adipociti, neuroni, cardiomiociti e cellule endoteliali (Accomasso L, 2016).

Le cellule staminali mesenchimali hanno suscitato un grande interesse nel campo della ricerca oncologica perché hanno la capacità di migrare verso il tumore e possono essere autotrapiantate. Rimangono, però, ancora molte domande riguardo a queste cellule, ad esempio occorre approfondire gli studi sulla loro biodistribuzione e capire qual è il loro destino a lungo termine. Attualmente, le sonde fluorescenti o i geni reporter sono gli agenti di contrasto più utilizzati per l'*imaging* in vivo delle cellule ma presentano dei problemi nell'utilizzo, come la loro permanenza in vivo a lungo termine (superiore a un mese) e il *photobleaching* (Li H, 2014). Al contrario, le nanoparticelle di silice fluorescenti possono essere internalizzate, *in vitro*, dalle cellule staminali che, poi, vengono somministrate nell'organismo e ne può essere tracciata la biodistribuzione grazie alla fluorescenza. In questo modo, le nanoparticelle riescono a proteggere il fluoroforo dal *photobleaching* e non hanno effetti dannosi sulle cellule stesse (Hall JB, 2007). Quindi, la tecnologia delle nanoparticelle per il *tracking* in vivo non invasivo delle cellule staminali potrebbe permettere una localizzazione sensibile e a lungo termine delle cellule, evitando il più possibile problemi di citotossicità (Sohaebuddin SK, 2010). È già stato dimostrato, infatti, che le nanoparticelle hanno un'influenza minima sulle caratteristiche cellulari, come la vitalità, la proliferazione e il differenziamento (Gao Y, 2014).

Per l'applicazione di questa tecnica sono comunque ancora necessari altri studi sul comportamento delle cellule staminali dopo l'internalizzazione delle nanoparticelle. Ad esempio, occorre capire in quanto tempo il segnale fluorescente viene dissipato visto che le cellule, replicandosi, in teoria si suddividono le nanoparticelle della cellula madre staminale. Inoltre, la maggioranza dei test con nanoparticelle sono stati effettuati su linee cellulari tumorali, mentre gli studi sulle linee cellulari sane e staminali non sono ancora stati approfonditi.

Un altro possibile problema è il fatto che le cellule, a lungo termine, potrebbero rilasciare le nanoparticelle, per cui anche in questo caso il segnale fluorescente si dissiperebbe progressivamente.

Un ulteriore problema del *tracking in vivo*, poi, è che devono essere utilizzate nanoparticelle con fluorofori che emettono nel rosso lontano, la cui radiazione arriva più in profondità nei tessuti, e questi sono i fluorofori meno stabili a causa del basso *gap* energetico che c'è tra lo stato fondamentale e quello eccitato.

In conclusione, possiamo dire che le nanoparticelle AcZon hanno un grande potenziale in campo diagnostico e terapeutico ma sono necessari ancora molti studi sul comportamento delle nanoparticelle *in vivo*. La tecnologia delle nanoparticelle ha fatto molti progressi negli ultimi anni, per cui possiamo ritenerci molto ottimisti sul fatto che queste applicazioni potrebbero trovare a breve un impiego diffuso in campo biomedico.

6 - Bibliografia

- Accomasso L, Gallina C, Turinetto V and Giachino C. *Stem Cell Tracking with Nanoparticles for Regenerative Medicine Purposes: an overview*. Stem Cells International, 2016.
- Blechinger J, Bauer AT, Torrano AA, Gorzelanny C, Bräuchle C and Schneider SW. *Uptake Kinetics and Nanotoxicity of Silica Nanoparticles Are Cells Type Dependent*. Small, May 2013.
- Chang JS, Chang KLB, Hwang DF and Kong ZL. *In Vitro Cytotoxicity of Silica Nanoparticles at High Concentrations Strongly Depends on the Metabolic Activity Type of the Cell Line*. Environmental Science & Technology, vol. 41 no. 6, 2007.
- Cheng X, Tian X, Wu A, Li J, Tian J, Chong Y, Chai Z, Zhao Y, Chen C, Ge C. *Protein Corona Influences Cellular Uptake of Gold Nanoparticles by Phagocytic and Nonphagocytic Cells in a Size-Dependent Manner*. ACS Applied Materials & Interfaces, 2015.
- Couvreur P, Barratt G, Fattal E, Legrand P, Vauthier C. *Nanocapsule technology: a review*. Crit Rev Ther Drug Carrier Syst 2002; 19: 99-134.
- De Jong WH, Borm PJA. *Drug Delivery and Nanoparticles: Applications and Hazards*. International Journal of Nanomedicine, 2008.
- Gao Y, Wang Y, Fu A, Shi W, Yeo D, Luo KQ, Ow H and Xu C. *Tracking Mesenchymal Stem Cell Tumor-homing Using Fluorescent Silica Nanoparticles*. Journal of Medical Chemistry B, 2014.
- Gobin AM, O'Neal DP, Watkins DM, Halas NJ, Drezek RA, et al. *Near infrared laser-tissue welding using nanoshells as an exogenous absorber*. Lasers Surg Med, 2005.
- Hall JB, Dobrovolskaia MA, Patri AK and McNeil SE. *Characterization of Nanoparticles for Therapeutics*. Nanomedicine, 2007.
- Li H, Mu Y, Lu J, Wei W, Wan Y and Liu S. *Target-cell-specific Fluorescence Silica Nanoprobes for Imaging and Theranostics of Cancer Cells*. Anal. Chem. 2014.
- McNeil SE. *Nanotechnology for the biologist*. Journal of Leukocyte Biology, vol. 78, September 2005.
- Mohanraj VJ and Chen Y. *Nanoparticles - A Review*. Trop J Pharm Res, June 2006; 5 (1).
- Montalti M, Prodi L, Rampazzo E and Zaccheroni N. *Dye-doped Silica Nanoparticles as Luminescent Organized System for Nanomedicine*. Chem. Soc. Rev., 2014.
- Niemeyer CM. *Nanoparticles, Proteins and Nucleic Acids: Biotechnology Meets Material Science*. Angew. Chem. Int. Ed. 2001.
- Nikalje AP. *Nanotechnology and its application in medicine*. Medicinal Chemistry, vol. 5, 2015.
- Ranganathan R, Madanmohan S, Kesavan A, Baskar G, Krishnamoorthy YR, Ponraju RSD, Rayala SK and Venkatraman G. *Nanomedicine: Towards Development of Patient-friendly Drug-delivery Systems for Oncological Applications*. International Journal of Nanomedicine 2012.
- Rio-Echevarria IM, Selvestrel F, Segat D, Guarino G, Tavano R, Causin V, Reddi E, Papini E and Mancin F. *Highly PEGylated Silica Nanoparticles: "Ready to Use" Stealth Functional Nanocarriers*. J. Mater. Chem., 2010.
- Sanna V, Pala N and Sechi M. *Targeted Therapy Using Nanotechnology: Focus on Cancer*. International Journal of Nanomedicine, 2014.
- Sohaebuddin SK, Thevenot PT, Baker D, Eaton JW and Tang L. *Nanomaterial Cytotoxicity is Composition, Size and Cell Type Dependent*. Particle and Fibre Toxicology, 2010.
- Wang L, Wang K, Santra S, Zhao X, Hilliard LR, Smith JE, Wu Y and Tan W. *Watching Silica Nanoparticles*. Analytical Chemistry, February 2006.
- Wu Y, Tang W, Wang P, Liu C, Yuan Y, Qian J. *Cytotoxicity and Cellular Uptake of Amorphous Silica Nanoparticles in Human Cancer Cells*. Part. Part. Syst. Charact, 2015.

7 - Ringraziamenti

Alla fine di questo percorso universitario desidero ringraziare tutte le persone che mi sono state vicine durante la stesura della mia tesi e che hanno contribuito a migliorarla con consigli, commenti e critiche.

Il primo ringraziamento va alle due persone senza le quali questo elaborato non sarebbe stato possibile, il mio relatore, prof. Giampaolo Zuccheri, e la mia correlatrice, dott.ssa Chiara Barattini. Grazie per il progetto che mi avete affidato e per la fiducia che avete riposto nella sua realizzazione.

Ringrazio anche tutti i membri dello staff (una menzione particolare alle tirocinanti come me!) dell'azienda che mi ha accolto e che mi ha permesso di concludere questo progetto nonostante il tempo a disposizione limitato.

Vorrei poi ringraziare i miei genitori, i miei nonni e mia sorella, che mi hanno sostenuto durante questo percorso universitario e che saranno entusiasti quanto me per la sua fine, comunque vada. Ringrazio anche tutti i miei fantastici compagni di università, con cui ho condiviso gioie e dolori di questi tre anni. In particolare, un pensiero va a Martina, Tania, Claudia e Chiara, senza le quali fronteggiare tutte le difficoltà non sarebbe stato così divertente e con cui rimarrò sempre in contatto, anche se le nostre strade stanno per dividersi.

Ringrazio tutta la mia squadra, con cui ho incorniciato la fine di un anno fantastico e che ricorderò sempre non solo per la conclusione del mio percorso universitario, ma anche per una meritatissima promozione.

Ancora un grazie va a Stefania e Carlo che, nonostante la distanza, sono i migliori amici che si possano desiderare.

Infine, un ringraziamento speciale va al mio fidanzato Andrea, che mi ha supportato e sopportato in tutti i momenti difficili e con cui ho condiviso tutte le soddisfazioni di questo percorso, che è sempre stato orgoglioso di me e che sarà orgoglioso di questa tesi ancora prima di averla letta.