

CONSORZIO INTERUNIVERSITARIO



Istituto Nazionale di Biostrutture e Biosistemi



UNIVERSITA' FEDERICO II – NAPOLI – ITT - CIRM

WORKSHOP

***“Nuovi Approcci in Nanomedicina  
ed Ingegneria Tissutale”***

ATTI

*27 SETTEMBRE 2013*

*Aula Conferenze  
Area della Ricerca - CNR  
Via Pietro Castellino, 111  
NAPOLI*

**Comitato Scientifico:**

Prof. Damiano Gustavo Mita

Prof. Paolo Antonio Netti

**Comitato Organizzatore:**

Dott. Antonio Capasso – IBP CNR

Dott.ssa Cristiana Citton – INBB

Sig.ra Anna Maria Aliperti – IGB CNR

# PROGRAMMA

**h. 9.30**                    **Saluti**

**PROF.SSA DANIELA CORDA**  
Presidente Area Ricerca CNR-NA1

**PROF. PAOLO NETTI**  
ITT – CIRM – Università Federico II

**PROF. DAMIANO GUSTAVO MITA**  
Presidente INBB

**h. 10.00 – 10.45**

**PROF. GIUSEPPE DE ROSA**  
Università Federico II - Napoli  
*“Micro e nano tecnologie per la veicolazione dei farmaci: una promessa o una realtà?”*

**h. 10.45 – 11.30**

**PROF. RANIERI CANCEDDA**  
Università di Genova  
*“Ricostruzione di tessuto osseo: dall’ingegneria dei tessuti alla medicina rigenerativa”*

**h. 11.30 – 12.00**

*Coffee Break*

**h. 12.00 – 12.45**

**DOTT.SSA. CLAUDIA TORTIGLIONE**  
Istituto di Cibernetica CNR - NA  
*“Un nuovo organismo modello per la nanomedicina e la nanotossicologia”*

**h. 12.45 – 13.30**

**PROF.SSA. ROSARIA RINALDI**  
Università del Salento - Lecce  
*“Nanodispositivi intelligenti multifunzionali per la nanomedicina”*

**h. 13.30 – 14.30**

*Lunch*

**h. 14.30 – 15.15**

**DOTT. IVO RENDINA**  
IMM - CNR - NA  
*“Micro e nano sistemi in biomedicina”*

**h. 15.15 – 16.00**

**PROF. JOSÉ MARIA KENNY**  
Università di Perugia  
*“Biopolimeri nanostrutturati multifunzionali per l’ingegneria tissutale”*

- h. 16.00 – 16.45**      **PROF. ALESSANDRO SANNINO**  
Università del Salento  
*“Scaffold per la rigenerazione nervosa”*
- h. 16.45 – 17.15**                      *Coffee Break*
- h. 17.15 – 18.00**      **PROF. GIOVANNI VOZZI**  
Politecnico di Pisa  
*“Tecniche di rapid prototyping per la realizzazione di scaffold biomimetici”*
- h. 18.00 – 19.00**      **Spazio Giovani**
- DOTT. GIOVANNI MURTAS**  
IFT – CNR – Roma
- DOTT. RAFFAELE VECCHIONE**  
ITT Napoli
- DOTT.SSA FEDERICA VALENTINI**  
Università Tor Vergata – Roma
- DOTT. CIRO MENALE**  
II Università di Napoli
- h. 19.00**                      **Conclusione dei Lavori**
- PROF. LUIGI NICOLAS**  
Presidente CNR

## INDICE

	PAG.
<i>INTRODUZIONE AL WORKSHOP (A CURA DEL PRESIDENTE INBB PROF. D.G. MITA)</i>	7
<i>ABSTRACT RELAZIONI SCIENTIFICHE</i>	11
<i>ABSTRACT SPAZIO GIOVANI</i>	27
<i>ABSTRACT ATTIVITÀ DI UNITÀ DI RICERCA INBB ATTINENTI ALLE TEMATICHE DEL WORKSHOP</i>	35
<i>CONCLUSIONI (A CURA DEL PRESIDENTE DEL CNR PROF. L. NICOLAIS)</i>	79



## INTRODUZIONE AL WORKSHOP

Puntuale all'appuntamento biennale, anche quest'anno il Consorzio Interuniversitario Istituto Nazionale Biostrutture e Biosistemi "INBB" ha organizzato un Workshop Nazionale su alcune tematiche di ricerca emergenti. Lo scopo è quello di stimolare l'interesse degli aderenti INBB verso nuove frontiere di ricerca, allargare la base interna dei ricercatori operanti in quei settori e promuovere contatti e collaborazioni fra appartenenti a differenti istituzioni scientifiche. Questo approccio è completamente differente da quello del Convegno Nazionale, altro appuntamento biennale che si alterna con il Workshop, in cui, pur tenendo presenti le stesse finalità del Workshop, le unità INBB raccontano la loro attività di ricerca in sei differenti sessioni, con tematiche scelte di volta in volta dal Comitato Scientifico.

Considerando la diversa platea di questa volta, sostanzialmente differente da quella del Convegno Nazionale, spenderò poche righe per presentare il Consorzio, illustrandone finalità ed organizzazione.

L'Istituto Nazionale di Biostrutture e Biosistemi (I.N.B.B.), come già detto, è un Consorzio Interuniversitario che ha ricevuto il riconoscimento della personalità giuridica con D.M. - MURST del 11/12/1995 ed è vigilato dal Ministero dell'Istruzione, dell'Università e della Ricerca Scientifica e Tecnologica.

All'I.N.B.B. aderiscono 550 ricercatori universitari (per lo più Professori ordinari ed associati) ammessi in base ad una selettiva valutazione delle pubblicazioni scientifiche, che vengono divisi nei sei settori di ricerca del Consorzio: Biomolecole, Biostrumentazione e Bioelettronica, Biosistemi e Bioregolazioni, Biotecnologie, Unità Funzionali Biologiche Supramolecolari, Cellule. Il Consorzio ha lo scopo statutario di promuovere e coordinare attività di ricerca scientifica nel campo delle Biostrutture e Biosistemi tra le Università consorziate ed Istituzioni, nazionali ed internazionali. A tal fine il Consorzio ha l'obiettivo strategico di incrementare e qualificare l'attività dei ricercatori aderenti promuovendone la capacità progettuale e raccogliendo risorse finanziarie per metterle a disposizione delle Unità di ricerca operanti presso le università consorziate, sostenendone i costi per borse di studio e/o contratti per giovani ricercatori, per l'acquisto di attrezzature e di materiale di consumo.

L'Istituto gestisce tre propri Laboratori Nazionali, esterni all'Università e sostenuti con risorse proprie, per incentivare e concentrare la collaborazione tra Unità di Ricerca di differenti atenei su:

- 1) Biologia molecolare per la medicina rigenerativa e lo studio delle cellule staminali nel cardio-circolatorio, presso l'Ospedale Suor Orsola Malpighi di Bologna, responsabile il Prof. Carlo Ventura;
- 2) Biologia cellulare per lo studio della Medicina di genere, ad Osilo (SS), responsabile la Prof.ssa Flavia Franconi;
- 3) Interferenti Endocrini, presso il CNR di Napoli, responsabile Prof.

Damiano Gustavo Mita.

Inoltre l'INBB avvia azioni di trasferimento all'ambiente clinico e/o industriale dei risultati ottenuti; esegue studi e ricerche su commissioni di Amministrazioni pubbliche e/o Enti pubblici e privati; promuove e sostiene la formazione di dottorati di ricerca e di giovani ricercatori mediante la concessione di borse di studio con avvisi pubblici, nonché con attività di alta formazione di management della R&S e dell'innovazione.

Al momento di attivare collaborazioni per elaborare e/o gestire nuovi progetti in collaborazione, il Consorzio stipula convenzioni con Dipartimenti Universitari, con Enti pubblici e Privati di ricerca, con Imprese e Fondazioni.

L'INBB promuove ed attua iniziative scientifiche nell'ambito di accordi e programmi internazionali ed organizza Convegni, Workshop e Scuole.

Il Consorzio ha sede legale in Roma, dove si svolgono le attività di coordinamento tecnico ed amministrativo, a favore delle Unità di ricerca operanti presso gli atenei consorziati o presso i Laboratori INBB.

Nonostante questa attività e un rapporto più che positivo (ca. 7-8 a 1) di fondi acquisiti per progetti di ricerca rispetto al finanziamento ordinario del MIUR e, la sopravvivenza del Consorzio è in forte pericolo se si conferma per il 2013 la mancanza del contributo di funzionamento da parte del Ministero per tutti i consorzi interuniversitari. E dire che il finanziamento 2012, finanziamento basato per la prima volta su avviso pubblico competitivo e con presentazione della propria capacità progettuale, ci aveva visti piazzati al secondo posto (il primo classificato con 100 e noi classificati con 99.50)! Il risultato ha rappresentato un vero motivo d'orgoglio per noi. Hanno partecipato al bando circa 25 Consorzi e di questi ne sono stati finanziati 14. Ma non è solo questo l'unico motivo di orgoglio. Molto importante è stata la valutazione dell'ANVUR a cui ci siamo sottoposti volontariamente ed alla quale hanno partecipato 17 Consorzi. Anche in questo caso il giudizio è stato certamente positivo, paragonato con gli altri Consorzi e i risultati medi degli Atenei.

Anche per queste valutazioni lusinghiere sul nostro Consorzio, e sulla gran parte degli altri Consorzi Interuniversitari, crediamo ingiustificata la scelta del Ministro Profumo di abolire, per il 2013, il contributo di funzionamento ai Consorzi interuniversitari di ricerca tematica (già ridotto del 34% nel 2012 limitato alla somma di 3 milioni). Questo significa nei fatti decretare in prospettiva la morte dei Consorzi Interuniversitari! Ci domandiamo se, come al solito, i nostri governanti si confermeranno eccezionalmente bravi nell'esercizio, tutto italico, di distruggere anche ciò che funziona bene. E dire che nella Pubblica Amministrazione ci sono tanti costi ed enti da tagliare, considerando che dal 1956 rimane inattuata la legge che prevede l'eliminazione di "enti inutili". Leggiamo sul Mattino del 21 luglio: *dopo oltre sessant'anni di promesse e di solenni impegni*

*parlamentari, la giungla degli enti inutili è ancora integra, e resiste a qualsiasi tentativo di disboscamento, come se in Italia fosse impossibile, anche in tempi di pesanti tagli alla spesa, eliminare il superfluo dalla grassa macchina statale.* Dal 2008 sono stati cancellati soltanto 49 enti, mentre il governo Monti ne aveva elencati circa 500 con un impegno economico di circa 10 miliardi l'anno. Ci auguriamo che il Ministro Carrozza, uno di noi per quel che riguarda l'attività di ricerca, voglia operare in modo da salvare la rete dei Consorzi Interuniversitari tematici, in linea con la recente politica della creazione di network tematici in grado di essere competitivi a livello nazionale ed internazionale. Noi siamo già quello che si vuol istituire!!!

Veniamo ora al Workshop 2013. Innanzi tutto mi corre l'obbligo, e lo faccio con immenso piacere, di ringraziare il collega ed amico Prof. Paolo Netti per la fattiva e preziosa collaborazione nella organizzazione scientifica. Senza di lui tanti illustri speaker non sarebbero intervenuti, anche considerando che la loro prestazione è "a costo zero" per le strutture organizzatrici. Grazie, quindi, a tutti i relatori, strutturati e non.

Non si può negare che la tematica "Nuovi approcci in Nanomedicina ed Ingegneria Tissutale" sia di enorme attualità e presenti interessanti prospettive di sviluppo industriale. Quest'ultimo è un mondo non vicino alle attività di ricerca della maggior parte dei nostri ricercatori, salvo alcune punte di eccellenza qualificate proprio per la collaborazione continuativa con l'Industria. E' fondamentale avvicinare il mondo dell'Industria a quello della Ricerca e viceversa. L'industria non deve aspettare di entrare in gioco soltanto al momento di comprare il "prodotto finale" della ricerca fatta nei nostri laboratori, ma dovrebbe "rischiare" di più e partecipare sin dall'inizio, ben conscia che "la ricerca è rischio più che profitto". Non abbiamo voluto raccogliere le relazioni in due sessioni distinte per tematica, ma abbiamo preferito alternare le stesse in modo da tenere sempre vigile ed interessato l'uditorio. Speriamo di essere riusciti nell'intento.

Molto significativa ci sembra la partecipazione di relatori "precari" nello spazio giovani. Abbiamo ricevuto molte richieste e, con dispiacere, siamo stati costretti a selezionare. Nel fare questa selezione abbiamo scelto un dottorando, un precario del CNR, un precario dell'IIT ed un giovane ricercatore universitario. Crediamo di aver veramente selezionato giovani promesse e ci auguriamo di averli posti in una vetrina sotto gli occhi dei "fratelli maggiori".

Per finire un grazie al Presidente del CNR che, esperto di livello mondiale nelle tematiche del Workshop, ha voluto con la sua partecipazione validare la bontà ed utilità del nostro convegno e manifestare affetto e simpatia per i convenuti.

*Prof. Damiano Gustavo Mita*

*Napoli, 27 Settembre 2013*



**ABSTRACT**  
**RELAZIONI SCIENTIFICHE**

## **MICRO E NANOTECNOLOGIE**

### **PER LA VEICOLAZIONE DI FARMACI: PROMESSA O REALTÀ?**

*Giuseppe De Rosa*

*Dipartimento di Farmacia - Università degli Studi di Napoli Federico II*

La scoperta di meccanismi molecolari finora sconosciuti alla base di alcune patologie, spinge i ricercatori allo sviluppo di nuove strategie basate su molecole in grado di agire su tali meccanismi in maniera selettiva (es. terapia genica e farmaci di origine biotecnologica). Questi nuovi agenti, ad esempio molecole di origine peptidica o acidi nucleici quali antisense, small interfering RNA (siRNA), microRNA (miRNA), ecc., richiedono però sistemi di veicolazione che superino il loro scarso profilo biofarmaceutico, dovuto ad instabilità chimica o enzimatica in vivo, scarsa penetrazione nelle cellule bersaglio, distribuzione aspecifica. Formulazioni a base di micro e nanotecnologie offrono la possibilità di superare alcune di queste problematiche.

Microsfere a base di polimeri di uso consolidato, quali acido poli(lattico-co-glicolico) (PLGA), sono già presenti sul mercato per il rilascio controllato di farmaci di diversa natura. Il nostro gruppo di ricerca ha dimostrato che le microsfere a base di PLGA possono essere utilizzate per il rilascio controllato di acidi nucleici, ed in particolare di diversi tipi di oligonucleotidi. Un'opportuna scelta dei parametri formulativi consente di incapsulare elevate quantità di acido nucleico, che viene protetto dall'azioni di nucleasi e viene rilasciato in maniera lenta per più di un mese. Le potenzialità applicative delle microsfere di PLGA per il rilascio controllato di oligonucleotidi sono stati dimostrati in due modelli sperimentali animali, rispettivamente con un oligonucleotide decoy per il fattore di trascrizione NF- $\kappa$ B e con uno siRNA attivo contro il TNF- $\alpha$ .

L'utilizzo di nanovettori di natura lipidica offre poi la possibilità, non solo di proteggere gli oligonucleotidi incapsulati, ma anche di direzionare l'attivo verso organi/tessuti bersaglio (targeting). Sono state sviluppate formulazioni a base di nanovettori lipidici anche noti come SNALP (stable nucleic acid lipid particles) in grado di coniugare elevata efficienza d'incapsulazione dell'oligonucleotide con stabilità nel circolo ematico. L'interesse della ricerca è stato focalizzato sull'allestimento di formulazioni per la veicolazione di microRNA (miRNA), la cui efficacia è stata dimostrata in diversi modelli in vitro o in vivo di cancro quali medulloblastoma e mieloma multiplo.

L'utilizzo di nanovettori a base lipidica può risultare particolarmente utile nel caso di molecole con profilo biofarmaceutico particolarmente svantaggioso. Un esempio in tal senso è rappresentato dai bisfosfonati, che a fronte di spiccata attività antiproliferativa in vitro, mostrano solo una trascurabile

attività antitumorale in neoplasie extra-scheletriche in vivo. Questa contraddizione è stata attribuita con l'accumulo dei bisfosfonati nei tessuti ossei e bassi livelli del farmaco in tumori extra-scheletrici. Il nostro gruppo di ricerca ha proposto e sviluppato diversi tipi di nanovettori in grado di veicolare l'acido zoledronico, un bisfosfonato di ultima generazione, in tumori extra-scheletrici, riducendone allo stesso tempo l'accumulo nelle ossa. Studi in vitro ed in vivo hanno dimostrato il potenziamento dell'attività antiproliferativa dell'acido zoledronico incapsulato in nanoparticelle. La formulazione di nanoparticelle è stata poi ulteriormente modificata con lo scopo di aumentare l'efficacia del sistema soprattutto di consentirne l'impiego dell'acido zoledronico in tumori di prognosi infausta quale il glioblastoma.

### **Bibliografia**

- De Rosa et al. *Int. J. Pharm.* 2002
- De Rosa et al. *J. Pharm. Sci.* 2002
- De Rosa et al. *Biomacromolecules* 2003
- De Rosa et al. *Int. J. Pharm.* 2003
- Fattal et al. *Int. J. Pharm.* 2004
- De Rosa et al. *J Gene Med.* 2005
- De Stefano et al. *Pharmacol. Res.* 2009
- Présumey et al. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 2012
- de Antonellis et al. *PLoS One.* 2011
- Marra et al. *Nanomedicine* 2011
- Salzano et al. *Int. J. Pharm.* 2011
- Marra et al. *Biotechnol. Adv.* 2012
- Caraglia et al. *Mol. Pharm.* 2013

## **RICOSTRUZIONE DI TESSUTO OSSEO: DALL'INGEGNERIA DEI TESSUTI ALLA MEDICINA RIGENERATIVA**

*Ranieri Cancedda, Università di Genova e IRCCS AOU San Martino-IST, Genova*

Le attuali terapie per la ricostruzione delle gravi lesioni e discontinuità ossee sono nella maggior parte dei casi gli auto- e gli allo-trapianti d'osso. Gli impianti d'osso autologo (prelevato dal paziente medesimo), vascolarizzato o non, danno in molti casi buoni risultati, ma complicazioni come infezioni, non unioni ed altro sono piuttosto frequenti specialmente nelle ricostruzioni più ampie. Inoltre, quest'ultime richiedono una seconda operazione per la raccolta di tessuto sano che risulta in una significativa morbilità del sito di prelievo e in più alti costi chirurgici. L'uso di allotrapianti (da cadavere) è limitato dal rischio di una reazione immune dovuta a differenze genetiche e dal rischio di trasmissione di malattie. Non da ultimo, essendo strettamente regolati dalla legislazione, gli allotrapianti possono essere effettuati solo nei casi in cui il materiale può essere immediatamente congelato e conservato in banche di tessuti per un successivo innesto nel paziente. Inoltre, in alcuni paesi (es. Giappone), ragioni culturali o divieti legislativi non consentono il prelievo di parti di cadavere per un successivo impiego terapeutico. L'osteotomia a cui segue la distrazione ossea (tecnica di Ilizarov) è un'altra opzione terapeutica. Questa tecnica è caratterizzata da notevole disagio per il paziente, un lungo tempo di ricovero ed un elevato numero di complicazioni.

Considerati i limiti di queste tecnologie, e grazie al rapido progresso nel campo dei biomateriali e della biologia cellulare, per la riparazione d'ampi difetti ossei è stato anche proposto un approccio mediato dall'ingegneria dei tessuti, vale a dire l'impianto di un idoneo scaffold associato a cellule osteogeniche. In particolare è stata proposta l'utilizzo delle "Bone Marrow Stromal Cells" (cellule stromali del midollo osseo, BMSC), chiamate anche "Mesenchymal Stem Cells" (MSC), una fonte facilmente accessibile di cellule in grado di differenziare verso cellule di diversi tessuti di derivazione mesenchimale, incluso l'osso. Nel 2001 il nostro gruppo di ricerca ha pubblicato le prime ricostruzioni d'importanti segmenti ossei effettuate impiantando ceramiche porose seminate con MSC dello stesso paziente (autologhe). Da allora anche altri gruppi hanno riportato il trattamento di gravi deficit ossei con questo tipo d'approccio, tuttavia l'impiego di costrutti "ingegnerizzati" è fortemente limitato per una serie di motivi inclusi: a) la persistenza di alcuni problemi scientifici, specialmente per quanto riguarda la vascolarizzazione di grossi impianti; b) la complessità della attuale legislazione riguardanti la terapia cellulare (FDA, EMA, normative

nazionali); c) la necessita' di laboratori GMP per l'espansione cellulare che siano dotati di attrezzature e strumentazione molto costose che richiedono l'implementazione di procedure estremamente sofisticate; d) le difficoltà logistiche relative al trasporto delle cellule e degli impianti fra la clinica e il laboratorio GMP e vice versa; e) i costi molto elevati dell'intero processo non sostenibili per un largo numero di pazienti da nessun servizio sanitario pubblico o privato. Come conseguenza un approccio terapeutico di questo tipo deve essere riservato a condizioni patologiche estreme in cui sia in gioco la sopravvivenza del paziente o dell'organo.

Il continuo approfondimento delle conoscenze relative ai processi cellulari e metabolici attivati durante l'embriogenesi, nello sviluppo fatale e nella riparazione fisiologica della lesione di un tessuto o di un organo, ha suggerito un approccio terapeutico diverso che ha come obiettivo la attivazione o riattivazione di quei meccanismi endogeni funzionanti in utero prima della nascita ed in qualche caso funzionanti, almeno parzialmente, anche nella vita adulta tutte le volte che un tessuto subisce un trauma o una ferita e sia necessario ripararlo.

Un agente terapeutico ideale dovrebbe essere in grado di attivare le cellule staminali adulte presente in ogni tessuto e contemporaneamente favorire la creazione di un microambiente permissivo per la rigenerazione del tessuto danneggiato da parte delle cellule staminali attivate. Le stesse cellule staminali possono contribuire alla creazione di questo microambiente favorevole grazie alla loro azione paracrina. Elementi importanti del microambiente rigenerativo sono le molecole rilasciate dalle piastrine dopo la formazione del coagulo, la risposta infiammatoria ed il ruolo dei macrofagi, la stimolazione di una angiogenesi e/o vasculogenesi, l'ipossia. Questi aspetti saranno discussi durante la presentazione di un modello murino di formazione ectopica di osso che noi abbiamo sviluppato.

## UN NUOVO ORGANISMO MODELLO PER LA NANOMEDICINA E LA NANOTOSSICOLOGIA

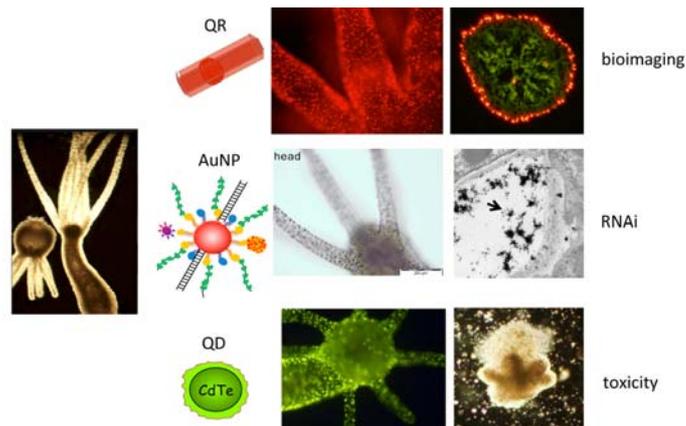
*Claudia Tortiglione*

*Istituto di Cibernetica CNR - NA*

I recenti sviluppi nelle nanotecnologie hanno portato alla sintesi di dispositivi multifunzionali, le cui dimensioni nanometriche, dello stesso ordine di grandezza delle biomolecole (proteine, acidi nucleici enzimi), permettono lo studio di fenomeni biologici con una risoluzione spaziale, specificità cellulare e controllo temporale che non hanno precedenti. Nell'ambito delle numerose tipologie di nanoparticelle, che differiscono per forma, composizione chimica, dimensione e proprietà chimico-fisiche, i nanocristalli a nucleo metallico costituiscono preziosi strumenti di indagine in diversi campi che spaziano dalla biomedicina alla diagnostica e sensoristica. Lo sviluppo crescente di nuove metodologie di funzionalizzazione di tali nanoparticelle rende inoltre possibile la realizzazione di nanodispositivi innovativi ed "intelligenti" da utilizzarsi in svariate applicazioni che vanno dallo studio della funzione genica (RNA interference, trasformazione genetica) al drug delivery, all'imaging funzionale. Le enormi potenzialità dei nanobiodispositivi nella diagnostica e terapia sono tuttavia limitate dalle scarse conoscenze dei possibili rischi sulla salute umana e sull'ambiente, oggetto delle nuove discipline di nano- e nanoeco-tossicologia. A livello nanometrico, infatti, le proprietà dei materiali sono profondamente diverse da quelle degli stessi strutturati su macroscale, e possono attivare risposte comportamentali (a livello di animale intero) o vie metaboliche e genetiche (a livello di singole cellule) del tutto inattese. Pertanto è attuale priorità della comunità scientifica sviluppare nuove metodologie per saggiare non solo l'attività biologica dei nuovi nanodispositivi sui sistemi biologici cui sono dedicati, ma anche la biocompatibilità e la tossicità.

A tale scopo è stato da noi utilizzato con successo il polipo di acqua dolce *Hydra vulgaris* (Cnidaria, Hydrozoa), un organismo alla base dell'evoluzione animale, prezioso modello già utilizzato per studi di biologia dello sviluppo, rigenerazione tissutale, differenziamento cellulare, e il cui genoma recentemente sequenziato ha mostrato una complessità paragonabile a quella degli organismi superiori e maggiore di altri modelli genetici. La trasparenza e l'elevata plasticità tissutale, la possibilità di allevamento in laboratorio su larga scala grazie alla riproduzione asessuata, l'elevata sensibilità ai metalli pesanti rendono Hydra un organismo ideale non solo per lo studio funzionale dei nuovi materiali bioattivi, ma anche per la determinazione di numerosi endpoints di tossicità acuta e cronica.

Saranno presentati diversi studi effettuati nel nostro laboratorio\* con nanoparticelle di diversa composizione e struttura: long term imaging e cell tracking di tessuti rigeneranti utilizzando nanocristalli fluorescenti<sup>1</sup>; RNA interference del protooncogene *myc* mediata da nanoparticelle di oro multifunzionali<sup>2</sup>; meccanismi di endocitosi, trafficking ed esocitosi di nanoparticelle di oro<sup>3</sup>; tossicità di QDs di CdTe: effetti in vivo, a livello cellulare e modulazione dell'espressione genica<sup>4</sup>.



## References

1. Tortiglione C, Quarta A, Malvindi MA, Tino A, Pellegrino T. PLoS One (2009) 4, e7698.
2. Conde J, Ambrosone A, Sanz V, Hernandez Y, Marchesano V, Tian F, Child H, Berry CC, Ibarra MR, Baptista PV, Tortiglione C, de la Fuente JM (2012). ACS Nano 6 (9), 8316–8324.
3. V.Marchesano, Y.Hernandez, W.Salvenmoser, A.Ambrosone, A.Tino, B.Hobmayer, JM de la Fuente and C.Tortiglione ACS Nano. (2013), 7(3):2431-42
4. Ambrosone A, Mattera L, Marchesano V, Quarta A, Susha AS, Tino A, Rogach AL, Tortiglione C. (2012) Biomaterials 33(7):1991-2000.
5. Marchesano V, Ambrosone A, Mazzarella V, Tortiglione C. Nanotoxicology. (2013) Jun 3.
6. Ambrosone A and Tortiglione C. Methodological approaches for nanotoxicology using Cnidarian models. Toxicol Mech Methods Special Issue on nanotoxicology (2013) 23(3):207-162013.

\*NanoBiomolecular group: <http://www.tortiglione.com/nanobiomoleculargroup/Sito/Home.html>

# NANODISPOSITIVI INTELLIGENTI MULTIFUNZIONALI PER LA NANOMEDICINA

**Rosaria Rinaldi**

*Dipartimento di Matematica e Fisica "E. De Giorgi"*

*Scuola Superiore ISUFI*

*Università del Salento - Lecce*

La ricerca di sistemi multifunzionali a dimensione nanometrica prevede lo sviluppo di nuovi strumenti miniaturizzati in grado di assolvere parallelamente più funzioni. Questi nuovi "nanodispositivi" a contenuto altamente nanotecnologico, offrono soluzioni interessanti per applicazioni biomediche che vanno dalla diagnosi alla cura di malattie. Saranno presentati i risultati ottenuti nel nostro laboratorio per lo sviluppo di sistemi multi-funzionali costituiti dai seguenti sotto-componenti: i) NP (metalliche, semimetalliche o magnetiche), ii) biomolecole e iii) sistemi di incapsulamento per farmaci antitumorali. Le varie tipologie di NP possono essere usate per diversi fini applicativi nel campo della nanomedicina, come : a) possibile mezzo di contrasto per MRI; b) capacità di accumularsi in prossimità di un determinato sito tumorale, anche in seguito all'applicazione di un campo magnetico esterno al sito di accumulo, c) quali agenti in grado di esplicare ipertermia, in seguito all'applicazione di un campo magnetico alternato, e d) rilascio controllato di farmaci. Tali NP sono funzionalizzate sulla loro superficie con biomolecole che fungono da sistemi di riconoscimento specifico nei confronti di cellule tumorali o di tessuti specifici. Saranno descritti i sistemi di incapsulamento di NP basati su polimeri biodegradabili che agiscono da involucri di protezione per i farmaci. Tali polimeri sono in grado di rispondere a stimoli cellulari (come ad esempio il pH delle cellule tumorali) o biofisici (ad esempio radiazioni) e tale proprietà può essere sfruttata per il rilascio controllato dei farmaci.

Una seconda strategia di nanofabbricazione analoga alla precedente adopera la tecnica Layer by Layer per lo sviluppo di nano e microcapsule di multistrati di polielettroliti biocompatibili e biodegradabili cresciuti su un core nanocolloidale (ad es. di carbonato di calcio) dissolubile in condizioni "mild" (usando ad es. un chelante del calcio, l'EDTA). Lo spessore del film cresciuto sul colloide può essere controllato con accuratezza nanometrica dal numero di cicli di deposizione e dalle condizioni di forza ionica. Una volta dissolto il core colloidale si ottengono capsule vuote, le cui dimensioni dipendono dal template (tra i 70nm e i 10 $\mu$ m) mentre lo spessore della ricopertura si può controllare in un *range* nanometrico. Queste nano e micro capsule colloidali possono essere usate anche come sensori raziometrici intracellulari.

## MICRO E NANOSISTEMI IN BIOMEDICINA

**Ivo Rendina** - Istituto per la Microelettronica e Microsistemi del CNR - Via P. Castellino 111, 80131 Napoli, e-mail: [ivo.rendina@cnr.it](mailto:ivo.rendina@cnr.it)

Le nuove conoscenze di biofisica e biochimica, l'applicazione dell'elettronica e della fotonica, delle scienze dei materiali e dell'ingegneria dell'informazione, e più recentemente, le nanotecnologie, stanno consentendo di individuare nuovi approcci nell'affrontare e risolvere i principali problemi che la moderna biomedicina ha davanti. Tra questi ricordiamo

- i) la necessità di effettuare analisi di tipo genomico e proteomico con sistemi rapidi, affidabili e poco costosi per l'individuazione di marker tumorali e di potenziali malattie ancora inesprese, o per effettuare analisi di routine nei paesi in via di sviluppo dove vive la maggioranza della popolazione mondiale e dove non sono disponibili laboratori attrezzati;
- ii) lo sviluppo di tecniche di microscopia ultra-risoluta che consentano l'*imaging* a livello sub-cellulare;
- iii) la messa a punto di micro e nano sistemi, tipicamente nano particelle, che possano indirizzare e rilasciare i farmaci direttamente ed in modo altamente selettivo sui tessuti malati;
- iv) ed infine tecniche per la cura dei tumori e per l'individuazione di cellule tumorali circolanti (CTC).

In questa comunicazione saranno presentati i più recenti sviluppi ottenuti presso l'Istituto per la Microelettronica e Microsistemi (IMM) del Consiglio Nazionale delle Ricerche relativi all'applicazione delle nanotecnologie e della fotonica alla biomedicina, ed in particolare al tentativo di trovare nuovi approcci, basati sull'impiego di micro e nano sistemi, alla risoluzione dei problemi suddetti.

Tra questi si cita la realizzazione di nuove configurazioni di *microarray* su chip di silicio, ovvero di una matrice ad alta densità di sensori in grado di eseguire in un unico esperimento l'analisi parallela di un elevatissimo numero d'interazioni biomolecolari. I microsistemi realizzati si basano sull'impiego di nanosensori ottici *label-free*, alternativi quindi ai DNA-microarray commerciali basati sull'utilizzo di biomolecole marcate con fluorocromi. I microsistemi sviluppati in IMM sfruttano principi di funzionamento interferometrici ed a cavità risonante; risultano di semplice e diretto utilizzo eliminando i passaggi chimici necessari ad agganciare il fluorocromo alla biomolecola, che tra l'altro induce perturbazioni indesiderate delle sue caratteristiche biochimiche.

Il microarray è integrato con un opportuno sistema di microfluidica realizzato mediante tecniche di *soft-lithography* in uno strato trasparente polimerico (PDMS). L'integrazione ha permesso di ridurre notevolmente il consumo dei composti biomolecolari ed i tempi di rivelazione dell'analita bersaglio.

La tecnica è estendibile allo sviluppo di microsistemi fluidici per la manipolazione, l'individuazione e la separazione di cellule all'interno di un campione eterogeneo. In particolare, le applicazioni più interessanti sono relative all'individuazione di CTC, per la diagnosi della malattia minima residua.

Ancora nel campo dello sviluppo di bio-nanosensori, gli sviluppi più recenti riguardano la possibilità di realizzare nanostrutture su chip totalmente dielettriche a cristallo fotonico e ad indice di rifrazione medio negativo, in grado di supportare configurazioni del campo elettromagnetico simili a quelle plasmoniche in termini di distribuzione spaziale e caratteristiche dispersive. Tali strutture non presentano l'elevato assorbimento ottico tipico delle strutture metalliche plasmoniche che provoca una notevole conversione di energia elettromagnetica in calore e che, soprattutto nelle applicazioni di singola molecola ed in circuiti microfluidici, rischia di perturbare in maniera significativa il sistema sotto esame. Le stesse tecnologie basate sull'utilizzo di strutture a metamateriale consentono di confinare la radiazione elettromagnetica oltre il limite di diffrazione, fornendo nuove prospettive nello sviluppo di tecniche di microscopia ultra-risoluta.

Ulteriori sviluppi che saranno riportati riguardano le nuove tecniche di spettroscopia raman e Surface Enhanced Raman Spectroscopy (SERS) in applicazioni diagnostiche a bassa invasività. Queste forniscono strumenti innovativi nello *screening* diagnostico e *label-free* di cellule tumorali, nella mappatura chimica di singola cellula e nella rilevazione di singoli *marker* tumorali. In particolare sono state sviluppate e brevettate nei nostri laboratori numerose strategie volte alla riduzione dei segnali di fondo, all'implementazione di modulatori spaziali di luce in abbinamento a microscopi raman per aumentare il *sampling rate* nell'acquisizione di "mappe spettrali", e nuove configurazioni di substrati SERS che garantiscono maggiore riproducibilità del segnale. Si riporteranno infine i più recenti sviluppi relativi alla realizzazione di un microscopio non lineare basato sulla microscopia raman coerente con fasci laser al femtosecondo, in cui il campione biologico è eccitato da due sorgenti luminose collineari (il segnale di pompa e il segnale raman) a frequenze diverse. Quando la differenza in frequenze è uguale ad una vibrazione molecolare, nel campione si ha un'eccitazione stimolata e coerente dei modi di vibrazione del legame molecolare (processo non lineare al terzo ordine) che comporta un significativo aumento del segnale rivelato. La spettroscopia raman coerente è un metodo innovativo ad elevata sensibilità, e pertanto ad alto contrasto, che permette di ottenere una mappa chimica puntuale all'interno di cellule viventi e tessuti.

# **BIOPOLIMERI NANOSTRUTTURATI MULTIFUNZIONALI PER L'INGEGNERIA TESSUTALE**

*I.Armentano<sup>1</sup>, E. Fortunati<sup>1</sup>, S. Mattioli<sup>1</sup>, N. Rescignano<sup>2</sup>, J.M. Kenny<sup>1,2</sup>*

*<sup>1</sup>Materials Engineering Center, UdR INSTM, University of Perugia, Terni, Italy*

*<sup>2</sup>Instituto de Ciencia y Tecnología de Polímeros, ICTP-CSIC,*

*Madrid, Spain*

In questa comunicazione analizzeremo l'importanza della progettazione e sviluppo di nuovi biomateriali nanostrutturati multifunzionali, con controllo delle proprietà su scala nanometrica, per studiare e indurre il processo di differenziamento di cellule staminali umane. L'idea di questa ricerca è lo sviluppo di un modello basato sull'interazione tra cellule staminali e biomateriali polimerici multifunzionali, allo scopo di trovare una relazione specifica tra le proprietà dei biomateriali e la risposta delle cellule staminali.

Studi precedenti hanno dimostrato come la nano e la micro-struttura del biomateriale polimerico influenzi la polarità cellulare e favorisca la migrazione delle cellule. Studi specifici sui meccanismi d'interazione tra cellule staminali e biomateriali hanno mostrato come cellule staminali embrionali e pluripotenti rispondono in modo differente a nanocompositi di acido polilattico e idrossiapatite con modulate proprietà meccaniche inducendo il differenziamento osteogenico, senza fattori inducenti, mentre le cellule staminali mesenchimali di midollo osseo rispondono a diverse geometrie nanotopografiche di carbonio amorfo con specifica riorganizzazione del citoscheletro, con induzione di differenziamento neurale in assenza di agenti inducenti, nel caso di configurazione a canali.

I risultati di queste ricerche interdisciplinari avranno ricadute importanti sulla comprensione delle proprietà delle cellule staminali e sullo sviluppo di approcci biomedicali basati sulle applicazioni dell'ingegneria tissutale. L'auspicio è che i risultati di questa ricerca sui nanomateriali associata con le potenzialità delle cellule staminali porti a una nuova classe di materiali con proprietà uniche e con un notevole impatto nel settore delle nanotecnologie e della salute.

# MICROPATTERNED OF COLLAGEN-BASED SCAFFOLD REGULATING ADULT PERIPHERAL NERVE REGENERATION

<sup>1</sup>Cerri, Federica; <sup>2</sup>Memon, Danish; <sup>3</sup>Salvatore, Luca; <sup>1</sup>Martinelli Boneschi, Filippo; <sup>1</sup>Brambilla, Paola; <sup>1</sup>Del Carro, Ubaldo; <sup>1</sup>Lopez, Ignazio Diego; <sup>4</sup>Mortini, Pietro; <sup>1</sup>Scarlato, Marina; <sup>1</sup>Comi, Giancarlo; <sup>5</sup>Pluchino, Stefano; <sup>1</sup>Martino, Gianvito; <sup>1</sup>Quattrini, Angelo; <sup>3</sup>Sannino, Alessandro; <sup>6</sup>Yannas, Ioannis V.

<sup>1</sup> Dept. of Neurology, INSPE and Division of Neuroscience, San Raffaele Scientific Institute, Milan, Italy.

<sup>2</sup> Dept. of Chemical Engineering, Indian Institute of Technology Bombay, Mumbai, India.

<sup>3</sup> Dept. of Innovation Engineering, University of Lecce, Lecce, Italy.

<sup>4</sup> Dept. of Neurosurgery, San Raffaele Scientific Institute, Milan, Italy.

<sup>5</sup> Cambridge Centre for Brain Repair, Dept. of Clinical Neurosciences, University of Cambridge, Cambridge, UK.

<sup>6</sup> Dept. of Mechanical Engineering, Massachusetts Institute of Technology, Cambridge (MA) USA.

Nerve injury is a frequent event especially after traumatic injury, affecting mainly young people. Various therapeutic approaches have been proposed for patients suffering from peripheral nerve injuries. Results have been, so far, inconsistent, in terms of both quality as well as extent of nerve regeneration and re-innervation.

Here, a novel technique is presented able to produce tubular collagen-based scaffolds, characterized by a radially/axially patterned microporosity (MPCS), without the use of any complex mold. The technique is based on a sedimentation process of the collagen in a liquid phase, activated by the fast rotation of a cylindrical mold containing the solution and following immersion of the cylinder in a cold bath. After freeze drying of the cold solid collagen solution, tubular scaffolds have been obtained, with an inner diameter which was function of the spinning time and velocity. A porosity gradient has been obtained along the radially oriented pattern of porosity, and pores dimension has been carefully controlled.

The process has been modelled by means of the Lamm differential equation, according to appropriate scaling laws. We predicted that its microstructure might play a significant role in the regulation of cellular and molecular mechanisms sustaining cell behaviour inside the scaffold and, in turn, improving distal induced regeneration. In the present investigation, we tested *in vivo* the clinico-pathological impact of this MPCS over a 10-mm critical size defects in the adult rat sciatic nerve. Rats with transection of the sciatic nerve and implanted with either commercial collagen or silicon conduits were used as controls. MPCS-implanted rats showed significantly improved nerve

regeneration at both neurophysiological and neuropathological levels, as compared to control rats. Our data demonstrate that this specific tubular scaffold micro-patterning orchestrates physiological regeneration in the adult rat sciatic nerve over a 10-mm critical size defect. Indeed, whole genome gene expression analyses confirm that the MPCs induce selective gene expression patterns and enhanced cell proliferation, motility and myelination.

Our findings open new perspectives towards the clinical application of this micro-patterned scaffold, owing to its ease of production, cost-effectiveness, favorable degradation rate and remarkable cell-instructing behavior.

# TECNICHE DI RAPID PROTOTYPING PER LA REALIZZAZIONE DI SCAFFOLD BIOMIMETICI

**Giovanni Vozzi**

*Centro di Ricerca "E. Piaggio"- Largo Lucio Lazzarino, 2- 56126 Pisa - Università di Pisa*

*Dipartimento di Ingegneria dell'Informazione – Largo Lucio Lazzarino, 2- 56126 Pisa - Università di Pisa*

Nel corpo umano le cellule sono inserite in una complessa architettura tridimensionale. Per replicare questo microambiente in vitro, è necessario fornire un supporto (scaffold) sul quale le cellule possano aderire, muoversi e proliferare nello spazio. Uno scaffold è una struttura tridimensionale (3D) porosa, biodegradabile e biocompatibile, che può sostenere l'adesione e la crescita cellulare. In genere le cellule vengono seminate su scaffold polimerici biodegradabili e il "costrutto", ovvero l'insieme scaffold-cellule, è in grado di rigenerare parti o intere strutture di tessuti e/o organi. L'approccio "scaffold" per creare tessuti biologici emerse dai primi anni 90 e da allora gran parte del lavoro si è incentrato sull'uso di strutture polimeriche in forma di spugne o schiume che possiedono una microstruttura porosa casuale. In seguito, l'attenzione si è spostata al "*designer scaffold*", basandosi sull'ipotesi che i tessuti devono avere una architettura ben definita per un corretto funzionamento. Infatti, la maggior parte degli organi presentano una struttura interna topologicamente ben organizzata che è essenziale per la loro funzione. In questo senso, al fine di realizzare costrutti 3D per la riparazione e la ricostruzione degli organi è necessario guidare la crescita cellulare attraverso strutture con una topologia stabilita che replica quella del tessuto naturale. Per realizzare i *designer scaffold*, sono state sviluppate diverse tecniche di microfabbricazione, utilizzando i principi dei processi CAD/CAM (disegno e fabbricazione assistiti da computer o Computer Aided Design / Computer Aided Manufacturing). Infatti, la maggior parte delle tecniche di lavorazione derivano da metodiche pre-esistenti come stampe 3D e micro-lavorazioni. Recentemente, lo sviluppo e l'ottimizzazione di tecnologie in grado di ottenere specifiche proprietà a livello nano-strutturale ha rispostato l'attenzione alle strutture con porosità casuale. Piuttosto che realizzare una micro-architettura prestabilita, si cerca di ingegnerizzare le proprietà nanostrutturali di materiali. Studi di avanguardia hanno dimostrato come le cellule siano estremamente sensibili al loro microambiente locale, e caratteristiche quali rigidità, presentazione di ligandi e nanostruttura, sono fattori fondamentali per mantenere ed eventualmente modificare la loro funzione. La nuova tendenza è rivolta alla ricreazione di questa complessità a livello ultrastrutturale, utilizzando una combinazione di materiali, tecniche di processamento dei materiali e più tipi cellulari per realizzare dei sistemi in vitro più fisiologici possibili. Questa nuova tendenza

viene denominata "*Live Scaffold Fabrication*". Nel panorama delle tecnologie disponibili per la realizzazione di scaffold, si possono quindi distinguere due gruppi di tecniche: i) quelle che si basano sulla realizzazione di strutture 3D con pori casuali utilizzando metodi fisici o chimici per la generazione dei pori, ii) quelle basate sulla realizzazione di scaffold 3D con metodologie acquisite dai settori consolidati del CAD/CAM e della Prototipazione Rapida. Poiché allo stato attuale non è ancora ben chiaro se serva fornire una struttura casuale/caotica oppure finemente organizzata, in questo talk si analizzeranno i diversi metodi di fabbricazione partendo dalla realizzazione di strutture amorfe fino alla discussione di tecniche di prototipazione rapida. Alla fine saranno mostrati i nuovi approcci per la realizzazione dello scaffold del futuro con caratteristiche di integrazione con il tessuto ospitante ottimizzate, in cui si evidenzierà come la fusione di diverse tecniche di lavorazione dei materiali sta spingendo la ricerca dalla realizzazione di uno scaffold polimerico ad uno scaffold vivente.



**ABSTRACT**  
**SPAZIO GIOVANI**

# NANOPARTICELLE BIOATTIVE A BASE PEPTIDICA SIMIL-LIPIDICA PER IL RILASCIO TERAPEUTICO

*Giovanni Murtas IFT – CNR Synthetic Biology – Nano-biotechnology Lab, Area Tor Vergata  
Roma Email: giovanni.murtas@ift.cnr.it*

Costruiamo nanoparticelle sopramolecolari grazie all'impiego di nano-biomateriali sintetici, caratterizzate da assemblaggio molecolare spontaneo di peptidi con proprietà simil-lipidiche (LL-Pep). Questi peptidi anfifilici formano in base alla loro sequenza, lunghezza e condizioni chimico-fisiche nanostrutture, nanovesicole o nanotubi.

Le nanoparticelle così costituite sono in grado di intrappolare al loro interno molecole di interesse farmaceutico e terapeutico, sia idrofiliche che idrofobiche, ed in particolare le molecole di *siRNA* per la terapia genica avanzata nel trattamento di malattie come il cancro e le malattie a base degenerativa.

Le LL-Pep nano-vescicole possono essere modificate con molecole ligando specifiche per il riconoscimento dei recettori cellulari e permettere un trattamento terapeutico tessuto-specifico.



*LL-Pep nanovesicole costruite con peptidi anfifilici: in rosso le teste idrofiliche ed in verde le code idrofobiche.*

Le LL-Pep vescicole hanno una dimensione di 30-50 nm e predisposte per il rilascio di *siRNA*/terapia genica/farmaci in cellule ed in modelli di topo per diverse malattie.

Le LL-Pep sono biocompatibili, non immunogeniche, di facile sintesi e si sono dimostrate efficienti nel rilascio delle molecole rendendo facile il trasporto attraverso le giunzioni epiteliali. Rappresentano un sistema alternativo ai liposomi come vettori per il rilascio di agenti diagnostici e terapeutici.

Durante la relazione saranno presentate alcune proposte di utilizzo delle nuove LL-Pep nanoparticelle per il rilascio molecolare e terapeutico.

# BIO-FISICA DEL NANO GRAFENE

## E SUE APPLICAZIONI IN NANOMEDICINA

**F. Valentini**<sup>1\*</sup>, A. Zicari<sup>2</sup>, E. Mari<sup>2</sup>, C. Tozzo<sup>3</sup>, and G. Palleschi<sup>1</sup>

<sup>1</sup>. Dipartimento di Scienze e Tecnologie Chimiche, via della Ricerca Scientifica 1, 00133 Roma (Italy).

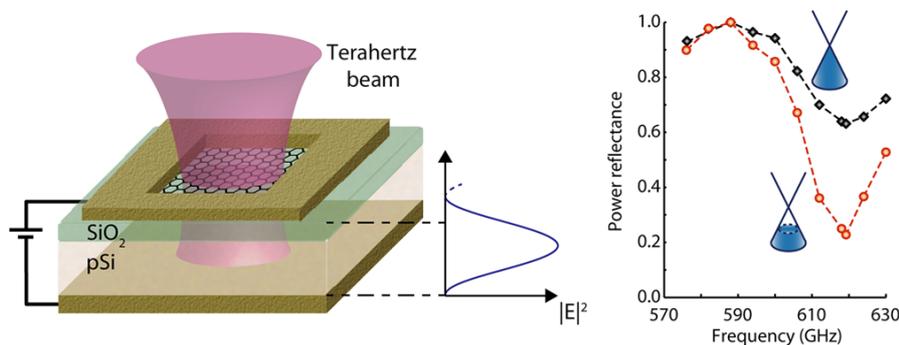
<sup>2</sup>. Dipartimento di Medicina Sperimentale, Università di Roma "La Sapienza", V.le Regina Elena 324 00161 Roma (Italy)

<sup>3</sup>. U.O.C. Ipertensione e Nefrologia, Dipartimento di Medicina Università degli Studi di Roma Tor Vergata, Viale Oxford 81, Rome (Italy)

Corresponding author\*: federica.valentini@uniroma2.it

**Abstract.** Il grafene (**G**) quale singolo strato di grafite rappresenta un sistema di carbonio avente spessore bidimensionale. Negli ultimi anni questo nuovo materiale ha catturato l'interesse della comunità scientifica internazionale, soprattutto per le innumerevoli proprietà chimico-fisiche e biochimiche in base alle quali, interessanti applicazioni nel campo della sensoristica, dei dispositivi opto-elettronici, dei Beni Culturali e della nanomedicina si sono affermate con grande successo [1]. Recentemente, alcuni gruppi di ricerca hanno esplorato le applicazioni biologiche di grafene e dell'ossido di grafene (**GO**) per poter realizzare nuovi vettori in grado di veicolare farmaci [2], ma anche per tecniche di diagnostica clinica. Una delle proprietà chimico-fisiche che rende **G** e **GO** un materiale ideale per la somministrazione di farmaci, è proprio l'elevato sviluppo superficiale nominale ( $S/V=3000 \text{ m}^2/\text{g}$  [1]). Infatti **GO** ha una capacità di carico, per diverse molecole biologicamente attive, superiore al 200%. Questo dato si dimostra significativamente migliore rispetto a quello esibito da alcune nanoparticelle (con capacità di "loading" pari al 100%) impiegate sempre nel trasporto di farmaci. Oltre a ciò, **G** e **GO** esibiscono un'elevata biocompatibilità cellulare e tissutale nonché una stabilità fisiologica sorprendente [2]. Inoltre, dal confronto con altri nanomateriali si evince che **G** e **GO** possiedono un grado di funzionalizzazione superficiale elevato, permettendo l'immobilizzazione covalente (via *EDC chemistry* [2]) o l'adsorbimento fisico, di numerosi sistemi biologicamente attivi. Non solo la densità superficiale dei gruppi funzionali, ma anche la natura chimico-fisica di questi, conferisce a **GO** proprietà di auto-fluorescenza [2], quest'ultima utilizzata in Microscopia Confocale a scansione Laser, con un grande vantaggio cioè quello di evitare le successive manipolazioni *post-sintesi* del nanomateriale, come la marcatura con i fluorocromi. Nel lavoro che qui si propone, sono stati investigati due aspetti importanti di **GO**, quali: **1.** l'elevata biocompatibilità in cellule umane [3], ed in questo caso particolare di studio in **EaHy926**, cioè nella linea cellulare endoteliale derivata dalla fusione della vena ombelicale umana (**HUVEC**) con la linea cellulare **A549**, cioè di carcinoma bronchiale. La biocompatibilità è stata

valutata dopo esposizione “*in vitro*” a 24hrs, di linee cellulari **EaHy926**, poste a contatto con diverse concentrazioni di **GO** (0,2-20mg/ml). Questi test hanno dimostrato elevata vitalità cellulare e, lo studio condotto via HR-TEM (High Resolution-Transmission Electron Microscopy) accoppiato anche alla Microscopia Confocale a scansione Laser hanno evidenziato, rispettivamente, l’assenza di deformazioni morfologico/topografiche dell’assetto cellulare dopo internalizzazione di **GO**, e la localizzazione di **GO** nei compartimenti citoplasmatici. **2.** Il secondo aspetto studiato qui, riguarda l’utilizzo “*in vitro*” di **GO** coniugato a molecole biologicamente attive, quali ormoni, citochine o bio-mediatori. Quest’ultimo aspetto è molto importante perché tali sistemi biologicamente attivi verrebbero ad essere trasportati “*in vitro*”, senza passare attraverso l’interazione specifica con un opportuno recettore di membrana (con estrema riduzione dei tempi di somministrazione del composto biologicamente attivo). Infine, in questo lavoro è stato anche esplorata la relazione che sussiste tra il grado di funzionalizzazione di **G** e **GO** e: **1.** la conducibilità del grafene nonché le proprietà ottiche, nel campo delle frequenze compreso tra l’infrarosso ed il terahertz; **2.** l’auto-fluorescenza e la riflessione totale di **GO** e **G**, in funzione del grado di polidispersione del nanomateriale, che strettamente dipende dalla natura e dalla densità superficiale, di detti gruppi/difetti funzionali [4].



**Figure 1.** Quando il livello di Fermi nel grafene coincide con il punto di Dirac, la riflettanza è al massimo della sua potenza. Quest’ultima è stata anche calcolata in funzione dello spessore ottico del substrato grafenico, e normalizzata al terahertz (riportata a fianco, in **Figura 1**, tratta dalla letteratura [4]). Quando lo spessore ottico di **G** è un multiplo pari di un quarto di lunghezza d'onda, l'intensità del campo elettrico nello stato fondamentale di grafene, diminuisce significativamente, portando ad assorbimento zero (no emissione e si è in condizioni di riflessione) [4]. D'altra parte, se lo spessore ottico di **G** e/o **GO** è un multiplo dispari di un quarto di lunghezza d'onda, l'assorbimento può essere straordinariamente esaltato (si emissione, no riflessione di **G** e/o **GO**, [4]).

### ***Bibliografia.***

- [1]. A. C. Neto, Graphene: Graphene's properties, *New Scientist* Volume 214, Issue 2863, 5 May **2012**, Pages iv–v.
- [2]. H. Wang, Q. Zhang, X. Chu, T. Chen, J. Ge, R. Yu, Graphene Oxide–Peptide Conjugate as an Intracellular Protease Sensor for Caspase-3 Activation Imaging in Live Cells, *Angewandte Chemie International Edition* Volume 50, Issue 31, pages 7065–7069, July 25, **2011**
- [3]. K. Wang, J. Ruan, H. Song, J. Zhang, Y. Wo, S. Guo, D. Cui, Biocompatibility of Graphene Oxide, *Nanoscale Res Lett* **2011**, 6:8
- [4]. H. Wen, C. Dong, H. Dong, A. Shen, W. Xia, X. Cai, Y. Song, X. Li, Y. Li, D. Shi, Engineered Redox-Responsive PEG Detachment Mechanism in PEGylated Nano-Graphene Oxide for Intracellular Drug Delivery, *Small* Volume 8, Issue 5, pages 760–769, March 12, **2012**.

## NANOCAPSULE BIODEGRADABILI PRODOTTE VIA LAYER BY LAYER SU NANO EMULSIONI OLIO IN ACQUA

*Dr. Raffaele Vecchione – IIT – Sezione di Napoli*

La veicolazione di farmaci antitumorali rappresenta ad oggi la strategia più promettente per il trasporto e il rilascio selettivo nei siti tumorali. E' quindi fondamentale la corretta progettazione di tali sistemi di veicolazione in modo da permettere elevata capacità d'incapsulamento, dimensione appropriata e opportuna funzionalizzazione di superficie per eludere il sistema immunitario da un lato e interagire in modo selettivo con il tessuto tumorale dall'altro. Le nanocapsule sono i sistemi che presentano la maggiore capacità d'incapsulamento. In particolare, quelle realizzate con il metodo del layer by layer, ovvero con accrescimento stratificato di strati polimerici nanometri, sono tra le più interessanti in virtù della capacità di conferire multifunzionalità e multicompartimentalità al nanovettore. Tipicamente questo metodo impiega modelli solidi che sono poi rimossi dopo la formazione della nanocapsula con tutta una serie di limitazioni. Per tale motivo la nostra attenzione è stata rivolta alla preparazione di nanocapsule layer by layer ottenute su template liquido ovvero su nano emulsioni di olio in acqua. In aggiunta, un template a base di olio può essere direttamente precaricato di farmaco lipofilo con elevata efficienza di caricamento. Il limite delle emulsioni risiede tipicamente nella loro intrinseca instabilità legata sia a problemi di poldispersione sia al fatto di essere dei sistemi immiscibili e quindi non termodinamicamente stabili. Qui presentiamo la possibilità di ottenere emulsioni olio in acqua monodisperse e opportunamente impiegabili per la deposizione *layer by layer* di polimeri biodegradabili. La monodispersione è garantita da un rivestimento di pochi nanometri di polielettrolita sulla superficie dell'emulsione combinato ad un opportuno processo di omogeneizzazione. Tali emulsioni ricadono inoltre in un intervallo dimensionale di forte interesse nel campo della nanomedicina e cioè tra i 70 e i 200 nm. Per quanto riguarda la stabilità essa dipende dalla concentrazione del polimero di rivestimento e in particolare risulta crescente con essa. La possibilità di impiegare tali emulsioni per la preparazione *layer by layer* di nanocapsule di polimeri biodegradabili è stata dimostrata sia nel caso di concentrazioni di polimero di saturazione che nel caso di concentrazioni di polimero di ultrastabilità. In quest'ultimo caso, la monodispersione delle nano emulsioni ha consentito di rimuovere efficacemente il polimero in eccesso e procedere con le successive deposizioni.

# CARATTERIZZAZIONE FISICO-CHIMICA E ATTIVITÀ BIOLOGICA *IN VITRO* DI NANOPARTICELLE A BASE DI PLGA CARICATE CON CISPLATINO PER IL TRATTAMENTO DEL MESOTHELIOMA

**Menale Ciro** <sup>a, b, c</sup>

<sup>a</sup> *Dipartimento di Medicina Sperimentale, seconda Università degli Studi di Napoli, Napoli*

<sup>b</sup> *Gene Expression & Human Molecular Genetics Laboratory, Istituto di Genetica e Biofisica, CNR, Napoli*

<sup>c</sup> *Laboratorio Nazionale Interferenti Endocrini, Istituto Nazionale Biostrutture e Biosistemi, Napoli*

Il mesotelioma pleurico è un tumore maligno, correlato principalmente all'esposizione all'amianto. Con riferimento alla terapia chemioterapica, il farmaco di elezione per la cura del mesotelioma è il cisplatino. Dati gli effetti collaterali del cisplatino e le continue somministrazioni che rendono difficile l'approccio del paziente con la terapia, un modo per migliorare la somministrazione farmacologica classica e aumentare la biodisponibilità del farmaco riducendo gli effetti collaterali è utilizzare forme di rilascio controllato capaci di liberare il farmaco lentamente ed in dosi efficaci per lungo tempo. Come veicolo del cisplatino, sono state realizzate nanoparticelle di acido poli (lattico-co-glicolico), PLGA, usando la metodica della doppia emulsione con evaporazione del solvente. È stata effettuata una caratterizzazione chimico-fisica e dimensionale delle preparazioni, e ne è stata studiata la modalità di rilascio e l'*uptake* cellulare. L'efficacia terapeutica delle nanoparticelle di PLGA caricate con cisplatino è stata valutata saggiando l'attività biologica *in vitro* su una linea cellulare di mesotelioma pleurico umano, MSTO-211H, in funzione della dose di farmaco somministrato e in funzione del tempo di trattamento. Esperimenti di controllo sono stati condotti con cellule trattate con nanoparticelle vuote per escludere effetti citotossici provocati dalla formulazione stessa, e con cisplatino libero per valutare la differenza di efficacia con il farmaco incapsulato in nanoparticelle. Sono state valutate citotossicità ed effetti proapoptotici derivanti dall'interazione del cisplatino rilasciato e il DNA nucleare. In particolare il lavoro si è focalizzato sulle variazioni delle fasi del ciclo cellulare, sull'attività della caspasi-3, sull'attivazione di alcune proteine coinvolte nei meccanismi apoptotici come PARP e sull'overespressione di p21 e p53, proteine che, in studi precedenti su mesotelioma e trattamento con cisplatino, si sa essere coinvolte nei meccanismi di induzione dell'apoptosi. I risultati ottenuti mostrano come l'azione del cisplatino incapsulato in nanoparticelle di PLGA produce gli stessi effetti biologici del farmaco in forma libera, anche se l'azione è rallentata nel tempo dal sistema di rilascio. Inoltre, non è stato evidenziato alcun effetto citotossico dovuto alle particelle non caricate. Alla luce di quanto è

risultato da questo studio, nanoparticelle di PLGA caricate con cisplatino rappresentano un semplice metodo di somministrazione del farmaco che mantiene l'efficacia del cisplatino libero ma riducendo gli effetti collaterali portando ad una citotossicità ritardata. Studi in corso sono hanno lo scopo di apportare modifiche alla formulazione di nanoparticelle di PLGA migliorandone le efficienze di incapsulamento e le modalità di rilascio, nonché migliorando l'efficacia sel sistema di rilascio.

**ABSTRACT ATTIVITÀ  
DI UNITÀ DI RICERCA INBB  
ATTINENTI ALLE TEMATICHE DEL WORKSHOP**

## **DISEGNO E SVILUPPO DI UN APTAMERO A RNA PER MUCINA 16 (CA125) E SUE POSSIBILI APPLICAZIONI DIAGNOSTICHE TRAMITE SPETTROSCOPIA SERS**

*Ilaria Lamberti<sup>a</sup>, Vittorio de Franciscis<sup>b</sup>, Laura Cerchia<sup>b</sup>, Giovanni Antonini<sup>ac</sup>, Sabrina Foglia<sup>cd</sup>, Stefano Iacobelli<sup>e</sup>, Lucia G Quagliano<sup>cd</sup>, Caterina Tanzarella<sup>a</sup>, Nicola Tinari<sup>e</sup>, Antonio Antoccia<sup>ac</sup>*

<sup>a</sup>*Dipartimento di Scienze Università degli Studi di Roma Tre Viale Marconi, 446 00146 Roma;*

<sup>b</sup>*IEOS-CNR Via Sergio Pansini, 5 80131, Napoli;*

<sup>c</sup>*"INBB (sez. Roma), Viale medaglie d'Oro 305 - 00136 Roma"*

<sup>d</sup>*IFN-CNR, Via Cineto Romano, 42 00156, Roma;*

<sup>e</sup>*MediaPharma s.r.l. and University "G. D'Annunzio", Chieti, Università degli studi di Chieti Pescara, via dei Vestini 31 - 66013, Chieti*

L'identificazione precoce di patologie neoplastiche è essenziale per giungere ad interventi terapeutici tempestivi e ridurre in maniera significativa la mortalità dei pazienti affetti. Per alcune tipologie tumorali è possibile effettuare dosaggi di biomarcatori rilasciati nei fluidi circolanti. Un noto biomarcatore è il Cancer Antigen 125 (CA125) o mucina 16 (MUC 16), una glicoproteina umana della famiglia delle mucine, già utilizzata per la valutazione diagnostica e prognostica del cancro ovarico. Pertanto la rilevazione del CA125 a tutt'oggi rimane un promettente strumento nella diagnosi precoce di questo tumore. Gli Aptameri sono filamenti di DNA o RNA lunghi circa dalle 15 alle 60 basi che mostrano una elevata affinità per target biologici poiché sono in grado di legarsi con una buona affinità e selettività ad un marker specifico e sono pertanto di grande interesse nello sviluppo di protocolli di diagnosi precoce. A differenza degli anticorpi, gli aptameri sono preparati da una procedura di selezione in vitro chiamata SELEX (Systematic Evolution of Ligands by Exponential Enrichment). L'affinità degli aptameri è simile o addirittura superiore a quelle degli anticorpi. Inoltre, gli aptameri sono più stabili e non inducono risposta immunitaria, con applicazioni potenziali nel campo della diagnostica ma con possibili sviluppi nel campo della terapia tumorale o il drug delivery. In questo lavoro presentiamo lo sviluppo di aptameri ad RNA in grado di legare con alta affinità e selettività l'antigene tumorale CA125. Una sequenza oligonucleotidica di RNA generata casualmente attraverso la SELEX, con una regione variabile di circa 40 nucleotidi è stata amplificata mediante PCR in condizioni di bassa stringenza per introdurre mutazioni casuali. Il pool di RNA arricchito è stato messo in contatto prima con un agente controselezionante, in modo da ridurre i legami aspecifici e in seguito con la proteina target. Le sequenze con la maggior capacità di legare la molecola bersaglio sono state così selezionate e sottoposte ad un successivo giro di selezione. I cicli di generazione della libreria e di selezione sono stati ripetuti per 8 volte fino all'ottenimento di un risultato soddisfacente in termini di affinità di

legame verso il marcatore. Gli aptameri selezionati sono state sequenziati e clonati ed è iniziato lo studio delle proprietà di legame di questi aptameri in modo da selezionare infine la molecola di RNA con le migliori possibilità applicative. L'aptamero così selezionato verrà utilizzato per il metodo di rilevazione altamente innovativo basato sulla spettroscopia SERS (Surface Enhanced Raman Spectroscopy) e sull'utilizzo di aptameri che stiamo sviluppando (vedi altro Abstract del nostro gruppo di ricerca dal titolo *Rivelazione di proteine bersaglio mediante l'utilizzo di aptameri e spettroscopia SERS*)

## **RIVELAZIONE DI PROTEINE BERSAGLIO MEDIANTE L'UTILIZZO DI APTAMERI E SPETTROSCOPIA SERS**

*Sabrina Foglia<sup>a</sup>, Lucia G Quagliano<sup>a</sup>, Ilaria Lamberti<sup>b</sup>, Antonio Antoccia<sup>bc</sup>, Stefano Iacobelli<sup>d</sup>, Caterina Tanzarella<sup>b</sup>, Nicola Tinari<sup>d</sup>, **Giovanni Antonini<sup>bc</sup>**.*

<sup>a</sup>*IFN-CNR, Via Cineto Romano, 42 00156, Roma;*

<sup>b</sup>*Dipartimento di Scienze Università degli Studi di RomaTre Viale Marconi, 446 00146 Roma;*

<sup>c</sup>*"INBB (sez. Roma), Viale medaglie d'Oro 305 - 00136 Roma";*

<sup>d</sup>*MediaPharma s.r.l. and University "G. D'Annunzio", Chieti, Università degli studi di Chieti Pescara, via dei Vestini 31 - 66013, Chieti*

L'individuazione di antigeni tumorali è di fondamentale importanza per la diagnosi precoce del cancro. Ci sono molti recettori, fattori di trascrizione ed enzimi il cui incremento può rivelare la presenza di un tumore. Tale identificazione è molto importante per lo sviluppo di strategie terapeutiche in una fase precoce della malattia e permette di indirizzarsi verso la terapia più appropriata. Attualmente, uno sforzo significativo è dedicato verso lo studio dei profili di espressione genica mediante i microchip a DNA. Tuttavia, questi biochip non possono rilevare modifiche post trascrizionali e di conseguenza forniscono solo una vista parziale del quadro biologico. Poiché il trasferimento dei dati tra trascrittoma e proteoma non è semplice, l'accento deve essere posto sulla proteomica che consente lo screening sierologico di antigeni tumorali. Lo scopo principale di questo lavoro è il set up e la validazione di una metodica innovativa per la diagnosi del cancro attraverso l'individuazione rapida e sensibile di biomarkers tumorali. Per raggiungere tale obiettivo si è utilizzato un metodo di rilevazione altamente innovativo basato sulla spettroscopia SERS (Surface Enhanced Raman Spectroscopy) e sull'utilizzo di aptameri. A tal fine è stata realizzata una piattaforma che si adatta ad un dispositivo microfluidico, formata da una deposizione multistep di miscele binarie di alchiltioli biotinilati su un film d'oro sottile. La sonda SERS costituita da nanoparticelle d'oro è stata legata tra le catene alchiliche e l'aptamero. L'aptamero utilizzato per questa sperimentazione è una molecola di RNA già ben descritta in letteratura, capace di legare con buona affinità una proteina bersaglio (in quest caso la trombina). I cambiamenti che si sono manifestati con la comparsa delle caratteristiche bande vibrazionali della molecola, sono stati osservati quando la molecola bersaglio ha interagito con il proprio aptamero. Grazie all'utilizzo congiunto di nanoparticelle d'oro funzionalizzate con aptameri e marcatori tumorali si è potuto ottenere il riconoscimento biomolecolare per concentrazioni molto basse di target, prossimi a quelli della singola molecola. La piattaforma realizzata supera la struttura a sandwich, composta dall'aptamero immobilizzato, la proteina bersaglio e un aptamero secondario legato alla sonda Raman. Questa costruzione solitamente realizzata nei biosensori SERS è limitativa in quanto non permette

una rilevazione di tipo diretto. Al contrario il sistema da noi proposto è veloce ed economico, adatto per le misurazioni analitiche dirette di campioni biologici. La sperimentazione proseguirà quindi con l'utilizzo del nuovo aptamero da noi generato capace di legare la proteina Cancer Antigen 125 (CA125) o mucina 16 (MUC 16), una glicoproteina umana della famiglia delle mucine, già utilizzata per la valutazione diagnostica e prognostica del cancro ovarico (vedi altro Abstract del nostro gruppo di ricerca dal titolo *Disegno e sviluppo di aptamero a RNA per mucina 16 (CA125) e sue possibili applicazioni diagnostiche*)

# **NANOPARTICELLE FUNZIONALIZZATE CON TRANSFERRINA ED INCAPSULANTI ACIDO ZOLEDRONICO DETERMINANO INIBIZIONE DELLA CRESCITA DEL GLIOBLASTOMA INTRACRANICO IN VIVO**

*Caraglia M. (1), Luce A. (1), Zappavigna S. (1), Balestrieri M.L. (1), D'Onofrio N. (1), Porru M. (2), Salzano G. (3), Lusa S. (3), Leonetti C. (2), De Rosa G. (3)*

*(1) Dip. di Biochimica, Biofisica e Patologia Generale- Seconda Università degli Studi di Napoli, via L. De Crecchio, 7 Napoli*

*(2) Dipartimento di Oncologia Sperimentale, Laboratorio di Chemioterapia Sperimentale Preclinica, Istituto Nazionale Tumori Regina Elena IRCCS, Via Elio Chianesi, 53 00144 Roma*

*(3) Dipartimento di Chimica Farmaceutica e Tossicologica, Università di Napoli Federico II, Via Domenico Montesano 49*

Parole chiave: Acido Zoledronico, Glioblastoma, Nanoparticelle

Il glioblastoma è un tumore cerebrale altamente aggressivo e con esito clinico infausto. Nonostante nuove e più specifiche strategie di trattamento, le recidive ricompaiono in tutti i casi. La barriera ematoencefalica (BBB) è il più importante fattore limitante per il trattamento di neoplasie del sistema nervoso centrale (SNC). Diversi metodi sono stati utilizzati per facilitare il trasporto di farmaci nel cervello (1, 2). Recentemente, piccoli vettori peptidici sono stati utilizzati per migliorare l'accumulo di farmaci nel cervello, e la maggior parte di essi consentono un trasporto sicuro ed efficiente. L'acido zoledronico (ZOL) è un farmaco usato per il trattamento delle metastasi ossee e dati recenti indicano che lo ZOL abbia una diretta attività antitumorale. Uno dei limiti più importanti dello ZOL è il suo ridotto rilascio nei tessuti tumorali e l'eccessivo accumulo nell'osso. Su queste basi, vi è stata la necessità di sviluppare nuove formulazioni che aumentino l'emivita dello ZOL nel plasma e permettano il raggiungimento di concentrazioni efficaci nel sito tumorale. Abbiamo sviluppato nanoparticelle autoassemblanti pegilate (NP), costituite da calcio/fosfato e liposomi cationici. Le condizioni di preparazione sono state ottimizzate per realizzare NP facilmente allestibili prima dell'uso, con dimensioni colloidali ed elevato carico di ZOL. Inoltre, per migliorare il direccionamento dello ZOL nel cervello abbiamo progettato nanoparticelle contenenti ZOL (NP-ZOL) funzionalizzate con transferrina (TRF), in grado di legare gli specifici recettori sulle cellule endoteliali della BBB. Abbiamo valutato gli effetti di nanoparticelle con ZOL funzionalizzate e non con transferrina sull'inibizione della crescita di linee cellulari di glioblastoma,

LN-229, U-373 MG e U-87 MG, mediante test MTT. L'incapsulamento in nanoparticelle funzionalizzate con TRF comportava maggiore attività citotossica in vitro su tutte e tre le linee cellulari di glioblastoma. Tuttavia, il potenziamento dell'attività antiproliferativa di NP-ZOL con transferrina era uguale (LN-229) o inferiore (U-373 MG e U-87 MG) rispetto a quella indotta da NP-ZOL non funzionalizzate con TRF e correlava con l'espressione del recettore della transferrina sulle cellule tumorali. D'altra parte, nanoparticelle funzionalizzate con TRF mostravano un'efficacia antitumorale superiore rispetto a NPZOL in topi nudi portatori di glioblastoma intramuscolare, inducendo una significativa inibizione del peso del tumore (TWI) del 41%, un ritardo della crescita tumorale (TC) di 10 giorni e un incremento della sopravvivenza dei topi (ILS) del 23%. Lo stesso trattamento è stato effettuato anche su topi nudi con xenotrapianti di cellule di glioblastoma intracranico ed anche in questo caso 4 topi su 8 avevano una stabilizzazione di malattia ed altri 2 su 8 una completa regressione del tumore. Tali effetti avvenivano in parallelo alla localizzazione di particelle marcate con fluorofori fluorescenti all'interno dei tumori prelevati dai topi trattati che suggeriva una buona penetrazione delle NP attraverso la BBB. Lo ZOL libero e le NP vuote, invece, non avevano alcun effetto sulla crescita dei tumori. Abbiamo analizzato gli effetti del trattamento combinato e in sequenza della temozolomide (TMZ), gold standard per il trattamento del glioblastoma, e di NP-ZOL con e senza TRF, e ZOL libero sull'inibizione della crescita utilizzando, come metodo di valutazione del sinergismo, l'apposito software Calcsyn. Le sequenze, TMZ al giorno 1 seguita da ZOL, NP-ZOL o NP-ZOL con transferrina al giorno 2 erano in tutti i casi fortemente sinergiche nell'indurre inibizione della crescita su cellule di glioblastoma, mentre la sequenza inversa NP-ZOL con transferrina seguita da TMZ era sinergica solo nelle LN-229, che esprimevano livelli più elevati dei recettori TRF rispetto a U-373 MG e U-87 MG. Al fine di valutare la biodistribuzione di NP-ZOL abbiamo effettuato l'analisi, mediante microscopia confocale, delle cellule LN-229 trattate con NPZOL fluorescenti, marcate con Bodipy a 6, 24, 48 e 72 h. Dai risultati è evidente un'internalizzazione maggiore di NP-ZOL con transferrina rispetto alle NP nude che è massima a 6h. Tali dati erano del tutto sovrapponibili a quelli in vivo ottenuti con NP fluorescenti iniettate in topi con xenotrapianto di glioblastoma intramuscolare nel fianco destro. Questi risultati preliminari hanno mostrato che l'incapsulamento dello ZOL aumenta l'efficacia antitumorale di questo farmaco nelle cellule di glioblastoma sia in vitro che in vivo probabilmente attraverso l'acquisizione di capacità di attraversamento della BBB.

1. Pardrige WM. New approaches to drug delivery through the blood-brain barrier. *Trends Biotechnol.* (1994) 12 239- 245.
2. Jolliet-Riant P, Tillement JP. Drug transfer across the blood- brain barrier and improvement of brain delivery. (1999) *Fundam. Clin. Pharmacol.* 13 16- 26.

# **DIFFERENZIAMENTO NEURONALE DI CELLULE MESENCHIMALI STAMINALI OTTENUTE DA TESSUTO ADIPOSO TRATTATE CON TERRENO CONDIZIONATO DI CELLULE GLIALI DELLA MUCOSA OLFATTIVA O DI NEUROBLASTOMA B104**

*Debora Lo Furno<sup>1</sup>, Rosalia Pellitteri<sup>2</sup>, Adriana C.E. Graziano<sup>1</sup>, Rosario Giuffrida<sup>1</sup>, Venera Cardile<sup>1</sup>*

<sup>1</sup>*Dipartimento di Scienze Bio-mediche, Sezione Fisiologia, Università di Catania, V.le A. Doria 6, 95125 Catania, Italy*

<sup>2</sup>*Istituto di Scienze Neurologiche, Consiglio Nazionale delle Ricerche, Sezione di Catania, Via Gaifami 18, 95126 Catania, Italy*

La scoperta che il tessuto adiposo (AT) è ricco di cellule staminali adulte capaci di differenziarsi in molte linee ha portato a considerare le potenziali applicazioni cliniche per la riparazione dei tessuti danneggiati e per la terapia angiogenica. Le cellule staminali mesenchimali (MSC) hanno un grande potenziale come agenti terapeutici, perché sono facili da isolare e possono essere ottenute da pazienti senza gravi problemi etici o tecnici. Inoltre, AT-MSCs possono essere differenziate sia in cellule della linea mesodermica come osteogeniche, condrogeniche, adipogeniche e miogeniche, che in cellule di origine non-mesodermica, come le cellule del pancreas endocrino, gli epatociti, le cellule endoteliali e i cardiomiociti. Le AT-MSCs sono in grado di sviluppare anche un fenotipo neuronale ed essere positive per la proteina acida fibrillare gliale (GFAP), la nestina e i nuclei neuronali (NeuN). In particolare, queste cellule in condizioni adeguate possono essere indotte ad esprimere il marcatore di differenziazione neuronale  $\beta$ -tubulina tipo III.

Lo scopo di questo studio è stato quello di verificare se il terreno condizionato (CM) ottenuto da cellule olfattive che formano la guaina mielina (OECs) o da colture di neuroblastoma B104 è in grado di indurre il differenziamento delle AT-MSCs verso un fenotipo neuronale.

Le OECs sono cellule gliali degli assoni dei nervi olfattivi capaci nel sistema olfattivo di neurogenesi continua per tutta la vita dei mammiferi. Essi condividono molte caratteristiche fenotipiche con gli astrociti e le cellule di Schwann. Le OECs sono, inoltre, una fonte di molteplici fattori trofici per cui sembrano giocare un ruolo decisivo nella plasticità del sistema nervoso centrale.

Le cellule B104, derivate da neuroblastoma, posseggono molte proprietà simili ai neuroni come la eccitabilità e la produzione di neurotrasmettitori. Inoltre, è stato riportato che il mezzo condizionato

ottenuto da cellule di neuroblastoma B104 (B104-CM) induce le cellule staminali neurali a differenziare in precursori degli oligodendrociti.

Per la realizzazione dei nostri obiettivi, in questo studio sono state utilizzate sia procedure immunocitochimiche che analisi di citometria a flusso e sono stati esaminati 24 ore e 7 giorni dopo il trattamento alcuni marcatori neurali, come nestina, proteina prodotta dal gene 9.5 (PGP 9.5), proteina associata ai microtubuli 2 (MAP2), proteina acida fibrillare gliale (GFAP) e antigene di superficie cellulare neuronale (A2B5).

I risultati hanno dimostrato che le AT-MSCs trattate con il terreno condizionato ottenuto da OECs o da cellule B104 esprimono marcatori di cellule progenitrici neuronali (nestina), così come di neuroni maturi (PGP 9.5 e MAP2) in modo tempo-dipendente. Esse mostrano, anche, caratteristiche morfologiche simili a cellule neuronali e sono immunonegative per GFAP e A2B5, marcatori rispettivamente degli astrociti e oligodendrociti.

Questo studio dimostra che le AT-MSCs possono rispondere a stimoli ambientali e differenziare verso un fenotipo neuronale. I dati ottenuti potrebbero contribuire allo sviluppo di un modello per la terapia sostitutiva in malattie degenerative del sistema nervoso centrale nell'uomo. Questo sistema di coltura potrebbe offrire molti vantaggi, tra cui la possibilità di effettuare test di sicurezza e di far proliferare e di conservare queste cellule prima di un eventuale trapianto.

## BIOSENSORI E APPLICAZIONI DI NANO PARTICELLE IN POLIMERI

**R. Eggenhöffner<sup>1</sup>**, S. Ottoboni<sup>1</sup>, L. Michelazzi<sup>2</sup>, P. Ghisellini<sup>1</sup>, C. Rando<sup>1</sup>, C. Larosa<sup>1</sup>, T. Bezerra<sup>1</sup> and P. Loria<sup>1</sup>

<sup>1</sup>*Dipartimento di Scienze Chirurgiche e Diagnostiche Integrate (DISC), Sezione di Biofisica Medica, Università degli Studi di Genova, Corso Europa 30, 16132 Genova,*

*email: roberto.eggenhoffner@unige.it*

<sup>2</sup>*Dipartimento di Scienze della Salute, Università degli Studi di Genova*

L'elettrospinning è una tecnica che appare molto promettente per la preparazione di fibre filamentari funzionalizzate sia attraverso l'inserimento di nano particelle che di macromolecole biologiche. L'utilizzo di elevate differenze di potenziale elettrostatico più intense delle tensioni superficiali fa sì che l'elettrospinning sia in grado di produrre fibre di dimensioni nanometriche.

E' noto che attraverso l'elettrospinning ed i sottilissimi fili che se ne ricavano si preparano le nuove sostanze fibrose per l'industria ad esempio tessile. Le più promettenti applicazioni sono rivolte alle nuove fibre, ad esempio tessili, capaci di sostituire i materiali attualmente sul mercato per via delle migliori caratteristiche e soprattutto della loro bioadattabilità. Flame retard, antifog, antiscratch costituiscono alcuni esempi applicativi. Una meta non ancora raggiunta è l'eventualità della sostituzione di materiali ignifughi come l'amianto con materiali altrettanto ignifughi e non nocivi per la salute.

L'interesse della ricerca sarà rivolto in particolare allo sviluppo di preparati in forme utili per applicazioni biosensoriali. In particolare, i fili funzionalizzati ottenuti per elettrospinning verranno utilizzati per verificarne la sensibilità e specificità nella risposta con tecniche nanogravimetriche ed elettrochimiche e quindi la loro utilità come nuovi biosensori. La geometria di queste disposizioni presenta un elevatissimo rapporto area superficiale/volume e pertanto una elevatissima sensibilità.

La ricerca rientra fra le attività del progetto COST MP1206.

Subbiah, T. , Bhat, G.S., Tock, R.W., Parameswaran , S. and Ramkumar, S.S. (2005). Electrospinning of Nanofibers, *Journal of Applied Polymer Science* , 96(2): 557—569

S. Bourbigot, E. Devaux, X. Flambard, *Polym. Degrad. Stab.* 2002, 75, 397

S. Ramakrishna, Neeta L. Lala, Hota Garudadhvaj, Ramakrishnan Ramaseshan, V. K. Ganesh *Polymer Nanofibers for Biosensor Molecular Building Blocks for Nanotechnology* , *Topics in Applied Physics Applications* Volume 109, 2007, pp 377-392

Adam K. Wanekaya, Wilfred Chen, Nosang V. Myung,\* Ashok Mulchandani\* *Nanowire-Based Electrochemical Biosensors Electroanalysis* 18,2006, No. 6, 533 – 550

# FORMULAZIONE E CARATTERIZZAZIONE DI NUOVI TIPI DI NANOPARTICELLE PER STRATEGIE DI “DRUG DELIVERY” A LIVELLO CEREBRALE

Alessandro Magini<sup>1</sup>, Jarosław Mazuryk<sup>1,2,3</sup>, Stefano Giovagnoli<sup>4</sup>, Alice Polchi<sup>1</sup>, Diego Dolcetta<sup>1</sup>, Brunella Tancini<sup>1</sup>, Adam Patkowski<sup>2,3</sup> e **Carla Emiliani**<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup> Dipartimento di Medicina Sperimentale e Scienze Biochimiche, Università degli Studi di Perugia, Via del Giochetto, 06126 Perugia, Italy

<sup>2</sup> The NanoBioMedical Centre, Umultowska 85, 61-614 Poznań, Poland

<sup>3</sup> Molecular Biophysics Division, Faculty of Physics, Adam Mickiewicz University, Umultowska 85, 61-614 Poznań, Poland

<sup>4</sup> Dipartimento di Chimica e Tecnologia del Farmaco, Università degli Studi di Perugia, Via del Liceo 1, 06123 Perugia, Italy

Attualmente le malattie neurodegenerative e cerebrovascolari hanno un impatto crescente sia dal punto di vista sociale che economico. Pertanto lo sviluppo di nuove strategie per una diagnosi precoce e per un trattamento efficace e sicuro di tali patologie sta diventando sempre più importante. Per queste ragioni, la ricerca di sistemi in grado di passare la barriera emato-encefalica per il trasporto di molecole terapeutiche a livello di sistema nervoso centrale (SNC) rappresenta una delle sfide più impegnative. La selettività della barriera emato-encefalica limita fortemente il numero di sostanze terapeutiche in grado di raggiungere il cervello e pertanto, negli ultimi anni, molti sforzi vengono rivolti allo sviluppo di sistemi che facilitino il passaggio dei farmaci verso il SNC. Tra questi, l'approccio basato sulle nanotecnologie sembra essere molto promettente. Tale approccio comporta l'uso di almeno due componenti, uno dei quali è costituito da una nanoparticella, che funge da vettore (nano-carrier), e l'altro è l'agente terapeutico (cargo).

La ricerca in atto ha lo scopo di indagare la potenziale efficacia di nanoparticelle solido-lipidiche coniugate con il farmaco Rapamicina (Rp-SLN) per la cura delle malattie neurodegenerative. Recentemente è stato dimostrato che l'inibizione specifica di mTOR, un complesso molecolare che riveste un ruolo centrale nel controllo della omeostasi cellulare, da parte della Rapamicina (Rp) è in grado di migliorare il comportamento cognitivo nel modello murino della Malattia di Alzheimer. mTOR è una serina / treonina chinasi implicata nella regolazione del metabolismo energetico, della proliferazione e motilità cellulare e dell'autofagia. mTOR forma due diversi complessi enzimatici,

mTORC1 e mTORC2. mTORC1 integra stimoli diversi provenienti da nutrienti, fattori di crescita, stato energetico e stress, interagendo strettamente con il complesso TSC1-TSC2 [Maiese et al., 2013 Trends Mol Med. 195, 1-60]. La Rp è un farmaco immunomodulatore approvato dalla US Food and Drug Administration per l'uso clinico come immunosoppressore. Attualmente viene usato per indurre tolleranza in pazienti che hanno subito trapianto d'organo, ma anche in oncologia per il trattamento del carcinoma renale avanzato. Studi recenti dimostrano che il trattamento con Rp, o con il suo analogo Everolimus, apporta benefici neurologici nella Sclerosi Tuberosa (TS) [Krueger et al. 2010 N Engl J Med 363,1801-11], una malattia genetica associata allo sviluppo di tumori al cervello e nella Malattia di Alzheimer [Caccamo et al. J Biol Chem 2010, 285, 13.107-20]. La Rp ed il suo analogo sono in grado di passare la barriera emato-encefalica ed apportare significativi benefici nelle due patologie neurodegenerative sopra citate, ma la loro somministrazione sistemica produce una serie di effetti indesiderati che possono compromettere la loro efficacia terapeutica, soprattutto se si pensa ad una loro somministrazione cronica. D'altro canto una somministrazione in loco sarebbe troppo invasiva e non consona ad un trattamento prolungato e precoce, quando ancora la sintomatologia non è conclamata. Al fine di mettere a punto una strategia terapeutica a bassa invasività basata su un sistema di nano-carrier specifico in grado di superare la barriera emato-encefalica e rilasciare in modo efficace una dose terapeutica del farmaco, abbiamo sintetizzato nanoparticelle solido-lipidiche caricate con Rp e opportunamente funzionalizzate con polisorbato 80 (P80). Il P80 ha il duplice ruolo di stabilizzatore e modificatore di superficie, in grado di favorire l'adsorbimento delle apolipoproteine sulla superficie delle particelle, convogliando così le stesse nel pathway dei recettori delle LDL presenti sulla barriera emato-encefalica e consentendone così l'attraversamento ed il rilascio del loro contenuto (che in questo caso era rappresentato da un colorante) a livello di sistema nervoso centrale [Blasi 2007 Advanced Drug Delivery Recensioni 59, 454-477]. Le Rp-SLN sono state da noi preparate con il metodo della omogeneizzazione a freddo ad alta pressione. Il Cetil-palmitato e la Rp (10 e 20% p/p) sono stati sciolti in cloroformio e adeguatamente miscelati con una soluzione acquosa di P80 all'1% (p/v) per ottenere una microemulsione olio-acqua. La produzione delle Rp-SLN consiste in 5 cicli di omogeneizzazione ad alta pressione. Il cloroformio è stato allontanato overnight a temperatura ambiente oppure mediante evaporazione rapida sotto vuoto. Misure di light-scattering dinamico hanno evidenziato che la dimensione media delle particelle è tra 50 e 200 nm. Il potenziale zeta è risultato essere neutro per le preparazioni ottenute mediante evaporazione rapida, mentre con tempi di evaporazione lunghi le Rp-SLN risultano cariche negativamente. La differenza osservata è correlata alla quantità di farmaco presente sulla superficie delle particelle che aumenta con il tempo di caricamento. L'intrappolamento del farmaco è stato valutato mediante spettroscopia UV. Misure della Rp nel

sopranatante opportunamente centrifugato e filtrato hanno evidenziato una efficienza di incapsulamento compresa tra 84 e 90%. Inoltre è stata effettuata una analisi TEM per controllare la morfologia delle particelle ed escludere la presenza di nanocristalli di Rp.

La eventuale citotossicità delle Rp-SLN ed il grado di internalizzazione sono stati analizzati *in vitro* in cellule SH-SY5Y (modello cellulare neurale) ed in cellule staminali neuronali. In queste ultime, da noi prodotte a partire dal modello murino di Alzheimer o da quello di Sclerosi Tuberosa, è stato valutato il livello di inibizione di mTOR dopo esposizione alle Rp-SLN e quindi l'effetto terapeutico. Sulla base dei dati ottenuti abbiamo ora intrapreso la preparazione di Rp-SLN marcate con una sonda fluorescente per valutare *in vivo* la loro capacità di oltrepassare la barriera ematoencefalica e di trasportare le dosi terapeutiche di Rp a livello di sistema nervoso centrale.

\* *Aderente INBB*

*Università degli Studi di Perugia,*

*Dipartimento di Medicina Sperimentale e Scienze Biochimiche,*

*Sezione di Biochimica e Biologia Molecolare*

*Via del Giochetto, 06100 Perugia*

*E-mail emiliani@unipg.it*

*Tel. 00390755857436*

# STUDIO DI INTERAZIONI PROTEINE-NANOPARTICELLE MEDIANTE NMR

*G. Esposito, A. Corazza, F. Fogolari – DSMB, Università di Udine*

L'interazione di proteine con nanoparticelle (NP) riveste un interesse particolare nel quadro dell'elaborazione di strategie per l'applicazioni di nuove tecnologie alla medicina. Oltre alla veicolazione di farmaci o alla presentazione di superfici funzionalizzate su scala nano, le NP possono modificare la funzionalità delle proteine, esaltando o inibendo alcune loro caratteristiche, il che potrebbe rivestire interesse per l'impiego di questi sistemi per scopi medici o farmacologici. In base a queste premesse abbiamo inserito la tematica tra le attività previste nell'ambito di un progetto PRIN 2012, guidato dal laboratorio di Biofisica di Udine e presentato in collaborazione con altre due unità, rispettivamente dell'Università di Parma e del CNR di Modena.

Il progetto si incentra sulla applicazione di una nuova tecnica NMR, messa a punto a Udine e denominata BLUU-Tramp, un nuovo approccio per la microcalorimetria di piccole e medie basato su misure di scambio isotopico. Solitamente le misure di scambio idrogeno-deuterio vengono eseguite in funzione di tempo e temperatura. Piuttosto che registrare lo scambio solo in funzione del tempo ad una singola temperatura, abbiamo realizzato un esperimento bidimensionale in cui il tempo è accoppiato ad una rampa lineare di temperatura. Così, in una singola sessione sperimentale si possono ottenere informazioni che normalmente richiederebbero mesi di acquisizione. In base alla teoria dello scambio isotopico in proteine, i dati sperimentali raccolti forniscono tutte le informazioni utili riguardanti il panorama conformazionale della proteina studiata. Il metodo BLUU-Tramp può essere applicato sia a proteine isolate o a sistemi più complessi in cui si osserva la proteina in presenza di un interattore, sia fortemente che debolmente legato. L'interattore può essere un piccolo ligando o un cosoluto, o, in ambienti fisiologici, anche una proteina o un complesso proteico, oppure NP, sempre che lo spettro NMR della specie di interesse sia ancora osservabile, il che impone marcatura selettiva e limiti per le restrizioni di mobilità della proteina considerata. Come già dimostrato da risultati pubblicati, per una proteina può essere ottenuta una descrizione termodinamica completa del panorama conformazionale di unfolding a livello di singolo residuo. L'applicazione a sistemi complessi affronterà l'interazione di proteine amiloidogene con NP preparate e caratterizzate a Modena. L'obiettivo finale è quello di creare una suite completa per l'identificazione sistematica dei determinanti della stabilità di proteine mediante caratterizzazione NMR, senza dover ricorrere a mutagenesi sistematica delle proteine oggetto di studio.

La valutazione degli aspetti termodinamici delle interazioni proteina-NP è un' tematica innovativa e interdisciplinare tra biofisica delle proteine e nanotecnologie. Sia le orientazioni preferenziali di adsorbimento della proteina sulle NP che le successive variazioni conformazionali sono fondamentali nel determinare il comportamento del sistema. Allo stato, le forze ed i meccanismi microscopici che regolano l'associazione tra proteine e NP sono poco conosciuti. La spettroscopia NMR in combinazione con approcci computazionali ha già dimostrato capacità di indagare tale meccanismo per ubiquitina su NP di oro. L'impiego di BLUU-Tramp per studiare le interazioni proteina-NP sarà un passo avanti rispetto all'informazione correntemente ottenibile.

# **BIOMATERIALI NANOSTRUTTURATI A MATRICE POLIMERICA BIODEGRADABILE**

***I. Armentano, E. Fortunati, S. Mattioli, N. Rescignano, J.M. Kenny***

*Materials Engineering Center, UdR INSTM, University of Perugia, 05100 Terni, Italy*

I materiali utilizzati per applicazioni biomediche devono essere concepiti per stimolare la risposta specifica delle cellule a livello molecolare, in modo da modulare i processi di adesione, proliferazione, differenziamento cellulare e la produzione e l'organizzazione della matrice extracellulare.

I poliesteri sintetici biorassorbibili, come l'acido poliglicolico (PGA), l'acido polilattico (PLA), il policaprolattone (PCL) ed il polivinilalcol, (PVA) o di derivazione naturale (PHA poliidrossialcanoati, collagene, cellulosa, ecc.) e i loro copolimeri, sono le matrici polimeriche più interessanti e versatili nell'ambito dello studio dei materiali per applicazioni biomediche.

Da diversi anni il gruppo di ricerca di Scienza e Tecnologia dei Materiali dell'Università di Perugia, presso la sede di Terni, lavora a sviluppare e caratterizzare nuovi biomateriali polimerici nanostrutturati a partire da polimeri biodegradabili sintetici e naturali.

L'attività di ricerca dell'Unità di Ricerca di Terni può essere suddivisa in quattro linee principali:

- sintesi di nanoparticelle polimeriche e nanogusci per il rilascio mirato di farmaci;
- sviluppo di nanocompositi polimerici multifunzionali con l'introduzione di nano strutture organiche e/o inorganiche per modulare le proprietà meccaniche, elettriche e morfologiche dei polimeri che possono influenzare il comportamento cellulare;
- sviluppo di nanocompositi polimerici porosi tridimensionali costituiti da polimeri biodegradabili e nanostrutture con elevato grado di interconnessione e modulate proprietà meccaniche e morfologiche;
- modifiche superficiali o deposizione al plasma per modulare le proprietà della superficie che è la prima parte del biopolimero che entra in contatto con la cellula e come tale influenzerà tutti i suoi comportamenti successivi.

L'attività di ricerca è resa possibile grazie all'integrazione fra diversi gruppi di ricerca in cui ricercatori con esperienza in diversi settori scientifici lavorano insieme al raggiungimento degli obiettivi comuni.

# **BIOSENSORI DI INTERESSE BIOMEDICO E PER IL MONITORAGGIO DELL'AMBIENTE E DELLE ACQUE**

*Paola Ghisellini<sup>1</sup>, Patrizia Loria<sup>1</sup>, Laura Pastorino<sup>2</sup>, Cristina Rando<sup>1</sup>, Tercio Terencio Bezerra<sup>1</sup> and Roberto Eggenhöfner<sup>1</sup>*

*<sup>1</sup>Dipartimento di Scienze Chirurgiche e Diagnostiche Integrate (DISC), Sezione di Biofisica Medica, Università degli Studi Genova, Corso Europa 30, 16132 Genova, email: paola.ghisellini@unige.it*

*<sup>2</sup>Dipartimento di Informatica, Bioingegneria, Robotica e Ingegneria dei Sistemi (DIBRIS)*

## *Biosensore per antidepressivi e betabloccanti*

I citocromi P450, costituiscono una grande superfamiglia di enzimi coinvolti nel metabolismo di vari substrati esogeni ed endogeni quali farmaci, xenobiotici ed ormoni steroidei (Wrighton and Stevens, 1992).

Il sistema del citocromo P450 è importante nei fenomeni di detossificazione di sostanze estranee ed agisce aumentando la solubilità di composti xenobiotici e facilitandone l'escrezione.

E' noto che undici isoforme di citocromo P450 umano sono coinvolte nel 90% del metabolismo dei farmaci (Guengerich, 2001).

In particolare l'isoforma dell'enzima P450, denominata P450 2D6 (CYP2D6), assume una grande rilevanza in psicofarmacologia chimica, in quanto rappresenta il più importante enzima coinvolto nel metabolismo di molti psicofarmaci antidepressivi, di antiipertensivi, e di betabloccanti (Smith et al., 1998).

Dal momento che il monitoraggio di questi farmaci in particolare della vera relazione dose-effetto è fondamentale in diagnostica clinica risulta interessante creare un innovativo biosensore basato sull'enzima CYP2D6 utilizzando le più avanzate tecnologie di immobilizzazione.

Un altro enzima che catalizza l'ossidazione di farmaci nel fegato umano è il citocromo CYP 2C19. Questo enzima ha particolari proprietà catalitiche e risulta efficiente se impiegato come elemento sensibile in un biosensore per l'analisi della amitriptilina, del propranololo e della fluoxetina.

L'obiettivo dello studio è definire, attraverso la caratterizzazione biofisica e biochimica, le tecniche ottimali di immobilizzazione (Langmuir Schaefer and matrix entrapment) utili a sfruttare le proprietà enzimatiche delle due isoforme citocromo P450, CYP2D6 e CYP 2C19, e a realizzare un biosensore elettrochimico altamente sensibile e specifico per l'analisi ed il monitoraggio di farmaci antidepressivi e betabloccanti nel sangue umano (Antonini et al., 2003).

### *Biosensore per il monitoraggio dell'ambiente e delle acque*

Gli organofosfati (OP) sono composti ad elevata tossicità che trovano applicazioni in agricoltura come pesticidi ed insetticidi e quindi potenzialmente presenti nelle acque potabili e nel cibo con notevoli effetti acuti e cronici ed anche cancerogeni. La loro tossicità, si esplica attraverso l'inattivazione transitoria, o irreversibile (i composti di più recente introduzione), dell'enzima acetilcolinesterasi, che degrada l'acetilcolina. L'acetilcolina media la trasmissione degli impulsi dal sistema nervoso al muscolo nella placca neuromuscolare.

Il progetto prevede lo sviluppo di un biosensore elettrochimico innovativo per il monitoraggio *in-situ* di composti organo fosfati.

Tecniche di immobilizzazione differenti verranno valutate al fine di individuare un protocollo operativo ottimale in termini di sensibilità, di stabilità e quindi di ri-utilizzabilità del biosensore. In quest'ottica l'attenzione sarà focalizzata in primo luogo sulle tecniche proprie dei film sottili, ovvero Langmuir-Blodgett (LB) e Langmuir-Schaefer (LS) (Blodgett and Langmuir, 1937; Roberts, 1990).

In secondo luogo verrà testata la possibilità di impiegare la tecnica di autoassemblaggio elettrostatico layer-by-layer (LBL) (Decher, 1997, Lvov et al., 1995).

### *Bibliografia*

Antonini M.; Ghisellini P.; Pastorino L.; Paternolli C.; Nicolini C. IEEP Nanobiotechnology, 150, 31-34, 2003.

Blodgett K.B., Langmuir I., Phys. Rev. 51, 964, 1937.

Decher G., Science 227, 1232-1237, 1997.

Guengerich F.P., Chem. Res. Toxicol. 14, 611-650, 2001.

Lvov Y., Ariga K., Ichinose I., Kunitake T., J Am Chem Soc 117, 6117-6123, 1995.

Roberts G., Langmuir- Blodgett Films, Plenum, New York, 1990.

Smith D.A., Abel S.M., Hyland R., Jones B.C., Xenobiotica 28, 1095-1128, 1998.

Wrighton S.A., Stevens J.C., Crit. Rev. Toxicol. 22, 1-21, 1992.

# INNOVATIVI SISTEMI NANOSTRUTTURATI PER APPLICAZIONI BIOMEDICHE E DIAGNOSTICHE

*P. Loria<sup>1</sup>, S. Ottoboni<sup>1</sup>, L. Michelazzi<sup>2</sup>, P. Ghisellini<sup>1</sup>, C. Rando<sup>1</sup>, C. Larosa<sup>1</sup>, T. Bezerra<sup>1</sup> and  
R. Eggenhöffner<sup>1</sup>*

*<sup>1</sup>Dipartimento di Scienze Chirurgiche e Diagnostiche Integrate (DISC), Sezione di Biofisica Medica, Università degli Studi Genova, Corso Europa 30, 16132 Genova, email:  
patrizia.loria@unige.it*

*<sup>2</sup>Dipartimento di Scienze della Salute, Università degli Studi di Genova*

La Sezione di Biofisica Medica del Dipartimento di Scienze Chirurgiche e Diagnostiche Integrate è attiva dal 2012 e prosegue una attività consolidata di ricerca in Biofisica Medica con finalità applicative alla Medicina del Centro Interuniversitario di Ricerca e di Servizi didattici sulle Nanotecnologie e Nanoscienze Organiche e Biologiche (CIRSDNNOB). Recentemente la Sezione si è occupata di progetti innovativi per la diagnosi e la terapia in Medicina e Chirurgia ed è attualmente coinvolta in collaborazioni scientifiche con Enti di ricerca e aziende private quali:

l'IIT (Istituto Italiano di Tecnologia), Consiglio Nazionale delle Ricerche (CNR), L'Istituto Nazionale di Fisica Nucleare (INFN) e l'azienda Leonardo Sistemi Integrati .

Biomateriali innovativi per usi chirurgici ed odontostomatologici.

Le resine composite attualmente utilizzate in varie tecniche chirurgiche e ricostruttive odontostomatologiche, non rispondono attualmente a tutte le proprietà ideali soprattutto in termini di resistenza meccanica nel tempo, caratteristiche di superficie nell'interfaccia con i tessuti calcificati (osso e dentina-smalto) (Covani et al., 2007) nell'ambiente orale, proprietà adesive nonché in termini di biocompatibilità locale e sistemica (Gregoire and Millas, 2005). Il progetto prevede l'inserimento nelle resine di base come riempitivo di nanostrutture come l'Allumina Porosa Anodizzata (APA) (Hermes et al., 2008). Le dimensioni e la concentrazione dei pori può essere opportunamente modulata attraverso parametri chimico-fisici nella fase della preparazione. I pori devono essere di tali dimensioni da consentire l'inserimento della resina di base per garantire una più efficace reticolazione e un conseguente miglioramento in particolare delle proprietà meccaniche e di superficie. Una resina composita con innovative proprietà meccaniche e di biocompatibilità può rispondere meglio alle tecniche applicative. La ricerca sui biomateriali per uso ricostruttivo in odontostomatologia oggi privilegia tecniche dirette sul paziente che non fanno uso di manufatti odontotecnici; questo perché le migliori qualità del materiale nel manufatto ottenuto ad alta temperatura in laboratorio, impongono però una tecnica molto più invasiva e distruttiva dei tessuti

biologici sani, con preparazioni complesse e distruttive degli elementi dentali e costi assai più elevati. Le resine composite per applicazione diretta devono quindi offrire requisiti meccanici, di adesione, estetici e di biocompatibilità che incrementino le tecniche basate sul risparmio biologico e sui costi contenuti.

### **Biosensore per la valutazione dei parametri biochimici del fenomeno stress**

Il progetto di ricerca sul fenomeno stress prevede uno studio per la determinazione del comportamento del cortisolo e di altri ormoni coinvolti con metodi immunologici su campioni di saliva, condotto su atleti e soggetti che praticano esercizi sportivi, anche estremi (Eggenhoffner et al., 2012). Lo scopo della ricerca è ottenere dati sufficienti a permettere una quantificazione rapida, semplice e sicura del fenomeno stress, sia eustress che distress (Smilios et al., 2003). A tal fine il progetto prevede, sulla base dei risultati, la formulazione di un biosensore multifunzione in grado di testare la presenza e la quantità di tali ormoni salivari per offrire un supporto diagnostico preciso in condizioni fisiologiche e patologiche utile nello sport, ma anche in ambienti di lavoro, o per riconoscere situazioni di difficoltà relazionali interpersonali o con l'ambiente. E' noto infatti come le condizioni psichiche influenzate da molteplici richieste di adattamento a stressogeni di varia natura, spesso di carattere cronico, possano favorire disfunzioni a livello endocrino, metabolico ed immunitario, responsabili di patologie per lo più di difficile determinazione eziopatogenetica, (Hellhammer et al., 2009) che otterrebbero in tal modo un più affidabile sistema di rilevamento e di valutazione.

### *Bibliografia*

- Covani U, Giacomelli L, Krajewski A, Ravaglioli A, Spetorno L, Loria P, Das S, Nicolini C. Biomaterials for orthopedics: a roughness analysis by anatomic force microscopi. *J Biomed. Mater Res A*, 82, 723-30, 2007.
- Gregoire G., Millas A. Microscopic evaluation of dentin interface obtained with 10 contemporary self-etching systems: correlation with their pH. *Oper. Dent.* 30, 481-91, 2005.
- Hermes S. Costa Alexandra A.P. Mansur, Edel F. Barbosa-Stancioli, Marivalda M. Pereira, Herman S. Mansur. Morphological, mechanical, and biocompatibility characterization of macroporous alumina scaffolds coated with calcium phosphate/PVA. *J Mater Sci* 43:510–524, 2008.
- Eggenhoffner R, Loria P, Ottoboni S, Ghisellini P, Rando C, Giuria R, Demori I, Michelazzi L. Behavior of cortisol in subjects performing extreme exercises and sports: winter swimmers versus athletes. *EuJIM.* 4S;61-1, 2012.
- Smilios I, Pilianidis T, Karamouzis M, Tokmakidis SP. Hormonal. responses after various resistance exercise protocols. *Med Sci Sports Exerc.* 35, 644-54, 2003.
- Hellhammer DH, Wüst S, Kudielka BM. Salivary cortisol as a biomarker in stress research. *Psychoneuroendocrinology*, 34, 163-71, 2009.

# **NUOVI APPROCCI PER CONTRASTARE LA SENESCENZA CELLULARE MEDIANTE LA TECNOLOGIA DEI CAMPI RADIOELETTRICI ASIMMETRICAMENTE CONVOGLIATI**

*Margherita Maioli, INBB, Dipartimento di Scienze Biomediche, Sassari*

Prove recenti suggeriscono che le malattie legate all'invecchiamento potrebbero essere causate da una perdita accelerata della capacità di auto-rinnovamento delle cellule staminali adulte, normalmente coinvolte nella sostituzione di elementi cellulari danneggiati.

L'utilizzo della tecnologia dei campi radio elettrici asimmetricamente convogliati (REAC), mediante specifici protocolli denominati ottimizzazione tissutale (TO) - rigenerativa (RGN) come da noi precedentemente pubblicato influenza, in vitro, i profili di espressione genica. In particolare influenza anche il controllo del processo di differenziamento verso particolari fenotipi delle cellule staminali, la pluripotenza e il differenziamento di fibroblasti umani derivati dalla pelle. Lo scopo del presente lavoro era quello di verificare se il trattamento REAC TO-RGN potesse anche essere efficace nel contrastare l'espressione del marcatore aspecifico di senescenza, la beta-galattosidasi, e nell'induzione di un pattern di senescenza, implicato durante la coltura prolungata di cellule staminali derivate da tessuto adiposo umano (hADSCs). A seguito del trattamento REAC TO-RGN, abbiamo osservato una significativa riduzione della colorazione della beta-galattosidasi, e dell'espressione dei geni mediatori di senescenza p16INK4, ARF, p53 e p21Cip1. Inoltre, diversamente dalle cellule non trattate, hADSCs esposte al trattamento REAC TO-RGN hanno mantenuto la loro tipica morfologia fibroblasto-simili e mostravano una elevata potenzialità differenziativa anche dopo prolungati passaggi colturali, dimostrata dalla conservata capacità di assumere un fenotipo osteogenico, adipogenico, condrogenico e vascolare. La comparsa dei fenotipi sopra descritti è stata valutata mediante l'espressione di specifici geni, e mediante valutazione morfologica. In conclusione, il nostro studio evidenzia un effetto positivo del trattamento REAC TO-RGN nel contrastare i processi degenerativi di senescenza in vitro e supporta la futura applicazione clinica di tale tecnologia come un potenziale strumento contro le malattie degenerative legate all'età.

# **SISTEMI NANOPARTICELLARI PER IL RILASCIO CONTROLLATO DI FARMACI NELLA TERAPIA DEL MESOTELIOMA E DEL CANCRO AL PANCREAS**

*Damiano Gustavo Mita – Consorzio Interuniversitario INBB- Laboratorio Nazionale Interferenti Endocrini – Via Pietro Castellino, 111 – Napoli*

L'attività sperimentale che si descrive, in parte in fase di esecuzione, fa parte di un progetto più ampio sottoposto al Ministero della Salute nell'ambito della ricerca finalizzata 2011-2012.

La maggior parte dei farmaci chemioterapici incontra enormi difficoltà nel raggiungere la massa tumorale ed espletare i propri effetti data la diversa vascolarizzazione, l'alterata composizione stromale e la resistenza multifarmaco (multi-drug resistance, MDR) dei tessuti cancerosi. Le nanoparticelle (NPs) per il rilascio controllato dei farmaci costituiscono un importante strumento farmacologico per il superamento di questi ostacoli. Inoltre, l'uso di NPs nel rilascio controllato dei farmaci chemioterapici permette di evitare i gravi effetti collaterali aspecifici che tali farmaci, se somministrati per via endovenosa, inducono. Tra i materiali d'elezione da usare per l'allestimento di NPs hanno particolare importanza polimeri biodegradabili e non-immuno-responsivi quali l'acido poli lattico-co-glicolico (PLGA), l'acido ialuronico (HA) e il chitosano (CH). Inoltre NPs che espongono acido ialuronico o peptidi cellula-specifici possono essere utilizzate per riconoscere ed eliminare selettivamente cellule tumorali overesprimenti specifici recettori come CD44 e CXCR4.

Alla luce di quanto descritto, lo scopo di questo progetto è testare, *in vitro* e *in vivo*, l'efficienza di NPs di PLGA, HA, HA/CH preparate utilizzando chemioterapici classici, come il cisplatino e la quercetina, da soli o in combinazione tra loro e con superfici modificate con peptidi anti-CD44 e/o CXCR4. L'ipotesi si fonda sull'uso di nanoparticelle caricate con cisplatino e con il polifenolo quercetina, che abbiano attività biologica su target specifici per il trattamento del mesotelioma pleurico e del cancro al pancreas.

PLGA-NPs (gruppo Mita) saranno preparate utilizzando il metodo della doppia emulsione con evaporazione del solvente. NPs di acido ialuronico (HA) (Gruppo Iaffaioli) saranno preparate mediante coniugazione covalente tra polimero e farmaco o marker fluorescente mediante uno spacer pH sensibile creato con reazione EDC-NHS. Nanocapsule (Gruppo Netti) saranno preparate mediante deposizione di HA e CH layer by layer utilizzando template liquidi basata sulla nano-emulsione olio/acqua. La fase organica interna viene caricata con la quercetina, lipofila, mentre il

cisplatino carico e idrofilico viene incapsulato tra gli strati polimerici. La reazione EDC-NHS sarà utilizzata per creare il coating con i peptidi anti-CD44 e CXCR4.

I diversi tipi di NPs saranno sottoposti a studi di cinetiche di rilascio *in vitro* a 37°C. L'*uptake* cellulare sarà valutato monitorando l'ingresso di NPs fluorescenti nelle cellule grazie alla microscopia confocale. NPs di PLGA, HA, HA-Chitosano, anche modificate in superficie con i peptidi anti-CD44/CXCR4, caricate e non caricate con i farmaci, saranno utilizzate per esperimenti di citotossicità e apoptosi su linee cellulari di mesotelioma (MSTO-211H) (Gruppo Crispi) e cancro pancreatico (MIA PaCa-2) (Gruppo Iaffaioli) mediante citofluorimetria a flusso. Vitalità e proliferazione cellulare saranno valutate mediante MTT test e saggio SRB, mentre analisi di proteine coinvolte nella regolazione del ciclo cellulare e apoptosi saranno effettuate mediante western blotting. I possibili effetti delle NPs sullo stato infiammatorio delle cellule e il citochinoma saranno valutati mediante test ELISA multiplo. L'espressione genica differenziale tra cellule trattate con NPs caricate di farmaci, trattate con NPs vuote e cellule non trattate sarà studiata mediante analisi con microarray e l'espressione di geni la cui regolazione risulterà alterata sarà valutata con Real Time RT-PCR quantitativa (Gruppo Crispi). Per gli esperimenti *in vivo* (Gruppi Crispi-Mita e Iaffaioli-Arra), saranno preparati modelli murini atimici in cui le diverse linee cellulari saranno iniettate sotto cute.

Le NPs che avranno dimostrato la migliore efficacia terapeutica *in vitro* saranno utilizzate per trattamenti *in vivo* in modelli murini xenograft portatori del tumore oggetto di studio. Come controlli saranno utilizzati topi non trattati e trattati con NPs vuote. Saranno valutate le variazioni di peso corporeo e le variazioni della funzionalità renale, epatica, della milza e del midollo osseo durante il trattamento. Tali osservazioni permetteranno di comprendere le possibili riduzioni degli effetti collaterali associati al cisplatino rilasciato dalle NPs e coadiuvato dalla quercetina. Saranno poi valutate le dimensioni della massa tumorale a tempi diversi durante i trattamenti. Dagli studi *in vitro* ci si aspetta che le NPs caricate simultaneamente con cisplatino e quercetina possano dare la migliore efficienza in termini di attività antitumorale anche a basse concentrazioni di cisplatino, grazie al sinergismo con la quercetina. Si ipotizza che la somministrazione intravenosa delle nuove formulazioni in topi portatori di cancro possa determinare: 1) l'accumulo nel parenchima delle cellule tumorali grazie all'effetto EPR non intaccando organi sani; 2) il legame ad alta affinità ai recettori CD44 e CXCR4 3) e quindi l'ingresso nelle cellule attraverso endocitosi mediata da recettori; e 4) rilasciare cisplatino e quercetina all'interno del citoplasma ottenendo così anche una riduzione degli effetti collaterali associati al cisplatino in forma libera.

Il progetto ha lo scopo di paragonare l'efficacia terapeutica di tre diverse formulazioni carriers di cisplatino e quercetina, dando indicazioni del co-trasporto di farmaci antitumorali con lo scopo di

aumentare il loro accumulo nei tessuti affetti da cancro e dell'uptake in cellule cancerose specifiche grazie al riconoscimento e legame con recettori CD44 e CXCR4, suscitando grande interesse prognostico e terapeutico nei confronti del mesotelioma e del cancro al pancreas.

### **Strutture ed Unità partecipanti al progetto**

1 – INBB: realizzazione di NPs-PLGA (Prof. Mita-Diano-Mayol-Biondi) e di Nanocapsule di Chitosano/HA (prof. Netti) su core organico preparate con la tecnica layer by layer.

2 - IRCCS “Fondazione G. Pascale”: realizzazione NPs-HA (prof. Iaffaioli), produzione di peptidi facilitanti l'uptake cellulare delle nanoparticelle (Prof. Castello), esperimenti *in vitro* e *in vivo* sull'efficacia delle NPs prodotte da tutte le unità partecipanti al progetto contro il cancro al pancreas (Proff. Iaffaioli-Arra).

3- CNR-IGB: studi *in vitro* e *in vivo* (Dr. Crispi) su mesotelioma e studio della modulazione dell'espressione genica.

***I risultati preliminari di questa sperimentazione saranno presentati, nello spazio giovani, dal Dr. Raffaele Vecchione, del gruppo del Prof. Netti, e dal Dr. Ciro Menale, del gruppo del Prof. Mita***

# **SINTESI, STUDI CHIMICO-FISICI E BIOLOGICI DI NANOVETTORI BIORESPONSIVI A BASE DI ACIDO IALURONICO PER IL TRATTAMENTO DEL CANCRO**

*Quagliariello V<sup>1</sup>, Iaffaioli R.V<sup>1</sup>, Mita D.G<sup>2</sup>*

<sup>1</sup> *National Cancer Institute of Naples "G.Pascale" Foundation, Via M. Semmola, 80131 Naples, Italy*

<sup>2</sup> *Laboratorio Nazionale Interferenti Endocrini – INBB- Via P. Castellino, 111, 80131 Naples, Italy*

Nel trattamento del cancro il Drug Delivery è uno dei metodi più importanti ed innovativi per aumentare la selettività e l'efficienza anticancro di piccole molecole e farmaci chemioterapici convenzionali risparmiando gli organi vitali del paziente e conseguenzialmente aumentando la sua sopravvivenza e migliorando la qualità della vita.

Il nostro lavoro scientifico è focalizzato sulla sintesi di nanovettori biodegradabili, non tossici, non responsivi dell'immunità innata (aspecifica) ed acquisita (specifica), bioresponsivi al microambiente tumorale e capaci di rilasciare selettivamente un principio attivo ,specificamente un polifenolo ad azione antiproliferativa tumorale ed antiangiogenica, grazie al contributo combinato del targeting passivo ed attivo. Sostanzialmente, il nostro gruppo di ricerca lavora con l'acido ialuronico (HA), uno dei carboidrati più flessibili ed atossici presenti in natura, mediante la sua funzionalizzazione covalente con un braccio spaziatore che a sua volta è coniugato ad un principio attivo mediante un legame reversibile esclusivamente a pH acido. La nanoparticella così ottenuta è capace di legare il recettore CD44 e rilasciare il farmaco in maniera massiva nel citoplasma delle cellule cancerose.

Il CD44 è un recettore altamente iperespresso sulla membrana delle cellule tumorali ed è significativamente associato alla progressione di molti tumori. Studi preclinici hanno mostrato una correlazione diretta tra la capacità di endocitosi CD44 mediata e la propensione alla metastasi, quindi alla malignità, del tumore: le cellule cancerose che internalizzano e degradano meglio l'acido ialuronico sembrano essere le più metastatiche.

La sintesi del nanostrutto HA-spaziatore-farmaco, ha mostrato risultati chimico-fisici basati su elevata stabilità diametrica idrodinamica, Z potenzial con valore negativo che porta a stabilità colloidale in condizioni fisiologiche nonché bassa interazione con le proteine plasmatiche, ed elevata capacità di drug loading ( $\mu\text{M}$  di farmaco / mg of nanovettore )

Studi biologici su linee cellulari tumorali di pancreas e prostata, entrambe caratterizzate da un'elevata espressione di CD44, hanno mostrato ottimi profili di citotossicità nel tempo fino a 72h di contatto con un valore di IC50 di 1,5 mg/mL di polimero corrispondenti ad un valore molare

medio di polifenolo internalizzato nelle cellule di 1,75  $\mu\text{mol}$ . Studi di ciclo cellulare hanno mostrato che il nostro nanocostrutto induce un arresto in fase G1 del ciclo cellulare su entrambe le linee tumorali in esame. Inoltre, analisi di biologia molecolare hanno evidenziato che il nanovettore determina la soppressione dell'espressione genica (determinata mediante RT-PCR) dell'oncogene PI3K e soprattutto dell'Hsp70, la cui iperespressione è coinvolta nella resistenza farmacologica alla gemcitabina da parte delle cellule tumorali di pancreas.

Studi di uptake cellulare effettuati mediante Microscopia Laser Confocale hanno dimostrato che con un meccanismo selettivo mediato da CD44, le nostre nanoparticelle si accumulano massivamente nel citoplasma cellulare mediante il pathway endo-lisosomiale, con rilascio farmacologico nelle vescicole endosomiali tardive/lisosomiali per via del loro ambiente acido che induce l'idrolisi del legame tra l'addotto HA-spaziatore ed il farmaco.

Questi risultati incoraggianti ci hanno portato a svolgere studi *in vivo* su modelli ortotopici murini di carcinoma del pancreas e della prostata. Sono, di fatto, in corso studi di efficacia anticancro *in vivo* del nostro nanocostrutto con il monitoraggio della funzionalità di organi vitali murini quali cuore, fegato, milza, reni e midollo osseo durante l'intero tempo di trattamento.

L'unione dei dati *in vitro* ed *in vivo* ci conferirà l'opportunità di creare un nuovo, sicuro e selettivo strumento terapeutico nelle mani dell'oncologo per la terapia del carcinoma del pancreas e della prostata.

# **CONTROLLO DEL PROCESSO DI PRODUZIONE DI NANOPARTICELLE POLIMERICHE PER IL RILASCIO DI CISPLATINO MEDIANTE MICROSPETTROSCOPIA INFRAROSSA A TRASFORMATA DI FOURIER**

**M. Portaccio**<sup>1,2</sup>, **C. Menale**<sup>1,2,3</sup>, **N. Diano**<sup>1,2,3</sup>, **D.G. Mita**<sup>2,3</sup>, **M. Lepore**<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> *Dipartimento di Medicina Sperimentale – Seconda Università di Napoli – Napoli (ITALY)*

<sup>2</sup> *Consorzio Interuniversitario INBB – Roma (ITALY)*

<sup>3</sup> *Istituto di Genetica e Biofisica “A. Buzzati Traverso” CNR - Napoli (ITALY)*

Recentemente l'utilizzo di nanoparticelle polimeriche per il rilascio di farmaci è stato largamente studiato allo scopo di migliorarne la biocompatibilità conservandone l'efficacia terapeutica. Uno dei sistemi più studiati è rappresentato da nanoparticelle di PLGA contenenti cisplatino grazie alle potenzialità del PLGA come “drug carrier”. Differenti tecniche sperimentali sono state adottate per controllare i metodi di preparazione di tali nanoparticelle. In questo ambito la microspettroscopia infrarossa a trasformata di Fourier (FT-IR) può essere particolarmente utile. Infatti tale tecnica permette di determinare la composizione e la struttura dei componenti chimici senza manipolazioni preliminari del campione.

Il presente lavoro riporta i risultati di una serie di misure FT-IR eseguite nelle varie fasi di preparazione delle nanoparticelle evidenziando il contributo dei vari composti chimici utilizzati. Inoltre è stata utilizzata una procedura di analisi univariata per l'interpretazione dei risultati sperimentali quando le modificazioni degli spettri sono relativamente deboli. In questi casi in cui può essere difficile valutare quantitativamente l'effetto di eventuali modifiche di stato o configurazione per la presenza di rumore di fondo o segnali spuri può essere utile tale tipo di analisi globale degli spettri. In particolare l'uso di questa procedura ha permesso di discriminare la presenza di piccole quantità di cisplatino nelle nanoparticelle di PLGA. I risultati ottenuti hanno confermato che nuove geometrie di acquisizione degli spettri unitamente ad appropriate procedure di analisi dei dati possono contribuire a rendere la microspettroscopia infrarossa uno strumento molto utile per un controllo rapido e dettagliato dei processi di produzione di interesse farmacologico.

# LE CELLULE STAMINALI INCONTRANO LE GRANDI MACCHINE DELLA FISICA

*Fabrizo Fiori, Emmanuelle Girardin, Alessandra Giuliani\**, Adrian Manescu, Serena Mazzoni,  
**Franco Rustichelli**

*Università Politecnica delle Marche – Dip. di Scienze Cliniche e Odontostomatologiche, Ancona*  
*\*a.giuliani@univpm.it*

## **Introduzione**

Il nostro gruppo di fisici ha iniziato da tempo lo sviluppo di alcune linee di ricerca su cellule staminali in collaborazione con biologi e medici utilizzando delle tecniche coinvolgenti la radiazione X di sincrotrone.

Essenzialmente tre tecniche vengono utilizzate per la caratterizzazione micro strutturale dei diversi campioni biologici: *la microtomografia computerizzata ai raggi-x* ( $\mu$ CT), *la micro diffrazione dei raggi-x* e *la olografia ai raggi-x*.

## **Ortopedia**

La prima linea di ricerca riguarda in particolare lo studio pre-clinico della cinetica di formazione dell'osso rigenerato da cellule staminali isolate dal midollo osseo in topi immunodeficienti.

Utilizzando la  $\mu$ CT, sono stati studiati diversi ossi ingegnerizzati ottenuti con supporti riassorbibili e non riassorbibili. In particolare sono stati ottenuti la frazione volumica, lo spessore medio e la distribuzione di spessori degli ossi formati e dei supporti in funzione del tempo di impianto. [1]  
L'uso della *microdiffrazione a raggi-x* ha permesso di ottenere diversi parametri strutturali a livello atomico sull'osso ingegnerizzato all'interno di un poro singolo. [1]

La *olografia a raggi-x* ha permesso di visualizzare a livello tridimensionale, *il network di vasi sanguigni per la prima volta senza mezzo di contrasto, all'interno di ogni singolo poro*. [2]

## **Cardiologia**

La  $\mu$ CT è stata utilizzata per visualizzare in condizioni *ex-vivo*, la distribuzione spaziale a livello 3D di cellule staminali iniettate nel miocardio di topi infartuati [3].

## **Neurologia**

Sulla base di lavori recenti che hanno mostrato l'efficacia dell'iniezione di cellule staminali umane nella riparazione muscolare in topi affetti da distrofia muscolare, è stato possibile, utilizzando la  $\mu$ CT presso l'ESRF di Grenoble, studiare *in vivo* su un modello animale la cinetica della distribuzione spaziale delle cellule staminali marcate con ossido di ferro. [4]

## **Odontoiatria**

La  $\mu$ CT e la *olotomografia a raggi-x* sono state utilizzate per caratterizzare la struttura e il network dei vasi sanguigni, in un osso ingegnerizzato formatosi in mandibole umane 3 anni dopo l'impianto di cellule staminali mesenchimali ottenute da polpa dentale. [5]

## **Conclusioni**

L'uso della radiazione di sincrotrone permette di ottenere delle utili informazioni a livello 3D in diversi campi della medicina rigenerativa, che sono complementari a quelle di tipo 2D ottenute dall'istologia.

E' da sottolineare il carattere innovativo *dell'olotomografia a raggi-x*, capace di fornire informazioni sulla vascolarizzazione senza l'uso dei mezzi di contrasto.

Tali tecniche sono a disposizione di altri gruppi che utilizzano le cellule staminali in altre aree della medicina rigenerativa.

## **Bibliografia**

[1] 2007 Cancedda R., Cedola A., Giuliani A., Komlev V., Lagomarsino S., Mastrogiacomo M., Peyrin F., Rustichelli F. Bulk and interface investigations of scaffolds and tissue-engineered bones by X-ray microtomography and X-ray microdiffraction. *Biomaterials*, 2007, 28, (2505–2524)

[2] 2009 Komlev V.S., Mastrogiacomo M., Peyrin F., Cancedda R., Rustichelli F., X-Ray Synchrotron Radiation Pseudo-Holotomography as a New Imaging Technique to Investigate Angio- and Microvasculogenesis with No Usage of Contrast Agents. *TISSUE ENGINEERING: 2009; Part C*, 15, Number 3, (425-430)

[3] Giuliani A., Frati C., Rossini A., Komlev V.S., Lagrasta C., Savi M., Cavalli S., Gaetano C., Quaini F., Manescu A., Rustchelli F., High-resolution X-ray microtomography for three-dimensional imaging of cardiac progenitor cell homing in infarcted rat hearts. *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine*, (2011) Published online in Wiley Online Library DOI: 10.1002/ter.409

[4] (2012) Farini A., Villa C., Manescu A., Fiori F., Giuliani A., Razini P., Sitzia C., Del Fraro G., Belicchi M., Meregalli M., Rustichelli F., Torrente Y. Novel insight into stem cell trafficking in dystrophic muscles. *International Journal of Nanomedicine*, 2012:7 3059–3067

[5] (2013) Giuliani A, Manescu A, Langer M, Rustichelli F, Desiderio V, Paino F, De Rosa A, Laino L, D'Aquino R, Tirino V, Papaccio G. Three years after transplants in human mandibles, histological and in-line HT revealed that stem cells regenerated a compact rather than a spongy bone: biological and clinical implications. *Stem Cells Translational Medicine*, 2, 316-324, 2013. <http://dx.doi.org/10.5966/stemcells.2012-0136>.

## NANOMATERIALI E DRUG DELIVERY

*Antonella Saija e Francesco Cimino*

*Dipartimento di Scienze del Farmaco e Prodotti per la Salute, Università di Messina*

Il settore della ricerca sulle possibili applicazioni di successo dei nanomateriali nel campo dei farmaci e del drug delivery (DD) è in continua espansione. L'interesse nel potenziale impiego dei nanomateriali in questo campo è particolarmente alto quando si tratti di farmaci con bassa biodisponibilità, scarsamente maneggevoli e utili per il trattamento di patologie a forte impatto, come il cancro e le patologie neurodegenerative. In questo campo la progettazione di nanomateriali dovrebbe essere intesa come lo studio di sistemi complessi in scala nanometrica ( $\approx 1-100$  nm), formati da almeno due componenti, dei quali uno è il farmaco e l'altro può essere estremamente diverso nella sua natura chimica (includendo materiali di origine naturale, come albumina, gelatina e fosfolipidi, e non, come diversi polimeri, nanoparticelle contenenti metalli e nanotubi di carbonio). Gli scopi della ricerca in questo campo includono: un più specifico drug targeting e delivery; il miglioramento della capacità di attraversamento delle barriere biologiche; la riduzione della tossicità del principio attivo a parità di effetto terapeutico; maggiore sicurezza.

Un esempio che riassume tutte le problematiche sopra descritte (ed argomento di ricerche in programma nel nostro laboratorio) è l'uso di nanomateriali per il trattamento terapeutico dei tumori cerebrali. Infatti la presenza della barriera emato-encefalica (BEE) costituisce un grosso ostacolo che impedisce alle terapie oggi disponibili di arrivare a svolgere la loro azione farmacologica direttamente in loco. Nonostante la neurofarmaceutica costituisca il più grande settore di crescita dell'industria del farmaco, il suo sviluppo è rallentato proprio dalla difficoltà di risolvere in modo efficace il problema dell'attraversamento della BEE. Nel caso specifico dei tumori cerebrali, va anche tenuto conto che i farmaci antitumorali per il loro meccanismo di azione stesso hanno una profonda tossicità che è spesso il principale fattore limitante il loro uso. I nanomateriali e le nanoparticelle (NP) possono essere un ottimo tool per il DD ai tumori cerebrali, favorendo l'arrivo del farmaco nel target e riducendone l'esposizione dei tessuti sani, con una vantaggiosa diminuzione della dose terapeutica e dei danni collaterali. Tuttavia, l'utilizzazione delle NP non appare utile solo nel caso di farmaci citotossici ma anche di altre molecole (es. curcumina) per le quali, a causa delle loro proprietà (es. attivazione di Nrf2), è stata dimostrata sia la capacità di potenziare l'effetto dei farmaci citotossici tradizionali sia anche di limitarne gli effetti collaterali.

Presupposto indispensabile allo studio di nuovi sistemi di DD è la biocompatibilità dei materiali utilizzati. Da ciò dipende il fatto che l'uso di NP di polimeri biodegradabili (come PLGA o PLA, approvati dalla FDA) sembra essere uno dei più promettenti nel campo dei nanomateriali per il DD.

Dimensioni e caratteristiche di superficie influenzano fortemente proprietà biologiche e destino nell'organismo delle NP (permanenza nel torrente circolatorio, adsorbimento alle proteine, uptake da parte dei macrofagi, opsonizzazione, aggregazione, diffusione attraverso i capillari, ecc), ma possono anche conferire loro caratteristiche particolari che ne migliorano la capacità di arrivare al target (ad esempio, adsorbimento di lipoproteine, inibizione delle pompe di estrusione di membrana, ecc.). Naturalmente lo studio dell'efficacia delle NP per il DD non può essere disgiunto dalla valutazione delle loro tossicità, a livello dei sistemi cellulari e tissutali con cui vengono a contatto. In conclusione, l'uso dei nanomateriali nel settore terapeutico appare promettente, e ulteriori studi sono certamente fondamentali necessari per valutarne efficacia e sicurezza.

# CARATTERIZZAZIONE STRUTTURALE DI COMPLESSI TROMBINA-APTAMERO: DETTAGLI DEL MECCANISMO DI RICONOSCIMENTO MOLECOLARE UTILI PER LO SVILUPPO DI METODI PER IL RILEVAMENTO DELL'ENZIMA ALTAMENTE SENSIBILI E SELETTIVI

Irene Russo Krauss<sup>a</sup>, Andrea Pica<sup>a</sup>, Antonello Merlino<sup>a,b</sup>, Lelio Mazzarella<sup>a,b</sup>, **Filomena Sica<sup>a,b,c\*</sup>**

<sup>a</sup>Dipartimento di Scienze Chimiche, Università di Napoli "Federico II", Complesso Universitario di Monte Sant'Angelo, I-80126, Napoli, Italia

<sup>b</sup>Istituto di Biostrutture e Bioimmagini del CNR, Via Mezzocannone 16, I-80134, Napoli, Italia

<sup>c</sup>Istituto Nazionale di Biostrutture e Biosistemi, Consorzio Inter-Universitario, Viale Medaglie d'Oro 305, I-00136, Roma, Italia

Gli aptameri sono acidi nucleici artificiali aventi la proprietà di legarsi ad una molecola bersaglio con elevata affinità e selettività[1,2]. Gli aptameri sono selezionati *in vitro* sulla base della loro affinità chimica per una specifica molecola attraverso un metodo chiamato SELEX (“*Systematic Evolution of Ligands by EXponential enrichment*”)[3,4]. Le peculiari proprietà di questi nucleotidi, quali semplicità di sintesi, assenza di immunogenicità, alta stabilità e disponibilità di antidoti, li rende agenti terapeutici migliori degli anticorpi monoclonali[5,8]. Gli aptameri sono, inoltre, ottimi strumenti per la somministrazione di farmaci, per la diagnostica clinica, e per il monitoraggio terapeutico in tempo reale. Grazie ai notevoli progressi nelle nanotecnologie sono stati prodotti diversi aptameri legati a nanoparticelle da utilizzare come piattaforme per uso terapeutico e diagnostico[9].

Gli acidi nucleici possono adottare una moltitudine di strutture tridimensionali, grazie alle quali adempiono ai loro ruoli funzionali. Un particolare tipo di struttura è quella a quadrupla elica o quadruplex. Le sequenze di acidi nucleici ricche in guanina sono in grado di formare, infatti, strutture note con il nome di G-quadruplex, che sono composte da uno, due o quattro filamenti di DNA. L'unità di base è una struttura ciclica planare di quattro guanine, chiamata quartetto-G o tetraed-G, ognuna delle quali interagisce con le vicine mediante interazioni ad idrogeno di tipo Hoogsteen. La struttura G-quadruplex è stabilizzata dalla presenza di cationi monovalenti (generalmente Na<sup>+</sup> e K<sup>+</sup>), che si inseriscono nella cavità centrale formata tra due piani di tetradi. Le quadruplex possono adottare una grande varietà di topologie, che dipendono dalle diverse combinazioni di filamenti, dalle variazioni delle dimensioni e della sequenza dei *loop*, e dalla conformazione dei legami glicosidici (*syn* and *anti*)[10-12].

L'importanza delle strutture G-quadruplex è notevole anche perché questo motivo strutturale è presente in diversi aptameri di proteine, molte delle quali hanno un ruolo fondamentale in specifiche patologie. Una di queste proteine è la trombina, un enzima che gioca un ruolo importante nel processo di coagulazione in quanto svolge importanti funzioni sia procoagulanti che anticoagulanti [13-15]. La proteina, oltre alle sue azioni dirette sul sistema di coagulazione, ha altre funzioni come quella di potente agente chemiotattico per monociti e leucociti coinvolti in processi aterosclerotici e trombotici [16] e di potenziale mediatore pro-infiammatorio in traumi neurologici e malattie neurodegenerative [17]. La concentrazione di trombina nel sangue varia notevolmente: può essere quasi assente nel sangue di soggetti sani ma può raggiungere concentrazioni micromolari durante il processo di coagulazione associato a fenomeni tumorali o concentrazioni picomolari nei pazienti che soffrono di problemi di coagulazione. Per questo è molto importante sviluppare metodi sensibili e selettivi per il rilevamento della trombina. La proteina oltre al sito catalitico presenta due esositi, I e II, localizzati in regioni opposte sulla superficie esterna, che interagendo con diverse molecole permettono di modulare l'attività enzimatica. In particolare, l'esosito I lega il fibrinogeno mentre quello II viene riconosciuto dall'eparina. Tra i più promettenti inibitori della trombina vanno annoverati l'aptamero a 15 basi (TBA) che riconosce esosito I ( $K_d \sim 100 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ ) [18], e l'aptamero a 29 basi (HD22\_29mer) che si lega all'esosito II con una affinità ancora più elevata ( $K_d \sim 0.5 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ ) [19]. Dati strutturali sui complessi trombina-aptamero sono essenziali per comprendere il meccanismo di riconoscimento di TBA e HD22 e per progettare nuovi aptameri con migliori proprietà farmacologiche e diagnostiche. Noi abbiamo effettuato una caratterizzazione spettroscopica e cristallografica dei complessi della trombina con il TBA [20], con varianti del TBA [21] e con un mutante di HD22 a 27 basi (HD22-27mer). I risultati ottenuti hanno fornito una descrizione dettagliata del processo di riconoscimento tra la trombina ed i suoi aptameri. Inoltre, essi hanno permesso di definire l'effetto degli ioni sulla struttura, sulla flessibilità, e la capacità di inibizione dei diversi aptameri. Va, infine, sottolineato che il complesso tra trombina e HD22-27mer rappresenta il primo modello cristallografico di un aptamero a struttura mista duplex-quadruplex e ha evidenziato aspetti strutturali inattesi.

Gli aptameri studiati vengono usati in numerosi dispositivi per il rilevamento della trombina, che si differenziano per le tecniche di identificazione utilizzate quali fluorescenza, ICP-MS, SPR, SERS, etc. Le piattaforme di rilevamento di ultima generazione sfruttano l'utilizzo contemporaneo dei due aptameri, TBA ed HD22, con un notevole aumento della sensibilità e della specificità del legame con la trombina [21,22]. In questo contesto i dati strutturali ottenuti hanno fornito utili informazioni che permetteranno di migliorare ulteriormente l'efficienza di questi nanodispositivi.

1. Ellington, A.D. *et al.*, 1990, *Nature* 346, 818.
2. Cho, E. J *et al.* 2009, *Annu. Rev. Anal. Chem.* 2, 241.
3. Breaker, R. R., 2004, *Nature* 432, 838.
4. Iliuk, A. B., *et al.*, 2011, *Anal. Chem.* 83, 4440.
5. Song S., *et al.*, 2008, *Trends Anal Chem* 27, 108.
6. Liu J., *et al.*, 2009, *Chem. Rev* 109, 1948.
7. Chiu T.C., *et al.*, 2009. *Sensors* 9, 10356.
8. Chen T., *et al.*, 2011, 3, 546.
9. Zeyu X., *et al.*, 2012, *ACS Nano* 6, 3670.
10. Svozil, D., *et al.*, 2010, *J. Phys. Chem. B*, 114, 1191.
11. Gu, J.D. Leszczynski, J., 2000, *J. Phys. Chem. A*, 104, 6308.
12. Gu, J.D. and Leszczynski, J., 2002 *J. Phys. Chem. A*, 106, 529–532.
13. Fenton, J.W., 1981, *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 370, 468.
14. Shuman, M.A., 1986, *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 485, 228.
15. Shuman, M.A.; Majerus, P.W. J., 1976, *Clin. Invest.*, 58, 1249.
16. Becker, R.C.; Spencer, F.A., 1998, *J. Thrombosis Thrombolysis* 5, 215.
17. Suo, Z.; *et al.*, *Curr. Drug Targets et al.*, *Inflamm. Allergy* 2004, 3, 105.
18. Macaya J., *et al.*, 1993, *PNAS*, 90, 3745.
19. Tasset *et al.*, 1997, *JMB*, 272, 688.
20. Russo Krauss, I: *et al.*, 2012, *NAR*, 40, 8119.
21. Meneghello, A., *et al.*, 2012, *Microarrays*, 1, 95.
22. Camille, D., *et al.*, 2013, *Biosensors and Bioelectronics*, 40 186.

# IMPLEMENTAZIONE DI UN BIOSENSORE NANO STRUTTURATO MEDIANTE LA TECNICA PISA PER APPLICAZIONI CLINICHE E DIAGNOSTICHE

*Rosanna Spera<sup>1</sup>, Principia Dardano<sup>2</sup>, Ilaria Rea<sup>2</sup>*

<sup>1</sup> *Dipartimento di Medicina Sperimentale (DIMES), Università di Genova.*

<sup>2</sup> *Istituto per la Microelettronica e Microsistemi (IMM) del Consiglio Nazionale delle Ricerche (CNR) Unità di Napoli.*

La moderna ricerca biosensoristica è in grado di offrire alla medicina mezzi diagnostici innovativi per valutare, anche in fase precoce, la concentrazione di biomarcatori (BM) espressioni di varie patologie.

Il presente progetto si propone di realizzare un nano-biosensore che combini le proprietà di nanostrutture in silicio (NS), sensibili al cambio di indice di rifrazione, come il silicio poroso e i cristalli fotonici, impiegati come trasduttori, e un innovativo tipo array di proteine come elemento sensibile ai BM, fornendo uno strumento diagnostico multifunzione e versatile.

L'elemento sensibile sarà costituito da un array di proteine *cell-free* che sfrutti la tecnica PISA (*Protein In Situ Array*): le superfici delle NS saranno opportunamente funzionalizzate per garantire l'immobilizzazione di anticorpi specifici per un determinato *tag* (anti-*tag*). Prima dell'uso il biosensore verrà attivato aggiungendo sulla sua superficie il cDNA ingegnerizzato (corrispondente alla proteina da sintetizzare con l'aggiunta del *tag*) e il sistema di trascrizione e trasduzione *in vitro* (in genere un lisato cellulare umano); in tal modo la sintesi delle proteine avverrà *in situ*. Le proteine, espresse con l'opportuno *tag*, si ancoreranno alla superficie del silicio (mediante l'interazione tra *tag* e anti-*tag*) che potrà essere immediatamente utilizzato. I vantaggi offerti da questa tecnica sono notevoli, in termini di stabilità delle proteine (sintetizzate al momento dell'analisi mediante un sistema di espressione *cell-free* umano che ne garantisce il corretto *folding*), di tempo (si evita il lungo e laborioso processo di purificazione), e di disponibilità di campioni (utilizzando il cDNA come stampo si possono sintetizzare praticamente tutte le proteine desiderate). Selezionando opportunamente la proteina da sintetizzare e immobilizzare, quindi, è possibile realizzare un chip altamente specifico, utilizzabile in campo clinico e diagnostico, per la rivelazione di BM anche in concentrazioni bassissime. Ottimi risultati sono stati raggiunti in studi precedenti nei quali array di proteine *cell-free* sono stati realizzati su quarzi da nanogravimetria consentendo la realizzazione di un biosensore nanogravimetrico per applicazioni in campo biologico e clinico [Spera et al. 2013; Spera et al. 2012; Nicolini et al. 2012].

D'altro canto, il silicio poroso (SP) si è dimostrato un ottimo materiale per trasduttori ottici, in quanto la sua elevata area superficiale ( $100 - 500 \text{ m}^2/\text{cm}^3$ ) ne assicura una efficiente e rapida interazione con numerose specie sia chimiche (alcoli, aromatici, etc.) che biologiche (DNA, proteine, anticorpi). Il meccanismo di trasduzione si basa sulla variazione d'indice di rifrazione in seguito alla penetrazione del BM da analizzare all'interno dei nanopori. Nel caso di nanostrutture risonanti come specchi di Bragg o microcavità ottiche, costituite da strati di SP a diversa porosità, conseguenza della variazione d'indice di rifrazione è uno spostamento della frequenza di risonanza nello spettro ottico riflesso/trasmesso; questo tipo di *sensing* consente di raggiungere limiti di rilevabilità dell'ordine delle decine di ppb [Rea et al, 2009]. Recentemente, è stato, inoltre, dimostrato un effetto di risonanza in NS a cristallo fotonico in silicio ad indice di rifrazione negativo [Dardano et al., 2012].

In ogni caso, la superficie delle NS in silicio viene attivata da plasma ossigeno, donandogli legami ossidrili terminali (-OH), e successivamente silanizzata con un aminosilano, il 3-aminopropyltriethoxysilane (APTES). Questo reagente possiede sia tre gruppi etossilici terminali capaci di legarsi alla superficie di Si-OH che un terminale amminico (-NH<sub>2</sub>). Quest'ultimo è necessario a sua volta a legare proteine come gli anticorpi anti-tag.

Per il sensore proposto sarà realizzato un prototipo portatile, di basso peso e piccolo ingombro. Disponendo, poi, più sensori diversamente funzionalizzati in un *array* sarà possibile realizzare un multisensore.

Spera R., et al. (2013) Conductometric Monitoring Of Protein-Protein Interactions. *Accepted on Journal of Proteome Research*.

Spera R, et al. (2013). NAPPa Based Nanogravimetric Biosensor: Preliminary Characterization. *Sensors and Actuators. B, Chemical*, 182, 682–688.

Nicolini C.; Spera R., et.al. (2012) Prototypes of newly conceived inorganic and biological sensors for health and environmental applications. *Sensors (Basel)*, 12, (12), 17112-27.

Dardano P., et al., (2012) Ellipsometric determination of permittivity in a negative index photonic crystal metamaterial. *Light: Science & Applications* 1, e42.

Rea I., et al., A Porous Silicon based Bragg Grating Waveguide Sensor for Chemical Monitoring *Sensors and Actuators B: Chemical* 139 (2009) 39-43.

# **MICROFLUIDICA DIGITALE E NANOPARTICLE ENHANCED SURFACE PLASMON RESONANCE IMAGING PER LA RIVELAZIONE ULTRASENSIBILE DEL DNA E RNA**

*Giuseppe Spoto, Roberta D'Agata, Maria Chiara Giuffrida, Angela Aura, Marzia Calcagno  
INBB, Unità di Catania, c/o Dipartimento di Scienze Chimiche. Email: gspoto@unict.it*

## **Rivelazione di DNA genomico non amplificato mediante nanoparticle enhanced SPRI**

Lo sviluppo di nuovi metodi per la rivelazione di sequenze di DNA comporta la risoluzione di numerosi problemi. Infatti, molto spesso solo una piccola quantità di DNA è disponibile per l'analisi e quindi vengono richiesti sistemi di rivelazione aventi una adeguata sensibilità. Un tipico approccio di rivelazione richiede sia l'amplificazione mediante la reazione a catena della polimerasi (PCR) della sequenza target del DNA che l'introduzione di marcatori. Tali operazioni sono costose e possono dar luogo a contaminazione del campione. Di conseguenza, un'analisi rapida e affidabile del DNA è possibile sviluppando nuovi metodi che 1) non dipendano dalla PCR e 2) siano basati su protocolli di rivelazione esenti da marcatori. Entrambi questi requisiti possono essere soddisfatti utilizzando la surface plasmon resonance imaging (SPRI). La SPRI è una tecnica ottica utilizzata per monitorare le interazioni tra recettori immobilizzati su una superficie metallica ed analiti che vengono messi in contatto con la superficie del sensore. L'uso della SPRI per il saggio genomico è stato limitato dalla ridotta sensibilità nel rivelare campioni di RNA o DNA ibridizzati. Così, recentemente sono stati studiati approcci, che non richiedono marcatori e PCR, volti ad amplificare la risposta SPRI utilizzando nanoparticelle di oro colloidali (AuNPs).

La strategia da noi adottata per la rivelazione ultrasensibile del DNA è basata sull'uso di sonde di PNA (Peptide Nucleic Acid) in combinazione con l'amplificazione del segnale SPRI mediante le nanoparticelle. Gli esperimenti dimostrano che la combinazione della ultrasensibilità del metodo nanoparticle enhanced SPRI con l'elevata affinità e selettività del PNA consente una rivelazione diretta di mutazioni puntiformi nel DNA genomico non amplificato, anche a concentrazioni di 2.6 aM.

## **Biosensore basato sulla microfluidica digitale per la rivelazione del DNA**

Array di DNA possono essere ottenuti depositando per spotting le soluzioni dell'oligonucleotide sulla superficie solida. In questi casi, possono essere ottenuti spot di qualche centinaio di micron di diametro, in maniera semplice e veloce. Le sonde immobilizzate fanno sì che l'interazione target/sonda dipenda dalla diffusione passiva dei campioni di DNA verso le sonde di rilevazione, ma la limitata diffusione solido-liquido ostacola notevolmente la velocità di ibridazione. Inoltre, le

condizioni delle sonde di rivelazione, come ad esempio la densità di immobilizzazione casuale, l'ingombro elettrostatico e la lunghezza delle sonde di DNA sul substrato, possono interferire con l'esito dell'esperimento. In più, vengono normalmente richiesti anche delle fasi di lavaggio dopo il processo di ibridazione per rimuovere molecole legate in modo non specifico il con la superficie del sensore. E' quindi importante sviluppare saggi di analisi del DNA che siano automatizzati, più semplici, più veloci e più accurati. Inoltre questi dovrebbero comportare un basso consumo del campione e permettere l'analisi multiplex del DNA.

In questa prospettiva, interessanti risultati vengono ottenuti utilizzando sistemi microfluidici, in cui i reagenti liquidi vengono manipolati più facilmente e accuratamente. Poiché permettono la manipolazione di piccole quantità di liquidi e di sfruttare nuovi fenomeni derivanti da cambiamenti fisici su scala micrometrica, i dispositivi microfluidici sono inclini ad essere buoni sistemi per l'analisi del DNA. A differenza dei sistemi a flusso continuo, i sistemi microfluidici a goccia creano piccoli volumi utilizzando fluidi immiscibili. Nella configurazione più semplice, una soluzione acquosa fluisce in un fluido non acquoso immiscibile per formare goccioline dell'ordine dei nanolitri/picolitri. I reagenti sono confinati nelle goccioline e ogni goccia è isolata dalle pareti del canale dal liquido immiscibile, riducendo notevolmente la contaminazione del campione ed eliminando i problemi di dispersione dei reagenti. Inoltre, ogni gocciolina può essere considerata come un microreattore isolato e ogni microreattore può essere controllato e analizzato singolarmente. Ciò consente l'elaborazione (processing) parallela, un rendimento maggiore e un minore consumo di campione rispetto ai sistemi a flusso continuo.

Nel nostro gruppo è stato dimostrato che l'uso combinato della microfluidica a goccia, di PNA molecular beacons e della microscopia a fluorescenza, è utile per la rivelazione selettiva e sensibile del DNA, utilizzando volumi di campione nel range 100-500 nL e un protocollo di rivelazione veloce, economico e accurato, capace di rivelare  $10^{-14}$ - $10^{-15}$  moli di campioni di DNA.

#### **Lavori selezionati**

-R. D'Agata, G. Spoto, **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, 2013, 405 (2-3), 573.

G. Spoto, M. Minunni **The Journal of Physical Chemistry Letters**, 2012, 3, 2682.

- L.M. Zanoli, G. Spoto **Biosensors** 2013, 3, 18.

- L.M. Zanoli et al. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, 2013, 405(2-3) 615.

- R. D'Agata et al. **Analytical Chemistry**, 2011 83(22), 8711.

- L.M. Zanoli, R. D'Agata, G. Spoto **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, 2012 402, 1759.

- R. D'Agata et al. **Biosensors & Bioelectronics**, 2010, 25, 2095–2100.

G. Spoto, R. Corradini (Eds.) **Detection of Non Amplified Genomic DNA**, Springer-Verlag, 2012 (ISBN 978-94-007-1225-6).

# MICROBOLLE: UN AGENTE DI CONTRASTO PER IMAGING MULTIMODALE E TERANOSTICA

*G. Paradossi, E. Chiessi*

*Dipartimento di Scienze e Tecnologie Chimiche*

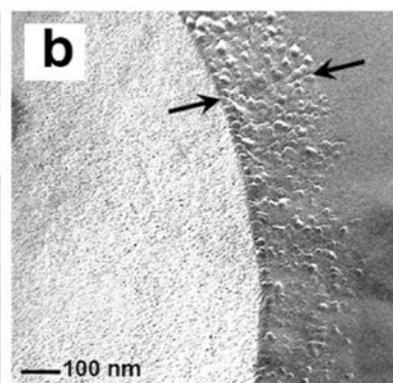
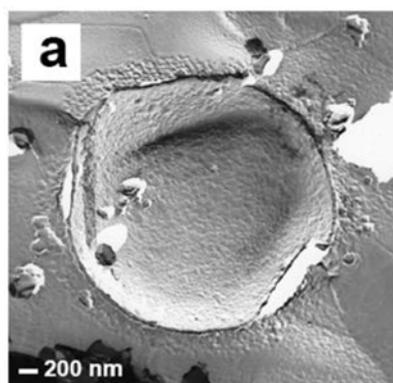
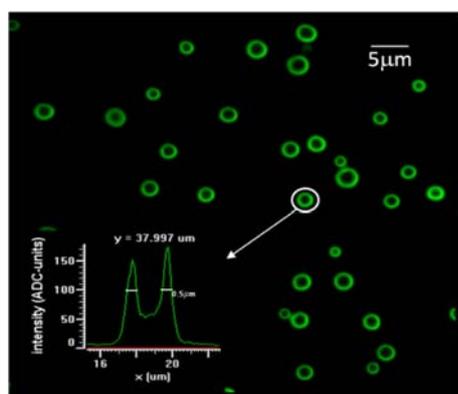
*Laboratorio di Chimica Fisica delle Macromolecole, Università di Roma Tor Vergata.*

*Via della Ricerca Scientifica, 00133 Roma, Italia.*

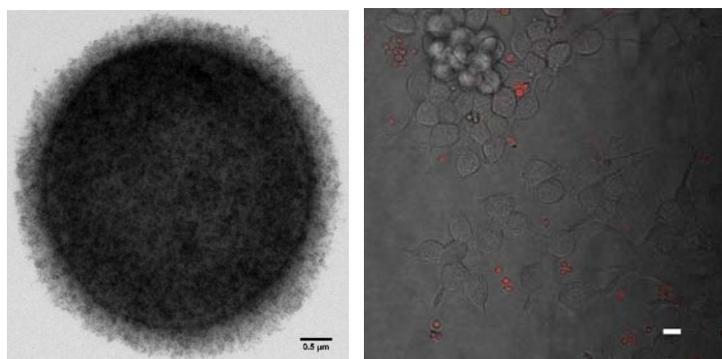
*paradossi@stc.uniroma2.it      web page: <http://www.stc.uniroma2.it/cfmacro/cfmacroindex.htm>*

Le recenti esigenze della medicina personalizzata pongono nuove e più complesse questioni da affrontare nella progettazione di micro/nano dispositivi. Gli approcci della *Soft Matter* sono comunemente adottati per la fabbricazione di tali dispositivi, poiché la maggioranza di essi sono a base di idrogel polimerici ed hanno una composizione ibrida. La formulazione di agenti per accrescere il contrasto nell'imaging molecolare è uno dei campi della nanomedicina in più rapida evoluzione ed il presente contributo evidenzia alcuni risultati ottenuti in questo ambito, con approcci sperimentali e computazionali, dal gruppo di Chimica Fisica delle Macromolecole dell'Università di Roma Tor Vergata.

La ricerca di un agente di contrasto multimodale in grado di supportare diversi tipi di imaging ci ha condotto alla formulazione di microbolle polimeriche aventi diverse interessanti proprietà, che sono state sondate negli anni recenti nell'ambito dei due successivi Progetti Europei "SIGHT" e "3MICRON". Le microbolle sono microparticelle che racchiudono un nucleo di aria in un guscio formato da un reticolo di alcool polivinilico, PVA, contenente circa il 70% in peso di acqua. Il loro diametro e spessore medio sono, rispettivamente, 3 e 0.3 micron. Questo microdispositivo è biocompatibile e mostra una buona capacità ecogenica agli ultrasuoni. Inoltre, la notevole versatilità chimica del PVA è una risorsa per successive modificazioni del guscio. In questo modo diventa possibile la marcatura con sonde di fluorescenza e la veicolazione mediante anticorpi. La micrografia confocale delle microbolle marcate con fluoresceina, in Figura 1, mostra le dimensioni del piano equatoriale. La Figura 2 riporta la micrografia elettronica della sezione di una microbolla dopo congelamento.



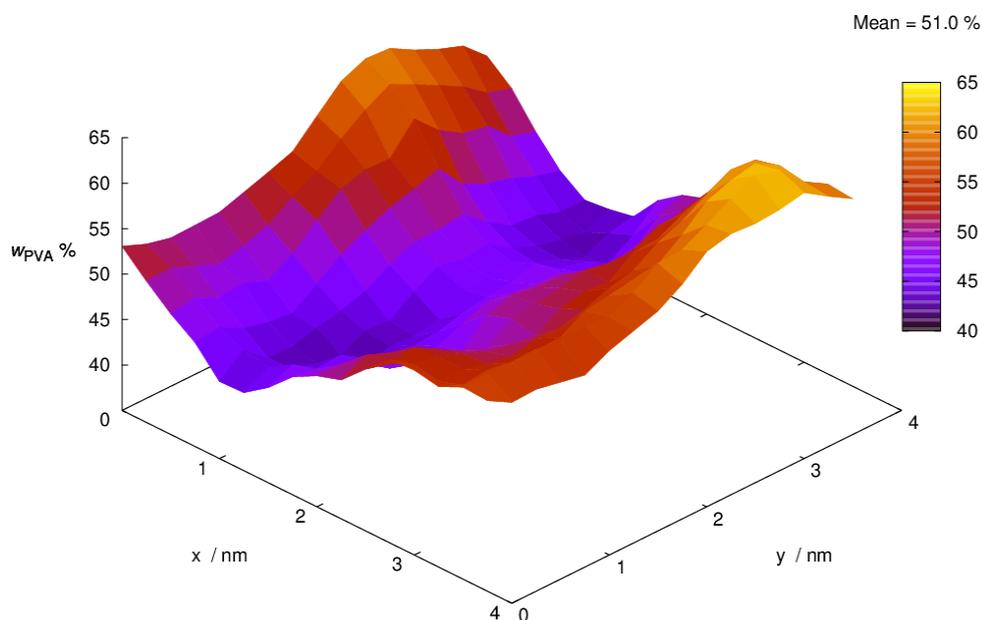
Il guscio può essere decorato con nanoparticelle super-paramagnetiche di ossido di ferro per imaging in Risonanza Magnetica (Figura 3). Un esempio di veicolazione delle microbolle verso cellule endoteliali bersaglio è mostrato in Figura 4.



**Figura 3 (sinistra).** Immagine TEM di una microbolla decorata con nanoparticelle di magnetite.

**Figura 4 (destra).** Immagine di microscopia in trasmissione/confocale di cellule endoteliali incubate con

Le microbolle di PVA hanno un'eccezionale stabilità, preservando il nucleo gassoso anche per anni. Tale caratteristica è dovuta alla natura dell'interfaccia tra il guscio e l'aria all'interno della microparticella. Per studiare questa interfaccia da un punto di vista molecolare, sono in corso simulazioni di dinamica molecolare su tempi scala delle centinaia di nanosecondi. Risultati preliminari indicano che il PVA si dispone all'interfaccia orientando i gruppi ossidrilici verso l'interno e formando sulla superficie dei pori accessibili all'acqua, con tempi di vita di alcuni nanosecondi.



**Figura 5.** Mappa di densità del PVA all'interfaccia film/vuoto, ottenuta dalla simulazione di un film costituito da PVA e acqua al 25 % in peso di PVA. Media calcolata su 55 nanosecondi di traiettoria, a 293 K.

### Riferimenti bibliografici.

G. Paradossi et al. "Multimodality imaging using SPECT/CT and MRI and ligand functionalized  $^{99m}\text{Tc}$ -labeled magnetic microbubbles " *European Journal of Nuclear Medicine and Medical Imaging Research*, 3, 1-14. (2013). G. Paradossi et al. "Magnetite Nanoparticles Can Be Coupled to Microbubbles to Support Multimodal Imaging" *Biomacromolecules*, 13 (5), 1390–1399 (2012).

## **CAPSULE POLIELETTROLITICHE NANOINGEGNERIZZATE PER IL RILASCIO MIRATO E CONTROLLATO DI FARMACI**

*Laura Pastorino, Carmelina Ruggiero*

*Dipartimento di Informatica, Bioingegneria, Robotica e Ingegneria dei Sistemi - Università degli Studi di Genova*

L'attività di ricerca del gruppo si concentra sull'impiego di metodologie e tecnologie proprie delle bionanotecnologie per la progettazione e l'ingegnerizzazione di materiali e di processi per applicazioni nel campo della salute.

In quest'ambito rientra la progettazione e l'ingegnerizzazione di sistemi per il rilascio controllato e mirato di molecole per applicazioni in campo farmaceutico e nutraceutico. L'attività di ricerca è pertanto volta allo sviluppo di formulazioni innovative, progettate a livello nanometrico, per consentire il rilascio del farmaco nell'area dell'organismo da trattare. Negli ultimi anni, si è assistito ad un progressivo aumento dell'interesse nei riguardi di formulazioni farmaceutiche innovative, in grado di garantire il controllo del profilo e del tempo di rilascio delle molecole di farmaco e in grado di raggiungere in modo selettivo determinate zone dell'organismo. L'approccio seguito nell'ambito di tale attività di ricerca consiste nell'applicazione della tecnica di autoassemblaggio elettrostatico per la fabbricazione di nano/micro-capsule polimeriche che siano anche biocompatibili e biodegradabili. Tali sistemi possono essere idealmente progettati per raggiungere, tramite campo magnetico esterno, e per riconoscere in modo mirato, a seguito di un attacco di tipo recettore/ligando, le cellule bersaglio [1, 2]. Una volta riconosciute le cellule bersaglio, il rilascio delle molecole farmacologiche, intrappolate all'interno della capsula, può essere comandato tramite uno stimolo esterno o uno dipendente dalla patologia da trattare [3, 4]. Nel primo caso, le capsule devono essere progettate per interagire con l'esterno, ad esempio la loro parete deve contenere molecole sensibili alla radiazione luminosa che ne provoca quindi la variazione della permeabilità della parete se illuminate ad una determinata lunghezza d'onda. Nel secondo caso invece le capsule devono essere progettate per variare la permeabilità della loro parete a seguito della fisiologia propria del tessuto e/o delle cellule da trattare. Ad esempio la variazione di permeabilità può essere associata alla presenza di determinate proteine caratteristiche della patologia in studio. In quest'ambito, l'attività futura sarà concentrato su tre aspetti fondamentali di tali sistemi:

1. Fabbricazione di capsule aventi dimensioni nell'intorno dei 200 nm
2. Fabbricazione di capsule biocompatibili e biodegradabili
3. Progettazione di sistemi innovativi per il rilascio controllato

Nell'ambito della progettazione e della fabbricazione di materiali per la salute, rientra anche l'attività relativa alla progettazione e fabbricazione di materiali e superfici innovative in grado di migliorare la risposta e l'interazione cellulare per applicazioni all'ingegneria dei tessuti [5, 6]. In particolare i materiali in studio sono materiali polimerici, ceramici e hydrogels di cui vengono modificate le proprietà superficiali tramite funzionalizzazione con biomolecole o le proprietà chimico-meccaniche tramite drogaggio con nanoparticelle organiche ed inorganiche. Le tecniche di funzionalizzazione utilizzate sono: self assembled monolayers, langmuir Blodgett films e Layer-by-Layer self assembly.

1. N. Habibi, L. Pastorino, F. Caneva Soumetz, F. Sbrana, R. Raiteri and C. Ruggiero. (2011) Nanoengineered Polymeric S-layers Based Capsules with Targeting Activity, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, *Colloids Surf B Biointerfaces* 88, pp.366-372.
2. N. Habibi, L. Pastorino, O.H. Sandoval, C. Ruggiero (2013). Polyelectrolyte based molecular carriers: The role of self-assembled proteins in permeability properties. *Biomater Appl.* in press.
3. L. Pastorino, S. Erokhina, F. Caneva Soumetz, P. Bianchini, O. Konovalov, A. Diaspro, C. Ruggiero, V. Erokhin. (2011). Collagen containing microcapsules: Smart containers for disease controlled therapy, *Journal of Colloid and Interface Science* 357, pp. 56-62.
4. S. Erokhina, O. Konovalov, P. Bianchini, A. Diaspro, C. Ruggiero, V Erokhin, L. Pastorino (2013). Release kinetics of gold nanoparticles from collagen microcapsules by total reflection X-ray fluorescence. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*. 417, pp 83-88.
5. F. Caneva Soumetz, J. F. Saenz, L. Pastorino, C. Ruggiero, D. Nosi, and R. Raiteri, "Investigation of Integrin Expression on the Surface of Osteoblast-like Cells by Atomic Force Microscopy", *Ultramicroscopy*, vol 110, pp. 330-338, 2010.
6. M. Salerno, F. Caneva Soumetz, L. Pastorino, N. Patra, A. Diaspro, C. Ruggiero (2013). Adhesion and Proliferation of Osteoblast-like Cells on Anodic Porous Alumina Substrates with Different Morphology, *IEEE Transactions on NanoBioscience*, 12, pp. 106-111.



## CONCLUSIONI

### *Ruolo dei materiali nella medicina traslazionale*

L'Ingegneria dei Tessuti e la Nanomedicina sono tecnologie molto promettenti nel campo della medicina rigenerativa e della terapia e diagnostica medica. Entrambe si fondano sulla applicazione di materiali nanostrutturati progettati per dirigere e guidare complessi processi biologici quali, ad esempio, differenziamento cellulare, riparo di tessuti, riconoscimento specifico di tessuti e cellule, controllo e correzione della espressione genica. Il controllo di questi eventi biologici è fondamentale per curare malattie o per riparare i tessuti danneggiati, come le ossa, i muscoli o i nervi e richiede interventi su scala molecolare o cellulare. L'utilizzo delle nanotecnologie per la realizzazione di materiali capaci di presentare cascate di segnali coordinate nello spazio e nel tempo apre alla possibilità concreta di indirizzare in maniera deterministica i complessi processi biologici. L'ottenimento di quest'ambizioso traguardo richiede necessariamente un cambio di paradigma nella cultura della progettazione dei nuovi biomateriali. Ovvero i materiali dovranno essere progettati in modo da 'contenere' o 'integrare' logiche della biologia e quindi raggiungere un livello evolutivo quasi organico. Trasferire informazioni o dare specifici indirizzi a cellule, intercettare una specifica cellula in un tessuto, individuare selettivamente una biomolecola sono funzioni integrabili in un materiale sintetico soltanto se si comprendono pienamente i meccanismi che regolano i complessi processi biologici. Lo sforzo delle organizzazioni di ricerca deve essere concentrato sullo sviluppo delle integrazioni delle conoscenze tra le scienze biologiche, fisiche e chimiche con gli strumenti ingegneristici e tecnologici. La formazione di laboratori multidisciplinari il costante confronto e osmosi tra le culture scientifiche e la pratica clinica è il terreno necessario per la realizzazione dei materiali biomedici di nuova generazione indispensabili per compimento della rivoluzione terapeutica e diagnostica che l'ingegneria dei tessuti e la nanomedicina promettono.

*Prof. Luigi Nicolais*

*Presidente CNR*