

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PARMA

DIPARTIMENTO DI BIOSCIENZE

DOTTORATO DI RICERCA IN BIOTECNOLOGIE

CICLO XXVIII

**Nanotossicologia dei *quantum dot* di
CdS in linee cellulari umane**

Coordinatore:

Chiar.mo Prof. Nelson Marmiroli

Tutor:

Chiar.mo Prof. Nelson Marmiroli

Co-Tutor:

Prof.ssa Annamaria Buschini

Prof.ssa Marta Marmiroli

Dottoranda:

Dott.ssa Laura Paesano

Indice

1. Introduzione	3
Nanotecnologie.....	4
Nanomateriali	5
Proprietà chimico-fisiche	7
Sintesi dei nanomateriali	9
Classificazione dei nanomateriali.....	10
Applicazioni	12
<i>Quantum dot</i> e <i>quantum dot</i> di cadmio solfuro (CdS QD).....	16
Applicazioni	16
Valutazione del rischio tossicologico.....	17
Nanotossicologia	18
Meccanismi di nano-tossicità	20
Principali meccanismi cellulari di risposta ai nanomateriali	24
Tossicità dei nanomateriali.....	28
Tossicità dei CdS QD	29
Linee cellulari umane come modello per gli studi di tossicità <i>in vitro</i>	30
Tossicità del cadmio	31
2. Scopo del lavoro.....	34
3. Materiali e metodi	36
<i>Quantum dot</i> di cadmio solfuro.....	37
Coltura cellulare	37
Internalizzazione di CdS QD.....	38
Citotossicità.....	39
Analisi di espressione genica	40
Estrazione RNA	40
Retrotrascrizione	41
Real Time - PCR: analisi di espressione mediante <i>TaqMan</i> [®] <i>custom Array Plates</i>	41
Real Time PCR: analisi di espressione mediante chimica <i>SYBR</i> [®] <i>Green</i>	48
Analisi dei dati.....	52
Determinazione della presenza di danno al DNA	53
Saggi per la valutazione dello stress ossidativo	54
Determinazione della formazione di specie reattive dell'ossigeno	54
Determinazione dei livelli di glutatione intracellulare	55
Determinazione dei livelli di ossido nitrico intracellulare.....	57
Saggio per la determinazione dell'integrità mitocondriale	58
Depolarizzazione della membrana mitocondriale	59

Determinazione del numero di copie del mtDNA	59
Analisi statistica	60
4. Risultati	62
Internalizzazione di CdS QD.....	63
Citotossicità.....	65
Analisi di espressione genica	67
Determinazione di danno al DNA	73
Saggi per la valutazione dello stress ossidativo	74
Saggio per la determinazione dell'integrità mitocondriale	77
5. Discussione.....	79
6. Conclusioni	85
Bibliografia	87
Appendice.....	98

RIASSUNTO

Le nanotecnologie sono un settore emergente in rapida crescita, come dimostra l'esplosione del mercato dei prodotti ad esso collegati. I *quantum dot* di cadmio solfuro (CdS QD) sono ampiamente utilizzati per la produzione di materiali semiconduttori e dispositivi optoelettronici; tuttavia, non sono ancora completamente chiari gli effetti di questi nanomateriali sulla salute umana. Questo lavoro di dottorato si pone l'obiettivo di definire il potenziale citotossico e genotossico dei CdS QD in linee cellulari umane e definirne il meccanismo implicato. A questo scopo, essendo il fegato uno dei principali organi di accumulo del cadmio e dei nanomateriali a base di cadmio, è stata utilizzata la linea cellulare HepG2 derivante da un epatocarcinoma umano. È stato evidenziato, in seguito all'assorbimento a livello cellulare dei CdS QD, un effetto citotossico, con conseguente modulazione dell'espressione genica di una serie di geni coinvolti sia nei processi di *rescue* (autofagia, risposta allo stress) sia in quelli di morte cellulare programmata. È stato, inoltre, dimostrata l'assenza di un rilevante effetto genotossico dipendente da questi nanomateriali. Infine, è stato osservato che cellule esposte ai CdS QD presentano mitocondri con un potenziale di membrana alterato, con conseguente alterazione della funzionalità di tale organello, pur conservando l'integrità del DNA mitocondriale.

Abstract

Nanotechnology is a rapidly growing field with many products manufactured and distributed in a wide and diverse range of industrial and technological applications. Cadmium sulfide quantum dots (CdS QDs) are widely used in the electric and electronic industries to produce semiconductor structures, solar energy and optoelectronic devices. However, the mechanism of interactions of these nanomaterials with living organisms have not been thoroughly evaluated. This study, on the effects of CdS QDs in HepG2 cells, has produced precious novel information regarding their potential action including their toxicity. CdS QDs internalization in HepG2 cells was led to a decrease in cell viability. The uptake was followed by the modulation of several key genes involved in the programmed cell death (PCD) pathways and in rescue pathways (i.e. autophagy, ROS clearance, oxidative stress response) leading to hypothesize a dual role for CdS QDs interaction. At low toxic dose, CdS QDs may trigger a cellular response which leads to a damage rescue and an early establishment of the apoptotic-like PCD pathway. This study demonstrated also that CdS QDs induced loss of mitochondrial function, but without a substantial damage of mitochondrial DNA.

Elenco delle abbreviazioni

CdS QD	<i>quantum dot</i> di cadmio solfuro
Ct	ciclo soglia
Cyt c	citocromo c
CTR	cellule non trattate
DCF	2,7-diclorofluoresceina
DCFH-DA	2,7-diclorofluoresceina diacetato
DMEM	<i>Dulbecco Modified Eagles's Medium</i>
dNTP	deossinucleotidi trifosfato
DTNB	acido 5,5'-ditio -bis -(2-nitrobenzoico)
EDTA	acido etilendiamminotetracetico
FS	<i>foward scatter</i>
GSH	glutazione ridotto
GSSG	glutazione ossidato
MOMP	permeabilizzazione della membrana mitocondriale
mtDNA	DNA mitocondriale
MTS	<i>3 - (4,5-dimethylthiazol-2-yl) - 5 - (3-carboxymethoxyphenyl) - 2 - (4-sulfophenyl) - 2H - tetrazolium</i>
MWCNT	<i>multi-walled carbon nanotube</i>
NADH	nicotinamide adenina dinucleotide
NADPH	nicotinamide adenina dinucleotide fosfato
NM	nanomateriale
NO	ossido nitrico
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
PCD	morte cellulare programmata
QD	<i>quantum dot</i>
RNS	specie reattive dell'azoto
ROS	specie reattive dell'ossigeno
RQ	<i>fold-expression change</i>
SEM	errore standard della media
SS	<i>side scatter</i>
SWCNT	<i>single-walled carbon nanotube</i>
TI%	<i>tail intensity percent</i>
TNB	acido 5-tio-2-nitrobenzoico

1. Introduzione

Nanotecnologie

Le nanotecnologie sono l'insieme dei metodi e delle tecniche per assemblare e modificare i materiali a livello atomico e molecolare; richiedono un approccio multidisciplinare permettendo la realizzazione di materiali, dispositivi e sistemi con dimensioni nanometriche. Sono un settore in rapida crescita, come è dimostrato dal continuo aumento dei prodotti ad esse correlate e dalle numerose applicazioni nei diversi ambiti industriali e tecnologici (Maynard et al., 2006).

La prima idea di nanotecnologia è stata introdotta nel 1959, quando il fisico americano e futuro premio Nobel, Richard Feynman, intuì la possibilità di manipolare la materia su scala atomica e molecolare, e le immense potenzialità che da ciò potessero derivare (Feynman, 1960). Infatti durante un suo, ormai, celebre seminario, "*There's plenty of room at the bottom*", gettò i semi per questo nuovo settore scientifico e tecnologico, suggerendo la possibilità di realizzare strumenti dalle dimensioni nanometriche attraverso la manipolazione di singoli atomi o di molecole. Egli, inoltre, suggerì come queste nuove tecnologie potessero essere utilizzate per creare strutture ancora più piccole.

Il termine "nanotecnologia" fu coniato solo qualche decennio dopo, nel 1974, da Norio Taniguchi che, in un suo lavoro, la definì come la capacità di processare, separare, deformare la materia lavorando su scala atomica o molecolare. Tuttavia le nanotecnologie non si svilupparono prima degli anni ottanta, quando Drexler espanse l'idea di Feynman descrivendo un approccio di ingegneria molecolare (Drexler, 1987, 1981). Drexler propose una visione molecolare della materia, definendo così un nuovo settore scientifico, quello delle nanotecnologie, che, da quel momento in poi, si svilupperà unendo la ricerca propria di diverse discipline, come la chimica, la scienza della materia, la medicina, la tossicologia, l'ecotossicologia, la biologia molecolare e l'ingegneria molecolare. Nel suo libro, "*Engines of creation. The coming era of nanotechnology*", definì la capacità di porre ogni atomo dove si voglia che esso stia come nanotecnologia, poiché si opera a livello del nanometro, un milionesimo di metro. Da questo momento in poi le nanotecnologie presero il volo, grazie anche allo sviluppo di microscopi sofisticati (*Microscopio a Scansione a effetto Tunnel*, STM, *Microscopio a Forza Atomica*, AFM, ecc.), che permisero l'osservazione della materia su scala atomica. Un significativo incremento nella popolarità delle nanotecnologie e nello sviluppo di diversi nanomateriali si è registrato a partire dagli anni novanta, portando ai risultati noti ai nostri giorni.

Le nanotecnologie promettono vantaggi sia industriali che economici in diversi settori che vanno da quello medico, cosmetico e alimentare a quello energetico, elettronico e tessile.

Nanomateriali

I nanomateriali sono il fondamento delle nanotecnologie. Sono definiti come particolari strutture di differente composizione chimica che presentino almeno una dimensione inferiore ai 100 nm (Fig. 1.1).

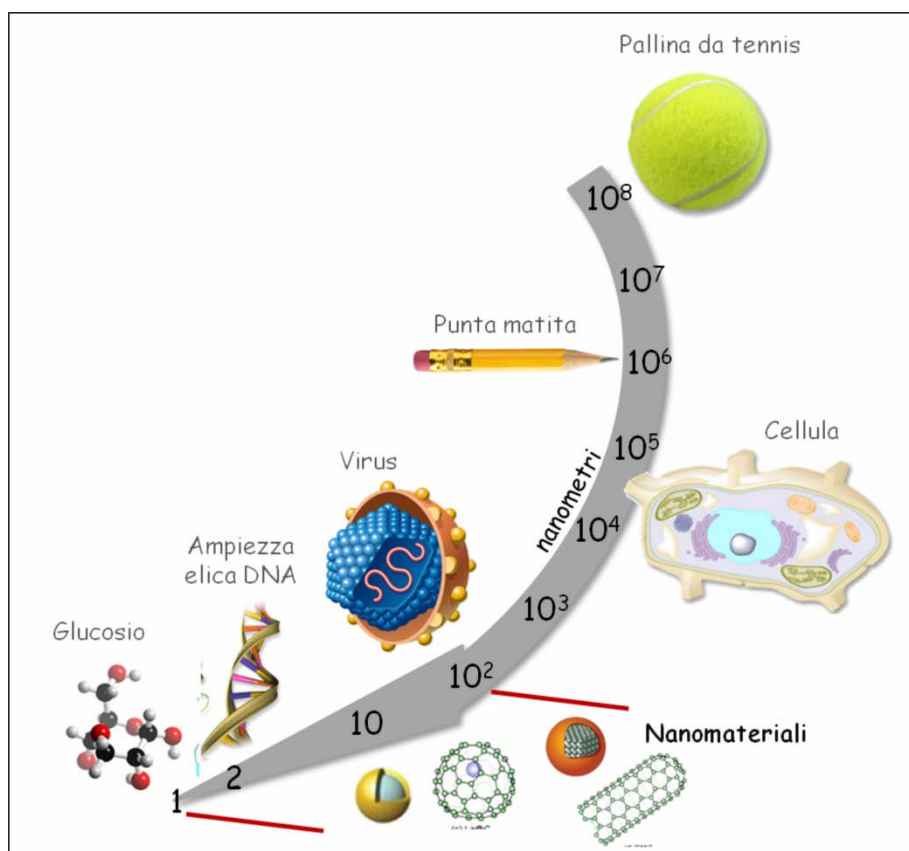


Figura 1.1 Scala nanometrica che mostra i nanomateriali comparati ai componenti biologici e a materiali di dimensioni non nanometriche.

Le diverse organizzazioni esistenti, internazionali e non, hanno sviluppato definizioni specifiche per definire i nanomateriali principalmente sulla base delle loro dimensioni. In particolare, l'Organizzazione Internazionale per la Standardizzazione (ISO) definisce i nanomateriali come materiali con una dimensione esterna nanometrica o con una struttura nanometrica interna o superficiale; intendendo con il termine nanometrica una grandezza compresa approssimativamente tra 1 e 100 nm (<http://cdb.iso.org>). L'Organizzazione per la Cooperazione e lo Sviluppo Economico (OECD), invece, li descrive come sostanze chimiche

che possono essere o nano-oggetti o nano-strutturati. A sua volta, definisce i nano-oggetti costituiti da una, due o tre dimensioni nanometriche e i nano-strutturati come aventi una struttura interna o superficiale nanometrica (Fig. 1.2). All'interno dell'Unione Europea, la

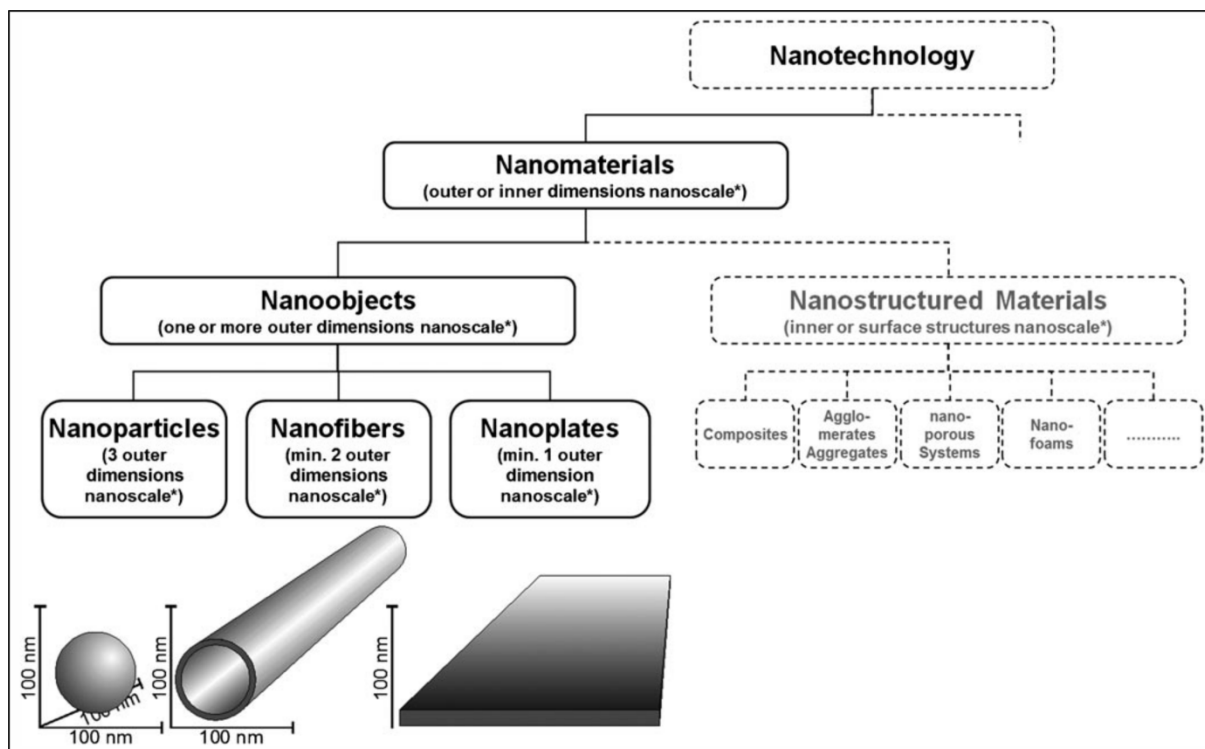


Figura 1.2 Definizione di nanomateriale. Tratto da Krug & Wick (2011).

Commissione ha emanato una Raccomandazione, nell'ottobre del 2011, nella quale definisce un nanomateriale come un "materiale naturale, derivato o fabbricato contenente particelle allo stato libero, aggregato o agglomerato, e in cui una o più dimensioni esterne siano comprese tra 1 e 100 nm" (2011/696/UE).

Nonostante si tratti di definizioni leggermente differenti tra loro, in tutti i casi i nanomateriali vengono confinati in un dominio dimensionale ben definito, equivalente a quello del particolato ultrafine, e collocato all'interno di quello proprio dell'insieme dei colloidali (Fig. 1.3) (Christian et al., 2008). Ricordiamo che per colloidale (o sistema colloidale) si intende, generalmente, un sistema a due fasi: una costituita da una sostanza di dimensioni microscopiche (diametro da 1 nm a 1 μm) e una fase continua disperdente. Si tratta, dunque, di sistemi eterogenei, caratterizzati da una tensione di vapore e pressione osmotica non regolari.

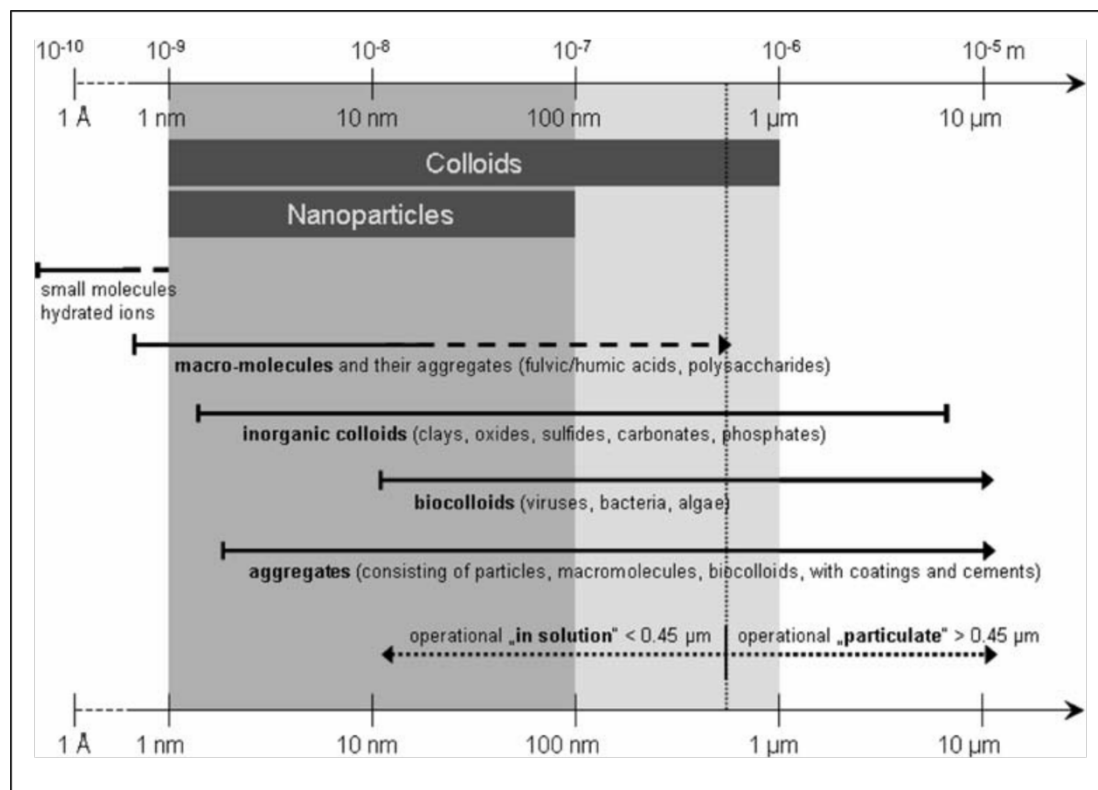


Figura 1.3 Dominio dimensionale dei colloidi e delle nanoparticelle, con esempi di alcuni colloidi naturali. Tratto da Christian et al. (2008).

La definizione di nanomateriale come sotto-frazione dei colloidi è fondamentale per capirne appieno le peculiari proprietà chimico-fisiche. È importante, infatti, sottolineare che la dimensione dei nanomateriali è la loro principale caratteristica, che li rende completamente differenti dai corrispondenti materiali di dimensioni maggiori.

Proprietà chimico-fisiche

I nanomateriali, come più volte evidenziato, sono caratterizzati da peculiari proprietà chimico-fisiche che sono da attribuire alle loro piccole dimensioni (area di superficie e distribuzione della dimensione), composizione chimica (purezza, cristallinità, proprietà elettroniche, ecc.), struttura superficiale (reattività di superficie, gruppi esposti sulla superficie, rivestimento inorganico o organico, ecc.), solubilità, forma e aggregazione (Nel et al., 2006). Tali proprietà sono descrivibili combinando insieme leggi proprie della fisica classica con quelle della fisica moderna.

Come già detto precedentemente, la caratteristica principale dei nanomateriali è la loro dimensione, che è responsabile delle differenti proprietà fisico-chimiche rispetto al

corrispondente materiale "macro". Al diminuire del diametro, aumenterà il rapporto area di superficie/volume e l'aumento dell'area di superficie sarà accompagnata da un aumento della reattività chimica (Fig. 1.4). Il risultato di ciò è che materiali preparati sottoforma di nanomateriali potrebbero presentare una maggiore attività in processi catalitici rispetto al corrispondente materiale di dimensioni non nanometriche (*bulk*) (Yoo, 1998). Ad esempio, un materiale considerato normalmente un pessimo catalizzatore, come l'oro, presenta ottime proprietà catalitiche se formulato con dimensioni nanometriche (Sau et al., 2001). L'elevato rapporto area di superficie/volume è, quindi, responsabile di alcune peculiari proprietà dei nanomateriali (come nuova reattività chimica e nuove proprietà ottiche, magnetiche, catalitiche ed elettrochimiche).

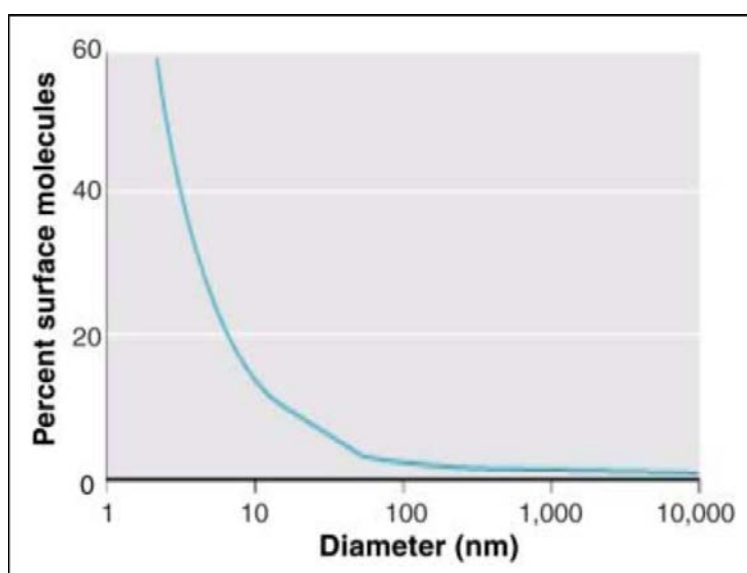


Figura 1.4 Relazione inversa tra dimensioni delle particelle e numero di molecole esposte sulla superficie. Tratto da Nel et al. (2006).

I nanomateriali, inoltre, sono caratterizzati da un'elevata energia superficiale che conferisce loro un'elevata capacità di agglomerazione e, di conseguenza, la tendenza a precipitare quando presenti in soluzione (Christian et al., 2008). Il grado di aggregazione in un mezzo acquoso dipenderà dalla frequenza di collisione particella-particella, dall'energia della collisione e dalle proprietà attrattive-repulsive delle particelle implicate. Dopo l'iniziale collisione, le particelle possono formare *cluster* o aggregati di *cluster* (le forze implicate nella collisione includono la repulsione di Borne e attrazione di van der Waals), a causa dell'elevata energia superficiale che li caratterizza, provocandone la precipitazione. Tale fenomeno ha pratiche implicazioni, poiché, nella maggior parte dei casi, i nanomateriali perdono le loro peculiari proprietà in seguito all'aggregazione. Per evitare la precipitazione in soluzione dei

nanomateriali molto spesso si cerca di stabilizzarle creando delle barriere tra le particelle stesse. Generalmente si cerca di ottenere una giusta combinazione tra cariche superficiali del materiale stesso e quelle degli ioni presenti nel solvente per creare repulsione tra i nanomateriali in sospensione (Christian et al., 2008).

Sintesi dei nanomateriali

Le strategie di sintesi e assemblaggio dei nanomateriali possono seguire un approccio *top-down* o un approccio *bottom-up* (Fig. 1.5). Quest'ultimo prevede la preparazione del nanomateriale desiderato tramite l'assemblaggio di singoli elementi nanometrici (*nano-building blocks*) basandosi su principi fisico-chimici di auto-organizzazione molecolare o atomica. Questo approccio permette, sfruttando il principio di supersaturazione, la sintesi di strutture più complesse a partire da atomi o molecole, controllando finemente le dimensioni, forme e intervalli di grandezza. L'approccio *top-down*, invece, si riferisce ai processi di produzione mediante tecnologia dei microsistemi, che prevede la generazione diretta del nanomateriale sfruttando metodologie fisiche come la fotolitografia, il processamento laser o tecniche meccaniche basate sull'attrito; quindi da un materiale grezzo saranno generati i singoli nanomateriali. Un approccio di questo tipo è utilizzato per la produzione di nanoparticelle metalliche; in questo caso, materiali tradizionali, come ossido di metalli, sono polverizzati all'interno di mulini a sfere ad alta energia (Raab et al., 2011).

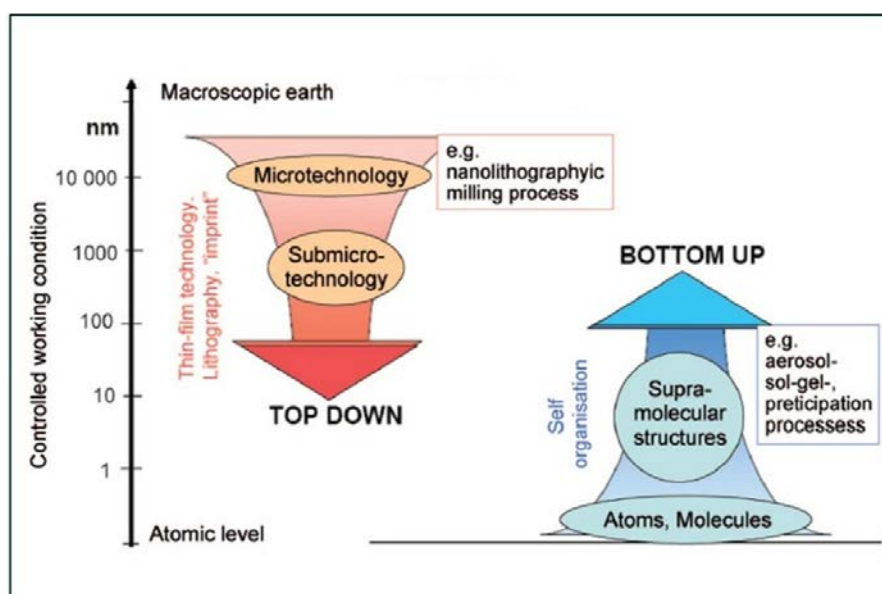


Figura 1.5 Tecniche per la sintesi di nanomateriali. Tratto da Raab et al. (2011).

La scelta dell'uno o dell'altro approccio dipende dalla composizione chimica e dalle specifiche caratteristiche del nanomateriale da sintetizzare. Solitamente, sono realizzati con un approccio *bottom-up* nanomateriali con un diametro compreso tra 1 e 10 nm e con una struttura cristallina o con una superficie derivatizzata (Murray et al., 1993; Saravanan et al., 2008). La sintesi in fase gassosa o di aerosol è più comunemente utilizzata a livello industriale per la produzione di nanomateriali sottoforma di polveri o *film*. Tale tecnica è basata su processi di evaporazione e condensazione (nucleazione e crescita) in ambiente inerte. Le nanoparticelle vengono sintetizzate vaporizzando il materiale di partenza mediante mezzi chimici o fisici. La produzione delle nanoparticelle iniziali, che può essere in stato liquido o solido, avviene tramite nucleazione omogenea. A seconda della strumentazione, la successiva crescita della particella può avvenire per condensazione (transizione dallo stato gassoso allo stato di aggregazione liquido), per reazione/i chimica sulla superficie della particella e/o per processi di coagulazione (adesione di due o più particelle). Esempi di nanomateriali sintetizzati con tecniche di questo tipo sono i nanotubi di carbonio e i fullereni.

L'utilizzo di uno o dell'altro approccio comporta risultati molto differenti in termini di densità, resistenza meccanica e proprietà magnetiche del prodotto finale. Tali risultati sono imputabili sia alle dimensioni dei nanomateriali, sia, in larga parte, al numero di atomi sulla superficie della particella.

Classificazione dei nanomateriali

In accordo con Stern & McNeil (2007), i nanomateriali possono essere classificati in due gruppi dipendenti dalla natura delle particelle: naturali o ingegnerizzati.

Tra i nanomateriali naturali distinguiamo quelli di origine geologica da quelli di origine biologica. I primi sono tipicamente nanomateriali inorganici e sono originati in seguito ai cambiamenti fisico-atmosferici, come abrasione o dissoluzione del materiale roccioso a polveri, all'attività vulcanica, alle attività geotermali/idrotermali e alla neoformazione nel suolo. Quelli di origine biologica, invece, sono generalmente molecole organiche, come proteine/peptidi, DNA/RNA, virus (Handy et al., 2008).

Per nanomateriali ingegnerizzati si intendono, invece, quei nanomateriali sintetizzati attraverso processi tecnologici. Questi, a loro volta, possono essere classificati, sulla base della loro natura chimica, in:

❖ nanomateriali a base di metalli

Possono essere costituiti da soli metalli, come i nanomateriali di oro (Au NM), argento (Ag NM) e ferro (Fe NM), o da ossidi di metalli, come i nanomateriali di ossido di titanio (TiO_2 NM), ossido di zinco (ZnO NM). Rientrano in questo gruppo anche una particolare tipologia di nanomateriali, i *quantum dot* (QD). Questi sono nanocristalli semiconduttori con peculiari proprietà ottiche ed elettroniche dipendenti esclusivamente dalle loro piccole dimensioni.

❖ nanomateriali a base di carbonio

Sono costituiti esclusivamente da atomi di carbonio e, a seconda della struttura che li caratterizza, si distinguono in:

- ◇ fullereni (Fig. 1.6), molecole composte da 60 - 70 - 80 atomi di carbonio comunemente di forma sferoidale. Aumentando il numero di atomi varierà la struttura della molecola e le proprietà fisico-chimiche.

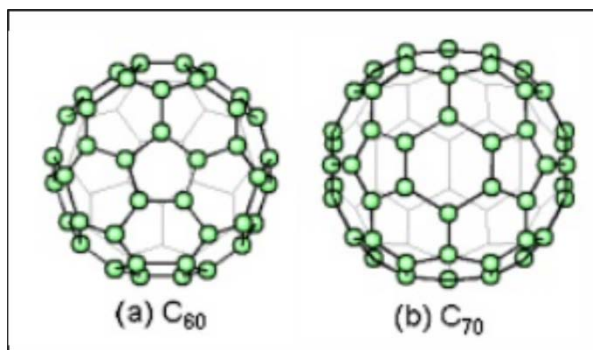


Figura 1.6 Esempi di fullerene costituiti da 60 (a) e 70 (b) atomi di carbonio

- ◇ nanotubi di carbonio (CNT; Fig. 1.7), molecole di forma tubolare di lunghezza e diametro variabili. Possono essere sintetizzate come singoli strati (*single-walled*, SWCNT) o come più strati concentrici (*multi-walled*, MWCNT).

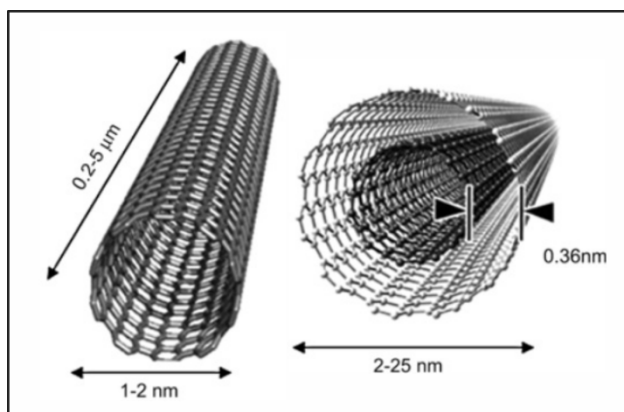


Figura 1.7 Esempi di nanotubi di carbonio. A sinistra un SWCNT e a destra un MWCNT

❖ nanomateriali con struttura ibrida

Nanomateriali metallici o a base di carbonio, che sono stati funzionalizzati o rivestiti esternamente in modo da aumentare l'affinità per un specifico target o per conferire nuove proprietà al nanomateriale stesso (es. conducibilità termica o elettrica).

Applicazioni

La quota di mercato mondiale dei prodotti derivanti dal settore delle nanotecnologie è stato valutato pari a 26 miliardi di euro nel 2014 e si prevede che possa raggiungere i 64 miliardi di euro entro il 2019 (BBCResearch, 2014). Le applicazioni dei nanomateriali sono innumerevoli e comprendono il settore medico, cosmetico ed elettronico (Fig. 1.8). Prodotti a base di nanomateriali possono essere utilizzati in prodotti igienici o di bellezza (ad esempio nei pannolini o creme solari), in prodotti per l'industria aerospaziale (come additivi per i propellenti dei razzi), in medicina e diagnostica e in prodotti per l'industria dei materiali. Questo ampio spettro di applicazioni è reso possibile grazie alle peculiari proprietà fisico-chimico che caratterizzano i nanomateriali.



Figura 1.8 Esempi di prodotti commerciali a base di nanomateriali. Tratto da Maynard et al. (2006).

Nanomateriali di ossidi di metallo sono molto utilizzati nel settore chimico, della scienza dei materiali e delle scienze biologiche. Ad esempio, il TiO_2 NM trova impiego nella catalisi chimica, il SiO_2 NM nei filler dentali e il CeO_2 NM come additivo nei carburanti. I Au NM e Ag NM, date le loro proprietà ottiche, elettroniche, magnetiche e la loro stabilità chimica, trovano applicazione in ambito medico come agenti di contrasto; inoltre, i Ag NM sono spesso utilizzati per la loro proprietà antibatterica (interferiscono con la trascrizione del DNA e bloccano la respirazione cellulare). Sono stati, ad esempio, realizzati cerotti protettivi contenenti nanoparticelle di argento per curare le ferite provocate da ustioni. TiO_2 NM sono anche utilizzati per formulare creme solari, che bloccano tutti i raggi UV restando completamente trasparenti alla luce visibile. I nanotubi sono molto utilizzati nell'industria tessile, in quanto danno origine a fibre molto resistenti che possono trovare applicazioni per costituire imbracature di sicurezza, giubbotti e schermi antiproiettili. Inoltre, sono stati realizzati indumenti in cotone impermeabili ai liquidi. Le fibre di cotone sono state ricoperte da una "peluria" (*nano-whiskers*) che, creando un cuscino d'aria, simula l'effetto loto osservato in natura. Le foglie di loto, infatti, hanno la proprietà di non trattenere l'acqua; questa, infatti, scivola via sotto forma di tante goccioline a causa dell'alta tensione superficiale presente sulla foglia, portando via tracce di fango e insetti che vi si appoggiano. Le foglie di loto sono rivestite da cristalli di cera idrofobica di dimensioni nanometriche che le rendono molto ruvide in superficie (Fig. 1.9). In questo modo l'area di contatto tra la goccia e la

superficie è molto piccola e la goccia scivola via dalla foglia per effetto del suo peso. La ruvidità della superficie è fondamentale per la pulizia della superficie stessa. La goccia d'acqua su una superficie liscia scivola mentre su una ruvida rotola, rendendo più efficace l'effetto autopulente.

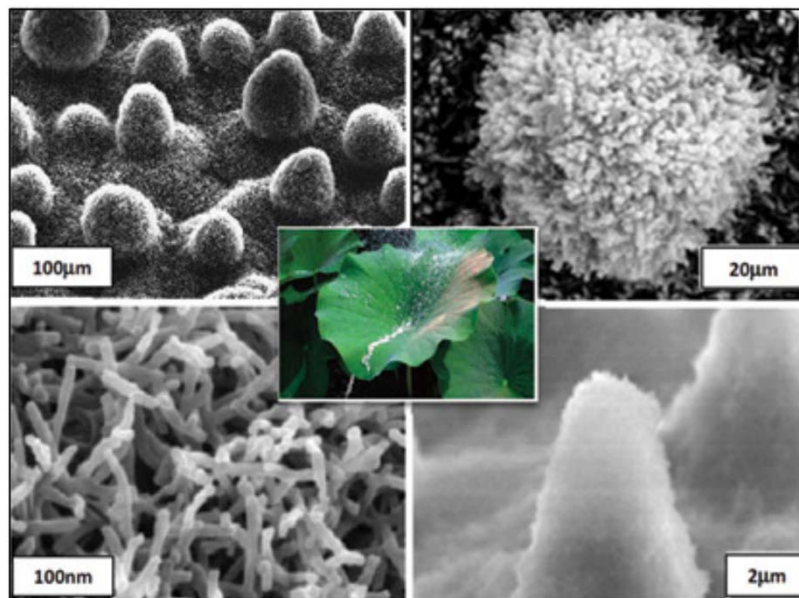


Figura 1.9 Ingrandimenti progressivi di una foglia di loto

Sempre sfruttando l'effetto loto, i nanomateriali sono anche utilizzati per formulare spray super idrofobici da spruzzare su materiale edile (anche vetro), permettendo alle superficie di auto-pulirsi, sfruttando l'acqua piovana (Fig. 1.10).

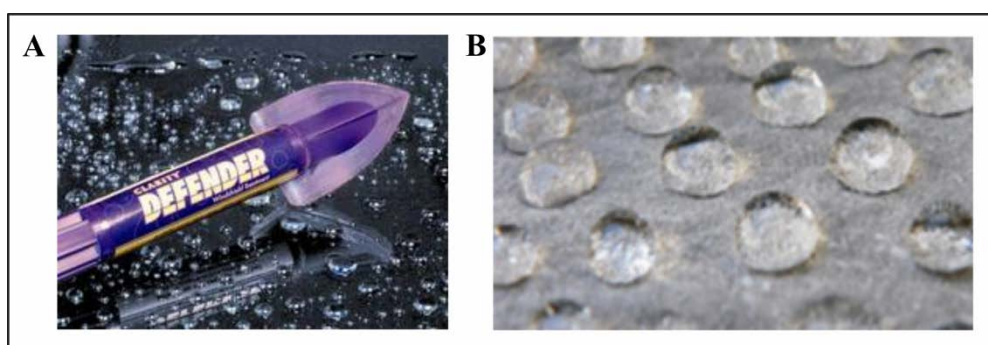


Figura 1.10 **A.** *Clarity Defendere Automotive-Glass Treatment*, film nanostrutturato che previene la formazione di ghiaccio e di sporco nel parabrezza delle auto. **B.** *SurfaPore® C*, idrorepellente per superfici in cemento, malta, stucco, pietra.

Altre applicazioni sono costituite dalla formulazione di rivestimenti superficiali antigraffio e con una migliore resistenza all'usura.

I nanomateriali, inoltre, trovano impiego per la bonifica di siti contaminati. Ad esempio, nanomateriali a base di ferro sono utilizzati per rimuovere il tetracloruro di carbonio dalle acque di falda o l'arsenico dalle acque.

Le nanotecnologie, inoltre, possono avere un grande impatto sullo sviluppo, l'elaborazione e l'applicazione di dispositivi elettronici; ne sono esempi i diodi nano, OLED, display al plasma, dispositivi per computer, progettazione di chip, nano transistor, ecc. I nanomateriali possono essere sfruttati anche nel campo delle energie rinnovabili per migliorare l'efficienza energetica della produzione, l'assorbimento e lo stoccaggio di energia.

Le loro applicazioni, inoltre, possono essere ulteriormente ampliati funzionalizzando la superficie dei nanomateriali con ioni di metalli, piccole molecole o polimeri; in questo modo, ad esempio, potrebbero essere utilizzati, in campo medico, per interagire selettivamente con uno specifico target. Sfruttando questa idea, si sta cercando di sviluppare nanomateriali per veicolare chemioterapici esclusivamente alle cellule tumorali, per approcci di terapia genica come mezzi trasportanti uno specifico gene, e per tecniche di ingegneria tissutale come *scaffold* (Fig. 1.11). Un'importante applicazione potrebbe essere nel settore della *drug delivery*, per la formulazione di farmaci a rilascio controllato e specifico.

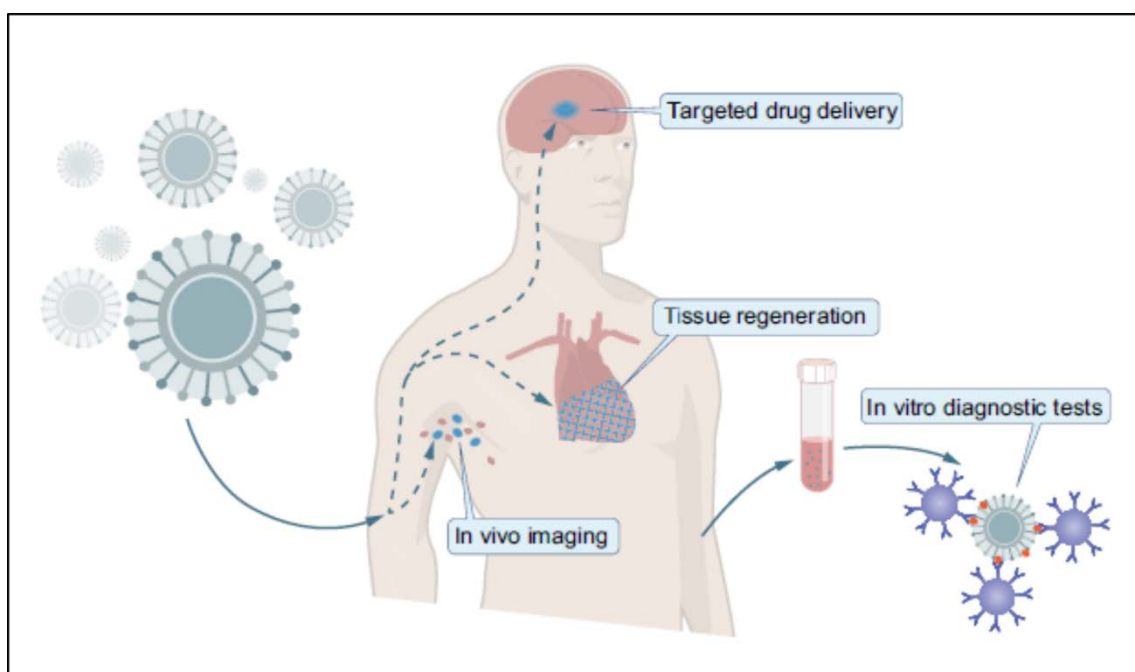


Figura 1.11 Applicazioni mediche delle nanotecnologie. Tratto da Fadeel (2013).

Quantum dot e quantum dot di cadmio solfuro (CdS QD)

I QD sono una particolare tipologia di nanomateriali, generalmente con un diametro inferiore ai 10 nm (sebbene in alcuni casi possano raggiungere dimensioni di 50 nm quando funzionalizzati con particolari gruppi). Si tratta di nanomateriali costituiti, generalmente, da atomi appartenenti ai gruppi II-VI (es. CdSe, CdTe, CdS, PbSe, ZnS e ZnSe) e III-V (es. GaAs, GaN, InP e InAs) della tavola (Chan et al., 2002). Le dimensioni molto piccole sono responsabili delle particolari proprietà ottiche ed elettroniche tipiche di questi nanomateriali e non riscontrabili nel corrispondente materiale in scala non nanometrica. Esempi di queste peculiari proprietà sono l'ampio e continuo spettro di assorbimento e una stretta banda di emissione (Bruchez Jr., 1998).

I QD, inoltre, possono subire passivazione con la conseguente formazione di un rivestimento esterno, che, solitamente, conferisce loro una maggiore bio-stabilità e biocompatibilità (Lewinski et al., 2008).

La produzione dei QD può avvenire principalmente con due approcci: sintesi organometallica e sintesi acquosa (Chen et al., 2012). La prima permette di ottenere QD con eccellenti proprietà ottiche (Peng et al., 2000) ma solitamente di natura idrofobica, che ne limita l'utilizzo in ambito biologico. I QD così ottenuti potrebbero essere sottoposti a trattamenti di funzionalizzazione con ligandi idrofilici per permetterne la dispersione in ambienti acquosi (Gerion et al., 2001). Tuttavia, questi processi spesso ne alterano le proprietà ottiche/fisiche/chimiche (Bao et al., 2004). La sintesi acquosa costituisce sicuramente una strategia più economica, semplice e ecosostenibile rispetto a quella appena descritta. I QD ottenuti con questo approccio risultano avere un diametro inferiore ai 5 nm, non necessitano di trattamenti post sintesi, ma spesso sono caratterizzati da proprietà ottiche non ottimali (Gaponik et al., 2002). Tuttavia, per ovviare a questo problema, si stanno sviluppando nuove strategie per ottenere QD mediante sintesi acquosa con ottime proprietà ottiche.

Applicazioni

Le eccellenti proprietà ottiche fanno dei QD un'interessante nuova classe di fluorofori per applicazioni mediche, come traccianti per immagini diagnostiche *in vivo* e biosensori (Bu

et al., 2013; Zhang et al., 2013). QD bioconiugati sono in via di sviluppo per l'utilizzo come strumenti per la *drug delivery* (Yu and Chow, 2004).

Inoltre, date le loro peculiari proprietà di semiconduttori sono spesso utilizzate in microelettronica e optoelettronica (Chan et al., 2002; Nann and Skinner, 1993); ad esempio per la produzione di pannelli LED. Si stanno, inoltre, sviluppando procedure per sistemi di memorizzazione ad altissima densità (Hardman, 2006).

Nel settore dell'energia rinnovabile, i CdS QD vengono utilizzati in celle solari per una produzione più efficiente ed economica di energia.

Valutazione del rischio tossicologico

La grande importanza che viene data alle nanotecnologie unitamente all'esplosione del mercato dei prodotti ad essa collegati, avvenuta nel corso degli ultimi due decenni, ha suscitato un grande interesse nei confronti dei potenziali effetti che i nanomateriali possano avere sulla salute umana e sull'ambiente.

Visto che i nanomateriali presentano spesso caratteristiche diverse dai corrispondenti materiali in scala non nanometrica, il sospetto è che lo stesso possa accadere per gli effetti tossici. Le loro piccole dimensioni, unitamente alle loro nuove proprietà chimico-fisiche potrebbero, infatti, essere responsabili di aumentare l'*uptake* e l'interazione con i sistemi biologici, determinando quindi effetti nocivi. Per tale motivo nasce la necessità di un'attenta valutazione del rischio connesso a tali materiali.

Nel campo della tossicologia regolatoria (branca della tossicologia che raccoglie, processa e valuta i dati tossicologici per consentire decisioni volte alla protezione della salute), un rischio è definito come funzione dell'esposizione e del pericolo. Ne consegue che i possibili danni alla salute o agli ecosistemi dipenderanno dalla dose (quindi dal livello di esposizione) e dalla tossicità. Tale definizione di rischio tiene in considerazione due aspetti indipendenti tra loro:

- ❖ l'esposizione: cioè la misura in cui gli organismi viventi entrano in contatto con i nanomateriali. L'esposizione descrive la quantità di nanomateriale a cui un organismo è sottoposto per un determinato periodo di tempo.

- ❖ la tossicità: ovvero la capacità intrinseca di una sostanza di interferire con i processi biologici negli organismi viventi (potenziale di rischio). Questo fattore descrive la proprietà intrinseca di un preciso nanomateriale, e dipende dalle proprietà fisico/chimiche della sostanza, nonché della natura dell'organismo bersaglio.

L'esposizione ai nanomateriali può avvenire sia durante il loro sviluppo, sia durante la fabbricazione di prodotti che li contengono, sia durante l'utilizzo di questi. Definire il ciclo di vita di questi prodotti può essere d'aiuto per comprendere le diverse vie di rilascio, trasporto, esposizione e *uptake* dei nanomateriali (Hischier and Walser, 2012). L'esposizione umana può anche essere il risultato di un contatto diretto, come l'ingestione di alimenti che presentano nanomateriali come additivi o il sottoporsi a procedure mediche che sfruttano tali materiali, o l'utilizzo di prodotti cosmetici che li contengono.

La valutazione dei rischi, quindi, descrive l'effetto tossico di una sostanza o materiale, ovvero la capacità di provocare un danno in un organismo vivente, quando tale sostanza è assunta ad una certa dose. La tossicità della maggior parte delle sostanze segue una funzione dose-risposta non lineare: a basse dosi non si osservano effetti avversi fino al raggiungimento di una specifica dose soglia, superata la quale si rendono evidenti gli effetti tossici. Ovviamente il tempo di esposizione svolge un ruolo cruciale in questa relazione; non possono essere esclusi effetti negativi in seguito ad un'esposizione a lungo termine di una dose bassa. Ciò che determina la dose che un organismo target può assorbire è, quindi, la durata dell'esposizione.

Nanotossicologia

La nanotossicologia si riferisce allo studio delle interazioni dei nanomateriali con i sistemi biologici, definendo il rapporto tra le proprietà fisico/chimiche e l'induzione degli effetti tossici (Oberdörster et al., 2005).

Capire tutto ciò non è semplice; la complessità è data dalla possibilità, da parte dei nanomateriali, di modificare la loro capacità di legame e di interazione con il materiale biologico e di cambiare le proprie caratteristiche di superficie a seconda dell'ambiente in cui si trovano (Elsaesser and Howard, 2012). Le conoscenze scientifiche accumulate negli ultimi

anni sui meccanismi di interazione nanomateriale-cellule, indicano che queste sono in grado di internalizzarli attraverso meccanismi sia attivi che passivi (Fig. 1.12).

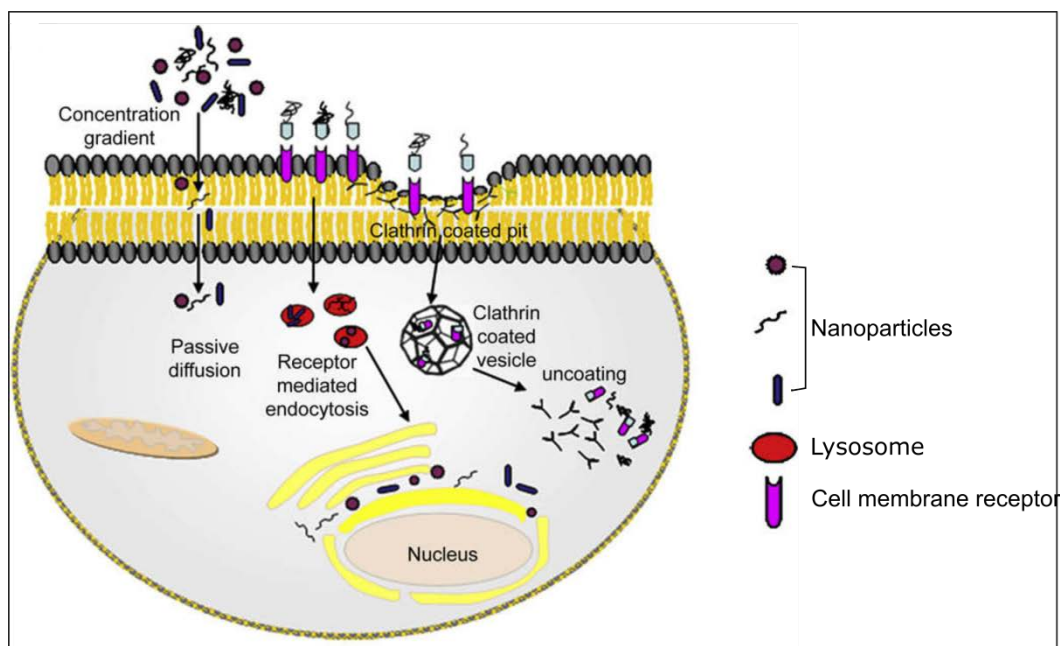


Figura 1.12 Possibili meccanismi di internalizzazione di nanomateriali: diffusione passiva, endocitosi mediata da recettore o da vescicole di clatrina. Tratto da Singh et al. (2009).

Tuttavia, nell'ambiente intracellulare molto poco ancora è chiaro sui processi coinvolti. Particelle dello stesso materiale possono, quindi, mostrare un comportamento completamente diverso dovuto, ad esempio, a piccole differenze sul rivestimento superficiale, sulla carica o sulla dimensione. Questo rende la possibilità di una categorizzazione del comportamento dei nanomateriali, a contatto con sistemi biologici, molto complicata e di conseguenza la valutazione del rischio non è semplice. Questa è una delle principali differenze esistenti tra nanotossicologia e tossicologia classica, dove, in quest'ultima, la caratterizzazione delle sostanze tossiche segue, generalmente, protocolli ben definiti indicanti una serie consolidata di metodologie disponibili. Protocolli di questo tipo non sono ancora diffusi per i nanomateriali e, inoltre, per la loro formulazione, sarà necessario tenere in considerazione molte più variabili, come materiale, dimensione, forma, superficie, carica, rivestimento, dispersione, agglomerazione, aggregazione, concentrazione e matrice (Fig. 1.13). Il dover considerare un gran numero di variabili, che possono influenzare la tossicità di questi materiali, si traduce in una difficile generalizzazione sui rischi per la salute associati all'esposizione ai nanomateriali; ogni nuovo nanomateriale deve essere valutato individualmente e tutte le proprietà che lo caratterizzano devono essere prese in considerazione (Shinde et al., 2012).

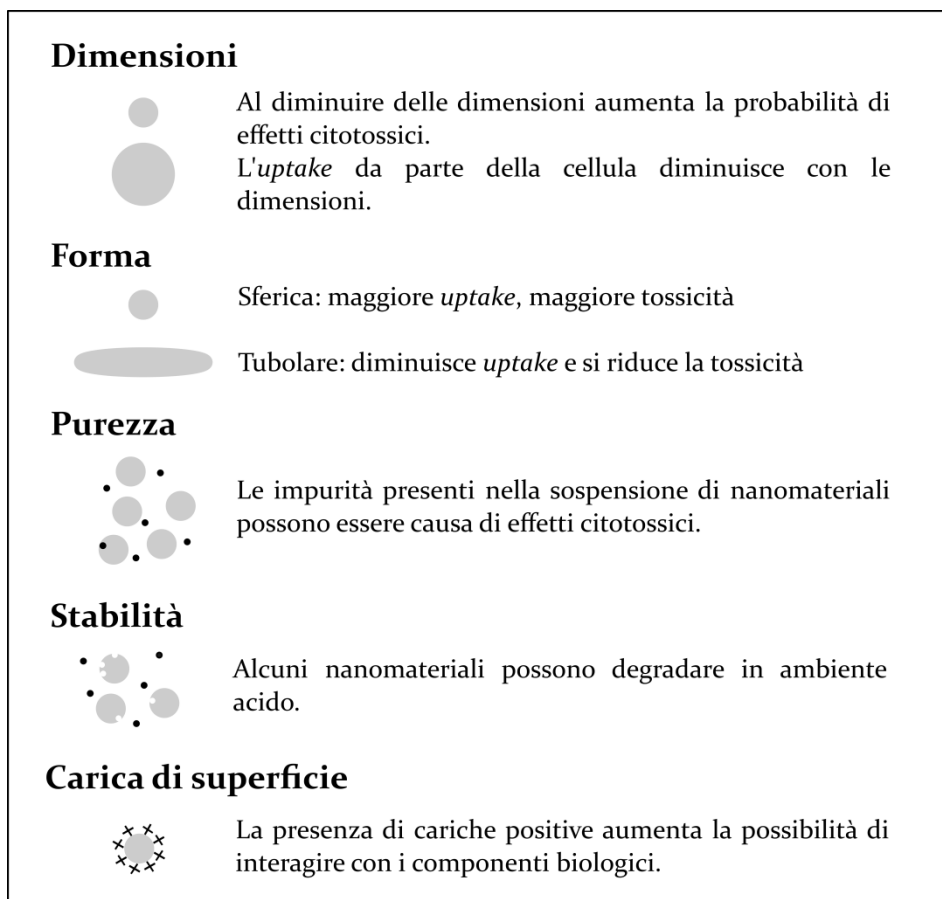


Figura 1.13 Schema delle principali caratteristiche dei nanomateriali che devono essere tenute in considerazione per valutare la biocompatibilità. Modificato da Soenen et al. (2011).

Non essendo ancora presenti linee guida per la valutazione del rischio di questi materiali, si cerca di realizzare dei prodotti derivanti dalle nanotecnologie con un profilo rischi-benefici accettabile; questo è reso possibile grazie ad una nuova ed emergente strategia, detta *safe by design* (Fadeel, 2013). Questo approccio si basa sulla modificazione dei nanomateriali per renderli completamente *safe* (bassa reattività in un sistema biologico) (Lynch et al., 2014), sfruttando la connessione esistente tra proprietà fisico-chimiche dei nanomateriali e i meccanismi biologici o tossicologici di risposta a questi (Fadeel, 2013).

Meccanismi di nano-tossicità

L'impatto biologico dei nanomateriali e la loro biocinetica dipendono dalle dimensioni, composizione chimica, struttura di superficie, solubilità, forma e aggregazione (Fig. 1.14). Questi parametri, infatti, possono modificare l'internalizzazione da parte delle cellule, il legame a proteine, la traslocazione all'interno dell'organismo e la possibilità di

causare lesioni ai tessuti (Oberdörster et al., 2005). Ad esempio, più è piccola una particella, maggiore sarà il rapporto area di superficie/volume e maggiore sarà la sua reattività chimica ed attività biologica.

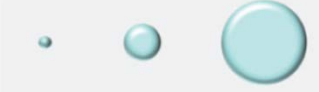



Nanoparticles	Feature	Effect on ...
	Size	Penetration
	Surface area	Effect amplitude
	Chemistry	Persistence Binding
	Surface chemistry	Reactivity

Figura 1.14 Relazione tra le proprietà delle nanoparticelle e gli effetti biologici. Tratto da Dietz & Herth (2011).

Il meccanismo primario di tossicità dei nanomateriali sembra essere l'aumento delle specie reattive dell'ossigeno (ROS) e la produzione di radicali liberi (Fig. 1.15). Inoltre, le ROS sono uno dei principali fattori coinvolti nel processo infiammatorio determinando una *up*-regolazione dei geni coinvolti nella risposta pro-infiammatoria, mediante l'attivazione di specifici fattori di trascrizione (Gou et al., 2010; Li et al., 2008). Tuttavia, la formazione di radicali liberi può avere anche un impatto diretto sull'integrità cellulare (Uchino et al., 2002). Ciò è stato osservato per una vasta gamma di nanomateriali, come fullereni, nanotubi di carbonio e nanoparticelle di ossidi di metallo. Le dimensioni estremamente ridotte dei nanomateriali implicano anche un più facile assorbimento da parte dell'organismo, rispetto alle particelle di dimensioni maggiori (Yang et al., 2010).

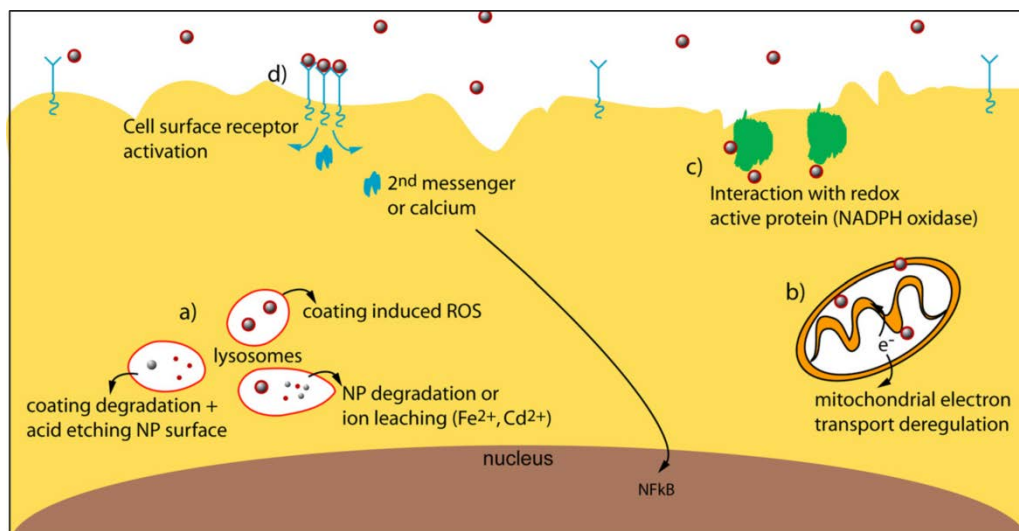


Figura 1.15 Rappresentazione grafica dei diversi modi in cui i nanomateriali possono indurre stress ossidativo. a) Generazione diretta delle ROS come risultato dell'esposizione ad un ambiente acido, come quello dei lisosomi, o per rilascio di ioni o per le proprietà chimiche della superficie. b) Interazione dei nanomateriali con organelli cellulari, come i mitocondri, alterandone la funzionalità. c) Interazione dei nanomateriali con proteine come NADH ossidasi. d) Interazione dei nanomateriali con recettori di superficie e attivazione di processi di segnalazione intracellulare. Tratto da Soenen et al. (2011).

Come questi nanomateriali si comportino all'interno del corpo non è ancora del tutto chiaro. È stato ipotizzato che la maggior parte di essi possa subire processi di fagocitosi, saturando tale meccanismo cellulare con conseguente attivazione dei meccanismi di risposta allo stress, portando, quindi, ad infiammazione e indebolimento dei meccanismi di difesa dell'organismo. Oltre a dover comprendere cosa succeda in un organismo che accumuli nanomateriali, bisogna anche capire se e come, queste particelle, interferiscano con i processi biologici. Ad esempio, potrebbero legare alcune proteine, causandone alterazione delle loro attività enzimatiche o dei meccanismi di regolazione in cui sono implicati.

Le potenziali vie di esposizione ai nanomateriali includono il tratto gastrointestinale, la pelle, i polmoni e la somministrazione sistemica, in caso di uso diagnostico e terapeutico (Nel et al., 2006). In quest'ultima situazione, è stato osservato che questi materiali possano distribuirsi nell'organismo raggiungendo il colon, il midollo osseo, il fegato, la milza e i vasi linfatici (El-Ansary and Al-Daihan, 2009). Le interazioni dei nanomateriali con i fluidi corporei, le cellule e le proteine giocano un ruolo principale nel determinare gli effetti biologici e l'abilità di distribuirsi nei vari tessuti. Ad esempio, i nanomateriali potrebbero legare proteine, generando complessi in grado di penetrare in tessuti altrimenti inaccessibili o potrebbero andare incontro a sistemi di difesa che potrebbero eliminarli, sequestrarli o dissolverli.

Quindi per poter effettuare una valutazione tossicologica, il punto di partenza è rappresentato dal definire tutte le caratteristiche del nanomateriale oggetto dell'analisi (Burlison et al., 2004). Questo è necessario poiché, altrimenti, i possibili effetti tossici rilevati non potrebbero essere attribuiti con assoluta certezza ad una particolare proprietà del nanomateriale o al nanomateriale stesso, ma potrebbero, ad esempio, essere una conseguenza della presenza di impurità o di altri elementi presenti nella miscela in cui si trova il nanomateriale (Sayes and Warheit, 2009).

I meccanismi di interazione nanomateriale-sistema biologico possono essere di natura chimica e/o fisica (Nel et al., 2009). I primi possono includere la produzione di ROS (Nel et al., 2006), il rilascio di ioni tossici (Xia et al., 2008), l'alterazione dei trasporti transmembrana (Auffan et al., 2008), il danno ossidativo mediante catalisi (Foley et al., 2002), la perossidazione lipidica (Kamat, 2000). I meccanismi di natura fisica dipendono principalmente dalle dimensioni e dalla superficie del nanomateriale. Queste includono alterazione dell'integrità delle membrane cellulari, aggregazione con proteine, alterazione del *folding* proteico e dei processi di trasporto (Elsaesser and Howard, 2012).

Entrambe le tipologie di interazione saranno seguite dall'attivazione di una serie di processi cellulari che costituiscono la risposta biologica alla presenza dei nanomateriali. Alcuni compartimenti cellulari, inoltre, saranno più suscettibili e, quindi, più vulnerabili all'internalizzazione dei nanomateriali, poiché coinvolti in questi processi di risposta (Fig. 1.16). I nanomateriali possono, ad esempio, interagire direttamente (es. danno fisico) o indirettamente (es. ossidazione) con le membrane biologiche, portando anche a morte cellulare, visto il loro ruolo nel controllo dell'omeostasi. In questo caso, dunque, sono le proprietà di superficie delle particelle a determinare l'interazione o meno con le membrane biologiche. Questa è la ragione per cui le modificazioni sulla superficie sono cruciali nel disegno di sistemi di *drug delivery* per avere la certezza dell'*uptake* da parte delle cellule.

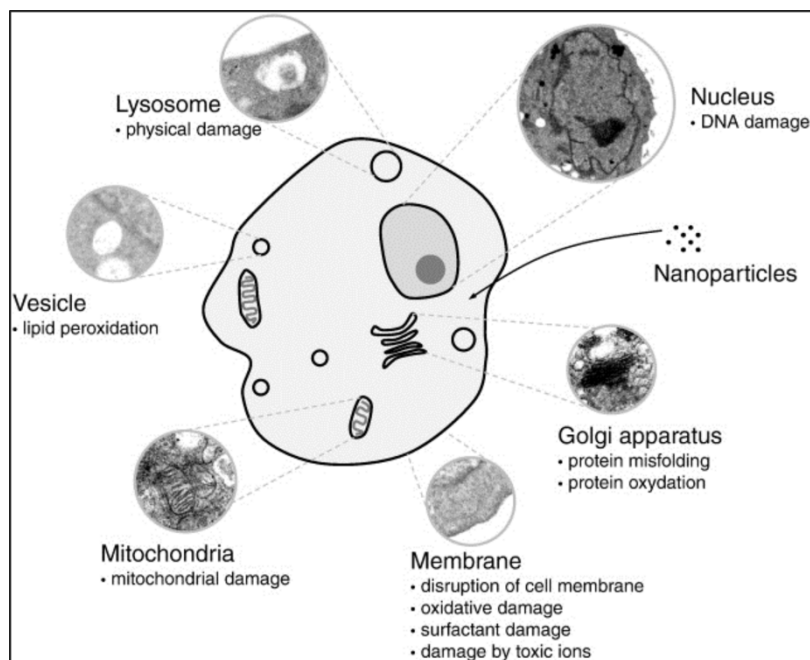


Figura 1.16 Interazione dei nanomateriali con le cellule: bersagli intracellulari e meccanismi nano-tossicologici. Tratto da Elsaesser & Howard (2012).

Principali meccanismi cellulari di risposta ai nanomateriali

Uno dei principali effetti biologici dovuti ai nanomateriali è la produzione di ROS nell'ambiente intracellulare. Il controllo dello stato *redox* cellulare è cruciale per il normale funzionamento della cellula ed è, per tale motivo, finemente controllato. La produzione di molecole ossidanti è, infatti, controbilanciata dalla presenza di antiossidanti, che mantengono bassi i livelli di ROS per prevenire il danno cellulare. Uno sbilanciamento di questo equilibrio è causa di stress ossidativo, che può tradursi in accumulo di proteine ossidate, alterazione delle membrane degli organelli cellulari e, infine, morte cellulare, se i meccanismi di *rescue* non sono sufficienti a contrastare lo stress (Fig. 1.17). Infatti, se si è in presenza di un'elevata quantità di ROS, queste possono agire come messaggeri secondari e attivare fattori di trascrizione, come NF- κ B (fattore nucleare κ B), che inducono l'espressione di geni coinvolti nella risposta pro-infiammatoria e nel processo apoptotico. Nel caso in cui si abbia un lieve incremento delle ROS, la cellula avvierà processi antiossidanti mediante l'attivazione del fattore di trascrizione nucleare NRF-2, che legherà gli elementi ARE (elementi di risposta antiossidanti), inducendo l'espressione di enzimi, come la glutathione S transferasi (GST) (Nel et al., 2006). Quindi, a seconda dell'intensità dello stress ossidativo indotto dai QD, la cellula risponde o attivando processi di difesa o quelli di morte cellulare.

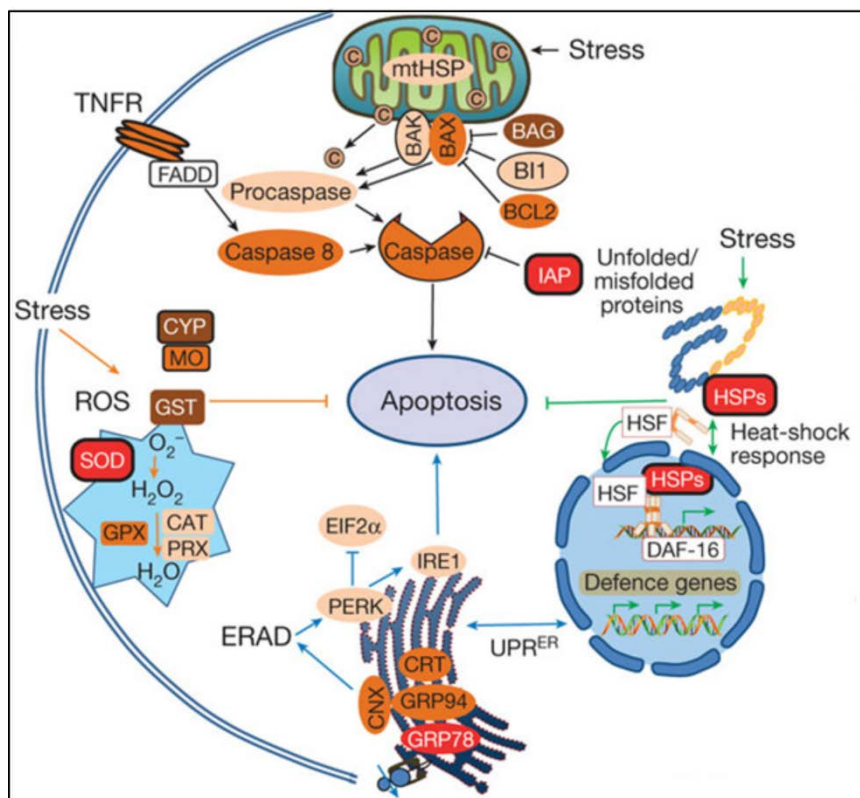


Figura 1.17 Meccanismi cellulari di risposta allo stress.

Recenti evidenze suggeriscono, inoltre, che i nanomateriali possono indurre il processo autofagico (Stern et al., 2008). Questo processo cellulare potrebbe essere un tentativo di degradare ciò che è percepito, dalla cellula, come estraneo e pericoloso, i nanomateriali. Il processo autofagico è solitamente attivato in risposta a situazioni di stress cellulari, come stress ossidativo dovuto ad un accumulo di proteine danneggiate dall'ossidazione, e conseguente stress del reticolo endoplasmatico, e/o per la rimozione di mitocondri danneggiati (mitofagia). Inoltre, evidenze sperimentali suggeriscono che tale processo cellulare possa essere attivato per compartimentalizzare i nanomateriali (Seleverstov et al., 2006; Stern et al., 2008). Tuttavia, sembra anche che la biopersistenza dei nanomateriali nell'autofagosoma potrebbe provocare disfunzione dello stesso processo autofagico; ciò vuol dire che l'alterazione dell'autofagia potrebbe essere incluso tra i possibili meccanismi di tossicità indotta dai nanomateriali (Fig. 1.18) (Stern et al., 2012).

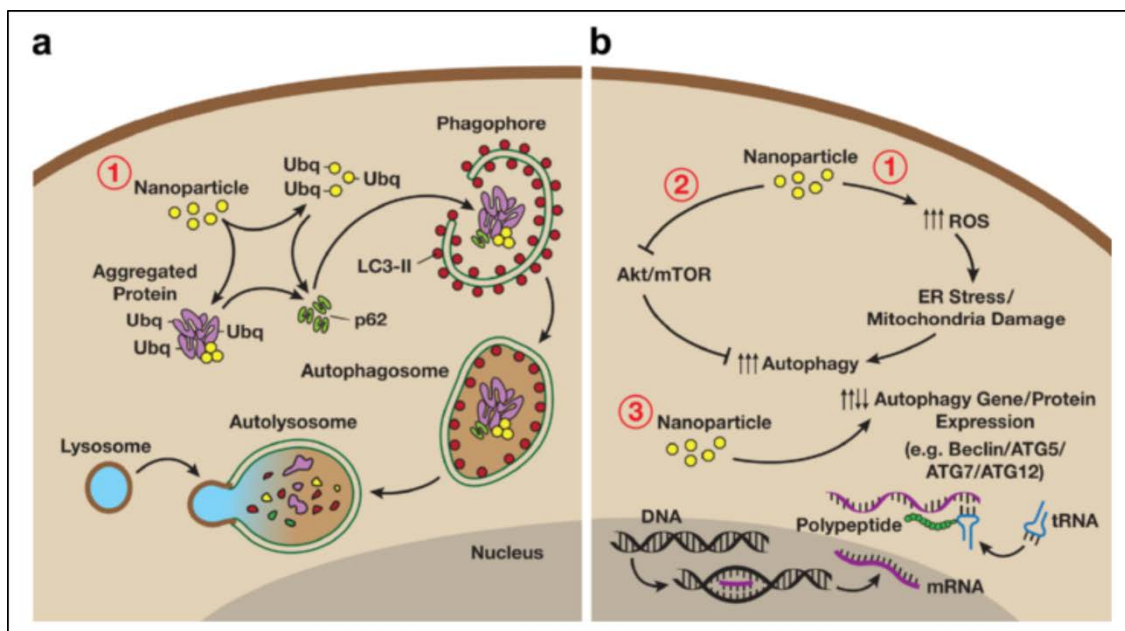


Figura 1.18 Induzione del processo autofagico ad opera dei nanomateriali. a) Recenti evidenze suggeriscono che i nanomateriali possono essere accumulati all'interno dell'autofagosoma. b) Studi in letteratura supportano anche l'ipotesi che i nanomateriali possano indurre alterazione del sistema autofagico. Tratto da Stern et al. (2012).

La disfunzione del processo autofagico potrebbe essere causata direttamente o indirettamente dai nanomateriali, per saturazione delle vescicole autofagiche o per alterazione del citoscheletro cellulare, con conseguente blocco del flusso autofagico. Tale disfunzione ha, inoltre, come conseguenza, l'attivazione del processo apoptotico. Infatti, se il danno cellulare è limitato, l'autofagia svolge il suo ruolo principale come meccanismo di *rescue*; se, invece, il danno è ingente o prolungato, tale processo cellulare determinerà la morte metabolica dopo una fase di lag (Jäättelä, 2004).

Quindi, sia in caso di induzione di stress ossidativo, sia in caso di disfunzione del processo autofagico (processi tra l'altro collegati tra loro), i nanomateriali possono condurre verso la morte cellulare.

La morte cellulare programmata (PCD) indotta in seguito ai danni cellulari causati da questi materiali è principalmente quella associata ai mitocondri, apoptosi intrinseca, e *apoptotic-like* PCD (Fig. 1.19). In entrambi i casi, si tratta di pathway di morte cellulare nei quali il mitocondrio svolge un ruolo centrale. La permeabilizzazione della membrana mitocondriale esterna (MOMP), infatti, costituisce spesso un punto di non ritorno per i principali modelli di PCD (Jäättelä, 2004).

Nell'apoptosi intrinseca, proteine pro-apoptotiche *BH3-only*, come NOXA, PUMA, BAD, determinano l'inizio della MOMP inducendo l'oligomerizzazione di BAX e/o BAK

nella membrana mitocondriale esterna, con conseguente formazione di canali che causano il rilascio del citocromo c e altre proteine mitocondriali. Il rilascio del citocromo c induce la multimerizzazione del fattore apoptotico APAF-1 e la formazione dell'apoptosoma. Questo ha il compito di reclutare, dimerizzare e attivare la caspasi 9, che a sua volta attiva la caspasi -3, -6 o -7 portando all'apoptosi (Tait and Green, 2010).

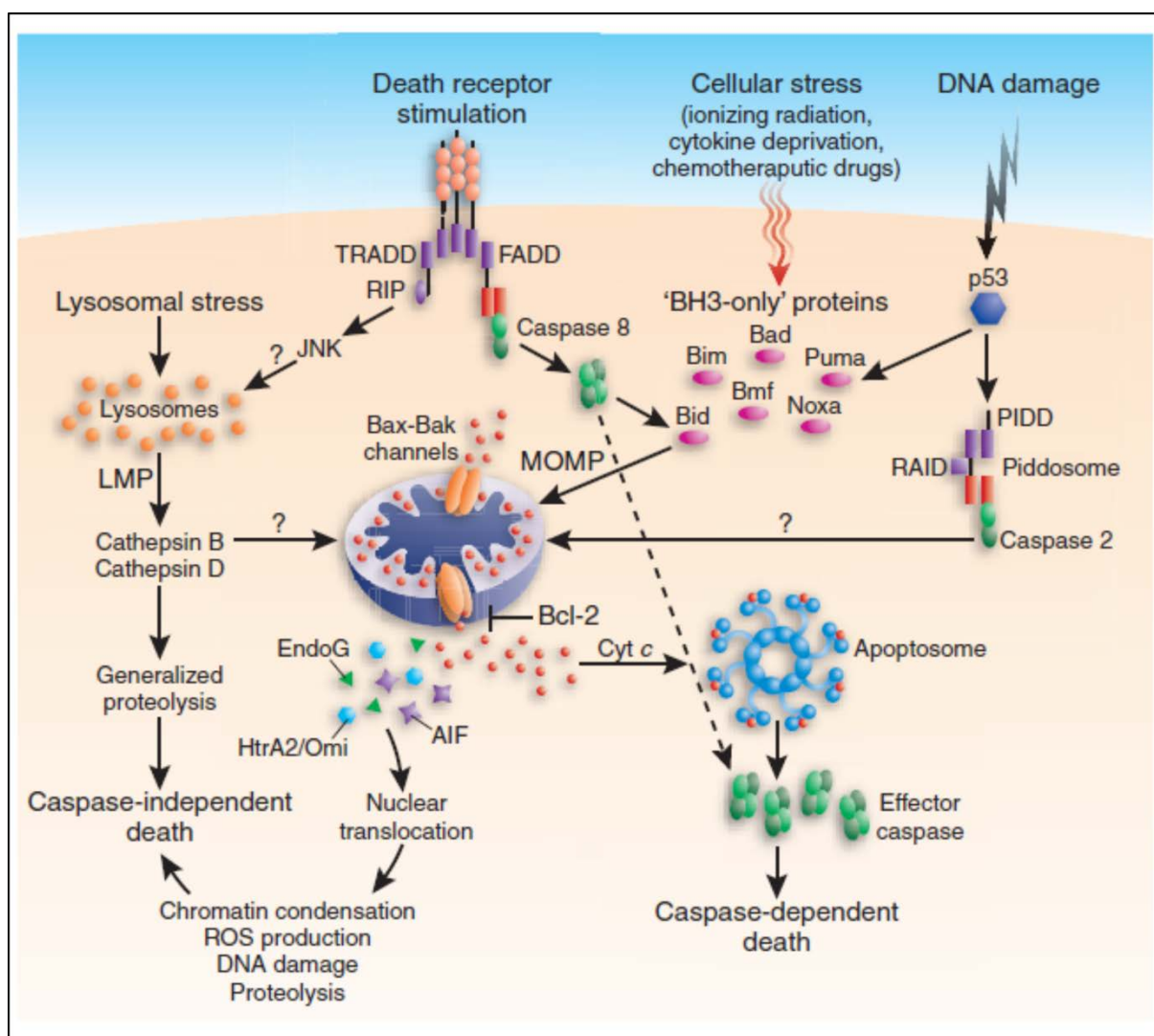


Figura 1.19 Principali pathway di morte cellulare caspasi-dipendente e caspasi-indipendente. I due principali pathway di apoptosi caspasi-dipendente sono: la via estrinseca, che coinvolge la stimolazione dei, cosiddetti, recettori di morte, e la via intrinseca, nella quale è necessaria la MOMP e l'assemblaggio dell'apoptosoma. Inoltre, il rilascio di alcune proteine mitocondriali, dovuto alla MOMP (AIF, HtrA2/Omi, endonucleasi G), possono promuovere la morte cellulare caspasi-indipendente attraverso diversi meccanismi. Tratto da Kroemer and Martin (2005).

Il rilascio dai mitocondri di AIF (*apoptosis-inducing factor*) determina, invece, la sua traslocazione nel nucleo inducendo la condensazione della cromatina, con un meccanismo ancora da definire (Kroemer and Martin, 2005).

Tossicità dei nanomateriali

Dalla letteratura scientifica emerge che gli studi riguardanti la valutazione degli effetti tossici dei nanomateriali sono sempre più numerosi. Tuttavia, non sono ancora sufficienti per una esaustiva valutazione del rischio poiché, spesso, emergono informazioni contraddittorie e mancano delle linee guida standardizzate (Borm et al., 2006; Iavicoli et al., 2011; Schulte and Salamanca-Buentello, 2006).

I TiO₂ NM possono essere considerati relativamente innocui per la salute umana poiché, generalmente, le cellule endoteliali entrano in contatto con una piccolissima quantità di questo materiale (Strobel et al., 2014). In alcuni studi, però, è stata dimostrata una rapida internalizzazione dei TiO₂ NM da parte delle cellule, con conseguente accumulo e danno all'endotelio per un'esposizione a lungo termine (Savi et al., 2014). In questo caso, quindi, particolare attenzione va indirizzata agli effetti cronici di questo nanomateriale. Inoltre, studi *in vitro* dimostrano che TiO₂ NM, una volta all'interno della cellula, si distribuiscono nella zona perinucleare causando induzione di ROS nella medesima regione (Park et al., 2008; Singh et al., 2009). Cai et al. (1992) dimostrano che la citotossicità associata a questi nanomateriali potrebbe essere dovuta a foto-eccitazione da luce UV, con conseguente stress ossidativo.

I ZnO NM sono, anch'essi, considerati non tossici e biocompatibili e per tale motivo utilizzati in prodotti cosmetici e nelle pitture. Tuttavia, esistono un piccolo numero di studi scientifici che dimostrano la loro possibile citotossicità (Vandebriel & De Jong 2012; Jeng & Swanson 2006).

Studi *in vitro* suggeriscono che alcuni tipi di QD possono essere citotossici. Lovrić et al. (2005) hanno osservato che QD di CdTe hanno un effetto citotossico in cellule MCF-7 (derivate da un adenocarcinoma mammario). La produzione di ROS sembra essere la principale causa del danno osservato. Tale osservazione è confermata da altri studi (Chen et al., 2012; Nguyen et al., 2015, 2013; Zhang et al., 2015), condotti su linee cellulari diverse, che permettono di meglio definire il meccanismo alla base della citotossicità osservata. L'aumento delle ROS intracellulari causa disfunzione mitocondriale, con conseguente attivazione del processo apoptotico. Questi lavori, inoltre, suggeriscono che la tossicità evidenziata sia principalmente dovuta al rilascio di ioni cadmio dallo stesso QD.

Tossicità dei CdS QD

I QD, come detto precedentemente, sono particolarmente interessanti per le loro applicazioni come fluorofori diagnostici in ambito biomedicale, per via del loro spettro di fluorescenza, e per l'industria elettronica. Tuttavia, possono essere responsabili di effetti nocivi per la salute umana e l'ambiente, in determinate condizioni.

I dati presenti in letteratura riguardanti la tossicità di questi nanomateriali presentano delle discrepanze, che possono essere dovute alla varietà delle dosi e dei tempi di esposizione valutati e alla diversità dei QD studiati. Inoltre pochi sono gli studi progettati per una valutazione tossicologica (esempio dose, durata, frequenza dell'esposizione, meccanismo d'azione). Molto importante è sottolineare che la tossicità dei QD dipende sia dalle proprietà fisico-chimiche che dalle condizioni dell'ambiente in cui si trovano. Ad esempio, se i CdS QD dovessero trovarsi in condizioni che ne determinano la loro degradazione, come un ambiente ossidativo, la tossicità correlata al rilascio dello ione metallo sarebbe predominante e il cadmio è noto essere tossico già a basse concentrazioni. Quindi un fattore cruciale nel determinare la tossicità è la stabilità del nanomateriale stesso (Lewinski et al., 2008).

Alcuni effetti citotossici dei CdS QD sono stati riportati sia in sistemi procariotici che eucariotici (Chen et al., 2012; Hossain and Mukherjee, 2013; K. G. Li et al., 2009; Lovrić et al., 2005), dimostrando che quanto osservato dipendesse principalmente dal rilascio dello ione cadmio dal QD stesso. In questi studi viene messo in evidenza che, in seguito all'esposizione a questi nanomateriali, nell'ambiente intracellulare, si registra un aumento dei livelli di ROS con conseguente induzione dei meccanismi di risposta allo stress e del processo apoptotico intrinseco.

Recentemente studi condotti con CdS QD, accuratamente caratterizzati, in *Arabidopsis thaliana* e *Saccharomyces cerevisiae* hanno evidenziato che i meccanismi cellulari e molecolari di sensibilità e tolleranza a questo nanomateriale sono differenti da quelli del corrispondente materiale di dimensioni maggiori e apparentemente non correlata al rilascio di Cd^{2+} (Marmioli et al., 2015, 2014).

Inoltre per valutare gli effetti citotossici dei QD è importante conoscere la loro biodistribuzione. Numerosi studi si sono occupati di ciò, evidenziando come, dopo somministrazione intravenosa, il fegato, organo chiave per la detossificazione di xenobiotici, sia il principale sito di accumulo (Haque et al., 2013; Kato et al., 2010).

Linee cellulari umane come modello per gli studi di tossicità *in vitro*

Allo stato attuale è necessario sviluppare e validare test *in vitro* per valutare il potenziale tossico del gran numero di nanomateriali prodotti. Infatti, sarebbe impensabile testarli tutti su animali, prendendo in considerazione le numerose variabili che possono influire sulla tossicità. Si rende, quindi, necessario individuare una serie di saggi *in vitro* per realizzare una procedura standard per la valutazione, in maniera accurata, della capacità dei nanomateriali di indurre effetti tossici sugli esseri umani (Stone et al., 2009).

Numerosi sono i vantaggi dei test di tossicità *in vitro*, come rapidità e costi relativamente bassi, se paragonati a quelli dei test *in vivo*. Tuttavia sono presenti anche una serie di svantaggi. Il principale è dato dal fatto che ogni sistema *in vitro* si limita ad un solo tipo cellulare o ad una combinazione di pochi di esse e ciò non permette di replicare pienamente la complessità delle interazioni che avvengono *in vivo* tra diversi tipi cellulari. Quindi un sistema *in vitro* può definire il potenziale di una particella di attraversare la membrana cellulare, ma non può essere utilizzato per studi di tossicocinetica. I dati osservati *in vitro*, come assorbimento delle particelle, segnalazione cellulare, espressione genica, produzione di proteine, nella maggior parte dei casi rispecchiano quelli evidenziati *in vivo*.

Nonostante gli svantaggi appena elencati, le colture cellulari rappresentano un utile strumento per lo studio della tossicità sui sistemi viventi. Vengono infatti utilizzate, ormai di consueto, in ambito tossicologico come sistema *in vitro* per lo studio degli effetti prodotti da composti potenzialmente tossici negli organismi. La scelta del tipo cellulare da utilizzare dipenderà dalla via di esposizione presa in considerazione e dal potenziale organo bersaglio.

In questo lavoro di dottorato, vista la necessità di definire la tossicità di CdS QD e i meccanismi alla base di questa, si è deciso di utilizzare:

- ❖ una linea cellulare derivante da un epatocarcinoma umano (HepG2) come modello per lo studio degli effetti epato-tossici. Nonostante sia noto che tale linea cellulare presenti bassi livelli di specifici enzimi implicati nel metabolismo della fase I e della fase II (Wilkening et al., 2003), è ampiamente utilizzata in studi tossicologici. È, infatti, considerata un buon sistema modello per gli studi *in vitro* poiché mantiene le principali funzioni tipiche degli epatociti (Liguori et al., 2008; Schoonen et al., 2005; Van den Hof et al., 2014).

- ❖ una linea cellulare di fibroblasti polmonari umani (HFL1) per simulare un'esposizione per inalazione e le conseguenze che da queste ne possono scaturire.

Tossicità del cadmio

Il cadmio (numero CAS 7440-43-9) è un metallo tossico, naturalmente presente sulla crosta terrestre, dove si trova associato a minerali di zinco, piombo e rame (Sarkar et al., 2013). È proprio l'estrazione e la lavorazione di questi materiali a determinare il rilascio di grosse quantità di cadmio nell'aria e nel suolo, contaminando l'ambiente umano. Inoltre, trova largo impiego per la produzione di batterie, di pannelli fotovoltaici, di pitture fluorescenti e come stabilizzante per alcune tipologie di plastiche; l'esposizione occupazionale a questo metallo è, quindi, molto elevata. Il cadmio, inoltre, è facilmente assorbito dalle piante dal suolo; per tale motivo la seconda principale via di esposizione a questo metallo è data dalla dieta.

L'esposizione occupazionale al cadmio è correlata con l'insorgenza di tumori ai polmoni, ai reni, al fegato, alla prostata, al sistema emopoietico, al pancreas, ai testicoli e allo stomaco; per tale motivo è stato classificato come cancerogeno di classe I dall'IARC (IARC, 1993). Tuttavia il cadmio, solitamente, non ha direttamente un effetto genotossico: non presenta, infatti, un elevato potere mutagenico né forma addotti con il DNA (Cartularo et al., 2015). La carcinogenesi è indotta indirettamente dal cadmio, in seguito all'induzione di stress ossidativo, mediante deplezione del glutathione e conseguente aumento delle ROS (Kawata et al., 2009; Valko et al., 2006), e alterazione dei livelli di espressione di specifici geni (Wang, 2012).

Una volta assorbito, il cadmio è rapidamente trasportato dal sangue ai diversi organi, ma si accumula principalmente nel fegato e nei reni, dove forma dei complessi stabili con le metallotioneine presenti (Sarkar et al., 2013). L'*uptake* di questo metallo determina induzione soprattutto di tre categorie di geni (Fig. 1.20) (Beyersmann and Hechtenberg, 1997; Beyersmann, 2002):

- ◇ geni codificanti per proteine con azione detossificante e citoprotettiva, come metallotioneine, enzimi per la sintesi del glutathione, proteine di trasporto per lo zinco, proteine *heat shock* (*chaperone* mitocondriale HSP 60).

In particolare, le metallotioneine hanno il compito di sequestrare il cadmio intracellulare, legandosi ad esso, e riducendone così gli effetti tossici per la cellula. Il glutathione e gli altri enzimi indotti dalla presenza di stress ossidativo riducono, invece, le ROS formatesi in seguito all'esposizione al cadmio. Essendo noto il ruolo nella cancerogenesi delle ROS, questo sistema di detossificazione protegge la cellula. Tuttavia, un'esposizione prolungata al cadmio satura i sistemi di detossificazione attivati dalla cellula con conseguente avvio del processo di cancerogenesi.

- ◇ geni codificanti per fattori di trascrizione. Diversi studi hanno messo in evidenza che cellule esposte al cadmio aumentano i livelli di espressione di alcuni fattori di trascrizione, come AP-1 (*activator protein 1*), MTF1 (*metal regulatory transcription factor 1*), USF (*upstream stimulator factor*), NFkB (*nuclear factor kB*), NRF2 (*NF-E2-related fator 2*).
- ◇ geni proto-oncogeni coinvolti nel controllo della proliferazione cellulare, come *c-FOS*, *c-JUN*, *c-MYC*, *EGR-1*. L'induzione di questi geni da parte del cadmio è mediata dall'alterazione che gli ioni di questo metallo causano ai meccanismi di trasduzione del segnale basati sul calcio. È stato, infatti, osservato che il cadmio interagisce con l'omeostasi cellulare del calcio (Choong et al., 2014).

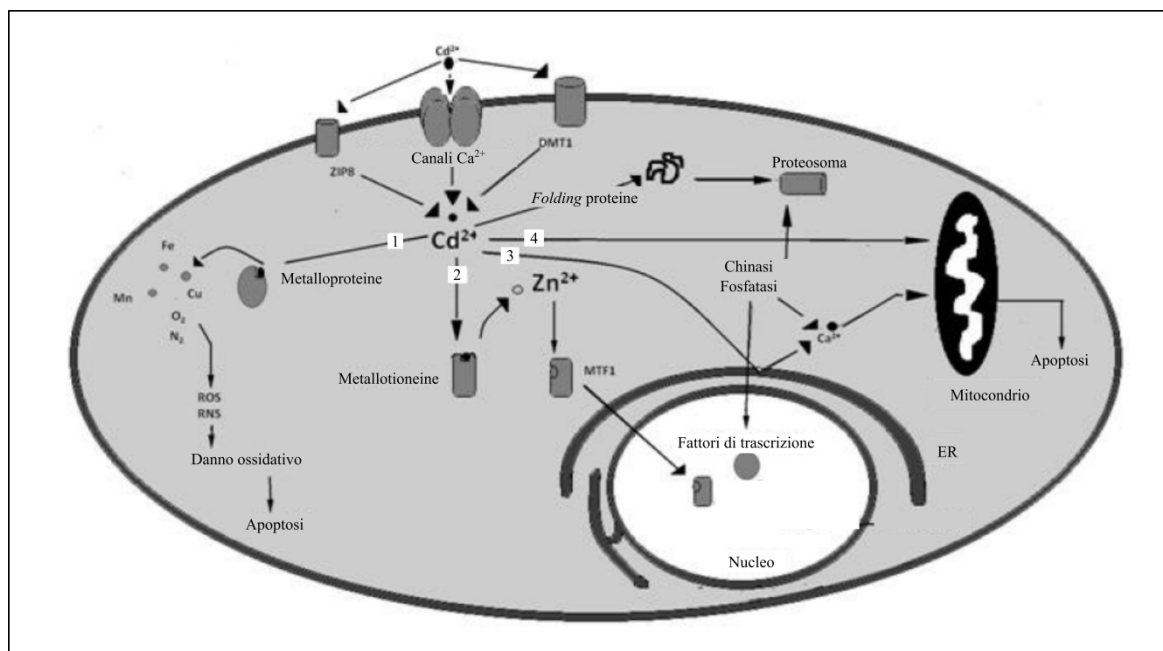


Figura 1.20 Rappresentazione schematica degli effetti intracellulari del cadmio. L'*uptake* del Cd²⁺ può avvenire attraverso i canali Ca²⁺. Una volta all'interno della cellula il cadmio può: (1) legare le metalloproteine, allontanando gli ioni (Zn, Cu, Fe, Mn, ecc.) ad esse legate alterandone il corretto *folding* e causando danno ossidativo con conseguente morte cellulare; (2) legare le metallothioneine presenti con conseguente attivazione della trascrizione dei geni regolati dal fattore di trascrizione MTF1, che in seguito al legame con le metallothioneine sarà traslocato nel nucleo; (3) legare specifici recettori sulla membrana del reticolo endoplasmatico (ER) portando a rilascio di Ca²⁺, determinando l'attivazione delle caspasi e portando la cellula verso l'apoptosi, o all'attivazione di specifiche chinasi/fosfatasi che determineranno l'attivazione della trascrizione di geni coinvolti nel ciclo cellulare o codificanti proteine per la riduzione degli ioni calcio rilasciati; (4) indurre il processo apoptotico intrinseco. Tratto e modificato da Sarkar et al. (2013).

2. Scopo del lavoro

Nonostante il mercato dei prodotti derivanti dalle nanotecnologie sia in continua crescita, ancora poco è noto sugli effetti che i nanomateriali potrebbero avere sulla salute umana. Le peculiari proprietà fisico-chimiche che contraddistinguono questi materiali, così diversi dai corrispondenti di dimensioni macroscopiche, rendono ciò molto complesso. Nonostante numerosi studi siano stati condotti per raggiungere tale obiettivo, ad oggi si hanno, ancora, informazioni frammentarie a riguardo; questo, quindi, non ha permesso la creazione di linee guida, indicanti saggi standardizzati, per la valutazione del rischio correlato ai diversi nanomateriali. Tuttavia, la comunità scientifica è riuscita ad individuare le caratteristiche principali da prendere in considerazione per la formulazione di nanomateriali *safe* e le possibili interazioni nanomateriale-sistema biologico. In particolare, per i QD è stato evidenziato che gli effetti citotossici osservati siano da imputare principalmente al rilascio, da parte del nanomateriale stesso, dello ione metallo di cui è costituito.

Poiché studi recenti condotti dal nostro gruppo di ricerca su organismi modello, come *Arabidopsis thaliana* e *Saccharomyces cerevisiae*, hanno evidenziato che CdS QD non sembrano rilasciare ioni cadmio, lo scopo di questo lavoro è stato quello di valutare il potenziale citotossico e genotossico di questi QD in linee cellulari umane e definirne il meccanismo implicato. A questo scopo, essendo il fegato uno dei principali organi di accumulo del cadmio e dei QD a base di cadmio, è stata utilizzata la linea cellulare HepG2, derivante da un epatocarcinoma umano. Inoltre, poiché una delle principali vie di esposizione ai CdS QD è quella inalatoria, verrà valutata la risposta cellulare all'esposizione a questi nanomateriali in una linea cellulare di fibroblasti polmonari, HFL1.

3. Materiali e metodi

Quantum dot di cadmio solfuro

I nanomateriali utilizzati in questo lavoro sono CdS QD, forniteci da IMEM-CRN (Parma). Sono stati sintetizzati in accordo con il metodo descritto in Villani et al. (2012) e il grado di purezza della miscela di nanomateriali ottenuta è stata definita con un'analisi di spettrometria a diffrazione a raggi X. I CdS QD utilizzati non presentano alcun rivestimento esterno, hanno un diametro medio di 5 nm, una densità di 4.82 g/cm^3 e un picco massimo di emissione a 380 nm (Fig. 3.1).

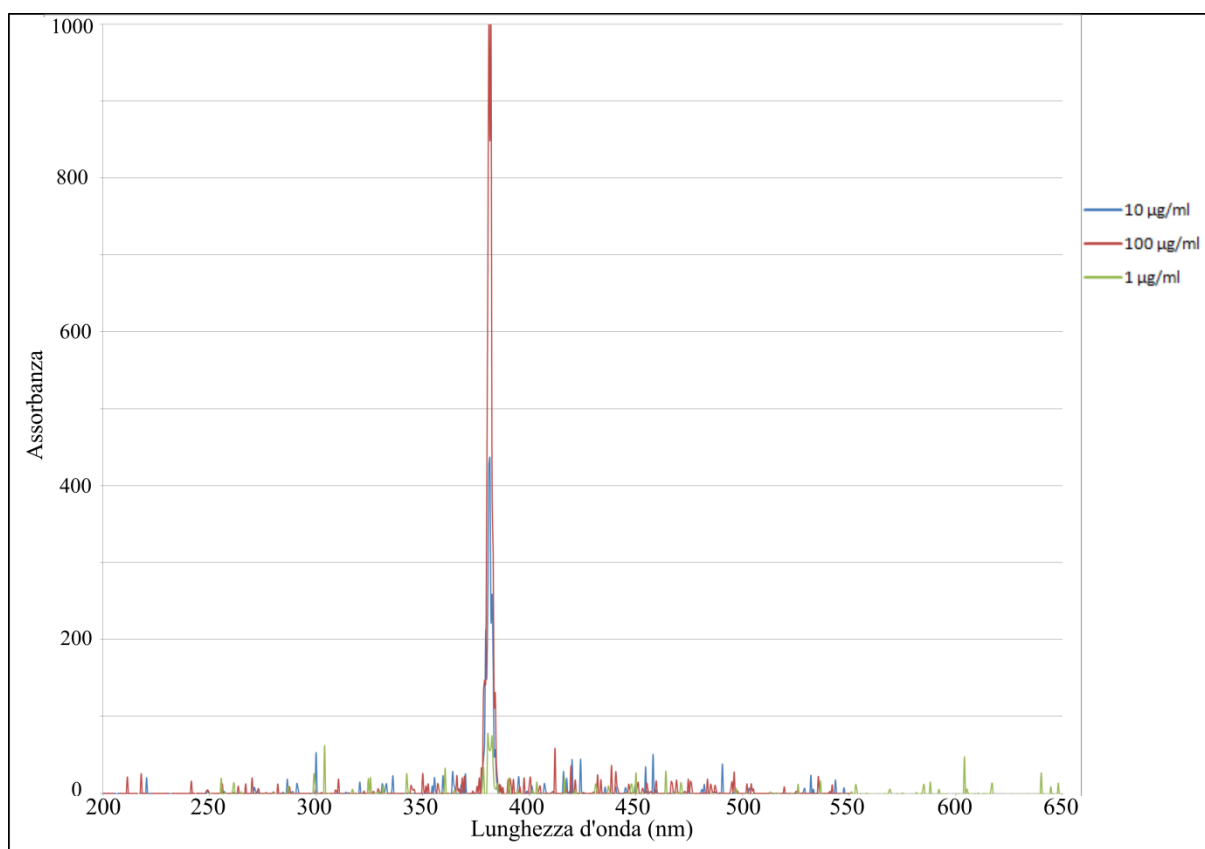


Figura 3.1 Spettro di emissione dei CdS QD.

I nanomateriali sono stati forniti come sospensione acquosa, ad una concentrazione di 5 mg/ml e sono stati conservati a temperatura ambiente, al riparo da fonti di luce. Prima dell'uso, tale sospensione è sonicata per 2 minuti e diluita con terreno di coltura, a seconda delle dosi richieste per l'esposizione cellulare.

Coltura cellulare

Le linee cellulari utilizzate in questo lavoro di dottorato sono state:

- ❖ HepG2, derivante da un epatocarcinoma umano
- ❖ HFL1, linea cellulare di fibroblasti polmonari fetali.

Entrambe le linee cellulari sono state coltivate in adesione, in condizioni permissive di 37°C + 5% di CO₂, in terreno completo costituito da:

- ◇ DMEM (*Dulbecco Modified Eagles's Medium*);
- ◇ 10% FBS (*Fetal Bovine Serum*);
- ◇ 2 mmol/l L-Glutammina;
- ◇ 100 U/ml penicillina;
- ◇ 100 mg/ml streptomicina.

La coltura cellulare è solitamente rinfrescata due volte a settimana e, una volta raggiunto circa l'80% di confluenza, suddivisa in due sottocolture, portando le cellule in sospensione con 0.025 % di Tripsina - EDTA (37°C per 7 min).

Per gli esperimenti, le cellule sono state seminate in piastre multi-pozzetto o fiasche, a seconda della necessità, e lasciate aderire per 24 h.

Internalizzazione di CdS QD

L'assorbimento a livello cellulare dei CdS QD è stato valutato mediante analisi al citofluorimetro.

Le cellule di HepG2 sono state seminate in fiasche di 25 cm² (T25) ad una densità di 5 x 10⁵ cell/fiasca. Dopo 24 h, una coltura cellulare è stata esposta a 100 µg/ml di CdS QD per tempi diversi, 0 - 30 - 60 e 240 minuti. Terminato il tempo di trattamento, le cellule sono state lavate con PBS (*Phosphate Buffered Saline*) e portate in sospensione, mediante trattamento con tripsina. Una volta centrifugate, 3500 rpm per 90", sono state risospese in PBS contenente 1% FBS. Come campione di riferimento è stata utilizzata una coltura cellulare non esposta ai nanomateriali.

I campioni così ottenuti sono stati analizzati al citofluorimetro FC500 (Beckman Coulter). I citogrammi sono stati ottenuti con il software Expo ADC (Beckman Coulter).

Citotossicità

La citotossicità dei CdS QD è stata valutata mediante saggio colorimetrico *Cell-Titer 96[®] AQueous One Solution Cell Proliferation Assay (MTS) kit* (Promega).

Le cellule HepG2 sono state seminate in piastre a 96 pozzetti ad una densità di 5×10^3 cell/pozzetto. Dopo 24 h, sono state trattate, in quadruplicato, con quantità crescenti di CdS QD per 24 h (Tab. 3.1). Alla fine del tempo di esposizione, è stato sostituito il terreno di coltura con altro terreno fresco contenente 5% di FBS e aggiunti 20 μ l del reagente MTS. Dopo un'incubazione di 4 h a 37°C e 5% di CO₂, è stata misurata l'assorbanza a 450 nm mediante spettrofotometro (MULTISKAN EX; Thermo Electron Corporation).

Tabella 3.1 Elenco delle condizioni di trattamento per la valutazione della vitalità cellulare di colture cellulari HepG2.

Trattamenti (μ g/ml)	
CdS QD	Cd ²⁺ equivalente
1.5	1.5
3	3
5	5
10	
20	
50	
100	

Cellule non trattate con i nanomateriali sono state utilizzate per la normalizzazione dei dati. Inoltre, alcune cellule sono state trattate con concentrazioni di CdSO₄ contenenti una dose di ioni Cd²⁺ equivalente alla quantità di cadmio presente nelle sospensioni di CdS QD utilizzate per i diversi trattamenti. In questo modo sarà possibile riverificare se l'eventuale tossicità osservata, in seguito all'esposizione ai nanomateriali, sia correlata o meno al rilascio di ioni Cd²⁺ dal nanomateriale stesso.

La vitalità cellulare è stata calcolata come rapporto tra la media di OD₄₅₀ ottenuto per ciascuna condizione analizzata e quella del campione controllo (non trattato). I valori saranno mostrati come media \pm S.E.M. (errore standard della media). La curva dose-risposta risultate è stata mostrata in un grafico, avente la concentrazione di CdS QD sull'asse delle ascisse e la percentuale della vitalità cellulare su quella delle ordinate. Inoltre, i dati ottenuti da questo

saggio sono stati utilizzati per la determinazione dell'IC₅₀, definito come la concentrazione di CdS QD che inibisce la crescita cellulare del 50%.

Il medesimo saggio è stato condotto anche su colture cellulari di HFL1. In questo caso è stato preso in considerazione un intervallo di concentrazioni maggiori (Tab. 3.2), in modo da poter identificare il *range* contenente il valore di IC₅₀, da definire con maggiore precisione in un successivo, analogo, saggio, nel quale analizzare dettagliatamente solamente l'intervallo di concentrazioni di interesse.

Tabella 3.2 Elenco delle condizioni di trattamento per la valutazione della vitalità cellulare di colture cellulari HFL1.

Trattamenti (µg/ml)	
CdS QD	Cd ²⁺ equivalente
20	20
50	50
100	
200	
300	
500	

Analisi di espressione genica

Estrazione RNA

Le cellule HepG2 sono state seminate in tre o quattro (a seconda del numero delle dosi di trattamento prese in considerazione) fiasche da 75 cm² (T75), in 12 ml di terreno di coltura, ad una densità di 1 x 10⁵ cell/ml. Una coltura cellulare è stata utilizzata come condizione di riferimento e, quindi, non è stata esposta ai nanomateriali. Le restanti, invece, sono state trattate per 24 h con due o tre dosi di CdS QD: 3, 7 e 14 µg/ml. Le cellule sono state allora portate in sospensione mediante trattamento con tripsina e contate con l'ausilio della camera di Burker. A partire da 5 x 10⁶ cellule, per ogni condizione in studio, è stato estratto l'RNA totale, tramite *RNeasy Mini kit* (Qiagen), secondo le indicazioni fornite dal produttore.

La quantità e la purezza dell'RNA estratto sono stati determinati allo spettrofotometro (Varian Cary 50, Agilent Technologies) misurando il valore di A₂₆₀ e i rapporti A₂₆₀/A₂₈₀ (indice di contaminazione proteica) e A₂₆₀/A₂₃₀ (indice di contaminazione da carboidrati o

altre sostanze organiche). La qualità dell'RNA estratto è stata, invece, valutata tramite elettroforesi su gel d'agarosio 1.5% in TAE.

Tutti i campioni di RNA estratti sono stati conservati a -80°C ed utilizzati come template per la reazione di retrotrascrizione.

Retrotrascrizione

L'RNA isolato dalle diverse colture cellulari è stato utilizzato per ottenere il corrispondente cDNA. In particolare, 1 μg di RNA è stato utilizzato per ciascuna reazione di retrotrascrizione, mediante *Quantitect[®] Reverse Transcription* (Qiagen), seguendo le indicazioni fornite dal produttore. È stato, quindi, eliminato il DNA genomico eventualmente presente nei campioni e, solo, successivamente si è proceduti alla retrotrascrizione.

I campioni ottenuti sono stati diluiti in acqua, in modo da avere una concentrazione di cDNA pari a 10 $\text{ng}/\mu\text{l}$ e conservati a -20°C .

Real Time - PCR: analisi di espressione mediante *TaqMan[®] custom Array Plates*

L'analisi di espressione è stata condotta su campioni di cDNA ottenuti da colture cellulari non trattate (CTR) e trattate per 24 h con due dosi di CdS QD, una sub-tossica (3 $\mu\text{g}/\text{ml}$) e una tossica (14 $\mu\text{g}/\text{ml}$).

Per questa prima analisi, si è ricorsi al sistema *TaqMan[®] custom Array*, fornito da Applied Biosystem. Tale piastra contiene 96 saggi di espressione genica, costituiti da coppie di oligonucleotidi iniziatori (primer) gene-specifici e relative sonde *TaqMan[®]* liofilizzate, messi appunto per studi di analisi di espressione quantitativa su cDNA.

Sulla base di studi precedenti condotti in *Saccharomyces cerevisiae*, che hanno evidenziato un numero limitato di geni determinanti il fenotipo tollerante/sensibile ai CdS QD (Marmioli et al., 2015), sono stati scelti i geni da prendere in considerazione per l'analisi di espressione, ricorrendo all'utilizzo di specifici database per l'individuazione dei corrispondenti geni ortologi. L'elenco dei geni considerati sono riportati in Tabella 3.3.

Tabella 3.3 Geni e saggi TaqMan[®] utilizzati per le analisi di espressione mediante *TaqMan*[®] Array Plates.

Categoria	Gene	Nome ufficiale	Funzione
PCD	<i>ABL1</i>	Tyrosine-protein kinase ABL1	Coinvolto in molti processi chiave collegati alla crescita cellulare e sopravvivenza come riorganizzazione del citoscheletro in risposta a stimoli extracellulari, autofagia, risposta a danno al DNA e apoptosi.
	<i>BAK1</i>	Bcl-2 homologous antagonist/killer	In presenza di un appropriato stimolo, accelera il processo apoptotico legando e svolgendo un'azione antagonista all'azione anti-apoptotica di BCL2.
	<i>BAX</i>	Apoptosis regulator BAX	Promuove l'attivazione di CASP3 e quindi l'apoptosi.
	<i>BBC3 (PUMA)</i>	Bcl-2-binding component 3	Mediatore essenziale dell'apoptosi p53/TP53-dipendente e p53/TP53-indipendente.
	<i>CASP2</i>	Caspase-2	Implicato nell'attivazione della cascata di caspasi responsabile del processo apoptotico.
	<i>CASP3</i>	Caspase-3	Implicato nell'attivazione della cascata di caspasi responsabile del processo apoptotico.
	<i>CHECK2 (RAD53)</i>	Serine/threonine-protein kinase Chk2	Richiesto per mediare l'arresto del ciclo cellulare (checkpoint-mediated), l'attivazione dei processi di riparazione del DNA e di quello apoptotico in risposta alla presenza di danno al DNA.
	<i>DEDD2</i>	DNA-binding death effector domain-containing protein 2	Coinvolto nel processo apoptotico attivato da <i>death receptor</i> .
	<i>DIABLO (SMAC)</i>	Diablo homolog, mitochondrial	Promuove l'apoptosi attivando la caspasi nel pathway citocromo c/Apaf-1/caspasi-9. Agisce impedendo l'attività dell'inibitore.
	<i>HRK</i>	Activator of apoptosis harakiri	Promuove l'apoptosi.
	<i>PIDD (LRDD)</i>	p53-induced protein with a death domain	Promuove l'apoptosi attivata in risposta al danno al DNA (p53/TP53).
	<i>PMAIP1 (NOXA)</i>	Phorbol-12-myristate-13- acetate-induced protein 1	Promuove l'attivazione delle caspasi e, quindi, dell'apoptosi. Promuove l'alterazione della membrana mitocondriale e la fuoriuscita di proteine apoptogeniche dal mitocondrio.
	<i>PYCARD</i>	Apoptosis-associated speck- like protein containing a CARD	Funziona come mediatore chiave nel processo apoptotico.
	<i>RAD21</i>	Double-strand-break repair protein rad21 homolog	Coinvolto nel ciclo cellulare, riparazione del DNA e apoptosi.
	<i>XIAP (BIRC4)</i>	E3 ubiquitin-protein ligase XIAP	Agisce come inibitore diretto delle caspasi.
		<i>FANCA</i>	Fanconi anemia group A protein
	<i>MRE11A</i>	MRE11 homolog A, double strand break repair nuclease	Coinvolto nella riparazione del danno al DNA e nel mantenimento dell'integrità dei telomeri..

Riparazione danno al DNA	<i>MSH2</i>	DNA mismatch repair protein Msh2	Componente del sistema di riparazione dei mismatch (MMR).
	<i>NBN</i>	Nibrin	Componente del complesso MRE11-RAD50-NBN che gioca un ruolo cruciale nella risposta cellulare al danno al DNA.
	<i>PRKDC</i>	DNA-dependent protein kinase catalytic subunit	Agisce come sensore della presenza del danno al DNA.
	<i>RAD18</i>	RAD18 E3 ubiquitin protein ligase	Implicato nella riparazione del danno al DNA.
	<i>REV1</i>	DNA repair protein REV1	Transferasi implicata nella riparazione al DNA.
	<i>RPA1</i>	Replication protein A 70 kDa DNA-binding subunit	Svolge un ruolo essenziale in una serie di processi cellulari relativi al metabolismo del DNA, come replicazione, ricombinazione e riparazione.
	<i>XPA</i>	DNA repair protein complementing XP-A cells	Coinvolto nel processo di riparazione del DNA per escissione.
	<i>XRCC6</i>	X-ray repair complementing defective repair in Chinese hamster cells 6	Elicasi coinvolta nella traslocazione cromosomica.
Ciclo cellulare	<i>BUB3</i>	Mitotic checkpoint protein BUB3	Codifica per una proteina coinvolta nella funzione di checkpoint.
	<i>ICMT</i>	Isoprenylcysteine carboxyl methyltransferase	Catalizza la metilazione posttraduzionale dei residui di cisteina.
	<i>MDM2</i>	E3 ubiquitin-protein ligase Mdm2	Media l'ubiquitinazione di p53/TP53, determinando la degradazione nel proteosoma. Blocca l'arresto del ciclo cellulare mediato da p53/TP53 e l'apoptosi legando il suo dominio di attivazione trascrizionale.
	<i>UBAC1</i>	Ubiquitin-associated domain-containing protein 1	Subunità non catalitica del complesso KPC che agisce come una E3 ubiquitin chinasi. Richiesta per la poli-ubiquitinazione di CDKN1B durante la fase G1 del ciclo cellulare.
	<i>ATP5L</i>	ATP synthase subunit alpha, mitochondrial	ATP sintasi mitocondriale.
	<i>COX8A</i>	Cytochrome c oxidase subunit 8A, mitochondrial	Questo gene codifica per una subunità della citocromo c ossidasi, enzima terminale della catena di trasporto degli elettroni.
Processi mitocondriali	<i>FIS1</i>	Fission 1 (mitochondrial outer membrane) homolog (<i>S. cerevisiae</i>)	Codifica per una proteina di membrana, collocata sulla membrana esterna mitocondriale. È implicata nel processo di frammentazione mitocondriale. Può, inoltre, indurre il rilascio del citocromo c mitocondrio, con conseguente induzione dell'apoptosi.
	<i>MSRB2</i>	Methionine sulfoxide reductase B2	Codifica per un enzima che riduce specificamente la metionina (R) - sulfoxide (spesso presente a causa della presenza di ROS) in metionina. Quindi in caso di stress ossidativo, può preservare l'integrità mitocondriale riducendo l'accumulo di proteine mitocondriali danneggiate.
	<i>SDHB</i>	Succinate dehydrogenase [ubiquinone] iron-sulfur subunit, mitochondrial	Codifica per una subunità della succinato deidrogenasi che è coinvolto nel complesso II della catena di trasporto degli elettroni ed è responsabile del trasferimento degli elettroni tra succinato a ubiquinone.

	<i>SLMO1</i>	Slowmo homolog 1 (Drosophila)	Regola il traffico delle proteine indirizzare al mitocondrio..
	<i>UQCR11</i>	Ubiquinol-cytochrome c reductase, complex III subunit XI	Componente dell'ubichinone-citocromo c ossidasi, complesso III, che è parte della catena di trasporto degli elettroni. Questa proteina può essere strettamente legata alla proteina ferro-zolfo nel complesso e funzionare come fattore di legame.
	<i>UQCRC1</i>	Ubiquinol-cytochrome c reductase core protein I	Componente dell'ubichinone-citocromo c ossidasi, complesso III, che è parte della catena di trasporto degli elettroni. Questa proteina può mediare la formazione del complesso tra citocromo c e c1.
	<i>UQCRC2</i>	Ubiquinol-cytochrome c reductase core protein II	Componente dell'ubichinone-citocromo c ossidasi, complesso III, che è parte della catena di trasporto degli elettroni. Questa proteina è richiesta per l'assemblaggio del complesso.
Metabolismo delle proteine	<i>SUMO1</i>	Small ubiquitin-related modifier 1	Implicata nella modificazione post- traduzionale delle proteine e agisce in maniera simile all'ubiquitina. Tuttavia, a differenza di quest'ultima, non contrassegna le proteine per la degradazione: questa proteina è implicata in diversi processi cellulari come trasporto nucleare, regolazione della trascrizione e stabilità delle proteine.
	<i>UBQLN1</i>	Ubiquilin 1	Implicata nella modificazione post- traduzionale delle proteine.
Metabolismo	<i>ADH1</i>	Alcohol dehydrogenase 1A (class I), alpha polypeptide	Catalizza la seguente reazione: alcol + NAD ⁺ = aldeide o chetone + NADH.
	<i>ACSL4</i>	Acyl-CoA synthetase long- chain family member 4	Svolge un ruolo chiave nella biosintesi dei lipidi e nella degradazione degli acidi grassi, in quanto converte gli acidi grassi liberi a catena lunga acil-CoA.
	<i>DHRS11</i>	Dehydrogenase/reductase (SDR family) member 11	Coinvolto nel metabolismo degli ormoni steroidi, delle prostaglandine, dei lipidi e xenobiotici.
	<i>GBP2</i>	Interferon-induced guanylate-binding protein 2	Catalizza l'idrolisi del GTP in GMP.
	<i>GCLC</i>	Glutamate-cysteine ligase catalytic subunit	Coinvolto nella biosintesi del glutatone.
	<i>MDH1</i>	Malate dehydrogenase, cytoplasmic	Catalizza la reazione: (S)-malato + NAD ⁺ = ossalacetato + NADH
	<i>MPV17</i>	MpV17 mitochondrial inner membrane protein	Questo gene codifica per una proteina della membrana interna mitocondriale, che è coinvolta nel metabolismo delle specie reattive dell'ossigeno.

	<i>NAA25</i>	N(alpha)-acetyltransferase 25, NatB auxiliary subunit	Subunità non catalitica del complesso NatB che catalizza l'acetilazione dei residui di metionina in posizione N-terminale di peptidi che iniziano con Met-Asp-Glu. Può giocare un ruolo nella normale progressione del ciclo cellulare.
	<i>PDHB</i>	Pyruvate dehydrogenase (lipoamide) beta	Catalizza la conversione del piruvato in acetil-CoA e CO ₂ .
	<i>PFKP</i>	Phosphofructokinase, platelet	Catalizza la fosforilazione del fruttosio-6-fosfato in fruttosio 1,6 difosfato.
	<i>RRM1</i>	Ribonucleotide reductase M1	Questo gene codifica per una subunità della ribonucleoside-difosfato reductasi, enzima essenziale per la produzione di deossiribonucleotidi durante la fase S.
Risposta allo stress	<i>DDIT3</i>	DNA damage-inducibile transcript 3 protein	Gioca un ruolo essenziale nella risposta ad un'ampia varietà di stress e induce arresto del ciclo cellulare e apoptosi in seguito a stress del reticolo endoplasmatico.
	<i>DNAJB9 (HSP40)</i>	DnaJ homolog subfamily B member 9	Agisce come co-chaperone con una proteina Hsp70. L'espressione di questo gene è indotta dalla presenza di stress del reticolo endoplasmatico.
	<i>GPX3</i>	Glutathione peroxidase 3	Protegge le cellule e gli enzimi da danno ossidativo mediante riduzione del perossido di idrogeno, dei lipidi perossidati e di idroperossidi organici.
	<i>HSP90AA1</i>	Heat shock protein 90kDa alpha (cytosolic), class A member 1	Hsp90 è una proteina chaperone che in presenza di stress stabilizza le altre proteine evitandone la degradazione.
	<i>HSPB3</i>	Heat shock protein beta-3	Inibitore della polimerizzazione dell'actina.
	<i>HSPD1</i>	60 kDa heat shock protein, mitochondrial	Implicato nell'import di proteine mitocondriali. Essenziale per assicurare il corretto <i>fold</i> ing e assemblaggio di proteine importate nel mitocondrio.
	<i>HSPH1</i>	Heat shock protein 105 kDa	Previene l'aggregazione di proteine denaturate in cellule esposte a diverse tipologie di stress.

	<i>LONP1</i>	Lon peptidase 1, mitochondrial	Media la degradazione selettiva di polipeptidi <i>misfolded</i> , non assemblate o danneggiate dall'ossidazione. Può, inoltre, agire da chaperone dei complessi proteici presenti nella membrana mitocondriale interna e partecipare alla regolazione dell'espressione genica mitocondriale e al mantenimento dell'integrità del genoma mitocondriale.
	<i>SIRT1</i>	NAD-dependent protein deacetylase sirtuin-1	Deacetilasi coinvolta nella regolazione della trascrizione e partecipa nella coordinazione di una serie di funzioni cellulari come ciclo cellulare, risposta al danno al DNA, metabolismo, apoptosi e autofagia.
	<i>TXN2</i>	Thioredoxin	Partecipa a diverse reazioni redox mediante l'ossidazione reversibile del suo ditiolo in disulfide e catalizza reazioni di scambio ditiolo-disulfide. Nitrosila il residuo di Cys presente nel sito attivo di CASP3 in seguito alla presenza di stress da ossido nitrico, e quindi inibisce l'attività di questa caspasi
Biogenesi dei miRNA	<i>DROSHA</i>	Ribonuclease 3	Specifica endonucleasi implicata nella fase iniziale della biogenesi dei microRNA.
	<i>DICER1</i>	Endoribonuclease Dicer	Questo gene codifica per una proteina che agisce come una ribonucleasi ed è richiesta per la sintesi di microRNA.
	<i>AGO2/EIF2C2</i>	Protein argonaute-2	Necessario per il silenziamento genico RNA-mediato (RNAi) mediato dal complesso RISC (<i>RNA-induced silencing complex</i>).
	<i>XPO5</i>	Exportin-5	Media l'esportazione nucleare di proteine recanti un dominio di legame RNA a doppia elica.
Espressione genica	<i>DOM3Z</i>	Decapping and exoribonuclease protein	Ribonucleasi che degrada in maniera specifica pre-mRNA con difetti al 5'
	<i>METTL18</i>	Methyltransferase like 18	Probabile istidina metil transferasi.
	<i>MRPL44</i>	39S ribosomal protein L44, mitochondrial	Componente della subunità 39S del ribosoma mitocondriale.
	<i>MTIF2</i>	Mitochondrial translational initiation factor 2	Fattore di iniziazione mitocondriale.
	<i>N6AMT1</i>	N-6 adenine-specific DNA methyltransferase 1	Codifica per un enzima implicato nella metilazione del fattore di rilascio I durante la terminazione della traduzione.

	<i>RPL36AL</i>	60S ribosomal protein L36a-like	Questo gene codifica per la proteina ribosomale componente della subunità 60S.
	<i>RPS8</i>	40S ribosomal protein S8	Questo gene codifica per la proteina ribosomale componente della subunità 40S.
	<i>RTF1</i>	RNA polymerase-associated protein RTF1 homolog	Componente del complesso PAF1 che svolge molteplici funzioni durante la trascrizione ad opera dell'RNAPol II.
	<i>SUPT3H</i>	SPT3 homolog, SAGA and STAGA complex component	Probabile attivatore trascrizionale.
	<i>TADA1</i>	Transcriptional adaptor 1	Subunità del complesso STAGA (SPT3; (MIM 602947)/TAF9 (MIM 600822)/GCN5 (MIM 602301)), che è un complesso multiproteico con attività acetiltransferasica che modifica la struttura cromatinica.
	<i>XRN2</i>	5'-3' exoribonuclease 2	Promuove la terminazione della trascrizione mediata dalla RNA polimerasi II.
	<i>YARS2</i>	Tyrosyl-tRNA synthetase 2, mitochondrial	Catalizza il legame della tirosina al tRNA(Tyr).
	<i>ZNF180</i>	Zinc finger protein 180	Codifica per una proteina che interagisce con il DNA.
Altri	<i>ACE</i>	Angiotensin I converting enzyme (peptidyl-dipeptidase A) 1	ACE is an integral membrane protein that is proteolytically shed from the cell surface by a zinc metallosecretase.
	<i>ATG3</i>	Ubiquitin-like-conjugating enzyme ATG3	Enzima richiesto per il trasporto nel vacuolo, per il processo autofagico e per l'omeostasi mitocondriale.
	<i>ATP6V1E1</i>	ATPase, H ⁺ transporting, lysosomal 31kDa, V1 subunit E1	Responsabile dell'acidificazione dei compartimenti intracellulari come i vacuoli.
	<i>CHAC2</i>	Cation transport regulator homolog 2	Catalizza il taglio del glutatione in 5-ossoprolina e Cys-Gly dipeptide.
	<i>ESD</i>	Esterase D	Serina idrolasi implicata nella detossificazione.
	<i>FNBP1L</i>	Formin-binding protein 1-like	Richiesta per la riorganizzazione del citoscheletro durante l'endocitosi. Promuove l'invaginazione della membrana e a formazione dei tubuli.
	<i>GADI</i>	Glutamate decarboxylase 1	Catalizza la produzione di GABA.
	<i>HEMK1</i>	HemK methyltransferase family member 1	Responsabile della metilazione della tripletta GGQ del fattore di rilascio mitocondriale MTRFIL.
	<i>HSPA8</i>	Heat shock 70kDa protein 8	Appartenente alla famiglia delle <i>heat shock protein 70</i> . Funziona come uno <i>chaperone</i> e lega i polipeptidi nascenti per facilitarne il corretto <i>fold</i> ing. Ha anche un ruolo di ATPase nel disassemblaggio delle vescicole ricoperte da clatrina durante il trasporto di componenti di membrana attraverso la cellula.
	<i>LCPI</i>	Plastin-2	Proteina che lega l'actina.
	<i>NEDD8</i>	Neural precursor cell expressed, developmentally down-regulated 8	Codifica per una proteina <i>ubiquitin-like</i> che svolge un ruolo importante nel controllo del ciclo cellulare.

	<i>PEX7</i>	Peroxisomal biogenesis factor 7	Questo gene codifica per un recettore citoplasmatico per enzimi nella matrice perossisomiale contrassegnati dal <i>peroxisome targeting signal 2</i> (PTS2).
	<i>PHB2</i>	Prohibitin 2	Agisce come mediatore di repressione della trascrizione mediante reclutamento di una istone deacetilasi.
	<i>STX16</i>	Syntaxin-16	Appartenente alla famiglia t-SNARE (<i>target-SNAP receptor</i>). Queste proteine si trovano sulla membrana cellulare e servono da target per le vescicole V-SNARES (<i>vesicle-SNAP receptors</i>) permettendo un fusione specifica.
	<i>TWF1</i>	Twinfilin-1	Inibisce la polimerizzazione dell'actina.
Candidati endogeni	<i>18S</i>	Eukaryotic 18S rRNA	-
	<i>ACTB</i>	Actin, beta	-
	<i>GAPDH</i>	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	-

Le reazioni di amplificazione sono state condotte in un volume finale di 10 µl/pozzetto, in modo che ogni pozzetto contenesse 8 ng di cDNA e la miscela di reazione ottimale, *TaqMan*[®] *Universal PCR Master Mix*, fornita dal produttore. È stato utilizzato lo strumento 7900HT Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems), con il seguente profilo termico:

Profilo termico per <i>TaqMan</i> [®] <i>Array Plates</i>			
Hold*	Hold [§]	PCR (40 cicli)	
		Denaturazione	<i>Annealing</i> /Estensione
50°C	95°C	95°C	60°C
2:00	10:00	0:15	1:00

* Attivazione AmpErase[®] Uracil-N-Glicosilasi (UNG), causa il rilascio di uracile, creando un sito apirimidinico nel DNA. Non presenta attività su RNA o DNA contenente dT.

§ Attivazione AmpliTaq Gold[®]

Real Time PCR: analisi di espressione mediante chimica *SYBR*[®] *Green*

L'analisi di espressione è stata condotta su campioni di cDNA ottenuti da colture cellulari non trattate (CTR) e trattate per 24 h con tre dosi di CdS QD: una dose sub-tossica (3 µg/ml) e due dosi tossiche (7 e 14 µg/ml).

Per questa seconda analisi, si è ricorsi all'utilizzo della chimica *SYBR*[®] *Green*, in particolare *Power SYBR*[®] *Green Master Mix* (Applied Biosystem). Tale miscela è costituita da:

- ◇ colorante fluorescente *SYBR[®] Green*
- ◇ desossinucleotidi trifosfato (dNTP)
- ◇ DNA polimerasi *AmpliTagGold[®] UP (Ultra Pure)* in forma inattiva, progettata per minimizzare i prodotti non specifici e i falsi positivi
- ◇ fluoroforo di riferimento (*ROXTM dye*) che non partecipa alla reazione di amplificazione, ma funge da riferimento interno per normalizzare il segnale relativo al complesso *SYBR[®] Green/dsDNA*. La normalizzazione è necessaria per correggere la fluttuazione di fluorescenza da pozzetto a pozzetto della piastra.

La scelta dei geni da analizzare si è basata sui dati ottenuti nella prima analisi di espressione (vedi *Risultati*). Un elenco di essi è mostrato in Tabella 3.4. Le sequenze dei trascritti sono stati reperiti da GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank/index.html>) e le relative coppie di primer necessarie per l'amplificazione sono stati disegnati con l'ausilio del software Primer Express[®] 3.0 (Applied Biosystem).

Tabella 3.4 Geni scelti per le analisi di espressione mediante chimica *SYBR[®] Green*.

Categorie	Gene	Nome ufficiale	Funzione
PCD	<i>AIFM2</i>	Apoptosis-inducing factor, mitochondrion-associated, 2	Ossidoriduttasi che gioca un ruolo principale nella mediazione della risposta apoptotica p53/TP53-dipendente e probabile effettore del processo apoptotico intrinseco.
	<i>CASP7</i>	Caspase 7	Coinvolta nell'attivazione della cascata di caspasi responsabili dell'avvio dell'apoptosi.
	<i>DAPK1</i>	Death-associated protein kinase 1	Calcium/calmodulin-dependent serine/threonine kinase implicata in diversi processi di segnalazione cellulare come sopravvivenza cellulare, apoptosi e autofagia.
	<i>FADD</i>	Fas (TNFRSF6)-associated via death domain	Recluta la caspasi 8 o la caspasi 10 per attivare il recettore Fas (CD95) o TNFR-1.
	<i>MAP3K5</i>	Mitogen-activated protein kinase kinase kinase 5	Serine/threonine kinase componente essenziale della via di trasduzione del segnale MAP chinasi. Gioca un ruolo cruciale nella via di trasduzione del segnale apoptotico attraverso l'attivazione di caspasi.
	<i>PYCARD</i>	PYD and CARD domain containing	Mediatore chiave del processo apoptotico e infiammatorio.
	<i>BAD</i>	BCL2-associated agonist of cell death	Promuove la morte cellulare. Compete per il legame con Bcl-X(L), Bcl-2 e Bcl-W, quindi interferisce con i livelli di eterodimerizzazione di queste proteine con BAX.
	<i>BCL2</i>	B-cell CLL/lymphoma 2	Regola la morte cellulare controllando la permeabilità della membrana mitocondriale. Inibisce l'attività della caspasi prevenendo il rilascio del citocromo c dal mitocondrio e/o legando APAF-1.
	<i>APAF1</i>	Apoptotic peptidase activating factor 1	Apaf-1 oligomero media l'attivazione della pro-caspasi 9 in presenza del citocromo c, portando all'attivazione della caspasi 3 o 6 e quindi all'apoptosi.
	<i>BAK1</i>	BCL2-antagonist/killer 1	In presenza di un appropriato stimolo, accelera il processo di morte cellulare legando BCL2 con conseguente inibizione della sua azione.

	<i>BID</i>	BH3 interacting domain death agonist	Forma eterodimeri con la proteina pro-apoptotiche BAX e con la proteina anti-apoptotica Bcl-2.
	<i>CASP8</i>	Caspase 8	Principale caspasi a monte della cascata di attivazione delle caspasi. Mediante il legame con FADD recluta il suo recettore.
Risposta allo stress	<i>AOX1</i>	Aldehyde oxidase 1	Svolge un ruolo chiave nel metabolismo degli xenobiotici e dei farmaci.
	<i>PRDX1</i>	Peroxiredoxin 1	Implicata nella rimozione dei perossidi generati durante il metabolismo.
	<i>PRDX2</i>	Peroxiredoxin 2	Implicata nella rimozione dei perossidi generati durante il metabolismo.
	<i>CAT</i>	Catalase	Protegge la cellula dagli effetti tossici del perossido di idrogeno.
	<i>PRDX3</i>	Peroxiredoxin 3	Mitocondrio. Protegge gli enzimi dal danno ossidativo.
	<i>PRDX5</i>	Peroxiredoxin 5	Mitocondrio. Riduce il perossido di idrogeno.
	<i>PRDX6</i>	Peroxiredoxin 6	Protegge dal danno ossidativo causato da H ₂ O ₂ .
	<i>CYGB</i>	Cytoglobin	Ha un'azione protettiva in presenza di stress ossidativo.
	<i>DHCR24</i>	24-dehydrocholesterol reductase	Protegge la cellula dallo stress ossidativo riducendo l'attività della caspasi 3 durante il processo apoptotico indotto da stress ossidativo.
	<i>DUSP1</i>	Dual specificity phosphatase 1	Indotta da stress ossidativo e termico. Agisce defosforilando la MAP chinasi MAPK1/ERK2, regolando l'attività di quest'ultima durante la meiosi.
	<i>MSRA</i>	Methionine sulfoxide reductase A	Svolge un'importante azione nella riparazione di proteine inattivate in seguito ad ossidazione.
	<i>OXSRI</i>	Oxidative stress responsive 1	Regola la via di segnalazione chinasi in risposta ad uno stress ambientale. Potrebbe avere un ruolo anche nell'organizzazione dell'actina nel citoscheletro.
	<i>PTGS1</i>	Prostaglandin-endoperoxide synthase 1 (prostaglandin G/H synthase and cyclooxygenase)	Questo è uno dei due geni codificanti enzimi simili che catalizzano la conversione dell'acido arachidico in prostaglandina. Funziona sia come cicloossigenasi che come perossidasi,
	<i>GBP2</i>	Guanylate binding protein 2, interferon-inducible	Catalizza la reazione di idrolisi del GTP in GMP.
	<i>STK25</i>	Serine/threonine kinase 25	Serine/threonine chinasi attivata in seguito a stress ossidativo.
	<i>GSR</i>	Glutathione reductase	Mantiene i livelli di glutazione ridotto elevati.
	<i>GSTZ1</i>	Glutathione S-transferase zeta 1	Membro della famiglia delle glutazione S-transferasi (GSTs) che codifica per enzimi importanti nella detossificazione delle molecole elettrofile mediante coniugazione col glutazione.
<i>GCLC</i>	Glutamate cysteine ligase, catalytic subunit	Primo enzima limitante nella sintesi del glutazione.	
<i>GSS</i>	Glutathione synthetase	Coinvolto nel secondo step della sintesi del glutazione.	
<i>LONP1</i>	Lon peptidase 1, mitochondrial	Questo gene codifica per una proteina della matrice mitocondriale. Questa proteina media la degradazione selettiva delle proteine <i>misfolded</i> , non correttamente assemblate o danneggiate. È anche implicata nella regolazione dell'espressione genica mitocondriale e nel mantenimento dell'integrità del genoma mitocondriale.	

	<i>MPV17</i>	MpV17 mitochondrial inner membrane protein	Implicato nell'omeostasi mitocondriale. È molto probabilmente implicato nel metabolismo delle specie reattive dell'ossigeno e nel controllo della fosforilazione ossidativa e nel mantenimento del mtDNA.
	<i>NOS2</i>	Nitric oxide synthase 2, inducible	Questo gene codifica per un'ossido nitrico sintasi indotta dalla combinazione di lipopolisaccaridi e alcune citochine.
	<i>OXR1</i>	Oxidation resistance 1	Espressione indotta dalla presenza di stress termico e ossidativo.
	<i>SOD1</i>	Superoxide dismutase 1, soluble	Responsabile dell'eliminazione dei radicali liberi superossido. Questo isoenzima agisce come omodimero.
	<i>SOD2</i>	Superoxide dismutase 2, mitochondrial	Codifica una proteina mitocondriale che forma un omotetramero e lega uno ione manganese per subunità. Questa proteina si lega ai superossidi sottoprodotto della fosforilazione ossidativa e li converte in perossido di idrogeno e ossigeno biatomico.
	<i>TXNRD2</i>	Thioredoxin reductase 2	Mantiene la tioredossina nello stato ridotto. Coinvolto, quindi, nella difesa cellulare contro lo stress ossidativo.
	<i>UCP2</i>	Uncoupling protein 2 (mitochondrial, proton carrier)	Codifica per una proteina di trasporto mitocondriale che determina una perdita di protoni attraverso la membrana mitocondriale interna. Come risultato, l'energia viene dissipata sotto forma di calore.
Autopagia	<i>ATG12</i>	Autophagy related 12	Coinvolta nella formazione della vescicola autofagica.
	<i>ATG13</i>	Autophagy related 13	Fattore autofagico richiesto per la formazione dell'autofagosoma e in caso di mitofagia.
	<i>ATG14</i>	Autophagy related 14	Richiesto sia nella fase di induzione del processo autofagico sia durante l'intero processo. Coinvolto nella formazione dell'autofagosoma
	<i>ATG7</i>	Autophagy related 7	L'enzima codificato da questo gene è essenziale per il processo autofagico e per il trasporto citoplasmatico dei vacuoli.
	<i>GABARAP</i>	GABA(A) receptor-associated protein	Svolge un ruolo importante nel trasporto intracellulare del recettore GABA e nella sua interazione con il citoscheletro. Coinvolta nel processo autofagico e apoptotico.
	<i>MAP1LC3A</i>	Microtubule-associated protein 1 light chain 3 alpha	Implicato nella formazione dell'autofagosoma.
	<i>MTOR</i>	Mechanistic target of rapamycin (serine/threonine kinase)	Codifica per una protein-chinasi parte di due complessi strutturalmente e funzionalmente distinti mTORC1 e mTORC2 (mTOR complesso 1 e 2).

Le reazioni di amplificazione sono state condotte in un volume finale di 10 μ l con la seguente composizione della miscela di reazione: 0.4 μ M di ciascun primer, 8 ng di cDNA e 1X Power SYBR[®] Green Master Mix. È stato utilizzato lo strumento ABI[®] - PRISM 7000 Sequence Detection System (Applied Biosystems), con il seguente profilo termico:

Profilo termico per Real Time PCR con chimica SYBR® Green						
Hold*	Hold§	PCR (40 cicli)		Dissociazione		
		Denaturazione	Annealing/Estensione			
50°C	95°C	95°C	60°C	95°C	60°C	95°C
2:00	10:00	0:15	1:00	0:15	0:20	0:15

* Attivazione AmpErase® Uracil-N-Glicosilasi (UNG), causa il rilascio di uracile, creando un sito apirimidinico nel DNA. Non presenta attività su RNA o DNA contenente dT.

§ Attivazione AmpliTaq Gold®

Ogni reazione è stata condotta in triplicato e i dati sono stati espressi come media dei tre esperimenti indipendenti. La specificità degli ampliconi ottenuti è stata verificata mediante analisi delle curve di dissociazione, confermando la specificità dei primer utilizzati.

Analisi dei dati

I dati ottenuti dalle reazioni di Real Time PCR (media dei Ct e relative deviazioni standard) di tutti i geni analizzati sono stati utilizzati per una quantificazione relativa dei livelli di trascritto nei campioni esposti alle diverse dosi di QD rispetto al campione di riferimento (non trattato). È stato utilizzato il metodo comparativo $\Delta\Delta Ct$ (Livak and Schmittgen, 2001) e la variazione di espressione è stata espressa come *fold-expression change* (RQ), calcolato come $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (Tab. 3.5).

Per l'analisi di espressione, quindi, è stato necessario definire il gene endogeno da utilizzare per normalizzare i livelli di trascritto dei geni target, nelle diverse condizioni analizzate. Per definizione, il gene endogeno è quel gene che mostra livelli costanti di trascritto in tutte le condizioni prese in considerazione; in questo caso, tra i possibili geni candidati (*18S*, *ACTB*, *GAPDH*), quello codificante per l'actina β (*ACTB*) è risultato essere il miglior gene endogeno.

Una volta sottratto il Ct medio relativo al gene endogeno a tutti i Ct medi dei geni target, per ciascuna condizione di analisi, è stato ottenuto il ΔCt . A questi valori è stato sottratto il corrispondente ΔCt del, cosiddetto, campione calibratore, corrispondente alla condizione di riferimento, ossia l'assenza di trattamento con CdS QD. È stata considerata significativa una variazione di più o meno 2 *fold-expression change*: RQ maggiore di 2 e minore di 0.5 (Staal et al., 2007).

Tabella 3. 5 Metodo comparativo $\Delta\Delta Ct$

$$\Delta Ct = Ct_{\text{target}} - Ct_{\text{endogeno}}$$

$$\Delta\Delta Ct = \Delta Ct_{\text{campione}} - Ct_{\text{calibratore}}$$

$$RQ = 2^{-\Delta\Delta Ct}$$

Inoltre, i valori di RQ ottenuti sono stati rappresentati come *heatmap* ricorrendo al software R (versione 3.1.1; <http://www.r-project.org>). La *heatmap* è una rappresentazione grafica della modulazione di espressione genica; infatti, sulla base dei valori di RQ, i dati sono rappresentati come quadrati colorati con gradazioni di rosso o di verde a seconda se indicano un aumento o una diminuzione dei livelli di trascritto rispetto al controllo. Inoltre, sulla base della similitudine dei profili di espressione, i diversi geni sono raggruppati secondo cluster gerarchico, in cui la lunghezza dei rami è inversamente proporzionale al livello di similarità.

Determinazione della presenza di danno al DNA

L'eventuale presenza di danno al DNA in seguito all'esposizione ai nanomateriali è stata valutata mediante elettroforesi su gel di singole cellule (SCGE, *Comet assay*).

Le cellule sono state seminate su una piastra a 6 pozzetti, ad una densità di 2×10^4 cell/pozzetto, e trattate con una dose sub-tossica di CdS QD, 1.5 $\mu\text{g/ml}$, per 1, 4 e 24 h. Al termine del trattamento, le colture cellulari sono state lavate con PBS e trattate con tripsina per portarle in sospensione. Successivamente 1.5×10^4 cellule, per ciascun campione, sono stati risospesi in 0.7% agarosio *low melting* (LMA) e trasferiti su un vetrino da microscopio precedentemente ricoperto da un sottile strato di 1% agarosio *normal melting* e un'altro di agarosio LMA. Si è, quindi, proceduto alla lisi cellulare mediante incubazione a 4°C per 12 h con un tampone di lisi pH 10 (2.5M NaCl, 10 mM Na₂EDTA, 10 mM Tris-HCl, 1% Triton X-100 e 10% DMSO). La corsa elettroforetica (DNA *unwinding*: 20 min; elettroforesi: 20 min, 0.78 Vcm^{-1} , 300 mA) è stata condotta in ambiente alcalino con tampone di corsa pH >13 (1 mM Na₂EDTA, 300 mM NaOH, 0°C). Al termine della separazione elettroforetica, i vetrini sono stati colorati con etidio bromuro (10 $\mu\text{g/ml}$) ed osservati al microscopio a fluorescenza (Leica DMLS; filtro di eccitazione BP 515 - 560 nm; filtro di barriera LP 580 nm), usando un

sistema automatico di analisi di immagini (Comet Assay III - Perceptive Instruments Ltd, UK). L'indice di danno al DNA è dato dalla *Tail Intensity Percent* (TI%) che è definita come il rapporto dell'intensità della fluorescenza emessa dalla coda e l'intensità di quella dell'intera cometa. Per ciascun campione sono state analizzati 100 cellule.

Saggi per la valutazione dello stress ossidativo

Il livello di stress intracellulare in seguito all'esposizione con i CdS QD è stato valutato determinando i livelli di ROS, di glutazione e dell'ossido nitrico (NO).

Determinazione della formazione di specie reattive dell'ossigeno

Il livello di ROS intracellulare è stato determinato mediante l'utilizzo della 2,7-diclorodiidrofluoresceina diacetato (DCFH-DA), come descritto da Giordano et al. (2007). La DCFH-DA, una volta assorbita dalle cellule, è de-esterificata e ossidata dalle ROS presenti in una molecola fluorescente (2,7-diclorofluoresceina, DCF) (Fig. 3.2). L'intensità di fluorescenza emessa sarà proporzionale alla quantità di ROS presenti.

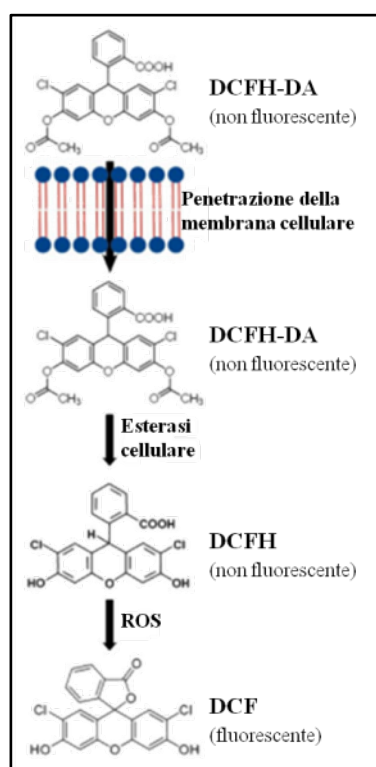


Figura 3.2 Principio di base per la determinazione dei livelli di ROS intracellulari mediante l'utilizzo della DCFH-DA

Dapprima, è stata eseguita una valutazione qualitativa delle ROS presenti mediante osservazione al microscopio a fluorescenza di colture cellulari trattate e non con i QD. Cellule HepG2 sono state seminate su vetrini copri-oggetto ad una densità di 1×10^5 cell/ml. Una volta raggiunta l'80% di confluenza, le diverse colture cellulari sono state lavate con PBS ed è stata aggiunta una soluzione DCFH-DA $10 \mu\text{M}$, per 30', a 37°C con 5% di CO_2 . Successivamente le cellule sono state nuovamente poste in terreno di coltura e sottoposte a trattamento, in un caso, con una dose tossica di CdS QD, $14 \mu\text{g/ml}$, per 4 h, e, in un altro, con $100 \mu\text{M}$ di H_2O_2 . Quest'ultima condizione fungerà da controllo positivo, poiché è noto che il perossido di idrogeno determina l'insorgenza di stress ossidativo; la condizione di riferimento, invece, sarà data dal campione di cellule non esposto ai nanomateriali. Terminato il periodo di trattamento, i campioni sono stati fissati in paraformaldeide 4% e ciascun copri-oggetto è stato montato sul vetrino con il montante *Vectashield*[®] (contenente DAPI, colorante organico fluorescente che lega specificamente le regioni del DNA ricche di sequenze A-T; Vector Laboratories, Inc). I campioni così ottenuti sono stati visualizzati al microscopio a fluorescenza AXIO Image.Z2 (Zeiss; filtro GFP 489/509 nm).

Successivamente è stata eseguita una quantificazione relativa dei livelli di ROS. In questo caso, le cellule HepG2 sono state seminate su piastre a 24 pozzetti ad una densità di 1.5×10^5 cells/ml. È stata, quindi, aggiunta la soluzione di DCFH-DA e le diverse colture cellulari sono state trattate con tre dosi di CdS QD, 3 - 7 - $14 \mu\text{g/ml}$, per 1 e 4 h. Al termine del trattamento, le cellule sono state lisate mediante l'utilizzo della soluzione di lisi non enzimatica *Cell Dissociation Solution* (Sigma). Recuperato il soprannatante, è stata misurata la fluorescenza emessa dai diversi campioni allo spettrofluorimetro (SpectraFluor Plus – TECAN; 488/525 nm). Tutte le misurazioni sono state fatte in triplicato e il campione non trattato con i QD è stato utilizzato come controllo.

Determinazione dei livelli di glutazione intracellulare

Il glutatione è un tripeptide, $\gamma\text{-L-glutamyl-L-cysteinylglycine}$, presente in tutti i tessuti di mammiferi ed è il più abbondante tiolo non-proteico contro lo stress ossidativo; esiste nella forma tiolo-ridotta (GSH) e disulfide-ossidato (GSSG). La forma predominante nelle cellule è quella ridotta, che rappresenta più del 98% del glutatione totale (Forman et al., 2009; Kaplowitz et al., 1985).

I livelli intracellulari di glutatione sono stati determinati ricorrendo all'utilizzo del reagente di Ellman, il DTNB [acido 5,5'-ditio -bis -(2-nitrobenzoico)]. Questo, infatti, reagisce col gruppo sulfidrilico del GSH per dare un prodotto giallo, l'acido 5-tio-2-nitrobenzoico (TNB). La quantità di GSH è stata determinata misurando l'assorbanza a 415 nm. Il GSSG presente, invece, è stato determinato sfruttando lo stesso principio ma introducendo la glutatione reduttasi, enzima che riduce la forma ossidata del glutatione in quella ridotta (Fig. 3.3). In questo modo, si otterrà un valore corrispondente al glutatione totale (GSH + GSSG) intracellulare, dal quale sarà, facilmente, possibile risalire alla quantità di GSSG.

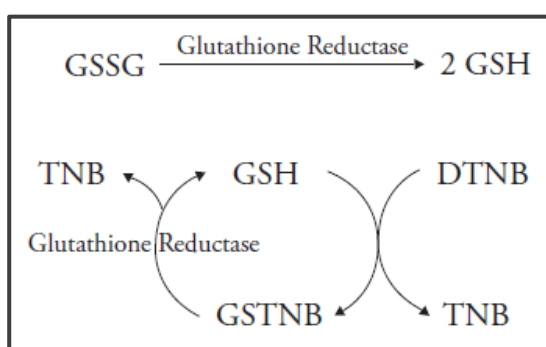


Figura 3.3 Principio di base del saggio per la determinazione dei livelli di glutatione intracellulare.

Le cellule HepG2 sono state seminate in fiasche T25 ad una densità di 1×10^6 cells/ml. Le colture cellulari sono state, quindi, trattate con tre dosi di QD (3 - 7 - 14 $\mu\text{g/ml}$), per 24 h. Terminata la fase di trattamento, le cellule sono state lisate e il contenuto in GSH è stato immediatamente misurato nel soprannatante. 50 μl di quest'ultimo sono stati aggiunti alla miscela di reazione (150 μl ; PBS, EDTA 0.1 mM, DTNB 5 mM), per 10 minuti a 30°C. I valori di assorbanza sono stati misurati con lo strumento iMarkTM Microplate Absorbance Reader (Bio-Rad). Per la determinazione dei livelli di glutatione totale si è proceduti come sopra descritto, ma aggiungendo la miscela di reazione con NADPH 2 mM e glutatione reduttasi 1U.

Tutte le misurazioni sono state effettuate in triplicato e il campione non trattato con i QD è stato utilizzato come controllo. Infine, la quantità di glutatione totale è stata determinata mediante la preparazione di una retta standard di GSH (0 - 200 μM). I dati sono mostrati come stato redox del glutatione, cioè come percentuale del rapporto tra la forma ridotta e quella ossidata del glutatione.

Determinazione dei livelli di ossido nitrico intracellulare

Le specie reattive dell'azoto (RNS) sono anch'esse responsabili, insieme alle ROS, dello stress ossidativo cellulare. Le RNS sono una famiglia di molecole derivanti dall'NO e dall'anione superossido ($O_2^{\cdot-}$) (Fig. 3.4). Inoltre l'NO può svolgere un ruolo citoprotettivo per la cellula (Clemens, 1999).

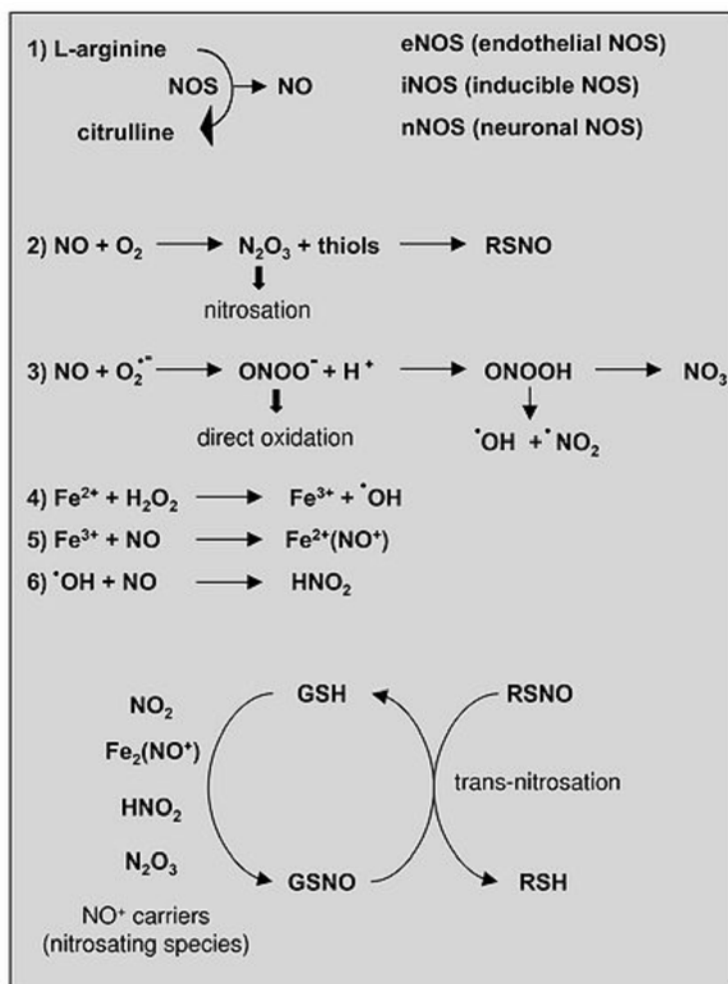


Figura 3.4 Reazioni che portano alla formazione di NO e RNS.

I livelli di NO intracellulari sono stati determinati mediante l'utilizzo del prodotto commerciale *OxiSelect™ Intracellular Oxide Assay Kit* (Cell Biolabs, Inc). Tale saggio si basa sull'utilizzo di una sonda che diffonde passivamente all'interno delle cellule ed è de-acetilata, dalle esterasi cellulari, ad un intermedio non fluorescente. Se presente l'ossido di azoto, tale intermedio è rapidamente ossidato, portando alla formazione di una molecola altamente fluorescente. L'intensità di fluorescenza emessa, misurata con un fluorimetro, sarà proporzionale ai livelli di NO intracellulari (Fig. 3.5).

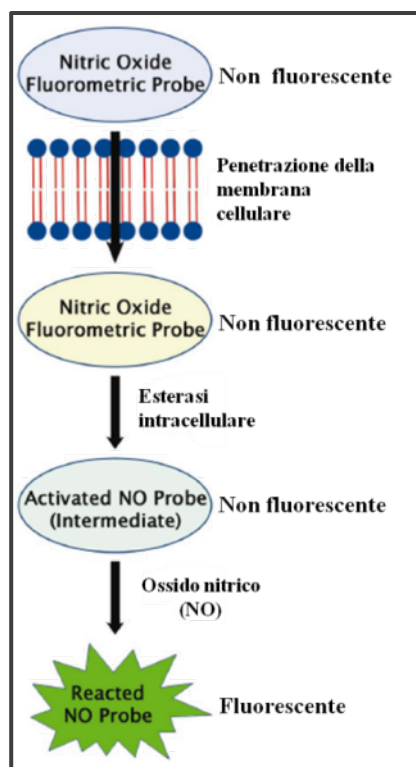


Figura 3.5 Principio di base per la determinazione dei livelli di NO intracellulari mediante "OxiSelect™ Intracellular Oxide Assay Kit" (Cell Biolabs, Inc).

Le cellule HepG2 sono state seminate in piastre a 96 pozzetti ad una densità di 1.5×10^5 cells/ml. Quindi, sono state trattate con tre dosi di CdS QD, 3 - 7 - 14 $\mu\text{g/ml}$, per 1 e 4 h. Al termine del trattamento, le cellule sono state lavate con PBS ed incubate per 2 h (37°C con 5% di CO_2) con la sonda. Successivamente, le diverse cellule sono state lisate e, recuperato il soprannatante, è stata misurata la fluorescenza emessa dai diversi campioni allo spettrofluorimetro (SpectraFluor Plus – TECAN; 488/525 nm). Tutte le misurazioni sono state eseguite in triplicato e il campione non trattato con i QD è stato utilizzato come controllo.

Saggio per la determinazione dell'integrità mitocondriale

I mitocondri svolgono un ruolo centrale nella respirazione ossidativa della cellula e sono la principale fonte endogena di ROS. L'esposizione ai CdS QD potrebbe provocare, direttamente o indirettamente, un'alterazione della funzionalità mitocondriale. È stato, quindi, valutato il corretto funzionamento dei mitocondri mediante verifica della presenza di un'alterazione del potenziale di membrana e analisi del numero di copie del DNA mitocondriale (mtDNA).

Depolarizzazione della membrana mitocondriale

L'alterazione del potenziale di membrana mitocondriale ($\Delta\psi_m$) è stata misurata usando un derivato della rodamina B (rodamina B esilestere), fluorocromo lipofilo carico positivamente, che si accumula, come aggregato, nella matrice mitocondriale emettendo fluorescenza rossa, se opportunamente eccitato. Quindi, le cellule che mostreranno una bassa fluorescenza saranno cellule in cui è avvenuta dissipazione del potenziale, che non consente l'accumulo del fluorocromo.

Le cellule HepG2 sono state seminate in fiasche T25 ad una densità di 5×10^5 cell/fiasca. Dopo 24 h, una coltura cellulare è stata esposta a $14 \mu\text{g/ml}$ di CdS QD per 4 ore. Terminato il tempo di trattamento, le cellule sono state esposte al fluorocromo per 30 minuti. Successivamente, sono state lavate con PBS e portate in sospensione. Una volta centrifugate (3500 rpm per $90''$), sono state risospese in PBS contenente 1% FBS. Come campione di riferimento è stata utilizzata una coltura cellulare non esposta ai nanomateriali.

I campioni così ottenuti sono stati analizzati al citofluorimetro FC500 (Beckman Coulter). I citogrammi sono stati ottenuti con il software Expo ADC (Beckman Coulter).

Determinazione del numero di copie del mtDNA

Il numero di copie di mtDNA è stato determinato mediante Real Time - PCR (chimica *SYBR[®] Green*).

DNA nucleare e mitocondriale è stato estratto da colture cellulari, precedentemente esposte e non(campione di riferimento), per 24 h, alle tre dosi di CdS QD ($3 - 7 - 14 \mu\text{g/ml}$), mediante *ZR Genomic DNA II Kit* (ZymoResearch), seguendo le indicazioni fornite dal produttore.

Primer specifici per i geni mitocondriali, *CYTB*, *ND1* e *ND4*, e per il gene nucleare, *ACTB*, sono stati disegnati con l'ausilio del software Primer Express[®] 3.0 (Applied Biosystem).

Le reazioni di amplificazione sono state condotte in un volume finale di $10 \mu\text{l}$ con la seguente composizione della miscela di reazione: $0.4 \mu\text{M}$ di ciascun primer, 5 ng di DNA e 1X *Power SYBR[®] Green Master Mix*. È stato utilizzato lo strumento ABI[®] - PRISM 7000 Sequence Detection System (Applied Biosystems), con il seguente profilo termico:

Profilo termico per Real Time PCR con chimica SYBR® Green						
Hold*	Hold§	PCR (40 cicli)		Dissociazione		
		Denaturazione	Annealing/Estensione			
50°C	95°C	95°C	60°C	95°C	60°C	95°C
2:00	10:00	0:15	1:00	0:15	0:20	0:15

* Attivazione AmpErase® Uracil-N-Glicosilasi (UNG), causa il rilascio di uracile, creando un sito apirimidinico nel DNA. Non presenta attività su RNA o DNA contenente dT.

§ Attivazione AmpliTaq Gold®

Ogni reazione è stata condotta in triplicato e i dati espressi come media dei tre esperimenti indipendenti. La specificità degli ampliconi ottenuti è stata verificata mediante analisi delle curve di dissociazione, confermando la specificità dei primer utilizzati.

La quantità totale di mtDNA, nei diversi campioni, è stata calcolata come differenza del valore di Ct del gene nucleare (scelto come calibratore) e quello del gene mitocondriale, ed espressa come $2^{-\Delta Ct}$, come descritto in lavori precedenti (Dimmock et al., 2008; Liao et al., 2011; Wong et al., 2007; Xing et al., 2008).

Analisi statistica

L'analisi statistica sui dati ottenuti dai diversi esperimenti è stata realizzata con l'ausilio del software IBM SPSS Statistics® v.21. In particolare, sono stati confrontati tra loro in modo da evidenziare le differenze presenti tra le diverse condizioni analizzate. Dapprima è stata verificata l'omoschedasticità della varianza mediante test di Levene. Verificata questa, le medie dei valori sono stati utilizzati per l'analisi della varianza ad una via (ANOVA). Una volta evidenziato un *F-value* significativo ($p < 0.05$), sono stati eseguiti confronti multipli mediante test di Dunnett (per evidenziare le differenze significative tra i campioni trattati ed il campione di riferimento) e test di Tuckey (per osservare le differenze tra tutti i campioni). In assenza di omoschedasticità della varianza, le mediane dei valori sono stati confrontati mediante test non parametrico Kruskal-Wallis e il test di Mann-Whitney per i confronti multipli.

Per l'identificazione dei geni umani ortologhi a quelli di lievito, selezionati precedentemente (Marmioli et al., 2015), è stato utilizzato lo strumento bioinformatico "Gene

and Orthologs" di PANTHER (*Protein ANalysis THrough Evolutionary Relationships*), versione 10.0 (<http://pantherdb.org/>).

Per la visualizzazione grafica dei dati relativi all'analisi di espressione, è stato utilizzato il pacchetto "heatmap.2" incluso nel software R

4. Risultati

Internalizzazione di CdS QD

L'obiettivo principale del presente lavoro di tesi di Dottorato è stato quello di valutare l'eventuale tossicità dei CdS QD e i possibili meccanismi alla base di questa. *In primis* è stato necessario verificare l'assorbimento a livello cellulare di questi nanomateriali mediante analisi con citofluorimetro.

La citometria a flusso è una tecnica analitica che utilizza i principi di dispersione e eccitazione della luce per generare dati multiparametrici da particelle e cellule di dimensioni comprese tra 1-40 μm di diametro. Nella camera di flusso, le particelle o cellule fluiscono in fila e, dopo l'incrocio col fascio luminoso, la luce viene dispersa in varie direzioni. La luce dispersa in avanti, in genere fino a 20° rispetto all'asse del fascio laser, è detta *forward scatter* (FS). L'intensità di FS equivale, all'incirca, alla dimensione della particella o della cellula. La luce che, invece, viene dispersa di circa 90° rispetto al laser è detta *side scatter* (SS; Fig. 4.1). L'intensità di SS fornisce informazioni sulla complessità interna della cellula. Questi parametri possono essere utilizzati per determinare l'assorbimento a livello cellulare dei nanomateriali. Infatti, cellule in cui si è verificato l'internalizzazione dei nanomateriali presenteranno valori di SS maggiori rispetto a cellule in cui questo non è avvenuto.

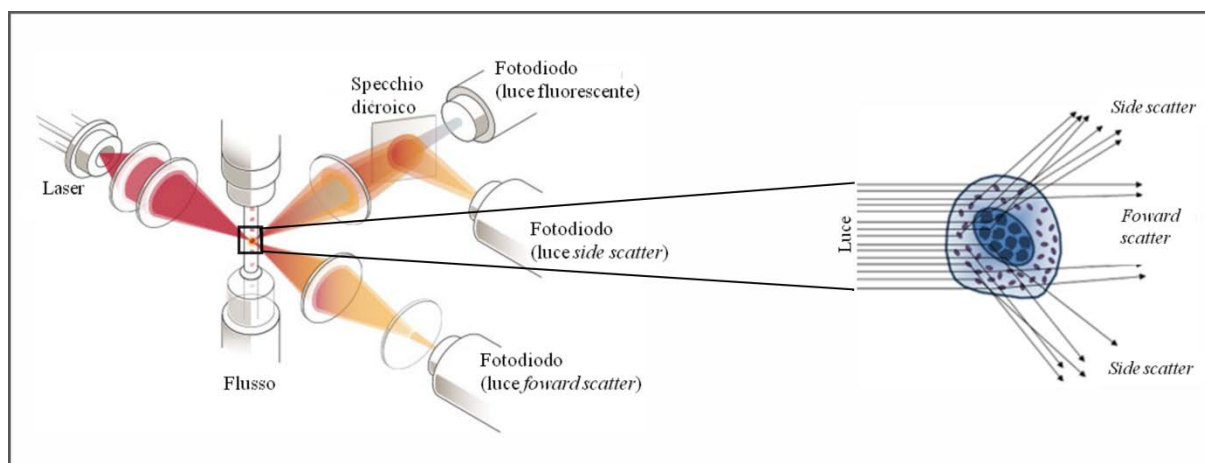


Figura 4.1 Schema rappresentativo del funzionamento di un citofluorimetro.

Viste le piccole dimensioni dei QD utilizzati, per questa analisi la dose di trattamento utilizzata (100 $\mu\text{g/ml}$) è tale da permettere di meglio apprezzare l'eventuale variazione del valore di SS.

Cellule di HepG2 esposte a 100 $\mu\text{g/ml}$ di CdS QD mostrano un aumento nel tempo del valore di SS medio (Fig. 4.2), dimostrando che i CdS QD sono internalizzati a livello cellulare.

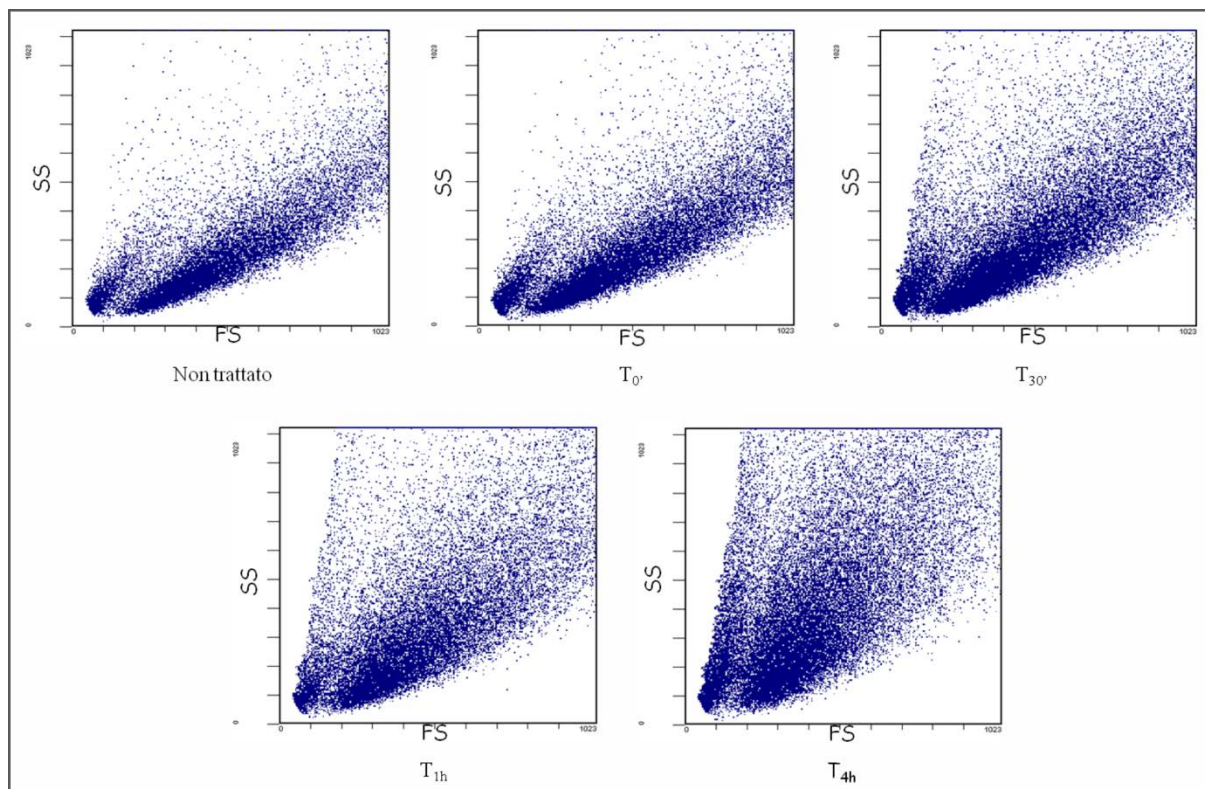


Figura 4.2 Valutazione dell'internalizzazione dei CdS QD mediante analisi di citofluorimetria. Rappresentazione dei valori di FS e SS dei diversi campioni esposti per tempi diversi ai QD.

Inoltre, come si evidenzia dal grafico in Figura 4.3, l'assorbimento a livello cellulare sembra raggiungere un *plateau* dopo 4 ore di trattamento.

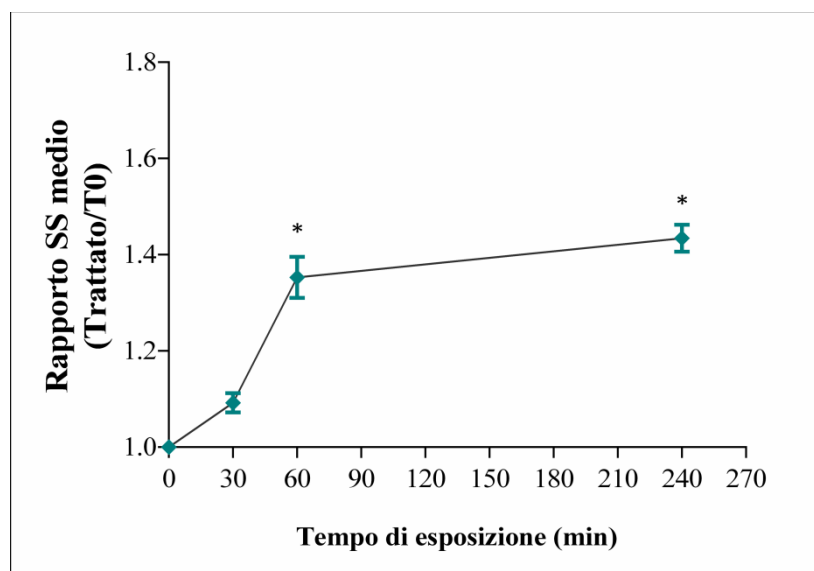


Figura 4.3 Internalizzazione dei CdS QD in funzione del tempo. In figura sono mostrati i valori significativamente differenti dalla condizione in cui le cellule sono state esposte per 0 minuti ai CdS QD (t_0). (*, $p < 0.05$)

Citotossicità

Verificato l'effettivo assorbimento a livello cellulare dei CdS QD da parte di cellule di epatoblastoma umano, è stata valutata la citotossicità di queste molecole utilizzando il saggio MTS.

Tale saggio sfrutta la bioriduzione, ad opera delle cellule, del derivato del tetrazolio in esso contenuto [3 - (4,5-dimethylthiazol-2-yl) - 5 - (3-carboxymethoxyphenyl) - 2 - (4-sulfophenyl) - 2H - tetrazolium, inner salt] (MTS) in formazano, prodotto colorato e solubile nel mezzo di coltura, in presenza di fenanzina etosolfato (PES), agente accoppiante elettronico (Fig. 4.4). Questa conversione è presumibilmente accompagnata dalla produzione di NADPH o NADH, ad opera di deidrogenasi presenti in cellule metabolicamente attive (Berridge and Tan, 1993).

La quantità di formazano prodotta è determinata misurando l'assorbanza a 450 nm ed è direttamente proporzionale alla respirazione cellulare e, quindi, al numero di cellule vive in coltura.

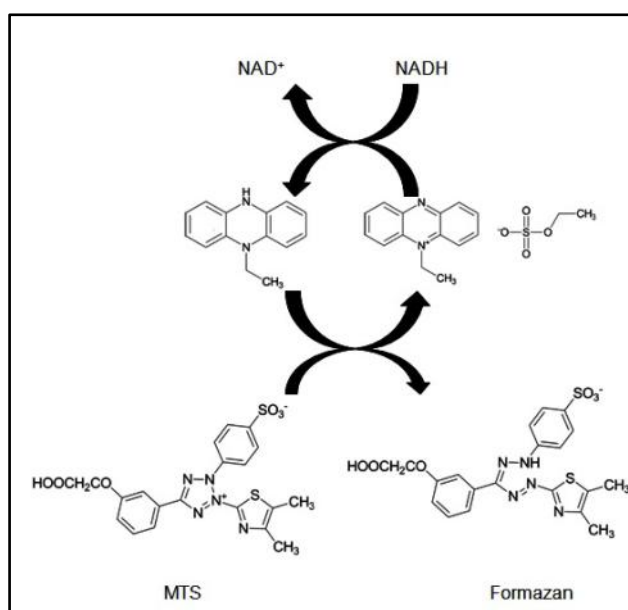


Figura 4.4 Bioriduzione di MTS in formazano.

Colture cellulari di HepG2 sono state esposte a dosi crescenti di QD (1.5 - 100 $\mu\text{g/ml}$) per 24 h. Come mostrato in Figura 4.5, il trattamento causa una significativa riduzione della vitalità cellulare in maniera dose-dipendente. È stato, così, individuato il valore di IC₅₀, per 24 h di trattamento, in 14 $\mu\text{g/ml}$.

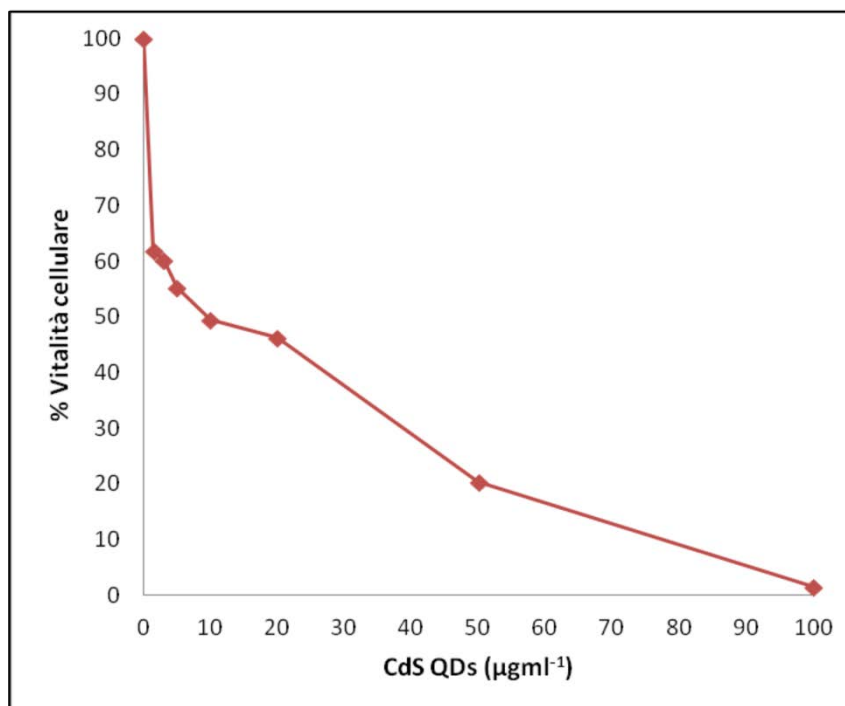


Figura 4.5 Inibizione delle vitalità cellulare in seguito all'esposizione a diverse dosi di CdS QD.

Per escludere la possibilità che gli effetti osservati potessero essere dovuti ad un rilascio di ioni cadmio (Cd^{2+}) da parte dei nanomateriali stessi, le cellule sono state trattate, per 24 h, con CdSO_4 in dosi tali da contenere quantità di ioni Cd^{2+} equivalenti a quella presente nelle dosi di CdS QD utilizzate per i trattamenti. Alla dose più bassa di sale di cadmio (equivalente a $1.5 \mu\text{g/ml}$ CdS QD) è stata osservata una maggiore riduzione (30% in più) della vitalità cellulare rispetto a quella osservata con i CdS QD. Ne consegue che la citotossicità rilevata è imputabile ai soli QD, come già riportato da Marmioli et al. (2015, 2014).

Gli effetti sulla vitalità cellulare dei CdS QD sono stati valutati anche su un'altra linea cellulare HFL1, non tumorale. In questo caso non è stato possibile individuare un valore di IC_{50} , infatti nessuna delle dosi saggiate determina una riduzione apprezzabile della vitalità cellulare. Le colture cellulari, trattate o meno con i CdS QD, sono state visualizzate al microscopio ottico (JuLI™ SMART, 68x). Come risulta evidente dalla Figura 4.6, all'aumentare delle concentrazioni di nanomateriali (le "macchie nere" in figura) la morfologia cellulare viene solo lievemente alterata, lasciando supporre che le cellule siano danneggiate, ma non morte (in questo caso, infatti, perderebbero completamente la loro morfologia). Saranno necessarie ulteriori analisi per poter giungere ad una corretta conclusione.

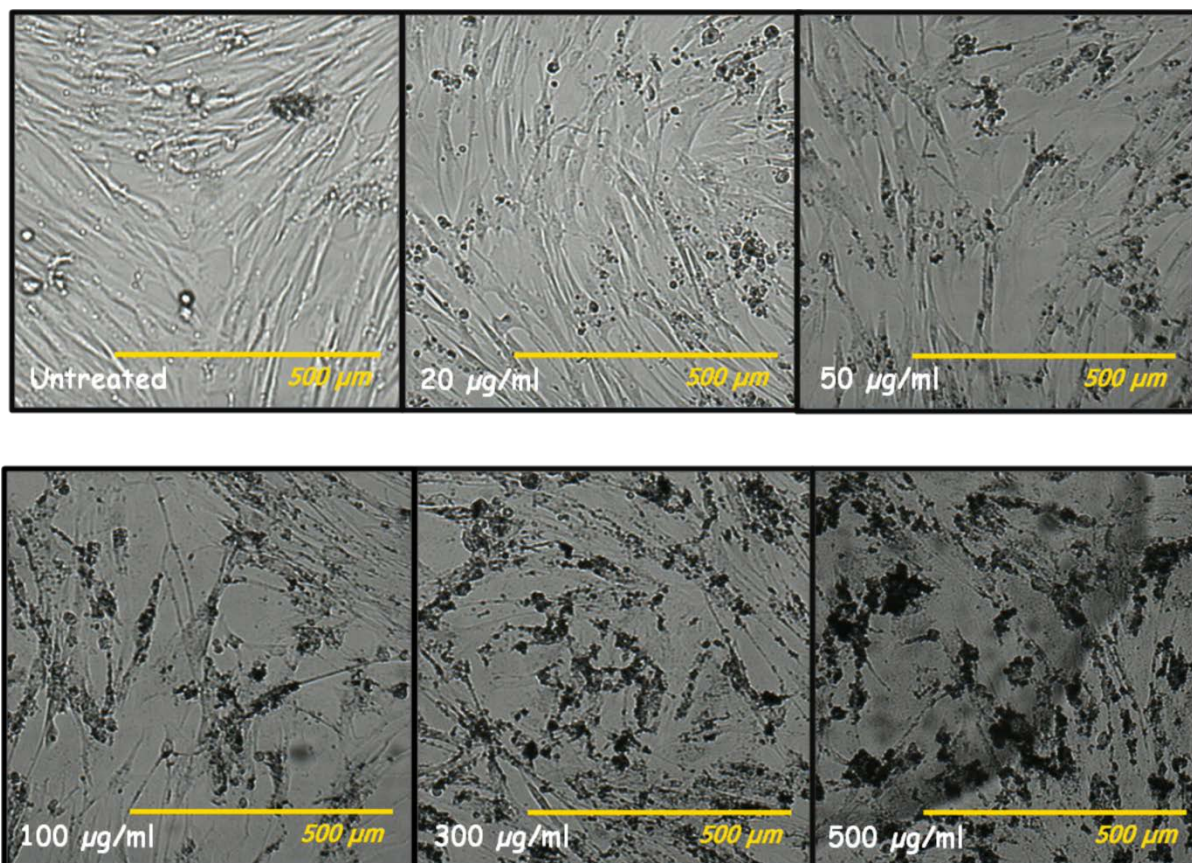


Figura 4.6 Immagini al microscopio ottico di colture cellulari di HFL1 esposte a diverse dosi di CdS QD per 24 ore

Analisi di espressione genica

Per definire il meccanismo molecolare alla base della citotossicità causata dai CdS QD, in cellule HepG2, è stata eseguita un'analisi trascrittomica. Inizialmente, ci si è avvalsi di studi precedenti che, attraverso analisi *in vitro*, hanno evidenziato, in lievito, un numero limitato di geni essenziali determinanti il fenotipo tollerante/sensibile ai medesimi QD utilizzati in questo lavoro. La variazione dei livelli di espressione dei corrispondenti geni umani è stata valutata in cellule HepG2, dopo trattamento con diverse dosi di CdS QD. Inoltre, ulteriori geni sono stati presi in considerazione in modo tale da definire quali tra i principali processi cellulari siano quelli coinvolti nella risposta ai nanomateriali.

Sulla base dei dati ottenuti dal saggio MTS, sono state utilizzate, in un primo momento, due dosi di CdS QD come trattamenti: una sub-tossica, 3 µg/ml, e una tossica, 7 µg/ml.

I dati ottenuti sono mostrati in Figura 4.7 A come *heatmap*; inoltre, i geni, i cui livelli di trascritto variano significativamente rispetto alla condizione di controllo, sono anche mostrati nel diagramma in Figura 4.7 B, in modo da evidenziare quelli che sono modulati positivamente o negativamente in entrambe le condizioni di trattamento.

In particolare, l'analisi di espressione genica ha messo in evidenza una significativa modulazione positiva dei livelli di espressione di geni coinvolti nei processi di PCD. Infatti, i trascritti dei geni pro-apoptotici, *BAX*, *PUMA* e *NOXA*, sono molto più abbondanti in cellule trattate con i QD rispetto alla condizione di riferimento. Lo stesso vale per i trascritti di geni implicati nei processi mitocondriali, come *ATP5L*, *SDHB*, e attivati in risposta allo stress ossidativo (*HSPD1*, *LONP1*) e per *ATG3*, coinvolto nel processo autofagico. Tra i geni implicati nella riparazione del danno al DNA è stata osservata una modulazione positiva solo per alcuni di essi, come *XPA*, *MSH2*, *NBN* e *REVI*.

I dati ottenuti suggeriscono i possibili meccanismi cellulari modulati in seguito all'esposizione ai QD. È stata, quindi, eseguita un'ulteriore analisi (ricorrendo questa volta alla chimica *SYBR[®] Green*) per confermare il reale coinvolgimento di tali processi nella risposta cellulare ai CdS QD. È stata, inoltre, presa in considerazione un'ulteriore condizione di trattamento, ossia una dose tossica intermedia (7 µg/ml). Sono stati, quindi, analizzati tre categorie geniche: geni coinvolti nella PCD, nell'autofagia e nella risposta allo stress. Anche in questo caso i risultati ottenuti sono mostrati come *heatmap* e con diagrammi di Venn solo i geni modulati in maniera significativamente differente dal controllo (Fig. 4.8).

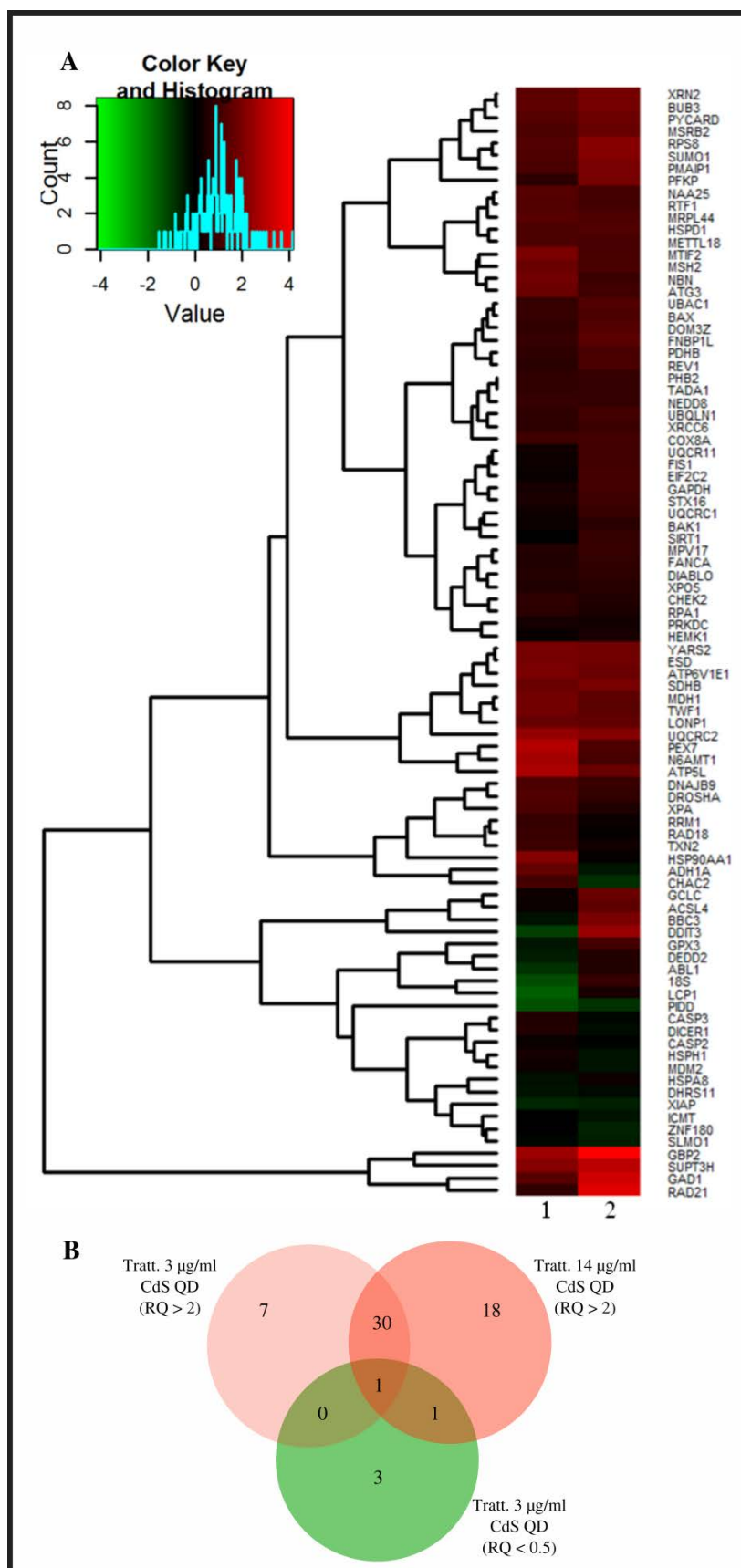


Figura 4.7 **A.** Heatmap relativa all'analisi di espressione mediante *TaqMan*[®] Array Plates su cellule HepG2 esposte a 3 µg/ml (indicato come 1) e a 14 µg/ml (2) di CdS QD per 24 h. **B.** Il numero di geni, i cui livelli di espressione sono significativamente differenti dal campione non trattato, sono rappresentati nel diagramma di Venn, in modo da evidenziare quanti geni sono up- (rosso) o down- (verde) regolati nelle medesime condizioni.

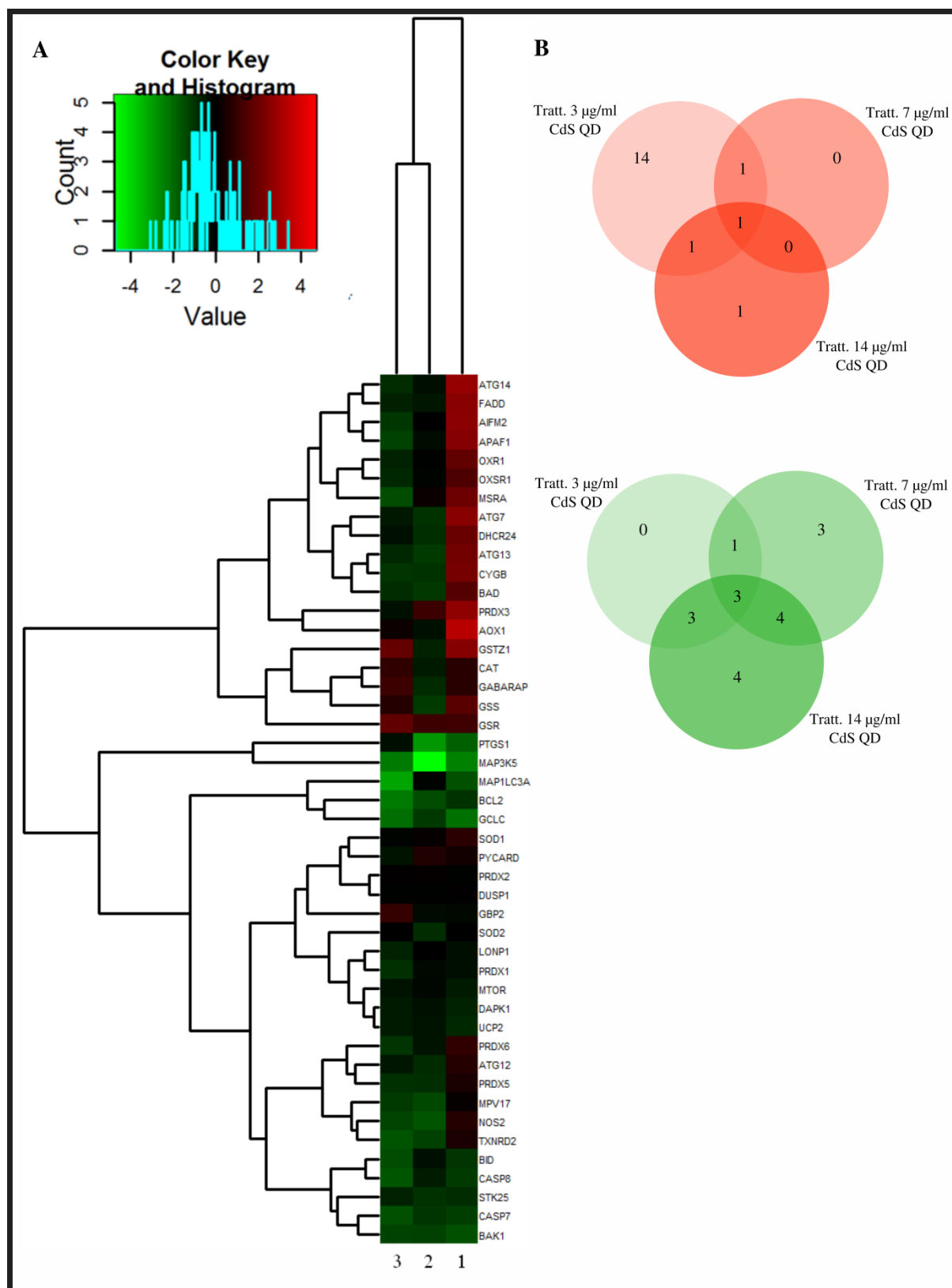


Figura 4.8 **A.** Heatmap relativa all'analisi di espressione mediante chimica *SYBR[®] Green* su cellule HepG2 esposte a 3 µg/ml (indicato come 1), 7 µg/ml (2) e a 14 µg/ml (3) di CdS QD per 24 h. **B.** Il numero di geni, i cui livelli di espressione sono significativamente differenti dal campione non trattato, sono rappresentati nel diagramma di Venn, in modo da evidenziare quanti geni sono up- (rosso) o down- (verde) regolati nelle medesime condizioni.

I dati ottenuti mostrano l'esistenza di una modulazione positiva dell'espressione dei geni considerati in seguito all'esposizione con la dose sub-tossica di CdS QD.

In particolare, per quanto riguarda i geni coinvolti nella PCD (Fig. 4.9), l'esposizione alle dosi tossiche, ha causato una modulazione negativa nei livelli di espressione dei geni considerati. Nel caso, invece, dell'esposizione alla dose sub-tossica di CdS QD è stata osservata una significativa diminuzione dei livelli di trascritto del gene *BCL2*, codificante per una proteina antiapoptotica che impedisce la MOMP legandosi a BAX, bloccandone la dimerizzazione e quindi la creazione di pori sulla membrana mitocondriale. Un comportamento simile è stato riscontrato per i geni *CASP 2*, - *3*, - *7* e - *8*, codificanti le diverse caspasi analizzate, e per il gene *MAP3K5*, che svolge un ruolo cruciale nel pathway di trasduzione del segnale apoptotico mediante attivazione della caspasi. Invece, geni come *AIFM2* (ossidoriduttasi che agisce come effettore del processo apoptotico caspasi indipendente), *APAF1* (richiesto per la formazione dell'apoptosoma), *PYCARD* (media la traslocazione al mitocondrio di BAX) e *BAX* (promuove il rilascio del citocromo c) hanno mostrato una importante modulazione positiva dei loro livelli di trascritto.

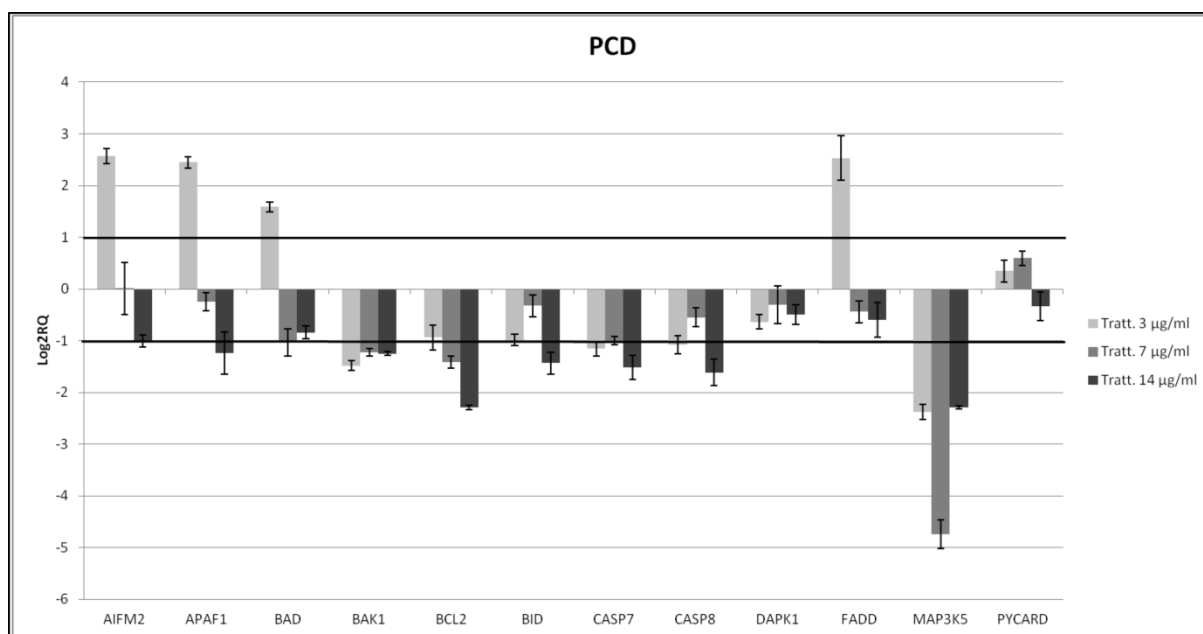


Figura 4.9 Risultati dell'analisi di espressione per i geni coinvolti nei processi di PCD. I dati sono mostrati come Log₂RQ.

Per quanto riguarda la categoria dei geni implicati nel processo autofagico (Fig. 4.10), il trattamento con la dose sub-tossica di CdS QD ha determinato un aumento dei livelli di trascritto di geni coinvolti sia nel processo di nucleazione sia in quello di formazione dell'autofagosoma.

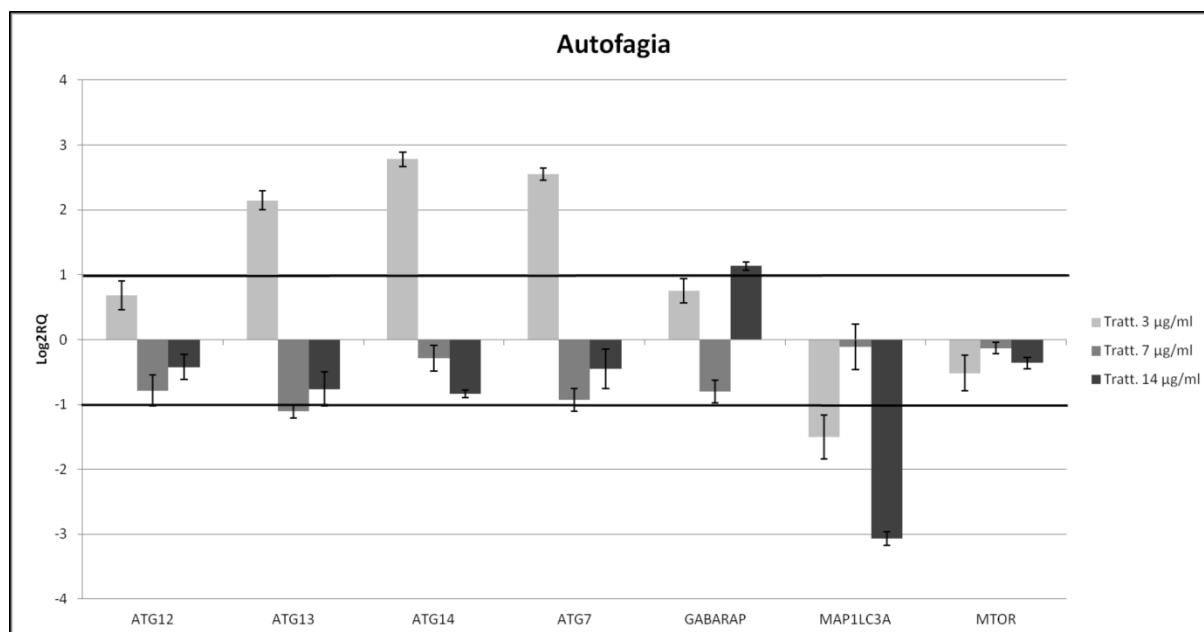


Figura 4.10 Risultati dell'analisi di espressione per i geni coinvolti nel processo autofagico. I dati sono mostrati come Log₂RQ.

Infine, per i geni i cui prodotti sono responsabili della risposta allo stress (Fig. 4.11) è stata osservata una modulazione positiva per *GRS*, il cui prodotto genico, glutatione reduttasi mitocondriale, è implicato nel mantenimento dei livelli citosolici di GSH. Lo stesso è stato riscontrato per il gene *GSTZ*, codificante per la glutatione S-transferasi; tuttavia il gene *GCLC*, il cui prodotto è il primo enzima limitante della biosintesi del glutatione, non subisce alcuna modulazione significativa della sua espressione in seguito al trattamento con i nanomateriali. Inoltre, è stato evidenziato un significativo aumento dei livelli di trascritto dei geni *PRDX3* e *MSRA*, codificanti per proteine che proteggono dal danno ossidativo enzimi ad esso sensibili, e dei geni *OXR1*, *OXSR1*, *DHCR24*, coinvolti nella protezione della cellula dallo stress ossidativo. È stata anche evidenziata una modulazione positiva per i geni *AOX1*, implicato nella regolazione dell'omeostasi delle ROS e codificante per una proteina con attività nitrito reduttasica (Li et al. 2009), e *CYGB*, con funzione di *scavenge* dell'NO e delle ROS (Burmester et al., 2002). Tuttavia, geni codificanti per le superossido dismutasi e le catalasi non subiscono alcuna variazione dei loro livelli di trascritto, in seguito al trattamento con i nanomateriali.

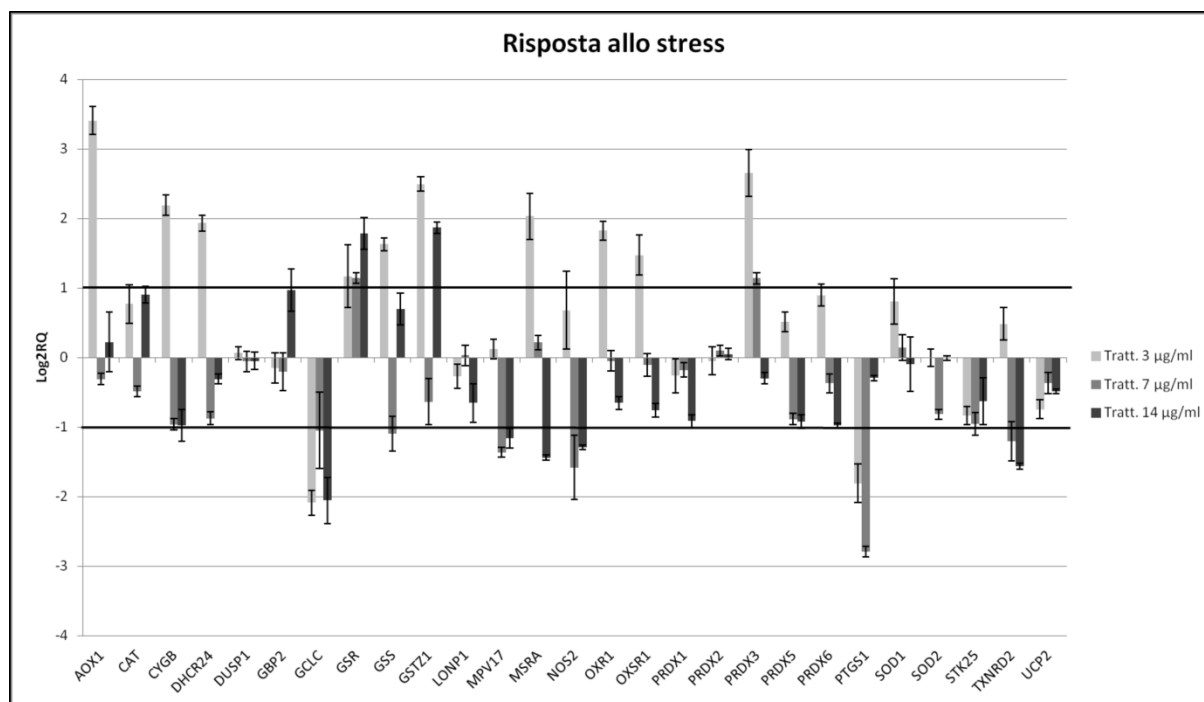


Figura 4.11 Risultati dell'analisi di espressione per i geni coinvolti nella risposta allo stress. I dati sono mostrati come Log₂RQ.

In generale, quindi, l'analisi quantitativa di espressione genica lascia supporre una pre-attivazione di un processo di morte programmata (molto probabilmente quello *apoptotic-like* PCD, poichè non si osserva un'attivazione delle caspasi), un'attivazione del processo autofagico e un coinvolgimento dei processi di controllo dell'omeostasi cellulare.

Determinazione di danno al DNA

Vista la modulazione positiva di alcuni geni implicati nella riparazione del danno al DNA risultante dall'analisi trascrittomica, è stata indagata anche la possibilità che questi QD determinino tale tipologia di danno in cellule ad esse esposte, mediante *Comet assay*.

Il principio di base del *Comet assay* è che la migrazione del DNA, in una matrice di agarosio sottoposta a specifiche condizioni elettroforetiche, presenterà una forma a cometa se presente danno al DNA. La testa della cometa (regione nucleare) sarà costituita da DNA integro mentre la coda, rivolta in direzione dell'anodo, presenterà DNA frammentato. La versione alcalina (pH >13) di tale metodologia risulta essere un metodo sensibile per la valutazione di rotture a singolo filamento e dei siti sensibili all'ambiente alcalino, come siti apirimidinici e apurinici, che si formano in seguito alla perdita e all'ossidazione delle basi azotate.

Poiché, per tale analisi, è necessario utilizzare una dose che non causi una mortalità cellulare superiore al 30%, sono stati utilizzati 1.5 µg/ml di CdS QD come dose di trattamento. Infatti, una mortalità elevata porterebbe ad un aumento eccessivo dei nuclei con classe di danno elevate. I dati ottenuti (Fig. 4.12) mostrano, dopo 1 h di trattamento, un lieve aumento della TI% (circa il 5% rispetto alla condizione di riferimento), molto probabilmente imputabile ad una risposta precoce allo stress ossidativo, che viene quasi completamente recuperato dopo 24 h di esposizione. In questo caso, infatti, la TI% ritorna a valori basali; quanto osservato può, molto probabilmente, essere dovuto all'azione di enzimi di risposta al danno al DNA, come MSH2, i cui geni codificanti hanno evidenziato un aumento dei loro livelli di trascritto nell'analisi di espressione genica precedentemente descritta.

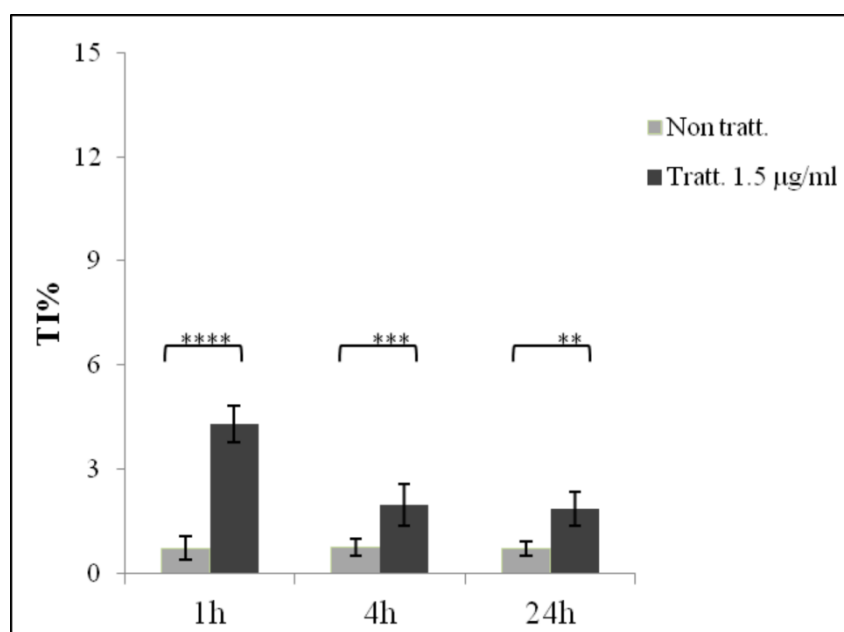


Figura 4.12 Effetto dell'esposizione ai CdS QD sul DNA nucleare. Il danno al DNA è espresso come TI%. I dati significativamente diversi dalla condizione di non trattamento sono mostrati come: **= $p \leq 0.01$; ***= $p \leq 0.001$; ****= $p \leq 0.0001$.

La cellula, quindi, in presenza di un blando effetto genotossico, causato direttamente o indirettamente dai CDS QD, reagisce modulando positivamente l'espressione dei geni coinvolti nella riparazione del danno al DNA e riuscendo, in 24 h, a recuperare quasi completamente il danno subito.

Saggi per la valutazione dello stress ossidativo

Per valutare l'induzione dello stress ossidativo in cellule esposte ai CdS QD sono stati determinati i livelli intracellulari delle ROS, del glutatione e dell'NO.

Da un'analisi qualitativa al microscopio a fluorescenza è stato osservato che l'esposizione ai CdS QD, in colture cellulari di HepG2, causa, direttamente o indirettamente, un aumento di ROS, dopo trattamento di 4 h con la dose tossica (Fig. 4.13).

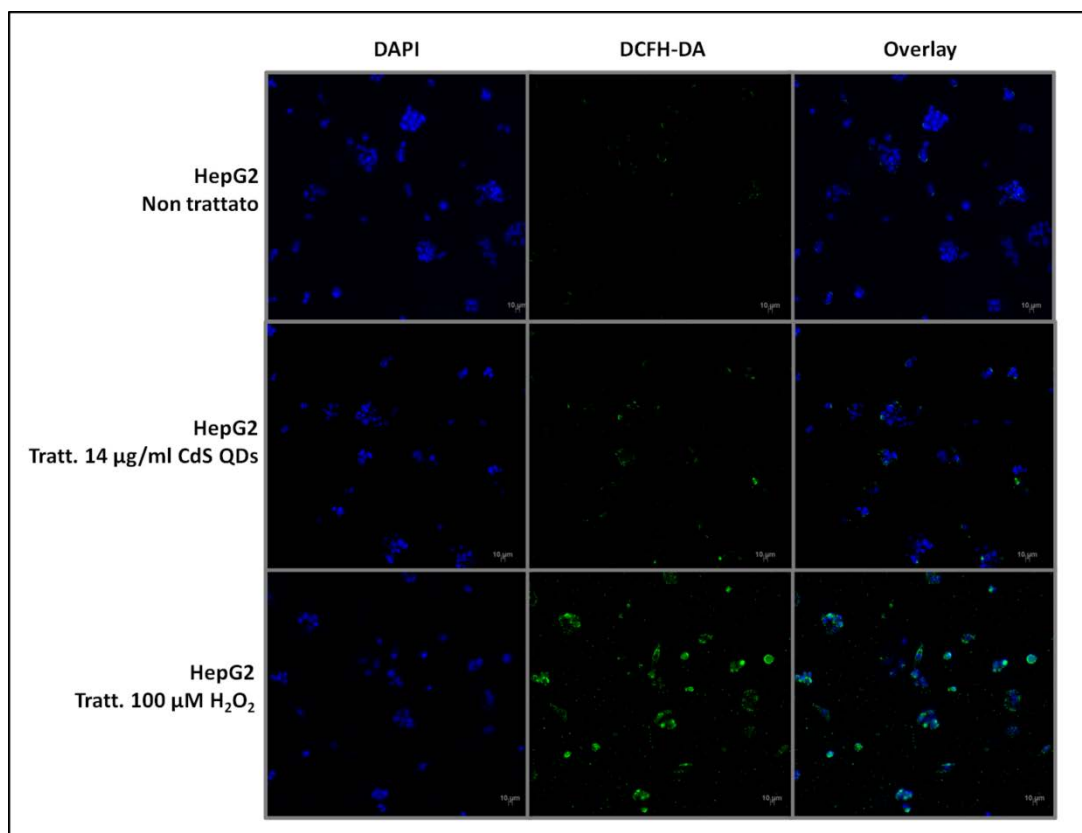


Figura 4.13 Analisi qualitativa, al microscopio a fluorescenza, della produzione di ROS. I nuclei sono colorati col DAPI e mostrati in blu; la produzione di ROS è evidenziata in verde come risultato dell'ossidazione della DCFH-DA.

In particolare, mediante analisi allo spettrofluorimetro, è stato quantificato un lieve aumento di $\approx 20\%$ dei livelli di ROS intracellulari rispetto al controllo, dopo 1 h di trattamento. Tali specie molecolari aumentano di $\approx 60\%$, dopo 4 h di esposizione alle dosi tossiche (Fig. 4.14).

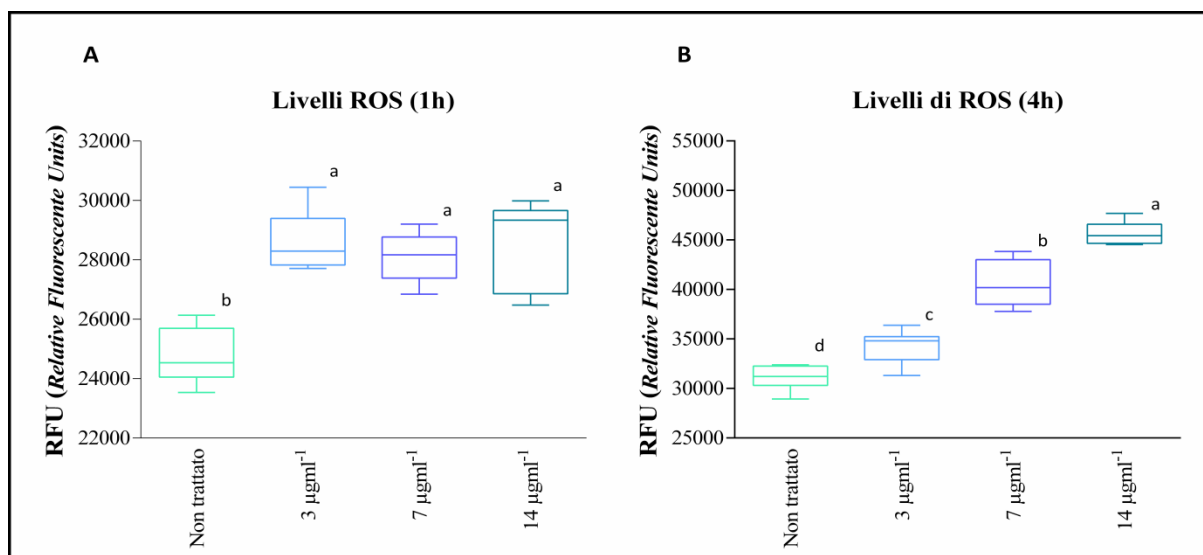


Figura 4.14 Livelli intracellulari di ROS in cellule HepG2. Lettere differenti indicano una differenza significativa, $p < 0.5$.

Essendo il glutatione un fattore chiave nella segnalazione della presenza di stress ossidativo, nella detossificazione di xenobiotici e nella modulazione della proliferazione cellulare e dell'apoptosi (Lu, 2013), ne sono stati misurati i livelli intracellulari in cellule trattate e non con i CdS QD. Tuttavia, non sono state evidenziate differenze significative tra le diverse condizioni saggiate. Non si osserva, infatti, alcuna variazione significativa dello stato redox del glutatione (Fig. 4.15).

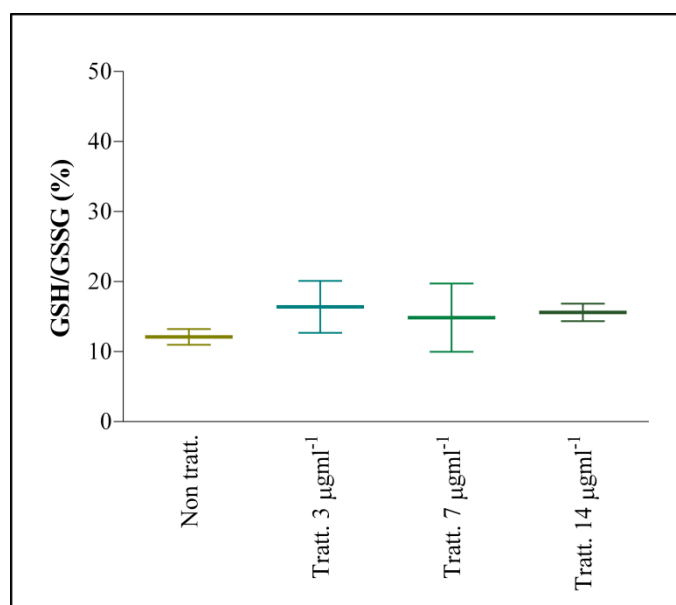


Figura 4.15 Stato redox del glutatione (%) nelle diverse condizioni di trattamento.

Poiché è noto che l'NO può potenziare i danni causati dello stress ossidativo mediante S-nitrosilazione dei residui di cisteina di un ampio spettro di proteine (come fattori di

apoptosi, 26S del proteasoma) (Napoli et al., 2013), ne sono stati valutati i livelli presenti in cellule esposte ai CdS QD. Dalle analisi non sono emerse importanti variazioni dei livelli intracellulari di questa specie molecolare dopo un'esposizione di 1 e 4 ore (Fig. 4.16).

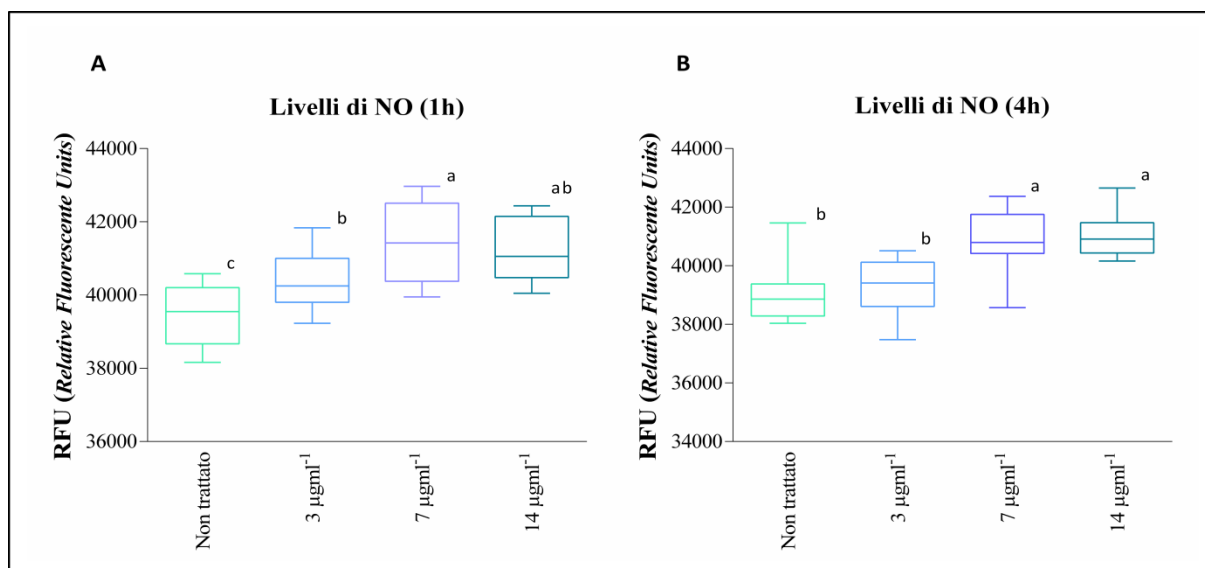


Figura 4.16 Livelli intracellulari di NO in cellule HepG2. Lettere differenti indicano una differenza significativa, $p < 0.5$.

Saggio per la determinazione dell'integrità mitocondriale

L'instaurarsi di stress ossidativo unitamente all'attivazione del PCD e al processo autofagico sembrerebbe implicare una disfunzione mitocondriale. Visto che il potenziale di membrana è fondamentale per il corretto funzionamento di questo organello, nonché dell'intera cellula, ne è stata verificata la perdita nelle cellule trattate con i CdS QD mediante rodamina B. Questa, infatti, si accumula come aggregati nella matrice mitocondriale solo negli organelli integri e correttamente funzionanti. Tale accumulo è direttamente proporzionale al potenziale di membrana (Reungpatthanaphong et al., 2003). L'analisi al citofluorimetro ha evidenziato una diminuzione significativa (15%) della fluorescenza emessa in seguito all'esposizione ai nanomateriali (14 µg/ml). Tale risultato indica che un trattamento, di 4 h, con i QD determina la perdita del potenziale di membrana mitocondriale in cellule HepG2.

Inoltre è stato determinato se, in seguito all'alterazione della funzionalità mitocondriale, si registrasse una variazione nel contenuto di mtDNA dopo trattamento con CdS QD, mediante Real Time-PCR. I dati ottenuti non hanno evidenziato alcuna differenza significativa nel numero di copie del mtDNA tra campioni trattati e non con i QD (Fig. 4.17).

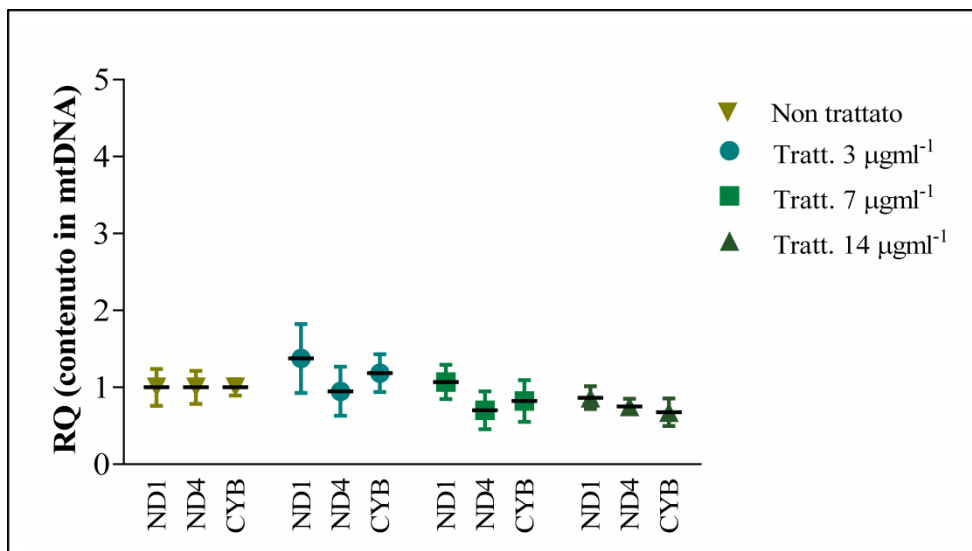


Figura 4.17 Quantità relativa di tre geni mitocondriali, *ND1*, *ND4*, *CYB*.

5. Discussione

I CdS QD presentano peculiari caratteristiche ottiche ed elettroniche che li rendono particolarmente interessanti per diverse applicazioni umane (Hardman, 2006). Tuttavia, proprio queste nuove proprietà potrebbero essere responsabili di altrettanto nuovi effetti tossici. Risulta, quindi, necessario far luce su quelli che potrebbero essere gli effetti sulla salute umana in seguito all'utilizzo di materiali o tecnologie a base di CdS QD. Tali materiali, infatti, viste le piccole dimensioni e le proprietà chimico-fisiche possono interagire in maniera del tutto diversa, rispetto ai materiali della medesima composizione chimica in scala non nanometrica, con cellule e componenti cellulari. Le informazioni tossicologiche sui CdS QD sono ancora molto frammentarie e incomplete; tuttavia concordano sulla possibilità che tali nanomateriali possano determinare una rilevante interazione tossica con i sistemi biologici (Chen et al., 2012; Rzigalinski and Strobl, 2009; Valizadeh et al., 2012).

In questo lavoro di tesi di Dottorato sono stati indagati i meccanismi molecolari e cellulari implicati nell'interazione con i CdS QD, in linee cellulari umane. Essendo tali nanomateriali a base di cadmio, i cui rilevanti effetti nocivi sulla salute umana sono ampiamente noti, è stata, dapprima, verificata la tossicità di questi QD in una linea cellulare epatica derivante da un epatoblastoma umano (HepG2). È noto, infatti, che il cadmio esplica parte della sua tossicità mediante accumulo in specifici organi, tra cui il fegato (ASTDR, 2012; Fowler, 2009). Studi recenti dimostrano, inoltre, che i QD a base di Cd, una volta introdotti per via sistemica, sono anch'essi accumulati nel fegato (Haque et al., 2013; Kato et al., 2010). È stata, anche, presa in considerazione un'ulteriore linea cellulare derivante da fibroblasti polmonari (HFL1). Questa è rappresentativa di un'ulteriore distretto corporeo, quello polmonare, e di un'altra via di esposizione, quella inalatoria, rispetto alla linea cellulare HepG2.

I dati ottenuti hanno messo in evidenza come, l'internalizzazione a livello cellulare dei CdS QD, determini nelle cellule HepG2 un effetto citotossico dose-dipendente. È stato, inoltre, osservato che il grado di tossicità rilevato è molto minore rispetto a quello riscontrato in cellule trattate con CdSO₄ ad una concentrazione di cadmio equivalente. Tale osservazione suggerisce, in accordo con quanto visto da Marmioli et al. (2014), che un'eventuale rilascio di Cd²⁺ non risulta rilevante al fine della tossicità osservata.

L'analisi trascrittomico, condotta su colture cellulari esposte, per 24 h, ad una dose sub-tossica e due dosi tossiche di CdS QD, ha permesso di definire il meccanismo alla base della citotossicità osservata. I dati ottenuti, infatti, mostrano una significativa modulazione di

una serie di geni coinvolti principalmente in tre processi cellulari: autofagia, risposta allo stress e PCD.

Un aumento dei livelli di trascritto di geni come *OXSRI*, *OXRI*, *AOXI* e geni codificanti per proteine *heat shock* lascia supporre un aumento dello stress ossidativo in seguito all'esposizione alla dose sub-tossica di CdS QD. A supporto di questa ipotesi è stata osservata una modulazione positiva anche per il gene *GSTZ1*, che svolge un ruolo importante nella protezione dagli effetti tossici causati dalle ROS. Sembra, quindi, che l'esposizione a 3 µg/ml di CdS QD causi, direttamente o indirettamente, un lieve danno ossidativo in cellule HepG2, tale da determinare un aumento dei livelli di trascritto di geni i cui prodotti proteici contrastino gli effetti di tale danno, specialmente a carico del mitocondrio (fonte principale di ROS (Balaban et al., 2005). In particolare, la modulazione positiva del gene *OXRI*, regolatore chiave nella prevenzione degli effetti del perossido di idrogeno, potrebbe prevenire l'insorgenza di danno al mtDNA e la perdita del numero di copie del mtDNA causati dallo stress ossidativo (Yang et al., 2014). Questa ipotesi è ulteriormente supportata dall'aumento dei livelli di trascritto di *LONPI*, codificante per una proteina della matrice mitocondriale, che ha il ruolo di degradare selettivamente polipeptidi *misfolded* o danneggiati dalle ROS, nel mitocondrio, e può anche essere implicata nel mantenere l'integrità del mtDNA (Bayot et al., 2014). Inoltre, i dati di espressione genica ottenuti per questi ultimi geni avvalorano la teoria che la cellula, in seguito all'esposizione ai CdS QD, cerchi di prevenire l'insorgenza di danno al mtDNA. L'ipotesi che i CdS QD determinino un aumento di ROS, nelle cellule HepG2 ad essi esposte, è confermata anche da quanto evidenziato dal saggio basato sulla DCFH-DA. Da questo saggio, infatti, è stato osservato come queste specie molecolari aumentino dopo 1 e 4 h di trattamento. Tuttavia, da ulteriori analisi, non è stata rilevata, rispetto alla condizione di controllo, un'alterazione del rapporto GSH/GSSG comunemente riscontrabile in condizioni di stress ossidativo. Ma la modulazione positiva osservata per i geni *GSTZ1* e *GSR* potrebbe suggerire che, le proteine da esse codificate, possano essere in grado di mantenere costanti i livelli intracellulari di GSH. Il primo gene, infatti, codifica per una glutatione S transferasi, che gioca un ruolo fondamentale nella resistenza cellulare allo stress ossidativo, mentre il secondo gene codifica per la glutatione reduttasi, enzima necessario per la riduzione del GSSG.

L'analisi di espressione genica suggerisce, inoltre, la pre-attivazione del processo di PCD. Infatti, nella condizione di trattamento con la dose sub-tossica di CdS QD, è stata osservata una modulazione positiva dei geni implicati principalmente nel processo *apoptotic-*

like PCD; un esempio è dato da *AIFM2*, probabile ossidoriduttasi che agisce come effettore mitocondriale caspasi-indipendente. Inoltre, l'analisi ha evidenziato una diminuzione dei livelli di trascritto di *BCL2*, la cui proteina corrispondente è coinvolta nel mantenimento del potenziale di membrana mitocondriale in modo da bloccare il rilascio di proteine, come cyt c e AIF (Pradelli et al., 2010; Susin, 1996). Contemporaneamente è stato osservato un aumento dei livelli di trascritto del gene *APAF1*, che codifica per una proteina che, insieme alla procaspasi 9 e al cyt c, è necessaria per la formazione del complesso dell'apoptosoma (Green and Reed, 1998; Schultz and Harrington, 2003), necessario nel processo apoptotico intrinseco. Un comportamento analogo è stato registrato per *PYCARD* e *NOXA*. Le proteine codificate da questi geni sono implicati nell'attivazione della caspasi 9, i cui livelli di espressione non sono stati, però, indagati. Si potrebbe, quindi, supporre anche una pre-attivazione del processo apoptotico intrinseco, invece che di quello *apoptotic-like*, ma l'assenza di modulazione positiva dei geni codificanti per le caspasi lascia propendere maggiormente per quest'ultimo.

L'ipotesi dell'attivazione del processo *apoptotic-like* PCD è supportata anche dalla alterazione del potenziale di membrana mitocondriale osservato in cellule esposte ai CdS QD. Un dato simile è stato riscontrato anche per altri QD, come CdSe e CdTe (Chan et al., 2006; Nguyen et al., 2015). Studi recenti, inoltre, hanno mostrato che un evento precoce nella morte cellulare programmata è rappresentato dalla iperpolarizzazione della membrana mitocondriale (Gross et al., 2000; Kroemer and Reed, 2000).

Sono stati, inoltre, valutati i livelli di NO nelle diverse condizioni di trattamento, visto che tale specie molecolare svolge diversi e importanti ruoli cellulari. L'NO, infatti, ha una azione citoprotettiva (Clemens, 1999) e può anche attenuare l'azione delle caspasi mediante S-nitrosilazione (Li et al., 1997; Rodríguez-Hernández et al., 2015). Tale molecola potrebbe, quindi, evitare la morte cellulare anche dopo attivazione delle caspasi (Li et al., 1997). Tuttavia, non sono state osservate importanti variazioni dei livelli intracellulari di tale specie molecolare in seguito all'assorbimento a livello cellulare dei nanomateriali a conferma dell'attivazione del processo di PCD.

I dati ottenuti lasciano supporre che, in seguito all'esposizione con la dose sub-tossica di QD, la cellula risponda con una pre-attivazione del macchinario cellulare per i processi di PCD, in attesa del raggiungimento di una nuova omeostasi cellulare o all'avviarsi del processo prolungando l'esposizione.

L'analisi di espressione genica ha, inoltre, permesso di evidenziare la possibile attivazione del processo autofagico, in seguito all'esposizione ai CdS QD. La cellula, quindi, potrebbe cercare di prevenire il collasso del sistema cellulare mediante l'attivazione di un importante meccanismo di *rescue*. I principali geni implicati in questo processo hanno mostrato un aumento dei loro trascritti in cellule esposte alle dosi sub-tossiche di CdS QD, lasciando supporre che il processo autofagico svolga, in queste condizioni, un ruolo nella prevenzione del danno intracellulare. È noto, infatti, che la formazione delle ROS, con conseguente aumento delle proteine *misfolded*, determina un'induzione dell'autofagia (Chen et al., 2008). Inoltre, anche i danni riscontrati a livello mitocondriale potrebbero determinare l'attivazione di tale processo cellulare, in quanto la mitofagia determina la degradazione di questi organelli danneggiati (Priault et al., 2005; Rodríguez-Hernández et al., 2009). Tale processo, inoltre, costituisce un meccanismo per la riduzione dei livelli delle ROS e per la sopravvivenza cellulare (He and Klionsky, 2009). L'ipotesi che il processo autofagico venga attivato dalle cellule HepG2 in risposta all'esposizione ai CdS QD è supportata, non solo da quanto appena descritto, ma anche da recenti studi che descrivono come tale processo sia un'appropriata risposta cellulare per la *clearance* dei nanomateriali (Stern and Johnson, 2008; Stern et al., 2008). Questi, infatti, possono essere sequestrati nelle vescicole autofagiche e selettivamente compartimentalizzate nell'autofagosoma (Seleverstov et al., 2006). Allo stesso tempo, un eccessivo accumulo di questi nanomateriali nell'autofagosoma potrebbe portare ad una disfunzione del processo autofagico stesso, attraverso il blocco del flusso autofagico. Questo scenario potrebbe essere associato all'accumulo di proteine ubiquitinate e alla disfunzione mitocondriale, e quindi alla tossicità osservata in seguito ad un'esposizione cellulare ai nanomateriali (Stern et al., 2012).

In accordo con le nostre osservazioni, i CdS QD svolgono un'azione citotossica in cellule HepG2, inducendo un modesto stress ossidativo e determinando l'attivazione del processo autofagico e la pre-attivazione dei componenti chiave dei processi di morte programmata (Fig. 5.1).

In questo lavoro di tesi di Dottorato è stata presa in considerazione anche una linea cellulare non tumorale, HFL1, per descrivere i meccanismi di risposta attivati da questa tipologia di cellule, in seguito all'esposizione ai CdS QD. I dati attualmente a nostra disposizione non ci permettono di formulare un'ipotesi sui meccanismi cellulari coinvolti nella risposta ai CdS QD da parte dei fibroblasti polmonari. È possibile solo ipotizzare una citotossicità, causata dai QD, differente nei due tipi cellulari considerati, poichè non è stata

osservata una riduzione apprezzabile della vitalità cellulare, dopo trattamento con concentrazioni di CdS QD maggiori rispetto a quelle utilizzate per trattare la linea cellulare HepG2.

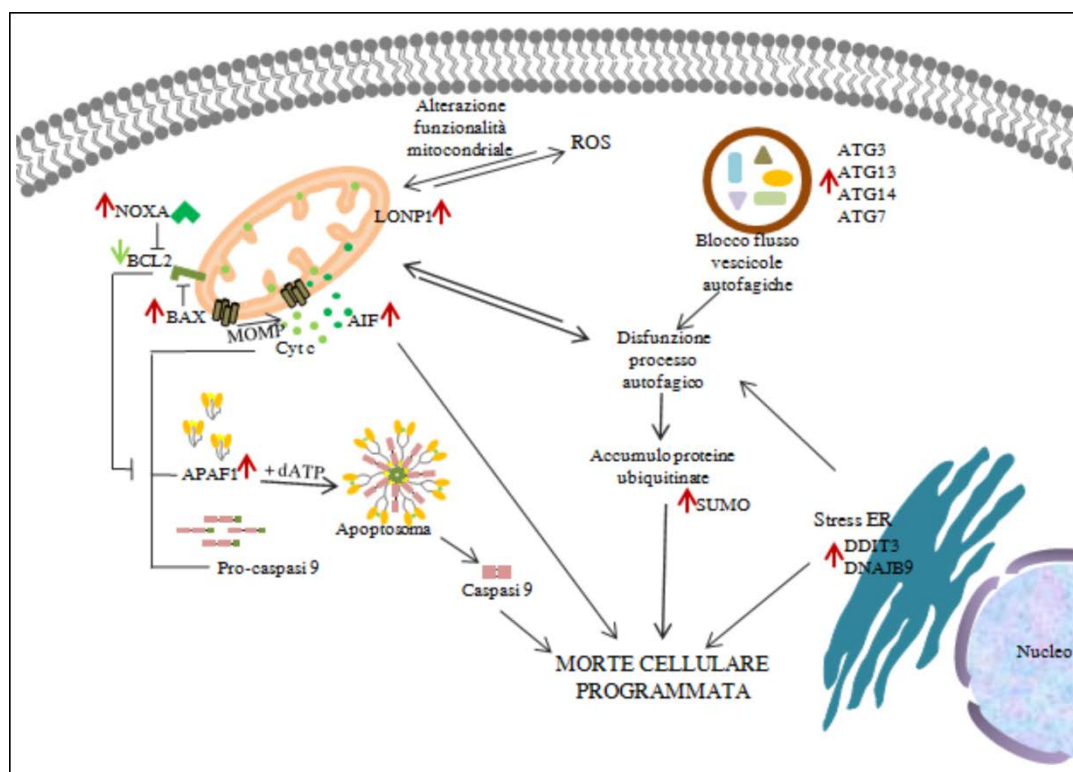


Figura 5.1 Modello di interazione tra i processi implicati nella risposta cellulare ai CdS QD messi in evidenza da questo lavoro. La modulazione positiva di alcuni dei geni analizzati è indicata con frecce rosse, e quella negativa con frecce verdi. L'alterazione della funzionalità mitocondriale è collegata allo stress ossidativo, in quanto i mitocondri sono i principali generatori di ROS. I CdS QD possono essere compartimentalizzati nell'autofagosoma, determinando un blocco del flusso autofagico con conseguente alterazione del processo stesso. Questo potrebbe essere dovuto anche ad un accumulo di proteine ubiquitinate. La cellula risponde alla presenza dei CdS QD attivando diversi meccanismi di *rescue* per cercare di ritornare ad una situazione di omeostasi. Allo stesso tempo si osserva una pre-attivazione del processo di PCD, da avviare in caso di un insuccesso dei meccanismi di *rescue* o di una prolungata esposizione ai QD.

6. Conclusioni

La linea di ricerca seguita durante il dottorato ha riguardato lo studio degli effetti dei CdS QD in cellule HepG2, portando alla determinazione del potenziale meccanismo di tossicità esplicito da questi nanomateriali. È stato dimostrato l'assorbimento a livello cellulare di questi QD monitorando la variazione del SS-medio rispetto alla condizione di controllo in colture cellulari trattate, per tempi diversi, con i CdS QD. L'*uptake* ha determinato una importante modulazione di una serie di geni chiave implicati sia nel processo apoptotico, sia in meccanismi di *rescue* (autofagia, *clearance* delle ROS, risposta a stress ossidativo) portando ad ipotizzare un duplice ruolo dell'interazione dei QD con il sistema cellulare. Infatti, dosi sub-tossiche di CdS QD sembrano determinare una risposta cellulare caratterizzata dall'attivazione di meccanismi di *rescue* e contemporanea pre-attivazione del processo di PCD, presumibilmente quello *apoptotic-like*. Il corrispondente aumento dei livelli di trascritto osservato per i fattori pro-apoptotici potrebbe, o no, condurre ad una morte cellulare tardiva, a seconda se i meccanismi di *rescue* attivati saranno in grado di ripristinare la condizione di omeostasi cellulare.

Inoltre, nonostante l'induzione dello stress ossidativo sia considerata un evento chiave nella tossicità dei nanomateriali a base metallica (Hossain and Mukherjee, 2013), nelle condizioni da noi analizzate, l'aumento relativamente tardivo delle ROS, non sembra determinare un rilevante coinvolgimento dello stress ossidativo nella tossicità specifica di CdS QD. L'assenza di un importante danno genotossico, in seguito al trattamento con i QD, è un ulteriore supporto all'ipotesi di un contributo minore dello stress ossidativo nel meccanismo di tossicità e, inoltre, sembra escludere altre forme di interazione con il materiale genetico.

Sarà sicuramente necessario un'ulteriore analisi delle interazioni fisico-chimiche dei QD con i componenti cellulari per stabilire se, la tossicità osservata, sia dovuta ad un semplice ostacolo fisico o ad una specifica interazione con l'apparato cellulare. Inoltre potrebbero essere informativo caratterizzare anche gli effetti a lungo termine, simulando un'esposizione cronica ai CdS QD.

Concludendo, i dati ottenuti da questo studio supportano la scelta di procedere con cautela all'utilizzo dei QD e la necessità di un'accurata valutazione del rischio basata sui dati fino ad ora a disposizione e su ulteriori studi su linee cellulari non cancerogene (come la linea cellulare HFL1) e/o su sistemi *in vivo*, per confermare, in maniera esaustiva, gli effetti tossici sull'intero organismo.

Bibliografia

- ASTDR, 2012. Toxicological Profile for Cadmium. U.S Public Health Service, Agency for Toxic Substances and Disease Registry 1–487.
- Auffan, M., Achouak, W., Rose, J., Roncato, M.-A., Chanéac, C., Waite, D.T., Masion, A., Woicik, J.C., Wiesner, M.R., Bottero, J.-Y., 2008. Relation between the Redox State of Iron-Based Nanoparticles and Their Cytotoxicity toward *Escherichia coli*. *Environmental Science & Technology* 42, 6730–6735.
- Balaban, R.S., Nemoto, S., Finkel, T., 2005. Mitochondria, Oxidants, and Aging. *Cell* 120, 483–495.
- Bao, H., Gong, Y., Li, Z., Gao, M., 2004. Enhancement Effect of Illumination on the Photoluminescence of Water-Soluble CdTe Nanocrystals: Toward Highly Fluorescent CdTe/CdS Core–Shell Structure. *Chemistry of Materials* 16, 3853–3859.
- Bayot, A., Gareil, M., Chavatte, L., Hamon, M.P., L’Hermitte-Stead, C., Beaumatin, F., Priault, M., Rustin, P., Lombès, A., Friguet, B., Bulteau, A.L., 2014. Effect of Lon protease knockdown on mitochondrial function in HeLa cells. *Biochimie* 100, 38–47.
- BBCResearch, 2014. Nanotechnology: a realistic market assessment. URL <http://www.bccresearch.com/market-research/nanotechnology/nanotechnology-market-assessment-report-nan031f.html>
- Berridge, M. V, Tan, A.S., 1993. Characterization of the cellular reduction of 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT): subcellular localization, substrate dependence, and involvement of mitochondrial electron transport in MTT reduction. *Archives of biochemistry and biophysics* 303, 474–82.
- Beyersmann, D., 2002. Effects of carcinogenic metals on gene expression. *Toxicology Letters* 127, 63–68.
- Beyersmann, D., Hechtenberg, S., 1997. Cadmium, gene regulation, and cellular signalling in mammalian cells. *Toxicology and applied pharmacology* 144, 247–261.
- Borm, P.J., Robbins, D., Haubold, S., Kuhlbusch, T., Fissan, H., Donaldson, K., Schins, R., Stone, V., Kreyling, W., Lademann, J., Krutmann, J., Warheit, D., Oberdorster, E., 2006. The potential risks of nanoamaterials: a review carried out for ECETOC. *Particle and Fibre Toxicology* 3, 11.
- Bruchez Jr., M., 1998. Semiconductor Nanocrystals as Fluorescent Biological Labels. *Science* 281, 2013–2016.

- Bu, Y., Chen, Z., Li, W., Yu, J., 2013. High-efficiency photoelectrochemical properties by a highly crystalline CdS-sensitized ZnO nanorod array. *ACS Applied Materials & Interfaces* 5, 5097–104.
- Burleson, D.J., Driessen, M.D., Penn, R.L., 2004. On the Characterization of Environmental Nanoparticles. *Journal of Environmental Science and Health, Part A* 39, 2707–2753.
- Burmester, T., Ebner, B., Weich, B., Hankeln, T., 2002. Cytoglobin: a novel globin type ubiquitously expressed in vertebrate tissues. *Molecular biology and evolution* 19, 416–421.
- Cai, R., Kubota, Y., Shuin, T., Sakai, H., Hashimoto, K., Fujishima, A., 1992. Induction of Cytotoxicity by Photoexcited TiO₂ Particles. *Cancer Research* 52, 2346–2348.
- Cartularo, L., Laulich, F., Sun, H., Kluz, T., Freedman, J.H., Costa, M., 2015. Gene expression and pathway analysis of human hepatocellular carcinoma cells treated with cadmium. *Toxicology and Applied Pharmacology* 288, 399–408.
- Chan, W.C.W., Maxwell, D.J., Gao, X., Bailey, R.E., Han, M., Nie, S., 2002. Luminescent quantum dots for multiplexed biological detection and imaging. *Current Opinion in Biotechnology* 13, 40–46.
- Chan, W.H., Shiao, N.H., Lu, P.Z., 2006. CdSe quantum dots induce apoptosis in human neuroblastoma cells via mitochondrial-dependent pathways and inhibition of survival signals. *Toxicology Letters* 167, 191–200.
- Chen, N., He, Y., Su, Y., Li, X., Huang, Q., Wang, H., Zhang, X., Tai, R., Fan, C., 2012. The cytotoxicity of cadmium-based quantum dots. *Biomaterials* 33, 1238–1244.
- Chen, Y., McMillan-Ward, E., Kong, J., Israels, S.J., Gibson, S.B., 2008. Oxidative stress induces autophagic cell death independent of apoptosis in transformed and cancer cells. *Cell death and differentiation* 15, 171–182.
- Choong, G., Liu, Y., Templeton, D.M., 2014. Interplay of calcium and cadmium in mediating cadmium toxicity. *Chemico-Biological Interactions* 211, 54–65.
- Christian, P., Von der Kammer, F., Baalousha, M., Hofmann, T., 2008. Nanoparticles: structure, properties, preparation and behaviour in environmental media. *Ecotoxicology* 17, 326–343.
- Clemens, M.G., 1999. Nitric oxide in liver injury. *Hepatology (Baltimore, Md.)* 30, 1–5.
- Dietz, K., Herth, S., 2011. Plant nanotoxicology. *Trends in Plant Science* 16, 582–589.
- Dimmock, D.P., Zhang, Q., Dionisi-Vici, C., Carozzo, R., Shieh, J., Tang, L.-Y., Truong, C., Schmitt, E., Sifry-Platt, M., Luciola, S., Santorelli, F.M., Ficicioglu, C.H., Rodriguez, M., Wierenga, K., Enns, G.M., Longo, N., Lipson, M.H., Vallance, H., Craigen, W.J.,

- Scaglia, F., Wong, L.-J., 2008. Clinical and molecular features of mitochondrial DNA depletion due to mutations in deoxyguanosine kinase. *Human mutation* 29, 330–1.
- Drexler, E., 1987. *Engines of Creation: The Coming Era of Nanotechnology*. Random House 3, 320.
- Drexler, K.E., 1981. Molecular engineering: An approach to the development of general capabilities for molecular manipulation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 78, 5275–5278.
- El-Ansary, A., Al-Daihan, S., 2009. On the Toxicity of Therapeutically Used Nanoparticles: An Overview. *Journal of Toxicology* 2009, 1–9.
- Elsaesser, A., Howard, C.V., 2012. Toxicology of nanoparticles. *Advanced Drug Delivery Reviews* 64, 129–137.
- Fadeel, B., 2013. Nanosafety: towards safer design of nanomedicines. *Journal of Internal Medicine* 274, 578–580.
- Feynman, R.P., 1960. There's plenty of room at the bottom: An invitation to enter a new field of physics. *Engineering and Science* 23, 22–35.
- Foley, S., Crowley, C., Smahi, M., Bonfils, C., Erlanger, B.F., Seta, P., Larroque, C., 2002. Cellular localisation of a water-soluble fullerene derivative. *Biochemical and biophysical research communications* 294, 116–9.
- Forman, H.J., Zhang, H., Rinna, A., 2009. Glutathione: Overview of its protective roles, measurement, and biosynthesis. *Molecular Aspects of Medicine* 30, 1–12.
- Fowler, B. a, 2009. Monitoring of human populations for early markers of cadmium toxicity: A review. *Toxicology and Applied Pharmacology* 238, 294–300.
- Gaponik, N., Talapin, D. V., Rogach, A.L., Hoppe, K., Shevchenko, E. V., Kornowski, A., Eychmüller, A., Weller, H., 2002. Thiol-Capping of CdTe Nanocrystals: An Alternative to Organometallic Synthetic Routes. *The Journal of Physical Chemistry B* 106, 7177–7185.
- Gerion, D., Pinaud, F., Williams, S.C., Parak, W.J., Zanchet, D., Weiss, S., Alivisatos, A.P., 2001. Synthesis and Properties of Biocompatible Water-Soluble Silica-Coated CdSe/ZnS Semiconductor Quantum Dots †. *The Journal of Physical Chemistry B* 105, 8861–8871.
- Giordano, G., Afsharinejad, Z., Guizzetti, M., Vitalone, A., Kavanagh, T.J., Costa, L.G., 2007. Organophosphorus insecticides chlorpyrifos and diazinon and oxidative stress in neuronal cells in a genetic model of glutathione deficiency. *Toxicology and Applied Pharmacology* 219, 181–189.
- Gou, N., Onnis-Hayden, A., Gu, A.Z., 2010. Mechanistic toxicity assessment of

- nanomaterials by whole-cell-array stress genes expression analysis. *Environmental science & technology* 44, 5964–70.
- Green, D.R., Reed, J.C., 1998. Mitochondria and Apoptosis. *Science* 281, 1309–1312.
- Handy, R.D., Owen, R., Valsami-Jones, E., 2008. The ecotoxicology of nanoparticles and nanomaterials: Current status, knowledge gaps, challenges, and future needs. *Ecotoxicology* 17, 315–325.
- Haque, M.M., Im, H., Seo, J., Hasan, M., Woo, K., Kwon, O.-S., 2013. Acute toxicity and tissue distribution of CdSe/CdS-MPA quantum dots after repeated intraperitoneal injection to mice. *Journal of Applied Toxicology* 33, 940–950.
- Hardman, R., 2006. A toxicologic review of quantum dots: Toxicity depends on physicochemical and environmental factors. *Environmental Health Perspectives* 114, 165–172.
- He, C., Klionsky, D.J., 2009. Regulation Mechanisms and Signalling Pathways of Autophagy. *Annual review of genetics* 43, 67.
- Hischier, R., Walser, T., 2012. Life cycle assessment of engineered nanomaterials: state of the art and strategies to overcome existing gaps. *The Science of the total environment* 425, 271–82.
- Hossain, S.T., Mukherjee, S.K., 2013. Toxicity of cadmium sulfide (CdS) nanoparticles against *Escherichia coli* and HeLa cells. *Journal of Hazardous Materials* 260, 1073–1082.
- IARC, 1993. Cadmium and certain cadmium compounds. IARC monographs on the evaluation of the carcinogenic risk of chemicals to humans. Beryllium, cadmium, mercury and exposures in the glass manufacturing industry 58, 1–119.
- Iavicoli, I., Leso, V., Fontana, L., Bergamaschi, A., 2011. Toxicological effects of titanium dioxide nanoparticles: a review of in vitro mammalian studies. *European review for medical and pharmacological sciences* 15, 481–508.
- Jäättelä, M., 2004. Multiple cell death pathways as regulators of tumour initiation and progression. *Oncogene* 23, 2746–2756.
- JENG, H.A., SWANSON, J., 2006. Toxicity of Metal Oxide Nanoparticles in Mammalian Cells. *Journal of Environmental Science and Health, Part A* 41, 2699–2711.
- Kamat, J., 2000. Reactive oxygen species mediated membrane damage induced by fullerene derivatives and its possible biological implications. *Toxicology* 155, 55–61.
- Kaplowitz, N., Aw, T.Y., Ookhtens, M., 1985. The Regulation of Hepatic Glutathione. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology* 25, 715–744.

- Kato, S., Itoh, K., Yaoi, T., Tozawa, T., Yoshikawa, Y., Yasui, H., Kanamura, N., Hoshino, A., Manabe, N., Yamamoto, K., Fushiki, S., 2010. Organ distribution of quantum dots after intraperitoneal administration, with special reference to area-specific distribution in the brain. *Nanotechnology* 21, 335103.
- Kawata, K., Shimazaki, R., Okabe, S., 2009. Comparison of gene expression profiles in HepG2 cells exposed to arsenic, cadmium, nickel, and three model carcinogens for investigating the mechanisms of metal carcinogenesis. *Environmental and molecular mutagenesis* 50, 46–59.
- Kroemer, G., Martin, S.J., 2005. Caspase-independent cell death. *Nature medicine* 11, 725–730.
- Krug, H.F., Wick, P., 2011. *Nanotoxicology: An Interdisciplinary Challenge*. *Angewandte Chemie International Edition* 50, 1260–1278.
- Lewinski, N., Colvin, V., Drezek, R., 2008. Cytotoxicity of nanoparticles. *Small* 4, 26–49.
- Li, H., Kundu, T.K., Zweier, J.L., 2009. Characterization of the Magnitude and Mechanism of Aldehyde Oxidase-mediated Nitric Oxide Production from Nitrite. *Journal of Biological Chemistry* 284, 33850–33858.
- Li, J., Billiar, T.R., Talanian, R. V, Kim, Y.M., 1997. Nitric oxide reversibly inhibits seven members of the caspase family via S-nitrosylation. *Biochemical and biophysical research communications* 240, 419–24.
- Li, K.G., Chen, J.T., Bai, S.S., Wen, X., Song, S.Y., Yu, Q., Li, J., Wang, Y.Q., 2009. Intracellular oxidative stress and cadmium ions release induce cytotoxicity of unmodified cadmium sulfide quantum dots. *Toxicology in Vitro* 23, 1007–1013.
- Li, N., Xia, T., Nel, A.E., 2008. The role of oxidative stress in ambient particulate matter-induced lung diseases and its implications in the toxicity of engineered nanoparticles. *Free radical biology & medicine* 44, 1689–99.
- Liao, L.M., Baccarelli, A., Shu, X.-O., Gao, Y.-T., Ji, B.-T., Yang, G., Li, H.-L., Hoxha, M., Dioni, L., Rothman, N., Zheng, W., Chow, W.-H., 2011. Mitochondrial DNA copy number and risk of gastric cancer: a report from the Shanghai Women's Health Study. *Cancer epidemiology, biomarkers & prevention: a publication of the American Association for Cancer Research, cosponsored by the American Society of Preventive Oncology* 20, 1944–9.
- Liguori, M.J., Blomme, E.A.G., Waring, J.F., 2008. Trovafloxacin-Induced Gene Expression Changes in Liver-Derived in Vitro Systems: Comparison of Primary Human Hepatocytes to HepG2 Cells. *Drug Metabolism and Disposition* 36, 223–233.

- Livak, K.J., Schmittgen, T.D., 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods (San Diego, Calif.)* 25, 402–408.
- Lovrić, J., Cho, S.J., Winnik, F.M., Maysinger, D., 2005. Unmodified Cadmium Telluride Quantum Dots Induce Reactive Oxygen Species Formation Leading to Multiple Organelle Damage and Cell Death. *Chemistry & Biology* 12, 1227–1234.
- Lu, S.C., 2013. Glutathione synthesis. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects* 1830, 3143–3153.
- Lynch, I., Weiss, C., Valsami-Jones, E., 2014. A strategy for grouping of nanomaterials based on key physico-chemical descriptors as a basis for safer-by-design NMs. *Nano Today* 9, 266–270.
- Marmiroli, M., Pagano, L., Pasquali, F., Zappettini, A., Tosato, V., Bruschi, C. V., Marmiroli, N., 2015. A genome-wide nanotoxicology screen of *Saccharomyces cerevisiae* mutants reveals the basis for cadmium sulphide quantum dot tolerance and sensitivity. *Nanotoxicology* 5390, 1–10.
- Marmiroli, M., Pagano, L., Savo Sardaro, M.L., Villani, M., Marmiroli, N., 2014. Genome-wide approach in *Arabidopsis thaliana* to assess the toxicity of cadmium sulfide quantum dots. *Environmental Science and Technology* 48, 5902–5909.
- Maynard, A.D., Aitken, R.J., Butz, T., Colvin, V., Donaldson, K., Oberdörster, G., Philbert, M. a, Ryan, J., Seaton, A., Stone, V., Tinkle, S.S., Tran, L., Walker, N.J., Warheit, D.B., 2006. Safe handling of nanotechnology. *Nature* 444, 267–269.
- Murray, C.B., Norris, D.J., Bawendi, M.G., 1993. Synthesis and characterization of nearly monodisperse CdE (E = sulfur, selenium, tellurium) semiconductor nanocrystallites. *Journal of the American Chemical Society* 115, 8706–8715.
- Nann, T., Skinner, W.M., 1993. Quantum Dots for Electro-Optic Devices 5291–5295.
- Napoli, C., Paolisso, G., Casamassimi, A., Al-Omran, M., Barbieri, M., Sommese, L., Infante, T., Ignarro, L.J., 2013. Effects of Nitric Oxide on Cell Proliferation. *Journal of the American College of Cardiology* 62, 89–95.
- Nel, A., Xia, T., Mädler, L., Li, N., 2006. Toxic potential of materials at the nanolevel. *Science (New York, N.Y.)* 311, 622–627.
- Nel, A.E., Mädler, L., Velegol, D., Xia, T., Hoek, E.M. V, Somasundaran, P., Klaessig, F., Castranova, V., Thompson, M., 2009. Understanding biophysicochemical interactions at the nano-bio interface. *Nature materials* 8, 543–57.
- Nguyen, K.C., Rippstein, P., Tayabali, a. F., Willmore, W.G., 2015. Mitochondrial Toxicity

- of Cadmium Telluride Quantum Dot Nanoparticles in Mammalian Hepatocytes. *Toxicological Sciences* 146, 31–42.
- Nguyen, K.C., Willmore, W.G., Tayabali, A.F., 2013. Cadmium telluride quantum dots cause oxidative stress leading to extrinsic and intrinsic apoptosis in hepatocellular carcinoma HepG2 cells. *Toxicology* 306, 114–123.
- Oberdörster, G., Oberdörster, E., Oberdörster, J., 2005. Nanotoxicology: An emerging discipline evolving from studies of ultrafine particles. *Environmental Health Perspectives* 113, 823–839.
- Park, E.-J., Yi, J., Chung, K.-H., Ryu, D.-Y., Choi, J., Park, K., 2008. Oxidative stress and apoptosis induced by titanium dioxide nanoparticles in cultured BEAS-2B cells. *Toxicology letters* 180, 222–9.
- Peng, Manna, Yang, Wickham, Scher, Kadavanich, Alivisatos, 2000. Shape control of CdSe nanocrystals. *Nature* 404, 59–61.
- Pradelli, L. a, Bénétiau, M., Ricci, J.-E., 2010. Mitochondrial control of caspase-dependent and -independent cell death. *Cellular and molecular life sciences : CMLS* 67, 1589–1597.
- Priault, M., Salin, B., Schaeffer, J., Vallette, F.M., di Rago, J.-P., Brooks, G., 2005. Impairing the bioenergetic status and the biogenesis of mitochondria triggers mitophagy in yeast. *Cell Death and Differentiation* 12, 1613–1621.
- Raab, C., Simko, M., Fiedeler, U., 2011. Production of nanoparticles and nanomaterials. *NanoTrust-Dossiers* 006en, 1–4.
- Raccomandazione della Commissione Europea 2011/696/UE del 18 ottobre 2011 sulla definizione di nanomateriale.
- Reungpatthanaphong, P., Dechsupa, S., Meesungnoen, J., Loetchutinat, C., Mankhetkorn, S., 2003. Rhodamine B as a mitochondrial probe for measurement and monitoring of mitochondrial membrane potential in drug-sensitive and -resistant cells. *Journal of biochemical and biophysical methods* 57, 1–16.
- Rodríguez-Hernández, Á., Cordero, M.D., Salviati, L., Artuch, R., Pineda, M., Briones, P., Izquierdo, L.G., Cotán, D., Navas, P., Sánchez-Alcázar, J.A., 2009. Coenzyme Q deficiency triggers mitochondria degradation by mitophagy. *Autophagy* 5, 19–32.
- Rodríguez-Hernández, A., Navarro-Villarán, E., González, R., Pereira, S., Soriano-De Castro, L.B., Sarrías-Giménez, A., Barrera-Pulido, L., Álamo-Martínez, J.M., Serrablo-Requejo, A., Blanco-Fernández, G., Nogales-Muñoz, A., Gila-Bohórquez, A., Pacheco, D., Torres-Nieto, M.A., Serrano-Díaz-Canedo, J., Suárez-Artacho, G., Bernal-Bellido, C.,

- Marín-Gómez, L.M., Barcena, J.A., Gómez-Bravo, M.A., Padilla, C.A., Padillo, F.J., Muntané, J., 2015. Regulation of cell death receptor S-nitrosylation and apoptotic signaling by Sorafenib in hepatoblastoma cells. *Redox biology* 6, 174–82.
- Rzizgalinski, B.A., Strobl, J.S., 2009. Cadmium-containing nanoparticles: Perspectives on pharmacology and toxicology of quantum dots. *Toxicology and Applied Pharmacology*.
- Saravanan, P., Gopalan, R., Chandrasekaran, V., 2008. Synthesis and characterisation of nanomaterials. *Defence Science Journal* 58, 504–516.
- Sarkar, A., Ravindran, G., Krishnamurthy, V., Campus, K.K.B.G., 2013. A Brief Review on the Effect of Cadmium Toxicity : From Cellular To Organ Level. *International Journal of Bio-Technology and Research (IJBTR)* 3, 17–36.
- Sau, T.K., Pal, A., Pal, T., 2001. Size Regime Dependent Catalysis by Gold Nanoparticles for the Reduction of Eosin. *The Journal of Physical Chemistry B* 105, 9266–9272.
- Savi, M., Rossi, S., Bocchi, L., Gennaccaro, L., Cacciani, F., Perotti, A., Amidani, D., Alinovi, R., Goldoni, M., Aliatis, I., Lottici, P.P., Bersani, D., Campanini, M., Pinelli, S., Petyx, M., Frati, C., Gervasi, A., Urbanek, K., Quaini, F., Buschini, A., Stilli, D., Rivetti, C., Macchi, E., Mutti, A., Miragoli, M., Zaniboni, M., 2014. Titanium dioxide nanoparticles promote arrhythmias via a direct interaction with rat cardiac tissue. *Particle and Fibre Toxicology* 11.
- Sayes, C.M., Warheit, D.B., 2009. Characterization of nanomaterials for toxicity assessment. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Nanomedicine and Nanobiotechnology* 1, 660–670.
- Schoonen, W.G.E.J., de Roos, J.A.D.M., Westerink, W.M.A., Débiton, E., 2005. Cytotoxic effects of 110 reference compounds on HepG2 cells and for 60 compounds on HeLa, ECC-1 and CHO cells. *Toxicology in Vitro* 19, 491–503.
- Schulte, P.A., Salamanca-Buentello, F., 2006. Ethical and Scientific Issues of Nanotechnology in the Workplace. *Environmental Health Perspectives* 115, 5–12.
- Schultz, D.R., Harrington, W.J., 2003. Apoptosis: Programmed cell death at a molecular level. *Seminars in Arthritis and Rheumatism* 32, 345–369.
- Seleverstov, O., Zahirnyk, O., Zscharnack, M., Bulavina, L., Nowicki, M., Heinrich, J.M., Yezhelyev, M., Emmrich, F., O'Regan, R., Bader, A., 2006. Quantum dots for human mesenchymal stem cells labeling, a size-dependent autophagy activation. *Nano Letters* 6, 2826–2832.
- Shinde, S.K., Grampurohit, N.D., Gaikwad, D.D., Jadhav, S.L., Gadhve, M. V., Shelke, P.K., 2012. Toxicity induced by nanoparticles. *Asian Pacific Journal of Tropical Disease* 2, 331–334.

- Singh, N., Manshian, B., Jenkins, G.J.S., Griffiths, S.M., Williams, P.M., Maffei, T.G.G., Wright, C.J., Doak, S.H., 2009. NanoGenotoxicology: The DNA damaging potential of engineered nanomaterials. *Biomaterials* 30, 3891–3914.
- Soenen, S.J., Rivera-Gil, P., Montenegro, J.M., Parak, W.J., De Smedt, S.C., Braeckmans, K., 2011. Cellular toxicity of inorganic nanoparticles: Common aspects and guidelines for improved nanotoxicity evaluation. *Nano Today* 6, 446–465.
- Staal, Y.C., Hebels, D.G., van Herwijnen, M.H., Gottschalk, R.W., van Schooten, F.J., van Delft, J.H., 2007. Binary PAH mixtures cause additive or antagonistic effects on gene expression but synergistic effects on DNA adduct formation. *Carcinogenesis* 28, 2632–2640.
- Stern, S.T., Adiseshaiah, P.P., Crist, R.M., 2012. Autophagy and lysosomal dysfunction as emerging mechanisms of nanomaterial toxicity. *Particle and Fibre Toxicology*.
- Stern, S.T., Johnson, D.N., 2008. Role for nanomaterial-autophagy interaction in neurodegenerative disease. *Autophagy* 4, 1097–1100.
- Stern, S.T., McNeil, S.E., 2007. Nanotechnology Safety Concerns Revisited. *Toxicological Sciences* 101, 4–21.
- Stern, S.T., Zolnik, B.S., McLeland, C.B., Clogston, J., Zheng, J., McNeil, S.E., 2008. Induction of Autophagy in Porcine Kidney Cells by Quantum Dots: A Common Cellular Response to Nanomaterials? *Toxicological Sciences* 106, 140–152.
- Stone, V., Johnston, H., Schins, R.P.F., 2009. Development of in vitro systems for nanotoxicology: methodological considerations. *Critical reviews in toxicology* 39, 613–626.
- Strobel, C., Torrano, A.A., Herrmann, R., Malissek, M., Bräuchle, C., Reller, A., Treuel, L., Hilger, I., 2014. Effects of the physicochemical properties of titanium dioxide nanoparticles, commonly used as sun protection agents, on microvascular endothelial cells. *Journal of Nanoparticle Research* 16, 2130.
- Susin, S.A., 1996. Bcl-2 inhibits the mitochondrial release of an apoptogenic protease. *Journal of Experimental Medicine* 184, 1331–1341.
- Tait, S.W., Green, D.R., 2010. Mitochondria and cell death: outer membrane permeabilization and beyond. *Nature reviews.Molecular cell biology* 11, 621–632.
- Uchino, T., Tokunaga, H., Ando, M., Utsumi, H., 2002. Quantitative determination of OH radical generation and its cytotoxicity induced by TiO₂-UVA treatment. *Toxicology in Vitro* 16, 629–635.
- Valizadeh, A., Mikaeili, H., Samiei, M., Farkhani, S., Zarghami, N., Kouhi, M., Akbarzadeh,

- A., Davaran, S., 2012. Quantum dots: synthesis, bioapplications, and toxicity. *Nanoscale Research Letters* 7, 480.
- Valko, M., Rhodes, C.J., Moncol, J., Izakovic, M., Mazur, M., 2006. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chemico-Biological Interactions* 160, 1–40.
- Van den Hof, W.F.P.M., Coonen, M.L.J., van Herwijnen, M., Brauers, K., Wodzig, W.K.W.H., van Delft, J.H.M., Kleinjans, J.C.S., 2014. Classification of Hepatotoxicants Using HepG2 Cells: A Proof of Principle Study. *Chemical Research in Toxicology* 27, 433–442.
- Vandebriel, R.J., De Jong, W.H., 2012. A review of mammalian toxicity of ZnO nanoparticles. *Nanotechnology, Science and Applications* 5, 61–71.
- Villani, M., Calestani, D., Lazzarini, L., Zanotti, L., Mosca, R., Zappettini, A., 2012. Extended functionality of ZnO nanotetrapods by solution-based coupling with CdS nanoparticles. *Journal of Materials Chemistry* 22, 5694.
- Wang, B., 2012. Cadmium and Its Epigenetic Effects. *Current Medicinal Chemistry*.
- Wilkening, S., Stahl, F., Bader, A., 2003. Comparison of primary human hepatocytes and hepatoma cell line HepG2 with regard to their biotransformation properties. *Drug Metabolism and Disposition* 31, 1035–1042.
- Wong, L.C., Brunetti-Pierri, N., Zhang, Q., Yazigi, N., Bove, K.E., Dahms, B.B., Puchowicz, M.A., Gonzalez-Gomez, I., Schmitt, E.S., Truong, C.K., Hoppel, C.L., Chou, P., Wang, J., Baldwin, E.E., Adams, D., Leslie, N., Boles, R.G., Kerr, D.S., Craigen, W.J., 2007. Mutations in the MPV17 gene are responsible for rapidly progressive liver failure in infancy. *Hepatology* 46, 1218–1227.
- Xia, T., Kovoichich, M., Liong, M., Mädler, L., Gilbert, B., Shi, H., Yeh, J.I., Zink, J.I., Nel, A.E., 2008. Comparison of the mechanism of toxicity of zinc oxide and cerium oxide nanoparticles based on dissolution and oxidative stress properties. *ACS nano* 2, 2121–34.
- Xing, J., Chen, M., Wood, C.G., Lin, J., Spitz, M.R., Ma, J., Amos, C.I., Shields, P.G., Benowitz, N.L., Gu, J., De Andrade, M., Swan, G.E., Wu, X., 2008. Mitochondrial DNA content: Its genetic heritability and association with renal cell carcinoma. *Journal of the National Cancer Institute* 100, 1104–1112.
- Yang, M., Luna, L., Sørnbø, J.G., Alseth, I., Johansen, R.F., Backe, P.H., Danbolt, N.C., Eide, L., Bjørås, M., 2014. Human OXR1 maintains mitochondrial DNA integrity and counteracts hydrogen peroxide-induced oxidative stress by regulating antioxidant pathways involving p21. *Free Radical Biology and Medicine* 77, 41–48.

- Yang, Z., Liu, Z.W., Allaker, R.P., Reip, P., Oxford, J., Ahmad, Z., Ren, G., 2010. A review of nanoparticle functionality and toxicity on the central nervous system. *Journal of the Royal Society, Interface / the Royal Society* 7 Suppl 4, S411–S422.
- Yoo, J.S., 1998. Selective gas-phase oxidation at oxide nanoparticles on microporous materials. *Catalysis Today* 41, 409–432.
- Yu, S., Chow, G.M., 2004. Carboxyl group (-CO₂H) functionalized ferrimagnetic iron oxide nanoparticles for potential bio-applications. *Journal of Materials Chemistry* 14, 2781.
- Zhang, H.R., Xu, J.J., Chen, H.Y., 2013. Electrochemiluminescence ratiometry: A new approach to DNA biosensing. *Analytical Chemistry* 85, 5321–5325.
- Zhang, T., Hu, Y., Tang, M., Kong, L., Ying, J., Wu, T., Xue, Y., Pu, Y., 2015. Liver Toxicity of Cadmium Telluride Quantum Dots (CdTe QDs) Due to Oxidative Stress in Vitro and in Vivo. *International Journal of Molecular Sciences* 16, 23279–23299.

Appendice

Tabella A.1 Tabella riassuntiva dei valori di RQ ottenuti dall'analisi di espressione genica mediante *TaqMan*[®] *custom Array Plates*. I valori considerati significativi sono evidenziati in rosso (RQ > 2) e in verde (RQ < 0.5)

Categorie	Simbolo	Nome ufficiale	RQ = 2 ^{-ΔΔCT}	
			Treat 7 μg/ml	Treat 14 μg/ml
PCD	<i>ABL1</i>	Tyrosine-protein kinase ABL1	0,565	1,475
	<i>BAK1</i>	Bcl-2 homologous antagonist/killer	1,131	1,632
	<i>BAX</i>	Apoptosis regulator BAX	1,860	2,397
	<i>BBC3 (PUMA)</i>	Bcl-2-binding component 3	0,806	3,973
	<i>CASP2</i>	Caspase-2	1,127	0,961
	<i>CASP3</i>	Caspase-3	1,455	0,923
	<i>CHECK2 (RAD53)</i>	Serine/threonine-protein kinase Chk2	1,685	1,478
	<i>DEDD2</i>	DNA-binding death effector domain-containing protein 2	0,716	1,497
	<i>DIABLO (SMAC)</i>	Diablo homolog, mitochondrial	1,524	1,679
	<i>PIDD (LRDD)</i>	p53-induced protein with a death domain	0,398	0,569
	<i>PMAIP1 (NOXA)</i>	Phorbol-12-myristate-13-acetate-induced protein 1	2,340	3,874
	<i>PYCARD</i>	Apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD	2,648	3,425
	<i>RAD21</i>	Double-strand-break repair protein rad21 homolog	1,785	12,435
	<i>XIAP (BIRC4)</i>	X-linked inhibitor of apoptosis	0,646	0,684
Riparazione danno al DNA	<i>FANCA</i>	Fanconi anemia group A protein	1,456	1,783
	<i>MSH2</i>	DNA mismatch repair protein Msh2	3,320	2,310
	<i>NBN</i>	Nibrin	3,628	1,962
	<i>PRKDC</i>	DNA-dependent protein kinase catalytic subunit	1,264	1,239
	<i>RAD18</i>	RAD18 E3 ubiquitin protein ligase	1,912	1,090
	<i>REV1</i>	DNA repair protein REV1	1,615	2,345
	<i>RPA1</i>	Replication protein A 70 kDa DNA-binding subunit	1,610	1,377
	<i>XPA</i>	DNA repair protein complementing XP-A cells	2,305	1,409
	<i>XRCC6</i>	X-ray repair complementing defective repair in Chinese hamster cells 6	1,659	1,958
Ciclo cellulare	<i>BUB3</i>	Mitotic checkpoint protein BUB3	2,882	3,705
	<i>ICMT</i>	Isoprenylcysteine carboxyl methyltransferase	0,983	0,786
	<i>MDM2</i>	E3 ubiquitin-protein ligase Mdm2	1,177	0,802
	<i>UBAC1</i>	Ubiquitin-associated domain-containing protein 1	1,840	2,490

Processi mitocondriali	ATP5L	ATP synthase subunit alpha, mitochondrial	6,887	3,234
	COX8A	Cytochrome c oxidase subunit 8A, mitochondrial	2,053	2,143
	FIS1	Fission 1 (mitochondrial outer membrane) homolog (<i>S. cerevisiae</i>)	1,158	2,059
	MSRB2	Methionine sulfoxide reductase B2	2,371	3,209
	SDHB	Succinate dehydrogenase [ubiquinone] iron-sulfur subunit, mitochondrial	3,340	3,911
	SLMO1	Slowmo homolog 1 (<i>Drosophila</i>)	0,917	0,707
	UQCR11	Ubiquinol-cytochrome c reductase, complex III subunit XI	1,201	2,129
	UQCRC1	Ubiquinol-cytochrome c reductase core protein I	1,177	1,859
	UQCRC2	Ubiquinol-cytochrome c reductase core protein II	5,311	4,399
Metaboli smo proteine	SUMO1	Small ubiquitin-related modifier 1	2,429	4,445
	UBQLN1	Ubiquilin 1	1,698	2,148
Metabolismo	ADH1	Alcohol dehydrogenase 1A (class I), alpha polypeptide	3,122	0,775
	ACSL4	Acyl-CoA synthetase long-chain family member 4	1,137	2,912
	DHRS11	Dehydrogenase/reductase (SDR family) member 11	0,792	0,889
	GBP2	Interferon-induced guanylate-binding protein 2	5,811	17,782
	GCLC	Glutamate--cysteine ligase catalytic subunit	1,194	3,335
	MDH1	Malate dehydrogenase, cytoplasmic	3,679	2,884
	MPV17	MpV17 mitochondrial inner membrane protein	1,484	1,862
	NAA25	N(alpha)-acetyltransferase 25, NatB auxiliary subunit	2,677	2,176
	PDHB	Pyruvate dehydrogenase (lipoamide) beta	1,711	2,347
	PFKP	Phosphofructokinase, platelet	1,672	3,912
RRM1	Ribonucleotide reductase M1	1,828	1,149	

Risposta allo stress	DDIT3	DNA damage-inducible transcript 3 protein	0,485	5,474
	DNAJB9 (HSP40)	DnaJ homolog subfamily B member 9	2,354	1,929
	GPX3	Glutathione peroxidase 3	0,769	2,162
	HSP90AA1	Heat shock protein 90kDa alpha (cytosolic), class A member 1	4,360	1,074
	HSPB3	Heat shock protein beta-3	0,830	1,177
	HSPD1	60 kDa heat shock protein, mitochondrial	2,378	2,505
	HSPH1	Heat shock protein 105 kDa	1,291	0,801
	LONP1	lon peptidase 1, mitochondrial	3,157	3,041
	SIRT1	NAD-dependent protein deacetylase sirtuin-1	1,008	1,838
	TXN2	Thioredoxin	1,978	1,225
Biogenesi miRNA	DROSHA	Ribonuclease 3	2,512	1,790
	DICER1	Endoribonuclease Dicer	1,495	0,863
	AGO2/EIF2C2	Protein argonaute-2	1,109	2,170
	XPO5	Exportin-5	1,452	1,541
Espressione genica	DOM3Z	Decapping and exoribonuclease protein	1,734	2,558
	METTL18	Methyltransferase like 18	2,395	2,295
	MRPL44	39S ribosomal protein L44, mitochondrial	2,670	2,392
	MTIF2	Mitochondrial translational initiation factor 2	3,941	2,292
	N6AMT1	N-6 adenine-specific DNA methyltransferase 1	6,317	2,233
	RPS8	40S ribosomal protein S8	2,537	4,553
	RTF1	RNA polymerase-associated protein RTF1 homolog	2,562	2,184
	SUPT3H	SPT3 homolog, SAGA and STAGA complex component	4,612	8,239
	TADA1	Transcriptional adaptor 1	1,719	1,796
	XRN2	5'-3' exoribonuclease 2	2,860	3,754
	YARS2	Tyrosyl-tRNA synthetase 2, mitochondrial	3,901	3,562
	ZNF180	Zinc finger protein 180	1,010	0,680

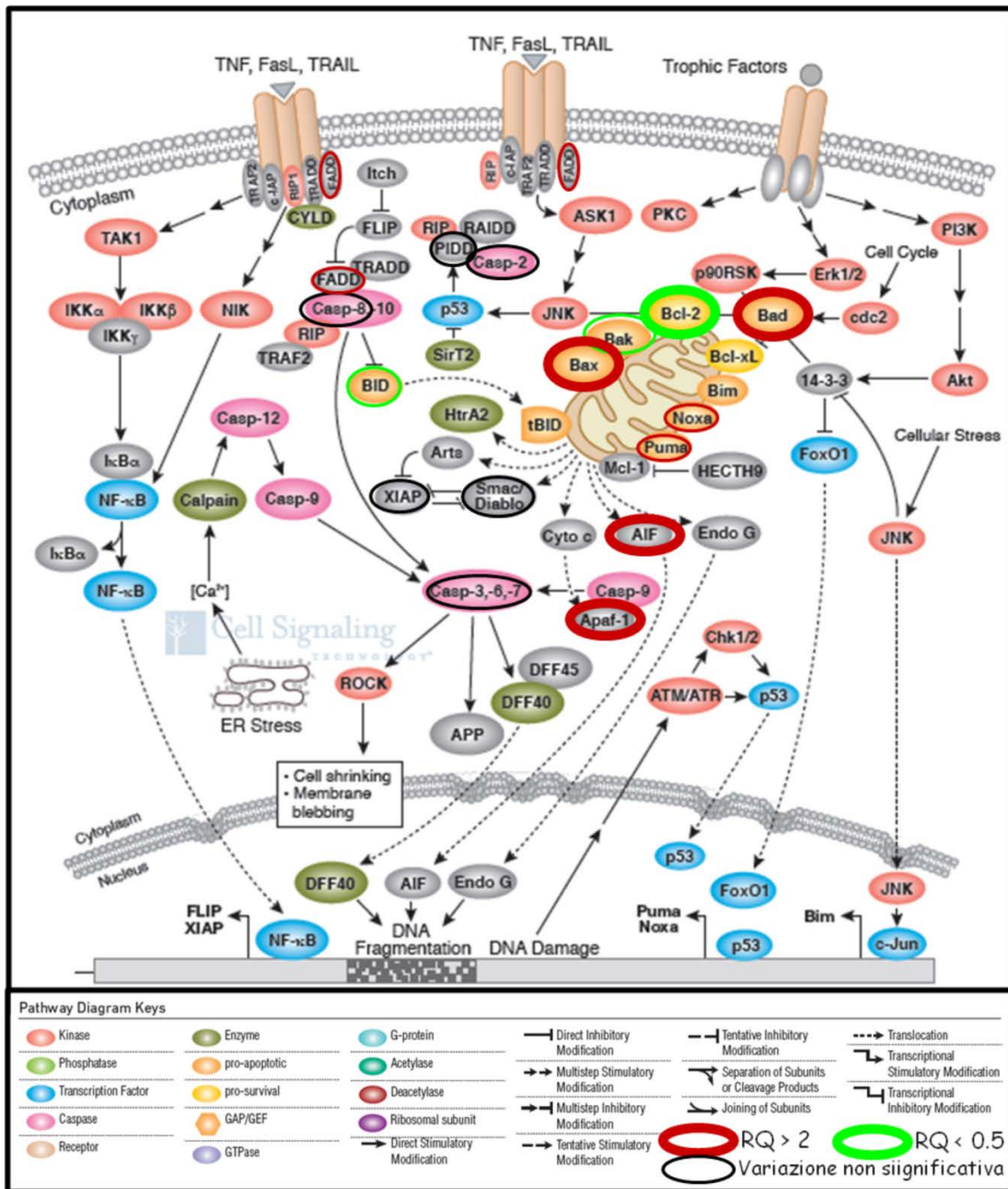
Altri	ATG3	Ubiquitin-like-conjugating enzyme ATG3	3,323	2,078
	ATP6V1E1	ATPase, H ⁺ transporting, lysosomal 31kDa, V1 subunit E1	3,972	3,311
	CHAC2	Cation transport regulator homolog 2	2,163	0,596
	ESD	Esterase D	3,820	3,603
	FNBP1L	Formin-binding protein 1-like	1,845	2,754
	GAD1	Glutamate decarboxylase 1	2,746	10,255
	HEMK1	HemK methyltransferase family member 1	1,119	1,354
	HSPA8	Heat shock 70kDa protein 8	0,830	1,177
	LCP1	Plastin-2	0,342	1,324
	NEDD8	Neural precursor cell expressed, developmentally down-regulated 8	1,866	1,834
	PEX7	Peroxisomal biogenesis factor 7	7,444	2,405
	PHB2	Prohibitin 2	1,730	1,807
	STX16	Syntaxin-16	1,352	2,038
	TWF1	Twinfilin-1	3,656	2,781
Candidati endogeni	18S	Eukaryotic 18S rRNA	0,421	1,862
	ACTB	Actin, beta	endogeno	endogeno
	GAPDH	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	1,288	2,178

Tabella A.2 Tabella riassuntiva dei valori di RQ ottenuti dall'analisi di espressione genica mediante chimica SYBR® Green. I valori considerati significativi sono evidenziati in rosso (RQ > 2) e in verde (RQ < 0.5)

Categorie	Nome	Nome ufficiale	RQ = 2 ^{-ΔΔCT}		
			Tratt. 3 µg/ml	Tratt. 7 µg/ml	Tratt. 14 µg/ml
PCD	AIFM2	apoptosis-inducing factor, mitochondrion-associated, 2	5,938	1,002	0,497
	CASP7	caspase 7	0,448	0,501	0,349
	DAPK1	death-associated protein kinase 1	0,644	0,809	0,709
	FADD	Fas (TNFRSF6)-associated via death domain	5,776	0,735	0,660
	MAP3K5	mitogen-activated protein kinase kinase kinase 5	0,192	0,037	0,205
	PYCARD	PYD and CARD domain containing	1,270	1,510	0,793
	BAD	BCL2-associated agonist of cell death	3,000	0,487	0,559
	BCL2	B-cell CLL/lymphoma 2	0,521	0,375	0,204
	APAF1	apoptotic peptidase activating factor 1	5,464	0,844	0,423
	BAK1	BCL2-antagonist/killer 1	0,357	0,429	0,421
	BID	BH3 interacting domain death agonist	0,505	0,797	0,369
	CASP8	caspase 8	0,473	0,684	0,326
	Risposta allo stress	AOX1	aldehyde oxidase 1	10,629	0,807
PRDX1		peroxiredoxin 1	0,835	0,883	0,530
PRDX2		peroxiredoxin 2	0,966	1,071	1,035
CAT		catalase	1,705	0,714	1,873
PRDX3		peroxiredoxin 3	6,320	2,204	0,812
PRDX5		peroxiredoxin 5	1,424	0,541	0,527
PRDX6		peroxiredoxin 6	1,860	0,774	0,509
CYGB		cytoglobin	4,563	0,514	0,509
DHCR24		24-dehydrocholesterol reductase	3,824	0,545	0,807
DUSP1		dual specificity phosphatase 1	1,045	0,962	0,966
MSRA		methionine sulfoxide reductase A	4,098	1,161	0,369
OXSRI		oxidative stress responsive 1	2,780	0,930	0,593
PTGS1		prostaglandin-endoperoxide synthase 1 (prostaglandin G/H synthase and cyclooxygenase)	0,285	0,144	0,816
GBP2		guanylate binding protein 2, interferon-inducible	0,901	0,868	1,959
STK25		serine/threonine kinase 25	0,561	0,516	0,646
GSR		glutathione reductase	2,246	2,211	3,446
GSTZ1		glutathione S-transferase zeta 1	5,637	0,644	3,655
GCLC		glutamate cysteine ligase, catalytic subunit	0,235	0,483	0,241
GSS		glutathione synthetase	3,095	0,467	1,625
LONP1		lon peptidase 1, mitochondrial	0,829	1,021	0,635
MPV17		MpV17 mitochondrial inner membrane protein	1,090	0,389	0,470
NOS2		nitric oxide synthase 2, inducible	1,602	0,334	0,408
OXR1		oxidation resistance 1	3,543	0,966	0,635
SOD1		superoxide dismutase 1, soluble	1,747	1,108	0,938
SOD2		superoxide dismutase 2, mitochondrial	0,998	0,567	0,995
TXNRD2		thioredoxin reductase 2	1,400	0,434	0,338
UCP2	uncoupling protein 2 (mitochondrial, proton carrier)	0,597	0,775	0,715	
Autofagia	ATG12	autophagy related 12	1,600	0,581	0,747
	ATG13	autophagy related 13	4,423	0,463	0,588
	ATG14	autophagy related 14	6,869	0,821	0,561
	ATG7	autophagy related 7	5,877	0,525	0,732
	GABARAP	GABA(A) receptor-associated protein	1,688	0,574	2,196
	MAP1LC3A	microtubule-associated protein 1 light chain 3 alpha	0,352	0,927	0,119
	MTOR	mechanistic target of rapamycin (serine/threonine kinase)	0,700	0,914	0,779

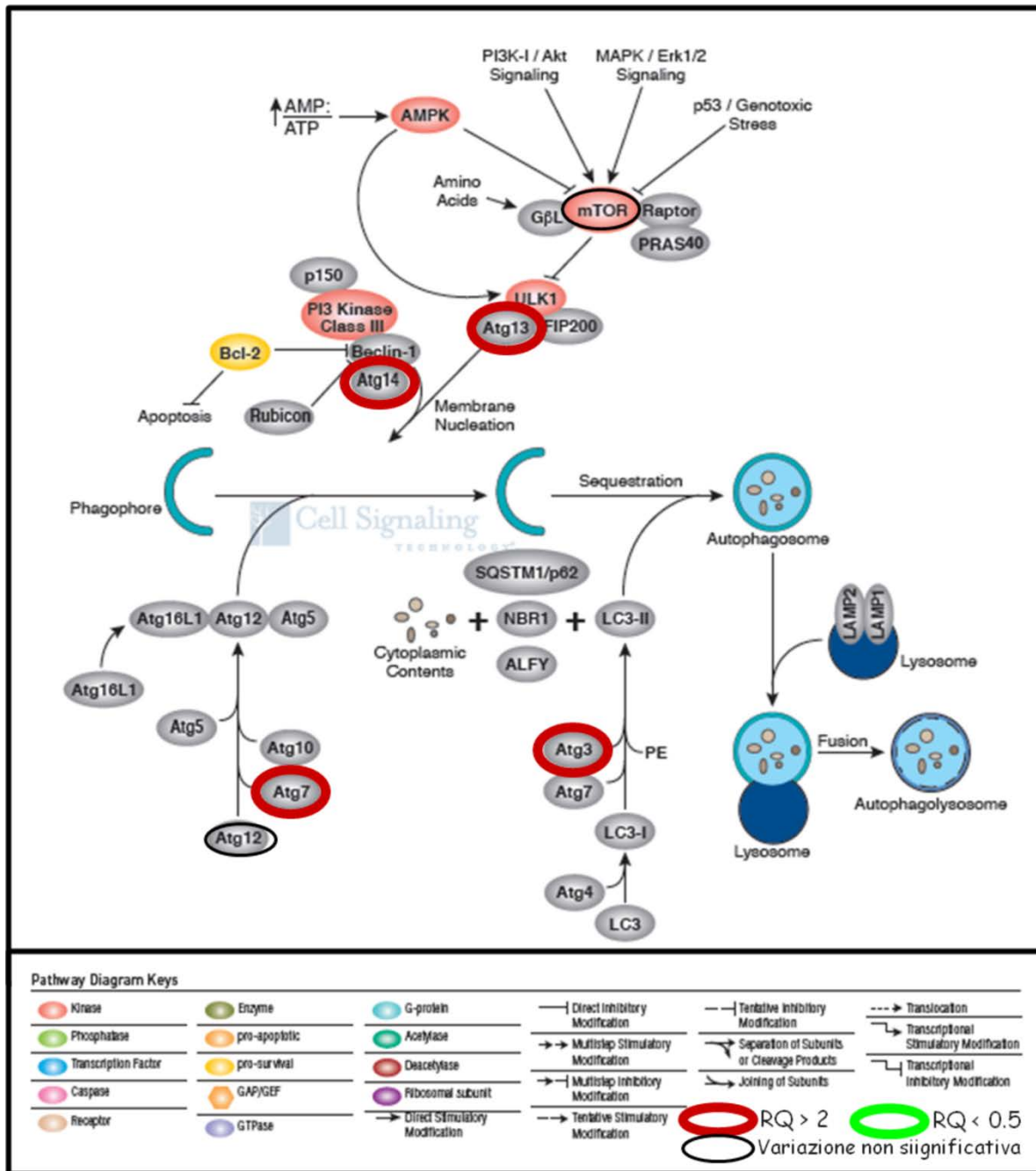
Rappresentazioni schematiche dei geni coinvolti nei processi di risposta cellulare ai CdS QD evidenziati:

❖ Morte cellulare programmata



Tratto e modificato da <http://www.cellsignal.com/>

❖ Autofagia



Tratto e modificato da <http://www.cellsignal.com/>

NOTA

I risultati presentati in questa lavoro di dottorato sono stati oggetto di pubblicazioni e/o di presentazioni a congressi, come di seguito riportato.

Pubblicazioni scientifiche:

- ◇ Paesano, L., Perotti, A., Buschini, A., Carubbi, C., Marmiroli, M., Iannotta, S., Marmiroli, N., 2016. Nanotoxicity of CdS Quantum dots in hepatocellular carcinoma cells (HepG2). *in preparation*

Comunicazioni a congressi nazionali:

- ◇ Paesano, L., Perotti, A., Buschini, A., Marmiroli, N. (2015) Mitochondrial effects of CdS quantum dots in a human hepatoma cell line. Atti del workshop "Parma Nano-Day" II edizione, p. 69 (ISBN 978-88-941066-1-9)
- ◇ Paesano, L., Perotti, A., Marmiroli, M., Buschini, A., Marmiroli, N. (2014) Nanotoxicology of CdS quantum dots in a human hepatoma cell line. Atti del workshop "Parma Nano-Day" I edizione, p.28.

Gli estratti dei sopraelencati atti di convegno sono allegati in fondo al documento.

Ringraziamenti

Vorrei ringraziare il Professore Nelson Marmioli, coordinatore del mio Dottorato di Ricerca e mio docente guida, per l'opportunità che mi ha offerto. Grazie anche al Dott. Andrea Zappetini e il Dott. Marco Villani (IMEM-CNR, Parma) per aver fornito i nanomateriali oggetto della ricerca. Ringrazio, inoltre, la Prof.ssa Annamaria Buschini e il Dott. Alessio Perotti per la loro collaborazione, fondamentale in questo progetto, e per avermi iniziato al mondo delle colture cellulari *in vitro* umane, trasmettendomi parte delle loro conoscenze ed esperienze, ma anche tutto il loro entusiasmo. Vorrei, inoltre, ringraziare la Dott.ssa Cecilia Carubbi (S.Bi.Bi.T., Università di Parma) per aver effettuato le analisi al citofluorimetro.

Grazie anche a tutti i miei colleghi di laboratorio, per gli innumerevoli confronti e i momenti di spensieratezza: Prof.ssa Elena Maestri, Prof.ssa Marta Marmioli, Prof.ssa Mariolina Gulli, Prof.ssa Anna Maria Sanangelantoni, Dott.ssa Caterina Agrimonti, Dott.ssa Michela Janni, Dott.ssa Giovanna Visioli, Dott.ssa Marina Caldara, Dott. Alessio Malcevschi, Dott.ssa Roberta Ruotolo, Dott.ssa Sara Graziano, Dott. Davide Imperiale, Dott.ssa Francesca Mussi, Dott. Luca Pagano, Urbana Bonas, Dott. Nicola Cavirani, Dott. Giacomo Lencioni, Dott.ssa Alessia Comastri, Dott. Francesco Pasquali, Dott.ssa Graziella Pira, Dott.ssa Stefania Cadonici, Dott.ssa Valentina Gallo, Dott.ssa Valentina Buffagni.

In particolare un grazie alle mie compagne di ufficio, Alessia, Michela, e Valentina, per il supporto/sostegno. Grazie ad Elena, Roberta e Alessio per il loro supporto critico e scientifico. Grazie ai colleghi/amici della Cascina, Davide, Giacomo, Francesca, Valentina, con cui ho condiviso pause pranzo all'aperto, pause caffè riflessive e discussioni costruttive. Vorrei anche ringraziare Francesco, Graziella, Luca, Marina, Nicola, Sara, Stefania, Urbana per la loro disponibilità e per tutti i momenti trascorsi insieme.

Un ulteriore grazie ad Alessio, per la sua infinita pazienza e per essere sempre riuscito a sdrammatizzare, tra una saluto spagnoleggiante e un baffo ribelle, tutti i miei momenti più critici. Grazie anche per avermi fatto conoscere il caro "bilancino", un amico ormai fidato!

Un grazie enorme ad Antonino, per essermi sempre stato affianco, per aver sempre creduto in me (a volte anche più di quanto non lo faccia io stessa), per avermi incoraggiato, per avermi aiutato ad ascoltarmi e per l'enorme pazienza (e con me ce ne vuole veramente tanta!).

Vorrei anche ringraziare i miei amici, Michelangelo, Veronica, Daniela, Sara, Titti, Maria Laura, Pamela, Claudia per la loro pazienza nel sopportare un'amica a volte troppo presa dal proprio lavoro e per avermi regalato grandi emozioni e momenti di assoluta distrazione.



1ST PARMA NANO-DAY

WORKSHOP SCIENTIFICO

28 NOVEMBRE 2014

AUDITORIUM PLESSO POLIFUNZIONALE,
CAMPUS, PARCO AREA DELLE SCIENZE
UNIVERSITÀ DI PARMA



unipr&expo2015 

Nanotoxicology of CdS quantum dots in a human hepatoma cell lineL. Paesano^(1,2), A. Perotti^(3,4), M. Marmiroli⁽¹⁾, A. Buschini⁽¹⁾, N. Marmiroli⁽¹⁾⁽¹⁾Department of Life Sciences, University of Parma⁽²⁾Doctorate in Biotechnonology, University of Parma⁽³⁾Department of Clinical and Experimental Medicine, University of Parma; Doctorate in Science of Prevention, University of Parma

Cadmium toxicity in humans has been documented since 50 years. Cadmium has been classified by IARC as a category 1 carcinogen and the rapid development of nanotechnology and the spread of cadmium-containing engineered nanomaterials promoted more investigation on the human and environmental health risks^(1,2). Cadmium sulfide quantum dots (CdS QDs) are widely used in the electric and electronic industries to produce semiconductor structures, solar energy and optoelectronic devices. It has been shown that CdS as nanoscale materials have different physical and chemical properties than its "bulk" counterpart^(3,4).

In this work, the cytotoxicity and the gene expression modulation after exposure to CdS QDs in a human hepatoma cell line (HepG2) were investigated. MTS assay was used to assess the viability of the human tumor cells exposed to increasing concentrations of CdS-QDs (from 1.5 µg/ml to 100 µg/ml). For the molecular characterization of the mode of action of the nanomaterials, gene expression analysis was performed by Real time qPCR in HepG2 cells treated with two different concentrations to simulate a "low toxic" (3 µg/ml) and a "highly toxic" conditions (14 µg/ml). Gene expression was conducted using a "7900HT Fast Real-Time PCR System". The results showed that Cd QDs promote activation of apoptotic processes and oxidative stress response.

¹Marmiroli M. *et al.* Genome-Wide Approach in *Arabidopsis thaliana* to Assess the Toxicity of Cadmium Sulfide Quantum Dots. *Environ. Sci. Technol.* 2014, 48 (10):5902–5909.

²Marmiroli M. *et al.* A genome-wide nanotoxicology screen of *Saccharomyces cerevisiae* mutants reveals the basis for cadmium sulfide quantum dots tolerance and sensitivity. *Submitted*.

³Lewinski N. *et al.* Cytotoxicity of Nanoparticles. *Small* 2008, 4:26-49.

⁴Rzgalinski B. and Strobl J. Cadmium-containing nanoparticles: Perspectives on pharmacology and toxicology of quantum dots. *Toxicology and Applied Pharmacology* 2009, 238: 280-288.





2ND PARMA NANO-DAY

WORKSHOP SCIENTIFICO

3-4 DICEMBRE 2015

AUDITORIUM PLESSO POLIFUNZIONALE
CAMPUS, AREA DELLE SCIENZE E DELLE TECNOLOGIE
UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PARMA



Mitochondrial effects of CdS quantum dots in a human hepatoma cell line

Laura Paesano[#], Alessio Perotti, Annamaria Buschini, Nelson Marmioli

Department of Life Sciences, University of Parma

[#]laura.paesano@libero.it

Cadmium toxicity in humans has been documented for 50 years and, as a result, cadmium has been classified by IARC as category 1 carcinogen. The rapid development of nanotechnology and the spread of cadmium-containing nanomaterials promoted deeper investigation on human and environmental health risks. Cadmium sulfide quantum dots (CdS QDs) are widely used in the electric and electronic industries to produce semiconductor structures, solar energy and optoelectronic devices. It has been shown that CdS as nanoscale material has different physical and chemical properties than its "bulk" counterpart.

The aim of the research is to evaluate cytotoxic and genotoxic potential of the CdS QDs in human cells and to understand the mechanism involved. A human hepatoma cell line (HepG2) was used as a model to determine the toxic effects of the exposure to CdS QDs.

Uptake of CdS QDs was determined by flow cytometry and MTS assay was used to assess the viability of the human tumor cells exposed towards increasing concentrations of CdS QDs (1.5÷100 µg/ml). For the molecular characterization of the mechanism involved in nanomaterials toxicity, gene expression analysis was performed by means of Real time-PCR in HepG2 cells treated with two different concentrations to simulate "low toxic" (3 µg/ml) and "highly toxic" conditions (14 µg/ml). DNA damage was measured using Comet assay showing lack of genotoxicity in tested conditions. Furthermore ROS generation was assessed using the fluorescent probe 2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate.

Overall, the study demonstrated that CdS QDs may induce mitochondrial depolarization through the disruption of key cellular processes.

