



**UNIVERSITÀ  
DEGLI STUDI  
DI PADOVA**



**DIPARTIMENTO DI INGEGNERIA DELL'INFORMAZIONE  
CORSO DI LAUREA IN INGEGNERIA BIOMEDICA**

**“NANOPARTICELLE E LORO APPLICAZIONI NELLE MALATTIE  
NEURODEGENERATIVE”**

**Relatore: Prof. Andrea Bagno**

**Laureanda: Vardabasso Irene**

**ANNO ACCADEMICO 2022 – 2023**

**Data di laurea 19/07/2023**



## **Indice**

<b>Abstract</b>	pagina 5
<b>Introduzione</b>	pagina 6
<b>Capitolo 1: Sviluppo delle nanoparticelle</b>	pagina 7
1.1 Evoluzione della nanotecnologia	pagina 7
1.2 Definizione delle nanoparticelle	pagina 9
1.3 Metodi di sintesi con approccio top-down	pagina 11
1.3.1 Macinazione meccanica e ball milling	pagina 11
1.3.2 Elettrofilatura	pagina 12
1.3.3 Litografia	pagina 12
1.3.4 Ablazione laser	pagina 13
1.3.5 Scarica ad arco	pagina 13
1.4 Metodi di sintesi con approccio bottom-up	pagina 13
1.4.1 Metodo sol-gel	pagina 13
1.4.2 Sintesi idrotermale e solvotermale	pagina 14
1.4.3 Microemulsione inversa	pagina 14
<b>Capitolo 2: Tipologie di nanoparticelle</b>	pagina 15
2.1 Nanoparticelle metalliche	pagina 15
2.1.1 Nanoparticelle d'oro	pagina 15
2.1.2 Nanoparticelle d'argento	pagina 17
2.2 Nanoparticelle magnetiche	pagina 19
2.3 Nanoparticelle organiche	pagina 21
2.3.1 I liposomi	pagina 22
2.3.2 Nanoparticelle solide lipidiche	pagina 22
2.3.3 Nanoparticelle polimeriche	pagina 24
2.3.4 Micelle polimeriche e dendrimeri	pagina 26
2.4 Nanoparticelle a base di carbonio	pagina 27
2.4.1 I carbon dots	pagina 27
2.4.2 I nanotubi di carbonio	pagina 28
<b>Capitolo 3: Applicazioni nelle malattie neurodegenerative</b>	pagina 30
3.1 Il sistema nervoso centrale e la barriera emato-encefalica	pagina 30
3.2 I disturbi neurologici neurodegenerativi	pagina 32
3.2.1 Il morbo di Alzheimer	pagina 32

3.2.2 La malattia di Parkinson	pagina 33
3.2.3 La malattia di Huntington	pagina 34
3.2.4 La sclerosi laterale amiotrofica (SLA)	pagina 35
3.3 Nanoparticelle per il rilascio di farmaci per le malattie neurodegenerative	pagina 36
3.3.1 Il rilascio di farmaci per il morbo di Alzheimer	pagina 37
3.3.2 Il rilascio di farmaci per il morbo di Parkinson	pagina 39
3.3.3 Il rilascio di farmaci per la malattia di Huntington e SLA	pagina 41
3.4 Teranostica delle malattie neurodegenerative tramite nanoparticelle	pagina 41
3.4.1 L'applicazione delle nanoparticelle di ossido di ferro nelle malattie neurodegenerative	pagina 43
3.4.2 L'applicazione dei carbon dots nelle malattie neurodegenerative	pagina 44
<b>Conclusioni</b>	pagina 46
<b>Bibliografia</b>	pagina 48

## **Abstract**

La presente tesi investiga l'applicazione delle nanoparticelle nelle malattie neurodegenerative, illustrando prima di tutto la loro evoluzione, evidenziando i progressi e le scoperte che hanno aperto la strada al loro utilizzo in ambito medico, analizzando inoltre alcuni metodi di sintesi. Vengono in seguito esaminate in dettaglio le caratteristiche delle diverse tipologie di nanoparticelle, sia organiche che inorganiche, utilizzabili in medicina. Infine, vengono riprese le caratteristiche più salienti delle nanoparticelle utilizzabili nella cura delle malattie quali Alzheimer, Parkinson, SLA, e Huntington che rappresentano una sfida ancora aperta in termini di trattamento efficace. Le nanoparticelle risultano una strategia promettente grazie al loro potenziale e alle loro caratteristiche uniche: le nanoparticelle metalliche e magnetiche offrono vantaggi sia in termini di drug delivery che di imaging, le nanoparticelle organiche forniscono eccellenti capacità di incapsulamento e di rilascio controllato di farmaci. In particolare, si vuole fornire una prospettiva sul potenziale delle nanoparticelle per il rilascio mirato di farmaci, per diagnostica e imaging, e per la teranostica.

In questa tesi si discute inoltre la biocompatibilità delle nanoparticelle: questo aspetto è particolarmente rilevante e richiede di effettuare studi preclinici e clinici approfonditi.

Le nanoparticelle offrono buona speranza per la cura delle malattie neurodegenerative, permettendo di superare ostacoli finora invalicabili (quali la barriera emato-encefalica), portando quindi ad un miglioramento concreto della vita dei pazienti.

## Introduzione

Le nanoparticelle sono una delle molte nanotecnologie sviluppatesi nell'ambito delle nanoscienze. Grazie alla collaborazione tra varie discipline scientifiche quali, ad esempio, la chimica, la fisica, la biologia e l'ingegneria, le nanotecnologie si sono evolute a partire da metà del ventesimo secolo procedendo a grandi passi fino al giorno d'oggi.

Con nanotecnologia si intende la comprensione e il controllo della materia su dimensioni nanometriche. Proprio grazie a queste dimensioni, che comportano interazioni e proprietà chimiche, meccaniche, elettriche e magnetiche della materia estremamente diverse da quelle che regolano oggetti di più grandi dimensioni, si sono sviluppate nuove applicazioni e tecnologie nei settori più disparati. In ambito biomedicale, le nanoparticelle sono utilizzate per vari scopi, quali il rilascio di farmaci, la diagnostica, la terapia personalizzata e la produzione di biomarcatori. Le nanoparticelle sono state oggetto di molte ricerche soprattutto nella cura di tumori e altre malattie vista la possibilità di internalizzazione cellulare consentita dalle loro dimensioni. Quest'ultime inoltre permettono di avere un elevato rapporto superficie/volume, che può essere sfruttato per la funzionalizzazione della nanoparticella stessa, permettendone il passaggio attraverso molte barriere biologiche. Infatti, un ambito in cui sono molto sfruttate le nanoparticelle è la terapia direzionale (che prevede il rilascio di farmaci mirato ad un preciso target) e personalizzata, sfruttata nel trattamento di tumori e malattie neurodegenerative.

La presente tesina ha come obiettivo illustrare l'utilizzo delle nanoparticelle nella cura delle malattie neurodegenerative, studiandone le applicazioni maggiormente consolidate ma anche quelle più promettenti. Inoltre, si espone come le nanotecnologie si sono sviluppate, i maggiori metodi di sintesi ed i materiali per la fabbricazione delle nanoparticelle per avere una visione più completa nello studio delle applicazioni.

# Capitolo 1. Sviluppo delle nanoparticelle

## 1.1 Evoluzione della nanotecnologia

La National Nanotechnology Initiative (NNI) degli Stati Uniti definisce la nanotecnologia come la scienza, l'ingegneria e la tecnologia condotte su scala nanometrica, in particolare tra 1 nm e 100 nm (Figura 1.1), dove fenomeni unici portano a nuove applicazioni in un ampio numero di campi, dalla chimica, fisica e biologia, alla medicina e ingegneria [1]. L'aspetto più importante delle nanotecnologie è proprio dato dalla loro misura: le proprietà fisiche, chimiche e biologiche della materia su questa dimensione differiscono in modo fondamentale e significativo dalle proprietà che la materia stessa avrebbe su dimensioni macroscopiche.

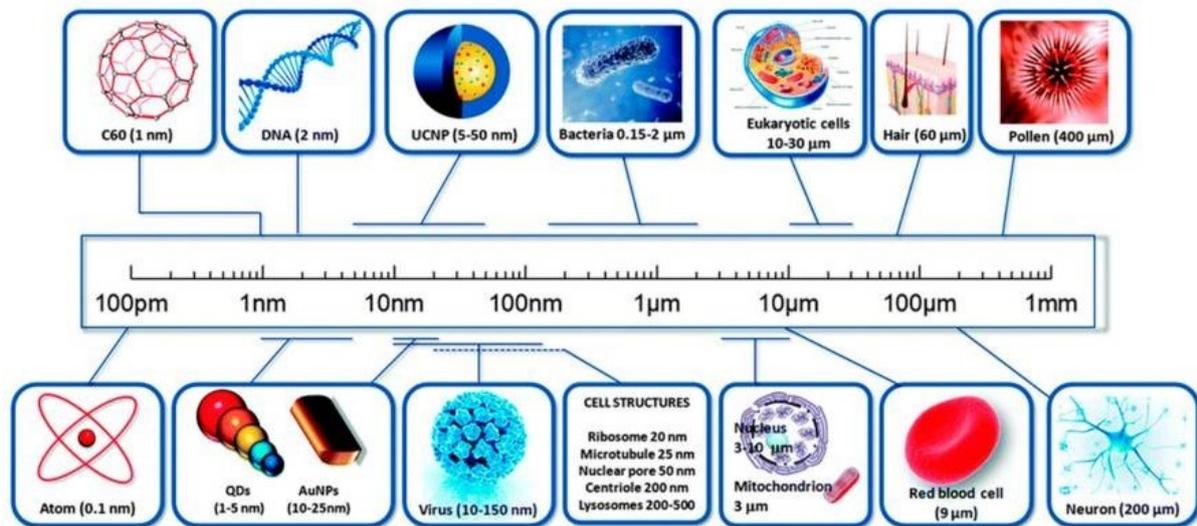


Figura 1.1: Scala per confronto delle dimensioni relative alle nanotecnologie.

Le nanotecnologie sono perciò l'applicazione delle conoscenze derivanti dalla nanoscienza. Il concetto di nanoscienza fu per la prima volta introdotto da Richard Feynman nel 1959 alla conferenza intitolata "There's Plenty of Room at the Bottom" nella quale egli presentò l'idea di usare degli strumenti per costruire dispositivi sempre più piccoli fino ad arrivare al livello molecolare. Per fare ciò, secondo Feynman si sarebbe dovuto andare ad agire direttamente sulla posizione degli atomi nella materia [2]. Il termine nanotecnologia fu coniato, però, solo nel 1974 nell'articolo "On the Basic Concept of Nano-Technology" di Norio Taniguchi, prima pubblicazione scientifica in cui la fattibilità della nanotecnologia fu dimostrata [3]. Successivamente, nel 1986, Kim Eric Drexler pubblicò un libro intitolato "Engines of Creation: The Coming Era of Nanotechnology", in cui egli propose un apparato in grado di manipolare

indipendentemente molecole e atomi e quindi di produrre nanostrutture auto-assemblabili, facendo nascere quindi la nanotecnologia molecolare [4].

Negli anni 80 vi fu quindi una grande diffusione di interesse per queste nuove tecnologie, tanto da attirare molti ricercatori, e dal punto di vista sperimentale si iniziarono a escogitare delle tecniche di sintesi per produrre le nanotecnologie. Non fu la prima volta nella storia dell'umanità in cui si maneggiavano dei "nano-oggetti", infatti già gli artigiani e i fabbri romani del IV secolo d.C. avevano inconsapevolmente utilizzato delle nanoparticelle d'oro, come si può notare nell'opera Coppa di Licurgo, per creare effetti visivi quali il cambiamento di colore della coppa se illuminata o meno. Lo stesso principio fu sfruttato nelle ceramiche medievali e rinascimentali attraverso la tecnica del lustro. Queste proprietà ottiche dei metalli a livello nanometrico furono spiegate solo nel 1857 da Michael Faraday.

Uno degli eventi più significativi nella ricerca della nanoscienza e delle nanotecnologie fu l'invenzione di un nuovo microscopio, il microscopio a effetto tunnel (STM) presso il Laboratorio di Ricerca IBM di Zurigo nel 1981 [5]. Questa invenzione portò poi allo sviluppo del microscopio a forza atomica (AFM), e a quello a scansione di sonda (SPM).

Nel 1985, Robert Curl, Harold Kroto e Richard Smalley scoprirono una nuova forma allotropica del carbonio: sfere molto stabili chiamate successivamente fullerene C<sub>60</sub>. Queste sfere si originano da grafite fatta evaporare, grazie ad un laser focalizzato, in atmosfera inerte [6]. Nel 2004 fu scoperta una nuova classe di nanomateriali carbonici: i carbon dots (C-dots). I carbon dots hanno dimensione minore ai 10 nm e furono scoperti accidentalmente da Xu durante la purificazione di un nanotubo di carbonio a parete singola fluorescente [7].

La ricerca in questo ambito divenne presto oggetto di molte attenzioni, soprattutto per quanto riguarda la nanotecnologia biologica, portando a nuove scoperte sempre più rilevanti tanto da riuscire ad attirare finanziamenti non indifferenti ed essere riconosciuta come uno degli ambiti di ricerca prioritari, sviluppandosi in settori diversi ad esempio, per citarne alcuni, a scopi ambientali, energetici ed elettronici. Più recentemente, si è visto anche un forte inserimento delle discipline informatiche nella nanoscienza, in particolare nella nanomedicina, che permettono, grazie al machine learning, di avere analisi predittive e di facilitare lo sviluppo di nanotecnologie più efficaci.

La sequenza temporale della scoperta delle nanotecnologie è riassunta in Tabella 1.1 [8].

Year	Event
4th Century	Lycurgus Cup (Colored glass).
500–1450	Cathedrals (Stained glasses windows).
1450–1600	Deruta Pottery (Iridescent/metallic clusters).
1857	Michael Faraday (Synthesis of colloidal ruby gold nanoparticles).
1908	Gustav Mie (Light scattering nanoparticles).
1928	Edward Synge (Near-field optical microscope).
1931	Max Knoll and Ernst Ruska (invention of transmission electron microscope (TEM)).
1936	Erwin Müller (Invention of field electron microscope).
1947	William Shockley, Walter Brattain and John Bardeen (Discovery of the semiconductor transistor).
1951	Erwin Müller (Invention of field-ion microscope, first to see atoms on the surface).
1953	James Watson and Francis Crick (Discovery of DNA).
1956	Arthur Von Hippel (Molecular Engineering).
1958	Leo Esaki (Electron tunneling).
1959	Richard Feynman (There's Plenty of Room at the Bottom).
1960	Charles Plank and Edward Rosinski (Zeolites and catalysis).
1963	Stephen Papell (Invention of Ferrofluids).
1965	Gordon E. Moore (Moore's Law).
1970	Eiji Osawa (Predicted the existence of C60 in the form of icosahedron).
1974	Norio Taniguchi (First use of the term "Nanotechnology").
1974	Mark A. Ratner and Arieh Aviram (Molecular electronics).
1977	Richard P. Van Duyne (Discovery of Surface Enhanced Raman Spectroscopy (SERS)).
1980	Jacop Sagiv (Discovery of Self-Assembly Monolayers (SAMs)).
1981	Gerd Binnig and Heinrich Rohrer (Invention of Scanning Tunneling Microscope (STM)).
1981	Alexey Ekimov (Discovery of nanocrystalline Quantum Dots in a glass matrix).
1981	Eric Drexler (Molecular Engineering).
1982	Nadrian Seeman (Development of the concept of DNA Nanotechnology).
1983	Louis Brus (Discovery of colloidal Quantum Dots).
1985	Richard Smalley, Robert Curl and Harold Kroto (Discovery of Buckminsterfullerenes C60).
1986	Gerd Binnig, Christoph Gerber and Calvin F. Quate (Invention of Atomic Force Microscope (AFM)).
1987	Dimitri Averin and Konstantin Likharev (Single-Electron Tunneling (SET) transistor).

Tabella 1.1: Timeline dell'evoluzione delle nanotecnologie.

## 1.2 Definizione di nanoparticelle

Secondo la American Society for Testing and Materials (ASTM), le nanoparticelle (NPs) sono particelle aventi dimensioni comprese tra 1 e 100 nm, che possono o meno presentare proprietà intensive legate alle loro dimensioni (Figura 1.2) [9].



Figura 1.2: Esempio di nanoparticelle.

Alcune delle proprietà più rilevanti, scaturite dalla dimensione che rende vantaggioso il rapporto tra area di superficie e volume delle NPs (il rapporto cresce al diminuire della dimensione delle nanoparticelle), sono una maggiore reattività chimica, una maggiore resistenza meccanica, una conducibilità elettrica più efficiente e maggiore attività biologica. Queste proprietà diventano particolarmente utili da sfruttare per il rilascio di farmaci, come verrà spiegato in seguito. Le nanoparticelle hanno inoltre proprietà ottiche differenti dipendenti da forma, materiale e dimensioni. Ciò rende possibile utilizzare le NPs come biomarcatori ottici. Le loro dimensioni, infatti, fanno sì che le nanoparticelle seguano leggi che si trovano tra la fisica quantistica, secondo cui esse acquistano comportamento ondulatorio e livelli energetici discreti e quantizzati, e quella classica, che attribuisce uno spettro energetico continuo.

Le nanoparticelle differiscono per dimensione, origine, forma (sferica, cilindrica, cava, filamentosa, irregolare), composizione e possono essere utilizzate singolarmente, ossia allo stato disperso, o in forma aggregata o agglomerata. Gli aggregati sono costituiti da nanoparticelle legate tra loro da forze molto stabili, mentre gli agglomerati sono costituiti da nanoparticelle tenute insieme da forze deboli come quelle di Van der Waals, o da tensione superficiale. Questa tendenza però attenua la reattività tipica delle NPs, visto l'aumento di dimensioni che portano ad avere proprietà più simili a quelle delle macroparticelle.

Non esiste una vera e propria classificazione netta tra le varie nanoparticelle ma si può utilizzare questa ripartizione: nanoparticelle lipidiche (come ad esempio i liposomi), polimeriche (come ad esempio nanoparticelle di chitosano o dendrimeri) e inorganiche, che a loro volta si dividono in nanoparticelle metalliche e quantum dots (Figura 1.3).

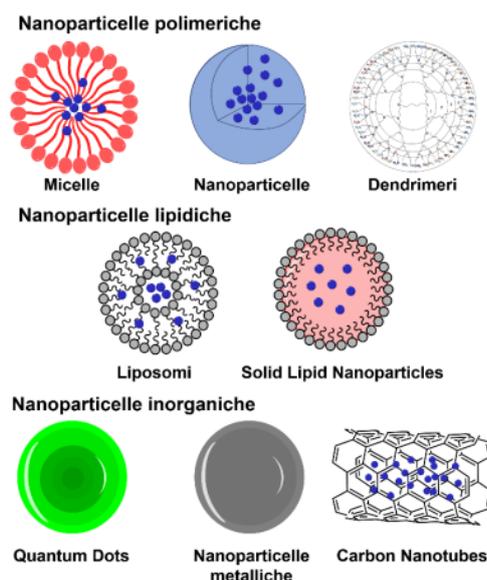


Figura 1.3: Panoramica dei nanostrutture più utilizzati in ambito medico.

Negli ultimi anni è stata sfruttata molto anche la nanoinformatica, che ha fornito un grosso aiuto nello sviluppo delle nanoparticelle, dando la possibilità di bypassare le barriere dei modelli in vitro, di poter ottimizzare la focalizzazione del bersaglio nel rilascio di farmaci, e di riuscire a minimizzare i danni collaterali quando si provano delle cure per malattie e tumori grazie al nano-modeling.

Per sintetizzare le nanoparticelle ci sono due metodi principalmente utilizzati al giorno d'oggi: il metodo Top-down e quello Bottom-up (Figura 1.4).

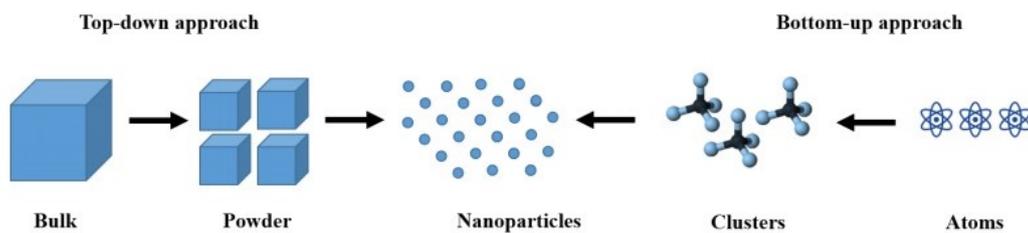


Figura 1.4: Differenza tra approccio top-down e bottom-up per la sintesi di nanoparticelle.

### 1.3 Metodi di sintesi con approccio top-down

Nei metodi di sintesi che utilizzano un approccio top-down, il materiale di partenza è diviso in parti sempre più piccole fino a formare materiali nanostrutturati. I metodi che fanno parte di questa categoria sono: macinazione meccanica, elettrofilatura, litografia, ablazione laser e scarica ad arco.

#### 1.3.1 Macinazione meccanica e ball milling

Il metodo della macinazione meccanica fu inventato negli anni '70, ed è un processo industriale che produce le nanoparticelle in modo efficiente (dal punto di vista energetico e quantitativo), a partire dal materiale nella sua forma di bulk, attraverso la formazione di polvere nanostrutturata. Questo metodo offre la possibilità di formare miscele a fasi diverse, e offre la possibilità di produrre diverse tipologie di polvere nanostrutturata. Un'importante caratteristica di questo metodo è che, date le basse temperature richieste dal processo, i grani che si formano possono crescere molto lentamente, dando la possibilità di ottenere nanoparticelle cristalline, con dimensioni di grano ridotte tramite la formazione e l'organizzazione di bordi di grano all'interno delle particelle. Questo metodo di sintesi prevede la macinatura di una polvere monofasica (con particelle non maggiori di 100 nm) controllando il bilanciamento tra frattura e parziale fusione. In questo modo possono essere prodotte particelle con grandezza da 50-100

$\mu\text{m}$  fino a 2-20 nm. I continui urti delle sfere e l'attrito meccanico provocano una deformazione plastica che a sua volta aumenta, dato l'aumento di temperatura (da ambiente fino a 200 °C). Con questo meccanismo si produce un affinamento della struttura interna delle polveri.

Una tipologia di macinazione meccanica è il metodo di sintesi ball milling. Questo processo utilizza un mulino a biglie in cui viene inserita della polvere non raffinata di diversi materiali, e come spiegato precedentemente permette di produrre nanoparticelle di leghe, nitruri, ossidi metallici e nanocristalli di compositi metallo-ceramici. In questo metodo è importante che il processo sia condotto in atmosfera inerte, ad esempio in presenza di gas inerte come l'Argon o sottovuoto [10].

### *1.3.2 Elettrofilatura*

Il processo di sintesi tramite elettrofilatura (electrospinning) è utilizzato principalmente per produrre nanofibre, tipicamente polimeriche. Questa tecnica si basa su un processo elettrodinamico, il quale è fondato su un modello matematico che fu teorizzato da Taylor, che descrive la forma delle creste che si staccano da un fluido sottoposto ad un campo elettrico. Infatti, il processo prevede l'innalzamento del potenziale elettrostatico di un materiale ad alta coesione molecolare (fuso o in soluzione), facendo aumentare quindi la carica superficiale del fluido all'interno di una siringa. La polarizzazione del fluido fa sì che la repulsione elettrostatica controbilanci la tensione superficiale andando perciò a influenzare la forma della goccia che esce dall'ago, la quale assume la forma a cono di Taylor. Dalla punta del cono (in cui è concentrato lo stress elettrico) si genera un getto che subisce una fase di allungamento e di assottigliamento in cui si generano le fibre.

Questo metodo può essere utilizzato per sviluppare nanofibre ultrasottili, che possono essere cave, ricoperte da un secondo materiale, organiche, inorganiche o ibride.

### *1.3.3 Litografia*

La litografia è una tecnica che si basa sull'utilizzo di un fascio di luce o di elettroni: può essere infatti considerata un'estensione del comune concetto di processo fotografico. Sulla superficie che si vuole nanostrutturare, si deposita un sottile strato di resina sensibile alle radiazioni. Quest'ultimo viene illuminato in zone selezionate attraverso una maschera (che delinea la geometria dei prodotti) oppure viene scansionato da un fascio di elettroni focalizzato. Il fascio provoca delle modifiche chimiche importanti allo strato iniziale.

La litografia è classificata in base al fascio che si vuole utilizzare, infatti non esiste un solo metodo, ma al contrario ve ne sono numerosi come la nanolitografia, la litografia ottica e la litografia 'scanning probe'.

#### *1.3.4 Ablazione laser*

Questa tecnica di sintesi genera le nanoparticelle utilizzando un raggio laser ad alta energia che colpisce il materiale target, facendolo vaporizzare. È una tecnica ecosostenibile visto che non c'è bisogno di nessun agente stabilizzante o di altri prodotti chimici [11]. Questa metodologia di sintesi permette di produrre diverse tipologie di nanoparticelle, tra cui quelle metalliche e quelle ceramiche. Se si conduce l'ablazione laser in liquido, si vengono a generare soluzioni colloidali di nanoparticelle senza l'utilizzo di reagenti o stabilizzanti che andrebbero a contaminare le loro proprietà chimico-fisiche.

#### *1.3.5 Scarica ad arco*

Questo metodo di sintesi è principalmente utilizzato per creare nanomateriali a base di carbonio, in particolare il fullerene: non ne è escluso però l'uso per nanoparticelle metalliche. Questa tecnica si basa sulla possibilità di caricare elettricamente due elettrodi (il catodo è fatto di grafite nel caso del fullerene, e l'anodo da precursori) posti in un tubo, sfruttando il fenomeno dell'arco elettrico (in cui una scarica elettrica fluisce attraverso il tubo che contiene aria, o elio se viene utilizzata la grafite) che va a vaporizzare il catodo e sublimare i precursori del carbonio [12]. In questo le particelle si aggregano e si depositano.

### **1.4 Metodi di sintesi con approccio bottom-up**

A differenza dei processi di sintesi precedenti, quelli che prevedono il modello bottom-up danno origine alle nanoparticelle a partire da entità singole, messe poi in connessione tra loro andando a formare componenti più grandi. Le tipologie di sintesi in questo caso si classificano in: tecniche in fase vapore e in fase liquida. In seguito, vengono espone quelle più sfruttate per la creazione di nanoparticelle.

#### *1.4.1 Metodo sol-gel*

Il metodo sol-gel è una tecnica in fase liquida (wet-chemical), perché sfrutta, nel processo di formazione delle nanoparticelle, un liquido precursore in cui sono disperse particelle solide, amorphe o cristalline chiamato sol, e il sol viene poi convertito in un reticolo solido continuo (gel) [13]. Questa tipologia di sintesi si basa su reazioni di idrolisi e di condensazione.

I precursori principali per questa tecnica sono alcossidi metallici o sali di metalli data la loro disponibilità dei legami M-OR. La reazione di idrolisi comporta la sostituzione di un gruppo alcossidico con un gruppo ossidrile portando alla condensazione delle catene dei precursori (sol polimerico). Il gel viene poi fatto essiccare per eliminare la fase liquida del gel, promuovere condensazione ed incrementare le proprietà meccaniche.

#### 1.4.2 Sintesi idrotermale e solvotermale

La sintesi idrotermale si riferisce al trattamento di soluzioni acquose di sali metallici o metallorganici a temperature e pressioni elevate (con valori attorno al punto critico). Questa tecnica viene condotta in un'autoclave in cui si vanno a variare le caratteristiche delle soluzioni iniziali (pH, solvente, concentrazione degli ioni) e le condizioni del processo (come la temperatura e la pressione all'interno dell'autoclave) andando quindi a controllare forma e dimensioni di nanoparticelle e fasi cristalline ottenute. La sintesi solvotermale cambia da quella idrotermale per l'utilizzo di un mezzo non liquido. Recentemente si stanno impiegando anche le microonde in questi metodi di sintesi.

#### 1.4.3 Microemulsione inversa

Questo metodo di sintesi sfrutta la proprietà dei tensioattivi, che dissolti in un solvente organico, formano aggregati sferici chiamati "micelle inverse": le teste polari sono situate verso il centro della micella (Figura 1.5). Questo nucleo acquoso funge da nanoreattore, in cui avviene la reazione di polimerizzazione, e la sua dimensione può essere controllata variando il rapporto acqua-tensioattivi al fine di incrementare la stabilità delle micelle, grazie a repulsioni di natura elettrostatica e/o sterica. Questo metodo permette quindi di controllare le dimensioni delle nanoparticelle con molta precisione [12].

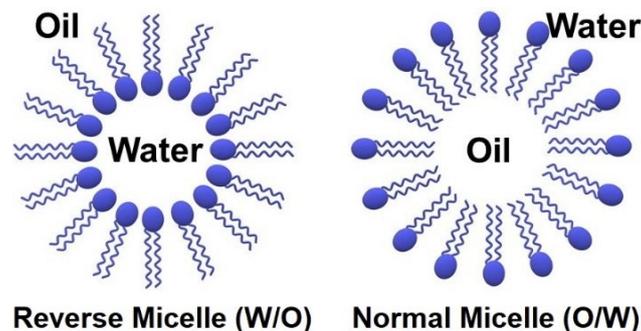


Figura 1.5: Differenza tra micella e micella inversa.

## Capitolo 2. Tipologie di nanoparticelle

Le nanoparticelle (NPs) possono essere classificate in base al materiale con cui sono prodotte. In genere, le nanoparticelle inorganiche hanno un nucleo centrale di materiale metallico o ceramico che ne definisce le proprietà magnetiche, ottiche ed elettriche; tale nucleo può essere ricoperto da una membrana esterna che, in ambito biologico e biomedicale, serve a proteggere la struttura e può essere sfruttata, in base alla composizione, anche per interagire con elementi circostanti. Le nanoparticelle organiche, invece, sono interamente costituite da lipidi o catene polimeriche. In seguito, si elencano le nanoparticelle che in ambito biomedico hanno trovato maggior utilizzo.

### 2.1 Nanoparticelle metalliche

Le particelle metalliche hanno importanza rilevante nelle applicazioni biomediche. Ciò è dovuto al fatto che, per prima cosa, esistono diversi metodi di sintesi che offrono molte possibilità nel modellare, conferire grandezza e forma le più adatte al contesto a cui poi le NPs metalliche dovranno essere applicate. Inoltre, le loro caratteristiche morfologiche e la dimensione permettono una buona interazione con sistemi fisiologici e patologici, mentre le caratteristiche chimico-fisiche conferiscono numerose opportunità di funzionalizzare la nanoparticella stessa (utilizzando, ad esempio, anticorpi, enzimi, peptidi, ma anche coating sintetici o naturali) [14]. I metalli più utilizzati come materiali per le nanoparticelle, nell'ambito medicale, sono oro e argento.

#### 2.1.1 Nanoparticelle d'oro

Tra i vari metalli utilizzati per sintetizzare le nanoparticelle, l'oro è adoperato in moltissimi ambiti, non solo nella medicina. Per quanto riguarda l'uso nella nanomedicina, le nanoparticelle d'oro sono utilizzate come biosensori ottici ed elettrochimici, agenti di contrasto per la risonanza magnetica (e per l'imaging in generale), per la diagnostica, in diverse terapie (ad esempio radioterapia), e il rilascio di farmaci. L'interesse verso questo metallo deriva dal fatto che, in scala nanometrica, possiede proprietà uniche di fotoattivazione, fotoluminescenza, biocompatibilità, inerzia ed è facilmente sintetizzabile sotto forma di nanoparticelle.

In particolare, le importanti proprietà ottiche dell'oro dipendono intrinsecamente dalla dimensione e forma della nanoparticella, e sono determinate dal fenomeno dei plasmoni di superficie localizzati (LSP). I plasmoni superficiali localizzati sono eccitazioni di elettroni di conduzione che non si propagano e si trovano su nanostrutture metalliche che interagiscono con

un campo elettromagnetico. I modi plasmonici si creano dallo scattering di nanoparticelle molto piccole, di diametro minore della lunghezza d'onda luminosa, con onde elettromagnetiche. Il campo elettromagnetico può penetrare all'interno della particella e sposta gli elettroni liberi rispetto agli ioni del reticolo. In conseguenza a ciò, anche le cariche di segno opposto si accumulano sulla superficie opposta delle particelle, polarizzando il metallo e ripristinando la stabilità del campo elettromagnetico locale. In generale questa risposta ottica può essere molto complicata visto che le particelle hanno più di un modo di risonanza, differiscono per carica e distribuzione del campo, dimensione, forma e ambiente in cui si viene a creare il fenomeno [15].

La tossicità delle nanoparticelle d'oro è stata oggetto di molte ricerche; ed è stato osservato che esse sono sostanzialmente biocompatibili, almeno in un range tra 1 e 100 nanoparticelle per cellula [16]. Le NPs d'oro possono essere modificate superficialmente, funzionalizzate o rivestite, e tutto ciò ha un grosso impatto nella tossicità delle nanoparticelle stesse. Si è infatti visto che se si legano alle nanoparticelle dei polimeri cationici (monostrato tiolo alchilico) la tossicità peggiora. Invece se si legano le nanoparticelle a un monostrato anionico, risultano quasi per nulla tossiche [17]. Un altro aspetto da considerare è l'affinità delle NPs d'oro con il DNA: sono stati mostrati dei cambiamenti nell'espressione genica per l'acuta e cronica esposizione alle nanoparticelle d'oro [18]. Sotto l'aspetto citotossicologico quindi le nanoparticelle d'oro sono considerate biocompatibili (più di nanoparticelle ottenute con altri metalli puri) a meno che non siano funzionalizzate con complessi cationici; quindi, possono risultare molto utili ma si suggerisce comunque di condurre un'indagine tossicologica prima di utilizzarle in ambito medicale. Le nanoparticelle d'oro, oltre agli utilizzi consolidati, possono offrire un numero di applicazioni ancora più ampio dovuto alle diverse modificazioni superficiali, funzionalizzazioni, e bioconiugazione ad esempio con peptidi, frammenti di DNA e carboidrati (Figura 2.1) [19]. In particolare, l'aggiunta di polimeri biodegradabili e di proteine può essere molto utile per il controllo della stabilità dei sistemi colloidali delle nanoparticelle d'oro<sup>1</sup> (e quindi della reattività del metallo), e per poter assemblare o rilasciare una determinata sostanza ad uno specifico target. I ligandi instaurano con la superficie delle nanoparticelle dei legami di diversa natura derivanti, ad esempio, da interazioni elettrostatiche o interazioni idrofobiche, per lo più dovute a dei gruppi funzionali del ligando stesso. Nel caso specifico delle NPs d'oro, il gruppo tiolo (-SH) ha mostrato la maggiore affinità (200 kJ/mol) e si lega a nanoparticelle con legami covalenti [20].

---

<sup>1</sup> Le nanoparticelle d'oro si trovano spesso sottoforma di sistemi colloidali.

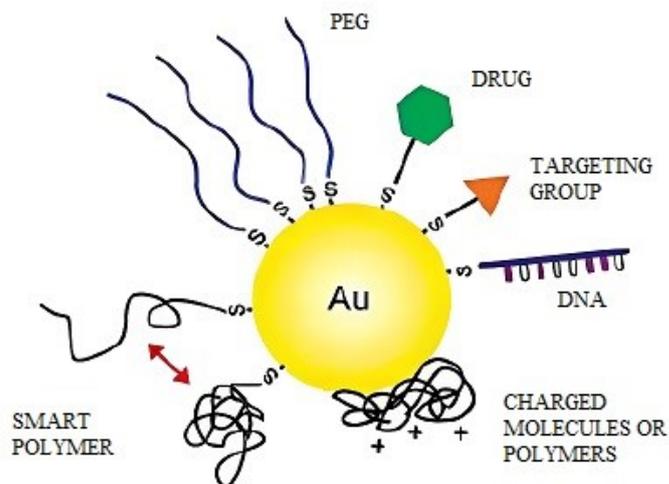


Figura 2.1: Esempi di funzionalizzazione delle NPs d'oro.

### 2.1.2 Nanoparticelle d'argento

Sin dall'antichità i metalli pesanti come rame, oro e argento sono stati largamente usati per il controllo e il trattamento di malattie infettive. Tra questi, l'argento è il metallo che sicuramente è stato il più usato date le sue ben note proprietà antibatteriche, antimicotiche, antinfiammatorie, antivirali e antitumorali. Inoltre, è stato studiato il suo potenziale per contrastare organismi resistenti agli antibiotici. Le nanoparticelle d'argento, infatti, possono indurre un danno di tipo fisico-meccanico alle pareti cellulari microbiche: entrano nella cellula stessa e possono andare a denaturare il DNA e rilasciando ioni  $\text{Ag}^+$  danneggiano le basi azotate generando delle mutazioni. Le NPs d'argento hanno anche la capacità di generare specie reattive all'ossigeno (ROS) che sono responsabili dell'ossidazione delle proteine e dei lipidi (Figura 2.2).

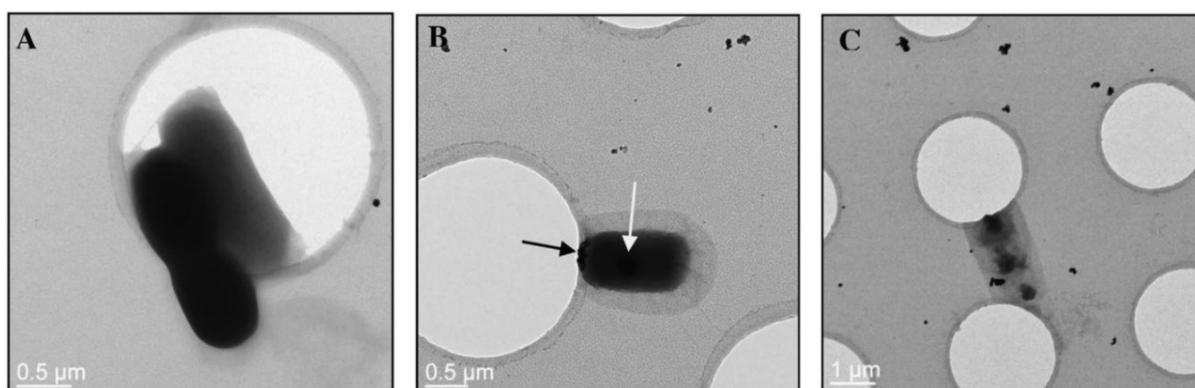


Figura 2.2: A) immagine SEM di E. coli non trattato, (B) E. coli trattato con  $8 \times 10^{-8}$  mg/ml di PEG AgNPs per 4 ore (C) E. coli trattato con  $8 \times 10^{-8}$  mg/ml di PEG AgNPs per 24 ore.

La stabilità delle nanoparticelle d'argento, e in generale dei metalli nobili, dipende principalmente dalla stabilità colloidale delle stesse. Questa può essere alterata con la funzionalizzazione delle nanoparticelle, facilmente attuabile tramite legami covalenti e non. Le modificazioni che si possono apportare presentano due vantaggi principali: la riduzione della tossicità, e la possibilità di formare dei sensori biologici estremamente precisi o la possibilità di rilasciare i farmaci più accuratamente al target desiderato.

Un esempio di come le proprietà antibatteriche e virali delle nanoparticelle possono essere migliorate, è un lavoro pubblicato da O. Yu. Golubeva [21]. Si è studiato il cambiamento della capacità antibatterica tra delle NPs d'argento senza modifiche superficiali e delle nanoparticelle che fossero funzionalizzate con un peptide ricco di prolina (C-Bac3.4). Si è visto che le NPs funzionalizzate avevano caratteristiche antibatteriche molto più pronunciate, sia verso batteri 'standard' che verso batteri resistenti ai farmaci. Per quanto riguarda l'attività antivirale, sono stati condotti, ad esempio, degli studi per il trattamento dell'HIV, e come la dimensione della particella (attorno ai 10-50 nm) favorisse l'inibizione dell'infezione.

Le nanoparticelle d'argento sono anche caratterizzate da un'alta conducibilità elettrica e termica, effetto Raman amplificato nella superficie (fenomeno secondo cui alcuni fotoni della luce con cui una NP interagisce, subiscono una diffusione anelastica) e comportamenti ottici non lineari. Questo le rende estremamente adatte ad essere usate anche come biosensori e a svolgere un ruolo importante nella diagnostica per immagini. È importante sottolineare come le nanoparticelle d'argento siano, tra le NPs metalliche, quelle che presentano maggior accentuazione dei modi plasmonici, alle lunghezze d'onda del visibile, se sottoposte a radiazione elettromagnetica. Infatti, per questo motivo è più probabile che i fotoni interagiscano con esse tramite fenomeni di fotoluminescenza, assorbimento e scattering.

Le nanoparticelle d'argento possono però risultare pericolose anche per le cellule umane perché, a differenza dell'oro, l'argento presenta maggiore reattività chimica. La tossicità dipende dalla loro forma, dimensione, modificazione superficiale, dal dosaggio e dal metodo di sintesi. Si è visto che le particelle irregolari sono più propense a danneggiare fisicamente le cellule: se sono più piccole (10-70 nm) hanno la capacità di passare attraverso la membrana cellulare e limitarne le funzioni vitali (se fossero più grandi dovrebbero invece passare attraverso i canali ionici). Se sono ottenute tramite metodi chimici, possono risultare più tossiche, mentre la presenza di gruppi funzionali legati alle nanoparticelle può ridurre di molto la tossicità e aumentarne la biocompatibilità [22]. A favore di ciò vi è uno studio, condotto da Jeremy Bonor, che dimostra l'importanza della funzionalizzazione delle nanoparticelle d'argento: legando L-lisina ad esse le nanoparticelle mostrano tossicità praticamente nulla [23].

L'uso quindi delle NPs d'argento deve essere limitato a dosi piccole (50-150  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ), e molte applicazioni delle proprietà antibatteriche e antinfiammatorie sono sfruttate in impianti ossei, dentali ed eventualmente in garze.

## 2.2 Nanoparticelle magnetiche

Le nanoparticelle magnetiche (MNPs), sono un'importante classe di nanomateriali utilizzati nell'ambito biomedico. Le loro proprietà magnetiche, infatti, rendono possibili applicazioni come: diagnostica per immagini, marcatura cellulare, rilascio controllato di farmaci e geni e per varie terapie oncologiche.

In natura esistono varie forme di magnetismo, caratterizzate dai diversi orientamenti dei momenti magnetici di un materiale sotto l'effetto di un campo magnetico esterno. I materiali ferromagnetici, come ferro e nichel, hanno momenti magnetici atomici allineati di egual valore; la loro struttura cristallina inoltre permette un'interazione diretta di accoppiamento tra i momenti, i quali possono influenzare significativamente il flusso del campo magnetico. I materiali che presentano magnetizzazione permanente in assenza di un campo magnetico esterno sono detti magneti permanenti. Gli ossidi di ferro, invece, sono materiali antiferromagnetici, con un comportamento opposto a quello precedentemente esposto, in cui vi è la presenza di sottoreicoli in cui i momenti magnetici sono disposti in maniera opposta; i momenti mostrano un allineamento antiparallelo e la risultante totale è nulla.

Le nanoparticelle magnetiche sono di grande interesse perché le loro dimensioni, sono paragonabili a quelle di un dominio magnetico<sup>2</sup> (denominato dominio di Weis). Affinché la particella si trovi nelle condizioni di singolo dominio il diametro deve essere inferiore a:

$$R = 18 \frac{\sqrt{AK}}{\pi M_s^2}$$

dove  $A$  è la costante di rigidità di scambio,  $K$  è la costante di anisotropia e  $M_s$  è la magnetizzazione di saturazione del materiale. Alcuni valori dei raggi sono:  $R$  pari a 14 nm per il ferro e  $R$  pari a 128 nm per la magnetite. A queste dimensioni si osservano fenomeni di paramagnetismo (momenti atomici spaiati), e i materiali che presentano questa caratteristica vengono detti superparamagnetici. Le particelle superparamagnetiche non presentano magnetizzazione residua e hanno un momento magnetico molto ampio e dunque una suscettività molto più elevata delle normali particelle paramagnetiche.

---

<sup>2</sup> Un dominio magnetico si riferisce a un volume di materiale ferromagnetico in cui tutti i momenti magnetici sono allineati lungo la stessa direzione e con lo stesso verso.

Anche se il ferro presenta magnetizzazione maggiore rispetto a quello degli ossidi metallici, esso è facilmente ossidabile, il che comporta un cambiamento nella magnetizzazione di eventuali nanoparticelle di ferro (che infatti non sono utilizzate). Le nanoparticelle di ossido di ferro invece sono risultate le candidate ideali per l'applicazione in campo medico, grazie alla loro scarsa tossicità (risultano infatti biocompatibili), l'alta magnetizzazione di saturazione e l'alta suscettibilità magnetica. Le NPs di ossidi di ferro sono classificate in base alla loro dimensione: SPIO (superparamagnetic iron oxide particle) che hanno diametro superiore a 30 nm, USPIO (ultrasmall superparamagnetic iron oxide particle) con diametro inferiore a 30 nm. Tra gli ossidi del ferro vi sono: la maghemite, la magnetite e la wüstite. La maghemite cubica ( $\gamma$ - $\text{Fe}_2\text{O}_3$ ) è una delle fasi magnetiche di ossido ferrico  $\text{Fe}_2\text{O}_3$ , con struttura a spinello con formula generale  $\text{AB}_2\text{O}_4$ , nella quale gli ioni metallici occupano sia siti tetraedrici (A) che quelli ottaedrici (B) (Figura 2.3) [24]. Essa presenta comportamento ferromagnetico a temperature inferiori ai 950 K ed è spesso ottenuta da un processo di ossidazione su nanoparticelle di magnetite.

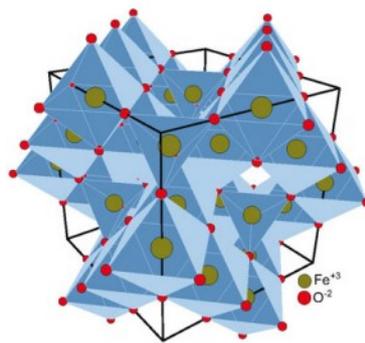


Figura 2.3: Struttura di un cristallo di maghemite.

La magnetite,  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ , ha forma cubica, con abito cristallino ottaedrico ed è interessata dalla presenza di cationi di ferro nei due stati di valenza  $\text{Fe}^{2+}$  e  $\text{Fe}^{3+}$ ; essa è ferromagnetica per temperature sotto ai 858 K. La wüstite è un ossido cubico di  $\text{Fe}^{2+}$  ed è antiferromagnetico nel suo stato naturale.

Le nanoparticelle di ossido di ferro sono formate da un nucleo di ossido di ferro magnetico e da un rivestimento utilizzato per stabilizzare la particella. Il loro nucleo presenta più precisamente, come accennato precedentemente, comportamento superparamagnetico ossia si magnetizza solo in presenza di un campo magnetico esterno. Queste proprietà le rendono molto utilizzabili nella risonanza magnetica in cui queste nanoparticelle sono usate come agenti di contrasto, in quanto presentano tempo di rilassamento diverso dagli atomi di idrogeno e permettono di migliorare la sensibilità e la risoluzione dell'immagine. Esse possono essere

anche funzionalizzate con delle molecole ben precise, così da legarsi ad un target prestabilito (come viene fatto per la diagnostica del cancro) [25]. In questo modo si riescono a rilevare anche immagini che con la risonanza magnetica normale non sarebbero rilevate. Altre applicazioni possono essere il trasporto di geni, anticorpi e farmaci, termoterapia e radioterapia. Nel caso del trasporto di farmaci e geni, queste nanoparticelle sono utilizzate principalmente per ovviare alle problematiche della farmacoterapia: infatti prima di sfruttarle non si riusciva a portare il farmaco in un sito specifico e a farlo rimanere per il tempo desiderato. Utilizzando un campo magnetico esterno si riesce a rilasciare il farmaco, legandolo in modo reversibile alla nanoparticella, in una determinata parte del corpo. Questo metodo dipende anche da molti fattori, come il dosaggio, la forma e il tipo di legame con il farmaco, ma anche dal peso del paziente, portata cardiaca e altri parametri fisiologici [26]. Per evitare che le nanoparticelle vengano internalizzate dai macrofagi, le si può legare a dei farmaci come la lovastatina, che riduce l'esposizione di recettori diretti contro di esse dei macrofagi stessi.

Le nanoparticelle magnetiche sono biocompatibili (molto di più di altri metalli puri), ma è necessario valutare il dosaggio da utilizzare e testare la suscettibilità del determinato "tessuto target" può accadere che una volta internalizzate dalla cellula, il rivestimento venga degradato e il nucleo rimanga esposto a componenti cellulari alterandone l'integrità, oppure può capitare che esso possa adsorbire proteine del plasma e indurre la reazione del sistema immunitario [27].

### 2.3 Nanoparticelle organiche

Le nanoparticelle organiche sono divise in lipidiche e polimeriche. Le nanoparticelle lipidiche comprendono i liposomi e le nanoparticelle solide lipidiche, mentre quelle polimeriche comprendono dendrimeri, nanoparticelle polimeriche e micelle (Figura 2.4).

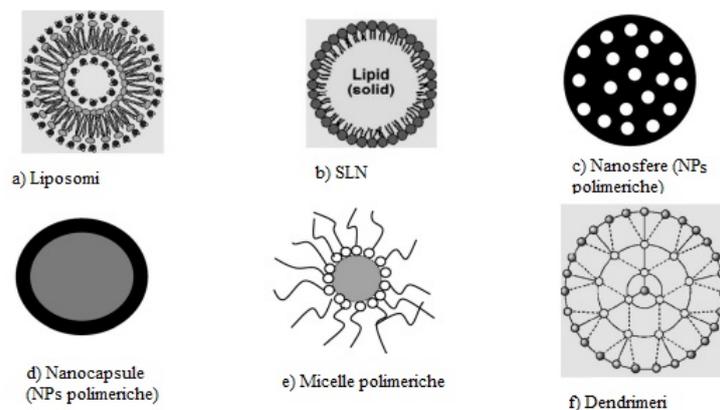


Figura 2.4: Tipologie di nanoparticelle organiche.

### 2.3.1 I liposomi

I liposomi sono nanoparticelle colloidali costituite da un doppio strato fosfolipidico che circonda una piccola area acquosa. Anche se presentano delle dimensioni limite (90-110 nm), sono considerate biotecnologie data la loro biocompatibilità. Essendo fatte di fosfolipidi, che hanno una testa idrofilica e una coda idrofobica, si dispongono spontaneamente in una sfera stabile. I liposomi sono non tossici, biodegradabili e in grado di inglobare e quindi trasportare molecole idrofobiche, idrofiliche e anfifiliche. Data la loro sicurezza, sono spesso utilizzati nel trasporto di farmaci chemioterapici o tossici. Questi farmaci possono essere caricati all'interno della membrana lipidica o nel compartimento acquoso e possono essere somministrati ad un organo o tessuto preciso. Un'altra caratteristica importante dei liposomi è la possibilità di essere costruiti, manipolandone la costituzione, per essere sensibili a variazioni di pH e temperatura e per rilasciare il farmaco in modo costante e controllato [28]. I liposomi hanno la capacità di accumularsi con facilità in regioni con permeabilità vascolare alta come i siti di infiammazione, infezione e tumori; purtroppo hanno emivita bassa perché vengono degradati molto rapidamente dai macrofagi epatici. La loro degradazione può essere ridotta tramite l'introduzione di liposomi fantasma, ossia liposomi ricoperti di materiali che prevengono l'opsonizzazione e la fagocitosi, oppure incorporare i liposomi in sostanze come il colesterolo. Il direccionamento dei liposomi può essere attivo o passivo. Quello passivo è dovuto al fatto che il tessuto neoplastico presenta vari e diffusi leak dati dalla disorganizzata vascolarizzazione del tessuto portando ad un accumulo passivo di nanoparticelle, mentre quello attivo sfrutta liposomi coniugati a ligandi. Una classe importante di quest'ultimi sono gli immunoliposomi che sono coniugati ad anticorpi. Tra questi, è rilevante citare la classe ADEPT (Antibody Directed Enzyme Prodrug Therapy), che sono legati sia ad un anticorpo diretto ad un antigene tumorale che ad un enzima in grado di attivare un profarmaco<sup>3</sup>.

### 2.3.2 Nanoparticelle solide lipidiche

Le nanoparticelle solide lipidiche (SLNs) sono sistemi colloidali costituiti da una matrice lipidica solida, sia a temperatura ambiente che corporea, stabilizzati da tensioattivi con dimensioni comprese tra 10 e 500 nm e sono preparate utilizzando diversi tipi di lipidi, come trigliceridi, acidi grassi, steroidi, cere. Gli agenti emulsionanti impiegati stabilizzano il sistema colloidale e impediscono l'aggregazione delle nanoparticelle. La scelta dei lipidi e dei tensioattivi da impiegare ricopre un ruolo importante perché vanno a determinare la dimensione

---

<sup>3</sup> Sostanza farmacologicamente inattiva che viene trasformata in vivo in una sostanza farmacologicamente attiva

e la carica superficiale della particella, ma anche la capacità di legare il farmaco che si vuole veicolare. Come per i liposomi, il principio attivo può essere localizzato nel core della particella, disperso nella matrice lipidica oppure in prossimità della superficie. La tossicità acuta e cronica di queste nanoparticelle è fortemente ridotta visto che la matrice è composta da lipidi fisiologici. I vantaggi dell'utilizzo di queste nanoparticelle sono molteplici: la possibilità di controllare il rilascio e direzionamento del farmaco (targeting attivo), migliore biodisponibilità di farmaci poco solubili in acqua, utilizzo di diverse vie di somministrazione, alta efficienza di intrappolamento del farmaco con protezione di esso da agenti degradanti. Inoltre, hanno maggiore stabilità rispetto ai liposomi e richiedono bassi costi di produzione [29]. Vi sono però diversi svantaggi nell'utilizzo delle SLNs, ad esempio la possibilità di trasportare una dose limitata del farmaco (risolvibile aumentando le dimensioni della particella, microparticelle solide lipidiche) e l'espulsione del farmaco in seguito a transazioni polimorfiche, soprattutto se la matrice è costituita da molecole simili. È un passaggio spontaneo che porta a una forma  $\beta$  più stabile (struttura cristallina ordinata), da una forma metastabile  $\alpha$  che però presenta più spazio a disposizione delle molecole del farmaco [30].

Per ovviare a questi svantaggi sono stati creati i carrier lipidici nanostrutturati (NLCs), che sono SNLs modificate in cui la matrice lipidica è costituita da una miscela di lipidi solidi differenti o da una miscela di lipidi solidi e liquidi a temperatura ambiente. Queste nanoparticelle hanno quindi struttura cristallina meno ordinata, e permettono un maggiore dosaggio del farmaco (si solubilizza meglio nel lipide liquido) e un rilascio più controllato dato che le transazioni polimorfe avvengono meno velocemente. I NLCs sono divisi in tre tipologie: di tipo imperfetto, ottenuti miscelando lipidi solidi e liquidi chimicamente molto diversi; di tipo amorfo in cui le particelle solidificano senza cristallizzare (miscela di mono-, di- e trigliceridi); di tipo multiplo costituiti da una matrice lipidica solida contenente nanocompartimenti di lipide liquido (Figura 2.5).

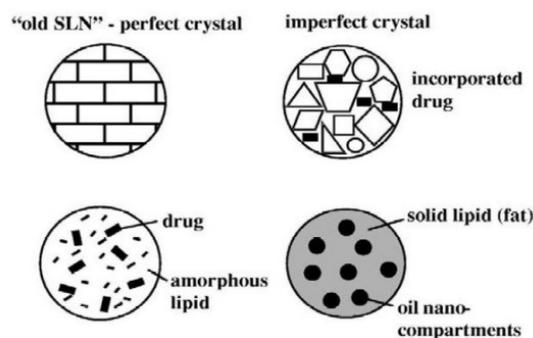


Figura 2.5: SLNs (in alto a sinistra), i NLCs di tipo imperfetto (in alto a destra), di tipo amorfo (in basso a sinistra), di tipo multiplo (in basso a destra).

### *2.3.3 Nanoparticelle polimeriche*

Le nanoparticelle polimeriche sono particelle solide sferiche che hanno diametro compreso tra 10 e 1000 nm (comprendendo anche le particelle chiamate sub-micrometriche) prodotte a partire da polimeri di varia natura. Grazie alle loro proprietà chimico-fisiche, alle loro dimensioni e alla loro biocompatibilità, le nanoparticelle polimeriche risultano ottime candidate come nanocarriers in ambito biomedico e farmacologico.

Affinché un polimero possa essere usato in campo medico esso deve essere biocompatibile, deve avere elevata purezza, oltre che essere non tossico ed essere rilasciabile dall'organismo senza causare fenomeni di accumulo o, meglio, biodegradabile. I polimeri sintetici che soddisfano questi requisiti e più comunemente usati sono: polimetilmetacrilato (PMMA), poliuretano (PU), acido polilattico (PLA), acido poliglicolico (PGA), acido poli(lattico-co-glicolico) (PLGA) e polietilenglicole (PEG).

Il polimetilmetacrilato è un polimero del metilmetacrilato che presenta buone proprietà meccaniche, è un materiale facilmente lavorabile e risulta trasparente. In medicina è stato il primo polimero usato nelle lenti a contatto, è utilizzato come cemento osseo e sottoforma di nanoparticelle collegate ad un grande numero di sostanze come enzimi, proteine ma anche nanotubi di carbonio. Il PMMA non è biodegradabile e non è utilizzato puro per il rilascio di farmaci, ma miscelato con altri polimeri.

I poliuretani sono una famiglia di polimeri ottenuti dalla polimerizzazione di diisocianato e diolo. Si possono ottenere materiali con proprietà molto diverse tra loro andando a cambiare la struttura dei monomeri. In ambito medicale sono utilizzati per realizzazione di protesi, rivestimenti di organi artificiali o per medicinali da assunzione orale e per il rilascio controllato di farmaci. Per gli scopi medici i poliuretani vengono prodotti utilizzando dioli biocompatibili (PEG) e isocianati derivati dall'acido L-lattico.

L'acido polilattico è ottenuto dalla polimerizzazione dell'acido lattico e possiede due forme enantiometriche, l'acido D-lattico e l'acido L-lattico. È infatti possibile ottenere tre tipologie di polimeri: il PLLA polimero composto solo dall'enantiomero L, PDLA solo di enantiomero D e il PDLLA ottenuto dai due enantiomeri. Quest'ultimo è un polimero atattico e amorfo ma presenta biodegradabilità maggiore e per questo è più utilizzato nella produzione di nanoparticelle. L'acido poliglicolico è risultante dalla polimerizzazione dell'acido glicolico, è semicristallino, presenta buone proprietà meccaniche ed è molto biodegradabile per la presenza di legami esterei. Dalla metà del secolo scorso è stato usato per suture riassorbibili e per la produzione di impianti biodegradabili come chiodi e viti, è molto utilizzato anche nella sintesi di copolimeri per il rilascio controllato di farmaci. Il PLGA è un copolimero ottenuto dalla

polimerizzazione tra omodimeri ciclici dell'acido lattico e dell'acido glicolico. A seconda del rapporto tra i monomeri, si ottengono PLGA con proprietà diverse: aumentando la quantità di acido lattico aumenta il tempo di degradazione e migliorano le proprietà meccaniche (eccezione fatta per il PLGA 50:50 che risulta il meno stabile). Il polietilenglicole è un polietere, polimero del glicole etilenico che si presenta come polimero cristallino quando solido. Esso è biocompatibile ma non biodegradabile ed è ampiamente usato in ambito biomedico: per esempio, nelle nanoparticelle è utilizzato per rallentare il processo di opsonizzazione delle medesime. Le opsine sono una classe di proteine che si legano alla superficie del corpo estraneo permettendo alle cellule fagocitarie di eliminarle. Il PEG blocca l'aggancio delle opsine alla superficie della nanoparticella rendendola "invisibile" al sistema immunitario. Un'altra caratteristica del PEG è la sua capacità di formare micelle, assieme ai suoi copolimeri, che oltrepassano facilmente la barriera cellulare (grazie anche alla somiglianza alla barriera fosfolipidica) [31].

Il vantaggio dei polimeri di sintesi, rispetto a quelli naturali (come il chitosano e l'albumina), è dato dalla loro grande versatilità: in fase progettuale è infatti possibile modulare diversi parametri, come il peso molecolare e la presenza di gruppi funzionali, in modo da assicurare un controllo rigoroso della farmacocinetica dell'agente che trasportano.

Le nanoparticelle polimeriche si dividono in due categorie: le nanocapsule, che sono dei sistemi vescicolari in cui il principio attivo è confinato in una cavità che costituisce il core liquido interno ricoperto da una membrana polimerica, e le nanosfere, che sono particelle solide con struttura piena ed omogenea in cui il principio attivo è uniformemente distribuito. L'inserimento della sostanza attiva o biomolecola può avvenire per incorporazione, durante la produzione o, una volta formate le nanostrutture, per adsorbimento superficiale. La quantità incapsulata dipende dal tipo di matrice polimerica, dal peso molecolare, dal tipo di interazione con la sostanza da veicolare e dalla presenza di gruppi funzionali. Il rilascio della sostanza avviene invece per desorbimento, per diffusione o per erosione della matrice costituente le nanoparticelle. Se si impiegano le nanosfere, si osserva un rapido rilascio iniziale dovuto alla frazione di sostanza veicolata adsorbita o debolmente legata. Successivamente la quantità rilasciata diminuisce esponenzialmente seguendo una cinetica simile al primo ordine. In questa fase, la biodegradazione del polimero (erosione) e la diffusione risultano essere i meccanismi che governano il rilascio della sostanza e a prevalere è quello più veloce<sup>4</sup>. Le nanocapsule rilasciano la sostanza per diffusione, dal core della nanoparticella attraverso lo strato

---

<sup>4</sup> La velocità dipende dalla solubilità, diffusione e biodegradazione della matrice polimerica ma anche dalla dimensione delle nanoparticelle.

polimerico, seguendo una cinetica simile a quella di ordine zero (ovvero la quantità rilasciata diminuisce linearmente nel tempo) [32].

#### *2.3.4 Micelle polimeriche e dendrimeri*

Le micelle polimeriche si ottengono per auto-assemblaggio di copolimeri anfifilici a blocchi in soluzione acquosa e presentano un nucleo idrofobico e uno strato esterno idrofilico. È proprio il nucleo idrofobico che permette di trasportare sostanze non solubili in acqua o agenti di imaging, oppure sostanze che si distribuiscono tra nucleo e strato esterno. Sono caratterizzate in base alla grandezza e alle proprietà superficiali. Le micelle polimeriche offrono numerosi vantaggi in termini di stabilità termodinamica: infatti, nelle soluzioni fisiologiche hanno dimostrato una degradazione lenta [33].

I dendrimeri sono composti macromolecolari che si ramificano a partire da un centro, assumendo le dimensioni desiderate. Si tratta di una particolare classe di polimeri ottenuti per polimerizzazione di monomeri con approccio divergente (dal nucleo alle ramificazioni) o convergente (dalle ramificazioni al nucleo). Sono strutture altamente regolari e presentano quindi un'architettura a strati che può essere suddivisa in tre parti: il nucleo polifunzionale, le unità ramificanti e i gruppi funzionali superficiali che ne determinano le caratteristiche. Le ramificazioni che partono da un unico ramo ancestrale formano una struttura definita dendrone, e ogni ramificazione successiva è definita generazione (GN). Il dendrimero è perciò l'associazione di più dendroni. Il core centrale presenta una porosità maggiore rispetto alla porzione periferica. Le ramificazioni intermedie conferiscono flessibilità e influenzano il volume libero totale, mentre le estremità possono essere funzionalizzate con specifici ligandi. I dendrimeri sono utilizzati come nanocarrier, data la loro stabilità e bassa tossicità, e possono veicolare la sostanza all'interno del nucleo oppure tramite adsorbimento dei gruppi superficiali. I dendrimeri possono essere costituiti da diversi polimeri come ad esempio le poliammidoammine. I dendrimeri possono essere funzionalizzati con dei linkers specifici o stabilizzati con PEG. Sono stati utilizzati come carrier di geni, acidi nucleici e farmaci ma anche come scaffold per la rigenerazione tissutale. L'applicazione dei dendrimeri in ambito medicale necessita però di uno studio approfondito per migliorare la loro biocompatibilità e biodistribuzione [33].

## 2.4 Nanoparticelle a base di carbonio

I nanomateriali a base di carbonio si possono distinguere in base alle dimensioni che li caratterizzano: zero dimensionali, unidimensionali, bi e tridimensionali. Essi sono tutti allotropi del carbonio. I fullereni e i punti quantici (che nel caso del carbonio prendono il nome di carbon dots) sono zero dimensionali, i nanotubi di carbonio sono monodimensionali (la lunghezza prevale sul diametro), il grafene è bidimensionale e infine i nanodiamanti sono tridimensionali. I fullereni, il grafene e i nanodiamanti vedono applicazioni soprattutto in elettronica e in aspetti ambientali, sono poco utilizzati in ambito biomedico. Di seguito segue una trattazione più precisa solo di punti quantici e nanotubi di carbonio.

### 2.4.1 I carbon dots

I punti quantici (quantum dots) sono particelle di materiali conduttori, di solito di metalli pesanti, che grazie alle dimensioni nanometriche sfruttano il comportamento quantico per dar luogo a particolari processi di assorbimento ed emissione della luce. I carbon dots (CDs) fanno parte di una classe di materiali fluorescenti a base di carbonio aventi un diametro inferiore a 10 nm. Essi, anche se sono stati scoperti solo nel 2004, rappresentano una valida alternativa ai quantum dots sia per il processo di preparazione che risulta più economico, sia per le loro proprietà quali la biocompatibilità, idrosolubilità, inerzia chimica e fotoluminescenza [34]. La struttura dei carbon dots varia in base ai precursori utilizzati per sintetizzarli. Si ipotizzano due diverse strutture: un core grafítico con caratteristiche amorfe o cristalline, oppure un core amorfo di carbonio puro ibridato  $sp^3$ . Inoltre, nella struttura dei carbon dots è stata riscontrata la presenza di vari gruppi funzionali quali i gruppi carbossilici, carbonilici e ossidrilici, con eventuale presenza di eteroatomi come zolfo e fosforo. I CDs possono essere classificati in 3 categorie: quantum dots di grafene (struttura simile a quella degli strati di grafene), carbon nanodots (possono avere un reticolo cristallino simile alla grafite o struttura amorfa), dots polimerici (catene polimeriche che si sono aggregate attorno a un core sferico di carbonio). Ogni categoria, anche se presenta struttura differente, esibisce luminescenza simile [35].

I carbon dots possiedono proprietà migliori rispetto ai quantum dots, hanno elevata stabilità chimica, buona conduttività ma soprattutto bassa tossicità e proprietà ottiche paragonabili ai quantum dots. Il fenomeno della fluorescenza che caratterizza i carbon dots dipende dalla loro dimensione e dal fatto che alcuni elettroni tra la banda di valenza vengano investiti da luce di lunghezza d'onda opportuna, che, trasferendo energia, li fa "saltare" a una banda di energia superiore. In questo modo si crea una buca, e la coppia elettrone-buca si va a ricombinare producendo fotoluminescenza. L'emissione di fluorescenza dei carbon dots è forte e regolabile.

All'aumentare del diametro dei CDs l'emissione si assesta più sul rosso, in quanto diminuisce l'energia del picco di assorbimento (Figura 2.6). Anche l'aumento della presenza di ossigeno porta a una emissione sempre più verso il rosso.

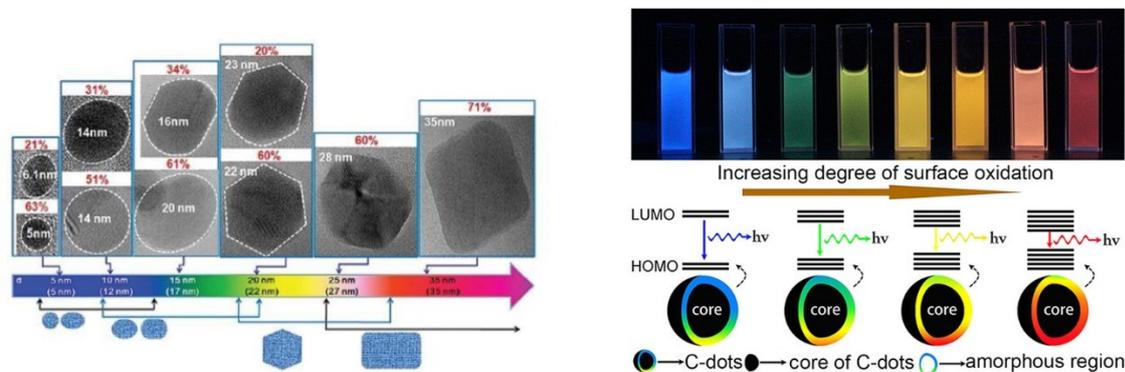


Figura 2.6: Relazione tra dimensione dei carbon dots (a sinistra), presenza di ossigeno (a destra) e spettro di emissione.

Le molteplici proprietà che caratterizzano i CDs fanno sì che essi possano essere adoperati in ambito sia diagnostico che terapeutico (in particolare nella teragnostica), ad esempio come molecole sonda o come veicolo per il rilascio di farmaci, oppure per tecniche di bioimaging e biosensing (come biosensori).

#### 2.4.2 I nanotubi di carbonio

I nanotubi di carbonio sono delle strutture di forma tubulare simili ad un foglio di grafite arrotolato a forma di cilindro. I nanotubi si ottengono per auto-assemblaggio e possono presentare un singolo strato di carbonio o multiple pareti concentriche. I nanotubi a parete singola hanno un diametro di 1-2 nm mentre quelli a parete multiple hanno un diametro di 2-25 nm con distanza tra le pareti di 0.3 nm. I nanotubi di carbonio presentano importanti proprietà termiche, meccaniche e conduttive, dovute al fatto che la curvatura circolare (come nei fullereni) provoca la reibridazione dei legami  $\sigma$  e  $\pi$  per cui il legame  $\pi$  è maggiormente localizzato rispetto alla grafite. I nanotubi risultano essere anche biologicamente e chimicamente attivi. In medicina trovano un'applicazione molto ampia, dalla somministrazione dei farmaci e biosensori all'ingegneria tissutale. I nanotubi di carbonio possono essere coniugati con diverse molecole per aumentarne l'utilizzo in teragnostica. L'entrata dei nanotubi nelle cellule può essere mediata da endocitosi o inserimento attraverso le membrane e la loro solubilità può essere aumentata incorporando gruppi carbossilici. I nanotubi possono quindi

essere sfruttati come veicolo di farmaci e di acidi nucleici e sequenze di RNA senza causare citotossicità alle cellule. Inoltre, per quanto riguarda la rigenerazione di tessuti, le cellule che internalizzano i nanotubi di carbonio riescono ad essere attratte da una sorgente magnetica, permettendo il controllo del movimento della cellula stessa.

### **Capitolo 3. Applicazioni nelle malattie neurodegenerative**

Le nanoparticelle sono utilizzate in svariati ambiti in campo biomedico. Le applicazioni più frequenti sono in ambito diagnostico e terapeutico, ma sono anche impiegate nella nanostrutturazione di superfici per applicazioni ortopediche, odontoiatriche e antimicrobiche. L'ambito in cui sono maggiormente sfruttate è la cura dei tumori: esse, infatti, sopperiscono agli svantaggi dei trattamenti tradizionali, quali la chemioterapia, riuscendo così ad aggirare i loro effetti collaterali.

Le nanoparticelle possono essere sfruttate anche per le malattie neurodegenerative. Le terapie fino ad ora usate sono state inefficaci soprattutto perché vi è un ostacolo difficile da oltrepassare quando si ha a che fare con queste malattie del sistema nervoso: la barriera emato-encefalica (Blood Brain Barrier, BBB). I nanomateriali negli ultimi anni hanno suscitato molto interesse nella loro applicazione per il trattamento di malattie neurologiche: infatti, la possibilità di usare nanomateriali quali le nanoparticelle come veicoli di molecole farmacologicamente attive che favoriscano il superamento della barriera emato-encefalica o per somministrazioni intracerebrali, e materiali nanostrutturati come matrici e interfacce che promuovano il processo neurorigenerativo, può fornire terapie alternative rispetto a quelle convenzionali.

#### **3.1 Il sistema nervoso centrale e la barriera emato-encefalica**

Il sistema nervoso centrale (SNC) coordina le attività degli altri apparati e sistemi, interviene nella regolazione del trofismo e delle funzioni dei singoli organi, indirizza risposte immediate agli stimoli ed elabora le informazioni. Il sistema nervoso centrale è costituito da encefalo e midollo spinale. L'encefalo è rivestito, oltre che dal cranio, da tre strati di tessuto connettivo membranoso chiamate meningi e dal fluido presente tra le meningi chiamato liquido cerebrospinale. È formato da una parte più esterna contenente i corpi dei neuroni (sostanza grigia o corteccia cerebrale) e da una parte più interna dove si trovano le fibre nervose che trasmettono e ricevono le informazioni al e dal resto dell'organismo. All'esterno della corteccia tutte queste fibre sono circondate da mielina, il cui aspetto biancastro ha portato ad assegnare alla parte più interna del cervello il nome di sostanza bianca. Il cervello si compone di diverse strutture, tra cui la corteccia cerebrale, il cervelletto, il sistema limbico e il tronco encefalico. Il midollo spinale è una lunga struttura cilindrica che scorre all'interno della colonna vertebrale ed è considerata un vero e proprio prolungamento dell'encefalo, ma presenta una struttura speculare rispetto ad esso. L'unità base del cervello è il neurone, che è allo stesso tempo l'unità funzionale del sistema nervoso. Il neurone è costituito da un corpo cellulare dal quale

fuoriescono lunghi processi. Questi processi sono classificati come dendriti se trasmettono il segnale dalla loro estremità verso il corpo cellulare, o come assoni se trasportano informazioni dal corpo cellulare verso il loro terminale. Queste strutture permettono ai neuroni di comunicare con altre cellule e tra di loro. I lunghi assoni dei neuroni periferici afferenti (o sensoriali) ed efferenti (o motori somatici e autonomi), insieme al tessuto connettivo, formano i nervi, che si estendono dal sistema nervoso centrale ad organi o a tessuti. Essi trasmettono i segnali e servono come connessioni intermedie tra cervello e cellule, organi o tessuti bersaglio.

Al sistema nervoso spetta il ruolo fondamentale di controllo dei sistemi sensoriali, motori e delle funzioni superiori. I recettori generano delle sensazioni originate da stimoli esterni che poi vengono organizzate in percezioni riconoscibili mediante complessi processi d'integrazione che si svolgono a livello del talamo e della corteccia sensitiva dell'encefalo. L'esecuzione armonica di un movimento o il mantenimento di una postura sono controllate da parte di strutture superiori del SNC (cervelletto, corteccia motoria etc.) sui centri inferiori (motoneuroni del midollo spinale). Le funzioni superiori (comportamento, apprendimento, memoria) sono principalmente svolte dalla corteccia associativa degli emisferi cerebrali, mentre le funzioni autonome come appetito e sete vengono controllate dall'ipotalamo.

La barriera emato-encefalica è un'unità morfo-funzionale in grado di isolare il liquido cerebro-spinale ed il tessuto nervoso dal compartimento ematico regolando attivamente ed in modo selettivo gli scambi delle sostanze tra sangue e parenchima cerebrale e fra sangue e liquido cerebro-spinale. La BBB ha anche il compito di mantenere l'omeostasi chimico-fisica del liquido cerebro-spinale così che i neuroni possano realizzare al meglio le funzioni. La BBB svolge inoltre il ruolo importante di funzione neuroprotettiva (dalle sostanze esogene o sostanze tossiche derivanti dal metabolismo), e mantiene separate le azioni centrali e periferiche dei neurotrasmettitori. La struttura della barriera emato-encefalica, infatti, è costituita da elementi che permettono di conservare il microambiente particolare del cervello. È anatomicamente costituita dall'endotelio dei capillari cerebrali e dai processi perivascolari degli astrociti (Figura 3.1). I capillari cerebrali differiscono da quelli periferici e sistemici perché sono composti da cellule dell'endotelio capillare provviste di giunzioni serrate (che impediscono la libera diffusione dei soluti) e dai periciti (cellule contrattili separate dalla membrana basale del capillare mediante una matrice extracellulare di collagene). I processi astrocitari perivascolari sono delle espansioni degli astrociti<sup>5</sup> che si dispongono come le altre cellule gliali negli spazi compresi tra i neuroni e i loro prolungamenti.

---

<sup>5</sup> Gli astrociti sono una classe di cellule gliali che svolgono funzione di supporto ai neuroni.

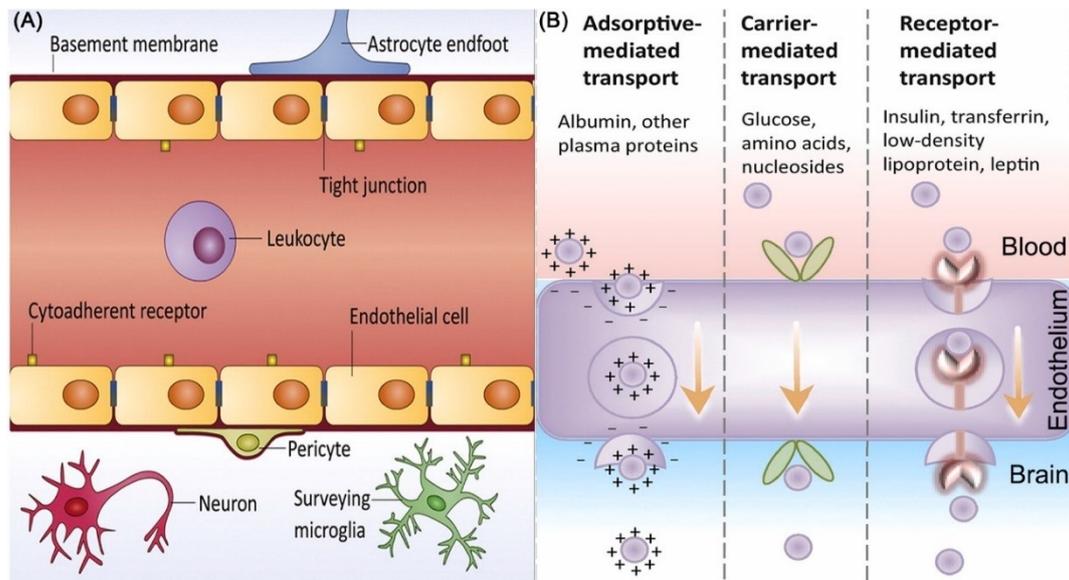


Figura 3.1: La struttura della BBB (A) e le tre principali tecniche di attraversamento della BBB (B).

### 3.2 I disturbi neurologici neurodegenerativi

Le malattie neurodegenerative racchiudono un ampio spettro di patologie progressive del sistema nervoso, contraddistinte da una graduale perdita della struttura e delle funzioni neuronali. A seconda delle specifiche aree del cervello e del midollo spinale in cui si verifica la perdita dei neuroni, si hanno determinate caratteristiche cliniche, tipiche dei vari disturbi neurodegenerativi. Le patologie neurodegenerative comprendono malattie come il morbo di Alzheimer (AD), il morbo di Parkinson (PD), la sclerosi laterale amiotrofica (SLA) e la malattia di Huntington (HD). Le caratteristiche patologiche comuni a questi disturbi sono: morte neuronale, gliosi, atrofia e formazione di aggregati proteici. Questi disturbi si differenziano per neuropatologia, sulla base di quali popolazioni neuronali vengono colpite, di quali proteine formano gli aggregati e della localizzazione di quest'ultimi a livello cellulare.

#### 3.2.1 Il morbo di Alzheimer

Il morbo di Alzheimer è una malattia neurodegenerativa correlata all'età, a tarda insorgenza e lenta progressione, clinicamente caratterizzata da deficit cognitivi e alterazioni comportamentali. La malattia di Alzheimer è la malattia neurodegenerativa più frequente e la prima causa di demenza. In generale l'AD è una patologia multifattoriale alla cui eziopatogenesi<sup>6</sup> concorrono fattori genetici e ambientali; tra i fattori di rischio non modificabili sono compresi l'età avanzata, il sesso femminile e le caratteristiche genetiche, individuali o

<sup>6</sup> Studio delle cause di una malattia e del loro meccanismo di azione

familiari. Le caratteristiche patologiche si esprimono a livello macroscopico con un quadro di atrofia cerebrale, più marcata per le regioni temporali mesiali, dovuta a una perdita neuronale e sinaptica. A livello microscopico, i segni caratteristici del morbo di Alzheimer consistono in una progressiva deposizione di placche neuritiche (placche senili) nell'ambiente extracellulare e di grovigli neurofibrillari in quello intracellulare. I grovigli neurofibrillari sono ammassi di filamenti elicoidali appaiati di proteina tau iperfosforilata che si depositano nel citoplasma dei neuroni. La proteina tau è normalmente espressa negli assoni poiché ha la funzione di stabilizzare i microtubuli del citoscheletro neuronale. La forma fosforilata, oltre a non essere in grado di svolgere questa funzione, tende ad assemblarsi in grovigli acquisendo una funzione tossica nel citoplasma neuronale [36]. Le placche neuritiche sono costituite da un core centrale di deposito extracellulare di amiloide circondato da detriti neuronali (principalmente frammenti assionali). L'ipotesi più convincente dell'eziopatogenesi del morbo di Alzheimer sostiene che gli eventi che portano alla degenerazione e alla morte neuronale sono scatenati dalla formazione e dal deposito di fibrille insolubili e tossiche di  $\beta$ -amiloide ( $A\beta$ ). La presenza di questi aggregati porterebbe a una cascata di eventi secondari, che coinvolgono la gliosi, i processi infiammatori, la formazione di grovigli neurofibrillari, lo stress ossidativo e la disfunzione sinaptica e neuronale.

### 3.2.2 *La malattia di Parkinson*

La malattia di Parkinson è la seconda patologia neurodegenerativa più comune, dopo quella di Alzheimer. La malattia di Parkinson comprende sintomi di tipo motori accanto a disturbi non motori e psichici. I sintomi motori comprendono tremore a riposo, bradicinesia, rigidità e squilibrio dell'andatura. I sintomi non motori includono deficit cognitivo, disturbi neuropsichiatrici, disfunzione anatomica (come disturbi urologici) e disturbi del sonno. Il deficit cognitivo, contrariamente all'AD, non prevede compromissione della memoria ma è caratterizzato da deficit dell'attenzione e delle funzioni esecutive. Il PD si può presentare sia in forma ereditaria che sporadica ed entrambe sono caratterizzate dalla presenza di corpi di Lewy<sup>7</sup> (LBs) e neuriti distrofiche (DNs) che portano a una diffusa neurodegenerazione [37]. La presenza di  $\alpha$ -sinucleina all'interno dei corpi rappresenta una localizzazione citologica anomala dato che normalmente è una componente delle terminazioni nervose presinaptiche coinvolta nel rilascio di neurotrasmettitori come la dopamina e acetilcolina. A livello anatomo-patologico, la presenza dei corpi di Lewy e dei neuriti distrofiche comporta una progressiva perdita della

---

<sup>7</sup> Inclusioni citoplasmatiche neuronali sferiche composte di aggregati di  $\alpha$ -sinucleina, una proteina sinaptica.

funzionalità del sistema dopaminergico nigro-striale e di altri collegamenti neuronali, a causa della degenerazione dei neuroni dopaminergici della *substantia nigra pars compacta* (SNc) a livello mesencefalico [38]. La degenerazione della via nigro-striatale ha come conseguenza la perdita dell'attività di controllo esercitata dai nuclei della base sull'attività motoria, con la comparsa della classica sintomatologia. La dopamina esercita un ruolo importante anche in alcune funzioni cognitive. La perdita di questo neuromodulatore contribuisce, quindi, alla comparsa dei deficit cognitivi, rilevabili soprattutto in fasi avanzate della malattia. La causa della morte selettiva dei neuroni dopaminergici nigrali e dell'accumulo di alfa-sinucleina nell'encefalo dei pazienti parkinsoniani non è ancora nota.

### 3.2.3 La malattia di Huntington

La malattia di Huntington, o corea di Huntington, è una rara patologia neurodegenerativa ereditaria, causata dall'anormale espansione della ripetizione della tripletta nucleotidica CAG nel gene HTT che codifica per l'huntingtina (Htt). La funzione dell'Htt non è ancora del tutto nota: si ritiene, tuttavia, che essa sia importante per un corretto sviluppo neuronale, per il mantenimento delle funzioni neurali e per l'innescare di meccanismi di neuroprotezione [39]. L'espansione della ripetizione comporta la formazione di aggregati di una forma anomala (mal-ripiegata) di huntingtina (mHtt), a livello del nucleo e del citosol, con una conseguente perdita delle sue funzioni e interazioni con le altre proteine. La forma mal-ripiegata di proteina si accumula a livello cerebrale e risulta essere tossica per alcuni comparti neuronali. La sua presenza provoca, per un meccanismo non ancora noto, una perdita neuronale e atrofia soprattutto a livello dell'area striatale<sup>8</sup> in modo da compromettere il circuito talamo-corticale dei gangli della base. I pazienti affetti da HD presentano anche alterazioni della sostanza nera, dell'ippocampo, del giro angolare del lobo parietale, delle cellule di Purkinje cerebellari, dell'ipotalamo e del talamo [40]. La malattia di Huntington presenta clinicamente una triade sintomatologica caratteristica che comprende disfunzione motoria, deficit cognitivo e disturbi psichiatrici.

---

<sup>8</sup> Componente sottocorticale del telencefalo.

#### 3.2.4 *La sclerosi laterale amiotrofica (SLA)*

La SLA è una malattia progressiva dell'adulto che colpisce i motoneuroni. I pazienti manifestano alterazioni motorie, difficoltà di movimento, difficoltà a reggere gli oggetti a causa dell'indebolimento dei muscoli delle mani. Con il progredire della malattia si giunge alla paralisi completa degli arti con una difficoltà sempre maggiore a parlare, masticare e deglutire. Esistono due forme principali di SLA, quella definita sporadica e quella ereditaria. La maggior parte dei casi di SLA non ha una componente genetica e viene definita sporadica. Le cause di questa forma non sono state ancora completamente chiarite e il decorso clinico è altamente variabile, suggerendo che diversi fattori possono essere coinvolti nel determinare la malattia. La SLA è caratterizzata dalla morte dei secondi motoneuroni posti a livello delle corna anteriori del midollo spinale e dei nuclei motori degli ultimi nervi cranici. Inoltre, vi è degenerazione dei primi motoneuroni presenti nella corteccia motoria. La perdita di questi ultimi motoneuroni porta alla gliosi delle vie corticospinali laterali. I muscoli interessati mostrano quindi atrofia, causata dalla denervazione delle fibre muscolari. Le caratteristiche anatomo-patologiche comprendono la perdita dei neuroni motori associata a inclusioni intraneuronali immunoreattive all'ubiquitina nei neuroni motori superiori e a inclusioni immunoreattive a TDP-43 nei neuroni motori inferiori in fase di degenerazione. Recentemente, plurime evidenze sperimentali suggeriscono che la proteina TDP-43 possa avere un ruolo diretto nei processi degenerativi della SLA non solo nella forma familiare ma, più significativamente, in quella sporadica. Da un punto di vista funzionale, la proteina è coinvolta nella regolazione della trascrizione e nello splicing (è infatti in grado di legarsi con DNA e RNA), e come elemento strutturale per corpi nucleari attraverso l'interazione con la proteina SMN [41]. Il 20% dei casi di SLA familiare è causato dalla mutazione del gene che codifica per l'enzima Superossido dismutasi-1 (SOD-1), una proteina deputata a detossificare le cellule dall'accumulo di radicali liberi. È stato osservato che la tossicità della SOD-1 mutata è data dall'acquisizione delle proprietà tossiche della proteina, piuttosto che da una perdita di funzione dell'enzima stesso. Le inclusioni neuronali TDP-43 positive non sono state riportate in soggetti affetti da SLA con mutazioni a carico del gene SOD1, facendo ipotizzare l'esistenza di differenti meccanismi patologici nei pazienti sporadici e in quelli associati a mutazioni SOD1.

### 3.3 Nanoparticelle per il rilascio di farmaci per le malattie neurodegenerative

Lo sviluppo di nuove strategie più efficaci per curare le malattie neurodegenerative è una delle nicchie più impegnative e costose. La difficoltà a superare la fase di sperimentazione richiede molto tempo e un costo molto elevato prima che qualche nuovo composto possa essere autorizzato per il commercio. Quando si ha a che fare con farmaci neurologici tutto diventa più complicato, vista la necessità che questi farmaci riescano a superare la BBB in vivo. Grazie all'uso delle nanoparticelle, però, si è riusciti ad aumentare la capacità di superare la BBB, portando a nuove possibilità nell'ambito del rilascio dei farmaci diretti al cervello.

Il passaggio attraverso la BBB avviene in base alle caratteristiche chimico-fisiche delle nanoparticelle: di seguito sono esposti alcuni esempi.

La prima tipologia di attraversamento della barriera prevede l'apertura delle giunzioni serrate, da parte delle nanoparticelle, tra le cellule endoteliali, o l'induzione di una reazione tossica locale in modo tale che la barriera sia resa permeabile localmente permettendo alla nanoparticella coniugata al farmaco di penetrare. Le nanoparticelle possono anche passare attraverso le cellule endoteliali tramite transitosi o endocitosi (rilasciando la sostanza all'interno del citoplasma per poi andare incontro a esocitosi). Può anche accadere una combinazione dei meccanismi appena descritti. La nanoparticella può essere veicolata verso il target desiderato grazie alla funzionalizzazione con peptidi, proteine e anticorpi.

Le NPs sono oggetto di molti studi per il rilascio di farmaci data la possibilità di modularle in termini di forma grandezza, idrofilicità, carica superficiale e rivestimento. Avere il controllo di queste caratteristiche permette di migliorare la stabilità dell'agente terapeutico nella circolazione, di controllare il rilascio del farmaco dentro al sito desiderato, di migliorare la capacità di penetrazione della BBB ed evitare il sistema reticolo-endoteliale. Diversi parametri sono coinvolti nell'efficienza del passaggio delle NPs attraverso la BBB. La dimensione delle NPs influisce secondo una relazione di proporzionalità inversa nella penetrazione (la maggior parte degli studi hanno utilizzato particelle di dimensioni comprese tra 50 nm e 100 nm) [42]. La forma delle nanoparticelle influenza la distribuzione nel corpo e la capacità di penetrare le cellule: la maggior parte degli studi ha preferito usare la forma sferica per la semplicità di preparazione. Il potenziale zeta<sup>9</sup> ha un ruolo rilevante nella capacità di oltrepassare la BBB: un potenziale zeta alto (carica positiva alta) causa tossicità immediata alla barriera emato-encefalica: quindi, in genere si usano nanoparticelle che hanno zeta potenziale negativo (da -1 mV a -15 mV). I ligandi sono capaci di facilitare il passaggio della BBB, e possono essere

---

<sup>9</sup> Potenziale generato in seguito alla formazione di un doppio strato elettrico.

suddivisi in quattro macrogruppi: ligandi che mediano l'adsorbimento delle proteine dal flusso sanguigno che interagiscono direttamente con i recettori della barriera; i ligandi che hanno interazione diretta con i recettori della BBB; i ligandi che aumentano la carica e la idrofobicità; i ligandi che aumentano il tempo della circolazione sanguigna (come il PEG). I ligandi possono anche essere scelti accuratamente per evitare la rimozione delle nanoparticelle o l'adsorbimento di proteine 'disturbatrici' che si legano spontaneamente. Innestando il PEG nelle nanoparticelle diminuisce il processo di degradazione; inoltre, data la sua capacità di aumentare il tempo della circolazione sanguigna, le nanoparticelle PEG-funzionalizzate si accumulano più facilmente nel cervello [43].

È utile anche notare che anche il modo di somministrare le nanoparticelle influisce sull'efficacia del loro arrivo nel cervello. Esistono varie tipologie di somministrazione dei farmaci, come ad esempio l'iniezione intravenosa, ma in questo caso molte delle nanoparticelle vengono catturate dal fegato, principale organo del RES; si può anche utilizzare la somministrazione orale, ma la tecnica che sta riscuotendo maggiore interesse è quella della somministrazione per via nasale, soprattutto per malattie del cervello. Essa, infatti, permette di avere sia accesso diretto al cervello, sia tramite il sistema olfattivo, sia grazie al circolo sanguigno.

### *3.3.1 Il rilascio di farmaci per il morbo di Alzheimer*

La ricerca per i farmaci candidati alla cura della malattia di Alzheimer ha dimostrato che i peptidi neuroprotettivi, ossia peptidi che proteggono i neuroni dalla degenerazione o da traumi, sono i candidati migliori per la terapia. Infatti, essi possono agire su diversi fronti, come rimuovere le placche di  $\beta$ -amiloide ( $A\beta$ ), degradando i peptidi tossici di  $A\beta$  e modulando l'azione dell'enzima che li degrada, la secretasi.

Alcuni esperimenti sono stati condotti in vivo, per vedere se le nanoparticelle, funzionalizzate con i farmaci, riuscissero a superare la BBB: le nanoparticelle polimeriche PEG-PLA con un diametro di 120 nm modificate con il peptide B6 (sostituto della transferrina) caricate con il peptide neuroprotettivo NAPVSIPQ (NAP), si sono accumulate nel cervello dei topi, in modo maggiore che senza il peptide B6; inoltre, l'accumulo periferico (indesiderato) nel fegato e nei polmoni è molto maggiore nelle nanoparticelle senza B6. La somministrazione di queste nanoparticelle sui topi con AD 'indotta', ha riscontrato un miglioramento delle capacità cognitive e delle funzioni colinergiche (grazie al fatto che è stata favorita l'attività dell'enzima che sintetizza l'acetilcolina) [44].

Un'altra tipologia di nanoparticelle in grado di oltrepassare la BBB sono le nanoparticelle cosiddette *soft* come i liposomi. I liposomi possono incapsulare i medicinali idrofobici

all'interno del loro core in modo più efficiente di quanto riescano a trattenere, invece, le molecole idrofiliche. Per oltrepassare la BBB, però, i liposomi devono essere sottoposti a modificazioni superficiali. A questo scopo i liposomi possono essere funzionalizzati con peptidi, proteine o anticorpi che si trovano anche sulla superficie della BBB cosicché essi possano sfruttare la transitosi mediata da recettori. Alcuni esempi di queste proteine sono la transferrina e la lactoferrina. Mourtas e colleghi [45] hanno sviluppato dei liposomi che incapsulassero la curcumina, che mostra affinità nel degradare le placche di A $\beta$ , funzionalizzati con gli anticorpi per i recettori della transferrina. Le nanoparticelle presentavano potenziale zeta negativo e avevano diametro minore di 160 nm. Studi ex vivo post-mortem su cervelli di pazienti che presentavano AD hanno mostrato come questa combinazione tra anticorpo e curcumina potesse migliorare il passaggio della BBB e quindi rilasciare la curcumina a contatto con le placche. Anche i liposomi cationici possono attraversare la BBB, visto che quest'ultima presenta carica negativa, ma ci sono aspetti indesiderati di questa tecnica come il legarsi a proteine del siero ed essere assorbiti da tessuti circostanti causando effetti tossici. Un'altra strategia è quella di legare i liposomi a nutrienti come il glucosio e glutatione, facendo superare la barriera tramite trasportatori specifici. Esistono anche i liposomi bifunzionali che permettono di rendere più sicuro il passaggio attraverso la barriera anche quando vi è saturazione dei trasportatori o recettori [46].

Le nanoparticelle solide lipidiche sono sfruttate per trasportare principi attivi idrofobici all'interno del loro core: hanno una dimensione compresa tra 40 e 200 nm, che permette loro di oltrepassare la BBB e non essere intercettate dal RES. Una caratteristica di queste nanoparticelle è la loro capacità di essere stabili fino a 3 anni e rilasciare il farmaco in modo controllato per una durata di molte settimane [47].

I nanotubi di carbonio (CNT) sono sempre più utilizzati come mezzi di rilascio per il trattamento dei disturbi del sistema nervoso centrale, date le loro proprietà fisico-chimiche dovute, in particolare, alla buona dispersività in solventi fisiologici, alla superficie estesa, alla capacità di essere facilmente funzionalizzabili con farmaci e alla biocompatibilità con tessuti nervosi. Il farmaco in questo caso viene fissato o sulla superficie o all'interno del nanotubo di carbonio funzionalizzato; il coniugato ottenuto viene poi introdotto all'interno del corpo (animale) attraverso classiche somministrazioni (orale od iniezione) o direttamente al sito bersaglio attraverso l'uso di un coniugato magnetico (per esempio guidato da un magnete esterno all'organo bersaglio). La cellula ingerisce la capsula farmaco-CNT ed infine il nanotubo versa il contenuto nella cellula rilasciando farmaco. La capacità del CNT di attraversare le membrane cellulari per la somministrazione di farmaci è dovuta alla semplice interazione

idrofobica, all'interazione di impilamento (stacking), all'adsorbimento elettrostatico, ad interazioni covalenti, ma anche all'adsorbimento nella cavità del cilindro, che favorisce l'aumento della superficie per l'adsorbimento [48].

È utile dare un altro accenno dell'utilizzo dei nanotubi di carbonio per le malattie neurodegenerative: la loro applicazione nella neuroregenerazione. Grazie alle loro proprietà elettriche e meccaniche, insieme alla loro biocompatibilità neuronale, i CNT sono considerati possibili candidati per la riparazione di tessuti neuronali. Molti studi, sfruttando diversi modelli in vitro di tessuti neuronali, hanno esaminato il potenziale utilizzo dei CNT come substrati per la crescita neuronale, servendosi della loro capacità di interagire fisicamente ed elettricamente con reti di neuroni promuovendo o facilitando la ricostituzione delle connessioni sinaptiche fra i neuroni, e migliorare le funzioni neuronali come ad esempio la conduttività elettrica. Inoltre, l'utilizzo dei nanotubi di carbonio per rilasciare cellule staminali entro siti del sistema nervoso centrale danneggiati, e promuovere la loro differenziazione in neuroni, costituisce un'essenziale requisito per il successo della rigenerazione di tessuti neuronali danneggiati.

### *3.3.2 Il rilascio di farmaci per il morbo di Parkinson*

La BBB, nelle persone che presentano il morbo di Parkinson, risulta danneggiata: questo difetto può essere sfruttato per aumentare la capacità di far arrivare le nanoparticelle. Inoltre, la barriera emato-encefalica può diventare un target essa stessa per andare a ridurre la progressione della malattia.

I trattamenti per il morbo di Parkinson sfruttano principalmente l'integrazione di dopamina (dato che è progressivamente meno prodotta nel paziente malato), che migliora i sintomi motori. Come per la malattia di Alzheimer il problema principale rimane oltrepassare la barriera, e a questo proposito viene sfruttata la modificazione superficiale delle nanoparticelle come spiegato per l'Alzheimer. Oltre alle molecole sfruttate per quest'ultima funzione, le nanoparticelle (vengono preferite anche in questo caso quelle polimeriche o lipidiche) sono coniugate a un ligando specifico per l'interazione con i neuroni dopaminergici (Figura 3.2).

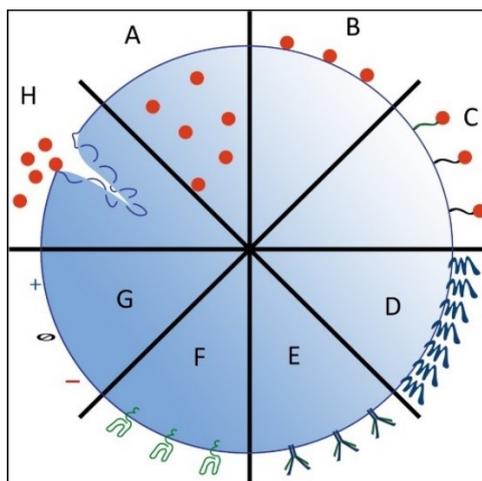


Figura 3.2: Metodi per la funzionalizzazione delle NPs. (A) Carico del farmaco, (B) adsorbimento del farmaco, (C) coniugazione del farmaco, (D) rivestimento di PEG, (E) targeting mediato da anticorpi, (F) targeting mediato da peptidi, (G) carica superficiale, (H) rilascio del farmaco [49].

Le nanoparticelle che sono legate alla lattoferrina sono state oggetto di studi e si è dimostrato che queste riescono ad accumularsi nel cervello maggiormente rispetto a quelle legate a transferrina; inoltre, si è notato come la lattoferrina avesse anche un ruolo nella riparazione della BBB.

Nikolina Kalčec con il proprio gruppo di ricerca [50] ha dimostrato la possibilità di utilizzare nanoparticelle d'oro funzionalizzate con monomeri di peptidoglicani (o anche con PEG) come nanocarrier per L-DOPA e dopamina, dato che esse si legano in modo spontaneo e stabilmente a queste sostanze, in presenza di albumina da siero bovino. Le tipologie di legame coinvolti sono le forze di van der Waals, ponti a idrogeno e interazioni elettrostatiche. Questo metodo di produzione dei nanocarrier per i farmaci è efficace e poco costoso, presenta ottime prospettive di applicazione anche se il fatto di riuscire a superare la BBB deve ancora essere confermato da test in vitro e in vivo.

Le nanoparticelle d'oro e d'argento sono un'altra tipologia di nanoparticelle attualmente studiate per il drug delivery date le loro caratteristiche di morfologia e la facilità di funzionalizzazione, la buona biocompatibilità e la bassa tossicità. Inoltre, possono essere ingegnerizzate per resistere agli stimoli fisiologici come il pH, gli enzimi e le reazioni di ossidazione, riuscendo inoltre a oltrepassare la BBB in quantità rilevanti. È stato condotto uno studio che sfrutta le nanoparticelle d'oro funzionalizzate con fattore di crescita nervoso (NGF), e si è visto che in vivo (ratti) le cellule sono riuscite a inglobarle, tramite endocitosi, e quindi diminuire l'apoptosi delle cellule nervose [51].

### *3.3.3 Il rilascio di farmaci per la malattia di Huntington e SLA*

Dato che non si sa ancora con certezza la causa della malattia di Huntington, si è ipotizzata una connessione, non ancora confermata, tra la produzione disfunzionalizzata del colesterolo nel cervello e i deficit cognitivi e sinaptici nella malattia. In uno studio condotto in vivo su topi [52], si sono utilizzate le nanoparticelle polimeriche in PLGA caricate con colesterolo e ulteriormente modificate con il peptide g7 per oltrepassare la BBB. Lo studio ha dimostrato che queste nanoparticelle hanno raggiunto diverse regioni del cervello dei topi e hanno rilasciato gradualmente il colesterolo mentre si degradavano. Come risultato si è visto che ripetendo questa procedura, i topi hanno riscontrato dei miglioramenti nella comunicazione sinaptica dei neuroni spinali striati, hanno diminuito la recessione cognitiva e parzialmente migliorato l'attività globale e ripreso il livello di proteine che compongono le sinapsi.

La SLA invece è una delle malattie neurodegenerative per cui si sa ancora molto poco: le principali terapie si basano sull'utilizzo delle cellule staminali. Per quanto riguarda l'utilizzo delle nanoparticelle, sta aumentando il numero di studi riguardanti il loro utilizzo come carrier di geni. In uno studio [53], si è dimostrato il loro potenziale come vettori non virali della terapia genica per la SLA. In questo studio sono state utilizzate nanoparticelle lipidiche PEGligate modificate con calcio e fosfato come carrier di AOS<sup>10</sup>, filamenti corti singoli di nucleotidi (10-25 basi) che possono legare con l'mRNA target per cambiare la sua maturazione o traduzione. In particolare, esse sono in grado di diminuire il livello di mutazioni della proteina SOD1 nei motoneuroni. Si è visto che queste nanoparticelle sono in grado di oltrepassare la BBB e di essere efficaci nel trasporto di geni.

### **3.4 Teranostica delle malattie neurodegenerative tramite nanoparticelle**

La teranostica è un concetto innovativo basato sull'integrazione di diagnosi e terapia attraverso l'uso delle nanotecnologie. La combinazione di diagnostica e terapia permette di fornire un trattamento ottimale per il singolo paziente già dalle prime fasi della malattia. L'obiettivo di questa tecnica è di sviluppare un approccio non invasivo ma immediato per la localizzazione di una determinata patologia, e le nanoparticelle sono potenziali strumenti adatti sia alla diagnostica che all'approccio terapeutico. Tra le più importanti applicazioni delle nanoparticelle nella teranostica ci sono l'imaging mirato (target imaging) e il rilascio terapeutico (therapeutic delivery), che include il targeting passivo e attivo.

---

<sup>10</sup> Oligonucleotidi antisenso.

Nel paragrafo precedente è stato presentato il rilascio di farmaci (drug delivery), che verrà poi ripreso successivamente, mentre è utile spiegare cosa si intende per target imaging. Al giorno d'oggi, un gran numero di sistemi di nanoparticelle è in fase di studio per valutare il loro potenziale nella diagnostica molecolare. Le tecniche di imaging hanno aiutato a interpretare i processi biologici, grazie al fatto che rendono possibile la loro visualizzazione, facilitando il collegamento tra struttura e funzione. Ad esempio, queste tecniche hanno permesso ai ricercatori di capire dove si manifestano le malattie, riconoscere e diagnosticare malattie in modo tempestivo, identificare le reti neurali che hanno a che fare con i processi cognitivi e determinare come agiscono le terapie. Le tecniche di diagnostica sono numerose e comprendono, ad esempio, la risonanza magnetica, la tomografia a fluorescenza o fotoacustica, tomografia computerizzata a raggi X (CT) o ad emissione di fotone singolo (SPECT), tomografia a emissione di positroni (PET), che forniscono informazioni a livelli di risoluzione diversa (anatomica, cellulare, molecolare). L'imaging molecolare, in breve, è composto da due parti fondamentali: gli agenti della diagnostica e l'hardware relativo, e diventa target imaging quando si fa in modo che gli agenti (ossia le nanoparticelle) vadano ad accumularsi in un determinato tessuto o organo. Gli agenti di imaging devono essere biocompatibili visto che interagiscono con l'organismo. Le nanoparticelle paramagnetiche e super-paramagnetiche (ossidi di metallo) sono utilizzate principalmente per la risonanza magnetica, ma possono essere usati anche altri agenti di contrasto (come i metalli). Le nanoparticelle d'oro e i nanotubi di carbonio sono utilizzati per l'imaging molecolare fotoacustico; i quantum e carbon dots sono utilizzati per la fotoluminescenza e la fluorescenza ottica; infine, le nanoparticelle che possono essere radioattive sono utilizzate per la PET [54]. È utile sottolineare che le tecniche di imaging presentano sia vantaggi che svantaggi. Ad esempio, l'MRI e la CT hanno un'elevata risoluzione spaziale e forniscono informazioni anatomiche dettagliate ma mancano di sensibilità e difficilmente aiutano a capire la funzionalità di ciò che è presente nell'immagine restituita. Al contrario, PET e SPECT sono molto sensibili ma hanno risoluzione limitata, non permettendo di avere precisione nell'immagine. Per superare questi limiti si sono sviluppati dispositivi che uniscono più tecniche tra quelle precedentemente elencate: PET-CT, MRI-optical e MRI-PET. Le nanoparticelle sono particolarmente utilizzate in quest'ultime, soprattutto come agenti di contrasto.

Le nanoparticelle usate in teranostica, per la maggior parte, sono caratterizzate da quattro componenti basilici: un emettitore di segnale, un carico utile terapeutico, un trasportatore di carico utile, un ligando.

L'emettitore possiede delle proprietà ottiche, magnetiche o radioattive che lo caratterizzano e può emettere il segnale in maniera spontanea o in seguito ad un'eccitazione da parte di una sorgente esterna. Il segnale, individuato da rilevatori esterni, è utilizzato per ricostruire l'immagine. Il carico utile è il medicinale o il principio attivo o anche l'acido nucleico. Il trasportatore solitamente include una matrice polimerica di materiali con molteplici gruppi funzionali, ai quali possono essere coniugati degli emettitori di segnale oppure il carico terapeutico. Il ligando di targeting è scelto in modo che legghi e formi un complesso con il marker della specifica patologia, facilitando così il trasporto di nanoparticelle nel sito di interesse e consentendo interazioni con la cellula o con il tessuto malato.

### 3.4.1 L'applicazione delle nanoparticelle di ossido di ferro nelle malattie neurodegenerative

La deposizione di A $\beta$  è una delle caratteristiche istopatologiche primarie dell'Alzheimer. Siccome le placche di A $\beta$  sono relativamente grandi e sono posizionate tra le cellule, la A $\beta$  può essere considerato il biomarker ideale (ligando). Le nanoparticelle magnetiche, SPIONs, sono le migliori candidate come fattore di contrasto negativo per la risonanza magnetica, nell'identificare le placche di amiloide. A questo proposito, le nanoparticelle devono essere funzionalizzate con anticorpi contro A $\beta$  o legate a peptidi di A $\beta$ . È stata poi suggerita l'ipotesi che le nanoparticelle magnetiche possano modulare il processo di fibrillazione inibendo la formazione di nuclei o rallentando la trasformazione delle proteine ADDL in fibrille [55]. Kouyoumdjian e il suo gruppo di ricerca [56] hanno studiato una via biomimetica utilizzando gliconanoparticelle-SPIO per diagnosticare A $\beta$  (Figura 3.3). La natura superparamagnetica di queste nanoparticelle ha consentito di diagnosticare la presenza di amiloide utilizzando MRI sia in vitro che nei cervelli dei ratti. Le gliconanoparticelle non hanno solo diminuito il danneggiamento delle cellule ma possono anche evidenziare le placche nella fase di diagnostica.

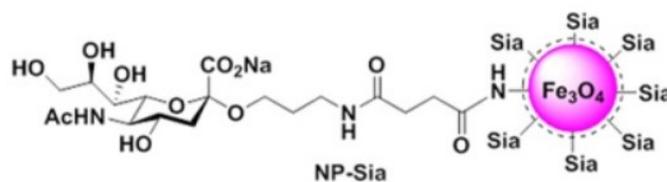


Figura 3.3: Gliconanoparticella-SPION, rivestita di acido sialico.

Un secondo esempio di applicazione delle nanoparticelle magnetiche è quello trattato da Ruan e colleghi [57], in cui le nanoparticelle sono applicate come agenti di teranostica. Le SPION

utilizzate sono funzionalizzate con PEG (per precisione DSPE-PEG), e poi legate alla molecola antinfiammatoria di curcumina: la terapia ha permesso la diminuzione di placche di amiloide- $\beta$ , ed è stata rilevata tramite tecniche di risonanza magnetica creando immagini sia in 2D sia in 3D per poter misurare il volume delle placche. La terapia è inoltre risultata efficiente per la ripresa della memoria dei ratti trattati.

Per il Parkinson, invece, un trattamento promettente è quello della terapia genetica, che va a colpire l'espressione di  $\alpha$ -sinucleina nei neuroni e shRNA. Per questo motivo Niu e il suo gruppo di ricerca [58] hanno utilizzato nanoparticelle magnetiche ricoperte di molecole di acido oleico, in grado di adsorbire shRNA. Hanno dimostrato che queste nanoparticelle, oltre che riuscire ad arrivare al target, possono ridurre l'espressione di  $\alpha$ -sinucleina e quindi prevenirne l'effetto tossico sulle cellule.

Per la SLA, le nanoparticelle magnetiche hanno trovato utilizzo solo come agenti di monitoraggio nella terapia con cellule staminali.

#### *3.4.2 L'applicazione dei carbon dots nelle malattie neurodegenerative*

Dopo la loro scoperta, i carbon dots hanno suscitato molto interesse date le loro proprietà ottiche, la fotostabilità, le piccole dimensioni; sono strutture chimicamente inerti e con bassa tossicità e, non ultimo, facilmente producibili. Essi hanno dimostrato di essere molto adatti ad applicazioni in molti campi come la biodiagnostica, optoelettronica, fotocatalisi, imaging dei tessuti non superficiali e infine nel rilascio di farmaci e geni. Per quanto riguarda le malattie neurodegenerative, hanno dimostrato la capacità di riuscire a passare la BBB e di riuscire a raggiungere il target desiderato, dimostrandosi dei potenziali carrier per i principi attivi contro le malattie neurodegenerative e di permettere il monitoraggio in tempo reale delle cellule vive [59].

I carbon dots, tra tutti i nanocarrier, hanno dimostrato proprietà notevoli, che più rispondono ai requisiti utili per entrare nel sistema nervoso, tra cui la possibilità di trasportare dosi relativamente elevate di farmaco, lunga stabilità nei fluidi biologici, alta biocompatibilità e capacità di rilasciare il farmaco in modo controllato. I carbon dots sono quindi in grado di portare i farmaci all'encefalo e di oltrepassare facilmente la BBB, grazie alla loro piccolissima dimensione, alla natura biocompatibile e alle caratteristiche chimiche di superficie uniche. Le terapie che utilizzano i carbon dots sfruttano la loro capacità di aprire le giunzioni serrate per il fatto che riescono ad aumentare la permeabilità della BBB funzionalizzando i carbon dots, ad esempio, con la transferrina che attiva il meccanismo di endocitosi Tr-assistita. Tutto ciò è stato confermato dall'imaging fatto su zebrafish, andando a legare ai carbon dots anche la proteina

verde fluorescente (GFP) oltre alla transferrina e si è monitorata la loro capacità di entrare nel sistema nervoso dei pesci stessi [60]. Come detto in precedenza, andare ad agire sull'amiloido- $\beta$  e sulle infiammazioni del sistema nervoso è la strategia migliore per prevenire le malattie neurodegenerative. È stato presentato, in alcuni studi [61-62] in cui si è legato un peptide neuroprotettivo ai carbon dots, di sequenza glicina-prolina-glutammato, che è in grado sia di inibire l'accumulo di  $A\beta$ , sia di diminuire le specie reattive dell'ossigeno (trattamento per l'Alzheimer), sia di impedire la formazione di fibrille di  $\alpha$ -sinucleina (legandosi alle fibrille formate) che di prevenire la morte neuronale (trattamento per il Parkinson).

## Conclusioni

Nell'ultimo secolo le nanoparticelle hanno suscitato l'interesse di molti ricercatori dato che offrono una serie di vantaggi unici, molto diversi dal materiale di cui sono composte preso a volume esteso. Esse possono infatti acquisire delle proprietà non ritrovabili in nessun'altro materiale e per questo hanno aperto la strada a nuove possibilità nella ricerca scientifica, non solo in ambito medico. Un altro aspetto fondamentale da considerare riguarda la loro sintesi che, oltre a prevedere tecniche in continuo miglioramento, è attuabile efficientemente senza essere costosa.

La loro applicazione nelle malattie neurodegenerative rappresenta un'innovativa e promettente strategia. Esse permettono, in primis, di attraversare la barriera emato-encefalica, ostacolo per molti farmaci e terapie attualmente utilizzate, e permettono di attuare una terapia ad hoc per ogni paziente, limitando quindi gli effetti indesiderati. Le nanoparticelle, infatti, consentono di veicolare farmaci ad una specifica area o tessuto del cervello interessato dalla malattia, e rilasciare il loro carico terapeutico in modo controllato. Non vi sono molti limiti sulla tipologia del principio attivo che esse possono trasportare, perché possono essere scelte nanoparticelle di un tipo piuttosto che un altro, in modo da essere più adatte alle interazioni con il farmaco. Tutte le nanoparticelle analizzate sono biocompatibili e quindi una data tipologia deve essere scelta per ottenere il miglior risultato in una determinata terapia.

Un altro vantaggio delle nanoparticelle è il loro utilizzo nell'imaging ad alta risoluzione, che permette di fare diagnosi precoce rispetto alle tecniche oggi utilizzate, e nella diagnosi delle malattie neurodegenerative. I due aspetti, infine, possono essere combinati nella teranostica e quindi nella terapia personalizzata del paziente, obiettivo sempre più ricercato nella medicina. La ricerca nel campo delle malattie neurodegenerative ha già dimostrato risultati importanti e promettenti sia in vitro che in vivo su modelli animali, aprendo nuove prospettive terapeutiche per i pazienti affetti da malattie come l'Alzheimer, il Parkinson e la SLA. Tuttavia, sono necessarie ulteriori sperimentazioni per comprenderne appieno l'efficacia e la stabilità nel contesto clinico. Attualmente, non ci sono trattamenti clinici approvati che utilizzino le nanoparticelle: l'unica loro applicazione in fase II della sperimentazione clinica riguarda il cancro al seno. Le nanoparticelle, per poterne approvare l'utilizzo clinico, devono rispettare delle caratteristiche molto rigorose (come la biocompatibilità e la stabilità in condizioni fisiologiche) e vi è bisogno, in questo contesto, di ulteriori sperimentazioni in vivo. Nonostante vi siano quindi ancora delle incertezze, dovute alla mancanza di un numero adeguato di sperimentazioni, le nanoparticelle risultano essere molto promettenti nel trattamento delle

malattie neurodegenerative, offrendo la possibilità concreta di un miglioramento della qualità di vita dei pazienti affetti da queste gravi patologie.

## Bibliografia

- [1] National Nanotechnology Initiative (NNI) [visitato il 27 aprile 2023]; Disponibile online: [www.nano.gov](http://www.nano.gov)
- [2] Feynman, R.P. (1960) 'There's Plenty of Room at the Bottom', *Engineering and Science*, 23(5), pp. 22–36.
- [3] Taniguchi N., Arakawa C., Kobayashi T. On the basic concept of nano-technology; Proceedings of the International Conference on Production Engineering; Tokyo, Japan. 26–29 August 1974.
- [4] Drexler E.K. Engines of Creation: The Coming Era of Nanotechnology. *Anchor Press*; Garden City, NY, USA: 1986.
- [5] Binnig, G. *et al.* (1982) 'Tunneling through a controllable vacuum gap', *Applied Physics Letters*, 40(2), pp. 178–180. Available at: <https://doi.org/10.1063/1.92999>.
- [6] Kroto, H.W. *et al.* (1985) 'C60: Buckminsterfullerene', *Nature*, 318(6042), pp. 162–163. Available at: <https://doi.org/10.1038/318162a0>.
- [7] Xu, X. *et al.* (2004) 'Electrophoretic Analysis and Purification of Fluorescent Single-Walled Carbon Nanotube Fragments', *Journal of the American Chemical Society*, 126(40), pp. 12736–12737. Available at: <https://doi.org/10.1021/ja040082h>.
- [8] Bayda, S. *et al.* (2019) 'The History of Nanoscience and Nanotechnology: From Chemical–Physical Applications to Nanomedicine', *Molecules*, 25(1), p. 112. Available at: <https://doi.org/10.3390/molecules25010112>.
- [9] American Society for Testing and Materials, ASTM E 2456-06. Terminology for nanotechnology. 2020. ASTM International.
- [10] Chen, F. *et al.* (2022) 'Chapter 2 - Synthesis of nanomaterials using top-down methods', in J.L. Liu, T.-H. Yan, and S. Bashir (eds) *Advanced Nanomaterials and Their Applications in Renewable Energy (Second Edition)*. Elsevier, pp. 37–60. Available at: <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-99877-2.00007-2>.
- [11] Amendola, V. and Meneghetti, M. (2009) 'Laser ablation synthesis in solution and size manipulation of noble metal nanoparticles', *Physical Chemistry Chemical Physics*, 11(20), pp. 3805–3821. Available at: <https://doi.org/10.1039/B900654K>.
- [12] Baig, N., Kammakakam, I. and Falath, W. (2021) 'Nanomaterials: a review of synthesis methods, properties, recent progress, and challenges', *Materials Advances*, 2(6), pp. 1821–1871. Available at: <https://doi.org/10.1039/D0MA00807A>.

- [13] Danks, A.E., Hall, S.R. and Schnepf, Z. (2016) ‘The evolution of “sol–gel” chemistry as a technique for materials synthesis’, *Materials Horizons*, 3(2), pp. 91–112. Available at: <https://doi.org/10.1039/C5MH00260E>.
- [14] Maldonado, C.R. *et al.* (2013) ‘Nano-functionalization of metal complexes for molecular imaging and anticancer therapy’, *Coordination Chemistry Reviews*, 257(19), pp. 2668–2688. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2013.04.014>.
- [15] Noguez, C. (2007) ‘Surface Plasmons on Metal Nanoparticles: The Influence of Shape and Physical Environment’, *The Journal of Physical Chemistry C*, 111(10), pp. 3806–3819. Available at: <https://doi.org/10.1021/jp066539m>.
- [16] Boisselier, E. and Astruc, D. (2009) ‘Gold nanoparticles in nanomedicine: preparations, imaging, diagnostics, therapies and toxicity’, *Chemical Society Reviews*, 38(6), pp. 1759–1782. Available at: <https://doi.org/10.1039/B806051G>.
- [17] Goodman, C.M. *et al.* (2004) ‘Toxicity of Gold Nanoparticles Functionalized with Cationic and Anionic Side Chains’, *Bioconjugate Chemistry*, 15(4), pp. 897–900. Available at: <https://doi.org/10.1021/bc049951i>.
- [18] A. Qiu, T. *et al.* (2015) ‘Gene expression as an indicator of the molecular response and toxicity in the bacterium *Shewanella oneidensis* and the water flea *Daphnia magna* exposed to functionalized gold nanoparticles’, *Environmental Science: Nano*, 2(6), pp. 615–629. Available at: <https://doi.org/10.1039/C5EN00037H>.
- [19] Rai, M. *et al.* (2015) ‘Bioactivity of noble metal nanoparticles decorated with biopolymers and their application in drug delivery’, *International Journal of Pharmaceutics*, 496(2), pp. 159–172. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2015.10.059>.
- [20] Sperling, R.A. and Parak, W.J. (2010) ‘Surface modification, functionalization and bioconjugation of colloidal inorganic nanoparticles’, *Philosophical Transactions of the Royal Society A: Mathematical, Physical and Engineering Sciences*, 368(1915), pp. 1333–1383. Available at: <https://doi.org/10.1098/rsta.2009.0273>.
- [21] Golubeva, O.Yu. *et al.* (2012) ‘Synthesis and investigation of silver-peptide bioconjugates and investigation in their antimicrobial activity’, in T. Böllinghaus *et al.* (eds) *Materials Challenges and Testing for Supply of Energy and Resources*. Berlin, Heidelberg: Springer, pp. 163–171. Available at: [https://doi.org/10.1007/978-3-642-23348-7\\_15](https://doi.org/10.1007/978-3-642-23348-7_15).

- [22] Nie, P., Zhao, Y. and Xu, H. (2023) 'Synthesis, applications, toxicity and toxicity mechanisms of silver nanoparticles: A review', *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 253, p. 114636. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2023.114636>.
- [23] Bonor, J. *et al.* (2014) 'Synthesis and Characterization of L-Lysine Conjugated Silver Nanoparticles Smaller Than 10 nM', *Advanced science, engineering and medicine*, 6(9), pp. 942–947.
- [24] Parkinson, G.S. (2016) 'Iron oxide surfaces', *Surface Science Reports*, 71(1), pp. 272–365. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.surfrep.2016.02.001>.
- [25] Huh, Y.-M. *et al.* (2005) 'In vivo magnetic resonance detection of cancer by using multifunctional magnetic nanocrystals', *Journal of the American Chemical Society*, 127(35), pp. 12387–12391. Available at: <https://doi.org/10.1021/ja052337c>.
- [26] Neuberger, T. *et al.* (2005) 'Superparamagnetic nanoparticles for biomedical applications: Possibilities and limitations of a new drug delivery system', *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*, 293(1), pp. 483–496. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.jmmm.2005.01.064>.
- [27] Vakili-Ghartavol, R. *et al.* (2020) 'Toxicity assessment of superparamagnetic iron oxide nanoparticles in different tissues', *Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology*, 48(1), pp. 443–451. Available at: <https://doi.org/10.1080/21691401.2019.1709855>.
- [28] Simões, S. *et al.* (2004) 'On the formulation of pH-sensitive liposomes with long circulation times', *Advanced Drug Delivery Reviews*, 56(7), pp. 947–965. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.addr.2003.10.038>.
- [29] Garud, A., Singh, D. and Garud, N. (2012) 'Solid Lipid Nanoparticles (SLN): Method, Characterization and Applications', *International Current Pharmaceutical Journal*, 1(11), pp. 384–393. Available at: <https://doi.org/10.3329/icpj.v1i11.12065>.
- [30] Müller, R.H., Radtke, M. and Wissing, S.A. (2002) 'Nanostructured lipid matrices for improved microencapsulation of drugs', *International Journal of Pharmaceutics*, 242(1–2), pp. 121–128. Available at: [https://doi.org/10.1016/s0378-5173\(02\)00180-1](https://doi.org/10.1016/s0378-5173(02)00180-1).
- [31] Joralemon, M.J., McRae, S. and Emrick, T. (2010) 'PEGylated polymers for medicine: from conjugation to self-assembled systems', *Chemical Communications*, 46(9), pp. 1377–1393. Available at: <https://doi.org/10.1039/B920570P>.
- [32] Soppimath, K.S. *et al.* (2001) 'Biodegradable polymeric nanoparticles as drug delivery devices', *Journal of Controlled Release*, 70(1), pp. 1–20. Available at: [https://doi.org/10.1016/S0168-3659\(00\)00339-4](https://doi.org/10.1016/S0168-3659(00)00339-4).

- [33] Rawat, M. *et al.* (2006) ‘Nanocarriers: Promising Vehicle for Bioactive Drugs’, *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 29(9), pp. 1790–1798. Available at: <https://doi.org/10.1248/bpb.29.1790>.
- [34] Lim, S.Y., Shen, W. and Gao, Z. (2014) ‘Carbon quantum dots and their applications’, *Chemical Society Reviews*, 44(1), pp. 362–381. Available at: <https://doi.org/10.1039/C4CS00269E>.
- [35] Koutsogiannis, P. *et al.* (2020) ‘Advances in fluorescent carbon dots for biomedical applications’, *Advances in Physics: X*, 5(1), p. 1758592. Available at: <https://doi.org/10.1080/23746149.2020.1758592>.
- [36] Masters, C.L. *et al.* (2006) ‘Molecular mechanisms for Alzheimer’s disease: implications for neuroimaging and therapeutics’, *Journal of Neurochemistry*, 97(6), pp. 1700–1725. Available at: <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2006.03989.x>.
- [37] Duda, J.E., Lee, V.M.-Y. and Trojanowski, J.Q. (2000) ‘Neuropathology of synuclein aggregates’, *Journal of Neuroscience Research*, 61(2), pp. 121–127. Available at: [https://doi.org/10.1002/1097-4547\(20000715\)61:2<121::AID-JNR1>3.0.CO;2-4](https://doi.org/10.1002/1097-4547(20000715)61:2<121::AID-JNR1>3.0.CO;2-4).
- [38] Jellinger, K.A. (2003) ‘Neuropathological spectrum of synucleinopathies’, *Movement Disorders*, 18(S6), pp. 2–12. Available at: <https://doi.org/10.1002/mds.10557>.
- [39] Cattaneo, E., Zuccato, C. and Tartari, M. (2005) ‘Normal huntingtin function: an alternative approach to Huntington’s disease’, *Nature Reviews Neuroscience*, 6(12), pp. 919–930. Available at: <https://doi.org/10.1038/nrn1806>.
- [40] Walker, F.O. (2007) ‘Huntington’s disease’, *The Lancet*, 369(9557), pp. 218–228. Available at: [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(07\)60111-1](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(07)60111-1).
- [41] Buratti, E. and Baralle, F. (2008) ‘Buratti, E. & Baralle, F. E. Multiple roles of TDP-43 in gene expression, splicing regulation, and human disease. *Front. Biosci.* 13, 867-878’, *Frontiers in bioscience : a journal and virtual library*, 13, pp. 867–78. Available at: <https://doi.org/10.2741/2727>.
- [42] *Transport of nanoparticles through the blood–brain barrier for imaging and therapeutic applications - Nanoscale (RSC Publishing)* (no date). Available at: <https://pubs.rsc.org/en/content/articlelanding/2014/NR/C3NR04878K> (Accessed: 28 May 2023).
- [43] Martinez-Veracoechea, F.J. and Frenkel, D. (2011) ‘Designing super selectivity in multivalent nano-particle binding’, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108(27), pp. 10963–10968. Available at: <https://doi.org/10.1073/pnas.1105351108>.

- [44] Saraiva, C. *et al.* (2016) ‘Nanoparticle-mediated brain drug delivery: Overcoming blood–brain barrier to treat neurodegenerative diseases’, *Journal of Controlled Release*, 235, pp. 34–47. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2016.05.044>.
- [45] Mourtas, S. *et al.* (2014) ‘Multifunctional nanoliposomes with curcumin–lipid derivative and brain targeting functionality with potential applications for Alzheimer disease’, *European Journal of Medicinal Chemistry*, 80, pp. 175–183. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2014.04.050>.
- [46] Passeri, E. *et al.* (2022) ‘Alzheimer’s Disease: Treatment Strategies and Their Limitations’, *International Journal of Molecular Sciences*, 23(22), p. 13954. Available at: <https://doi.org/10.3390/ijms232213954>.
- [47] Gastaldi, L. *et al.* (2014) ‘Solid lipid nanoparticles as vehicles of drugs to the brain: current state of the art’, *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics: Official Journal of Arbeitsgemeinschaft Fur Pharmazeutische Verfahrenstechnik e.V*, 87(3), pp. 433–444. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2014.05.004>.
- [48] He, H. *et al.* (2013) ‘Carbon Nanotubes: Applications in Pharmacy and Medicine’, *BioMed Research International*, 2013, p. e578290. Available at: <https://doi.org/10.1155/2013/578290>.
- [49] Baskin, J., Jeon, J.E. and Lewis, S.J.G. (2021) ‘Nanoparticles for drug delivery in Parkinson’s disease’, *Journal of Neurology*, 268(5), pp. 1981–1994. Available at: <https://doi.org/10.1007/s00415-020-10291-x>.
- [50] Kalčec, N. *et al.* (2022) ‘Spectroscopic study of L-DOPA and dopamine binding on novel gold nanoparticles towards more efficient drug-delivery system for Parkinson’s disease’, *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 268, p. 120707. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.saa.2021.120707>.
- [51] Hu, K. *et al.* (2018) ‘Neuroprotective effect of gold nanoparticles composites in Parkinson’s disease model’, *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*, 14(4), pp. 1123–1136. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.nano.2018.01.020>.
- [52] Valenza, M. *et al.* (2015) ‘Cholesterol-loaded nanoparticles ameliorate synaptic and cognitive function in Huntington’s disease mice’, *EMBO Molecular Medicine*, 7(12), pp. 1547–1564. Available at: <https://doi.org/10.15252/emmm.201505413>.
- [53] Ediriweera, G.R. *et al.* (2021) ‘Non-Viral Vector-Mediated Gene Therapy for ALS: Challenges and Future Perspectives’, *Molecular Pharmaceutics*, 18(6), pp. 2142–2160. Available at: <https://doi.org/10.1021/acs.molpharmaceut.1c00297>.

- [54] Padmanabhan, P. *et al.* (2016) ‘Nanoparticles in practice for molecular-imaging applications: An overview’, *Acta Biomaterialia*, 41, pp. 1–16. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2016.06.003>.
- [55] Busquets, M.A., Sabaté, R. and Estelrich, J. (2014) ‘Potential applications of magnetic particles to detect and treat Alzheimer’s disease’, *Nanoscale Research Letters*, 9(1), p. 538. Available at: <https://doi.org/10.1186/1556-276X-9-538>.
- [56] Kouyoumdjian, H. *et al.* (2013) ‘Glyconanoparticle Aided Detection of  $\beta$ -Amyloid by Magnetic Resonance Imaging and Attenuation of  $\beta$ -Amyloid Induced Cytotoxicity’, *ACS Chemical Neuroscience*, 4(4), pp. 575–584. Available at: <https://doi.org/10.1021/cn3002015>.
- [57] Ruan, Y. *et al.* (2022) ‘Highly sensitive Curcumin-conjugated nanotheranostic platform for detecting amyloid-beta plaques by magnetic resonance imaging and reversing cognitive deficits of Alzheimer’s disease via NLRP3-inhibition’, *Journal of Nanobiotechnology*, 20, p. 322. Available at: <https://doi.org/10.1186/s12951-022-01524-4>.
- [58] Niu, S. *et al.* (2017) ‘Inhibition by Multifunctional Magnetic Nanoparticles Loaded with Alpha-Synuclein RNAi Plasmid in a Parkinson’s Disease Model’, *Theranostics*, 7(2), pp. 344–356. Available at: <https://doi.org/10.7150/thno.16562>.
- [59] Lu, S. *et al.* (2016) ‘Hydrothermal synthesis of nitrogen-doped carbon dots with real-time live-cell imaging and blood–brain barrier penetration capabilities’, *International Journal of Nanomedicine*, 11, pp. 6325–6336. Available at: <https://doi.org/10.2147/IJN.S119252>.
- [60] Ashrafizadeh, M. *et al.* (2020) ‘Carbon dots as versatile nanoarchitectures for the treatment of neurological disorders and their theranostic applications: A review’, *Advances in Colloid and Interface Science*, 278, p. 102123. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.cis.2020.102123>.
- [61] Chung, Y.J. *et al.* (2017) ‘Carbon Nanodot-Sensitized Modulation of Alzheimer’s  $\beta$ -Amyloid Self-Assembly, Disassembly, and Toxicity’, *Small*, 13(34), p. 1700983. Available at: <https://doi.org/10.1002/smll.201700983>.
- [62] Kim, D. *et al.* (2018) ‘Graphene quantum dots prevent  $\alpha$ -synucleinopathy in Parkinson’s disease’, *Nature Nanotechnology*, 13(9), pp. 812–818. Available at: <https://doi.org/10.1038/s41565-018-0179-y>.