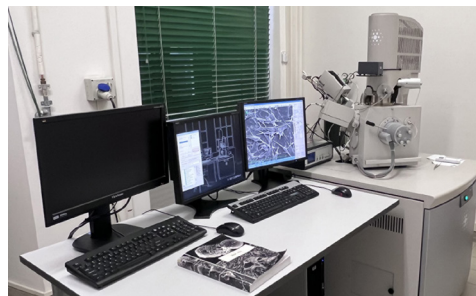


NANOTECNOLOGIE: UN VIAGGIO AL MICROSCOPIO



Giuseppina Bozzuto¹, Annarica Calcabrini¹, Miriam Caviglia², Marisa Colone¹,
Maria Condello¹, Alice Di Netta³, Maria Luisa Dupuis¹, Sofia Migani² e Annarita Stringaro¹

¹Centro Nazionale per la Ricerca e la Valutazione Preclinica e Clinica dei Farmaci, ISS

²Scuola di Scienze e Tecnologie, Divisione di Chimica, Università di Camerino

³Dipartimento di Scienze, Università di Roma Tre

RIASSUNTO - Le nanotecnologie sono applicate a diversi settori, quali chimica, ingegneria, biologia. In ambito sanitario, la nanomedicina contribuisce a migliorare alcuni aspetti della medicina tradizionale, tra cui l'efficacia e la selettività del trattamento farmacologico contro i tumori. A questo scopo vengono progettate e impiegate le nanoformulazioni, ovvero composti (di sintesi o di origine naturale) con attività antitumorale, trasportati da vettori di dimensione nanometrica di varia natura. Il Reparto "Ricerca Farmacologica e Terapia Sperimentale" del Centro Nazionale per la Ricerca e la Valutazione Preclinica e Clinica dei Farmaci dell'Istituto Superiore di Sanità si occupa di analizzare gli effetti delle nanoformulazioni su linee cellulari umane di diversa origine istologica allo scopo di valutarne l'efficacia e la sicurezza attraverso tecniche di biologia cellulare, molecolare e analisi di immagini in microscopia ottica, confocale ed elettronica.

Parole chiave: nanotecnologia; microscopia; cellule tumorali in coltura

SUMMARY (*Nanotechnologies: a journey under the microscope*) - Nanotechnologies are applied to different areas, such as chemistry, engineering, biology. In the healthcare sector, nanomedicine helps to improve some aspects of traditional medicine, such as the efficacy and specificity of pharmacological treatment against tumors. To this aim, nanoformulations are designed and used; they consist of compounds (both synthetic and of natural origin) showing antitumor activity, transported by organic or inorganic nanovectors. The research group "Pharmacological Research and Experimental Therapy" - National Centre for Drug Research and Evaluation at the National Institute of Health in Italy (ISS) is involved in analyzing the effects of nanoformulations on human cell lines of different histological origin in order to evaluate their efficacy and safety through cellular and molecular biology techniques and image analysis in optical, confocal and electronic microscopy.

Key words: nanotechnology; microscopy; cultured tumor cells

annarita.stringaro@iss.it

Il Gruppo afferente all'Area di Nanomedicina per Terapie Integrate (reparto di Ricerca Farmacologica e Terapia Sperimentale, Centro Nazionale per la Ricerca e la Valutazione Preclinica e Clinica dei Farmaci-FARVA, Istituto Superiore di Sanità - ISS), lo scorso 27 settembre, ha partecipato alla Notte Europea dei Ricercatori e delle Ricercatrici 2024 presso la Città dell'Altra Economia di Roma. Nello stand sono state illustrate le principali attività del Gruppo di Nanomedicina attraverso la presentazione di un poster "Nanotecnologie: un viaggio al microscopio" e l'impiego di vari giochi interattivi per divulgare l'importanza delle nanotecnologie in ambito sanitario.

Il Centro FARVA dell'ISS si occupa dell'intero settore che riguarda lo sviluppo dei farmaci, partendo dagli studi sperimentali di laboratorio, mediante l'im-

piego di colture cellulari (sperimentazione *in vitro*), alla sperimentazione su animali attraverso specifici modelli di malattie umane (studi *in vivo*) e successivamente alla sperimentazione in clinica sull'uomo. L'obiettivo principale di tali attività è quello di favorire lo sviluppo di nuovi approcci efficaci e sicuri per il trattamento delle malattie nell'uomo.

In questo ambito, presso l'ISS si inseriscono le attività dell'Area di Nanomedicina che (in collaborazione con altri enti di ricerca, quali Università e Consiglio Nazionale delle Ricerche) si occupa dello sviluppo e della valutazione di sicurezza ed efficacia dei nanovettori, strutture di dimensione nanometrica (miliardesimo di metro), utilizzate per il trasporto e il rilascio di composti dannosi all'interno delle cellule tumorali. Tali composti sono rappresentati sia da farmaci noti (già in

uso in clinica) che da nuove sostanze, comprese quelle di origine naturale. Tali attività contribuiscono allo sviluppo di nuove strategie per il miglioramento dei trattamenti farmacologici contro i tumori.

La nanoscienza e la nanotecnologia rappresentano un'area di ricerca in espansione. Il prefisso “nano” deriva dal greco e indica oggetti molto piccoli corrispondenti a un miliardesimo di metro, ovvero un nanometro (1 nm = 10^{-9} m). Il concetto di nanotecnologia è stato introdotto nel 1959 dal fisico americano e premio Nobel Richard Feynman il quale, nella leggendaria Conferenza intitolata “C'è un sacco di spazio laggiù”, introdusse l'ipotesi che grandi cambiamenti a livello macroscopico sarebbero potuti arrivare dal mondo dell'ultra-piccolo. Le nanotecnologie producono e utilizzano materiali o sistemi che presentano una dimensione compresa tra 1 e 100 nm. La loro applicazione spazia in molti campi della scienza, tra cui fisica, scienza dei materiali, chimica, ingegneria, biologia e medicina.

Come applicazione specifica delle nanotecnologie in ambito medico-sanitario, la nanomedicina è emersa allo scopo di fornire nuove soluzioni alle complicazioni non ancora risolte che accompagnano diagnostica e terapie della medicina tradizionale, contribuendo, in ultimo, a migliorare la qualità di vita del paziente. Tra i possibili campi di applicazione della nanomedicina si ricordano: l'analisi e la diagnosi precoce delle patologie, l'ingegneria tissutale e la medicina rigenerativa, la microchirurgia, il miglioramento dei trattamenti farmacologici in diversi tipi di malattie (1).

Recentemente le nanotecnologie hanno dimostrato risultati promettenti nella diagnosi e nel trattamento dei tumori. In particolare, il loro impiego ha contribuito a superare alcuni gravi problemi associati alla chemioterapia, primo tra tutti l'assenza di specificità dei farmaci nei confronti delle cellule tumorali e la loro tossicità verso quelle sane. A questo scopo vengono impiegate le cosiddette “nanoformulazioni”, vale a dire farmaci/composti ad attività antitumorale inseriti all'interno o legati sulla superficie di specifici nanovettori in modo da essere trasportati all'interno del tumore. Esiste una grande varietà di nanomateriali che si suddividono in organici e inorganici, in base al tipo di materiale utilizzato. Tra quelli organici ricordiamo: 1) i liposomi (vescicole a base di fosfolipidi, i vettori più utilizzati in clinica per il rilascio di farmaci); 2) le micelle lipidiche; 3) le nanoparticelle polimeriche (prodotte con polimeri sintetici biodegradabili o

con polimeri naturali); 4) le nanoparticelle di idrogel (materiale formato da una rete di polimeri idrofili). Tra i nanomateriali inorganici, i più studiati sono: a) le nanoparticelle d'oro (sfere o nanobacchette, a seconda della forma finale); b) le nanostrutture a base di carbonio (nanotubi di carbonio, grafene, nanodiamanti); c) i nanocristalli semiconduttori (*quantum dots*); d) le nanoparticelle di ossido di ferro (con proprietà superparamagnetiche) (Figura 1) (2).

Le nanoformulazioni vengono progettate opportunamente per: 1) aumentare la solubilità e la stabilità dei farmaci in acqua (quindi nei fluidi biologici); 2) aumentarne la quantità che raggiunge le cellule/tessuti tumorali; 3) colpire in maniera selettiva i tumori grazie alla presenza sulla superficie dei nanomateriali di molecole che riconoscono solo le cellule tumorali. In tal modo, vengono ridotti gli effetti collaterali della terapia oncologica classica, soprattutto i possibili danni contro cellule/tessuti sani. Inoltre, le caratteristiche fisico-chimiche dei nanovettori (composizione, forma, carica superficiale) possono essere “aggiustate” per migliorarne l'interazione con i sistemi biologici. L'impiego di questi nanovettori permette di controllare, nel tempo e nello spazio, il rilascio e la distribuzione del farmaco all'interno del tumore, aspetto fondamentale per ottenere un miglioramento delle terapie farmacologiche (3).

Tra le varie attività relative alla nanomedicina, il Gruppo di ricerca del FARVA si occupa di nanoformulazioni contenenti sostanze di origine naturale, che studi sperimentali *in vitro* hanno dimostrato essere efficaci nei confronti delle cellule tumorali (4, 5). I prodotti ►

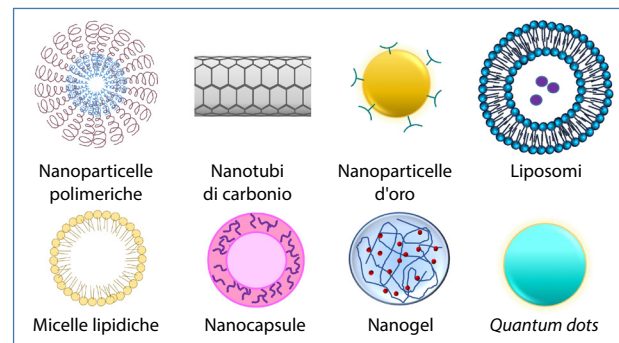


Figura 1 - Nanovettori utilizzati in nanomedicina. I liposomi, le micelle lipidiche, le nanocapsule, le nanoparticelle polimeriche, le nanoparticelle di idrogel, rappresentano i principali tipi di nanovettori di natura organica. Le nanoparticelle d'oro, le nanostrutture a base di carbonio e i *quantum dots* rappresentano i nanovettori di natura inorganica più studiati e utilizzati per il trasporto di farmaci/composti ad attività antitumorale

naturali, da anni, suscitano grande interesse nella ricerca e nell'industria farmaceutica come fonte di nuovi farmaci, soprattutto nel campo dell'oncologia e delle malattie infettive. La maggioranza di farmaci antitumorali (più del 60%) che hanno mostrato alta efficacia in clinica è ottenuta da piante, organismi acquatici e microorganismi. In particolare, i metaboliti secondari prodotti dalle piante per la loro protezione, come flavonoidi, alcaloidi e terpeni, hanno dimostrato di essere una fonte importante di potenziali nuovi agenti chemiosensibilizzanti, che rendono le cellule tumorali più sensibili agli effetti della chemioterapia (6). Tra i composti studiati dal Gruppo di Nanomedicina si ricorda l'aloe-emodin (antrachinone estratto dal gel delle foglie di *Aloe vera* e *barbadensis*) (7), l'estratto vegetale da *Prunus spinosa* (ecotipo Trigno, Italian Patent n. RM2015A 000133, 4-1-2015) (8), il tea tree oil (olio essenziale estratto dall'albero del tè *Melaleuca alternifolia*) (9).

Fasi di studio

Inizialmente mediante tecniche di biologia cellulare, molecolare e imaging (analisi di immagini microscopiche), il Gruppo di Nanomedicina si occupa di studiare e valutare l'azione antitumorale di questi composti su diverse linee cellulari umane, sia normali che tumorali; è importante infatti assicurarsi che tali composti non siano dannosi nei confronti delle cellule sane. Le linee cellulari utilizzate vengono cresciute e mantenute sia nella modalità bi-dimensionale (coltura 2D, aderente su un opportuno substrato) che in modalità tri-dimensionale (coltura 3D, sferoidi in sospensione), particolarmente utile per mimare le condizioni di crescita tumorale *in vivo*. L'arresto o la riduzione della crescita delle cellule tumorali e/o la comparsa di segni di sofferenza e morte cellulare (alterazione della forma, riduzione della motilità e capacità invasiva, induzione di apoptosi-necrosi-autofagia) testimoniano l'efficacia di un composto contro le cellule tumorali. Successivamente, in collaborazione con ricercatori chimici e fisici, vengono selezionati i tipi di nanovettori più adatti in grado di legare e trasportare il composto sotto esame. Individuato il nanovettore, che deve essere caratterizzato da assenza di tossicità nei confronti delle cellule sane, viene progettata la nanoformulazione corrispondente: nanovettore + composto. A questo punto iniziano le attività sperimentali per valutare gli effetti biologici di tre elementi: il nanovettore da solo, il composto libero e la nanoformulazione.

In particolare, vengono programmati: 1) studi di entrata, di trasporto e rilascio all'interno delle cellule; 2) analisi dell'effetto dannoso sulle cellule tumorali, a diversi livelli, ovvero sulla membrana esterna o plasmatica, sugli organuli citoplasmatici (reticolo, apparato di Golgi, citoscheletro) e sul nucleo; 3) modifiche della struttura di superficie del vettore per renderlo selettivo nei confronti delle cellule tumorali, come spiegato in precedenza. Lo scopo finale è quello di analizzare se il trattamento delle cellule con la nanoformulazione risulta più efficace rispetto al trattamento con il composto libero, non veicolato (Figura 2).

Per lo svolgimento delle varie attività descritte, un ruolo fondamentale è rappresentato dall'impiego delle tecniche microscopiche, grazie alla presenza di diverse apparecchiature in dotazione al Servizio Grandi Strumentazioni e al Centro FARVA dell'ISS: il microscopio elettronico a trasmissione (Transmission Electron Microscope, TEM), il microscopio elettronico a scansione (Scanning Electron Microscope, SEM) e la microscopia confocale a scansione laser (Laser Scanning Confocal Microscopy, LSCM). La microscopia elettronica (termine che deriva dall'impiego di un fascio di elettroni per l'illuminazione del campione) permette di ottenere un ingrandimento (rapporto tra la dimensione del campione sull'immagine e la dimensione reale del campione) e un potere di risoluzione (distanza minima alla quale due punti risultano distinti) decisamente più elevati

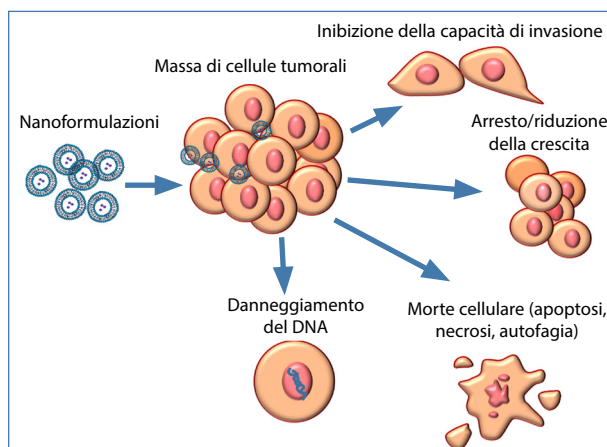


Figura 2 - Nanoformulazioni: interazione con le cellule tumorali e principali effetti biologici indotti. Il trattamento delle cellule tumorali con il composto sotto esame, libero o veicolato tramite nanoformulazione, induce una serie di risposte cellulari: arresto o riduzione della proliferazione; danni a carico del DNA; morte della cellula (apoptosi-necrosi-autofagia); riduzione della motilità cellulare; inibizione della capacità invasiva delle cellule tumorali

rispetto alla microscopia ottica che consente di avere ingrandimenti fino a 2.000 x e una risoluzione di 0,2 µm (micron o micrometro = milionesimo di metro). In Tabella sono riassunte le principali caratteristiche delle tecniche microscopiche impiegate negli studi di nanomedicina, mettendo a confronto i principi di funzionamento, i requisiti dei campioni da osservare, i valori di ingrandimento e il potere risolutivo raggiunti, così come le modalità di impiego delle diverse tecniche per l'analisi delle caratteristiche dei nanovettori (dimensione, forma, composizione) (10) e per lo studio dell'interazione dei nanovettori/nanoformulazioni a livello cellulare (Figura 3). Quindi, le nanotecnologie rappresentano un campo di ricerca e applicazione in continua espansione, con implicazioni significative in molti settori. La collaborazione interdisciplinare tra biologi, medici, ingegneri, fisici e informatici è cruciale per il progresso di questo settore, poiché permette di unire competenze diversificate al fine di ottimizzare l'uso dei nanomateriali.

Un aspetto fondamentale di questo processo, approfondito dal Gruppo di Nanomedicina da quasi 25 anni, è il monitoraggio e la caratterizzazione dei nanomateriali, un compito che viene facilitato dall'uso di tecniche avanzate di microscopia. Tecnologie quali la SEM, così come la LSCM, sono strumenti essenziali per indagare in dettaglio la struttura e la composizione dei nanomateriali, nonché per studiare le loro interazioni con tessuti, cellule, organuli e molecole intracellulari. Queste tecniche, permettendoci di osservare direttamente gli effetti dei nanomateriali a livello microscopico, forniscono informazioni fondamentali sui potenziali rischi biologici, come la tossicità e l'accumulo nei tessuti, oltre a consentirci di perfezionare la progettazione di nanomateriali specifici e sicuri.

Nell'ambito dell'oncologia, le nanotecnologie mostrano oggi un potenziale straordinario per la diagnosi e il trattamento delle malattie, offrendo soluzioni più precise, efficaci e meno invasive rispetto ►

Tabella - Principali tecniche microscopiche impiegate negli studi di nanomedicina

	Microscopia Elettronica a Trasmissione (TEM)^a	Microscopia Elettronica a Scansione (SEM)^b	Microscopia Confocale a Scansione Laser (LSCM)^c
Principio	Sorgente di illuminazione: fascio di elettroni indirizzato da lenti magnetiche sul campione, costituito da una sezione estremamente sottile che viene attraversata dal fascio elettronico	Sorgente di illuminazione: fascio di elettroni che effettua una scansione riga per riga sulla superficie del campione. Grazie all'inclinazione del fascio sulla superficie, si genera un'immagine finale 3D (tridimensionale)	Sorgente di illuminazione: laser a elevata intensità che illumina il campione un punto alla volta. Solo i segnali provenienti dal punto illuminato vengono raccolti, eliminando le informazioni prodotte dai piani non a fuoco
Campioni	Cellule sottoposte a fissazione chimica, disidratazione e inclusione in resine per ottenere sezioni ultrasottili (tra 50 e 100 nm ^d)	Cellule sottoposte a fissazione chimica, disidratazione e ricopertura con metalli pesanti (ad esempio, oro, platino)	Cellule vitali (non processate) e cellule non vitali (sottoposte a fissazione chimica) marcate con coloranti fluorescenti (fluorocromi) per l'identificazione di molecole/ organuli intracellulari
Tipologia di immagini	2D (bidimensionale) Bianco e nero	3D Bianco e nero	2D o 3D Bianco e nero - colorate
Potere di risoluzione	0,2 nm ^d	5 nm ^d	Da 100 a 700 nm ^d (determinato in base all'apertura numerica dell'obiettivo e al valore della lunghezza d'onda del laser)
Ingrandimento	Fino a 1.000.000 x	Fino a 100.000 x	Fino a 2.000 x
Utilizzo in nanomedicina	Studio delle caratteristiche dei nanovettori; analisi delle interazioni dei nanovettori/nanoformulazioni con strutture interne cellulari (citoplasma, organuli, nucleo); studio degli effetti dannosi indotti	Analisi della morfologia di superficie di un campione (dimensione e forma); studio della relativa interazione superficiale con nanovettori/nanoformulazioni	Analisi dell'entrata e dell'accumulo intracellulare di nanovettori e nanoformulazioni (conjugati a fluorocromi); studio della loro interazione con le strutture cellulari (ad esempio, nucleo, citoscheletro) e dei danni indotti

(a) TEM: Transmission Electron Microscope; (b) SEM: Scanning Electron Microscope; (c) LSCM: Laser Scanning Confocal Microscopy; (d) Nanometro: miliardesimo di metro

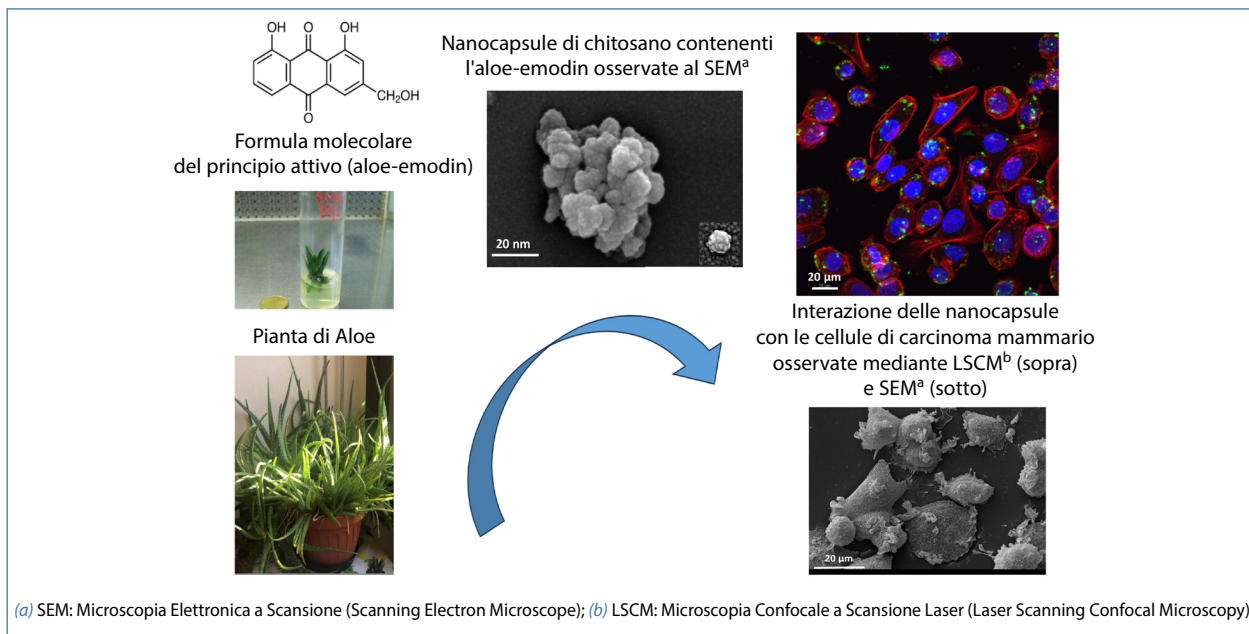


Figura 3 - Applicazione delle microscopie per lo studio di nanoformulazioni contenenti composti naturali. Le nanocapsule di chitosano (carboidrato polimerico biodegradabile, ottenuto dall'esoscheletro di crostacei) contenenti l'aloe-emodin vengono analizzate tramite la SEM per lo studio della morfologia. La LSCM analizza l'entrata nelle cellule della nanoformulazione (giallo/verde = aloe-emodin; blu = nuclei cellulari; rosso = contorno cellulare). La SEM mostra l'interazione della nanoformulazione con la superficie cellulare

ai metodi tradizionali. Studi più recenti del Gruppo di Nanomedicina sono indirizzati all'ottenimento di una somministrazione mirata di farmaci che potrebbe migliorare l'efficacia dei trattamenti e ridurre gli effetti collaterali, contribuendo in tal modo a migliorare la qualità della vita dei pazienti. ■

Dichiarazione sui conflitti di interesse

Gli autori dichiarano che non esiste alcun potenziale conflitto di interesse o alcuna relazione di natura finanziaria o personale con persone o con organizzazioni, che possano influenzare in modo inappropriato lo svolgimento e i risultati di questo lavoro.

Riferimenti bibliografici

1. Bayda S, Adeel M, Tuccinardi T, et al. The history of nanoscience and nanotechnology: from chemical-physical applications to nanomedicine. *Molecules* 2019;25(1):112.
2. Giri PM, Banerjee A, Layek B. A recent review on cancer nanomedicine. *Cancers* 2023;15:2256.
3. Anand U, Dey A, Chandel AKS, et al. Cancer chemotherapy and beyond: Current status, drug candidates, associated risks and progress in targeted therapeutics. *Genes & Dis* 2023;10:1367-401.
4. Colone M, Calcabrini A, Stringaro S. Drug delivery systems of natural products in oncology. *Molecules* 2020;25:4560.
5. Bozzuto G, Calcabrini A, Colone M, et al. Phytocompounds and nanoformulations for anticancer therapy: a review. *Molecules* 2024;29(16):3784.
6. Talib WH, Alsalahat I, Daoud S, et al. Planta-derived natural products in cancer research: extraction, mechanism of action, and drug formulation. *Molecules* 2020;25:5319.
7. Stringaro A, Serra S, Gori A, et al. Peptide-mediated targeted delivery of aloe-emodin as anticancer drug. *Molecules* 2022;27:4615.
8. Condello M, Vona R, Meschini S. Prunus spinosa extract sensitized HCT116 spheroids to 5-Fluorouracil toxicity, inhibiting autophagy. *Int J Mol Sci* 2022;23:16098.
9. Bozzuto G, Mariano F, Costa I, et al. Tea Tree Oil and Terpinen-4-Ol induce cytoskeletal reorganization of human melanoma cells. *Planta Med Int Open* 2021;8:e34-e53.
10. Condello M, Meschini S. Nanotechnology and nanomaterials in the strategy for the treatment of neoplastic diseases. *Microscopie* 2020;31:9196.

TAKE HOME MESSAGES

- Le nanotecnologie stanno rivoluzionando diversi settori (industriale, alimentare, ambientale, medico).
- L'applicazione delle nanotecnologie in ambito sanitario può contribuire al miglioramento delle terapie farmacologiche contro i tumori.
- Le microscopie elettroniche e ottiche danno un contributo fondamentale per la ricerca in campo nanotecnologico applicato alla salute, consentendo di studiare interazioni ed effetti indotti da nanovettori/nanoformulazioni a livello cellulare e molecolare.