

ALMA MATER STUDIORUM - UNIVERSITÀ DI BOLOGNA  
CAMPUS DI CESENA  
SCUOLA DI INGEGNERIA E ARCHITETTURA

CORSO DI LAUREA IN INGEGNERIA BIOMEDICA

INTERFACCE NEURALI A BASE DI CARBONIO:  
NANOTUBI DI CARBONIO E GRAFENE

Elaborato in

Fisiologia

*Relatore*

Dott.ssa VALENTINA BENFENATI

*Presentato da*

GIULIA GUERRA

Anno Accademico 2017/2018

## INDICE

1	INTRODUZIONE .....	3
2	DISTURBI NEUROLOGICI NEURODEGENERATIVI: ALZHEIMER E PARKINSON.....	6
2.1	ALZHEIMER.....	7
2.1.1	Caratteristiche macroscopiche .....	9
2.1.2	Caratteristiche microscopiche .....	10
2.2	PARKINSON .....	13
2.2.1	Caratteristiche macroscopiche .....	16
2.2.2	Caratteristiche microscopiche .....	17
3	LE INTERFACCE NEURALI NANOSTRUTTURATE A BASE DI CARBONIO .....	19
3.1	NANOTUBI DI CARBONIO .....	21
3.1.1	Nanotubi di carbonio e neurorigenerazione .....	24
3.1.2	Nanotubi di carbonio e drug delivery .....	30
3.2	GRAFENE.....	33
3.2.1	Grafene e neurorigenerazione .....	35
3.2.2	Grafene e drug delivery.....	39
4	TOSSICITÀ.....	42
4.1	TOSSICITÀ DEI NANOTUBI DI CARBONIO.....	42
4.1.1	Studi sulla tossicità in vitro .....	43
4.1.2	Studi sulla tossicità in vivo .....	45
4.2	TOSSICITÀ DEL GRAFENE .....	46
4.2.1	Studi sulla tossicità in vitro .....	47
4.2.2	Studi sulla tossicità in vivo .....	48
5	BIOCOMPATIBILITÀ .....	53
5.1	BIOCOMPATIBILITÀ DEI NANOTUBI DI CARBONIO .....	53
5.1.1	Biocompatibilità in vitro .....	54
5.1.2	Biocompatibilità in vivo.....	56
5.2	BIOCOMPATIBILITÀ DEL GRAFENE.....	58
5.2.1	Biocompatibilità in vitro .....	59
5.2.2	Biocompatibilità in vivo.....	63
6	CONCLUSIONI .....	65
7	REFERENZE.....	67

## 1 INTRODUZIONE

Per malattie neurodegenerative si intendono patologie neurologiche caratterizzate da una degenerazione strutturale e funzionale progressiva delle cellule neuronali.

Sebbene i trattamenti terapeutici possano contribuire ad alleviare alcuni dei sintomi fisici o mentali associati alle malattie neurodegenerative, attualmente non esiste una cura o un modo per rallentare la progressione della malattia.

Il rischio di essere affetti da una malattia neurodegenerativa aumenta drammaticamente con l'età. I miglioramenti della salute e della qualità della vita hanno aumentato la durata della vita della popolazione. Pertanto in un prossimo futuro, ovvero nei prossimi decenni, è previsto che, insieme a una più ampia generazione di anziani, potrà esserci un incremento drammatico del numero di persone che potrebbero essere affette da malattie neurodegenerative. Da qui nasce l'esigenza contingente di migliorare la nostra comprensione di ciò che causa le malattie neurodegenerative e sviluppare nuovi approcci per il trattamento e la prevenzione.

Dal punto di vista biologico e fisiologico la neurodegenerazione è in generale associata al progressivo invecchiamento dei sistemi molecolari cellulari che provoca la progressiva perdita di funzione o morte di neuroni o cellule accessorie, con conseguente compromissione dell'intero sistema nervoso. La sintomatologia clinica è variabile a seconda della tipologia di malattia neurodegenerativa. Quando la neurodegenerazione riguarda i neuroni del Sistema Nervoso Centrale (SNC), i sintomi più comuni possono essere perdita di coordinazione associata a disfunzionalità motorie, episodiche transitorie perdite di memoria (amnesie), fino a perdita di capacità cognitive e motorie che portano il paziente ad una debilitazione totale. Tra le patologie neurodegenerative del SNC, quelle che hanno una maggiore incidenza sulla popolazione mondiale sono la malattia di Alzheimer ed il morbo di Parkinson. Esse si manifestano con modalità molto diverse dando luogo a patologie ben distinte tra loro dal punto di vista clinico, istologico e biochimico. Tuttavia in entrambe le patologie, dal punto di vista eziopatologico, la causalità e la correlazione genetica sono sporadiche. Pertanto, parenti e figli di pazienti affetti da malattia di Alzheimer e morbo di Parkinson hanno la stessa probabilità di sviluppare la malattia della popolazione media. Rari sono i casi invece in cui la causa della malattia è da imputarsi a mutazioni specifiche, generalmente autosomiche dominanti, che si trasmettono con alta probabilità. Tali patologie sono caratterizzate da insorgenza precoce e coinvolgono molti familiari del paziente (il figlio di un soggetto affetto da malattia neurodegenerativa a trasmissione autosomica dominante ha il 50% di

probabilità di sviluppare la stessa malattia) [1]. Nella malattia di Alzheimer solo l'1% dei casi diagnosticati è genetico, mentre nella malattia di Parkinson l'incidenza dei casi genetici è circa il 5÷10%. Tra i fattori di rischio che aumentano l'incidenza dell'Alzheimer, per esempio, ci sono il trauma cranico, il basso livello di utilizzo delle funzioni cerebrali in età avanzata, l'invecchiamento precoce dei mitocondri, lo stress ossidativo, le infiammazioni croniche, il basso livello di estrogeni, l'ipertensione arteriosa, l'obesità e il diabete [1]. La nostra conoscenza dei fattori di rischio resta comunque assai limitata anche per una malattia molto studiata come l'Alzheimer o il morbo di Parkinson. Molti fattori di rischio restano da identificare e non si conoscono bene neppure i meccanismi molecolari e cellulari con cui quelli già identificati aumentano il rischio di Alzheimer; ancor meno note sono le interconnessioni e le forme di cooperatività positiva o negativa tra questi fattori di rischio.

Dato il costante aumento dell'aspettativa di vita nei Paesi occidentali, le malattie legate alla neurodegenerazione rappresentano un problema di crescente importanza per la nostra società. In quest'ottica le ricerche sullo sviluppo di metodologie diagnostiche e terapeutiche innovative sono in continua evoluzione. In particolare, dal punto di vista terapeutico strategie che mirano alla promozione della rigenerazione neuronale sono di grande interesse ed attualità in quanto costituiscono lo stato dell'arte della cosiddetta **medicina neuro-rigenerativa**. È stato infatti dimostrato che la stimolazione ambientale/modulazione del microambiente cerebrale è in grado di indurre eventi molecolari e funzionali che modificano il processo di rigenerazione neuronale e la plasticità sinaptica cerebrale e che, quindi, possono aumentare le capacità di recupero da danni cerebrali dovuti a traumi o malattie neurodegenerative. Oggi lo studio delle modalità di stimolo del processo di rigenerazione neuronale è un campo aperto di studio e di ricerca, dedito a capire come sia possibile accelerare il rinnovamento/la rigenerazione dei neuroni, e quindi sviluppare terapie di sostituzione sia per le malattie degenerative progressive e croniche, quali la malattia di Alzheimer e il morbo di Parkinson, sia per le lesioni neurodegenerative dovute a traumi acuti del sistema nervoso centrale. [4]

Nell'ambito della medicina rigenerativa la ricerca si sta orientando verso la trattazione di nuove strategie terapeutiche basate sullo sviluppo e la validazione di nuovi materiali che inducano, promuovano o sostengano il processo di rigenerazione. Un esempio è l'impiego di supporti cellulari (detti scaffold) con diverse proprietà meccaniche e chimiche. Diversi gruppi di ricerca hanno diretto i loro sforzi anche verso l'uso di nanoparticelle per applicazioni di rigenerazione neurale.

Risultati ottenuti da molteplici ricerche indicano che i nanomateriali a base di carbonio possono essere adatti a questo tipo di approcci terapeutici innovativi. Negli ultimi anni le sperimentazioni relative ai nanomateriali a base di carbonio hanno avuto un incremento esponenziale. Per facilitare la trasformazione del nanomateriale nelle pratiche applicazioni neurobiomediche è essenziale identificare e evidenziare, nella letteratura esistente, i punti di forza e le debolezze che questi diversi nanomateriali hanno mostrato nei vari esperimenti.

Sulla base di queste premesse questa tesi è stata rivolta alla rassegna dei lavori dedicati allo studio dello sviluppo di interfacce neurali a base di carbonio e della loro applicazione nell'ambito della medicina neurorigenerativa.

In particolare, il lavoro di tesi si è focalizzato sui due materiali innovativi quali nanotubi di carbonio e grafene, che hanno dimostrato risultati promettenti in termini di caratteristiche chimico-fisiche, conducibilità, versatilità, proprietà meccaniche e potenziale biocompatibilità con l'ambiente biologico.

## **2     DISTURBI   NEUROLOGICI   NEURODEGENERATIVI:   ALZHEIMER   E PARKINSON**

L'unità di base del cervello è il neurone, il quale è allo stesso tempo l'unità funzionale del sistema nervoso. Con unità funzionale si intende la più piccola struttura in grado di svolgere le funzioni di un sistema. Il neurone è costituito da un corpo cellulare dal quale fuoriescono lunghi processi. Questi processi vengono di solito 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. La forma, il numero e la lunghezza degli assoni e dei dendriti variano da neurone a neurone, ma queste strutture sono una caratteristica fondamentale che permette ai neuroni di comunicare tra loro e con le altre cellule. I lunghi assoni dei neuroni periferici afferenti (o sensoriali) ed efferenti (o motori somatici e autonomici), insieme a tessuto connettivo, formano i così detti nervi, ovvero cordoni che si stendono dal sistema nervoso centrale ad organi od a tessuti, che costituiscono il bersaglio dei neuroni componenti. Essi trasmettono i segnali nella stessa direzione e servono come connessioni intermedie fra cervello e cellule, organi o tessuti bersaglio. Di conseguenza, un qualsiasi danno al nervo compromette la trasmissione dei segnali ed i neuroni non sono quindi in grado di trasportare efficacemente l'impulso, originando in tal modo i così detti disturbi neurologici. Questi sono di competenza della neurologia, per il loro studio e la loro diagnosi. La neurologia si interessa di queste malattie sulla base della sede della lesione al cervello e assume che le malattie neurologiche siano in stretta relazione con la sede della lesione. In altri termini, ciò significa che lesioni in sedi diverse del cervello producono sintomi diversi, anche se le lesioni sono state provocate dalla stessa malattia o causa, e che malattie neurologiche diverse, se interessano la stessa lesione del sistema nervoso, possono produrre sintomi e segni simili o identici fra loro. Assunto ciò, bisogna tenere presente, quindi, che nella neurologia non si può considerare una malattia neurologica se non in stretta relazione con la sede anatomo-funzionale del sistema nervoso in cui si manifesta. Come per altre patologie mediche, le patologie neurologiche vengono classificate in base al meccanismo patogenetico. Morbo di Parkinson e morbo di Alzheimer vengono classificati come malattie neurodegenerative, ovvero malattie neurologiche contraddistinte da progressiva perdita, rispettivamente, delle funzioni motorie o cognitive, ed entrambe caratterizzate dall'evoluzione ingravescente nel tempo della malattia. Il morbo di Alzheimer è caratterizzato da una perdita di memoria progressivamente crescente, fino al punto che la persona non riconosce più neppure i propri famigliari; il morbo di Parkinson è

caratterizzato, invece, da movimenti anomali, difficoltà di linguaggio e problemi cognitivi. Di seguito verranno approfonditi questi due tipi di disturbi neurologici. [5]

## 2.1 ALZHEIMER

Il disturbo di Alzheimer è una patologia neurodegenerativa caratterizzata da un forte deficit cognitivo e rappresenta quasi la metà dei casi di demenza negli anziani. Con la progressione della malattia si hanno cambiamenti della personalità e, negli stadi finali, il deterioramento delle altre funzioni cognitive, fino al punto che il malato non riesce a comunicare neppure con chi lo assiste.

Lo sviluppo del disturbo è caratterizzato da cambiamenti degenerativi microscopici rappresentati da una varietà di sistemi di neurotrasmettitori; un neurotrasmettitore (o "neuromediatore") è una sostanza che veicola le informazioni fra le cellule componenti il sistema nervoso, ovvero i neuroni. È possibile catalogare i neuroni in diverse classi in base al neurotrasmettitore primario; nel disturbo di Alzheimer la classe di neuroni che subisce un evidente cambiamento è quella dei così detti neuroni aminergici, i quali si dividono a loro volta in: neuroni monoaminergici, se sfruttano come neurotrasmettitori le monoamine biogene (serotonina e catecolamine); colinergici, se sfruttano come neurotrasmettitore l'acetilcolina; aminoacidergici, se sfruttano come neurotrasmettitori gli aminoacidi o frammenti di essi (tra questi ricordiamo i neuroni GABAergici e i neuroni glutammatergici).

La malattia è anche caratterizzata da cambiamenti degenerativi macroscopici in particolari regioni cerebrali, che includono lobo temporale e parietale, regioni entro la corteccia frontale e il giro del cingolato. In questo disturbo neurodegenerativo, la perdita di cellule e la formazione di placche amiloidi e grovigli neurofibrillari si presentano nella neocorteccia, nell'ippocampo (inclusa la corteccia entorinale), nell'amigdala e nel nucleo basale di Meynert. In una minore estensione, queste caratteristiche si presentano anche in altre regioni come nucleo mediale del talamo, ponte e locus coeruleus.

Uno dei più consistenti interventi, per rallentare il progresso della malattia, è la riduzione dell'attività di acetilcolinesterasi, enzima responsabile della degradazione dell'acetilcolina (ACh), il neurotrasmettitore responsabile della trasmissione colinergica, in modo tale che, una volta utilizzato, il neurotrasmettitore non si accumuli tra le cellule nervose e non causi quindi complicazioni. I neuroni che secernono ACh ed i recettori che legano con ACh vengono definiti come colinergici. La perdita selettiva di questi neuroni si verifica nei nuclei del setto vicino alla benderella diagonale del Broca, nell'ippocampo

e nel nucleo basale di Meynert, che fornisce il principale input colinergico nella neocorteccia e nella corteccia celebrale. La neocorteccia mostra perdita di recettori colinergici, disfunzione dell'attività dell'enzima acetilcolinesterasi e diminuzione di colina acetil-transferasi, enzima responsabile della sintesi di ACh. Anche i neuroni glutammatergici sono coinvolti nel disturbo di Alzheimer e sono responsabili della perdita di gran parte dei neuroni nella corteccia celebrale e nell'ippocampo. L'eccessiva stimolazione di recettori di glutammato, in particolare il recettore N-metil-D-aspartate (NMDA), sembra strettamente coinvolta nella morte dei neuroni colinergici del prosencefalo; l'anormale funzione glutammatergica è di fatto un fattore causale nel disturbo di Alzheimer. L'efficace antagonismo farmacologico del recettore NMDA, in particolare attraverso l'utilizzo di antagonisti liberi, può essere capace di rallentare il progresso della malattia. Se gli antagonisti selettivi sono utilizzati nel sito recettoriale del NMDA, i neuroni colinergici possono essere salvati dalle conseguenze della neuroinfiammazione cronica del cervello. Essendo i sintomi del disturbo associati ad una alterazione della funzione colinergica, la ricerca si è focalizzata sul sistema colinergico del prosencefalo basale e su alcuni dei neurotrasmettitori che originano nel mesencefalo, come dopamina, norepinefrina e serotonina. Tuttavia, il perché questi neurotrasmettitori cambiano e quali meccanismi sono alla base della degenerazione di questi specifici sistemi sono ancora sconosciuti.

Fino ad oggi, sono stati identificati quattro specifici geni – detti geni mutanti –, associati a quattro proteine differenti, i quali, in condizioni alterate, causano o predispongono un individuo al disturbo di Alzheimer:

- gene del precursore della proteina amiloide (APP);
- gene della presenilina-1 (PS-1);
- gene della presenilina-2 (PS-2);
- gene dell'apolipoproteina (ApoE4).

Le preseniline sono proteine che hanno la funzione di tagliare la proteina amiloide; per questo, un'ipotesi è che il loro alterato funzionamento può portare all'accumulo di proteina amiloide. L'apolipoproteina (APOE), invece, è una proteina plasmatica, coinvolta nel trasporto del colesterolo, che si lega alla proteina amiloide, e della quale esistono tre forme (APOE2, APOE3, APOE4), codificate da tre diversi alleli (E2, E3, E4). Diversi studi hanno mostrato che l'allele 4 (E4) è più frequente nelle persone affette da Alzheimer rispetto a quelle sane; la presenza del genotipo E4 determinerebbe un aumento, di circa tre volte, del rischio di sviluppare la malattia. Il genotipo E2 avrebbe



invece un effetto protettivo nei confronti della malattia. La genotipizzazione dell'APOE, tuttavia, fornisce un dato solamente indicativo e non basta da solo a elaborare la diagnosi; infatti, quasi la metà delle persone affette non possiede questo allele, che d'altra parte può essere presente anche in una piccola percentuale di persone sane.

Le mutazioni od i polimorfismi in questi geni causano eccessiva accumulazione cerebrale della proteina  $\beta$ -amiloide e successiva patologia neuronale nelle regioni del cervello importanti per la memoria e la cognizione (corteccia cerebrale e ippocampo). Numerosi esperimenti, volti a riprodurre il disturbo di Alzheimer in modelli animali, si sono concentrati sulle conseguenze della distruzione di neuroni colinergici entro il nucleo basale magnocellulare, il quale è la regione cerebrale del ratto analoga al nucleo basale di Meynert negli umani. Un'informazione circa la cascata patogenetica del disturbo è stata rivelata dallo studio di topi portatori di entrambi i geni mutanti PS e APP, che sviluppano, in tenera età, depositi simili a quelli dell'Alzheimer composti di  $\beta$ -amiloide. Dall'osservazione di alterazioni colinergiche in questi topi, la ricerca ha scoperto un modesto decremento dell'attività corticale dell'enzima colinergico comparato con l'attività, in pari età, di topi selvatici. E' stato concluso che il grave deficit colinergico nell'Alzheimer è causato sia dalla perdita di neuroni colinergici del prosencefalo basale sia localmente dall'amiloidosi cerebrale nella neocorteccia, indicando con amiloidosi, una malattia caratterizzata dalla deposizione in sede extracellulare di materiale proteico a ridotto peso molecolare ed insolubile, detto amiloide.

La diagnosi di Alzheimer, di solito, è fatta o valutando il declino della persona o con test cognitivi. Tuttavia, l'unica diagnosi totalmente sicura può essere fatta solo dopo la morte, quando il tessuto cerebrale può essere esaminato. Di conseguenza, è stato difficile stabilire direttamente la sequenza degli eventi patogeni del disturbo. Sappiamo però che il primo componente da cui origina è la disfunzione del gene che produce l'amiloide. L'amiloide provoca infiammazione attorno alle placche amiloidi e dà il via ad una serie di cambiamenti, i quali portano alla sovrapproduzione di prostaglandine e all'aumento della concentrazione extracellulare di glutammato. L'incremento del livello di glutammato contribuisce, poi, alla morte finale dei neuroni. [6]

### **2.1.1 Caratteristiche macroscopiche**

A livello macroscopico si può osservare nel morbo di Alzheimer un grado variabile di atrofia (riduzione della massa dei tessuti od organi) corticale, simmetrica e diffusa, caratterizzata da ingrandimento dei solchi parietali, più accentuato nei lobi frontali,

temporali e parietali, e con appiattimento delle circonvoluzioni cerebrali. Il modello simmetrico di atrofia corticale predominante che colpisce il lobo mediale temporale e che risparmia le corteccie motoria primaria, sensoriale e visiva è considerato fortemente indicativo per la malattia, sebbene un esame visivo grossolano del cervello affetto da Alzheimer non sia diagnostico. Questa atrofia viene compensata da un ingrossamento delle cavità ventricolari, secondario alla perdita di parenchima. In particolare, negli stadi avanzati della malattia, le strutture del lobo temporale mediale, tra cui l'ippocampo, la corteccia entorinale e l'amigdala si atrofizzano in modo severo, dato il loro coinvolgimento a partire già dalle prime fasi della patologia. Si osserva, inoltre, una diffusa perdita di massa neuronale a livello della corteccia cerebrale, del cervelletto, dei gangli della base, del tronco encefalico e del midollo spinale. In particolare tale depauperamento interessa alcune specifiche regioni dell'encefalo come il nucleo basale di Meynert (substantia innominata), i nuclei del setto e la banda (o benderella) diagonale di Broca. La diminuita concentrazione di acetilcolina che si osserva nei pazienti affetti da morbo di Alzheimer sarebbe dovuta alla perdita neuronale in tali nuclei, responsabili di proiezioni colinergiche a tutta la corteccia.

Altro tratto macroscopico distintivo del disturbo è la presenza di corticali microsanguinamenti petecchiali o anche lobari evidenti emorragie, in particolare nei lobi parietale posteriore e occipitale, che può portare al sospetto di una grave angiopatia amiloide cerebrale, che è una forma di angiopatia nella quale si formano depositi di materiale amiloide, solitamente nella forma della  $\beta$ -amiloide, sulle pareti dei vasi sanguigni del sistema nervoso centrale. L'angiopatia amiloide, essendo causata da accumuli della stessa  $\beta$ -amiloide che è riscontrabile nella malattia di Alzheimer, è spesso correlata con tale patologia.

Solo per certe caratteristiche può esserci concomitanza con il morbo di Parkinson. Infatti nella malattia di Alzheimer, differentemente da ciò che accade nel disturbo parkinsoniano, la substantia nigra ha una colorazione normale ed inoltre il locus coeruleus è affetto già dai primi stadi del disturbo. [5][6]

### **2.1.2 Caratteristiche microscopiche**

A livello microscopico, particolarmente significativo appare il depauperamento sinaptico, che risulta sostanziale nel determinare pesanti conseguenze funzionali poiché, compromettendo la neurotrasmissione, riduce considerevolmente le possibilità di interazione tra i neuroni.

### *Grovigli neurofibrillari*

I grovigli, o ammassi, neurofibrillari si formano con la deposizione di aggregati di proteine TAU prevalentemente nei neuroni della corteccia trans-entorinale e successivamente dell'ippocampo e dell'amigdala. I grovigli neurofibrillari sono composti principalmente dalla forma iperfosforilata delle proteine TAU, le quali sono associate al citoscheletro dei neuroni. TAU appartiene alla famiglia delle proteine dette MAP (microtubule-associated proteins), ovvero proteine associate ai microtubuli. E' coinvolta nella stabilizzazione e nell'accrescimento dei microtubuli all'interno dei neuroni ed è implicata nel trasporto assonale dei componenti subcellulari. Queste proteine presenti nei neuroni formano brevi filamenti che contribuiscono, con i microtubuli, a stabilizzare la struttura della cellula (citoscheletro), ma soprattutto facilitano l'espulsione dalla cellula di proteine potenzialmente tossiche, instradandole verso l'esterno. L'iperfosforilazione riduce l'affinità delle TAU con i microtubuli, causando una perdita di stabilità nel neurone che può portare alla modificazione del metabolismo dell'APP.

Il modello spazio-temporale della progressione dei grovigli è piuttosto stereotipato e prevedibile. La degenerazione neurofibrillare inizia nell'allocorteccia del lobo temporale mediale e si diffonde nell'isocorteccia associata e in maniera moderata nell'area sensoriale primaria, motoria e visiva.

### *Oligomeri di $\beta$ -amiloide*

L'amiloide è una sostanza derivante dalla mutazione di una proteina che, per cause ancora sconosciute, si trasforma da solubile in insolubile. È quindi un disordine del folding (processo di ripiegamento molecolare attraverso il quale le proteine ottengono la loro struttura tridimensionale), ovvero un misfolding (errato ripiegamento della struttura secondaria e quindi terziaria delle proteine) delle proteine che, normalmente solubili, vengono depositate come fibrille insolubili e distruggono la struttura del tessuto, causando la malattia. Gli oligomeri di  $\beta$ -amiloide sono formazioni tossiche responsabili dei danni sinaptici che avvengono nelle prime fasi della malattia, sono considerati i responsabili della formazione delle placche extracellulari e le loro proprietà fibrillogeniche sembrano essere associate alla conversione strutturale da  $\alpha$ -elica a foglietto  $\beta$ . In modelli sperimentali è stato dimostrato che il rilascio trans-sinaptico di oligomeri di  $\beta$ -amiloide ( $A\beta$ ), per esempio dalla corteccia entorinale nello strato del giro dentato, favorisce la neurodegenerazione caratterizzata dalla perdita di sinapsi. Gli

oligomeri insolubili del peptide  $\beta$ -amiloide ( $A\beta$ ) inficiano i processi di plasticità sinaptica, in tal modo contribuendo alla patogenesi del danno nella malattia di Alzheimer. L'indagine sui meccanismi molecolari responsabili di questo effetto è ancora agli inizi, ma sappiamo che gli oligomeri  $A\beta$  insolubili, che rappresentano una fase prefibrillare degli aggregati molecolari formanti le placche della malattia di Alzheimer, sono responsabili delle disfunzioni sinaptiche che causano sintomi prima che il danno neurodegenerativo abbia arrecato lesioni macroscopiche diffuse dell'encefalo. Già a concentrazioni nanomolari questi oligomeri bloccano il potenziamento di lungo termine (LTP, forma di plasticità sinaptica che consiste in un aumento a lungo termine della trasmissione del segnale tra due neuroni, ottenuto stimolandoli in maniera sincrona) nei neuroni dell'ippocampo, causano il ritirarsi delle spine dendritiche dei neuroni piramidali corticali e invalidano la memoria spaziale.

#### *Placche amiloidi*

Le placche di sostanza amiloide sono depositi extracellulari del peptide  $\beta$ -amiloide ( $A\beta$ ), caratterizzate da un nucleo denso circondato da neuriti dalla morfologia alterata; hanno forma irregolare, approssimativamente sferica, e dimensioni molto variabili che vanno da dieci a parecchie centinaia di micrometri. In seguito al rilascio neuronale, i monomeri di  $A\beta$  iniziano a depositarsi nello spazio extracellulare costituendo strutture sovra-ordinate: dimeri, trimeri, oligomeri, protofibrille, fibrille e infine placche amiloidi. Contrariamente a quanto si potrebbe pensare, le placche non sono strutture statiche, ma sono sottoposte a continui processi di rimodellamento. La classificazione morfologica ci consente di discriminare tra placche diffuse, classiche e compatte. Le placche diffuse caratterizzano le prime fasi della patologia e sono descritte come depositi amorfi e immaturi; sono costituite principalmente da un nucleo circondato perimetralmente da cellule gliali coinvolte nei processi di degradazione della placca stessa e nella formazione di neuriti distrofici. Le placche classiche sono costituite quasi esclusivamente da un nucleo condensato di  $A\beta$  fibrillare con una corona di neuriti distrofici, anche in questo caso circondato da cellule gliali. Infine, le placche compatte, rare, sono morfologicamente simili alle placche classiche ma in esse sono assenti le cellule gliali a corona.

Le placche amiloidi sono particolarmente numerose nella sostanza grigia della neocorteccia e dell'ippocampo, ma si osservano anche nei gangli della base, nel talamo e nel cervelletto. La densità delle placche senili, però, non è proporzionale alla gravità della demenza e la loro presenza è riscontrabile anche nel cervello di individui anziani non dementi.

### *Neuroinfiammazione*

Anche l'infiammazione, chiaramente, gioca un ruolo critico nella patogenesi del disturbo di Alzheimer. Neuroni e neuriti danneggiati, depositi di peptide  $\beta$ -amiloide altamente instabile e grovigli neurofibrillari forniscono stimoli per l'infiammazione. La neuroinfiammazione cronica può contribuire agli iniziali stadi della disfunzione cellulare, aumentare la vulnerabilità cellulare, causare decadenza dell'attività di colina acetiltransferasi, consumare acetilcolina e determinare la neuroanatomia della patologia o la comparsa di microglia attivata. L'attivazione della microglia è un evento precoce nella patogenesi della malattia di Alzheimer che appare nelle regioni del cervello che mostrano successivamente il massimo grado di atrofia. L'attivazione microgliale è generalmente considerata un fenomeno deleterio per la cellula, a causa del rilascio di molecole citotossiche che generalmente l'accompagna, quali ad esempio citochine pro-infiammatorie. In realtà, in presenza di un processo neurotossico in atto, l'insieme delle risposte gliali potrebbe esacerbare il danno o, al contrario, esercitare un effetto neuroprotettivo, a seconda dell'equilibrio che si viene a determinare tra le funzioni citoprotettive e gli effetti citotossici legati all'attivazione di questa popolazione cellulare. Questa risposta cellulare non ha, quindi, effetti necessariamente citotossici ed entro certi limiti potrebbe determinare effetti neuroprotettivi, come ad esempio attraverso il rilascio di citochine anti-infiammatorie. [5][6]

## **2.2 PARKINSON**

La malattia di Parkinson è una patologia neurodegenerativa cronica e progressiva del sistema nervoso centrale, tipicamente caratterizzata dalla presenza di sintomi motori cardinali quali bradicinesia, rigidità e tremore, ai quali si associa instabilità posturale. Il coinvolgimento prevalentemente motorio della malattia ne determina il suo usuale inquadramento tra i disordini del movimento. La malattia consegue principalmente alla massiva degenerazione (oltre il 60% all'esordio dei sintomi motori) dei neuroni della pars compacta della substantia nigra. La caratteristica distintiva neuropatologica è rappresentata dall'accumulo, soprattutto a livello della substantia nigra stessa, di inclusioni eosinofile filamentose intracitoplasmatiche denominate corpi di Lewy, costituite principalmente da aggregati di una proteina, la  $\alpha$ -sinucleina, in forma alterata insolubile. La deposizione di tali aggregati è stata rilevata a livello di corpo cellulare e neuriti, non solo a livello del tronco encefalico, ma nella corteccia e, perifericamente, nel sistema nervoso enterico. È discusso se il riscontro di tale alterazione istologica

rappresenti in sé la patologia primaria, o sia solo un indicatore del processo di neurodegenerazione. La eziopatogenesi della malattia di Parkinson è attualmente sconosciuta, ma considerevoli prove ne individuano una origine multifattoriale, che coinvolge fattori genetici e ambientali. La diagnosi di Parkinson è eminentemente clinica e, allo stato attuale, basata sull'identificazione, durante un approfondito esame neurologico e dopo una accurata anamnesi, di segni e sintomi caratteristici della patologia, correlati al deficit dopaminergico conseguente alla degenerazione nigrostriatale, e sull'esclusione di eventuali sintomi atipici. La malattia di Parkinson è caratterizzata da una progressione relativamente lenta e da una evidente risposta alla terapia farmacologica dopaminergica, che può tuttavia perdere di efficacia durante il corso naturale della malattia. A dispetto dell'enfasi posta sulla sintomatologia motoria, è apparso evidente negli ultimi anni come sintomi non motori e non dopaminergici siano presenti inevitabilmente nella progressione della patologia e talvolta anche nella fase che precede l'esordio del disturbo motorio e quindi la diagnosi clinica. I sintomi non motori possono divenire rilevanti nelle fasi più avanzate, assumendo un ruolo determinante sulla disabilità e sulla qualità della vita, anche in considerazione della scarsa responsività alla terapia con L-dopa. Appare quindi necessario rileggere la tradizionale visione della malattia di Parkinson come disordine esclusivo del movimento e considerarla una sindrome complessa, di cui il quadro di deterioramento motorio costituisce solo la parte emersa di un iceberg. I substrati neuroanatomici e neuropatologici della maggior parte dei sintomi non motori sono sconosciuti e, considerata la varietà di questi, la questione è aperta ad ampie speculazioni fisiopatologiche. È stato suggerito che sintomi quali il deficit olfattivo, i disordini del sonno (REM Sleep Behaviour Disorder – RBD), la depressione e la stipsi possano essere presenti anche prima dei disturbi motori. Un ampio corredo di sintomi non motori sono stati inoltre descritti nel corso naturale della malattia, quali disordini neuropsichiatrici e cognitivi (apatia, depressione e ansia, deficit attentivo, demenza, allucinazioni e psicosi, comportamenti ripetitivi e ossessivi, disturbi del controllo degli impulsi) e sintomi disautonomici (disturbi vescicali, della salivazione, ipotensione ortostatica, xerostomia, sintomi gastrointestinali, dolore e parestesie, fatica, perdita di peso). La malattia di Parkinson rappresenta la forma più frequente di parkinsonismo ed è comunemente definita idiopatica. Diverse altre sindromi ne condividono i sintomi motori, rendendo difficoltosa la diagnosi differenziale, soprattutto all'esordio. La classificazione dei parkinsonismi include altre sindromi degenerative cosiddette atipiche ("Parkinson plus") per la presenza di sintomi e segni aggiuntivi, che

condividono però con la malattia di Parkinson idiopatica la degenerazione del circuito nigrostriatale. Una accurata diagnosi differenziale tra queste sindromi diviene dunque rilevante ai fini della gestione complessiva del paziente e di una sua più corretta informazione. Allo scopo di standardizzare e sistematizzare la diagnosi di malattia di Parkinson, quindi, sono stati elaborati, in ambiti di ricerca, specifici criteri diagnostici. L'applicazione di tali criteri può essere utile a uniformare il processo diagnostico, in particolare nelle prime fasi della malattia, quando la diagnosi è più incerta ed è necessario prendere decisioni rilevanti riguardo il trattamento e la gestione dei sintomi. I criteri diagnostici di ricerca sono soggetti allo stesso tipo di limitazioni della diagnosi clinica e allo stesso modo includono la verifica di segni e sintomi che richiedono un'osservazione del paziente nel tempo, anche riguardo alla responsività alla terapia dopaminergica. Appare necessaria, alla luce di tali indicazioni, una costante rivisitazione della diagnosi, che appare tanto più accurata quanto più il quadro sintomatologico si evolve nel corso della malattia divenendo più chiaro e consentendo una discriminazione tra le diverse sindromi. Nel caso della malattia di Parkinson, a tutt'oggi, la definizione neuropatologica è l'unica possibilità di definizione diagnostica della malattia e quindi l'unico standard di riferimento adeguato (gold standard) per la valutazione dell'accuratezza di qualsiasi altro criterio clinico o strumento diagnostico utilizzato. L'esame istopatologico, che, non prevedendo una biopsia in vita, si riserva a una osservazione post-mortem, permette di rilevare le alterazioni strutturali tipiche della malattia, essenzialmente relative alla distribuzione dei corpi di Lewy, secondo criteri neuropatologici riconosciuti. [7]

La progressiva evoluzione di tecniche diagnostiche di imaging strutturale e funzionale, in grado di studiare alterazioni qualitative e quantitative di aree di interesse a livello cerebrale, ha sollevato un'ampia discussione sull'utilità e validità di tali tecniche nell'orientamento diagnostico e soprattutto nella diagnosi differenziale della malattia di Parkinson. Tra le metodiche di imaging strutturale (TC, RM, TCS), la Tomografia Computerizzata e soprattutto la Risonanza Magnetica convenzionale sono utilizzate, nella pratica clinica, per rilevare, con metodiche ispettive visive, alterazioni strutturali cerebrali legate a processi vascolari, infiammatori, infettivi, neoplastici e valutare le caratteristiche morfologiche e volumetriche delle diverse aree cerebrali. La RM dell'encefalo consente con maggiore accuratezza di rilevare anche la riduzione di volume di specifiche regioni corticali e sottocorticali.

In una percentuale estremamente esigua di casi è possibile formulare una diagnosi conclusiva sulla base di specifiche mutazioni genetiche che si sono svelate associate

all'insorgenza di malattia di Parkinson. Nell'ultimo decennio, infatti, è radicalmente cambiata la nostra comprensione delle basi genetiche del Parkinson grazie alla individuazione di rare forme monogeniche di malattia, a trasmissione autosomico-dominante o recessiva, sostenute da mutazioni della codificazione di specifiche proteine. [8][10]

### **2.2.1 Caratteristiche macroscopiche**

Il morbo di Parkinson può presentarsi con sintomi e segni diversi. Le caratteristiche macroscopiche principali sono il tremore, la bradicinesia (lentezza dei movimenti), la rigidità e l'instabilità posturale. Nel 50-80% dei pazienti la malattia esordisce in modo insidioso, con un tremore a riposo di una mano, che diminuisce durante il movimento e scompare con il sonno e aumenta invece con le emozioni e la fatica. Successivamente il tremore colpisce maggiormente le mani, le braccia e le gambe e possono anche essere interessate la mandibola, la lingua, la fronte e le palpebre. La voce diventa ipofonica e spesso si accompagna a una caratteristica disartria (disturbo del linguaggio) monotona e balbettante. In un'ampia percentuale (circa 50%) dei pazienti può manifestarsi demenza, caratterizzata principalmente da un deficit delle funzioni cognitive. Progressivamente nelle fasi tardive si associano anche deficit di memoria e disturbi comportamentali. Infine va ricordato come alla malattia di Parkinson spesso si associno forme depressive. Il Parkinson viene definito da numerosi cambiamenti patologici a livello del cervello e degli organi periferici, nonché da tutta una serie di anomalie biochimiche cerebrali conseguenti alla modifica patologica primaria o risultanti da modifiche adattive secondarie in risposta alla perdita di dopamina. Ciò comporta l'alterazione di vari neurotrasmettitori oltre alla dopamina, che possono a loro volta contribuire all'insorgenza dei sintomi motori (lentezza, rigidità, tremore e anomalie posturali) e non motori (disturbi del sonno, alterazioni delle sensazioni, declino cognitivo, depressione e alterazioni autonomistiche) del Parkinson. Uscendo dall'arena dopaminergica, il quadro patologico del Parkinson appare chiaro nella sua forza e complessità. Negli altri sistemi monoaminergici si verifica una perdita di neuroni che interessa il locus coeruleus e i nuclei del raphe, con conseguente diminuzione dei livelli di noradrenalina e serotonina in varie aree del cervello. In conseguenza alla perdita neuronale di neuroni dopaminergici e noradrenergici, nelle sezioni del tronco celebrale, si rivela la perdita della normale pigmentazione, rispettivamente, della substantia nigra e del locus coeruleus.



La substantia nigra è uno dei quattro nuclei che compongono i gangli della base e nel Parkinson è quello principalmente alterato. La perdita dei corpi cellulari dei neuroni dopaminergici è associata al contenuto di dopamina che in cervelli post mortem di pazienti affetti dalla malattia di Parkinson è estremamente basso (meno del 10% rispetto ai valori normali); i segni clinici motori, infatti, compaiono quando c'è una riduzione di dopamina del 60-80% nello striato e una perdita di almeno il 50% delle cellule nella substantia nigra. In essenza, la perdita di dopamina nel Parkinson porta a cambiamenti nell'attività elettrica dei neuroni sottostanti al percorso dopaminergico danneggiato, modificando pertanto il rilascio dei neurotrasmettitori che propagano i segnali alle cellule neuronali successive.

Il locus coeruleus è il principale nucleo noradrenergico del sistema nervoso centrale ed il principale nucleo di sintesi di noradrenalina. Attraverso esperimenti è stato messo in evidenza il ruolo compensatorio e neuroprotettivo del sistema noradrenergico sul sistema dopaminergico. In effetti, la noradrenalina può legarsi ai recettori dopaminergici attivandoli, ha funzioni trofiche e determina in modelli animali la sopravvivenza dei neuroni dopaminergici; aumenta inoltre la concentrazione di molecole anti-infiammatorie ed inibisce la formazione di sostanze infiammatorie e sostanze responsabili di stress ossidativo, associate sia a Parkinson che ad Alzheimer. [9][10]

### **2.2.2 Caratteristiche microscopiche**

Dal punto di vista microscopico il morbo di Parkinson è caratterizzato dalla presenza del suo marchio distintivo: il corpo di Lewy. A livello ultrastrutturale, i corpi di Lewy, composti da materiale granulare denso e sottili filamenti, sono dei piccoli ammassi proteici dalla forma tondeggianti. La più importante e abbondante proteina che costituisce i corpi di Lewy è la cosiddetta  $\alpha$ -sinucleina, ma la presenza di quest'ultima all'interno dei corpi rappresenta una localizzazione citologica aberrante, poiché è normalmente una componente delle terminazioni nervose presinaptiche, coinvolta nel rilascio di importanti neurotrasmettitori come dopamina e acetilcolina, che si accumula nelle cellule nervose solo quando affette da Parkinson.

I corpi di Lewy non possono, tuttavia, essere la causa diretta della morte delle cellule. Sono stati identificati altri meccanismi che possono portare alla morte cellulare; questi includono la disfunzione dei lisosomi (compartimenti cellulari dotati di membrana cellulare, deputati alla degradazione di svariate sostanze tramite l'azione di acidità ed enzimi proteolitici) e proteosomi (complessi proteici atti a degradare i peptidi) e una

ridotta attività mitocondriale. Inoltre, l'accumulo di ferro nella substantia nigra si osserva tipicamente in combinazione con le inclusioni proteiche.

Analizzando accuratamente i cervelli di pazienti deceduti, alla ricerca di possibili indizi di una migrazione di effetti patogeni tra il tratto gastrointestinale e il cervello, lungo i plessi nervosi, il Prof. Dr. Heiko Braak ha messo a punto la cosiddetta «stadiazione di Braak». Secondo questo schema, composto da sei stadi, che rappresenta una classificazione della malattia sulla base della distribuzione di  $\alpha$ -sinucleina, i corpi di Lewy prima appaiono nel bulbo olfattivo, nel midollo allungato e nel tegmento pontino, con i pazienti che risultano asintomatici. Col progredire della malattia, i corpi di Lewy si sviluppano nella substantia nigra, nelle aree del mesencefalo e prosencefalo basale e, nell'ultima fase, nella neocorteccia. Queste zone del cervello sono le aree principali della degenerazione neuronale nella malattia di Parkinson. Questo schema di stadiazione, tuttavia, non è basato sulla distribuzione della perdita neuronale, ma sulla distribuzione dei depositi di  $\alpha$ -sinucleina anormali e non è stato rigorosamente studiato come, invece, possa relazionarsi alla progressione di perdita neuronale. Così, questa stadiazione proposta deve essere interpretata comunque con cautela. [9][10]

### 3 LE INTERFACCE NEURALI NANOSTRUTTURATE A BASE DI CARBONIO

I nanomateriali sono entità chimiche delle dimensioni di decine di nm, hanno forma ben definita (ad esempio sfera, tubo o stella), sono generalmente facili da modificare chimicamente applicando tecniche di funzionalizzazione delle superfici e sono chimicamente stabili. Le loro dimensioni nanoscopiche consentono lo sviluppo di dispositivi che possono interagire con le cellule sulla nanoscala e ad esempio penetrare all'interno delle cellule con relativa facilità. Questo meccanismo potrebbe essere particolarmente utile per la somministrazione mirata di farmaci. A tal proposito, negli ultimi anni sono stati compiuti notevoli progressi nell'applicazione delle nanotecnologie alla biomedicina, in particolare per approcci diagnostici e terapeutici. Tra le molteplici patologie cui le nanotecnologie possono essere applicate, particolare interesse hanno destato nuove prospettive per il trattamento di malattie neurologiche. La possibilità, infatti, di utilizzare nanomateriali quali, ad esempio, nanoparticelle come veicoli di molecole farmacologicamente attive, che favoriscano il superamento della barriera emato-encefalica o per somministrazioni intracerebrali, e/o materiali nanostrutturati come matrici e/o interfacce che promuovano il processo neurorigenerativo può fornire terapie alternative rispetto a quelle convenzionali (Freitas, 2005).

In questo ambito di studio si intendono interfacce neurali nanostrutturate materiali nanostrutturati che siano in grado di interagire propriamente con le cellule del sistema nervoso in modo da supportare, modificare, modulare o indurre la struttura e/o la funzione delle cellule cerebrali o nervose.

L'elevato potenziale nell'ambito dell'impiego di nanomateriali e nanotecnologie per generare interfacce neurali nella medicina neuro rigenerativa è dimostrato dall'elevata biocompatibilità di alcuni di questi materiali con le cellule neuronali *in vitro*, che li rende buoni candidati per lo sviluppo di sistemi diagnostici innovativi e anche agenti terapeutici per le patologie del cervello (Mattson et al., 2000; Webster et al., 2004; Li et al., 2011; Hopper et al., 2014). Inoltre, le peculiarità chimico fisiche di alcuni di questi materiali, come l'elevata resistenza meccanica e la conducibilità elettrica, combinate con le loro dimensioni molto piccole che forniscono un intimo contatto con le cellule, consentono un'eventuale applicazione sia come supporto per la neurorigenerazione (Roman et al., 2011), sia come materiali di interfaccia per dispositivi efficaci ed efficienti in una precisa stimolazione dell'attività funzionale neuronale. Da tempo si studiano sistemi di interfaccia, o protesi neuronali, che permettano di ristabilire efficacemente la struttura e la funzionalità di cellule neuronali. Il materiale perfetto per costruire le interfacce neurali

non esiste, ma i materiali a base di carbonio hanno dimostrato di avere delle grandi potenzialità.

L'interfaccia materiale/cellula neurale è stata spesso problematica, infatti, quando queste sono sviluppate per registrazioni elettrofisiologiche, gli elettrodi non solo devono essere altamente sensibili agli impulsi elettrici (ovvero offrire un elevato rapporto segnale/rumore), ma devono essere stabili nel tempo, senza alterare la funzionalità del tessuto analizzato. In questo contesto, è stato riportato che gli elettrodi utilizzati come interfaccia neurale basati su tungsteno o silicio soffrono, nel tempo, di perdita parziale o totale del segnale. E' fondamentale notare che questo evento è stato dimostrato in vivo essere causato dalla formazione di tessuti cicatriziali dall'interfaccia tra elettrodo e tessuto cerebrale. Questa reazione è dovuta ad un processo di natura infiammatoria detto gliosi. La gliosi è una reazione cellulare caratterizzata dal ripristino dello stato proliferativo, dal rilascio di fattori trofici e da una ipertrofia delle cellule non neuronali del cervello dette cellule gliali. E' stato dimostrato chiaramente che la risposta delle cellule gliali dette astrociti porta nel tempo alla formazione di una capsula di tessuto cicatriziale intorno all'impianto che, di conseguenza, ne compromette il suo funzionamento. In quest'ottica nell'ambito dello sviluppo di interfacce neurali sempre più attenzione è rivolta allo studio e all'interazione di nano materiali con cellule gliali.

I nanomateriali a base di carbonio presentano importanti peculiarità riguardo struttura, morfologia, proprietà fisiche e reattività chimica. La loro composizione atomica, cioè il carbonio, ha un potenziale tossico intrinseco molto più basso rispetto alle specie atomiche utilizzate nella produzione di altri tipi di nanoparticelle (solitamente metalli di transizione o silice) (Sohaebuddin et al., 2010; Sharifi et al., 2012). Inoltre, le loro proprietà e forme fisiche peculiari mostrano comportamenti di interazione diversi all'interno delle cellule e dei tessuti e le loro proprietà possono essere modificate mediante funzionalizzazioni (covalente e non covalente) che consentono di modificare la carica superficiale (Bartelmess et al., 2015) e di introdurre, sulla superficie, molecole luminescenti. La sintesi dei nanomateriali a partire dal carbonio grezzo si basa solitamente su fonti molto economiche e coinvolge passi sintetici, rendendo economicamente conveniente la loro produzione su larga scala (De Volder et al., 2013).

Nanotubi di carbonio (CNT), nanodiamanti, fullereni, grafene e derivati sono emersi come promettenti classi di nanomateriali a base di carbonio per applicazioni diagnostiche e terapeutiche. Tuttavia, sulla base di risultati ottenuti da una gran mole di studi, alcuni nanomateriali hanno dato valutazioni più incoraggianti rispetto ad altri. Il possibile

utilizzo di nanodiamanti (nanodiamonds, ND) nel sistema nervoso centrale (SNC), nonostante i buoni risultati ottenuti sia in vitro che in vivo per applicazioni biologiche, è ancora molto lontano. Ad oggi troppi pochi studi suggeriscono l'eventuale utilizzo di ND per applicazioni terapeutiche nel SNC e sono necessarie più valutazioni riguardo la loro possibile applicazione in futuro. Negli ultimi trent'anni i CNT sono stati considerati tra i nanomateriali all'avanguardia per applicazioni biomediche. Tuttavia, i risultati degli studi in vivo hanno evidenziato dati discordanti che individuano la necessità di approfondimenti in specifici modelli animali per poter considerare realmente questi materiali quali candidati per potenziali applicazioni nella terapia delle malattie neurodegenerative cerebrali.

Negli ultimi anni la comunità scientifica ha mostrato crescente interesse anche per il grafene ed i suoi derivati (Zhang Y. et al., 2012; Zhang H. et al., 2013; Yang et al., 2013) che vengono impiegati prevalentemente per scopi biomedici e che mostrano risultati promettenti nelle stesse applicazioni previste per i nanotubi di carbonio, cioè rilascio di farmaci e substrati di differenziazione delle cellule staminali (Peng et al., 2010; Huang, 2011; Gollavelli e Ling, 2012; Chung et al., 2013; Goenka et al., 2014). Le interfacce neurali a base di grafene sono state utilizzate come elettrodi per registrazioni elettrocorticografiche.

Qui di seguito saranno riportati nel dettaglio e rivisti criticamente i risultati più significativi riguardanti lo sviluppo e l'applicazione di interfacce neurali a base di CNT e grafene evidenziandone i profili di tossicità, biocompatibilità e le criticità specifiche.

### **3.1 NANOTUBI DI CARBONIO**

I nanotubi di carbonio sono i nanomateriali a base di carbonio più studiati per le applicazioni biomediche (Bianco et al., 2005; Liu Z. et al., 2009; Gong et al., 2013; Lamberti et al., 2015); presentano caratteristiche interessanti che li rendono particolarmente indicati per la costruzione di speciali dispositivi ibridi – composti cioè da tessuto biologico e materiale sintetico – progettati per ristabilire i collegamenti, perduti a causa di lesioni o traumi, tra le cellule nervose [3]. Più in particolare, i ricercatori hanno investigato quali effetti abbia sui neuroni l'interazione con i nanotubi di carbonio. Gli scienziati hanno dimostrato che questi nanomateriali possono regolare la formazione delle sinapsi, strutture specializzate attraverso cui comunicano le cellule nervose, e modulare meccanismi biologici, come la maturazione dei neuroni, attraverso un processo che si

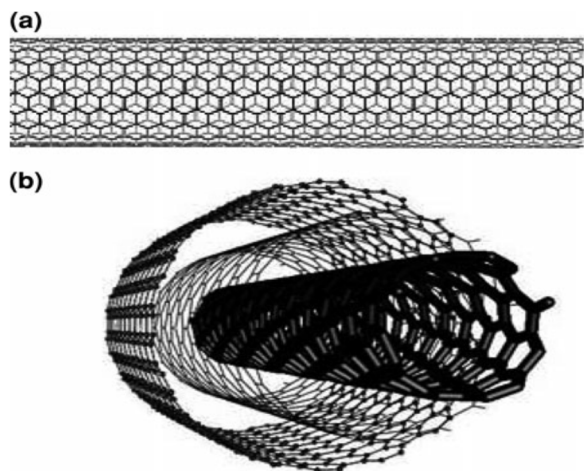
autoregola. Questo risultato, che dimostra come l'integrazione tra cellule nervose e queste strutture sintetiche sia stabile ed efficiente, evidenzia le grandi potenzialità dei nanotubi di carbonio come innovativi materiali utili a favorire la rigenerazione neuronale o per creare una sorta di ponte artificiale tra gruppi di neuroni la cui connessione è stata interrotta. Questi nanomateriali sono utilizzati sia come substrato, funzionando così come una sorta di impalcatura di sostegno per le cellule nervose, sia come mezzo per la trasmissione di quei segnali che fanno comunicare tra loro le cellule nervose. C'è la necessità, però, di indagare ancora su molti aspetti. Tra questi, l'effetto del semplice contatto tra queste strutture nanometriche e le cellule nervose. Studiare l'interazione tra questi due elementi è cruciale, perché potrebbe portare anche a degli effetti indesiderati, che devono essere assolutamente esclusi. Se, per esempio, il solo contatto provocasse un aumento vertiginoso del numero di sinapsi, questi materiali sarebbero sostanzialmente inutilizzabili, e questo è esattamente ciò che è stato sottoposto ad accurata indagine all'interno di uno studio che ha utilizzato i nanotubi di carbonio puri. I risultati della ricerca sono stati estremamente incoraggianti: anzitutto, i nanotubi hanno dimostrato di non interferire con la composizione dei lipidi, in particolare di colesterolo, che compongono la membrana cellulare nei neuroni, i quali hanno un ruolo molto importante nella trasmissione di segnali attraverso le sinapsi; inoltre, le cellule nervose che crescono sul substrato di nanotubi si sviluppano e maturano molto velocemente, raggiungendo poi una situazione di omeostasi biologica. I nanotubi favoriscono la maturazione dei neuroni e la formazione di nuove sinapsi. Questa crescita, però, non è indiscriminata e illimitata perché, dopo poche settimane, si raggiunge un equilibrio fisiologico. Aver stabilito che questa interazione è stabile ed efficace è un aspetto di basilare importanza. I nanotubi di carbonio presentano un'ottima riuscita in termini di durata, adattabilità e compatibilità meccanica con il tessuto; la loro interazione con il materiale biologico è efficiente e sulla base di queste evidenze si stanno già studiando applicazioni in vivo con risultati preliminari molto promettenti (tratto da un'intervista alla prof.ssa Laura Ballerini (SISSA) ed al prof. Maurizio Prato (UniTS-CIC BiomaGUNE)). [3]

La struttura centrale dei nanotubi di carbonio (carbon nanotube, CNT) è esclusivamente composta da atomi di carbonio e mostra eccezionali proprietà, come elevata conducibilità elettrica e termica ed un'elevata resistenza. Sono stati analizzati due principali tipi di nanotubi di carbonio in biomedicina: nanotubo a singola parete (Single-Walled NanoTube, SWNT), costituito da un singolo strato di anelli benzenici di carbonio arrotolato in una struttura tubulare, e nanotubo a parete multipla (Multi-Walled

NanoTube, MWNT), costituito da strati concentrici di fogli di carbonio. Il loro diametro varia da 0,2 a 4 nm per i SWNT e da 1,4 a 100 nm per i MWNT, mentre la loro lunghezza può raggiungere pochi micrometri in entrambi i tipi di nanotubi. Anche se i nanotubi di carbonio così prodotti (nanotubi di carbonio puri) sono insolubili in molti solventi acquosi, lo sviluppo di funzionalizzazioni chimiche della superficie dei nanotubi ha portato ad un notevole miglioramento della dispersività acquosa che ha consentito la loro applicazione in ambienti fisiologici che includono il sistema nervoso centrale. Due principali strategie sono state descritte per consentire l'applicazione di CNT sotto certe condizioni fisiologiche, ossia funzionalizzazioni covalente e non-covalente. La funzionalizzazione non-covalente coinvolge il rivestimento dei nanotubi con macromolecole idrofile e l'introduzione di forze repulsive. I nanotubi con questa funzionalizzazione sono stati realizzati rivestendo o avvolgendo il CNT con surfactanti, polimeri, peptidi o singoli filamenti di DNA. Questo approccio consente la conservazione di strutture aromatiche dei CNT senza effetti deleteri sulle loro caratteristiche elettriche. La funzionalizzazione covalente è l'alternativa strategia di modificazione chimica delle superfici dei CNT tramite reazioni organiche. Gruppi funzionali carichi possono essere fissati sulla parete laterale dei CNT creando forze repulsive elettrostatiche fra i singoli tubi. Due principali approcci sono stati descritti per ottenere la funzionalizzazione covalente dei CNT, ossia: (1) coniugazione covalente della parete laterale di gruppi funzionali e (2) ossidazione dei CNT e ulteriore funzionalizzazione. La funzionalizzazione covalente della parete laterale di gruppi funzionali organici può essere raggiunta attraverso una varietà di reazioni chimiche, in particolare attraverso la ciclo addizione 1,3-dipolare di ilidi azometiniche. In questa strategia, gruppi amminici funzionali sono uniti ad estremità e parete laterale dei CNT, ottenendo così una elevata solubilità del materiale in solvente acquoso. Alternativamente, l'ossidazione porta a nanotubi purificati e più corti ed a seguito del processo ossidativo si introducono numerosi gruppi carbossilici, soprattutto alle estremità, ma anche sulle pareti ove presente un difetto o una curvatura. Successivamente all'introduzione di questi gruppi, è possibile formare legami ammidici o esteri al termine del trattamento dei CNT.

L'applicazione delle tecniche che hanno permesso di ottenere una migliore dispersività dei nanotubi ha ampliato notevolmente gli orizzonti delle loro applicazioni biologiche. Gli sviluppi nella nanomedicina prevedono di avere un maggior impatto nella ricerca neurologica, contribuendo alla nostra ulteriore conoscenza del sistema nervoso centrale e lo sviluppo di nuove strategie terapeutiche per un intervento neurologico. L'uso di

nanostrutture a base di carbonio, come i CNT, è uno dei più attraenti approcci per le applicazioni neurologiche. Durante l'ultimo decennio, i CNT hanno messo in evidenza, oltre alla loro capacità di conduttività elettrica e alle forti proprietà meccaniche, la loro similarità morfologica con i neuriti. Le caratteristiche strutturali e dimensionali dei CNT sono simili a molti elementi del macchinario neuronale (canali ionici, proteine di segnale ed elementi del citoscheletro neuronale). Queste caratteristiche possono costituire un vantaggio aggiuntivo attraverso il miglioramento delle interazioni a livello molecolare e conseguentemente migliore controllo sull'attività fisiologica e sull'elaborazione di informazione neuronale. [13] [14]



**Figura 1.** Rappresentazione dei due diversi tipi di nanotubi di carbonio: (a) nanotubo a singola parete (Single Walled Carbon Nanotubes, SWCNT), (b) nanotubo a parete multipla (Multi Walled Carbon Nanotubes, MWCNT) [11].

### 3.1.1 Nanotubi di carbonio e neurorigenerazione

La rigenerazione dei neuroni dopo un danno cerebrale è considerata un compito assai arduo. Negli ultimi due decenni, nonostante il gran numero di studi che sono stati condotti e le scoperte che sono state fatte, i trattamenti sono ancora limitati e sono necessarie più ricerche per esplorare il meccanismo alla base dei disturbi neurologici. La perdita ed il danneggiamento di cellule del cervello e del midollo osseo è associata ad un gran numero di patologie neurologiche, come Alzheimer e Parkinson. Due sono le principali strategie per promuovere l'autoriparazione della rete neuronale danneggiata: ricrescita di assoni e/o riorganizzazione di circuiti neuronali. Affinché la rigenerazione abbia successo i neuroni devono anzitutto essere protetti, e per far ciò è necessario favorire la formazione di un ambiente adatto per la ricrescita, e, dopo la riconnessione, agevolare la plasticità sinaptica, ovvero la capacità del cervello di riorganizzarsi e ristrutturarsi continuamente in funzione delle mutevoli condizioni.



Grazie alle loro proprietà elettriche e meccaniche, insieme alla loro biocompatibilità neuronale, i CNT sono considerati possibili candidati per la riparazione di tessuti neuronali. Già da tempo, diversi laboratori studiano l'interfaccia fra CNT e neuroni, giungendo alla quasi certezza che queste interazioni siano fortemente modulate dalla purezza e dall'organizzazione tridimensionale dei substrati a base di nanotubi di carbonio. Un gran numero di 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 integrarsi con i neuroni e migliorare le funzioni neuronali, così come promuovere o facilitare la ricostituzione delle connessioni fra i neuroni. In questo contesto, si inserisce l'importanza delle cellule staminali (neural stem cell, NSC), le quali hanno la capacità di differenziarsi in diversi altri tipi di cellule del corpo, inclusi i neuroni, e di accrescere il recupero del tessuto nervoso. La sfida è di valutare l'efficienza del rilascio e la differenziazione in tipi di cellule neuronali, le quali contribuiranno alla rigenerazione del tessuto. L'efficacia dei nanotubi di carbonio nel rilasciare cellule staminali entro siti del sistema nervoso centrale danneggiati, e promuovere la loro differenziazione entro i neuroni, costituisce un'essenziale requisito per il successo della rigenerazione di tessuti neuronali danneggiati. Diversi studi hanno già dimostrato la capacità dei substrati nel mediare la differenziazione e la stimolazione elettrica di cellule staminali e la biocompatibilità tra queste ultime ed i substrati a base di carbonio. Diversi tentativi sono stati fatti anche per dirigere la crescita delle cellule staminali utilizzando substrati modificati con CNT; un esempio, ne è la differenziazione delle cellule staminali neuronali del topo su SWNT all'interno di un composito. Di fatto, una classe di biomateriali ideali per una vasta gamma di applicazioni in medicina rigenerativa è proprio il complesso composito polimerico-nanotubo di carbonio, perché è un materiale ibrido che combina numerose proprietà elettriche, meccaniche e chimiche. Come in questo caso, l'inclusione del SWNT nel composito conferisce flessibilità strutturale e stabilità chimica, senza alcun effetto negativo sulla differenziazione delle cellule staminali neuronali. [20]

L'abilità di substrati di MWNT favorisce la sopravvivenza a lungo termine di neuroni ippocampali dissociati in coltura. Questo è stato il primo lavoro a fare luce sull'importanza della funzionalizzazione dei nanotubi di carbonio nella modulazione del comportamento neuronale. Infatti, attraverso la modificazione non-covalente dei MWNT con 4-idrossinonenale (un prodotto perossidante lipidico che in ambiente biologico controlla la crescita neuritica) è stato possibile distinguere il loro effetto rispetto ad i

nanotubi a parete multipla non-funzionalizzati (puri), dimostrando che quelli funzionalizzati sono più efficaci nell'indurre la costruzione di elaborate arborizzazioni neuritiche (mostrando maggior ramificazione e lunghezza). La modificazione chimica della superficie dei nanotubi di carbonio influenza i modelli di crescita di neuriti e le caratteristiche come lunghezza, ramificazione e numero di coni di accrescimento, e varie ricerche hanno dimostrato come neuroni ippocampali del ratto possono crescere efficacemente su substrati di MWNT (Mattson e colleghi, 2000). È emersa, grazie a studi approfonditi, la possibilità di utilizzare nanotubi a parete multipla, funzionalizzati con gruppi di pirrolidone sia sulle estremità che sulla parete laterale per migliorarne la solubilità, come potenziali dispositivi per migliorare il trasferimento del segnale neurale. In questo caso, i nanotubi funzionalizzati sono stati sciolti in dimetilformammide e depositati su una superficie vitrea. Dopo evaporazione del solvente, i MWNT sono stati defunzionalizzati ponendo il vetrino in un forno a 350 ° C sotto atmosfera di azoto per 15 minuti; con questa procedura è stato così ottenuto uno strato stabile di nanotubi non-funzionalizzati puri. Successivamente, sono stati inoculati i neuroni dell'ippocampo, crescendo così sulla superficie del vetrino.

Al fine di aumentare la conoscenza riguardo alle interazioni presenti in sistemi ibridi formati da CNT e neuroni, è stata caratterizzata l'attività di reti neuronali cresciute su supporti di CNT attraverso la tecnica del patch clamp, riportando che circuiti neuronali cresciuti *in vitro* su questi substrati presentano un'aumentata attività sinaptica spontanea. Si è quindi ipotizzato che tale aumentata attività spontanea potesse originare da una modificazione del modo in cui i singoli neuroni generano il segnale elettrico. A tal fine, si sono monitorate variazioni nelle proprietà elettrogeniche di singoli neuroni, utilizzando un protocollo standard per caratterizzare l'integrazione di potenziali d'azione retropropaganti nei dendriti (Larkum et al., 1999). In configurazione current clamp, attraverso brevi iniezioni di corrente nel soma della cellula, sono state indotte una serie di regolari potenziali d'azione (PA) a varie frequenze nel neurone sotto registrazione, ed è stata studiata la presenza di un'addizionale depolarizzazione somatica dopo l'ultimo PA del treno. Si è osservato che neuroni di controllo mostrano nella maggioranza dei casi una iperpolarizzazione (AHP) del potenziale di membrana dopo l'ultimo potenziale d'azione del treno, mentre la depolarizzazione (ADP) è presente solo in una piccola quota di casi. In presenza di CNT, invece, l'ADP risulta essere l'evento predominante. Più esplicitamente, i CNT sono capaci di migliorare le proprietà elettrogeniche neuronali.

Gli effetti delle strutture di MWNT sull'eccitabilità dei singoli neuroni sono di pari passo con un forte effetto nell'attività della rete sinaptica. Sui neuroni dissociati dell'ippocampo, i nanotubi di carbonio sono capaci di aumentare la frequenza dell'attività sinaptica spontanea, misurata come corrente post-sinaptica. Una spiegazione del fenomeno osservato è stato proposto da un altro studio recente, che riporta l'abilità delle strutture dei nanotubi di carbonio nell'aumentare la formazione di sinapsi funzionali. Nelle reti ippocampali (in coltura), infatti, il numero di connessioni sinaptiche è marcatamente incrementata quando i neuroni vengono interfacciati ad i MWNT; questi ultimi sono, inoltre, capaci anche di influenzare le dinamiche a breve termine della trasmissione sinaptica neuronale: quando attivate ripetutamente, le sinapsi sviluppate su nanotubi non subiscono depressione sinaptica (= diminuzione della forza sinaptica) a breve termine, rafforzando così la loro abilità nel trasferire l'informazione.

Le strutture progettate per l'ingegneria dei tessuti neurali sono previste per favorire e / o imitare le proprietà elettriche di nervi ed, eventualmente, essere in grado di stimolare elettricamente i neuroni; la conduttività è estremamente importante per l'effetto di ogni struttura di CNT sulla crescita neuronale, e potrebbe finalmente essere messa a punto per poterla massimizzare. Film di SWNT legati covalentemente a catene di polietilenglicole (PEG) con diversi spessori, ottenendo film con diversa conducibilità (ma rugosità simile), ha evidenziato che questi materiali conduttivi influenzano differenzialmente la crescita delle cellule neuronali quando usati come substrati di coltura (Malarkey e collaboratori); in particolare, solo certi substrati di CNT con determinate conducibilità hanno promosso la crescita di più neuriti, senza influenzare il numero totale dei processi, ed inoltre, anche l'area media del corpo cellulare dei neuroni varia a seconda della conduttività dei CNT. Queste osservazioni dovrebbero dimostrare che gli effetti positivi dei CNT sulla morfologia dei neuroni vengono promossi solo in una gamma ristretta di conducibilità. Diversi copolimeri con innesto (per es. SWNT-PEG), da utilizzare per sostenere la crescita neuronale in vitro, hanno sviluppato proprietà conduttive variabili in relazione alla concentrazione di CNT; etichettando le cellule a contatto con questi copolimeri con un colorante fluorescente, è stata studiata la morfologia neuronale in condizioni diverse, osservando che una bassa gamma di valori di conducibilità (circa 0,3 S/cm) ha promosso l'espansione dei neuriti con una diminuzione del numero di coni di crescita e un aumento dell'area del corpo cellulare, mentre i valori di conducibilità più elevati bloccano queste modifiche (Malarkey et al., 2009). Questi studi, riguardanti CNT modificati elettricamente e / o biologicamente, o le variazioni delle proprietà conduttive dei CNT,

sono estremamente interessanti perché aprono la strada verso la progettazione di neuroprotesi intelligenti in grado di guidare adeguatamente l'espansione del neurite (Liopo et al., 2006, Matsumoto et al., 2007).

La carica superficiale di CNT è un'altra caratteristica importante per il controllo della crescita dei neuriti, evidenziata dalla presenza di un aumento di coni di accrescimento, dalla lunghezza media dei neuriti maggiore e dalla ramificazione del neurite più elaborata nei neuroni coltivati su CNT carichi positivamente (in particolare su MWNT), in contrasto a quelli con carica neutra o negativa. La funzionalizzazione chimica del MWNT con il gruppo carbossile (-COOH), con l'acido polimaminobenzene solfonico (PABS) o con l'etilendiammina (EN) è stata sfruttata per ottenere il CNT che presentava rispettivamente le cariche negative, neutrali o positive. È stato osservato che i neuroni ippocampali del ratto cresciuti sul MWNT-EN positivo mostrano neuriti più lunghi, più coni di crescita e una maggiore quantità di ramificazione di neuriti rispetto a quelli cresciuti su CNT neutro o negativamente caricato (Hu et al., 2004). Substrati di SWNT puri sono in grado di stimolare neuroni ippocampali portando, quest'ultimi, a crescere e sviluppare circuiti funzionali (Mazzatenta e colleghi, 2007). La crescita di circuiti neuronali osservata è associata all'incremento della trasmissione di segnali elettrici entro la rete neuronale, dovuto in parte all'elevata conduttività elettrica del materiale che influenza l'elaborazione dell'informazione neuronale.

Facendo reagire i CNT carbossi-funzionalizzati con ossalil cloruro, per formare un cloruro acilico intermedio, ulteriormente fatto reagire con polietilenimina ramificata (PEI), si ottiene l'innesto di copolimero di SWNT, più precisamente l'innesto di copolimero SWNT-PEI. Questo tipo di innesto viene poi caricato positivamente a pH fisiologico, in modo tale da poter evidenziare l'effetto della carica superficiale del copolimero sulla regolamentazione della crescita, della lunghezza e della ramificazione dei neuriti. È stata in questo modo testata la proliferazione delle cellule neuronali ippocampali sui nanotubi copolimerizzati e trovato che i neuroni coltivati su queste superfici vitree mostrano neuriti più ramificati rispetto a studi condotti su altri tipi di materiali. Lo studio suggerisce che le cellule neuronali possono mantenere una elevata redditività sulla superficie dei SWNT-PEI per 10 giorni, ed inoltre, la presenza di cariche positive, ha favorito la ramificazione e l'espansione neuritica rispetto a quella che si può presentare con un CNT puro (Hu et al., 2005); la funzionalizzazione negativa o neutra con acido 4-benzoico o 4-tertbutilfenile del SWNT, invece, riduce sia l'attaccamento che la sopravvivenza neuronale (Liopo et al., 2006).

Un altro approccio per utilizzare i CNT nel promuovere la formazione della rete neuronale, è aggiungere direttamente il CNT al mezzo di coltura cellulare. Per incorporare i nanotubi di carbonio alle colture neuronali dell'ippocampo, SWNT funzionalizzati con carbossili sono stati modificati con acido poli-aminobenzene solfonico (PABA) o poli glicole etilenico (PEG). Si è scoperto così, che sebbene le cellule neuronali crescano facilmente in presenza di SWNT, in coltura, vi è comunque una diminuzione del numero di neurite per neurone formato. Nella stessa ricerca è emerso che gli innesti di copolimeri di SWNT modulano la crescita dei neuriti, aumentando la loro lunghezza. Tutto ciò punta verso il fatto che i CNT possono essere utilizzati al sito locale di lesione del nervo e migliorare la crescita di neuriti selezionati, aumentando così la rete neurale nel cervello. Il contributo dei CNT al trattamento di danni traumatici al sistema nervoso centrale è stato recentemente approvato anche *in vivo*. I SWNT chimicamente funzionalizzati con PEG (polietilenglicole) sono effettivamente efficaci nella promozione della rigenerazione degli assoni in un modello di ratto con danni al midollo spinale (Roman e colleghi, 2011). La riduzione del volume della lesione e l'incremento del numero di neurofilamenti dentro e attorno ai siti lesionati, insieme all'induzione parziale del recupero funzionale della zampa posteriore del ratto, suggerisce l'efficacia di questi approcci. Questo costituisce la prima evidenza, ad oggi, che substrati a base di CNT sono capaci di promuovere la rigenerazione di tessuti del sistema nervoso centrale danneggiati *in vivo*, aprendo nuove prospettive nel campo della medicina neuro-rigenerativa. È necessario sottolineare che anche l'ambiente extracellulare gioca un ruolo critico nella crescita neuronale, e recenti studi hanno esaminato infatti la possibilità di produrre strutture a base di nanotubi di carbonio drogati con molecole della matrice extracellulare, con lo scopo di migliorare i segnali naturali e artificiali del comportamento neuronale. Un'ulteriore possibilità è che i CNT possano essere selettivamente rivestiti da siero proteine, fibrinogeno e apolipoproteine, in tal modo promuovendo l'adesione cellulare, favorita a sua volta, da altre due proprietà dei nanotubi, ovvero, rugosità ed elevata superficie d'esposizione; un esempio è dato dal rivestimento di MWNT con un sottile strato di collagene di tipo IV, una proteina della matrice extracellulare, che ha favorito l'adesione dei neuroni PC12 al substrato (Nguyen-Vu et al., 2006); un altro esempio è dato dalla neurotrofina, una proteina chiave per la maturazione del neurone, quando lega covalentemente alla CNT, conserva la sua attività biologica ed è in grado di promuovere una crescita efficace del neurite nei neuroni gangliari (Matsumoto e collaboratori, 2007). Anche l'analisi delle proprietà elettrofisiologiche hanno mostrato che le strutture di nanotubi di carbonio hanno

un forte effetto sulle proprietà elettriche rigenerative della singola cellula ed i neuroni interfacciati ai CNT, quando forzati a produrre il potenziale d'azione ad una frequenza relativamente alta, sono più inclini a generare un potenziale d'azione retropropagante (proprietà neuronale rigenerativa coinvolta nella regolazione delle risposte sinaptiche e nel rilascio di messaggeri).

Nonostante i numerosi studi condotti, rimane ancora non chiaro come i neuroni siano capaci di ricostituire la funzionalità della rete e ricostruire l'attività delle sinapsi quando in contatto con i substrati di CNT.

In generale, tutti questi studi propongono l'uso di nanotubi come una piattaforma compatibile con il tessuto neuronale capace di mantenere la vitalità cellulare, mentre simultaneamente promuove la formazione di circuiti neurali. [11] [12] [15]

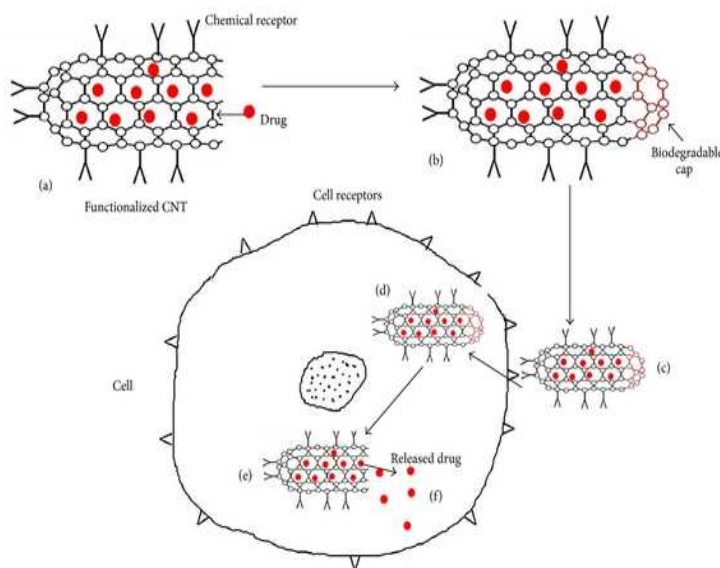
### 3.1.2 Nanotubi di carbonio e drug delivery

L'uso di nanotubi di carbonio, come veicoli di rilascio per il trattamento dei disturbi del sistema nervoso centrale, è dovuto alle loro proprietà fisico-chimiche, 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. Solo pochi studi sono stati pubblicati sull'uso dei CNT per il rilascio di farmaci nel cervello, tuttavia, questo andrà in crescendo nei prossimi anni e la neuroterapia con l'uso di nanotubi di carbonio potrebbe essere largamente sfruttata per il trattamento di varie patologie neurologiche.

Il processo attraverso il quale avviene il rilascio di farmaci può essere brevemente descritto come segue: il farmaco 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 e quindi il farmaco viene rilasciato. Nella maniera più semplice possibile possiamo descrivere il processo di rilascio del farmaco (schematizzato nella **Figura 2**, [17]) come segue: (a) la superficie del CNT è collegata ad un recettore chimico (Y) ed il farmaco (●) è incapsulato all'interno del nanotubo; (b) l'estremità aperta del CNT viene chiusa; (c) il vettore farmaco-CNT viene introdotto nel corpo e raggiunge la cellula bersaglio grazie al recettore chimico presente sulla superficie del CNT; (d) la cellula internalizza il CNT attraverso i recettori (V) per

esempio per endocitosi, (e) il “cappello” viene rimosso o biodegradato all'interno della cellula, e successivamente il farmaco viene rilasciato (f).

Generalmente, I nanotubi di carbonio funzionalizzati possiedono l'abilità di trasportare le molecole d'interesse attraverso la membrana citoplasmatica e la membrana nucleare senza produrre effetti tossici; d'altra parte, il coniugato farmaco-CNT dimostra essere più sicuro e più efficace rispetto al farmaco usato da solo e preparato con metodi tradizionali. Raggiunta la cellula bersaglio, ci sono due possibilità per rilasciare il farmaco: il farmaco può entrare nelle cellule senza internalizzazione del CNT-trasportatore, oppure, sia farmaco che CNT-trasportatore entrano nelle cellule. Quest'ultimo metodo di internalizzazione è più efficace rispetto al primo, perché dopo l'entrata nelle cellule, l'ambiente intracellulare degrada il coniugato trasportatore del farmaco rilasciando le molecole di farmaco in situ, cioè, all'interno delle cellule. Nel metodo di non-internalizzazione, invece, l'ambiente extracellulare aiuta a degradare il coniugato vettore-farmaco e il solo farmaco poi attraversa la membrana lipidica per entrare nelle cellule, con ciò, vi è la possibilità di degradazione del farmaco durante questa penetrazione. Essendo, quest'ultimo meccanismo, meno convincente, non è ancora ben conosciuto.



**Figura 2.** [17]

In breve, le spiegazioni circa la capacità del CNT nell'attraversare le membrane cellulari per la somministrazione di farmaci sono dovute alla semplice interazione idrofobica, all'interazione di impilamento, all'adsorbimento elettrostatico e ai legami covalenti nella loro struttura, ma anche all'adsorbimento nella cavità del cilindro, che tende ad aumentare la capacità di adsorbimento. [17] Inoltre, i CNT hanno la capacità non solo di penetrare nelle cellule per promuovere l'assorbimento cellulare di molecole terapeutiche, ma anche

di mantenerle intatte durante il trasporto e la penetrazione cellulare. L'ultima proprietà consente la riduzione delle dosi di farmaci utilizzati, e di conseguenza la riduzione del rischio di tossicità. Il primo impiego dei CNT per il trattamento di disturbi del sistema nervoso centrale prevedeva l'utilizzo di corti SWNT fisicamente adsorbiti con acetilcolina (SWNT-ACh) in cervelli di topi affetti da Alzheimer. L'acetilcolina è un neurotrasmettitore naturale del sistema nervoso colinergico ed è connesso con le attività nervose di alto livello, come imparare, pensare e memorizzare. Non ci sono altri modi per fornire acetilcolina nel cervello, perché l'acetilcolina è un composto con forte polarità, e ciò rende difficile il passaggio attraverso la barriera emato-encefalica. A tal proposito, i nanotubi di carbonio essendo in grado di attraversare la barriera emato-encefalica, vengono utilizzati per rilasciare acetilcolina entro i neuroni affetti dal disturbo (Yang e colleghi). Questo sistema rilascia con successo acetilcolina nei neuroni del cervello e, attraverso l'immagazzinamento di questa nell'assoplasma dei neuriti, ha migliorato in modo significativo la capacità di apprendimento e di memoria degli animali del modello affetti da Alzheimer. Da questo studio è emerso che dosi di SWNT sotto i 300 mg/kg potrebbero garantire il rilascio di acetilcolina entro i lisosomi dei neuroni, così rendendo la terapia più efficace senza compromettere il profilo tossicologico del materiale. Inoltre, i SWNT funzionalizzati con gruppi amminici, attraverso reazione di amminazione, migliora la tolleranza dei neuroni a danni neurologici, questi sono così protetti dai deterioramenti e le loro funzioni sono riacquisite attraverso la modificazione amminica dei SWNT senza dover ricorrere a interventi chirurgici terapeutici. La neuroprotezione potrebbe essere ottenuta nel futuro, per il trattamento di disturbi neurologici, attraverso il rilascio di nanofarmaci. A tal proposito, le neurotrofine, proteine coinvolte nella neuroprotezione, sono essenziali nello sviluppo e nella funzione di neuroni dei sistemi nervosi centrale e periferico. Queste possono essere rilasciate all'interno del cervello attraverso l'utilizzo, appunto, dei nanotubi di carbonio. I MWNT amminici sono efficacemente coinvolti nel rilascio di *small interfering RNA* (siRNA, breve RNA interferente) che riduce l'apoptosi al sito danneggiato e promuove la guarigione di neuroni motori funzionali in un modello di ratto (Al-Jamal e colleghi).

È necessario chiarire il fatto che la presenza della barriera emato-encefalica pone un enorme problema per il trattamento di disturbi neurologici tramite rilascio di farmaci; ha, di fatto, un'elevata selettività che permette solo ad una piccola quantità di sottosostanze presenti nella circolazione sanguigna di guadagnare l'accesso al sistema nervoso, nello specifico, ostacola il rilascio di molecole nel sistema nervoso centrale permettendo di



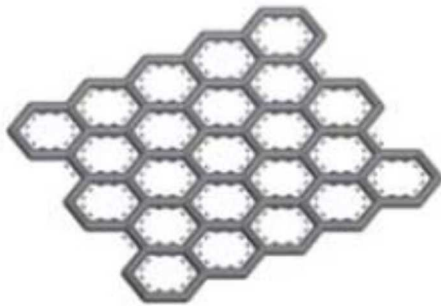
giungere a destinazione meno dell'1% delle sostanze del farmaco somministrato mediante iniezione endovenosa. [16]

## 3.2 GRAFENE

Il grafene è un materiale composto da un singolo strato di atomi di carbonio disposti in un reticolo a nido d'ape bidimensionale ultrasottile. Con il rapido sviluppo di approcci di sintesi e funzionalizzazione e le singolari proprietà elettrica, ottica, termica, e meccanica, il grafene ed i suoi derivati hanno mostrato notevole potenzialità in molti campi, tra i quali anche quello biomedico. Il monostato atomico di grafene si può considerare la struttura di base di altri allotropi del carbonio, tra i quali ricordiamo i nanotubi di carbonio precedentemente descritti. La scoperta sperimentale del grafene ha determinato un grande interesse per le proprietà eccezionali mostrate da questo materiale. Infatti, oltre ad essere il più sottile dei materiali esistenti, mostra una resistenza e una rigidità superiore a quella dell'acciaio e una capacità di conduzione elettronica a temperatura ambiente più veloce di qualsiasi altra sostanza. Le proprietà principali del grafene risiedono nella perfetta disposizione degli atomi di carbonio dovuta al forte legame esistente tra loro. Allo stesso tempo, i legami sono abbastanza flessibili da permettere uno stiramento fino al 20% della sua dimensione originale. La struttura del grafene consente agli elettroni di muoversi su lunghe distanze senza subire perturbazioni e quindi permettendo una conducibilità elettrica molto superiore a quella dei normali conduttori [18]. Il grafene ha dimostrato di essere un materiale promettente per risolvere problemi legati alla rigidità, osservata invece con elettrodi basati su materiali inorganici (silicio e oro). La sua eccellente conduttività, flessibilità, biocompatibilità e stabilità all'interno del corpo hanno suscitato l'interesse dei ricercatori. La sostanziale differenza emersa tra le varie ricerche relative a questa interfaccia riguarda il rapporto segnale/rumore: interfacce sviluppate utilizzando grafene trattato avevano un rapporto segnale/rumore più basso rispetto ad interfacce realizzate utilizzando grafene puro; sviluppando, infatti, metodi di lavoro con il grafene non trattato, viene mantenuta la conducibilità elettrica del grafene, creando un elettrodo notevolmente migliore, ed interfacciare direttamente i neuroni con il grafene, senza alcun rivestimento peptidico, mantiene inalterate le loro proprietà e migliora la loro adesione all'elettrodo. Sono emersi, tuttavia, studi riguardanti i rischi nei quali si può incorrere utilizzando il grafene nel cervello, per esempio, in uno studio che utilizza come modello l'embrione di pulcino, i fiocchi di grafene incontaminati hanno ridotto il livello dell'acido ribonucleico e la velocità di sintesi dell'acido deossiribonucleico, portando ad effetti

dannosi sullo sviluppo del tessuto cerebrale e alla formazione di un'ultrastruttura atipica nel cervello. L'ossido di grafene (GO) è il derivato più comune di grafene, ottenuto dall'esfoliazione della grafite mediante procedure di ossidazione. Le nanoparticelle di GO sono di solito costituite da uno spessore di 1 nm, mentre la loro dimensione laterale può estendersi da poche decine di nm a pochi  $\mu\text{m}$ . Sebbene la procedura sintetica introduce siti difettosi che distruggono le peculiari proprietà elettroniche del grafene, la presenza di funzionalità polarizzabili aumenta la sua stabilità, lo rende fortemente idrofilo e quindi facilmente disperdibile in acqua. Per questi motivi, l'ossido di grafene in certe situazioni è stato considerato più adatto del grafene per le applicazioni biomediche. Il GO e suoi derivati dispongono di molte proprietà che li rendono candidati adatti sia per applicazioni diagnostiche che terapeutiche nel SNC: presentano una fluorescenza intrinseca e possono diffondersi nei tessuti del cervello, hanno un'elevata capacità di carico che consente loro di trasportare importanti quantità di farmaci e, ad oggi, non hanno ancora mostrato tossicità nei confronti dei tessuti del SNC [2]. Le caratteristiche intrinseche e la sua disponibilità per modificazioni chimiche e fisiche fanno del grafene un mezzo promettente per vari tipi di applicazioni biomediche, le quali includono anche l'utilizzo di questo materiale come vettore di rilascio per i farmaci (drug delivery) o come biomateriale a contatto con cellule per l'ingegneria tissutale e la medicina rigenerativa. La struttura chimica del grafene e, di conseguenza, la sua funzionalità, può essere modificata tramite fissaggio di gruppi funzionali, i quali non solo modificano le proprietà del grafene ma anche consentono la sua coniugazione con anticorpi, peptidi, ligandi, mezzi di contrasto, farmaci e geni per le diverse applicazioni (John et al. 2015). Le funzionalizzazioni chimiche del grafene possono essere suddivise in due categorie: modificazione covalente e non-covalente. Nella modificazione non-covalente è possibile ancorare piccole molecole organiche sulla superficie del grafene sfruttando le interazioni elettrostatiche deboli (forze di van der Waals e/o interazioni  $\pi$ - $\pi$ ). Questo tipo di funzionalizzazione non determina l'alterazione della struttura aromatica del grafene, minimizzando quindi gli effetti sulla conduttività del grafene, ma dando comunque modificazioni altamente stabili. La funzionalizzazione covalente, invece, rappresenta un metodo con cui è possibile modificare notevolmente la struttura geometrica ed elettronica del grafene, attraverso la formazione di veri e propri legami covalenti. Si tratta di legami C-C, con formazione di un legame covalente che implica modifiche alla struttura elettronica e geometrica del nanomateriale. Quest'ultimi possono coinvolgere in linea di principio atomi di carbonio che si trovano nel piano o nel bordo del grafene e che risultano

strutturalmente differenti, determinando comunque in entrambi i casi la rottura del legame  $sp^2$  e la formazione del legame  $sp^3$  dell'atomo di carbonio interessato. Si creano così zone di discontinuità nella rete di ibridizzazione  $sp^2$  che non permettono la conduzione degli elettroni con notevoli conseguenze sulla conduttività del nanocomposito. Durante l'addizione covalente, gli atomi di carbonio interni che sono vincolati nel piano devono sporgersi fuori dal piano per adottare una geometria tetraedrica  $sp^3$ , introducendo una tensione nel piano e aumentando notevolmente l'energia di struttura. Viceversa, gli atomi di carbonio dei bordi possono invece adottare geometrie tetraedriche più liberamente. È per questo motivo che i carboni più esterni sono i siti preferenziali per l'addizione covalente. Considerando inoltre che orbitali molecolari sono maggiormente localizzati sui bordi a “zig-zag”, questi risultano particolarmente reattivi. [18] [19]



**Figura 3.** Rappresentazione della struttura di grafene [20].

### 3.2.1 Grafene e neurorigenerazione

Gli emergenti materiali a base di grafene offrono numerose opportunità per il progetto di nuove strutture per l'ingegneria tissutale neurale. Grazie alle eccezionali proprietà di questi biomateriali, essi offrono l'eccellente capacità di immobilizzare un gran numero di sostanze, fra le quali farmaci, biomolecole e cellule. Perciò non sorprende il fatto che il grafene abbia generato grande interesse all'interno della nanomedicina e delle applicazioni biomediche. Questo nanomateriale ed i suoi substrati sono eccellenti nanostrutture per la promozione dell'adesione, proliferazione e differenziazione di varie cellule, come cellule staminali embrionali, cellule staminali neurali, e cellule staminali mesenchimali. Nonostante le loro limitate capacità intrinseche rigenerative, le cellule staminali creano considerevole interesse per il loro uso nel trattamento di danni o disturbi del sistema nervoso. Sebbene sia possibile ottenere cellule staminali da biopsie nervose, il loro accesso è limitato e queste cellule hanno scarsa capacità di espandersi in vitro. Un'alternativa fonte di cellule è rappresentata dalle cellule staminali recuperate da tessuti

adulti non-neuronali, le quali possono essere differenziate entro fenotipi neurologici. La promozione della differenziazione di cellule staminali è una sfida critica nelle terapie per la rigenerazione neurale, tuttavia, un recente gruppo di ricerca è riuscito ad ottenere un buon risultato riguardo la differenziazione di cellule staminali neuronali umane entro neuroni, utilizzando come induttore una struttura a base di grafene (Park et al.). I risultati più evidenti hanno confermato che si è sviluppato un maggior tasso di differenziazione entro neuroni sul substrato di grafene. Nel tentativo di influenzare significativamente la differenziazione cellulare, sono state studiate diverse configurazioni di substrati. Per esempio, la posa di cellule staminali mesenchimali umane su fogli di grafene fluorurati generano un miglioramento nella differenziazione e nella proliferazione neuronale rispetto a cellule poste sul solo grafene (Wang et al.). La presenza di gruppi di fluoro sul grafene crea interazioni elettrostatiche più forti, aumento della bagnabilità della superficie, e rugosità sulla superficie cellulare. Si è di conseguenza supposto la presenza di un effetto neuro-induttivo della struttura di grafene fluorurata dovuto a spontanee polarizzazioni delle cellule. Lo stato attuale delle conoscenze è che il grafene possa essere quindi conduttivo / induttivo per la neurogenesi cellulare.

Per la rigenerazione del sistema nervoso centrale, si preferisce la differenziazione selettiva delle cellule staminali entro o i neuroni o gli oligodendrociti. All'interno di quest'ultimi, in uno studio condotto su un modello animale, è stata sperimentata la differenziazione di cellule staminali neuronali guidata da strutture nanofibrose ibride progettate tramite l'utilizzo di un materiale a base di grafene (Shan et al.).

Nella medicina rigenerativa, il grafene ha dimostrato essere un efficace substrato compatibile con le cellule nervose. Le cellule ippocampali e staminali neurali coltivate su substrati di grafene hanno dimostrato un significativo miglioramento nella neurogenesi, come valutato dallo sviluppo del neurite e della formazione della rete neurale (Li et al, 2011); a proposito di quest'ultima, un'altra intrigante caratteristica del grafene è la capacità di formare una rete neuronale funzionale. Attraverso uno studio condotto da un gruppo di ricercatori (Tang et al.,2013), neurosfere derivate da cellule staminali neuronali posizionate su substrati di grafene, dopo 14 giorni in coltura, hanno portato alla formazione di una rete neuronale. Un altro studio ha scoperto, inoltre, il potenziale utilizzo del grafene come interfaccia neuronale, come sostenitore della nascita di neuriti e della crescita (in coltura) di cellule neuronali ippocampali, come ottimizzatore delle performance nelle reti neurali differenziate tramite cellule staminali neuronali, e come

campo elettrico stimolatore per un'efficace valorizzazione del volume ematico cerebrale (Li et al.).

Riguardo al sistema nervoso periferico, le lesioni dei nervi periferici (peripheral nerve injury, PNI) rappresentano un problema clinicamente rilevante. I pazienti con danni del nervo di lieve gravità migliora spontaneamente, in quanto i neuroni periferici, spontaneamente, producono nuovi assoni dopo il danno. Quando si verificano grandi difetti nervosi, è necessario invece l'impianto di un innesto nervoso per colmare il divario. L'autoriparazione del nervo rappresenta ancora un regime aureo, ma questo approccio è associato a diverse complicazioni cliniche. L'allograft e lo xenograft sono valide alternative; tuttavia il rigetto immunitario sistemico rimane la più grande preoccupazione. I ricercatori dell'ingegneria tissutale hanno tentato di dare il proprio contributo alla comunità scientifica e medica attraverso lo sviluppo di innesti sintetici per il trattamento del PNI. Studi condotti su modelli animali hanno dimostrato che la combinazione di condotti nervosi con le tecnologie delle cellule staminali potrebbero essere la scelta migliore per ottenere il massimo recupero funzionale. Recentemente c'è stato grande interesse nell'uso di materiali a base di grafene per il progetto di strutture che potrebbero promuovere la neurorigenerazione. Grazie alle sue proprietà già precedentemente menzionate, il grafene può rappresentare una promettente struttura per colmare i difetti dei nervi, favorendone la rigenerazione. L'integrazione di cellule precursori gliali e nervose all'interno di tale struttura potrebbe migliorare la rigenerazione rispetto all'autograft nervoso ed ai condotti nervosi artificiali attualmente in uso. Come substrato conduttivo, il grafene può fornire sostegno per lo sviluppo di cellule che rafforzano le loro connessioni elettriche, così aprendo uno scenario completamente nuovo per l'ingegneria tissutale neuronale e le applicazioni nella rigenerazione. Solo pochi studi sono stati riportati sull'uso di substrati di grafene funzionalizzati per l'ingegneria tissutale, sebbene questi gruppi funzionali chimici sulle superfici di grafene possono migliorare le interazioni cellula-materiale, portando ad un miglior risultato biologico. Un'importante scoperta ha messo in luce come l'impianto di un gruppo amminico sulla superficie di grafene possa migliorare la sua bagnabilità e mostrare una più marcata vitalità cellulare. Il grafene polimero-funzionalizzato può indurre una più efficace differenziazione delle cellule staminali grazie all'effetto sinergico tra nanomateriale e macromolecole. [19] [20] Il grafene potrebbe quindi essere la chiave per curare le lesioni al midollo spinale. Il danneggiamento del midollo spinale porta a paralisi totale o parziale. Un team di ricercatori della Rice University ritiene infatti che l'accoppiata di nanostrisce di grafene

e polimero possa portare alla “cura” dei danni al midollo spinale. Tutto nasce dal lavoro del chimico James Tour, che ha speso un decennio a studiare possibili applicazioni per le nanostrisce di grafene. Questo materiale, le cui straordinarie proprietà elettriche, ottiche e meccaniche lo rendono ideale in molteplici settori, potrebbe trovare anche uso medico. Alla Rice hanno creato un materiale chiamato Texas-PEG – basato appunto su nanostrisce di grafene – che potrebbe aiutare a riparare in parte o completamente un midollo spinale danneggiato. Lo studio è stato pubblicato, con promettenti risultati preliminari, sul giornale *Surgical Neurology International*. Le nanostrisce di grafene messe a punto dalla Rice sono altamente solubili nel glicole polietilenico (PEG), un gel polimerico biocompatibile usato nelle operazioni, nei prodotti farmaceutici e in altre applicazioni biologiche. Quando le estremità delle nanostrisce biocompatibili sono rese funzionali con catene PEG e ulteriormente mischiate con il glicole polietilenico formano una rete elettricamente attiva che aiuta la riconnessione delle estremità recise del midollo spinale. Il grafene stimola notevolmente la crescita dei neuroni su di esso, perché è una superficie altamente conduttiva. I ricercatori hanno inserito atomi di potassio tra gli strati di nanotubi di carbonio a parete multipla per suddividerli in nanostrisce di grafene. A questo è seguita l’aggiunta di ossido di etilene per porre agli estremi glicole polietilenico (PEG) solubilizzante. Questo permette di avere superfici piatte di nanostrisce di grafene che danno ai neuroni una superficie conduttiva su cui crescere. Il laboratorio di Tour non è stato però l’unico laboratorio che ha dimostrato che i neuroni crescono sul grafene *in vitro*, ma la differenza è che gli altri laboratori sperimentano comunemente con ossido di grafene solubile in acqua, che è molto meno conduttivo del grafene, o comunque con strutture di grafene non a strisce. Alla Rice hanno sviluppato un modo per aggiungere catene polimeriche solubili in acqua agli estremi delle nanostrisce, conservandone la conducibilità, ma rendendole al tempo stesso solubili; solo l’1% del Texas-PEG è costituito da nanostrisce, ma ciò è sufficiente per formare una struttura conduttiva tramite la quale il midollo spinale si può ricollegare. Tramite il Texas-PEG i ricercatori della Konkuk University (Corea del Sud) sono riusciti a ripristinare la funzionalità in un roditore con il midollo spinale reciso; il materiale, infatti, ha favorito il passaggio dei segnali neuronali motori e sensoriali tramite il tratto, precedentemente danneggiato, nell’arco di 24 ore, dopo la completa resezione del midollo spinale, e un quasi perfetto recupero del controllo motorio dopo due settimane. Il potenziale di Texas-PEG per aiutare i pazienti con lesioni del midollo spinale è troppo promettente per essere minimizzato e

l'obiettivo dei ricercatori è di svilupparlo come un modo per affrontare le lesioni del midollo spinale. [21]

### **3.2.2 Grafene e drug delivery**

Il grafene si è recentemente dimostrato come un nuovo e competitivo materiale utilizzabile nel rilascio controllato di farmaci. La superficie del grafene è quattro volte superiore rispetto alle superfici di qualsiasi altro materiale fino ad ora utilizzato nel rilascio di farmaci (drug delivery). Un monostrato di grafene rappresenta un caso estremo, in cui ogni atomo è esposto sulla superficie, che permette significativamente maggiore capacità di carico del farmaco rispetto ad altri nanomateriali. Il numero di strati di grafene ed il loro sottile spessore sono importanti per diverse ragioni, maggiore è il numero di strati minore è l'area di superficie, ma contemporaneamente maggiore è la rigidità del materiale che deve essere tale da rendere possibile la penetrazione dello stesso attraverso le cellule. La dimensione laterale dei materiali a base di grafene non hanno effetto sulla superficie o sulla capacità di carico del farmaco, ma potrebbero dare rilevanti limitazioni per l'assorbimento cellulare, il trasporto attraverso la barriera emato-encefalica, la degradazione biologica e altri fenomeni biologici dipendenti dalle dimensioni delle particelle. Generalmente, i nanovettori interagiscono con le membrane cellulari ed entrano nelle cellule per endocitosi. Per la somministrazione mirata al nucleo, è importante che il vettore del farmaco rilasci il farmaco assorbito in compartimenti citosolici. La funzionalizzazione del grafene è stata utilizzata con successo per sviluppare nanovettori sensibili agli stimoli che rilasciano farmaci all'interno del citoplasma. L'internalizzazione e l'interazione di nanocarrier con cellule/macrofagi dipende da diversi parametri chiave, che includono la dimensione, la forma, la superficie chimica e la carica. La forma ovviamente gioca un ruolo veramente importante, in particolare perché il grafene ha una forma bidimensionale con morfologia planare, che non esiste nei sistemi biologici. Questa forma è abbastanza differente dalle forme sferiche e tubulari, già affrontate in altri studi. La rigidità è un altro importante parametro necessario al mantenimento dell'integrità strutturale dei vettori di farmaci, ma allo stesso tempo se la struttura del grafene è troppo rigida, questa potrebbe danneggiare la cellula. Perciò è importante ridurre la rigidità dei fogli di grafene per minimizzare questo impatto, che può essere un ostacolo per le applicazioni nel rilascio controllato. Riguardo alla superficie chimica, il grafene puro è altamente idrofobico e scarsamente disperdibile in acqua, per cui richiede tensioattivi o modificazioni della superficie per poter essere utilizzato in

applicazioni biomediche. In generale, affinché l'utilizzo del grafene come sistema di rilascio abbia successo è necessario affrontare diversi problemi: il primo è quale modificazione utilizzare per ottenere un efficiente nanocarrier con un'ottima capacità di carico del farmaco; il secondo è la conferma o il miglioramento della loro biocompatibilità e tossicità, che è essenziale, prima che possano essere intrapresi gli studi pre-clinici e clinici; infine, il terzo è il progetto di un sistema capace di rilasciare i farmaci in un percorso controllato con un dosaggio ottimizzato ad uno specifico sito richiesto. Relativamente a quest'ultimo problema, la cinetica del rilascio di farmaci tramite drug-carrier è usualmente controllata attraverso un processo di diffusione, il quale sottintende che il loro comportamento nel rilascio e la quantità di farmaco rilasciato non possono essere modificati dopo la loro somministrazione. Sostituire questo sistema di rilascio passivo è importante per sviluppare sistemi più avanzati capaci di rilasciare farmaci, con dosaggio e tempo ottimali. A tal scopo, sono stati sviluppati diversi nuovi approcci reattivi ("smart") per carrier di farmaci che possono rispondere a stimoli che sono innescati internamente (temperatura corporea, pH, reazione chimica specifica) od esternamente (applicazione di ultrasuoni, di campi magnetici ed elettrici). Questi concetti sono stati applicati con successo su nanocarrier a base di grafene. Quando i farmaci vengono fissati sui drug-carrier tramite leganti sensibili al pH, è possibile controllare il rilascio del farmaco manipolando il valore del pH ambientale. Diversi derivati del grafene sono stati utilizzati per progettare complessi drug carrier pH-sensitive, dando ottimi risultati; per esempio, un nanocomplesso, progettato utilizzando grafene funzionalizzato con monostrato fosfolipidico di membrana, presenta un comportamento pH-controllato nel rilascio del farmaco, con un'elevata capacità di carico del farmaco, pari al 70% (Li et al.). Da una recente scoperta è emerso, inoltre, come fogli di grafene in una soluzione e in determinate condizioni di pH possano comportarsi come un polimero, cambiando forma. Nessuno pensava che fosse possibile cambiare spontaneamente la struttura del grafene verso una forma sferica. E questa dimostrazione, ovvero il fatto che possa essere trasformato in cristalli liquidi in modo semplice ed economico, rafforza la prospettiva di utilizzo in campo clinico.

Un' ulteriore metodica utilizzata per il controllo del rilascio di farmaci, che sta sviluppandosi sempre più, prevede la stimolazione delle nanoparticelle tramite l'applicazione di campi elettromagnetici o di ultrasuoni. In questo tipo di processo, viene sfruttato un composto sensibile all'applicazione di campi esterni, come per esempio il composto grafene/Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> (magnetite), e manovrato al sito di interesse tramite l'azione del



campo elettromagnetico su di esso. Anche composti come  $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{GNS}$  (nanographene sheet), che vengono preparati con un semplice ed efficace metodo chimico in situ, vengono utilizzati nel rilascio di farmaci. [18] [22]

G-IMMUNOMICS è il nome di un altro progetto italiano, tra i 13 a livello europeo che hanno ottenuto una valutazione positiva, ritenuto meritevole di un sostanzioso finanziamento, che in gran parte andrà all'Università di Sassari. G-Immunomics ambisce ad aprire la strada allo sviluppo di nuove nanotecnologie che contribuiranno al superamento delle sfide sociali europee: qualità di vita migliore per le popolazioni che invecchiano e nuovi approcci nel trattamento di patologie gravi. L'obiettivo futuro dello studio è quello di sviluppare un nanomateriale, basato sul grafene, che abbia proprietà terapeutiche e sia, ad esempio, adatto a rilasciare i farmaci unicamente nella sede di interesse, ottenendo risultati migliori con minori effetti collaterali. [23]

## 4 TOSSICITÀ

### 4.1 TOSSICITÀ DEI NANOTUBI DI CARBONIO

Il comportamento biologico e tossicologico degli organismi viventi e dell'ambiente, vengono influenzati dalle proprietà fisico-chimiche dei CNT. L'elevata superficie idrofobica e la natura non biodegradabile contribuiscono a ridurre la loro biocompatibilità, limitare le loro applicazioni biomediche, con crescente preoccupazione circa la loro cronica tossicità. Nonostante le applicazioni dei CNT in neurologia siano ad uno stadio molto precoce, nei diversi anni di ricerca sono emerse le preoccupazioni riguardanti la loro neurotossicità a breve- ed a lungo-termine. La tossicità è attribuita a: struttura, lunghezza e proporzioni, area superficiale, grado di aggregazione e di ossidazione, topologia di superficie, legami di gruppi funzionali, metodo di fabbricazione, concentrazione e dose introdotta nella cellula o nell'organismo. I nanotubi possono generare tossicità attraverso membrane cellulari danneggiate causando stress ossidativo, cambiamenti nell'attività mitocondriale, alterazione delle vie metaboliche intracellulari e della sintesi delle proteine. I più comuni meccanismi di citotossicità dei nanotubi di carbonio comprendono anche apoptosi e necrosi.

Diversi gruppi di ricerca utilizzano diverse tecniche per stabilire la tossicità del CNT in studi in vitro. Tali prove di tossicità convenzionali sono ampiamente usate e hanno dato risultati interessanti che ne hanno fornito una preziosa analisi. Tuttavia, i risultati ottenuti dai diversi gruppi di ricerca sono spesso contrastanti, infatti, la tossicità di una particolare nanoparticella prodotta da diversi saggi effettuati dallo stesso gruppo oppure prodotta dagli stessi saggi ma compiuti da gruppi di ricerca diversi ha dato risultati spesso differenti e di conseguenza non affidabili; ciò è dovuto all'uso di convenzionali prove di tossicità in vitro, che non utilizzano i dosaggi più appropriati per misurare la tossicità delle nanoparticelle e possono quindi cadere in errore. I CNT possono interagire con i coloranti impiegati in alcuni saggi, alterando il colore emesso e quindi dando una falsa lettura, come è accaduto ad esempio per il complesso SWNT-COOH, per il quale la maggior parte degli studi tossicologici ha dimostrato che la funzionalizzazione di SWCNT con COOH elimina/riduce la tossicità, ma una minima parte dei test ha trovato che questo complesso era tossico per una particolare linea cellulare (la CaCo-2, cellule intestinali umane) (Jos et al.). Un altro limite dei saggi in vitro è che non possono produrre alcun dato tossicocinetico. Sebbene i test in vivo siano più costosi e complicati, è generalmente accertato che forniscano informazioni più precise e pertinenti che non

possono essere ottenute attraverso studi in vitro. Esperimenti in vivo hanno anche il vantaggio di poter fornire dati su un'ampia gamma di parametri, quali la distribuzione, il metabolismo e l'eliminazione.

In generale, i ricercatori hanno classificato i programmi di morte cellulare in tre gruppi principali: l'apoptosi, autofagia, e necrosi. L'apoptosi è la morte cellulare programmata e può essere attivata tramite il passaggio estrinseco (morte-recettore-dipendente) o intrinseco (mitocondriale-dipendente) e può o non può richiedere l'attivazione di proteasi citosoliche note come caspasi. L'autofagia cellulare o autofagocitosi è un meccanismo cellulare di rimozione selettiva di componenti citoplasmatici danneggiati. Esistono diversi tipi autofagia: in tutti i casi si ha la degradazione, attraverso i lisosomi, di uno o più costituenti cellulari e quasi tutti i tipi di autofagia prevedono la formazione di vescicole a doppia membrana, che inglobano, isolano e separano dal resto della cellula il materiale da degradare. È attualmente poco chiaro come un programma di morte cellulare sia indotto in risposta all'esposizione a diversi tipi di CNT. Vari esperimenti hanno dimostrato che il danno lisosomiale è una fase iniziale attraverso la quale i CNT innescano l'apoptosi. L'esposizione del CNT all'ambiente cellulare è il risultato della destabilizzazione delle membrane lisosomiali che portano alla morte delle cellule sia apoptotica così come necrotica. Il danno mitocondriale, che eventualmente porta a danno lisosomiale, è anche un altro metodo di induzione di apoptosi all'esposizione ai CNT della cellula. I lisosomi lesionati rilasciano enzimi digestivi, che danneggiano le cellule intere. Questo può eventualmente provocare neurodegenerazione. [24] [25] [27]

#### **4.1.1 Studi sulla tossicità in vitro**

La sicurezza è il primo requisito di qualsiasi materiale utilizzato in medicina; a tale scopo, negli ultimi anni, sono stati condotti molti studi per esplorare i potenziali effetti tossici dei nanotubi di carbonio. Le conclusioni di queste ricerche variano drasticamente, mostrando una grande dipendenza sia dal tipo di nanotubo, così come dal tipo di funzionalizzazione. Lo stato attuale è che la tossicità sembra dipendere dal tipo di preparazione del materiale, in particolare dalla geometria e dalla funzionalizzazione superficiale.

L'esposizione al CNT a singola parete puro ha mostrato una elevata tossicità a livello di cheratinociti epidermici umani (cellule epidermiche umane), da cui scaturiscono di conseguenza stress ossidativo e riduzione dell'attività cellulare. Allo stesso tempo, si è verificato che la citotossicità di un nanotubo a singola parete non modificato dipende da

dose e tempo di somministrazione. Diversamente, la modificazione superficiale di questi nanotubi di carbonio a singola parete ha portato alla riduzione della morte cellulare e di conseguenza ha evidenziato che i CNT con superficie non funzionalizzata sono più citotossici rispetto ad i CNT con superficie funzionalizzata. I tempi di interazione hanno comportato una maggiore quantità di apoptosi nei CNT sia funzionalizzati che non, sebbene i primi ne presentino una quantità minore. L'incubazione della coltura di neuroni ippocampali su SWNT chimicamente funzionalizzati con copolimero (PABS e PEG) non influenzano la vitalità dei neuroni; tuttavia, i cambiamenti potrebbero mostrarsi sulla loro morfologia (maggiore crescita dei neuriti e maggiore soppressione di coni di crescita) (Ni et al. 2005). La funzionalizzazione chimica di SWNT con PEG (PEG-SWNT) potrebbe inibire la depolarizzazione cellulare afflusso dipendente di  $Ca^{2+}$ , un processo noto per regolare il riciclo delle vescicole di neuroni, e conseguentemente modificare la velocità di allungamento dei neuriti (Malarkey et al. 2008). Lo stesso studio ha anche indicato come il SWNT-PEG potrebbe precludere l'endocitosi di membrana dei neuroni, portando all'inibizione di canali voltaggio-dipendenti per il  $Ca^{2+}$ , e di conseguenza portare ad un graduale decremento nella frequenza di correnti spontanee post-sinaptiche. Un'altra preoccupazione che può contribuire alla tossicità complessiva del materiale è la presenza di catalizzatori metallici. Il ruolo critico delle tracce di catalizzatore presenti nei nanotubi di carbonio viene rappresentato, per esempio, dalle tracce di ittrio rilasciate dal SWNT (chimicamente funzionalizzato con aril-solfonato), responsabili dell'inibizione di canali ionici  $Ca^{2+}$  neuronali. Una elevata presenza di impurità (catalizzatore), inoltre, è ritenuto avere un impatto sulla vitalità cellulare con un aumento della generazione delle specie reattive dell'ossigeno a concentrazioni più elevate di CNT ( $> 50 \mu\text{g/ml}$ ) (Schrand et al. 2007); un elevato livello di ROS è indicativo di stress ossidativo e può danneggiare le cellule alterando la struttura proteica, interrompendo il DNA, interferendo con le funzioni di segnalazione, e modulando la trascrizione del gene; l'effetto di un elevato livello di ROS è ancora più rilevabile nel sistema nervoso centrale a causa dell'elevato contenuto di acidi grassi insaturi, che sono suscettibili a perossidazione. Nonostante, la funzionalizzazione sia stata segnalata come un metodo per ridurre la tossicità dei CNT, i SWCNT-COOH funzionalizzati inducono l'autofagia, quando invece l'aggiunta di SWCNT-PABS (acido solfonico poliaminobenzene) e SWCNT-PEG non ha tale effetto. La tossicità dei CNT, come già anticipato, è relazionata alla loro struttura, infatti, i CNT a parete multipla con ampio diametro sono più citotossici rispetto a quelli con diametro minore. Alcuni studi hanno evidenziato modificazioni nell'attività di diversi canali ionici,

in particolare l'inibizione dei canali potassio ( $K^+$ ) delle cellule PC12 dopo l'incubazione con MWNT ossidato (Xu et al. 2009). Queste osservazioni suggeriscono che le proprietà elettrofisiologiche dei neuroni potrebbero essere influenzate dal passaggio di correnti attraverso substrati a base di nanotubi. Tale effetto è stato legato all'apertura dei canali ionici, identico ai tradizionali mezzi di eccitazione neuronale, dove substrati a base di CNT potrebbero promuovere un accoppiamento elettrico con cellule neuronali (Gheith et al. 2006). La tossicità sulle cellule di tre differenti tipi di MWNT, cioè lungo, breve non purificato e breve purificato, differisce in base alla lunghezza del nanotubo, la concentrazione, invece, non ha avuto alcun effetto sulla tossicità osservata, ciò è stato provato da un test in cui una concentrazione di 0.25-100  $\mu\text{g/ml}$  per ciascuna differente lunghezza di nanotubo è stata trattata per 48 ore e sono stati utilizzati tre diversi saggi per valutare i loro effetti. Il massimo effetto tossico è stato osservato in uno dei differenti saggi utilizzabili, con una morte cellulare che ha raggiunto il 50% per la concentrazione più bassa. [24] [25]

#### **4.1.2 Studi sulla tossicità in vivo**

Nonostante diversi anni di ricerca, i risultati definitivi relativi alla portata dei rischi tossicologici derivanti dall'uso di nanotubi sono ben lontani dall'essere completi. È necessaria una ricerca continua per determinare, ad esempio, come i CNT entrano nelle cellule, dove vengono internalizzati, quali sono i meccanismi citotossici rilevanti e come la nanotossicità è influenzata da una varietà di caratteristiche fisico-chimiche quali diametro, lunghezza, presenza di impurità, funzionalizzazione superficiale e bagnabilità superficiale. L'assorbimento di CNT nelle cellule svolge un ruolo fondamentale nella determinazione della loro citotossicità e genotossicità. Lo strato più esterno della cellula, la membrana cellulare, è costituito da un doppio strato fosfolipido, che serve a separare i compartimenti subcellulari al centro rispetto all'esterno della cellula e per regolare il trasporto di materiali estranei, tra cui i CNT, nelle cellule. Un percorso più comune per l'assorbimento cellulare di CNT è un trasporto attivo per endocitosi, che include fagocitosi e pinocitosi. Molti studi in vivo hanno dimostrato che CNT rilasciati ad una specifica area del corpo non sono limitati a quella zona, un esempio è stato dato da CNT iniettati per via endovenosa che sono giunti e poi sono stati assorbiti sia dal fegato che dalla milza e poi escreti rapidamente attraverso i reni. Al contrario, i SWCNT iniettati nel flusso sanguigno (dei topi) persistono nei macrofagi del fegato (cellule Kupffer), invece SWCNT, funzionalizzati con ammoniaca, vengono eliminati prevalentemente per via

renale senza assorbimento nella milza e nel fegato (Singh et al.). A causa dello spostamento dei CNT nei sistemi biologici, viene testata la loro tossicità anche su una varietà di organi. In molti casi, i macrofagi, che formano la prima linea di difesa contro i materiali estranei, interagiranno con i CNT. Dopo che i CNT sono stati ingeriti dai macrofagi, possono entrare nella circolazione sanguigna e linfatica. L'accumulo a lungo termine di SWCNT negli organi ha dimostrato non indurre alcuna apoptosi negli organi principali (Yang et al.). D'altra parte, ha causato, anche se in una bassa percentuale, aborti spontanei e malformazioni fetali nei topi femminili esposti a SWCNT incontaminati e formazioni di ROS nelle placente di feti malformati. I nanotubi di carbonio possono anche indurre l'actina (proteina fibrosa che può formare filamenti che compongono a loro volta il citoscheletro e che eseguono funzionalità essenziali come la generazione della forza e della motilità) e la riduzione della proliferazione cellulare che possono causare cambiamenti cronici alle funzioni cellulari.

La maggior parte delle indagini eseguite finora, che hanno esaminato l'interazione tra CNT e tessuti degli organismi in vivo, hanno prevalentemente valutato i risultati circa l'onere tossicologico e la risposta di questi materiali, piuttosto che valutare qualunque scopo terapeutico. Questo cambierà gradualmente in quanto aumenta la fiducia e la conoscenza su come gestire i nanotubi di carbonio nelle applicazioni biomediche. [24] [26] [27]

## 4.2 TOSSICITÀ DEL GRAFENE

Il futuro uso biologico del grafene richiede una comprensione approfondita della sua potenziale tossicità nella sua interazione con cellule e tessuti. La tossicità del grafene, e dei suoi derivati, è stata osservata e valutata attraverso studi *in vitro* e *in vivo*, ma i meccanismi esatti che sottendono la tossicità dei GFN rimangono ancora oscuri. Sicuramente, il profilo di tossicità è, come per molti altri nanomateriali a base di carbonio, fortemente dipendente dalla funzionalizzazione, dalla dimensione, dalla superficie chimica e dal tipo di aggregazione. Questi nanomateriali a base di grafene (GFN), per mezzo della loro nanodimensione, raggiungono diversi organi dopo l'iniezione nel corpo, passando attraverso la circolazione sanguigna, e le nanoparticelle con dimensioni <100 nm possono entrare nella cella, <40 nm possono entrare nel nucleo e inferiori a <35 nm possono attraversare la barriera emato-encefalica. L'intricata disposizione di questa barriera biologica, costituita da numerosi recettori di membrana e di vettori altamente

selettivi, rende difficile la comprensione del meccanismo di attraversamento da parte delle nanoparticelle, tuttavia, a riguardo, la ricerca ha fatto alcuni progressi nella nanotossicità, anche se questi studi sono molto rari e sono necessari ulteriori dati per trarre una solida conclusione. Numerosi risultati hanno dimostrato che il grafene ed i suoi derivati provocano tossicità dose-dipendente negli animali e nelle cellule, provocando lesioni epatiche e renali, formazione di granuloma polmonare, ridotta vitalità cellulare e apoptosi cellulare. Riguardo a quest'ultima, i GFN hanno dimostrato avere anche effetti pro-apoptotici nelle cellule; membrane cellulari fisicamente danneggiate da grafene aumentano la permeabilizzazione della membrana mitocondriale esterna, modificano il potenziale della membrana mitocondriale, aumentano la produzione di ROS che attivano a loro volta la caspasi-3, innescando, attraverso cascate apoptotiche mediate da mitocondri, l'esecuzione dell'apoptosi. Ma i danni generati dalla tossicità di questi nanomateriali non si arrestano alla sola apoptosi, ma provocano anche autofagia e necrosi. L'esposizione di cellule a dosi elevate (50 mg/ml) di grafene puro porta ad apoptosi e necrosi; tuttavia, come materiale non biodegradabile con grande potenziale per l'internalizzazione cellulare, sono necessari ulteriori indagini per valutare i possibili effetti negativi a lungo termine del grafene, in modo tale da poterlo utilizzare in campo medico. In vitro, la citotossicità delle nanoparticelle di grafene è largamente determinata da interazioni molecolari e tende a variare con la linea cellulare utilizzata durante l'esperimento.

Le recenti ricerche di GFN nel sistema nervoso centrale sono principalmente coinvolte nell'applicazione piuttosto che nella tossicità. I dati dello studio tossico su GFN sono in corso. [28] [30]

#### **4.2.1 Studi sulla tossicità in vitro**

L'interazione del grafene con le cellule è stato studiato *in vitro* utilizzando culture di diversi tipi di cellule umane, fra le quali le cellule neuronali (Zhang et al., 2010). Il grafene può indurre effetti citotossici e provocare lesioni mitocondriali nelle cellule neuronali, dopo un arco di tempo che va dalle 4 h alle 24 h, dal momento dell'iniezione di una dose di circa 10 µg / ml. Concentrazione, forma e funzionalizzazione superficiale del grafene hanno contribuito allo sviluppo degli effetti tossici, ed inoltre, l'ambiente circostante e le modalità di interazione con le cellule hanno influenzato la tossicità del nanomateriale (Liao et al. 2011). La citotossicità può indurre la modifica della vitalità e della morfologia

cellulare, e la distruzione dell'integrità della membrana. Nei diversi esperimenti effettuati i derivati del grafene, nell'interazione con le cellule, hanno drammaticamente inibito l'espressione differenziale di geni responsabili della struttura e della funzione della membrana cellulare, così come la regolazione della dinamica del citoscheletro, l'adesione focale e l'endocitosi. Nelle cellule di feocromocitoma del ratto (cellule PC12), il grafene e il GO hanno causato effetti citotossici e lesioni mitocondriali, rilascio di lattato deidrogenasi (LDH), aumento dell'attivazione della caspasi-3 e conseguente generazione di specie reattive dell'ossigeno. Il GO, in particolare, diminuisce l'adesione cellulare, induce apoptosi, ed entra nei lisosomi, nei mitocondri, nei nuclei cellulari e nell'endoplasma. Il grafene può causare la morte cellulare a seconda della linea cellulare, del tipo di grafene e della dose somministrata. Per esempio, GO ha sviluppato tossicità in fibroblasti umani e nelle cellule epiteliali polmonari a concentrazioni superiori a 20 µg/mL dopo 24 h, ma è stata riscontrata una tossicità minima nelle cellule tumorali polmonari (A549) a concentrazioni superiori (50 µg / mL). Nelle cellule HeLa (cellule tumorali immortalizzate altamente stabilizzate), invece, le risposte biologiche indotte da GO, quali specie reattive dell'ossigeno, malondialdeide (MDA, riflette lo stato della perossidazione lipidica) e L-lattato deidrogenasi (LDH, quando, in presenza di alcune patologie, le cellule sono danneggiate o distrutte, questo enzima aumenta la propria concentrazione in liquidi biologici, per es. il liquor) sono aumentate, mentre la superossido dismutasi (SOD, ha un ruolo antiossidante chiave, la mancanza di questo enzima porta alla morte dell'organismo a causa del forte stress ossidativo) è diminuita in maniera dose-dipendente. Un altro studio ha riportato che nanofogli di GO hanno soppresso sensibilmente al 20% la vitalità di cellule di neuroblastoma (della linea SH-SY5Y) a dosi elevate ( $\geq 80$  mg / ml) dopo le 96 ore di incubazione; a basse concentrazioni, invece, non hanno mostrato nessuna citotossicità entro le 96 ore di incubazione. [28] [29]

#### **4.2.2 Studi sulla tossicità in vivo**

Recentemente, la strategia di distribuzione e di escrezione del grafene all'interno dell'organismo è diventata una parte importante degli studi nano-tossicologici. Ad oggi, sono stati riportati in vari documenti diversi risultati controversi riguardanti la distribuzione e l'escrezione del grafene *in vivo*, ed ancora è necessaria una valutazione sistematica della tossicocinetica del grafene e dei suoi derivati (GFN). Il metabolismo e l'escrezione dei nanomateriali sono processi a lungo termine, tuttavia i recenti studi sono



stati limitati a valutazioni tossicologiche a breve termine e l'accumulazione e la tossicità a lungo termine, su tessuti diversi, rimangono ancora sconosciute. Pertanto, studi di lunga durata sulla deposizione e l'escrezione del grafene devono essere eseguiti utilizzando cellule e animali diversi per garantire la biosicurezza dei materiali prima dell'uso nelle applicazioni biomediche umane.

Il modello più utilizzato per lo studio della tossicità del grafene, in esperimenti *in vivo*, è il modello di embrione di pulcino. L'embrione di pulcino è un modello veramente utile per lo studio della tossicità a livello dell'intero organismo, incluso il cervello, grazie alla sua veloce crescita, alla sua sensibilità ai trattamenti esterni e soprattutto alla mancanza della barriera emato-encefalica nel principio della embriogenesi. In un esperimento che vede l'utilizzo di questo tipo di modello, sono stati utilizzati fiocchi di grafene puri che hanno ridotto il livello dell'acido ribonucleico e la velocità di sintesi dell'acido deossiribonucleico, portando ad effetti dannosi sullo sviluppo del tessuto cerebrale e conseguente formazione di un'atipica ultrastruttura cerebrale.

La polvere di grafene utilizzata nello studio era in fiocchi naturali, prodotti durante l'esfoliazione in fase liquida della grafite. In accordo con il produttore, la purezza del materiale era > 99,5%, con una superficie specifica di 120-150 m<sup>2</sup>g<sup>-1</sup> ed uno spessore delle particelle di circa 1-5 nm, con il diametro medio della superficie di 4 μm. Il grafene è stato disperso in una soluzione di acqua milli-Q<sup>1</sup> per preparare diverse sospensioni sperimentali, le quali sono state mescolate con l'albumina d'uovo ed il composto fatto incubare per un'ora. Ogni campione è stato controllato dopo 120 secondi di stabilizzazione a 25°C, con 20 repliche. Prima dell'incubazione, le uova sono state pesate e suddivise in maniera casuale in sette gruppi, ognuno con 30 uova. Il gruppo di controllo è il gruppo di uova non trattato, i gruppi restanti sono stati trattati con sospensioni di grafene in acqua milli-Q a diverse concentrazioni (50 μg/L, 100 μg/L, 500 μg/L, 1000 μg/L, 5000 μg/L, e 10000 μg/L). Le soluzioni sperimentali, somministrate in ovo mediante iniezione di 0,3 mL, sono state inoculate nell'albumina; dopo 19 giorni di incubazione le uova sono state aperte, gli embrioni pesati ed immediatamente decapitati. Successivamente è stata esaminata la morfologia dell'embrione, seguendo disposizioni di protocolli standard. I campioni del cervello hanno potuto subire due diversi trattamenti: o sono stati preparati per l'esame microscopico o sono stati fissati in azoto liquido e conservati a -80 °C per le analisi in sospenso. Per quanto riguarda la preparazione all'esame

---

<sup>1</sup> La Milli-Q è un'acqua purificata e deionizzata ad alto livello; il sistema di purificazione usa filtri a resine e deionizzazione, e monitora la concentrazione degli ioni misurando la resistenza elettrica dell'acqua.

microscopico, i tessuti cerebrali del gruppo di controllo e dei gruppi trattati sono stati adeguatamente fissati, poi disidratati, ed infine, incorporati ad una resina, per poter poi essere sottoposti all'esame TEM<sup>2</sup>. Le immagini TEM mostrano sia il più piccolo fiocco, che misura circa 400 nm, che il fiocco più grande, che misura più di 10 µm. La forma dei fiocchi di grafene appare irregolare con bordi taglienti, formanti ruvide strutture. Gli spettri della riflessione luminosa dei campioni di particelle mostrano intensi picchi che corrispondono a legami arilici C=C e legami eteri C-O, i quali confermano il comportamento idrofobico del grafene puro. Il potenziale zeta<sup>3</sup> dei fiocchi sospesi in acqua milli-Q ha un valore di -21.8 mV ad una concentrazione di 50 µg/L e decresce all'aumentare della concentrazione di grafene. Il potenziale zeta per concentrazioni >1000 µg/L non è possibile misurarlo a causa dell'aggregazione dei fiocchi di grafene. L'albumina d'uovo contiene un ampio spettro di composti nutrizionali diversi, principalmente proteine, ed il potenziale zeta dell'albumina ha un valore di -7.59 mV. Le misurazioni del potenziale zeta dell'albumina e delle diverse concentrazioni di grafene mescolate all'albumina hanno indicato che il nanomateriale, indipendentemente dalle concentrazioni, ha raggiunto il potenziale zeta caratteristico dell'albumina. Questa osservazione può confermare l'ipotesi che le nanoparticelle, dopo essere state introdotte nel medium biologico (albumina), possono essere rivestite, attaccate o legate da biomolecole che possono modificare la loro dispersione e, di conseguenza, provocare effetti tossici. Il grafene è un materiale idrofobico, e mostra una stabile dispersione in solventi polari, amminoacidi e proteine hanno regioni idrofobiche che possono interferire con il grafene idrofobico e, a seconda della quantità di grafene (in proporzione alle proteine), il grafene può circondare le proteine o essere circondato dalle proteine. Di fatto, il cervello contiene circa il 60% di grassi, essendo uno degli organi con il maggior contenuto di lipidi, e ciò porta inevitabilmente all'accumulo delle molecole idrofobiche di grafene. La dispersione può essere diversa prima dell'iniezione (nella sola acqua) e dopo l'iniezione in albumina, grazie alle specifiche proprietà dell'albumina stessa. A

---

<sup>2</sup> Il microscopio elettronico a trasmissione o TEM è usato nei casi in cui la risoluzione di un microscopio ottico è troppo bassa per distinguere i particolari che si vogliono osservare.

<sup>3</sup> Il potenziale zeta, o potenziale elettrocinetico, è il potenziale generato in seguito alla formazione di un doppio strato elettrico. Esso è responsabile dei fenomeni elettrocinetici e della stabilità dei colloidi. Con un valore elevato di potenziale zeta si originano repulsioni elettrostatiche che impediscono l'aggregazione delle particelle disperse. Un basso valore del potenziale crea forze attrattive che prevalgono sulle repulsioni e si verificano processi quali la coagulazione e la flocculazione.

concentrazioni più basse, la dispersione di fiocchi è più elevata e, di conseguenza, la penetrazione nell'embrione è più attiva rispetto alle alte concentrazioni, quando i fiocchi si agglomerano più facilmente fra loro. Questi risultati sulla distribuzione sono stati verificati successivamente all'apertura delle uova, ed hanno dimostrato che una concentrazione crescente di grafene ha portato alla formazione di strisce di agglomerati altamente visibili; di conseguenza la distribuzione del nanomateriale dentro le uova è diminuita con il crescere della concentrazione, ed i grandi agglomerati di grafene, anche se si diffondono nelle uova con meno efficacia, causano tossicità. La chiave determinante della tossicità del nanomateriale è la natura chimica dei gruppi legati sulla sua superficie. Questa è causata dall'affinità del grafene verso i lipidi, i quali formano le membrane cellulari. Così, i fiocchi di grafene hanno mostrato forte adesione alla membrana cellulare e si sono accumulati con facilità nell'area circostante alla membrana lipidica.

La sopravvivenza di embrioni è significativamente diminuita dopo il trattamento con il grafene in tutti i gruppi sperimentali. La visualizzazione macroscopica ha anche individuato alcuni difetti dello sviluppo, principalmente nei gruppi trattati con una dose di 1000 µg/L. Le malformazioni osservate erano principalmente nella testa, nel collo e nella colonna vertebrale. Tuttavia, peso corporeo e peso dei diversi organi, compreso il cervello, necessari per il corretto sviluppo degli embrioni, sopravvissuti fino al ventesimo giorno, non differivano tra i diversi gruppi (trattati e non). L'esame dell'ultrastruttura cerebrale ha mostrato alcune alterazioni cellulari negli embrioni trattati, non riscontrate nel gruppo di controllo, le quali aumentavano all'aumentare della concentrazione di nanomateriale disperso. Il grafene ha, quindi, dimostrato indurre, in alcuni casi, una tossicità dose-dipendente nelle cellule neuronali umane.

Nell'organismo sviluppato, la barriera emato-encefalica è riconosciuta come non permeabile alle piastrine di grafene. Tuttavia, in questo esperimento il grafene è stato impiantato prima della formazione della barriera emato-encefalica, ed ha provocato alcuni cambiamenti istologici e patologici in tutti i gruppi trattati, indipendentemente dalla concentrazione, mostrando anche alcune distorsioni della citoarchitettura dei campioni cerebrali. Le anomalie dell'ultra-architettura tissutale indicano effetti patologici del grafene sulla struttura delle membrane lipidiche, confermando che queste possono essere una particolare piattaforma per la localizzazione del grafene idrofobico.

Va sottolineato che questo esperimento è stato eseguito su un modello di organismo intero e non su un modello di coltura cellulare, di conseguenza, il movimento e la distribuzione dei nanofocchi di grafene entro tessuti potrebbe essere differente ed il grafene, circolato

all'interno dell'organismo attraverso diverse vie, si è depositato nel cervello prima dello sviluppo della barriera emato-encefalica, che inizia a formarsi al decimo giorno dell'embriogenesi.

I risultati attuali indicano chiaramente l'effetto tossicologico nel modello di embrione: il grafene ha colpito il tasso di sopravvivenza degli embrioni, alterato l'ultrastruttura del cervello e ridotto il tasso di sintesi del DNA, ma non solo, è emerso anche che l'effetto tossico ha influenzato la vacuolizzazione del tessuto cerebrale e questa, se sviluppata all'interno dei neuroni, può essere generalmente segno di sviluppo di alcune malattie del sistema nervoso, inoltre, esperimenti effettuati su particolari linee cellulari hanno sottolineato la possibilità che il grafene induca necrosi cellulare, tuttavia, l'apoptosi è il meccanismo dominante.

Come struttura bidimensionale, ma anche come molecola idrofobica, il grafene può causare effetti tossici, dipendenti non solo dalla concentrazione, ma anche dall'interazione con altre biomolecole e dal tipo di vie di distribuzione negli organismi viventi. Di conseguenza, il comportamento e la tossicità della nanostruttura a contatto con l'organismo vivente possono non avvenire tramite classici meccanismi tossicologici e fisiologici standard. Inoltre, gli effetti tossici misurati sono stati causati dai fiocchi di grafene con dimensioni e forma specifici. Questo limita la generalizzazione dei risultati ad altre particelle di grafene, aventi caratteristiche fisico-chimiche diverse e potendo quindi causare effetti tossicologici diversi. [30]

## **5 BIOCOMPATIBILITÀ**

La biocompatibilità di un nanomateriale può essere un termine sfuggente e difficile da definire con precisione, e molto dipendente dal contesto di applicazione e uso. Nel presente contesto e campo di studio, con biocompatibilità dei nanomateriali si intende: (a) capacità di interagire con l'ambiente biologico in assenza di reazioni avverse (ad esempio apoptosi, distacco cellulare, necrosi tessutale); (b) assenza di risposte infiammatorie acute; (c) assenza di intossicazione dal metabolismo di componenti chimici; (d) assenza di accumulo di tessuto a lungo termine che porta a depositi di materiale nel corpo. Le caratteristiche fisico-chimiche di ogni nanomateriale sono evidentemente fondamentali parametri che determineranno le risposte biologiche ottenute dall'interazione con la materia biologica e la modulazione della natura chimica dei nanomateriali, mediante legame covalente e non, può portare a cambiamenti radicali nelle sue proprietà fisiche e biologiche. È necessario sottolineare che il profilo tossicologico ed il rischio dipendono fortemente dalla distribuzione, accumulo e ritenzione del tessuto (biopersistenza) di qualsiasi nanomateriale. Le autorità di regolamentazione prestano molta attenzione a tale comportamento, poiché la biopersistenza è comunemente associata a rischi di tossicità a lungo termine.

### **5.1 BIOCOMPATIBILITÀ DEI NANOTUBI DI CARBONIO**

Il successo delle applicazioni biologiche dei nanotubi di carbonio nel sistema nervoso centrale è strettamente dipendente dalla loro compatibilità con questo tessuto. In termini di biocompatibilità, in base alle conoscenze generate da diversi laboratori durante l'ultimo decennio, è ora ben accettato che la funzionalizzazione chimica dei nanotubi di carbonio possa portare a un profilo di biocompatibilità notevolmente migliore, che è stato sfruttato per esplorare vari aspetti dei CNT funzionalizzati nelle scienze biomediche.

I CNT chimicamente e fisicamente modificati ed il loro legame con altre macromolecole possono essere studiati nel contesto delle indagini di biologia cellulare. Le interazioni fondamentali tra CNT e cellule, compartimenti intracellulari od altri componenti cellulari vengono gradualmente studiate. La nostra attuale conoscenza sui nanotubi funzionalizzati e sulla loro interazione con le cellule è basata sulla dimostrazione di meccanismi di legame con le membrane plasmatiche e di internalizzazione nelle cellule, che possono essere ulteriormente migliorati sulla base della struttura e della chimica superficiale dei nanotubi di carbonio. I risultati provenienti da diversi laboratori hanno dimostrato che i nanotubi funzionalizzati sono in grado di passare direttamente nel citoplasma delle cellule

neuronal, inoltre, la comprensione dei parametri fisico-chimici e farmacologici specifici, che sono implicitamente coinvolti nella determinazione dei profili farmacocinetici (ad esempio emivita circolatoria) e farmacodinamici (distribuzione tissutale, assorbimento) di CNT funzionalizzati, è indispensabile per la conoscenza clinica. Le relazioni struttura-funzione, che determinano il profilo (specialmente *in vivo*) dei nanotubi funzionalizzati, studiate usando tecniche di imaging su piccoli animali (come la tomografia computerizzata a emissione di singolo fotone, SPECT) hanno messo in luce che la distribuzione nel tessuto dipende, in modo critico, da un mix di parametri comprendenti le caratteristiche strutturali e di superficie di nanotubi funzionalizzati e la via di somministrazione.

Un'ulteriore caratteristica che gioca un ruolo significativo nella biocompatibilità è la biodegradabilità. La biodegradazione dei CNT da parte delle cellule cerebrali è stata studiata *in vitro* e *in vivo*. Forti evidenze suggeriscono che i CNT possono essere degradati all'interno del tessuto cerebrale tramite la mieloperossidasi (MPO) ed il perossido di idrogeno ( $H_2O_2$ ). In presenza di  $H_2O_2$ , l'MPO promuove la biodegradazione di SWNT attraverso la generazione dello ione ipoclorito che ossida parti della struttura di CNT. È importante sottolineare che l'eventuale presenza di PEG (ampiamente utilizzato per aumentare la biodisponibilità *in vivo*) non ha interferito con questo processo. Questa biodegradazione di SWNT ossidati e rivestiti con PEG (SWNT-PEG) è stata osservata dopo incubazione di 7 giorni con MPO,  $H_2O_2$  e NaCl; la biodegradazione di SWNT-PEG si è sviluppata in un processo a due fasi, con lo stripping iniziale del rivestimento di PEG, seguita dalla degradazione di SWNT attraverso difetti superficiali.

Complessivamente, l'elevata area superficiale dei CNT, la capacità intrinseca di attraversare il BBB, la tossicità controllata e la degradabilità in presenza di enzimi MPO sono proprietà / osservazioni incoraggianti per le future applicazioni dei CNT nel cervello, anche se, nonostante i notevoli progressi, le applicazioni diffuse dei CNT sono ancora considerate con apprensione a causa dei rischi segnalati che possono essere associati al loro uso. [26] [32]

### 5.1.1 Biocompatibilità in vitro

Uno studio, in cui cellule neuronali ippocampali su SWNT chimicamente funzionalizzati con copolimeri (PABS o PEG) sono state sottoposte ad incubazione, ha evidenziato che la nanostruttura utilizzata non ha influenzato l'attività cellulare (Ni et al., 2005), tuttavia, non è da escludere il verificarsi di cambiamenti circa la loro morfologia e l'eventuale

inibizione dei canali del sodio e del potassio. L'insieme di queste osservazioni hanno suggerito che le proprietà elettrofisiologiche dei neuroni possono essere influenzate dal passaggio di corrente elettrica attraverso substrati a base di nanotubi di carbonio; tale effetto è legato all'apertura dei canali ionici, tramite cui i substrati basati su CNT possono promuovere un accoppiamento elettrico con le cellule neuronali (Gheith et al., 2009). Diversamente da questi risultati, la funzionalizzazione chimica di MWNT con ammine, tramite reazione di cicloadizione 1,3 dipolare, sembra non agire sulla vitalità cellulare, sulla morfologia neuronale e sulla normale funzione primaria dei neuroni, nonostante tale funzionalizzazione renda i nanotubi altamente biocompatibili con le cellule neuronali; tuttavia, come aspetto positivo si presenta una normale attività spontanea dei neuroni dopo l'incubazione con i MWNT (Gaillard e colleghi, 2009).

Questi risultati sottolineano l'importanza della caratterizzazione fisico-chimica dettagliata del nanomateriale utilizzato, anche se un'altra importante caratteristica è la differente conduttività del CNT, un parametro non spesso considerato e descritto. La conduttività dei substrati a base di SWNT possono influenzare la crescita e la morfologia neuronale; i risultati hanno mostrato che il solo substrato in una stretta gamma di conduttività ( $< 0,3$  S/cm) è capace di indurre la crescita neuronale e del neurite, mentre con una più elevata conduttività dei substrati questo effetto svanisce (Malarkey et al., 2009).

Altri aspetti importanti che possono inibire la tossicità e quindi contribuire alla biocompatibilità del materiale sono lo stato di dispersività e la funzionalizzazione superficiale del materiale. Occorre prestare attenzione nella scelta della molecola tensioattiva utilizzata per migliorare la dispersività dei nanotubi, in quanto l'eventuale attività tossica o litica delle molecole di rivestimento potrebbe influenzare la tossicità complessiva del nanotubo di carbonio. Ciò è stato messo in luce da una serie di esperimenti, i quali hanno mostrato che ogni volta che i SWNT erano dispersi in presenza di colato di sodio (SC), la proliferazione cellulare non veniva sufficientemente favorita (Dong et al., 2008-2009). L'uso sicuro di CNT a contatto con i tessuti neuronali è visto come strettamente dipendente dalla loro dispersività acquosa (Kostarelos 2008; Smart et al., 2009). Una gamma di SWNT rivestiti in poliossietilene sorbitano mono-oleato hanno presentato diverse dispersività; l'incubazione di colture neuronali su questi tipi di SWNT ha creato interesse, perché, sebbene nessuno dei CNT utilizzati ha prodotto la crescita del neurite, l'impatto che ha avuto sulla vitalità cellulare era strettamente dipendente dal grado di dispersività e di concentrazione nella soluzione di nanotubi di carbonio (Belyanskaya et al., 2009). [26] [31] [32]

### 5.1.2 Biocompatibilità in vivo

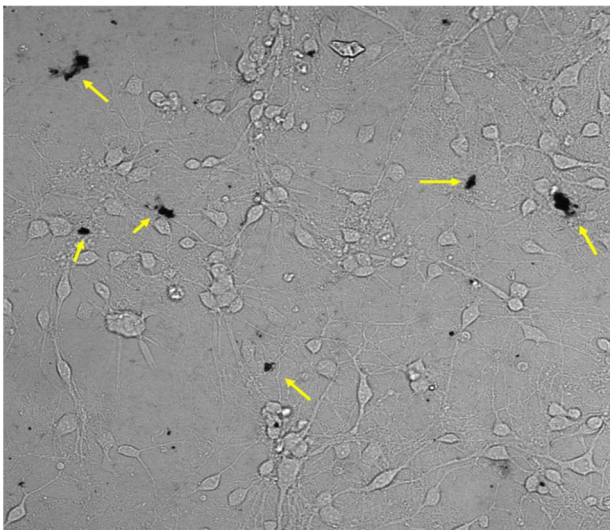
La comprensione dell'interazione tra CNT e cellule neuronali *in vivo* è di grande importanza, soprattutto in considerazione del loro potenziale uso nella neurologia. Finora, sono stati riportati solo pochi studi sulla biocompatibilità dei nanotubi di carbonio all'interno del tessuto cerebrale *in vivo* ed hanno originato un enorme dibattito in letteratura circa la tossicità, con dati a favore e contro un'interazione dannosa tra CNT e tessuti biologici. Sfortunatamente, questi studi hanno utilizzato diversi tipi di CNT, diversi rivestimenti e diversi biotest. Tutti questi fattori hanno dimostrato influenzare i risultati circa la tossicità. Pertanto, sembra cruciale che la convalida dei CNT come nanodispositivi terapeutici per la biomedicina debba utilizzare nanotubi di carbonio specifici con rivestimento standardizzato e dovrebbe adottare saggi biologici il più vicino possibile alla situazione *in vivo*. Fra i diversi studi empirici, l'unico che ha dato risultati promettenti circa la biocompatibilità del CNT nell'ambiente cerebrale di animali, è stato eseguito da Giuseppe Bardi e colleghi (2009), i quali hanno iniettato nanotubi di carbonio a parete multipla rivestiti con il tensioattivo non ionico idrosolubile Pluronic F127 nella corteccia visiva di un topo, senza sviluppare effetti tossicologici a livello cellulare.

Per rilasciare CNT nel cervello o in qualsiasi sistema biologico, è necessario disperderli prima in soluzione usando tensioattivi speciali. Questa operazione è già di per sé una grande sfida, perché i CNT tendono a formare fasci e ammassi. Il pre-rivestimento di CNT con Pluronic F127 (PF127; Sigma, St. Louis, Missouri) ha avuto successo nel promuovere la dispersione dei CNT nelle soluzioni acquose, essendo inoltre sostanzialmente non tossico alle concentrazioni richieste per la dispersione dei nanotubi. Il metodo di produzione di MWNT si basa sulla sintesi di nanostrutture di carbonio mediante deposizione chimica da vapore su substrati di allumina impregnati con catalizzatori metallici (ferro). L'avvolgimento non covalente della superficie tubolare è stato eseguito con il tensioattivo PF127 (dispersione sterica). La soluzione di acqua-PF127 (0,1%) contenente 0,5 mg / ml di MWNTs è stata posta su una piastra calda (a 70 ° C) sotto agitazione magnetica per 4 ore; la miscela risultante sonicata a 20 W per 12 ore. La miscela è stata quindi centrifugata a 900 g per 10 minuti per rimuovere i nanotubi non condensati. La concentrazione della soluzione di CNT misurata mediante apposita analisi era compresa nell'intervallo 30-150 µg / mL. Il punto di forza di questa procedura è che i nanotubi trattati secondo questo processo hanno mantenuto le loro proprietà elettroniche originali. Per capire se i MWCNT possano essere realmente usati come nanodispositivi per applicazioni cerebrali, abbiamo studiato la capacità o meno, della



nostra soluzione PF127-MWCNT, di indurre il danno *in vivo*. In questo studio i MWCNT rivestiti con PF127 sono stati rilasciati nella corteccia cerebrale del topo mediante microiniezione e successivamente ne è stata osservata l'istologia del tessuto circostante. I topi, sottoposti all'esperimento, sono stati anestetizzati e posizionati su un apparato stereotassico. Le iniezioni sono state effettuate in specifiche posizioni stereotassiche nella corteccia visiva per mezzo di una pipetta di vetro montata su un micromanipolatore motorizzato a tre assi collegato ad un iniettore (Sutter Instruments, Novato, California). Sono stati rilasciati 350 nL a 700  $\mu\text{m}$  e altri 350 nL a 400  $\mu\text{m}$  sotto la superficie corticale, per consentire una dispersione omogenea dei CNT lungo la profondità della corticale. Durante le iniezioni, gli animali sono stati ossigenati e riscaldati per mezzo di una coperta con un termostato per garantire una temperatura di 37 ° C. Dopo l'intervento chirurgico, è stato somministrato l'antibiotico per prevenire eventuali infezioni. Dopo il recupero dall'anestesia, gli animali sono stati riposti all'interno delle loro gabbie. Nell'analisi istologica è emerso che il PF127-MWCNT iniettato non ha provocato danni all'organizzazione complessiva del cervello del topo e che l'organizzazione in strati del tessuto circostante il sito dell'iniezione non è stata modificata nei 3 giorni successivi, tuttavia, in corrispondenza al sito dell'iniezione era presente una piccola area di lesione. Mediante apposita apparecchiatura è stato ricostruito il volume della lesione per quantificare il danno indotto. Nei giorni successivi i nanotubi iniettati non hanno aumentato il volume della lesione creata dall'iniezione stessa, anche se, diciotto giorni dopo l'iniezione, i topi trattati con CNT hanno presentato la formazione di una cicatrice gliale nella corteccia, localizzata nel sito di iniezione, senza però importanti alterazioni della struttura corticale. Questi dati hanno dimostrato che l'iniezione di PF127-MWCNT non aumenta la lesione indotta dal danno meccanico della microsiringa, mostrando inoltre che, dopo un lungo periodo di tempo, questo danno si è ridotto anche in presenza dei nanotubi. Una concentrazione di 3,5  $\mu\text{g} / \text{mL}$  di MWCNT dispersi in 0,01% PF127 nelle colture neuronali primarie *in vitro* non ha influenzato il numero di cellule, cioè, dopo 48 ore di trattamento con il solo PF127 è stata osservata una riduzione della morte cellulare dovuta alla presenza di MWCNT dispersi nel mezzo cellulare. Anche il conteggio dei neuroni apoptotici, dopo lo stesso trattamento con MWCNT e PF127, è stato significativamente ridotto: una maggiore concentrazione di MWCNT (17,5  $\mu\text{g} / \text{mL}$ ) dispersa in PF127 allo 0,05% è stata in grado di ridurre significativamente la morte cellulare apoptotica dopo 24 ore. La curva dose-risposta di concentrazione crescente di PF127 indica che il metabolismo cellulare viene fortemente ridotto, tuttavia, la presenza

di MWCNT nella soluzione con PF127 evita in modo significativo questa riduzione. I CNT non trattati non inducono alcuna differenza nel metabolismo basale dei neuroni. Tutti questi dati mostrano che i MWCNT dispersi con PF127 sono ben tollerati dai neuroni primari. Pertanto, il ruolo della somministrazione *in vivo* è fondamentale per progredire in questo campo di esplorazione. Questi risultati suggeriscono che i CNT rivestiti di Pluronic sono dispositivi biocompatibili, tuttavia, la formazione di una cicatrice gliale che circonda i nanotubi iniettati, ha portato a credere che sia necessaria un'indagine più precisa sulla tossicità a lungo termine, sulla cancerogenicità e sulle proprietà infiammatorie dei CNT prima che qualsiasi applicazione possa essere trasferita alla ricerca umana. [33]



**Figura 4.** Colture neuronali primarie miste in presenza di MWCNT puro (freccie gialle) [33]

## 5.2 BIOCOMPATIBILITÀ DEL GRAFENE

Il grafene viene proposto come piattaforma bioelettronica per registrare e stimolare cellule elettrogeniche come i neuroni e con il crescente interesse del suo utilizzo nelle applicazioni biomediche, diversi studi hanno tentato di esaminare l'interazione di particelle di grafene con diverse cellule e modelli animali per chiarire i meccanismi sottostanti di biocompatibilità. I substrati a base di grafene (GBS) sono materiali inerti ai neuroni con cui si interfacciano, in grado di preservare il livello fisiologico basale dell'attività neuronale. La capacità di interfacciare la ricrescita del circuito neuronale e della sinapsi senza alterare il comportamento delle cellule può consentire la fabbricazione di dispositivi basati su grafene per applicazioni mediche, come biosensori e neuroprotesi, in cui i GBS all'interfaccia tissutale determinano un'interazione efficiente con le cellule.

Il grafene ed i suoi derivati sono prodotti seguendo due protocolli diversi, LPE e BM, al fine di svelare i possibili effetti della produzione, elaborazione, deposizione e struttura dei materiali sull'attività neuronale. Entrambi i protocolli portano ad una semplice microfabbricazione del grafene, che in aggiunta alla conseguente mancanza di impurità citotossiche e ad una maggiore conduttività hanno reso il grafene il bionanomateriale in via di sviluppo accanto ad i nanotubi di carbonio. Nonostante il suo potenziale biomedico, la biocompatibilità di questo nanomateriale non è stata effettivamente valutata, e, per esempio, nessuno studio ha tentato di chiarire se il grafene puro è tossico per i neuroni, ma più che altro si è cercato di capire se è più o meno compatibile rispetto a suoi diversi derivati. In generale, si è comunque convenuto che questo nanomateriale ha la tendenza ad assorbire le proteine sulla sua superficie, limitando così l'interazione diretta con le cellule, e riducendo al minimo la possibilità di generare tossicità; la citotossicità del grafene rimane ampiamente determinata dalle interazioni molecolari e tende a variare con il tipo di linea cellulare, di granulometria, di concentrazione, di interazione chimica e di metodi di elaborazione. Queste conoscenze suggeriscono collettivamente che l'effetto citotossico dei nanomateriali a base di grafene dipendono fortemente dalla chimica di superficie, dalle dimensioni delle particelle, dalla forma e dalla concentrazione. È, inoltre, possibile personalizzare la modellazione e la bagnabilità della superficie per controllare la risposta cellulare e la natura conduttiva che può influenzare il comportamento cellulare. La biocompatibilità dei materiali derivati da grafene dipende, quindi, dalle loro proprietà fisiche e chimiche, e la scelta del metodo di sintesi produce grafene, e derivati, con differenti proprietà fisico-chimiche, che possono suscitare differenze nella risposta cellulare.

### **5.2.1 Biocompatibilità in vitro**

Ci sono stati studi che hanno dimostrato che il grafene è biocompatibile con i neuroni; tuttavia, la limitazione chiave in questi esperimenti è la mancanza di indagini dell'effetto del grafene sullo stress cellulare, che utilizzano indicatori intracellulari affidabili e sensibili nelle giuste condizioni fisiologiche. Volendo superare questa limitazione e valutare l'effetto del grafene sullo stress cellulare, si utilizzano tre indicatori altamente sensibili: potenziale della membrana mitocondriale (MMP), morfologia mitocondriale e livelli di autofagia. Innanzitutto, il grafene a strato singolo è stato sintetizzato utilizzando la deposizione chimica di vapore a bassa pressione (LPCVD) e trasferito su substrati di vetrino copri-oggetto, successivamente sono stati testati l'effetto del grafene sulla vitalità delle cellule e lo stress cellulare, caratterizzando la MMP, la morfologia mitocondriale e

L'analisi dei livelli di autofagia su neuroni ippocampali primari di ratto *in vitro*. Tutti i suddetti test sono stati eseguiti utilizzando l'imaging live-cell per consentire l'osservazione delle strutture interne e dei processi cellulari in tempo reale e fornire informazioni più affidabili e fisiologicamente rilevanti che non sono accessibili con l'immunofluorescenza. La MMP svolge un ruolo importante nel mantenimento del gradiente protonico attraverso la membrana mitocondriale, che è essenziale per la catena di trasferimento degli elettroni. MMP è uno degli indicatori intracellulari più affidabili e sensibili della salute o delle lesioni delle cellule. La depolarizzazione della membrana mitocondriale è uno degli eventi chiave associati allo stress cellulare. Le interruzioni della MMP possono causare gravi conseguenze fisiologiche, tra cui la diminuzione della sintesi di ATP, l'aumento della produzione di ROS e la redistribuzione di fattori mitocondriali pro-apoptotici che portano all'apoptosi della cellula. Il tetrametilrodamina etil estere (TMRE) è un marcatore quantitativo di fluorescenza per l'attività dei mitocondri. Maggiore è la concentrazione di colorante all'interno dei mitocondri, maggiore è la fluorescenza del TMRE. I risultati mostrano che le cellule coltivate su substrato di grafene puro mostrano una fluorescenza non significativamente differente in termini di intensità rispetto alle cellule coltivate su vetro, indicando che il grafene non influenza la MMP. La morfologia mitocondriale fornisce un altro indicatore affidabile e sensibile per lo stress cellulare. Una diminuzione della connettività e la formazione di mitocondri rotondi e brevi compromettono la funzione mitocondriale. Questi cambiamenti da morfologie tubulari a frammenti di mitocondri altamente ramificati sono regolati dai tassi di eventi di fissione e fusione, che vengono interrotti quando la cellula è sotto stress. Le apparizioni simili di mitocondri con morfologia tubulare nelle cellule coltivate su substrati di controllo e di grafene supportano ulteriormente l'osservazione che il grafene non induce stress cellulare. Il livello di autofagia fornisce un altro indicatore affidabile e sensibile dello stress cellulare. Durante l'autofagia, una proteina associata a microtubuli chiamata LC3-I si lega alla fosfatidiletanolamina per formare il coniugato LC3-fosfatidiletanolamina (LC3-II); l'aumento di LC3-II può derivare sia da un'aumentata formazione di autofagosomi che dal blocco della loro degradazione. Per quantificare i relativi livelli di autofagia nelle cellule coltivate in condizioni diverse, abbiamo calcolato il puncta dell'autofagosoma per cellula. Per determinare i livelli di autofagia nelle cellule coltivate su grafene, abbiamo trasfettato le cellule con proteina fluorescente rossa fusa con LC3 (RFP-LC3); i segnali RFP diffusi in tutto il citoplasma e il nucleo con un numero

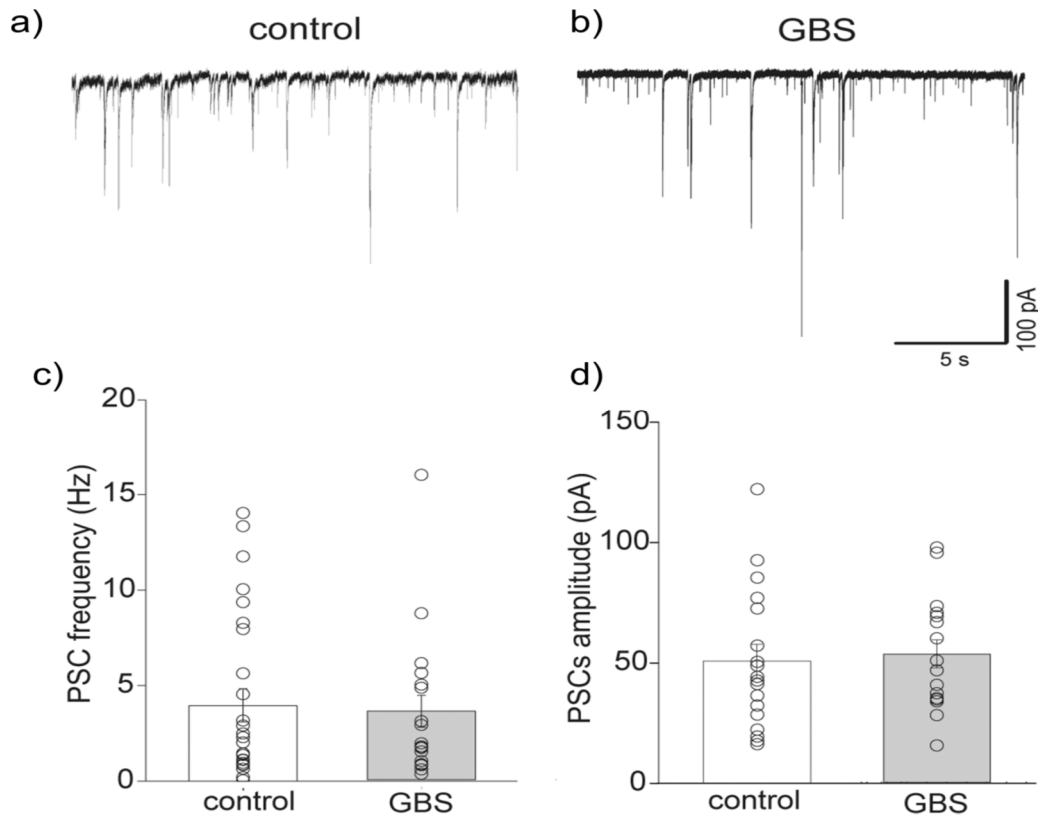
significativamente basso di puncta di autofagosoma nelle cellule coltivate su substrati di grafene convalida che il grafene non induce stress cellulare.

In conclusione di ciò, il grafene puro promuove l'adesione cellulare e la proliferazione cellulare di cellule neuronali, non influenza la MMP, la morfologia mitocondriale o i livelli di autofagia, indicando che non sono rilevabili effetti avversi sullo stress cellulare. La biocompatibilità cellulare del grafene evidenzia il potenziale del grafene da utilizzare nelle applicazioni biomediche fornendo interfacce neurali a lungo termine e stabili, in particolare nel campo della bioelettronica per studiare l'elettrofisiologia neurale. [34]

Un'ulteriore serie di esperimenti è stata progettata per confrontare separatamente la capacità dei diversi substrati di grafene, preparati tramite i protocolli LPE e BM, per interfacciare e consentire la formazione di reti neuronali in vitro, e confrontati con colture cresciute sui rispettivi substrati di controllo. Per esaminare le cellule neuronali quando interfacciate ai vari substrati, sono state confrontate le loro proprietà passive della membrana, cioè la resistenza di ingresso e la capacità (di un sistema di immagazzinare una carica elettrica) delle cellule, che sono anche indicative delle condizioni di salute neuronale. Nel singolo set di dati, i neuroni cresciuti su LPE o su BM vengono misurati rispetto alle loro culture di controllo (cioè all'interno delle stesse serie di colture) e questi risultati mostrano che entrambe le condizioni di substrati a base di grafene testate consentono la crescita neuronale senza apparenti differenze rispetto ai parametri misurati nei substrati di controllo. I neuroni sono stati studiati mediante microscopia elettronica e immunofluorescenza: quelli posti su grafene hanno mostrato una morfologia normale caratterizzata da soma circolare ben definito e arborizzazione del neurite estesa e densità cellulare simile ai substrati di controllo. La densità delle cellule neuronali, quantificata dalla colorazione dei nuclei neuronali con un marcatore specifico, è  $91 \pm 13$  neuroni /  $\text{mm}^2$  sul substrato di controllo e  $104 \pm 11$  cellule /  $\text{mm}^2$  su grafene (immunofluorescenza mostrata per controllo e LPE-GBS).

In vista dello sviluppo di substrati a base di grafene biocompatibili in grado di preservare completamente la funzionalità neuronale, è importante verificare se il grafene influisce sul comportamento sinaptico della rete, poiché ciò è predittivo dell'elaborazione delle informazioni. A tale scopo, sono state analizzate sia l'attività spontanea della rete che la connettività sinaptica neuronale in culture sviluppate su GBS e su substrati di controllo. La **Figura 5-a,b** mostra tipiche correnti postsinaptiche spontanee eterogenee (PSC) registrate da un neurone del substrato di controllo (**Figura 5a**) e da neuroni cresciuti sulla superficie di GBS (**Figura 5b**). L'interfacciamento con il grafene non influenza la

frequenza delle PSC spontanee e la loro ampiezza. Le dimensioni della rete di colture grafene-interfacciate e di controllo sono simili, come indicato dalla densità neuronale, di conseguenza esse contribuiscono in modo uguale alle frequenze delle PSC. Le interfacce GBS non alterano la frequenza della PSC spontanea.



**Figura 5.** Tracciati di corrente PSC registrate da neuroni sottoposti a voltage clamp coltivati su substrati di controllo (a) o su LPE-GBS (b). La frequenza e l'ampiezza delle PSC spontanee sono quasi identiche nei neuroni cresciuti su (c) controllo e su (d) GBS. Ogni punto rappresenta i valori di un singolo neurone. [35]

Indirettamente, è stato misurato l'impatto dei GBS sulla formazione in vitro di contatti funzionali (cioè la sinaptogenesi), mediante il patch clamping di coppie di neuroni selezionate casualmente. In ogni coppia di cellule, viene indotto un potenziale d'azione nel neurone presinaptico e la connessione monosinaptica tra i due neuroni viene valutata dalla risposta della PSC nei neuroni postsinaptici. La probabilità di trovare coppie di neuroni accoppiati in modo monosinaptico (espressa in %) da una misura delle connessioni sinaptiche funzionali formate nella rete in vitro. Osserviamo un accoppiamento % su GBS simile a quello trovato sui substrati di controllo, indicando così che l'interfacciamento di GBS non altera la sinaptogenesi. Nessuna differenza

nell'ampiezza dei potenziali di azione presinaptica indotta si trova tra i neuroni in controllo e GBS. L'osservazione che i GBS supportano lo sviluppo funzionale neuronale in assenza di qualsiasi perturbazione delle prestazioni sinaptiche della rete neuronale è incoraggiante. Nella progettazione futura di impianti elettro-funzionali, l'uso di nuovi materiali caratterizzati dalla capacità di integrarsi con il tessuto e che, allo stesso tempo, non influenzano il comportamento tissutale eccitabile, è altamente rilevante. I nostri dati indicano che entrambi i GBS sono promettenti per sistemi bioelettronici di prossima generazione, da utilizzare come interfacce cerebrali.

Altri lavori hanno dimostrato la piena biocompatibilità delle interfacce a base di grafene rivestite con peptidi con i neuroni dell'ippocampo (grafene rivestito di polisilicio) o cellule staminali neurali (grafene rivestito con laminina), anche se, il rivestimento con il peptide, può indebolire i contatti elettrici tra neurone ed interfaccia e la trasmissione del segnale elettrico, con conseguente trasferimento della carica non ottimale.

Il confronto effettivo tra gli studi che si occupano della biocompatibilità è compromesso dall'assenza di metodi di produzione uniformi, dalle dimensioni dei campioni di grafene utilizzati, dai contaminanti, dalle cariche superficiali, dai gruppi funzionali e dai metodi di test di tossicologia *in vitro*. I risultati e le osservazioni hanno indicato che il grafene non è la superficie più citotossica o ostile per la crescita, lo sviluppo, l'attaccamento e la vitalità neuronale e ciò non lo rende a tutti gli effetti un materiale biocompatibile, tuttavia, questo è già un buon punto di partenza che lo rende potenzialmente utile come materiale di impianto neurale per fornire un sostegno per il sistema nervoso. [35]

### **5.2.2 Biocompatibilità in vivo**

Le prestazioni di questi substrati a base di grafene *in vivo* non sono ben comprese, soprattutto per affrontare le potenziali preoccupazioni di tossicità. L'assenza di adeguati approfondimenti circa la biocompatibilità può essere attribuibile alla fragilità e al costo dell'uso dei neuroni ed alla mancanza di familiarità con la coltura cellulare neurale. Tuttavia, l'importanza di caratterizzare i risultati *in vivo* dell'interazione diretta tra neuroni e grafene non può essere sottovalutata se il grafene raggiunge un adattamento ampio e banale nelle tecnologie commerciali. Ai fini di qualsiasi futura applicazione verso il quale il grafene potrebbe essere utilizzato all'interno del SNC, una forma immobilizzata di grafene direttamente interfacciata con i neuroni corticali si avvicina di più alle necessarie condizioni sperimentali *in vivo* verso cui applicare il grafene.

Alcuni studi *in vivo* su modelli animali hanno rivelato che il grafene e le nanoparticelle di grafene funzionalizzate mostrano scarsa citotossicità, nonostante siano state trovate piccole frazioni di particelle di grafene che si accumulano in organi come polmoni, fegato, milza e rene, che possono causare infiammazioni. Recentemente, sono state sviluppate schiume di grafene tridimensionali (3D) per preparare strutture per l'ingegneria tissutale. Si ritiene che queste schiume imitino molto l'architettura 3D dei tessuti *in vivo* e sulla loro superficie si siano sviluppate una maggiore proliferazione ed una sovraregolazione dei marcatori neuronali rispetto a quelli di un substrato di grafene bidimensionale. Ciò è attribuito al fatto che il grafene planare offre un'area superficiale limitata per il trasporto rispetto alla più ampia superficie effettiva della schiuma di grafene tridimensionale.

I fogli di grafene, tuttavia, offrono vantaggi significativi per le applicazioni di ingegneria tissutale in quanto mostrano attività antibatterica, impedendo la crescita batterica con conseguente minimizzazione della citotossicità nelle cellule. Fogli di GO e rGO impediscono la formazione di insediamenti di E. coli sulla sua superficie, la cui presenza, su fogli a base di grafene, porterebbe invece alla perdita di integrità della membrana a causa della rottura fisica e conseguente stress ossidativo. Poiché i film / substrati di grafene e GO hanno dimostrato di essere citocompatibili, creando migliore attaccamento, proliferazione e differenziazione delle cellule, i rivestimenti preparati con un film sottile di grafene o GO su materiali di impianto forniscono superfici adatte per un'adesione cellulare forte e dovrebbero portare ad una integrazione migliore *in vivo*. [36][37][38]



## 6 CONCLUSIONI

Una buona percentuale di popolazione mondiale è affetta da disturbi neurodegenerativi come la malattia di Alzheimer e il morbo di Parkinson. Il dato drammatico è che questa percentuale andrà in crescendo nei prossimi decenni. In risposta a questo problema scienziati appartenenti a numerose discipline della comunità scientifica stanno lavorando per sviluppare un'efficace soluzione per la diagnosi e la cura di queste malattie neurodegenerative. Il problema sostanziale di queste patologie è dato dalla loro lenta natura progressiva che ne permette un'adeguata diagnosi solo ad uno stato avanzato, quando cioè i sintomi sono ben evidenti ed una buona parte di sistema nervoso è ormai compromesso. È qui che ha radicato la necessità dello sviluppo di nuovi approcci terapeutici e diagnostici basati sull'impiego di nanomateriali in grado di svolgere questo ruolo di riparazione e rigenerazione di neuroni danneggiati dalla crescita progressiva del disturbo neurodegenerativo, ovvero nello sviluppo e validazione di interfacce neurali per la medicina neuro-rigenerativa.

Tra le diverse tipologie di nanomateriali ad oggi studiati, particolare attenzione è stata data ai nanomateriali organici. All'interno di questa classe di nanomateriali, i nanotubi di carbonio ed il grafene hanno attratto l'interesse di una grande quantità di scienziati e di gruppi di ricerca. Questi due tipi di nanomateriali, grazie alle loro buone proprietà intrinseche, chimico-fisiche e biologiche, si sono dimostrati eccellenti candidati per lo sviluppo di interfacce neurali da applicare alla rigenerazione e riparazione dei neuroni danneggiati. Questo nuovo settore della medicina neurorigenerativa, che riunisce conoscenze sulla scienza dei materiali, sulla fisica, sulla chimica e sulle neuroscienze, è un campo emergente della bioingegneria che propone l'applicazione di nanomateriali ingegnerizzati per la prevenzione, diagnosi e terapia di patologie neurodegenerative, come Alzheimer e Parkinson. [2]

Lo sviluppo clinico della nanomedicina dipenderà dall'effettiva efficacia di questi materiali estremamente promettenti su cui tuttavia si ha una limitata conoscenza circa i loro profili tossicologici e farmacologici.

Sviluppare nuove interfacce neurali e dispositivi che superano lo stato attuale delle tecnologie per imaging, sistemi di supporto per la rigenerazione cellulare, per il rilascio di farmaci o registrazioni/stimolazioni elettrofisiologiche dei tessuti neuronali è una delle grandi sfide della medicina neurorigenerativa. Le indagini sull'utilizzo potenziale dei nanomateriali a base di carbonio per tali applicazioni sono iniziati circa due decenni fa. Da allora, numerosi studi *in vitro* ed *in vivo* hanno esaminato le interazioni tra questi

nanomateriali ed i neuroni, valutando in particolar modo la loro compatibilità, come vettori per la somministrazione di farmaci, o per il loro potenziale utilizzo come matrici di rigenerazione cellulare. Va notato che nella maggior parte dei casi in vitro, i risultati hanno evidenziato che senza dubbio grafene e CNT rappresentano un grande potenziale per lo sviluppo di interfacce neurali innovative. [2] Sebbene siano numerose le indagini sul modo in cui questi nanomateriali a base di carbonio interagiscono con le cellule del SNC in vitro, il numero di studi dedicati all'interazione delle interfacce basate su CNT e grafene in vivo con il SNC è sostanzialmente ancora scarso.

Inoltre studi futuri, in modelli animali specifici per la malattia di Alzheimer e di Parkinson potranno ancor di più rinforzare l'ipotesi dell'utilizzo in clinica di interfacce neurali a base di CNT e grafene.

## 7 **REFERENZE**

- [1] Neurodegenerazione in “Dizionario di Medicina”, Enciclopedia Treccani.
- [2] “Carbon Nanomaterials Interfacing with Neurons: An In vivo Perspective”, Michele Baldrighi, Massimo Trusel, Raffaella Tonini and Silvia Giordani, *Frontiers in Neuroscience Review*, published: 09 June 2016.
- [3] “Nanotubi per la ricrescita delle fibre nervose”, Laura Ballerini (SISSA) e Maurizio Prato (UniTS-CIC BiomaGUNE), *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine Review*, published 27 June 2017.
- [4] “I neuroni rinascono: Creatività e Vecchiaia nell’era della conoscenza condivisa”, Paolo Manzelli, <http://www.edscuola.it/archivio/lre/neuroni.html>.
- [5] “Neuropathological Alterations in Alzheimer Disease”, Alberto Serrano-Pozo, Matthew P. Frosch<sup>1</sup>, Eliezer Masliah, and Bradley T. Hyman, Published by Cold Spring Harbor Laboratory Press, November 29, 2016.
- [6] “Neuropathologic changes in Alzheimer’s disease”, Gary L. Wenk, Ph.D., from the teleconference ‘Noncholinergic Treatments for Alzheimer’s Disease’; *J Clin Psychiatry* 2003.
- [7] “Parkinson’s Disease and Parkinsonism: Neuropathology”, Dennis W. Dickson, Department of Neuroscience, Mayo Clinic, Jacksonville, Florida; Published by Cold Spring Harbor Laboratory Press, November 29, 2016.
- [8] “NEUROCIRCUITRY OF PARKINSON’S DISEASE”, THOMAS WICHMANN MAHLON R. DELONG; *Neuropsychopharmacology: The Fifth Generation of Progress*.
- [9] “RUOLO PATOGENETICO DELLA NEUROINFIAMMAZIONE E NUOVE STRATEGIE NEUROPROTETTIVE”, Fabio Blandini; IRCCS Istituto Neurologico "C. Mondino", Pavia.
- [10] “Parkinson’s Disease: Mechanisms and Models”, William Dauer and Serge Przedborski; *Neuron*, Vol. 39, 889–909, September 11, 2003.
- [11] “Carbon nanotubes in neuroregeneration and repair”, Alessandra Fabbro, Maurizio Prato, Laura Ballerini, *Advanced Drug Delivery Reviews*.
- [12] “Nanostructures: a platform for brain repair and augmentation”, Ruxandra Vidu, Masoud Rahman, Morteza Mahmoudi, Marius Enachescu, Teodor D. Poteca and Ioan Opris; *Frontiers in Systems Neuroscience*, REReview Article published: 20 June 2014.

- [13] “Carbon Nanomaterials Interfacing with Neurons: An In vivo Perspective”, Michele Baldrihi, Massimo Trusel, Raffaella Tonini and Silvia Giordani; *Frontiers in Neuroscience*, review published 09 June 2016.
- [14] “Tailored Carbon Nanotubes for Tissue Engineering Applications”, Jithesh V. Veetil and Kaiming Ye; Biomedical Engineering Program, College of Engineering, University of Arkansas, Fayetteville, AR.
- [15] “Carbon nanotubes: a promise for nerve tissue engineering?”, Susanna Bosi , Alessandra Fabbro , Laura Ballerini and Maurizio Prato; *Nanotechnol Rev* 2013.
- [16] “Nanoparticle-mediated brain drug delivery: Overcoming blood–brain barrier to treat neurodegenerative diseases”, Cláudia Saraiva, Catarina Praça, Raquel Ferreira, Tiago Santos, Lino Ferreira, Liliana Bernardino; *Journal of Controlled Release*, (2016).
- [17] “Carbon Nanotubes: Applications in Pharmacy and Medicine”, Hua He, Lien Ai Pham-Huy, Pierre Dramou, Deli Xiao, Pengli Zuo, and Chuong Pham-Huy; *BioMed Research International*, September 2013.
- [18] “Prospects and Challenges of Graphene-Based Nanomaterials in Nanomedicine”, Arghya Narayan Banerjee, School of Mechanical Engineering, Yeungnam University, South Korea; Published: May 26, 2016.
- [19] “Comprehensive Review on the Use of Graphene-Based Substrates for Regenerative Medicine and Biomedical Devices”, Sachin Kumar and Kaushik Chatterjee, Department of Materials Engineering, Indian Institute of Science, Bangalore, India; [www.acsami.org](http://www.acsami.org); Published: September 23, 2016.
- [20] “Graphene in Regenerative medicine: focus on stem cells and neuronal differentiation”, Chiara Gardin, Adriano Piattelli, and Barbara Zavan, *Trend in Biotechnology*, Cell Press; published June 2016.
- [21] “Grafene per curare le lesioni al midollo spinale”, di Manolo De Agostini, 21 Settembre 2016, Fonte Rice University; <https://www.tomshw.it/grafene-curare-lesioni-midollo-spinale-80160>.
- [22] “Graphene and graphene oxide as new nanocarriers for drug delivery applications”, Jingquan Liu, Liang Cui, Dusan Losic; *Acta Biomaterialia* (2013).
- [23] “Tumori, grafene intelligente uccide solo cellule malate: stop chemio”, *Future Web Net*, <http://www.future-web-net.com/2017/05/tumori-grafene-intelligente-uccide-solo.html>; Lunedì 15 maggio 2017.
- [24] “Funtionalized carbon nanotubes: biomedical applications”, Sandhya Vardharajula, Sk Z Ali, Pooja M Tiwari; *international journal of nanomedicine*, Dove Press (2012).

- [25] “Application of carbon nanotubes in neurology: clinical perspectives and toxicological risks”, Antonio Nunes, Kholoud Al-Jamal; *Arch Toxicol* (May 2012).
- [26] “Functionalised carbon nanotubes: From intracellular uptake and cell-related toxicity to systemic brain delivery”, Pedro M. Costa, Maxime Bourgoignon, Julie T-W Wang, Khuloud T. Al-Jamal; *Journal of Controlled Release* 241 (2016).
- [27] “Carbon nanotubes as nanomedicines: From toxicology to pharmacology”, Lara Lacerda, Alberto Bianco, Maurizio Prato, Kostas Kostarelos; *Advanced Drug Delivery Reviews* 58 (2006).
- [28] “Assessment of the toxic potential of graphene family nanomaterials”, Xiaoqing Guo, Nan Mei, *Science Direct; journal of food and drug analysis* 22 (2014).
- [29] “Toxicity of graphene-family nanoparticles: a general review of the origins and mechanisms”, Lingling Ou, Bin Song, Huimin Liang, Jia Liu, Xiaoli Feng, Bin Deng, Ting Sun and Longquan Shao; *Particle and Fibre Toxicology* (2016).
- [30] “Toxicity of pristine graphene in experiments in a chicken embryo model”, Ewa Sawosz, Slawomir Jaworski, Marta Kutwin, Anna Hotowy, *International Journal of Nanomedicine*, Dove Press (2014).
- [31] “Making carbon nanotubes biocompatible and biodegradable”, Alberto Bianco, Kostas Kostarelos, and Maurizio Prato; *The Royal Society of Chemistry* 2011.
- [32] “Toxicity and Biocompatibility of Carbon Nanoparticles”, S. Fiorito, A. Serafino, F. Andreola, A. Togna, and G. Togna.
- [33] “Pluronic-coated carbon nanotubes do not induce degeneration of cortical neurons in vivo and in vitro”, Giuseppe Bardi, PhD, Paola Tognini, MSc, Gianni Ciofani, MSc, Vittoria Raffa, PhD, Mario Costa, PhD, Tommaso Pizzorusso, PhD; *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine* 5 (2009).
- [34] “Effect of Graphene on Non neuronal and Neuronal Cell Viability and Stress”, Sahil Kumar Rastogi, Guruprasad Raghavan, Ge Yang, and Tzahi Cohen-Karni, *NANO letters*, published: April 6, 2017.
- [35] “Graphene-Based Interfaces Do Not Alter Target Nerve Cells”, Alessandra Fabbro, Denis Scaini, Veronica Leon, Ester Vazquez, Giada Cellot, Giulia Privitera, Lucia Lombardi, Felice Torrisi, Flavia Tomarchio, Francesco Bonaccorso, Susanna Bosi, Andrea C. Ferrari, Laura Ballerini, and Maurizio Prato, *ACSNano Article*, published: December 23, 2015.

- [36] “Three-dimensional graphene foam as a biocompatible and conductive scaffold for neural stem cells”; N Li, Q Zhang, S Gao, Q Song, R Huang, L Wang - Scientific reports, 2013 - nature.com.
- [37] “Culture of neural cells and stem cells on graphene”; S Ryu, BS Kim - Tissue Eng Regen Med, 2013 - researchgate.net.
- [38] “The promotion of neurite sprouting and outgrowth of mouse hippocampal cells in culture by graphene substrates”; N Li, X Zhang, Q Song, R Su, Q Zhang, T Kong, L Liu - Biomaterials, 2011 – Elsevier.