



UNIVERSITÀ POLITECNICA DELLE MARCHE
FACOLTÀ DI INGEGNERIA

Corso di Laurea Triennale in Ingegneria Biomedica

**IMPLEMENTAZIONE DEL NANOSIGHT PER
LA CARATTERIZZAZIONE DEGLI
ESOSOMI MEDIANTE L'ANALISI PER IL
MONITORAGGIO DELLE
NANOPARTICELLE**

**NanoSight implementation for the exosomes'
characterization by Nanoparticle Tracking Analysis**

Relatore:
Prof. Piva Francesco

Tesi di Laurea di:
Dragano Francesco

*Alla mia famiglia:
la mia fonte di
ispirazione, il mio
faro.*

Abstract

Negli ultimi decenni l'applicazione delle tecnologie in Medicina ha avuto un impatto diretto sulla ricerca e sul processo di cura del paziente, dalla diagnosi fino alla terapia. Un importante contributo al miglioramento delle metodologie delle scienze mediche e biologiche è fornito dallo sviluppo dell'Ingegneria Biomedica, disciplina che solo di recente è emersa come propria, pur mantenendo una fitta rete di rapporti di complementarità, integrazione ed interazione tra le diverse branche mediche ed ingneristiche. Il suo scopo principale è, dunque, quello di combinare le capacità progettuali e di problem solving con la Biologia e la Medicina, per migliorare lo stato di benessere del paziente.

In questo elaborato si vuole illustrare la Nanoparticle Tracking Analysis (NTA), traducibile con "analisi per il monitoraggio delle nanoparticelle", che è una tecnica sviluppata dalla NanoSight Ltd, la quale si propone di ottenere la distribuzione dimensionale e la concentrazione dei campioni in sospensione liquida, tramite l'utilizzo delle proprietà della luce diffusa (light scattering) e del moto browniano. È una tecnologia ad alta risoluzione che grazie alla modalità in fluorescenza permette di ottenere dati specifici alle particelle marcate. Piccoli cambiamenti possono essere monitorati in tempo reale e confermati grazie alla funzione unica di osservazione visiva al microscopio. Fornisce numerosi parametri di controllo simultaneamente per analisi rapide su ridotti volumi di campione.

Tra i benefici unici e le cospicue applicazioni della NTA, una posizione rilevante è occupata dalla possibilità di caratterizzare le vescicole extracellulari ed in particolare gli esosomi.

Recentemente si è scoperto che le cellule eucariotiche comunicano tra di loro non solo scambiandosi segnali elettrici e molecole, ma anche scambiandosi piccole vescicole, dette esosomi. Tali particelle si formano per gemmazione da una membrana cellulare e sono prodotte da diverse linee cellulari. La loro funzione principale è legata al trasporto di informazioni da una cellula di origine ad una cellula bersaglio, pertanto sono mediatori nei meccanismi di comunicazione intercellulare. Di dimensione che variano tra $40 \div 150$ nm, tali vescicole possono contenere macromolecole di diversa natura e specifiche della cellula di origine (ad esempio lipidi, proteine, DNA e RNA) in grado di modificare/alterare il profilo di espressione genica delle cellule bersaglio. Sembra che le cellule tumorali utilizzino, in modo particolare, questa comunicazione per coordinarsi, sfuggire al sistema immunitario, resistere ai farmaci, condizionare il microambiente tumorale a proprio vantaggio, aumentare

la vascolarizzazione ed addirittura metastatizzare. Gli esosomi si trovano in tutti i fluidi cellulari: il che rende loro i candidati ideali per essere utilizzati come biomarcatori o come vettori per farmaci in terapia genica. Queste vescicole intraluminari presentano organotropismo, dunque possono fondersi e quindi trasmettere il loro messaggio solo a cellule specifiche. Le cellule che formano gli esosomi programmano il messaggio ed il bersaglio; tali possono cambiare nel tempo in base alle necessità. Poiché la comunicazione esosomiale è dinamica, intercettando e studiando un esosoma, i ricercatori potrebbero conoscere i bisogni e le interazioni della cellula che lo ha rilasciato. Gli esosomi sono secreti fisiologicamente nei liquidi corporei, ma in condizioni patologiche si osservano cambiamenti significativi del loro numero/tipo/contenuto: possono diventare biomarcatori di patologie. Potrebbero avere importanti funzioni diagnostiche e prognostiche, ma la comprensione dei meccanismi molecolari di biogenesi, la precisa identificazione della loro rilevanza fisiologica e del loro ruolo sono state ostacolate dalla scarsa conoscenza fisica e chimica di questi oggetti di dimensione nanometrica.

Indice

1. INTRODUZIONE.....	1
1.1 LE VESCILE EXTRACELLULARI.....	1
<i>1.1.1 COMUNICAZIONE CELLULARE.....</i>	1
<i>1.1.2 CENNI STORICI SULLE EVs.....</i>	3
<i>1.1.3 CLASSIFICAZIONE DELLE EVs.....</i>	4
<i>1.1.3.1 Dimensioni.....</i>	6
<i>1.1.3.2 Morfologia.....</i>	6
<i>1.1.3.3 Densità.....</i>	6
<i>1.1.3.4 Composizione proteica ed origine sub-cellulare.....</i>	6
<i>1.1.4 BIOGENESI DELLE EVs.....</i>	7
<i>1.1.5 INTERAZIONE DELLE EVs CON LE CELLULE TARGET.....</i>	10
<i>1.1.6 FUNZIONI ED EFFETTI BIOLOGICI DELLE EVs.....</i>	11
<i>1.1.6.1 EVs nelle neoplasie.....</i>	11
<i>1.1.6.2 Cellule staminali e EVs.....</i>	12
<i>1.1.7 SCENARIO APPLICATIVO DELLE EVs.....</i>	13
1.2 GLI ESOSOMI.....	14
<i>1.2.1 BIOGENESI DEGLI ESOSOMI.....</i>	15
<i>1.2.2 MORFOLOGIA E COMPOSIZIONE.....</i>	16
<i>1.2.3 COMUNICAZIONE CELLULARE MEDIATA DA ESOSOMI.....</i>	18
<i>1.2.4 GLI ESOSOMI NEL SISTEMA IMMUNITARIO.....</i>	19

1.2.5 GLI ESOSOMI NELLA DIAGNOSTICA E NELLA TERAPIA	20
1.2.6 METODI PER LA SEPARAZIONE DEGLI ESOSOMI.....	21
2. SCOPO DELLA TESI	23
3. MATERIALI E METODI	24
3.1 NANOPARTICLE TRACKING ANALYSIS (NTA).....	24
3.1.1 PRINCIPIO FISICO	25
3.1.2 PRINCIPIO DI MISURA	28
3.2 RIPRODUZIONE DELLA NTA	31
3.3 RISULTATI	33
4. CONCLUSIONI.....	35
5. BIBLIOGRAFIA	V

1. INTRODUZIONE

1.1 LE VESCILE EXTRACELLULARI

Negli ultimi anni, le vescicole extracellulari (EVs) sono state identificate come potenti mezzi di comunicazione intercellulare, sia per i procarioti che per gli eucarioti. Questo è dovuto alla loro capacità di influenzare le più variegata funzioni fisiologiche e patologiche sia delle cellule target che delle progenitrici, per mezzo del trasferimento di macromolecole. Le EVs sono particelle di natura membranosa che possono avere funzioni autocrine e paracrine, controllando processi quali lo sviluppo, la migrazione, la proliferazione e meccanismi patogenetici (1).

1.1.1 COMUNICAZIONE CELLULARE

Ogni cellula, procariotica o eucariotica che sia, è in grado di comunicare, cioè scambiare messaggi con le cellule vicine o con lo spazio che la circonda. Negli organismi, in particolare quelli più evoluti, ogni cellula è specializzata per svolgere una o più funzioni. Ciò nonostante, è l'azione coordinata e contemporanea di più cellule caratterizzanti l'intero organismo che ne assicura la funzionalità. Infatti, in seguito ad un segnale cellulare, opportunamente captato e trasdotto, una cellula può andare incontro a mitosi, modulazione del metabolismo e apoptosi, ad esempio. Generalmente, i responsabili della comunicazione cellulare sono molecole extracellulari secrete da altre cellule o dalla medesima. In relazione al tipo di modulazione del messaggio si identificano differenti tipi di comunicazione (Figura 1.1.1.1):

- Comunicazione autocrina: i messaggi prodotti da una cellula hanno lo scopo di modificare l'attività e lo stato della cellula stessa, senza influenzare ulteriori cellule.
- Comunicazione paracrina: i messaggi generati da una cellula vanno a modificare l'attività e lo stato delle cellule vicine, appartenenti allo stesso tessuto o organo, senza la necessità che appartengano alla stessa linea cellulare.
- Comunicazione da contatto: avviene sulla superficie della cellula che produce tali messaggi e si manifesta con il legame diretto con le cellule bersaglio, come nel caso delle giunzioni gap, la cui permeabilità è strettamente regolata e per mezzo delle

quali possono passare vari tipi di molecole che coinvolgono tali giunzioni in svariati processi cellulari come il differenziamento, la carcinogenesi e la proliferazione.

- Comunicazione endocrina: i prodotti (ormoni) vengono rilasciati nel sistema circolatorio e raggiungono cellule bersaglio anche molto distanti in un breve periodo.
- Comunicazione nervosa: la propagazione avviene a velocità notevole per mezzo delle reti sinaptiche dei neuroni; i messaggi sono di natura elettrochimica ed hanno specificità tessutale.

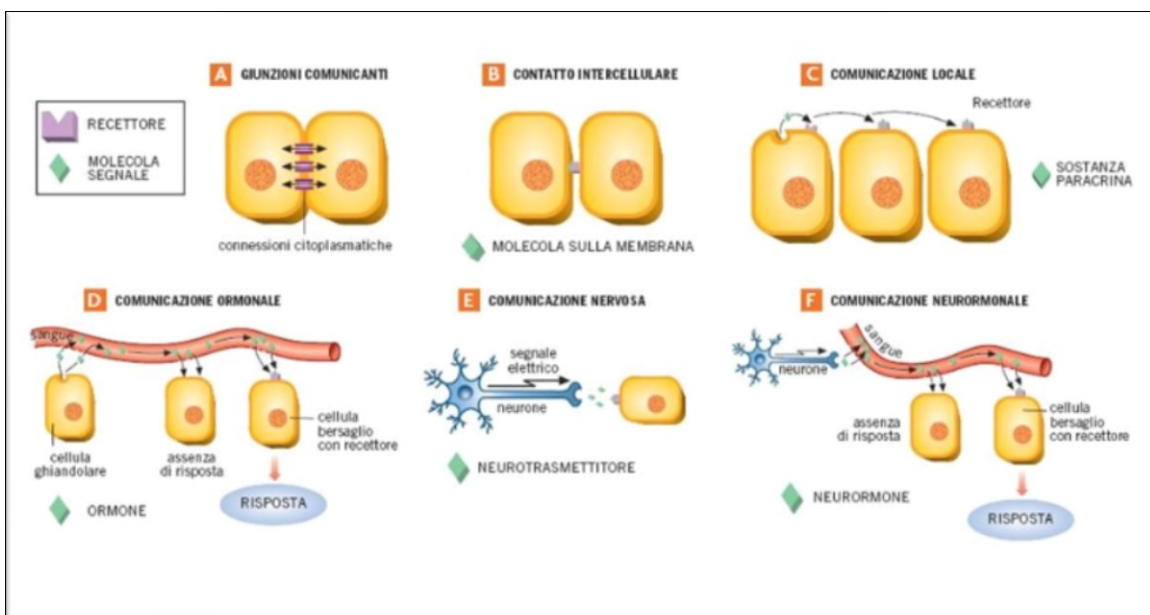


Figura 1.1.1.1 *Rappresentazione di alcuni tipi di comunicazione cellulare.*

Nella maggior parte dei casi, il messaggero non è la causa diretta della risposta cellulare. È necessario che lo stimolo venga trasdotto da un appropriato sistema che determini l'effettiva risposta della cellula bersaglio, attivando un meccanismo segnaletico intracellulare. In linea di principio si ha che la comunicazione avviene per mezzo del legame di molecole site sulla superficie cellulare, dette ligandi, con recettori altamente specifici presenti sulla superficie di cellule target, oppure anche grazie al rilascio di fattori solubili (come citochine, chemochine, fattori di crescita) che possono agire in modo autocrino, paracrino o endocrino, su cellule distanti che possono essere raggiunte tramite i fluidi biologici; come conseguenza del legame tra recettore e ligando, si ha una variazione conformazionale nel recettore, in

seguito alla quale si verifica l'insorgenza di una risposta cellulare o di un effetto biologico. Da alcuni anni è stato dimostrato che le microvescicole extracellulari, oltre ad essere parte integrante del microambiente intercellulare, rappresentano un altro importante meccanismo finalizzato a mediare la comunicazione tra le cellule (2).

1.1.2 CENNI STORICI SULLE EVs

In principio le EVs vennero considerate come detriti cellulari inerti, che si potessero riscontrare nei fluidi biologici o negli spazi interstiziali, come prodotto finito di cellule danneggiate o in fase di turnover delle membrane plasmatiche. Le prime osservazioni avvennero simultaneamente in vari contesti fisiologici, senza la cognizione che tale forma di comunicazione fosse una struttura biologica universalmente condivisa a livello cellulare. Vennero osservate per la prima volta nel 1946 da Chargaff e West nel plasma, identificate come particelle pro-coagulanti di derivazione piastrinica (3); nel 1967, Wolf le nominò "polvere piastrinica". In seguito, vennero rilevate in altre circostanze: nel 1969 Anderson le osservò durante la calcificazione ossea, tra gli anni '70 e '80 vennero percepite EVs rilasciate nel plasma dalle cellule dei microvilli dell'adenoma rettale e, ancora, identificate nel siero bovino e nel liquido seminale (4). Nel 1977, De Broe suggerì che tali vescicole potessero avere una certa importanza nell'ambito fisiologico cellulare e che il loro rilascio potesse essere la conseguenza di uno specifico meccanismo, dal momento che tali particelle pilotavano enzimi di membrana funzionali analoghi a quelli siti nelle cellule da cui prendevano vita (5). Attorno allo stesso periodo si iniziarono a riscontrare dei frammenti di membrana originati da tumore. Nel 1983, studi riguardanti l'ultrastruttura misero in evidenza che le vescicole venivano rilasciate dai corpi multi-vescicolari, in seguito alla loro fusione con la membrana cellulare, durante il differenziamento degli eritrociti (6). Nel decennio successivo, un gruppo di ricercatori guidati da Raposo, dimostrò che tali vescicole, successivamente chiamate esosomi, isolate dai linfociti B modificati dal virus Epstein-Barr, erano particelle presentanti l'antigene e che erano capaci di indurre una risposta nei linfociti T (7). Nel 2006-2007, il rinvenimento di materiale genetico nelle EVs, in particolare di microRNA, ha confermato la straordinaria importanza di queste strutture extracellulari, identificandole come mediatori della comunicazione cellula-cellula. Studi recenti hanno permesso di isolare le EVs nella maggior parte dei fluidi biologici, quali plasma, urina, siero,

saliva, liquido amniotico, liquido di lavaggio bronco alveolare, latte materno e liquido seminale (8).

1.1.3 CLASSIFICAZIONE DELLE EVs

Le vescicole extracellulari includono una vasta gamma di vescicole caratterizzate da membrane e rilasciate dalle cellule. Differiscono tra di loro per l'origine, per le dimensioni e per la composizione antigenica. Nonostante siano state rilevate caratteristiche specifiche per ogni sottopopolazione di EVs, attualmente non vi è ancora un'identificazione dei marcatori di ogni sottogruppo che sia valida universalmente ed ampiamente accettata, al fine di distinguere tali sottopopolazioni. Inoltre, vi è la mancanza di metodi standardizzati di isolamento e caratterizzazione e le procedure di isolamento non riescono a purificare specifici tipi di vescicole, ma producono miscele complesse di differenti tipi di EVs. Il subfrazionamento dei sottogruppi delle EVs può essere realizzato mediante l'utilizzo della cromatografia o con l'utilizzo di anticorpi contro marcatori di superficie per le EVs note o presunte. Tuttavia, un importante lavoro per la classificazione delle EVs è stato effettuato di recente dai membri della Società Internazionale di Vescicole Extracellulari (ISEV), al fine di unificare la nomenclatura e le metodologie di isolamento. I dati ottenuti hanno messo in evidenza una cospicua eterogeneità per la composizione della membrana delle loro membrane e un'importante dipendenza dallo stato delle cellule di origine e dalle condizioni ambientali (2). L' ISEV ha suggerito di indicare, genericamente, con il termine *vescicole extracellulari* tutte le vescicole che possono essere rilasciate nell'ambiente extracellulare, cioè esosomi, corpi apoptici, vescicole di membrana, microparticelle (rilasciate dalle piastrine) ed ectosomi (provenienti dai leucociti polimorfonucleati). I principali tipi di vescicole sono presenti nella Figura 1.1.3.1 (9).

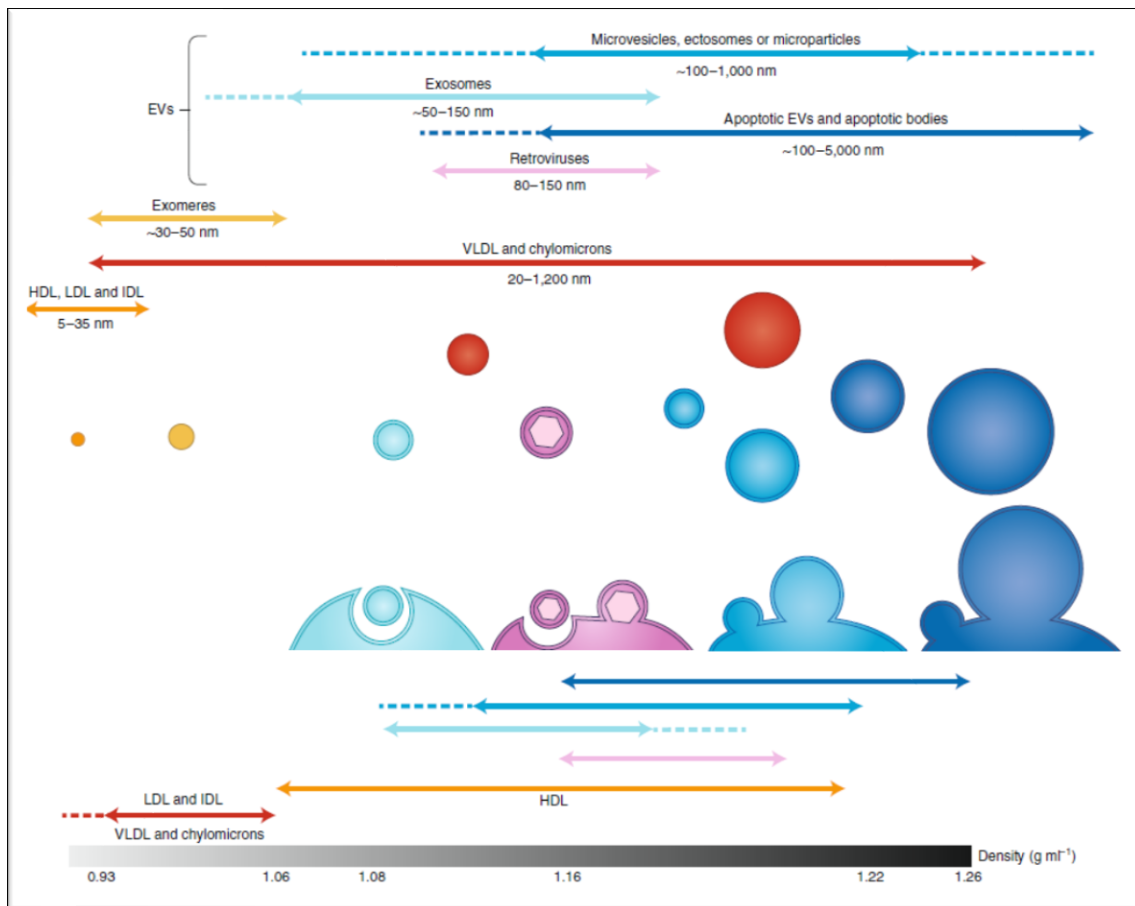


Figura 1.1.3.1 *Caratteristiche fisiche di diversi sottotipi di EVs. Differenti tipi di EVs sono rappresentati insieme ad altre particelle isolate. È schematizzata l'origine cellulare di questi elementi (endosomiale o dalla membrana plasmatica) insieme alle varie dimensioni e densità. Indipendentemente dal meccanismo di rilascio, i diversi sottotipi di EVs non possono essere completamente isolati in base alle dimensioni o alle densità, poiché sono caratteristiche che in genere li accomunano. Ciò si verifica, ad esempio, per le piccole microvescicole, gli esosomi ed i retrovirus. Anche i detriti cellulari, come i corpi apoptici, potrebbero non essere distinti dalle altre EVs. Altre particelle che possono essere isolate insieme alle EVs sono le lipoproteine. Mediante centrifugazione differenziale dei fluidi contenenti queste vescicole, si ha che le più grandi (> 300 nm) vengono recuperate a bassa velocità ed in poco tempo (20-30 minuti); segue il rilevamento delle vescicole di dimensione intermedia (150÷300), ad una velocità maggiore rispetto alla precedente e per più di 30 minuti di centrifugazione; infine, si hanno le vescicole più piccole (<150 nm), che vengono recuperate mediante ultracentrifugazione ad alta velocità, ma si potrebbe avere comunque campioni "sporchi", contenenti piccole particelle non classificate come EVs, come le già citate lipoproteine. In ogni caso le lipoproteine possono essere separate mediante metodi di isolamento basati su gradienti di densità.*

1.1.3.1 Dimensioni

Le vescicole sono considerate di forma sferica nel loro stato naturale, dunque la dimensione che in genere viene considerata è il diametro. Per determinare il diametro si utilizza per lo più il microscopio elettronico a trasmissione (TEM): la misurazione avviene sottovuoto, mediante fissazione e disidratazione, procedure importanti per avere una accurata morfologia delle vescicole (10).

1.1.3.2 Morfologia

È stata definita tradizionalmente come “cup-shaped”, dopo fissazione, adesione, colorazione negativa e visualizzazione mediante TEM. Ma è ancora ignoto se tale caratteristica sia un artefatto dovuto alla preparazione del campione o, in realtà, una caratteristica unica degli esosomi; tale potrebbe essere utile per distinguere vescicole derivate dalle cellule da altri tipi di particelle con medesime dimensioni. Con la microscopia a forza atomica è possibile studiare la morfologia delle vescicole aderite ad una superficie direttamente in soluzione. Però, per via dell'adesione delle vescicole alla superficie, la loro struttura muta, diventando emisferica o piatta, potendo comportare artefatti nell'interpretazione dei risultati (11).

1.1.3.3 Densità

L'analisi della densità è, in genere, basata sulla centrifugazione in gradiente di saccarosio. Dal momento che le vescicole presentano differenze di densità limitate, diversificare i tipi di vescicole mediante la densità risulta essere un lavoro arduo. Dunque, tale tecnica è per lo più utilizzata come supporto delle altre, al fine di separare la miscela di EVs ottenuta tramite l'ultracentrifugazione (12).

1.1.3.4 Composizione proteica ed origine sub-cellulare

Gli studi sulle EVs circa la loro origine intracellulare, rispetto ad una derivazione diretta dal plasmalemma, sono spesso basati sulla misurazione della composizione lipidica e proteica. Attualmente la dimensione, la morfologia e la composizione biologica non rappresentano dei validi criteri per la distinzione di un tipo di vescicola dall'altro (11). Non sono stati ancora individuati dei marcatori specifici delle EVs, quindi sarà necessario isolarne e

caratterizzarne mediante una miscela di più protocolli, poiché le proteine non sono marcatori specifici delle EVs.

	Densità [g/mL]	Diametro [nm]	Morfologia (TEM)	Origine	Cellula di origine	Composizione
ESOSOMI	50÷100	1.13÷1.19	Cup-shaped	Plasmalemma; endosoma	La maggior parte dei tipi cellulari	Composizione biochimica poco nota, con lipidi e proteine non specifiche degli esosomi
CORRPI AOPTICI	1000÷5000	1.16÷1.28	Cup-shaped	Plasmalemma; reticolo endoplasmatico	Tutti i dei tipi cellulari	Istoni, DNA
MICROVESCICOLE	20÷1000	Non conosciuta	Cup-shaped	Plasmalemma	La maggior parte dei tipi cellulari	Poco conosciuta
PARTICELLE DI MEMBRANA	80÷600	1.032÷1.068	Cup-shaped	Plasmalemma	Cellule epiteliali	CD133

Tabella 1.1.3.1 *Classificazione e caratteristiche delle principali EVs.*

1.1.4 BIOGENESI DELLE EVs

Il rilascio delle EVs è un processo fisiologico che avviene mediante un meccanismo calcio dipendente, che causa l'attivazione di una serie di modifiche del citoscheletro a livello della membrana plasmatica, in particolare a livello actinico e tubulinico (Figura 1.1.4.1). Un segnale esterno produce un aumento di calcio intracellulare, il quale agisce sull'attività di diversi enzimi: causa la perdita della simmetria del plasmalemma, agendo su enzimi quali scramblasi, flippasi e floppasi; induce l'attivazione di gelsolina e calpaina, alterando il disassemblaggio dell'actina corticale. Si verifica la formazione di una deflessione della membrana plasmatica, da cui deriva l'allontanamento della vescicola dalla membrana (13).

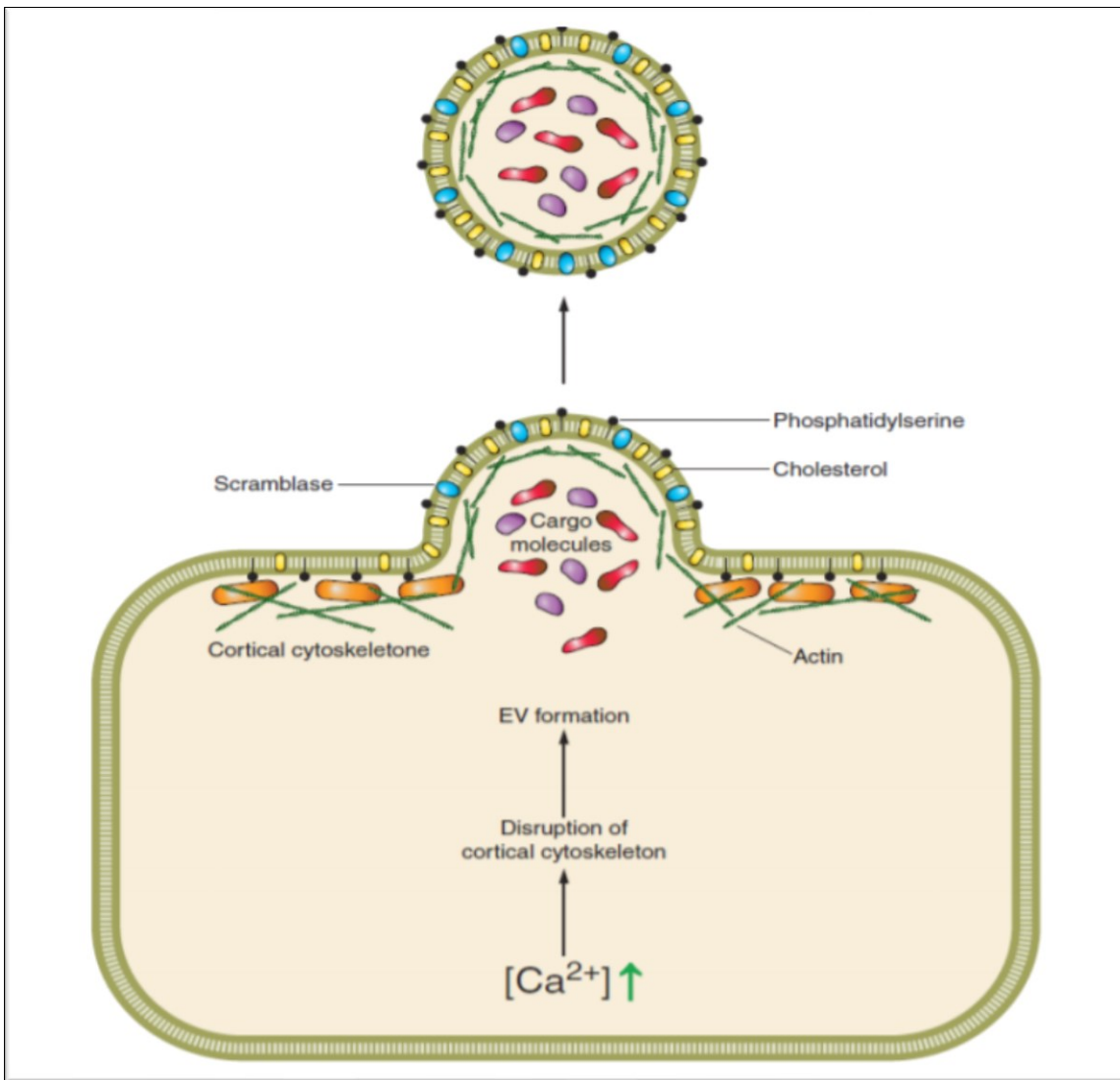


Figura 1.1.4.1 *Meccanismo proposto per la formazione delle EVs, caratterizzato dal verificarsi dell'aumento di ioni calcio nello spazio intracellulare, dall'attivazione della scramblasi e della fosfatidilserina, con il disassemblaggio dell'actina corticale.*

Tuttavia, il calcio non è il solo messaggero a partecipare nel meccanismo di rilascio delle EVs (Figura 1.1.4.2) (9).

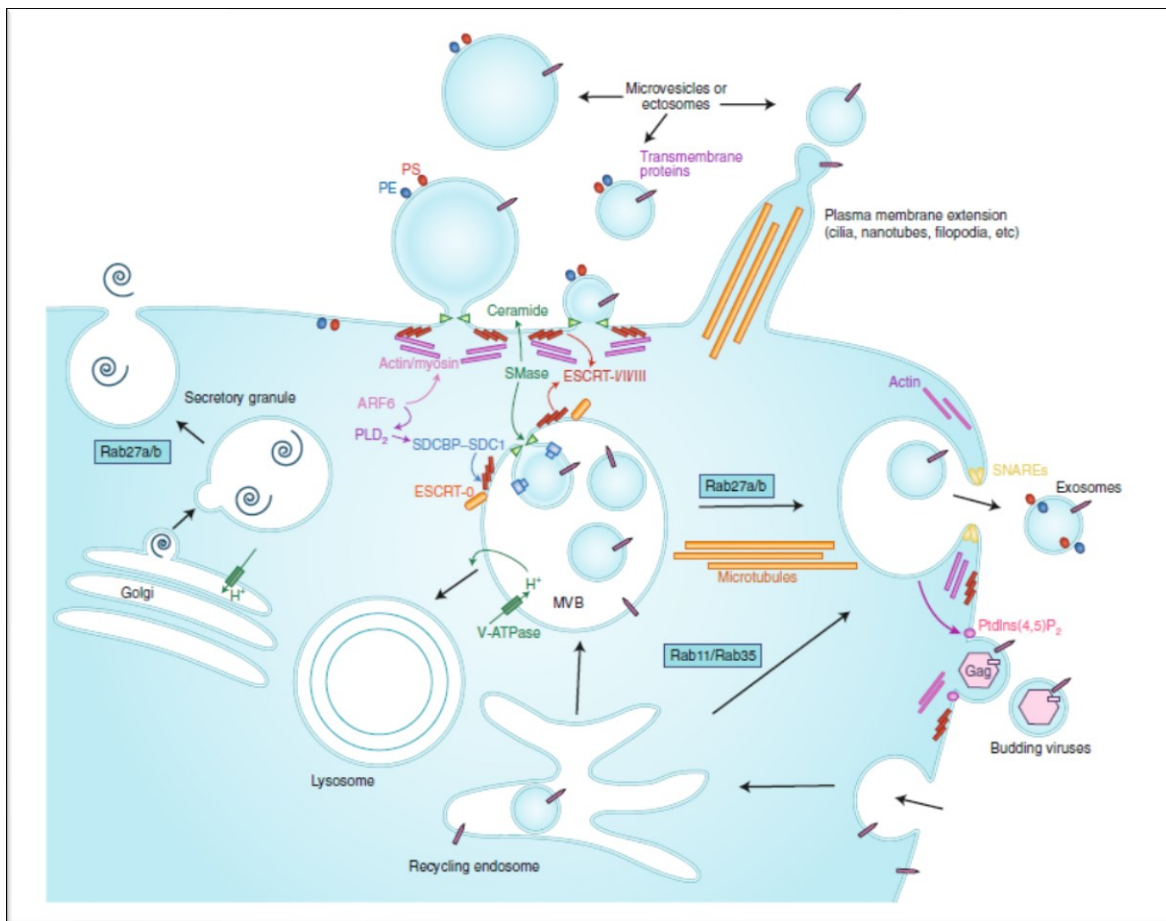


Figura 1.1.4.2 Esempi selezionati di interferenza tra i macchinari molecolari intracellulari coinvolti nella biogenesi e nella secrezione di EVs, formati dalla membrana plasmatica (microvescicole, microparticelle o ectosomi) o, nello specifico, da corpi multivesicolari endosomiali (MVB), per gli esosomi. Le proteine Rab271/b sono coinvolte nella secrezione degli esosomi (nei processi MVB-dipendenti), ma anche nel rilascio di virus e di granuli derivanti dal Golgi. I ceramidi generati dai complessi SMases e ESCRT promuovono la formazione di vescicole sia sulla membrana plasmatica che all'interno degli MVB. La ARF6 e la depolimerizzazione di actina e del citoscheletro sono requisiti per la secrezione di EVs. Invece, l'esternalizzazione della fosfatidiletanolamina (PE) e della fosfatidilserina (PS) può essere più specificamente coinvolta nella secrezione di EVs di derivazione membranosa. L'acidificazione degli MVB mediata dalla V-ATPasi può essere uno specifico meccanismo di controllo per la secrezione degli esosomi, sebbene gli inibitori della V-ATPasi possano anche influenzare la V-ATPasi del Golgi.

1.1.5 INTERAZIONE DELLE EVs CON LE CELLULE TARGET

Quando rilasciate, le EVs sono in grado di degradarsi rapidamente, liberando il loro contenuto nell'ambiente extracellulare in corrispondenza delle cellule che le hanno rilasciate, oppure possono raggiungere siti bersaglio lontani dalla zona di rilascio, per via dei fluidi biologici. Ciò spiega per quale motivo sono presenti in ogni tipo di fluido cellulare. Tale meccanismo si verifica anche nelle cellule tumorali, difatti nelle cellule neoplasiche è possibile riscontrare tEVs (14). Le EVs non hanno la capacità di interagire con tutti i tipi cellulari, ma solo con specifiche cellule. L'interazione con le cellule target può avvenire mediante differenti meccanismi (13):

- Attraverso il legame con specifici recettori espressi sulla superficie delle cellule target, che possono causare un meccanismo di segnalazione con conseguente formazione di un complesso extracellulare multimolecolare;
- Per fusione diretta della propria membrana con quella della cellula target, rilasciando istantaneamente il proprio contenuto nella cellula;
- Per endocitosi, con a sua volta 3 differenti destini, rappresentati in figura 1.1.5.1.

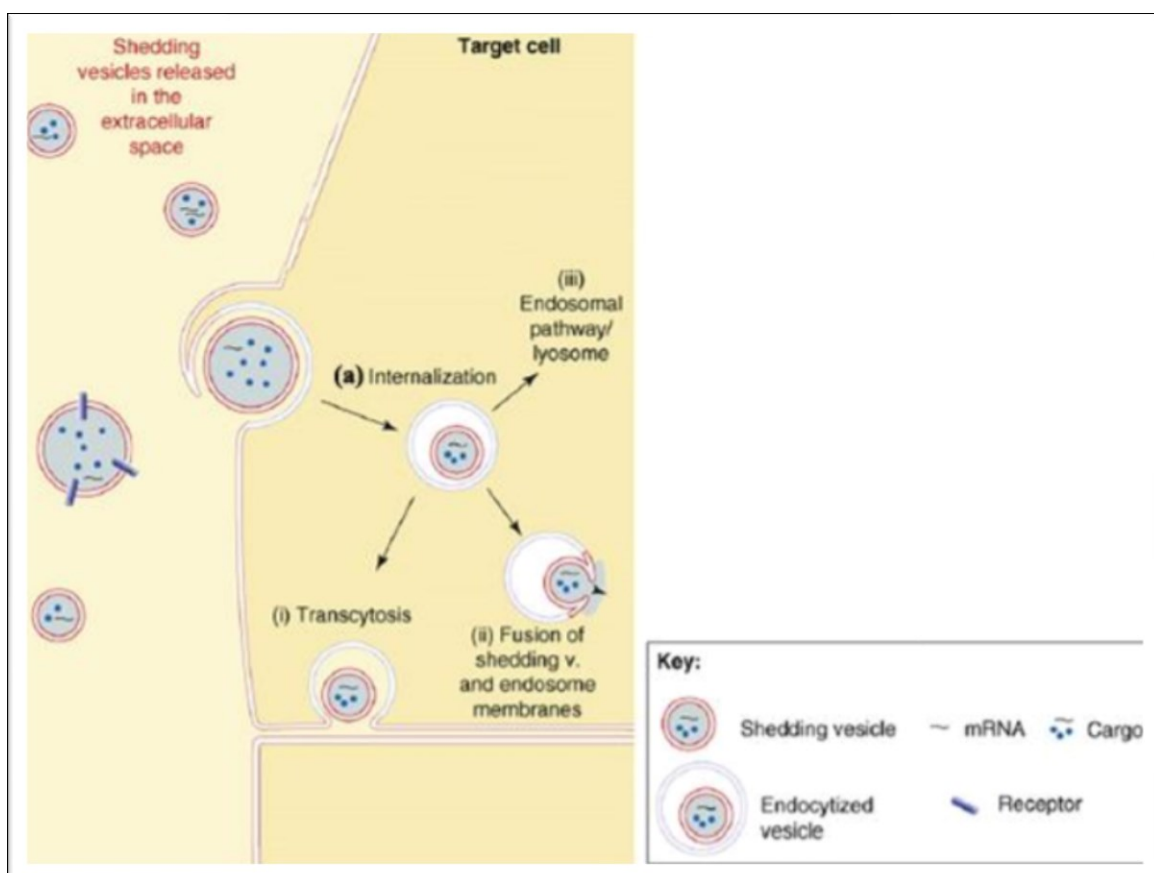


Figura 1.1.5.1 *Differenti tipologie di destini delle vescicole internalizzate tramite l'interazione con la cellula target per endocitosi:*

- i. raggiungono lo spazio extracellulare per transcitosi;*
- ii. fondono la propria membrana con quella endosomiale per rilasciare il proprio contenuto nel citosol;*
- iii. rimangono segregati all'interno degli endosomi.*

1.1.6 FUNZIONI ED EFFETTI BIOLOGICI DELLE EVs

Le funzioni biologiche delle EVs differiscono in base alla linea cellulare da cui derivano e, dunque, in base al contenuto. È stato dimostrato che anche per le cellule eucariotiche, oltre che per le procariotiche, le EVs rappresentano dei veicoli mediante i quali avviene una interessante comunicazione cellulare, in grado di condizionare il comportamento delle cellule bersaglio, in più modi. In particolare, possono agire da indicatori, trasferendo proteine e recettori di membrana alle cellule bersaglio, o anche alterandone il fenotipo tramite il trasferimento orizzontale di informazioni genetiche. È interessante osservare che oltre al trasferimento di proteine, lipidi e recettori, possono trasferire anche informazioni genetiche. È stato rilevato al loro interno la presenza di materiale genetico, in particolare di mRNA e di miRNA. Il vantaggio, per la veicolazione di tali cellule, è che le EVs consentono il loro trasferimento a lunga distanza e li proteggono da enzimi digestivi presenti in siti extracellulari. In aggiunta, costituiscono anche uno degli strumenti di difesa di cui le cellule si servono per proteggersi da stress intracellulari ed extracellulari, ad esempio, tramite l'eliminazione di recettori che vengono prodotti in eccesso o di cellule potenzialmente dannose. Possono intervenire anche nei processi di crescita: Greco e collaboratori hanno infatti dimostrato che durante il differenziamento alcune cellule rilasciano morfogeni attraverso le EVs, per favorire la creazione di un gradiente di sostanze capaci di fornire le istruzioni necessarie per la genesi delle forme (15).

1.1.6.1 EVs nelle neoplasie

È possibile che abbiano un ruolo centrale in determinati fenomeni patologici, come nel caso delle neoplasie. Il rilascio delle tEVs costituisce una barriera protettiva per le cellule tumorali, che ne favorisce la progressione, sostenendone la crescita e garantendone la sopravvivenza (16). Le tEVs promuovono la crescita tumorale:

- a. Favorendo la formazione di metastasi, in quanto veicolano oncogeni che inducono la trasformazione del fenotipo delle cellule target;
- b. Degradando la matrice extracellulare, agevolando, così, una crescita invasiva della massa tumorale (17);
- c. Incentivando l'angiogenesi, poiché contengono mRNA che codificano per specifici fattori di crescita che vengono tradotti all'interno dei monociti, permettendo l'ossigenazione e lo sviluppo della massa tumorale (18).

Inoltre, proteggono le cellule tumorali, poiché contengono delle proteasi che le proteggono da morte cellulare programmata e che conferiscono loro resistenza ai chemioterapici. Sono anche capaci di aggirare il sistema immunitario, dal momento che sulle loro cellule è esposto il Fas ligando, che interagendo con il recettore Fas può indurre l'apoptosi dei linfociti T.

1.1.6.2 Cellule staminali e EVs

Le cellule staminali sono cellule primitive, in grado di autorinnovarsi indefinitamente, rimanendo indifferenziate, ma dando origine a progenie di cellule differenziabili. Esistono quattro tipi di cellule staminali in grado di specializzarsi:

- cellule staminali totipotenti, che sono in grado di sviluppare un intero organismo;
- cellule staminali pluripotenti, capaci di differenziarsi in tutti i tipi cellulari;
- cellule staminali multipotenti, che si possono differenziare soltanto in alcuni tipi cellulari;
- cellule staminali unipotenti, che si differenziano in un solo tipo cellulare.

Possono distinguersi, in base alla zona in cui vengono captate, in cellule staminali embrionali, del liquido amniotico e adulte. Le cellule staminali adulte sono presenti in tutti i tessuti adulti e costituiscono un elemento essenziale per il mantenimento della loro omeostasi, dal momento che rappresentano una riserva importante che permette la sostituzione di cellule differenziate danneggiate, in seguito a processi fisiologici e non. L'interazione tra le cellule staminali ed il microambiente che le circonda ha un ruolo chiave nella determinazione del fenotipo cellulare. Infatti, l'ambiente influenza il mantenimento dell'equilibrio tra l'autorinnovamento e il differenziamento, le due proprietà che rendono uniche le cellule staminali. È chiaro che disporre di un reagente biologico come le cellule staminali, da differenziare nei diversi tipi cellulari, apra nuovi scenari terapeutici: patologie ora poco trattabili, potrebbero essere affrontate con maggior successo grazie alla sostituzione

dei tessuti danneggiati. Diversi ricercatori pensano che siano alla base della terapia genica: con le tecniche dell'ingegneria genetica si può correggere l'effetto prodotto da geni difettosi; infatti, le cellule staminali tollerano meglio di ogni altra cellula l'inserimento di geni dall'esterno. Tale tecnica potrebbe permettere la correzione di difetti genetici nelle prime fasi dello sviluppo embrionale. Di recente è stato dimostrato che anche le cellule staminali, soprattutto quelle embrionali, sono capaci di rilasciare le EVs. È stato ipotizzato che tali possano essere implicate nei meccanismi di autorinnovamento ed espansione (19).

1.1.7 SCENARIO APPLICATIVO DELLE EVs

L'interesse nei confronti delle EVs cresce di giorno in giorno negli ambienti scientifici, non soltanto perché rappresentano dei vettori tramite i quali la cellula può comunicare, ma specialmente perché si pensa che la loro flessibilità possa essere utilizzata per scopi terapeutici. È la medicina rigenerativa il campo in cui si crede possano avere un ruolo fortemente prospettico. Lo scopo di tale branca è sempre stato quello di ricercare cellule staminali che potessero essere trapiantate nei pazienti, in modo sicuro ed efficace, senza complicazioni immunologiche (20). Ad oggi, infatti, l'utilizzo delle cellule staminali risulta essere limitato, oltre che da fattori etici, anche dall'azione del sistema immunitario o dei fattori del complemento. Nei trapianti di cellule staminali, nonostante si osservino i benefici, soprattutto per la cura dell'infarto del miocardio o di danni epatici e renali (21), solo una piccola parte delle cellule trapiantate va incontro a transdifferenziazione, di sicuro non in quantità sufficienti per poterne giustificare la rigenerazione tissutale (22). Inoltre, l'uso delle cellule staminali è limitato dalla loro ridotta capacità di migrare verso il sito bersaglio e dalla bassa resistenza ad un ambiente citotossico. A causa della ormai accertata capacità delle cellule staminali di rilasciare EVs, sono stati condotti diversi esperimenti in vitro utilizzando il mezzo condizionato delle cellule staminali e si è osservato che tale è in grado di inibire l'apoptosi, stimolare la proliferazione e fungere da chemioattraente per alcuni tipi cellulari. Dunque, si è ipotizzato che le EVs rilasciate dalle staminali possano rimpiazzare le cellule stesse e si è iniziato a parlare sempre più frequentemente di fattori paracrini, che diversi esperimenti hanno dimostrato essere proprio le EVs. Si è osservato che i benefici ottenuti in seguito al loro utilizzo al posto delle staminali sono legati in particolare al trasferimento del mRNA, che può causare delle modifiche del fenotipo o dell'espressione genica delle cellule target. Pertanto, si pensa che il trasferimento di informazioni genetiche mediato dalle EVs

sia alla base dell'azione paracrina delle cellule staminali nei processi di riparazione tissutale (Figura 1.1.7.1) (23).

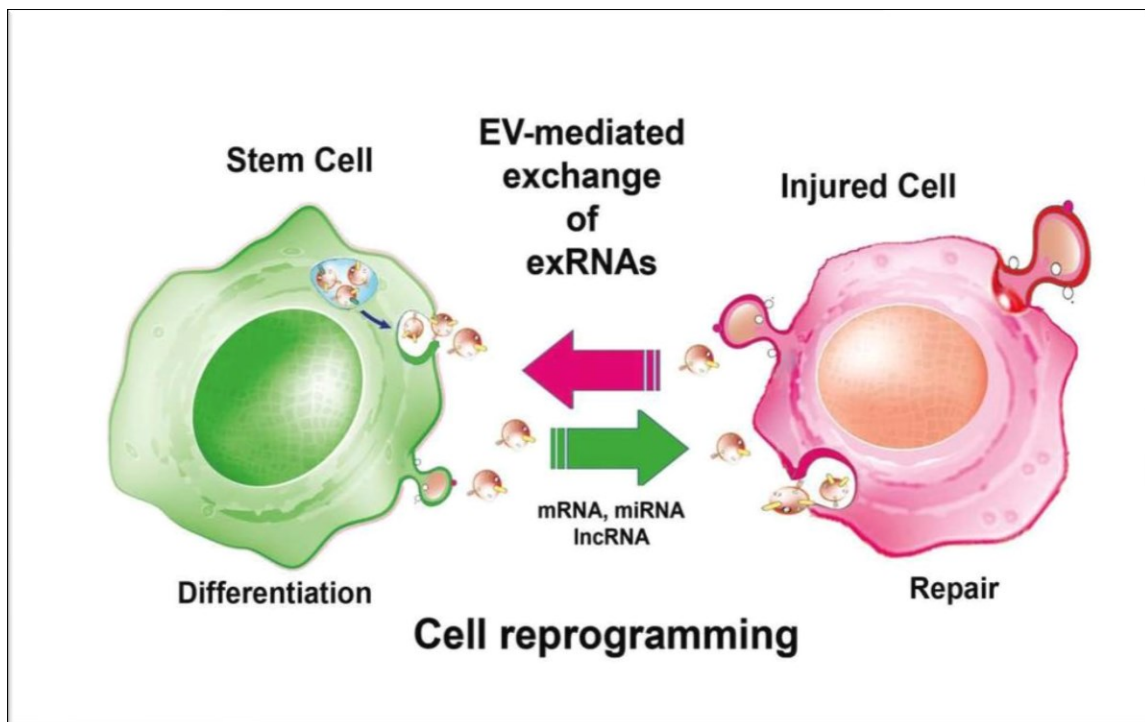


Figura 1.1.7.1 Riproduzione schematica dei meccanismi di scambi bidirezionali di RNA extracellulari tra cellule staminali e cellule danneggiate, mediati dalle EVs.

È evidente, per quanto descritto, che risulta fondamentale per la comunità scientifica acquisire al più presto maggiori e dettagliate informazioni riguardanti la biogenesi ed il rilascio delle EVs, tanto meno circa i meccanismi paracrini che le riguardano e le interazioni con specifici tipi cellulari.

1.2 GLI ESOSOMI

Gli esosomi sono delle microvescicole di derivazione membranosa, presenti in molti o, probabilmente, in tutti i fluidi biologici, tra cui sangue, urina, liquido cerebrospinale, saliva, latte materno, frazioni di fluidi corporei, come plasma e siero e nei terreni di coltura. Sono secreti dalla maggior parte dei tipi cellulari, dopo fusione con membrana plasmatica e rilasciati nello spazio extracellulare. Identificati per la prima volta nella seconda metà del

secolo scorso, soltanto recentemente è stato scoperto che queste vescicole extracellulari sono dei veicoli funzionali, che trasportano un complesso carico di proteine, lipidi e materiale genetico. Sono in grado di cedere questo importante materiale a cellule bersaglio e di riprogrammare il destinatario, in seguito all'accoppiamento. Dunque, gli esosomi rappresentano una nuova modalità di comunicazione cellulare che ricopre un ruolo importante in molti processi cellulari, come ad esempio la risposta immunitaria e la trasduzione dei segnali. Gli esosomi possono essere rilasciati praticamente da tutti i tipi di cellule eucariotiche; i loro contenuti possono essere completamente diversi da un tipo cellulare all'altro, sia per la funzione sia per il loro stato attuale (ad esempio stimolato, differenziato o trasformato). Quindi gli esosomi rappresentano un complesso biologico dinamico ed attivo, che può offrire interessanti informazioni prognostiche riguardanti diverse patologie, come l'infiammazione cronica, malattie cardiovascolari e renali, malattie neurodegenerative, malattie metaboliche e tumori (1).

1.2.1 BIOGENESI DEGLI ESOSOMI

I meccanismi di formazione e di rilascio degli esosomi sono sicuramente i più studiati, tra quelli delle diverse EVs, e comporta la formazione di vescicole intraluminali (ILV) all'interno dei corpi multivescicolari (MVB). Successivamente, gli MVB possono seguire due diversi destini: fondersi con la membrana plasmatica e liberare le vescicole intraluminali nell'ambiente extracellulare, o fondersi con i lisosomi per la degradazione del loro contenuto. La biogenesi degli esosomi inizia nel sistema endosomiale mediante la formazione di vescicole endocitiche, in regioni specializzate del plasmalemma. Tale processo può essere clatrina-dipendente, come nel caso del recettore della transferrina, o clatrina-indipendente, come nel caso delle proteine ancorate al glicosilfosfatidilinositolo (GPI). Le vescicole neoformate si staccano dal plasmalemma e vengono indirizzate verso gli endosomi precoci, con cui si fondono. Tali rappresentano un centro di smistamento nella via endocitica. Nell'ambiente leggermente acido dell'endosoma precoce, vari recettori di membrana mutano la loro conformazione e rilasciano un ligando. Tali ligandi in genere si dirigono verso i lisosomi per essere degradati. Al contrario recettori e ligandi che restano attaccati ad essi possono ritornare sulla membrana plasmatica o essere veicolati verso l'endosoma tardivo. Questi endosomi presentano un ambiente più acido rispetto a quelli precoci. In essi le proteine possono seguire due destini: ritornare sulla membrana plasmatica, oppure essere inglobate all'interno di vescicole più piccole, le vescicole intraluminali, che si

formano per gemmazione da vescicole di maggiori dimensioni, gli MVB. In seguito, gli MVB vengono veicolati verso la membrana plasmatica e, fondendosi con essa, rilasciano il loro contenuto nell'ambiente extracellulare (Figura 1.2.1.1). Le vescicole rilasciate prendono il nome di esosomi (11).

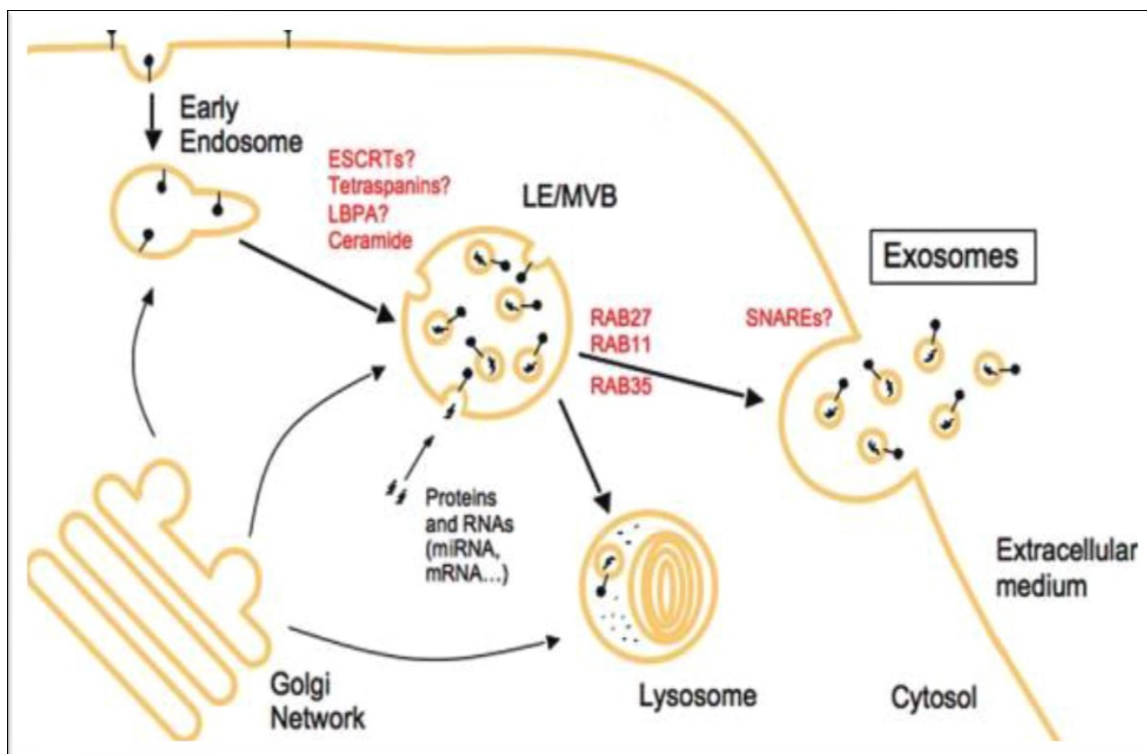


Figura 1.2.1.1 *Rappresentazione schematica del meccanismo di biogenesi e secrezione degli esosomi. Essi originano all'interno degli MVB, dal distacco delle ILV. La formazione delle ILV può essere mediata da diversi fattori, quali il complesso proteico ESCRT, le tetraspanine e da alcuni lipidi come LBPA e ceramide. Lo smistamento intravesicolare può essere mediato da diverse proteine appartenenti alla famiglia RAB, quali RAB11, RAB27 e RAB35. Infine, la fusione dei MVB con il plasmalemma può essere regolata dalle proteine SNAREs.*

1.2.2 MORFOLOGIA E COMPOSIZIONE

Gli esosomi appaiono di forma sferoide o biconcava in soluzione al microscopio elettronico a trasmissione. Tipicamente, essi hanno un intervallo di densità da 1,13 g/mL fino a 1,19 g/mL (su gradienti di saccarosio). Sono stati identificate 4563 proteine, 194 lipidi, 1639

mRNA e 764 miRNA all'interno di esosomi derivati da tipi di cellule diverse e da più organismi, a dimostrazione della loro complessità (Figura 1.2.2.1).

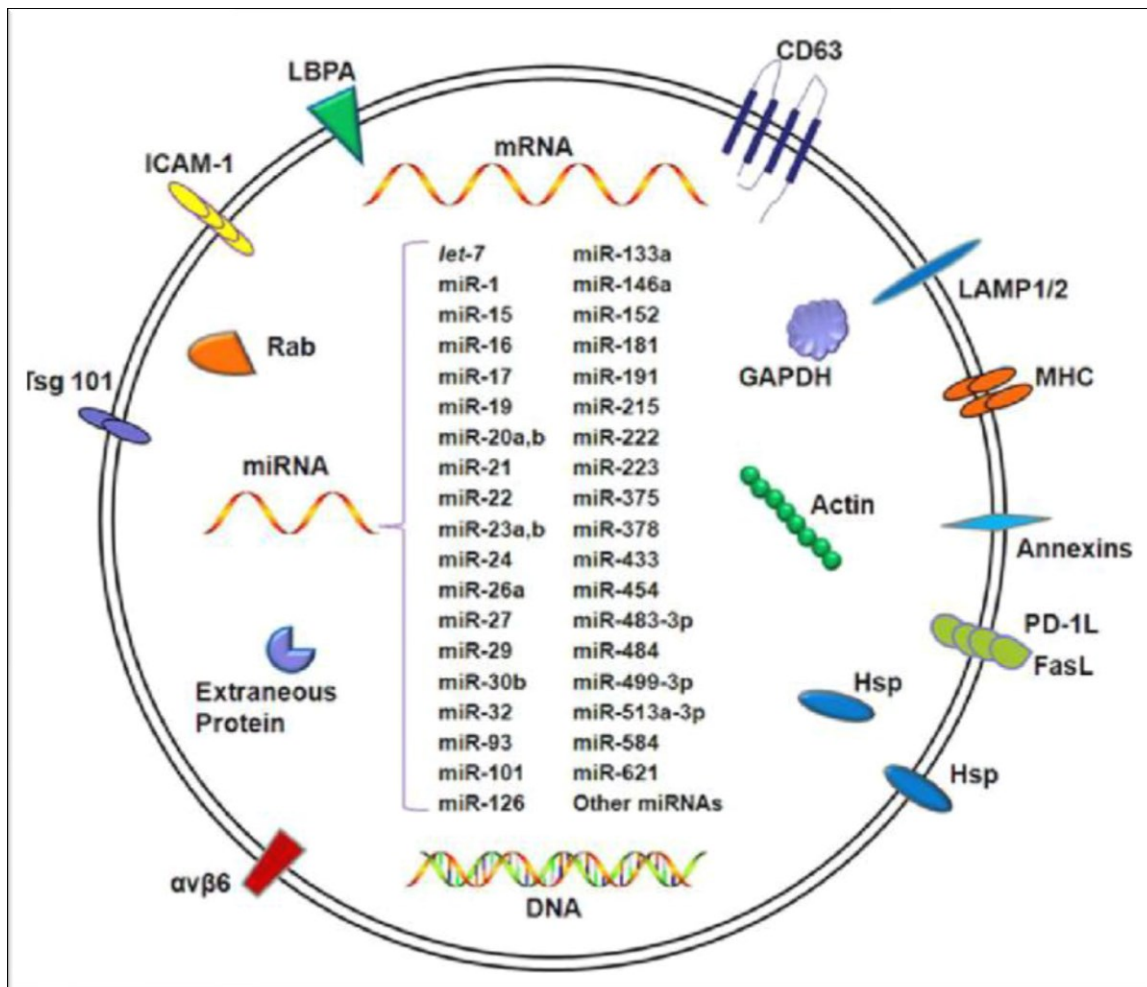


Figura 1.2.2.1 *Struttura e contenuto tipico degli esosomi.*

Gli esosomi contengono uno specifico complesso di proteine derivanti dalla membrana plasmatica, dagli endosomi e dal citosol, a conferma del fatto che sono secreti da cellule attive. Tra le proteine, quelle più importanti sono: le tetrasparine (CD9, CD63, CD81, CD82), che partecipano ai meccanismi di formazione cellulare, ad eventi di fusione e di invasione; le proteine da shock termico (HSP70, HSP90), che agiscono in situazioni di stress; proteine coinvolte nella formazione del MVB (Alix, TSG101); nonché proteine responsabili del trasporto attraverso la membrana plasmatica (Annexins e Rab). Tra queste proteine, alcune partecipano alla biogenesi degli esosomi, (Alix, flotillina e TSG101), mentre altre sono utilizzate come marcatori di proteine (HSP70, CD81, CD63). Oltre a proteine

specifiche, gli esosomi trasportano anche una varietà di materiale genetico come RNA, mRNA e miRNA, funzionalmente attivo. Tecniche di sequenziamento dell'RNA hanno dimostrato che i miRNA sono i più abbondanti nel plasma umano. Tali sono capaci di regolare l'espressione genica a livello post trascrizionale e mediare gli effetti funzionali degli esosomi. Sono coinvolti nel differenziamento delle cellule staminali, nell'emopoiesi, nell'organogenesi, nelle carcinogenesi e nella metastasi. Anche per la presenza di questi miRNA specifici, gli esosomi rappresentano un mezzo davvero interessante per una diagnostica non invasiva (11). La bioattività degli esosomi si manifesta anche tramite la componente lipidica. Generalmente sono ricchi di: fosfatidilserina, acido fosfatidico, colesterolo, sfingomieline, acido arachidonico ed altri acidi grassi; lipidi bioattivi, quali prostaglandine e leucotrieni ed enzimi del metabolismo lipidico. I lipidi, principalmente, conferiscono loro stabilità e rigidità strutturale (24).

1.2.3 COMUNICAZIONE CELLULARE MEDIATA DA ESOSOMI

È interessante poter osservare che gli esosomi rappresentano un nuovo meccanismo di comunicazione intercellulare, mezzo di trasporto di proteine, lipidi ed acidi nucleici. Questo concetto si basa sulla constatazione che esosomi rilasciati dalle cellule parentali possono interagire con cellule bersaglio, con conseguente modifica delle caratteristiche funzionali e fenotipiche di quest'ultima. Il successo dell'applicazione biologica degli esosomi dipende fortemente dall'effettiva consegna del materiale genetico, che può essere trasferito per mezzo dell'interazione con ligandi recettoriali, per mezzo della diretta fusione tra le membrane plasmatiche o tramite internalizzazione per endocitosi. Una volta internalizzati, gli esosomi potrebbero fondersi con le membrane degli endosomi, provocando un trasferimento genetico orizzontale del loro contenuto nel citoplasma delle cellule bersaglio. Le molecole bioattive contenute negli esosomi hanno mostrato di legarsi con le cellule bersaglio seguendo tre diversi meccanismi: diretta stimolazione delle cellule bersaglio mediante ligandi specifici; trasferimento di recettori attivati dalle cellule riceventi; riprogrammazione epigenetica delle cellule riceventi mediante il trasporto di proteine funzionali, lipidi e RNA (Figura 1.2.3.1). Ne risulta che le cellule parentali possono comunicare con specifiche cellule prossimali o distali attraverso la mediazione degli esosomi (11).

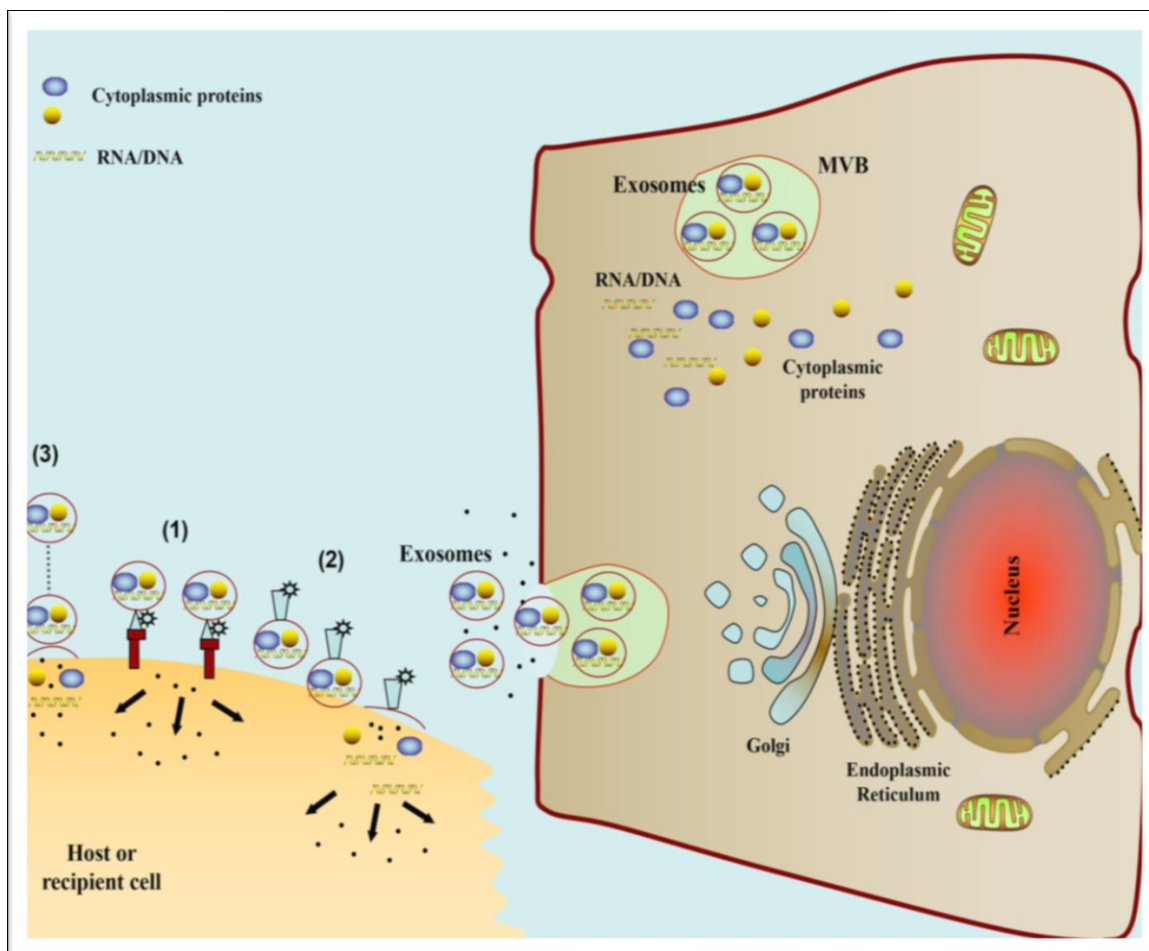


Figura 1.2.3.1 *Rappresentazione delle vie coinvolte nella comunicazione cellula-cellula mediata dagli esosomi: (1) diretta propagazione del segnale esosomiale mediante ligandi specifici; (2) trasferimento di esosomi attivato dai recettori delle cellule bersaglio; (3) riprogrammazione epigenetica della cellula ricevente, mediante il trasporto di proteine, lipidi ed RNA.*

1.2.4 GLI ESOSOMI NEL SISTEMA IMMUNITARIO

Nel sistema immunitario, gli esosomi hanno un'importante funzione immunoregolatrice, come la presenza dell'antigene, l'immunosoppressione e l'immunotolleranza. Gli esosomi che derivano dalle cellule CD4 T e CD8 T possono legarsi alle cellule dendritiche attraverso il complesso maggiore di istocompatibilità (MHC) e l'interazione ICAM-1/ALFA-1, che può portare all'apoptosi delle cellule dendritiche e quindi mediare il silenziamento delle cellule in modo specifico per l'antigene. Gli esosomi secreti dai linfociti T contengono Let-7b, Let-7d e miRNA-155 che sono in grado di inibire la risposta immunitaria Th-1 e mediare l'immunosoppressione. Inoltre, gli esosomi rilasciati dalla CD73 possono produrre

adenosina che può ulteriormente inibire l'attivazione o la proliferazione delle cellule CD4 T. È stato dimostrato che anche gli esosomi derivanti dai linfociti B causano, negli umani e nei topi, l'attivazione dell'antigene per le cellule T, per la presenza dell'MHC. Le cellule dendritiche sono cellule che hanno la funzione di presentare l'antigene ai linfociti B e T, con la capacità di indurre risposte immunitarie primarie e secondarie. Gli esosomi che derivano dalle cellule dendritiche possono essere in grado di sopprimere la crescita o la stabilizzazione dei tumori, tramite la presentazione dell'MHC di classe II e l'innescò di specifici linfociti T citotossici in vivo. Gli esosomi derivanti dalle cellule staminali mesenchimali (MSCs) sono i principali coinvolti nella riparazione tissutale. Tale capacità si manifesta in diversi organi, ed è stata verificata in diversi modelli patologici, mostrando una simile o, addirittura, superiore capacità funzionale rispetto alle MSCs stesse, come nella riparazione dei tessuti post-infarto del miocardio, post-ischemia, in seguito a lesione acuta renale, danno epatico e polmonare neonatale. Nonostante la diffusa origine cellulare, gli esosomi non interagiscono casualmente con nessuna cellula presente nelle vicinanze. Sono in grado di distinguere e selezionare cellule bersaglio, probabilmente a causa degli alti livelli adesione molecolare, per via della presenza di cellule come le integrine e le tetraspanine. Quindi, la capacità selettiva nel trasferimento di informazioni genetiche conferisce loro particolari attenzioni per il loro utilizzo in campo diagnostico e terapeutico (9).

1.2.5 GLI ESOSOMI NELLA DIAGNOSTICA E NELLA TERAPIA

Nel corso degli ultimi cinque anni, gli esosomi sono stati ritrovati in quasi tutti i fluidi corporei, tra i quali il sangue, le urine, la saliva, il latte materno, il liquido cerebrospinale, lo sperma, il liquido amniotico e l'ascesso. Questi esosomi hanno uno specifico profilo di miRNA, proteine e lipidi che può rispecchiare la loro origine cellulare e il loro stato fisiologico, come una "firma" o un' "impronta digitale". Pertanto, la specifica condizione di un esosoma può riflettere la condizione fisiologica relativa all'organo o tessuto che lo ha rilasciato: possono essere utilizzati come biomarcatori delle varie malattie. Nonostante i fluidi biologici siano relativamente semplici da reperire e nonostante la loro abbondanza di esosomi, attualmente l'effettivo utilizzo del contenuto esosomiale come biomarcatori non ha ancora trovato applicazioni nella pratica clinica. Ciò nonostante, diversi ricercatori credono che essi apriranno un nuovo capitolo nella diagnostica.

Gli esosomi possono essere utilizzati anche come vettori per la consegna di farmaci attraverso diverse barriere biologiche delle cellule bersaglio. Sono particolarmente indicati

per questa funzione per merito della loro elevata biocompatibilità e della loro diffusa distribuzione (11).

1.2.6 METODI PER LA SEPARAZIONE DEGLI ESOSOMI

Gli esosomi sono caratterizzati da dimensioni, morfologia e densità varianti e dalla presenza di proteine che fungono da marcatori, quali CD9, TSG101, HSP70, FLOT1 e ALIX. Sono state proposte diverse tecniche per l'isolamento degli esosomi. In genere, gli esosomi possono essere isolati da colture cellulari condizionate o dai fluidi corporei, tramite ultracentrifugazione, cromatografia di esclusione molecolare, tecniche microfluidiche e l'utilizzo di kit disponibili in commercio. Ogni approccio ha i suoi vantaggi e svantaggi, e la scelta può essere dettata dal tipo di campione e dallo scopo dell'analisi. Tuttora si crede che il metodo migliore per la separazione degli esosomi sia l'ultracentrifugazione ad alte velocità. Un elegante studio condotto da Webber ha dimostrato che l'uso di ultracentrifugazione su un "cuscino" di saccarosio è stato in grado di fornire una frazione altamente pura di esosomi. Tuttavia, la sua validità è stata confermata soltanto per la separazione di esosomi provenienti da una coltura cellulare, ma non con un campione di urine o siero, contenenti una combinazione di diverse componenti, probabilmente a causa della possibile sedimentazione di aggregati proteici e di legami non specifici. Una filtrazione mediante una serie di filtri con pori di 100 nm seguita da ultracentrifugazione, rappresenta un metodo efficace per isolare gli esosomi dalle proteine più piccole. Tuttavia, vi è un residuo proteico relativamente alto che potrebbe essere causa di impurità. L'immunoaffinità con l'utilizzo di anticorpi caricati di cellule magnetiche può essere eseguito anche per campioni contenenti varie tipologie di esosomi, in quanto tale metodo offre il vantaggio della specificità, ma i rendimenti sono spesso bassi. Di conseguenza, il metodo più accettato ed utilizzato per la separazione degli esosomi da coltura in vitro rimane l'ultracentrifugazione e successiva purificazione su gradiente di densità. Tuttavia, presenta come svantaggi i tempi molto lunghi, il lavoro intenso richiesto e la necessità di attrezzatura di laboratorio costosa (11). Negli ultimi anni sono stati messi a punto diversi kit per la separazione di esosomi, che permettono di ridurre i tempi di lavoro a meno di due ore ed hanno dimostrato di essere affidabili, efficienti e riproducibili, più di altre tecniche. Tuttavia, la sfida non consiste nella sola separazione degli esosomi, ma, piuttosto, in una rapida ed accurata quantificazione degli esosomi con la minima preparazione del campione, per permettere il rilevamento di piccoli cambiamenti patologici.

Di recente sono state sviluppate tecniche alternative che si basano sul conteggio diretto delle particelle, come la NTA. Nonostante la rapidità e l'affidabilità, tale tecnica presenta una debolezza a causa dell'incapacità di identificare in modo specifico gli esosomi, eccezion fatta per particelle della stessa dimensione. È doveroso osservare la mancanza di tecniche qualitative e quantitative che permettano una rapida e pura identificazione degli esosomi; ciò ne limita il loro impiego clinico. Ciò nonostante, tecnologie già consolidate potrebbero evolvere e superare questi problemi. Una sfida aggiuntiva include la possibilità di poter ottenere prodotti riproducibili e standardizzabili. Di conseguenza sono necessarie ancora robuste e valide ricerche per ottenere tecniche di successo per la pratica clinica.

2. SCOPO DELLA TESI

Lo scopo di questo studio è quello di riprodurre la Nanoparticle Tracking Analysis (NTA), al fine di individuare le vescicole extracellulari e, nello specifico, gli esosomi presenti in un campione biologico.

La NTA è alla base della strumentazione Nanosight, pioniera nello studio e nella caratterizzazione del mondo nanoparticellare, con numerosi risvolti clinici, sia in ambito diagnostico che terapeutico.

Tale elaborato potrebbe fungere da base per applicazioni maggiormente considerevoli e continuative, tramite la realizzazione della parte software di tale sofisticata e dispendiosa strumentazione.

3. MATERIALI E METODI

3.1 NANOPARTICLE TRACKING ANALYSIS (NTA)

La Nanoparticle tracking analysis (NTA) è una tecnica sviluppata dalla Nanosight Ltd che può essere usata per visualizzare ed analizzare particelle sospese in un liquido, mettendo in relazione il moto Browniano (Figura 3.1.1) delle particelle con le loro dimensioni. È una delle poche tecnologie a disposizione per visualizzare nanoparticelle in sospensione con dimensioni comprese nell'intervallo: $10 \div 1000$ nm. Particelle con due ordini di grandezza inferiori ai 100 nm sono chiamate nanoparticelle o particelle ultrafini. Le particelle fini, invece, hanno dimensioni che variano nel range: $100 \div 25000$ nm. La grandezza in questione è la diffusione traslazionale del diametro di una sfera, chiamata *diametro idrodinamico*. Infatti, se una particella dispersa in un liquido si muove attraverso un mezzo fluido, significa che sulla sua superficie è attaccato uno strato dipolare elettrico prevalentemente sottile, che influenza il movimento della particella. Nel controllo qualità, l'analisi dimensionale e della concentrazione necessitano di essere determinate di giorno in giorno con velocità e affidabilità. Per fare un'analisi che comprenda dimensione, concentrazione, carica superficiale (potenziale zeta) e fluorescenza, è necessario, per i ricercatori, acquisire maggiori approfondimenti nei processi di sintesi, studi sulle cinetiche o specificità di reazione. La NTA è una tecnica versatile capace di fornire misure rapide e multiparametriche, per tutti i tipi di particelle. Le più comuni applicazioni della NTA sono per particelle inorganiche, come il diossido di silicio, polimeri, fosfati, solfato di bario e nanotubi di carbonio. Inoltre, tutti i tipi di bionanoparticelle come aggregati di proteine, vescicole extracellulari, virus o liposomi possono essere analizzati e caratterizzati da tale tecnica, mediante marcatura con sostanze fluorescenti (25).

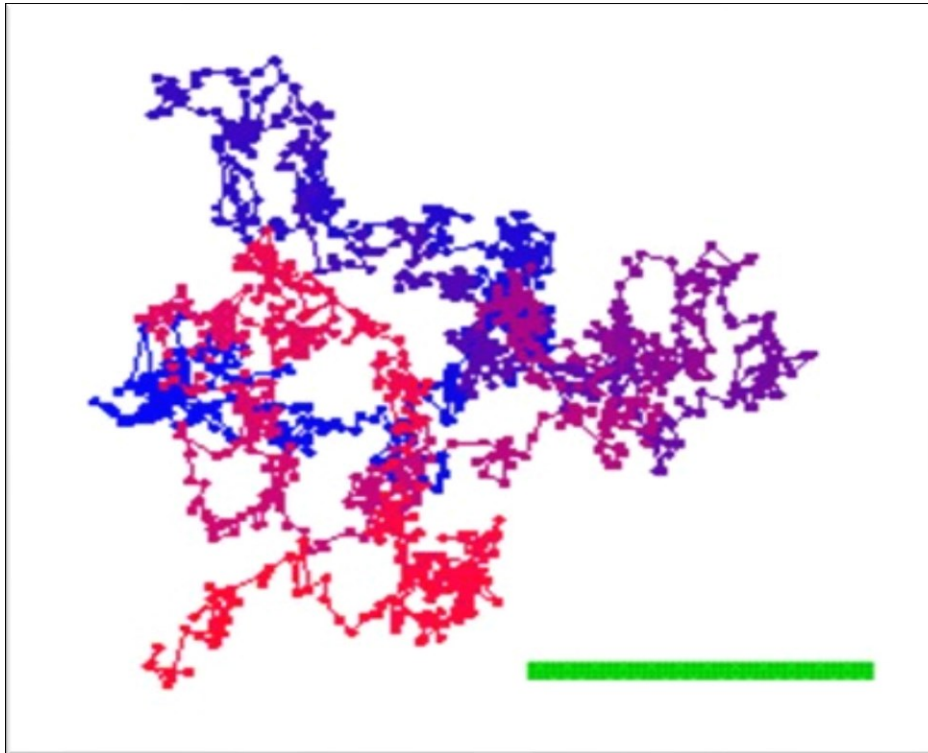


Figura 3.1.1 Esempio di moto Browniano: traiettoria di una particella di diametro di $2\ \mu\text{m}$, registrata ogni trentesimo di secondo per 24 s. L'inizio è raffigurato in rosso, la fine in blu.

3.1.1 PRINCIPIO FISICO

Quando le piccole particelle sono disperse in un liquido, esse si muovono a caso in tutte le direzioni. Il liquido viene anche detto solvente o fase continua e può essere l'acqua o solventi organici come l'etanolo al 70%. Il fenomeno del movimento a caso delle particelle si chiama diffusione e viene espresso mediante il *coefficiente di diffusione* [D]. Nello specifico, il movimento accidentale delle particelle è causato dal trasferimento di energia dalle molecole di acqua (o del solvente in generale) alle particelle stesse. La teoria sulla determinazione del coefficiente di diffusione venne sviluppata dal famoso fisico Albert Einstein. In assenza di qualsiasi tipo di gradiente di concentrazione all'interno della dispersione, si osserva che, nel lungo tempo, la distanza percorsa in ogni direzione dalle piccole particelle si annulla: risulta un movimento finale pari a zero. Tuttavia, durante determinati intervalli di tempo, si osserva che le particelle che si diffondono si muovono all'interno di un certo volume. Nella NTA il tempo [t] tra due osservazioni è molto piccolo (circa 30 ms). Il movimento delle particelle per intervallo di tempo viene registrato e quantificato come lo *spostamento quadratico medio*

$[x^2]$. A seconda del numero di dimensioni (una, due o tutte e tre le dimensioni), tramite lo spostamento medio nelle rispettive direzioni, il coefficiente di diffusione può essere calcolato nel modo seguente:

$$D = \frac{\langle x^2 \rangle}{2t} \quad [1]$$

$$D = \frac{\overline{\langle x, y \rangle}^2}{4t} \quad [2]$$

$$D = \frac{\overline{\langle x, y, z \rangle}^2}{6t} \quad [3]$$

Tramite l'equazione di Stokes-Einstein, il *diametro idrodinamico* delle particelle $[d]$ può essere calcolato in funzione del *coefficiente di diffusione* $[D]$, della *temperatura* $[T]$ e della *viscosità* del liquido $[\eta]$ (sia $[k]$ la costante di Stefan-Boltzmann):

$$D = \frac{4kT}{3\pi\eta d} \quad [4]$$

L'importanza della relazione [4] è che collega la quantità macroscopica D , determinabile da osservazioni sperimentali, con quantità microscopiche, come k ed il numero di Avogadro $N=R/k$ (con R costante dei gas), consentendo la determinazione di grandezze microscopiche da misure macroscopiche.

Nella NTA, la fluttuazione delle singole particelle è registrata in due dimensioni. Dalla combinazione dell'equazione di Stokes-Einstein con la formula dello spostamento quadratico medio in due dimensioni, l'equazione può essere risolta per ottenere il diametro medio delle particelle:

$$d = \frac{4kT}{3\pi\eta t} \cdot \frac{4t}{\langle x, y \rangle^2} = \frac{16kT}{3\pi\eta \langle x, y \rangle^2} \quad [5]$$

Tracciando simultaneamente più particelle, è possibile ottenere parallelamente ciascun diametro (25). La sensibilità dello strumento, cioè la più piccola dimensione delle particelle rilevabile, dipende dall'intensità di diffusione delle particelle (scattering), dall'efficienza di ingrandimento ottico e dalla sensibilità della fotocamera. Per scattering si intende quel processo di interazione tra due particelle che provoca una deviazione delle loro direzioni di moto. Le nanoparticelle di argento e di oro, ad esempio, hanno un elevato indice di rifrazione (2÷4), diffondono molto e, di conseguenza, possono essere rilevate anche dimensioni di circa 10 nm. Le nanoparticelle biologiche, come le EVs, hanno un indice di rifrazione più basso (1.37÷1.45), dunque possono essere rilevate dimensioni di 30÷50 nm. La NTA consente la misura diretta della concentrazione delle singole particelle nel volume illuminato. Pertanto, la NTA è una tecnica di misurazione assoluta che consente la caratterizzazione completa della superficie o del volume del campione. Per la misura della concentrazione, lo strumento è calibrato con dimensioni standard, tipiche della grandezza. Il campo di lavoro è di $10^5 \div 10^9$ particelle per cm^3 . È molto basso se paragonato a tecniche come la Dynamic Light Scattering (DLS), perciò consente di analizzare campioni con ridotte concentrazioni. Per avere risultati affidabili si consiglia di analizzare campioni con 1.000 ÷ 10.000 particelle singole. Sono incluse il controllo della temperatura, la messa a fuoco automatica e la misura della conducibilità (26).

La qualità dei risultati è condizionata dalla contaminazione del campione. Inoltre, alte concentrazioni di agenti stabilizzanti (come i tensioattivi) sono problematiche non appena raggiungono la concentrazione micellare critica (CMC). Distorsioni della forma delle particelle possono essere causate dai diluenti (acqua distillata o soluzioni tampone) o da sostanze chimiche utilizzate in fase di preparazione del campione. In genere, precipitati di fosfati, carbonati o silicati possono essere rimossi mediante filtrazione, con carte aventi dimensioni dei pori inferiori ai 50 nm. Inoltre, la pulizia in bagni ad ultrasuoni consente la rimozione di bolle d'aria (27).

3.1.2 PRINCIPIO DI MISURA

La tecnica NTA utilizza le proprietà del movimento browniano e della luce diffusa per ottenere la distribuzione dimensionale e la concentrazione dei campioni in sospensione liquida (Figura 3.1.2.1).

La determinazione del moto browniano avviene mediante l'analisi di una sequenza di video. La luce diffusa dalle particelle viene registrata mediante telecamere sensibili alla luce, quali la Charge Coupled Device (CCD) o la Complementary Metal Oxide Semiconductor (CMOS).

Il sensore di ambedue le telecamere è un fotodiodo che, quando viene colpito dalla luce, produce una carica elettrica. La differenza sta nel fatto che nel CCD la carica elettrica è trasferita per mezzo di nodi di uscita, in seguito convertita in voltaggio e, quindi, pronta ad uscire dal sensore come segnale analogico; nei CMOS, invece, ogni fotodiodo è unito ad un convertitore che trasforma l'energia generata dalla luce in tensione, in modo tale che l'uscita sia in formato digitale. Ulteriori differenze sono che: il CCD consuma più energia del CMOS, fornisce immagini di alta qualità con un basso livello di rumore, è più costoso ed è più complesso.

La telecamera viene posta perpendicolarmente rispetto al piano di irradiazione. La disposizione a 90° consente il rilevamento ed il monitoraggio del moto browniano di vescicole di dimensioni comprese tra 10 e 1000 nm. Usando uno specifico algoritmo, le particelle vengono rilevate ed il loro percorso viene registrato. Viene calcolata la dimensione di ciascuna particella tracciata individualmente, permettendo così la simultanea determinazione della loro distribuzione dimensionale e di concentrazione.

Nonostante la tecnologia sia relativamente nuova sul mercato, essa ha avuto origine circa venticinque anni fa. La completa affermazione della NTA ha richiesto la disponibilità di computer veloci, in grado di riprodurre fedelmente ed in tempo reale le immagini.

Il livello di movimento delle particelle è legato alla viscosità del liquido, alla temperatura ed alla dimensione delle particelle; mentre, non è legato alla densità o all'indice di rifrazione. Le particelle contenute nel campione sono visualizzate in virtù della dispersione della luce quando illuminate dalla luce laser. La luce diffusa dalle particelle viene catturata utilizzando una fotocamera digitale scientifica e il movimento di ciascuna particella viene tracciato da un fotogramma all'altro da un software appositamente sviluppato. Il livello di movimento delle particelle è correlato al diametro idrodinamico che viene calcolato attraverso

l'equazione di Stokes-Einstein. La tecnica calcola la dimensione delle particelle una ad una, superando le debolezze delle tecniche di assemblaggio. Inoltre, poiché il video costituisce la base dell'analisi, è possibile un'accurata caratterizzazione in tempo reale, ad esempio, di eventi di aggregazione e dissoluzione.

La misurazione della concentrazione delle particelle è un requisito di numerose applicazioni. Il sistema di rilevamento di singole particelle della strumentazione Nanosight consente la misurazione di particelle in sospensione liquida con diametri compresi tra i 10 nm ed i 2000 nm. L'ulteriore capacità di misurare la concentrazione di una particella aumenta le prestazioni dello strumento, fornendo all'utente una comprensione più dettagliata del proprio campione (28).

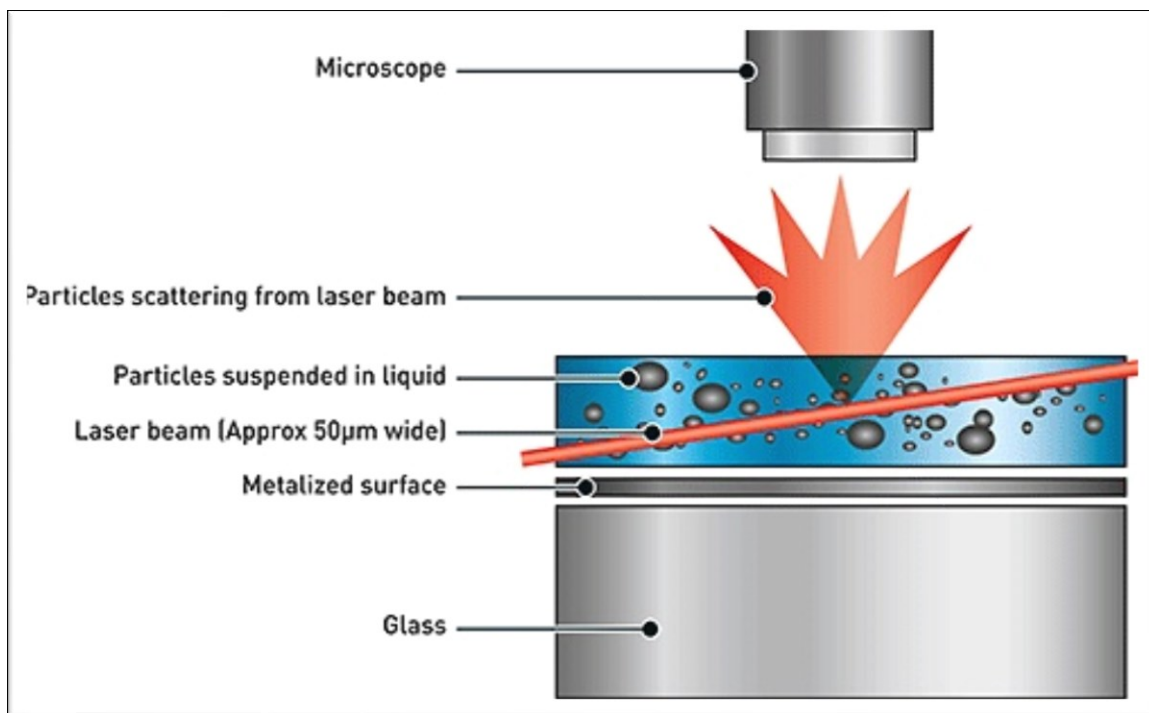


Figura 3.1.2.1 *Illustrazione del principio di misura. Un elemento ottico brevettato illumina con raggio laser ad un'angolazione specifica la camera contenente il campione. Le particelle in sospensione diffondono la luce, dunque sono perfettamente visibili al microscopio (20x). Una camera montata sul microscopio registra un video, dal quale si osserva che le particelle appaiono isolate, come punti luminosi, in movimento sotto l'effetto del moto Browniano; le particelle più piccole si muovono più velocemente rispetto a quelle più grandi. Un software le monitora automaticamente e simultaneamente, analizzandone i movimenti e calcolandone il coefficiente di diffusione. Applicando l'equazione di Stokes-Einstein si ottiene il diametro idrodinamico di ogni particella individuata.*

I risultati ottenuti dalla NTA sono:

- la distribuzione dimensionale e quantitativa ad alta risoluzione;
- lo scattering di ogni particella;
- la fluorescenza di ogni particella;
- la concentrazione totale del campione.

La tecnologia consente, inoltre, di monitorare in tempo reale dei piccoli cambiamenti, grazie all'osservazione al microscopio. Fornisce, quindi, simultaneamente numerosi parametri di controllo per analisi rapide su minimi volumi di campione (Figura 3.1.2.2 e Figura 3.1.2.3).

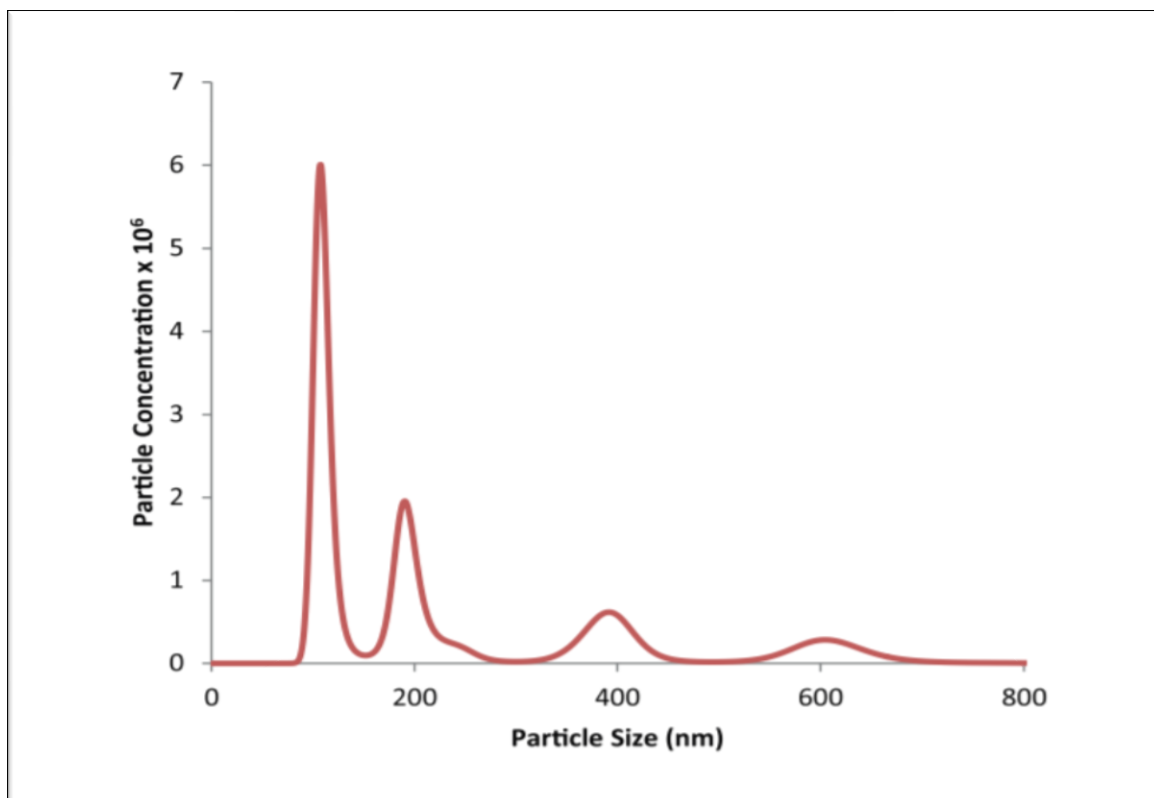


Figura 3.1.2.2 Grafico di un campione sottoposto a NTA. Mostra l'andamento della dimensione delle particelle e le relative concentrazioni, con picchi distinti a 100 nm, 200 nm, 400 nm, 600 nm.

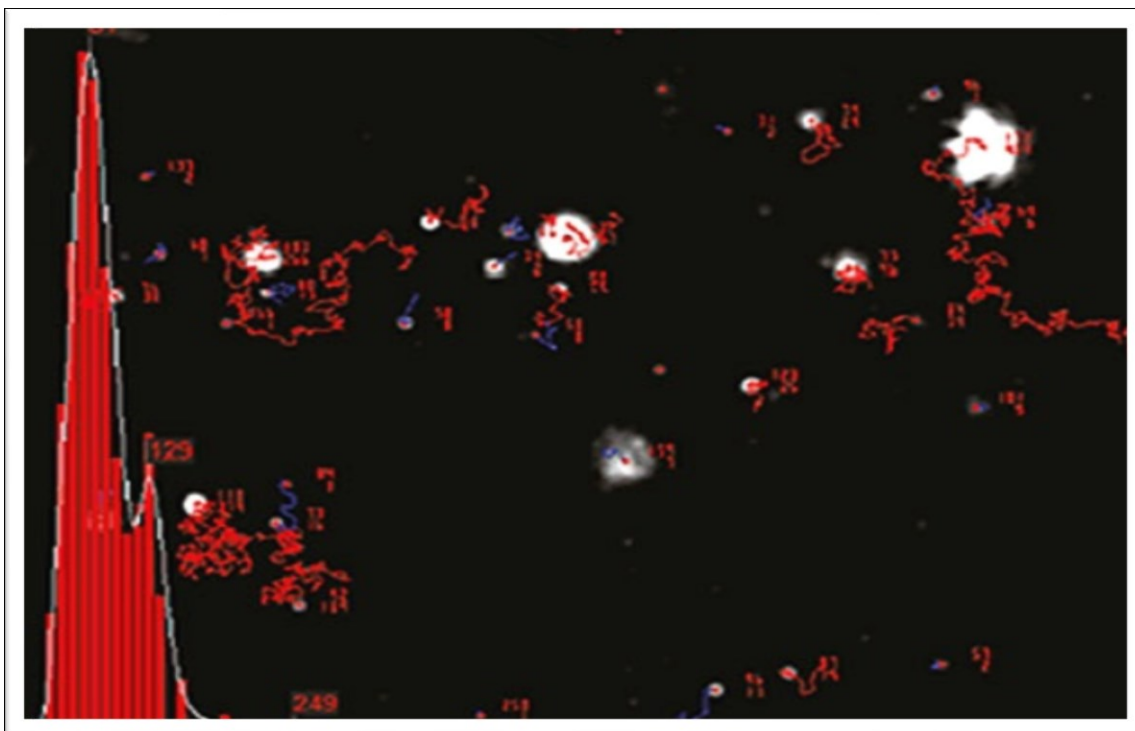


Figura 3.1.2.3 Esempio di analisi dimensionale mediante NTA. La dimensione modale di questo campione risulta essere di circa 70 nm. La NTA può essere anche utilizzata per misurare il movimento delle particelle in un campo visivo fisso, illuminato da un raggio profondo 10 micron. Il volume di scattering del campione può essere dedotto

3.2 RIPRODUZIONE DELLA NTA

Un tipico sistema per la caratterizzazione delle vescicole mediante NTA è costituito da (Figura 3.2.1):

- un laser per fornire una fonte di luce con lunghezza d'onda fissa, coerente ed intensa;
- un microscopio invertito per l'osservazione degli organismi viventi della coltura in vitro;
- un alimentatore per fornire al laser la tensione di funzionamento;
- un terreno di coltura in vitro su piastra Petri, contenente le vescicole da analizzare; occorre che il campione si diluito con una soluzione isoosmotica al 90%, altrimenti gli esosomi scoppierebbero. Il campione diluito va centrifugato a 10000 g per 10 minuti e filtrato con pori di 160 nm.

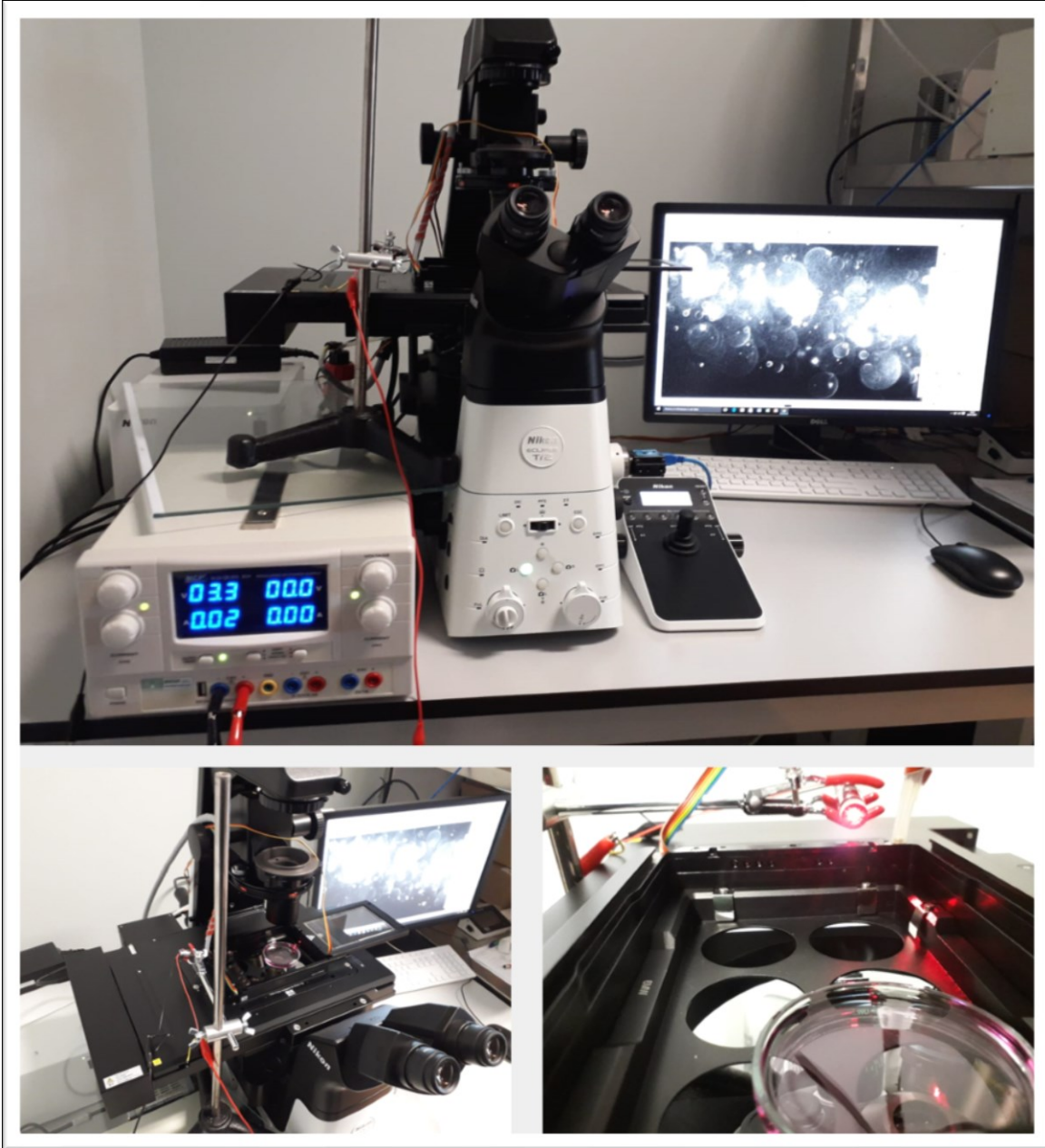


Figura 3.2.1 *Rappresentazione del sistema di lavoro per la riproduzione della tecnica di analisi del Nanosight. Si osservi che il puntatore laser è costituito da un diodo laser a luce rossa di elevata qualità, disponibile nella lunghezza d'onda di 635 nm e con una potenza di 20mW; inoltre assorbe meno di 50 mA di corrente, ha uno spessore di linea di circa 2 – 3 mm ed un errore di linearità di 1 mm ogni 1.000 mm. Le particelle in coltura diffondono la luce, dunque sono visibili tramite un microscopio invertito. Quest'ultimo ha il condensatore e la sorgente di luce posti al di sopra del tavolino portaoggetti, mentre la torretta e gli obiettivi si trovano al di sotto dello stesso. È equipaggiato di un dispositivo per il contrasto di fase, il cui rilevamento si basa sulle differenze di contrasto tra il campione da analizzare ed il mezzo circostante, in modo tale da consentire la visualizzazione senza ricorrere a metodologie di colorazione. Il revolver portaobiettivi è stato fissato su un contrasto di fase a 10x. Infine, si osservi la presenza della camera montata sul microscopio che consente la registrazione di un video da cui è possibile ricavare le dovute considerazioni tramite l'applicazione di uno specifico software.*

3.3 RISULTATI

La NTA è una tecnica che fornisce diversi risultati. Le applicazioni principali sono finalizzate ad ottenere misure di dimensioni e di concentrazione. Tuttavia, per comprendere i processi secondari e distinguere ulteriormente le particelle, sono integrate anche le misure del potenziale zeta e della fluorescenza.

- DIMENSIONE. La dimensione delle singole particelle è calcolata mediante l'analisi del moto Browniano. La distribuzione delle grandezze delle particelle è ottenuta dalla raccolta di circa 1000 singole particelle.
- CONCENTRAZIONE. Conoscendo il volume del misurando, la concentrazione si ottiene mediante la conta di tutte le particelle presenti nel campo visivo. La concentrazione può essere ottenuta in particelle per cm³.
- POTENZIALE ZETA. Riflette la carica superficiale delle particelle che è legata alla stabilità delle forze elettrostatiche. Dunque, permette di differenziare ulteriormente particelle con le stesse dimensioni. Ad esempio, nanoparticelle di oro coniugate e non coniugate presentano tra loro un differente potenziale zeta.

- FLUORESCENZA. La determinazione della fluorescenza permette di distinguere microvescicole appositamente marcate con specifiche sostanze fluorescenti e può essere utilizzata, ad esempio, per la quantificazione di sottopopolazioni. Con un fascio di luce laser a 488 nm, lo strumento rileva vescicole, EVs e particelle simili ai virus, se contrassegnate con marcatori tipici, come il GFP, il PKH67 e Alexa488.

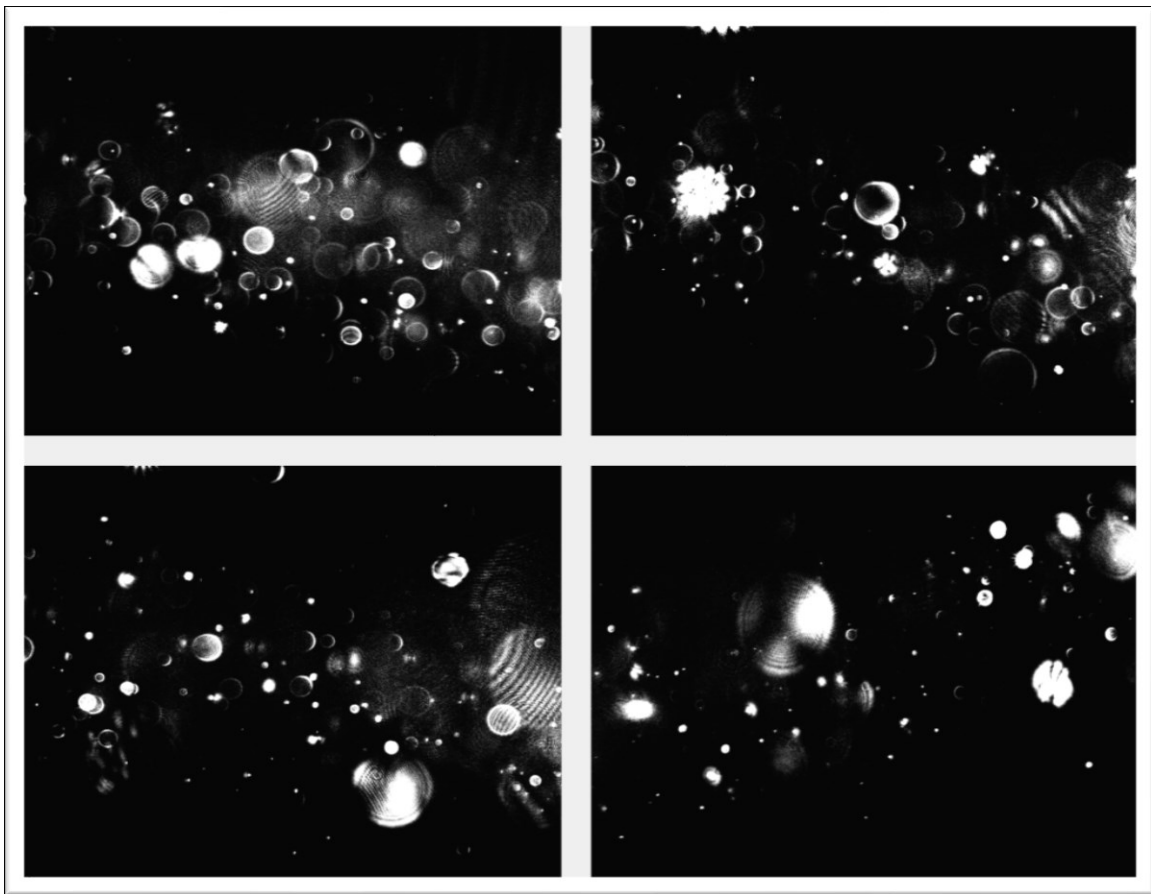


Figura 3.3.1 *Rappresentazione di immagini, in diversi istanti di tempo, ottenute mediante riproduzione della NTA. È possibile osservare lo spostamento medio nelle due direzioni delle diverse EVs, dovuto al moto browniano che caratterizza tali particelle. Esse appaiono isolate, come punti luminosi; le più grandi si muovono più lentamente rispetto a quelle più piccole, dal momento che creano, rispettivamente, delle variazioni di intensità della luce diffusa dal campione lente e rapide.*

4. CONCLUSIONI

Questo studio è nato con lo scopo di sperimentare l'efficacia di una tecnica di analisi, la NTA, che è in grado di consentire l'osservazione e la caratterizzazione del mondo nanoparticellare che costituisce l'organismo umano.

Pioniera nella caratterizzazione di esosomi, la tecnica NTA è oggi riconosciuta come il metodo più efficiente per l'analisi delle concentrazioni e delle dimensioni delle microvescicole. Il metodo di tracking delle singole particelle consente di ottenere la granulometria e la concentrazione delle particelle ad alta risoluzione, anche per campioni in matrici complesse o polidisperse. L'opportunità di lavorare in fluorescenza con l'applicazione di filtri a lunghezza d'onda costante permette, inoltre, di differenziare particelle marcate o naturalmente fluorescenti. I dati reperiti attraverso la NTA rappresentano un valido supporto alla ricerca, mediante i vari processi di caratterizzazione degli esosomi, inclusi studi di purificazione, stabilità e conservazione.

Ciò nonostante, è importante sottolineare i problemi di aspecificità di tale tecnica, così come la mancanza di caratteristiche qualitative e quantitative che permettano una rapida ed autentica identificazione degli esosomi. Il che ne limita notevolmente il loro impiego clinico, dilapidando quello che potrebbe essere un importantissimo strumento diagnostico e terapeutico per la Medicina.

In effetti, un numero sempre crescente di dati dimostra come gli esosomi e, in generale, le EVs possano agire come mediatori della comunicazione intercellulare, fungendo da trasportatori di molecole, quali recettori, mRNA, miRNA, DNA, proteine e lipidi. Inoltre, studi recenti hanno dimostrato che gli esosomi presentano organotropismo e, dunque, hanno la capacità di fornire informazioni per quanto riguarda il tessuto di origine: ciò rende loro i principali candidati per essere utilizzati come biomarcatori per numerose applicazioni, limitando la necessità di biopsie.

Alla luce di quanto detto, è evidente che si è in una fase di transizione, a causa della modernità di tali studi. Partendo dalle tecnologie già affermate, è doveroso superare le problematiche che limitano lo studio di tali importantissime ed affascinanti microvescicole. Pertanto, studi futuri potrebbero essere progettati per analizzare, accuratamente, il contenuto degli esosomi e delle EVs, sia in condizioni fisiologiche che patologiche.

5. BIBLIOGRAFIA

1. **Monesi, Adamo, De Felici, Dolfi, Filippini, Grano, Musaro', Nervi, Papac.** *Istologia di Monesi*. VII. s.l. : Piccin, 2018. p. 841.
2. **P. Rosati, R. Colombo, N. Maradi.** *Istologia*. 5. s.l. : Edi. Ermes, 2006. p. 640.
3. *The nature and significance of platelet products in human plasma.* **E. Chargaff, R. West.** 1967, Br J Haematol.
4. *Vesicles associated with calcification in the matrix of epiphyseal cartilage.* **Anderson.** 1969, J Cell Biol.
5. *Letter: Membrane fragments with koinozymic properties released from villous adenoma of the rectum.* **M. De Broe, R. Wieme, F. Roels.** 1975, Lancet.
6. *Fate of the transferrin receptor during maturation of sheep reticulocytes in vitro: selective externalization of the receptor.* **B.T. Pan, R.M. Johnstone.** 1983, Cell.
7. *B lymphocytes secrete antigen-presenting vesicles.* **G. Raposo, et. al.** 1996, J Exp Med.
8. *Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells.* **H. Valadi, et al.** 2007, Nat Cell Biol.
9. *Specificities of secretion and uptake of exosomes and other extracellular vesicles for cell-to-cell communication.* **Mathieu, M., Martin-Jaular, L., Lavieu, G. et al.** 2019, Nat Cell Biol.
10. *Optical and non-optical methods for detection and characterization of microparticles and exosomes.* **van der Pol, E., et al.** 2010, J Thromb Haemost.
11. *Exosomes: biogenesis, biologic function and clinical potential.* **Zhang Y, Liu Y, Liu H, Tang WH.** 2019, Cell Biosci.
12. *Detailed analysis of the plasma extracellular vesicle proteome after separation from lipoproteins.* **Karimi, N., Cvjetkovic, A., Jang, S.C. et al.** 2018, Cell. Mol. Life Sci.
13. *Shedding microvesicles: artefacts no more.* **Cocucci E, Racchetti G, Meldolesi J.** 2009, Trends Cell Biol.

14. *Tumour-released exosomes and their implications in cancer immunity.* **Iero M, Valenti R, Huber V, Filipazzi P, Parmiani G, Fais S, Rivoltini L.** 2008, Cell Death Differ.
15. *Argosomes: a potential vehicle for the spread of morphogens through epithelia.* **Greco V, Hannus M, Eaton S.** 2011, Cell.
16. *Functional role of extracellular vesicles and lipoproteins in the tumour microenvironment.* **Menard Julien A., Cerezo-Magaña Myriam and Belting Mattias.** 2017, Phil. Trans. R. Soc. B.
17. *Vesicle-associated urokinase plasminogen activator promotes invasion in prostate cancer cell lines.* **Angelucci A, D'Ascenzo S, Festuccia C, Gravina GL, Bologna M, Dolo V, Pavan A.** 2000, Vesicle-associated urokinase plasminogen activator promotes invasion in prostate cancer cell lines.
18. *Complement proteins C5b-9 cause release of membrane vesicles from the platelet surface that are enriched in the membrane.* **Sims PJ, Faioni EM, Wiedmer T, Shattil SJ.** 1988, J Biol Chem.
19. *Stem cells and the niche: a dynamic duo.* **Voog J, Jones DL.** 2010, Cell Stem Cell.
20. *Bone marrow stem cell mobilization in stroke: a 'bonehead' may be good after all!* **CV, Borlongan.** 2011, Leukemia.
21. *Advances in cardiology: clinical trial update.* **Howe AJ, Shand JA, Menown IB.** 2011, Future Cardiol.
22. *Exogenous mesenchymal stem cells localize to the kidney by means of CD44 following acute tubular injury.* **Herrera MB, Bussolati B, Bruno S, Morando L, Mauriello-Romanazzi G, Sanavio F, Stamenkovic I, Biancone L, Camussi G.** 2007, Kidney Int.
23. *Role of Stem Cell-derived Extracellular RNA-carrying Vesicles in Cell Reprogramming.* **Camussi G, Deregibus MC, Quesenberry PJ.** 2014, Austin J Clin Pathol.
24. *Exosome function: from tumor immunology to pathogen biology.* **Schorey, J.S. and S. Bhatnagar.** 2008, Traffic.
25. *Particle Metrix GmbH. www.particle-metrix.de. [Online] 40668 Meerbusch / Germany.*

26. *Characterisation of exosomes derived from human cells by nanoparticle tracking analysis and scanning electron microscopy.* **Viktoriya Sokolova, Anna-Kristin Ludwig, Sandra Hornung, Olga Rotan, Peter A. Horn, Matthias Epple, Bernd Giebel.** 2011, Colloids Surf B Biointerfaces.

27. *Critical Evaluation of Nanoparticle Tracking Analysis (NTA) by NanoSight for the Measurement of Nanoparticles and Protein Aggregates.* **Filipe, V., Hawe, A. & Jiskoot, W.** 2010, Pharm Res.

28. *Interlaboratory comparison of size measurements on nanoparticles using nanoparticle tracking analysis (NTA).* **Hole, P., Sillence, K., Hannell, C. et al.** 2013, J Nanopart Res.