



UNIVERSITÀ
DI PAVIA

Dipartimento di Biologia e Biotechnologie “L. Spallanzani”

Laurea Magistrale in Biologia Sperimentale e Applicata

Dipartimento di Sanità Pubblica, Medicina sperimentale e forense

Valutazione qualitativa dell'internalizzazione di
micro- e nanoplastiche nelle cellule staminali
mesenchimali umane mediante analisi microscopica

Relatore:

Prof.ssa Manuela Monti

Correlatore:

Dott.ssa Beatrice Camia

Tesi sperimentale di
Sofia Vitti

Anno Accademico 2025/2026

INDICE

INTRODUZIONE	4
Cellule staminali mesenchimali (<i>Mesenchymal Stem Cells</i> – MSC)	4
Fenotipo e proprietà biologiche	4
Fonti principali di isolamento	8
Midollo Osseo	8
Fonti alternative di isolamento	10
Liquido follicolare ovarico	10
Capacità differenziative	15
Potenziati applicazioni cliniche	18
Influenza di sostanze esogene	19
Micro e nanoplastiche nell'ambiente	20
Influenza sulla salute	20
Effetti tossici sulla riproduzione	23
Meccanismo di internalizzazione nell'organismo	27
Trasporto di sostanze inquinanti	29
SCOPO DEL LAVORO	31
MATERIALI E METODI	32
Isolamento di cellule staminali mesenchimali da midollo osseo (BM-MS) e liquido follicolare (FF-MS)	32
Protocollo di isolamento di cellule staminali mesenchimali da liquido follicolare	32
Incorporazione di micro- e nanoplastiche di polistirene fluorescenti	33
Immunofluorescenza	33
Marcatura fluorescente dell'Apparato del Golgi ed Immunofluorescenza	35
Valutazione delle specie reattive dell'ossigeno (ROS)	35

Valutazione dell'apoptosi mediante Annexin V	36
Differenziamento adipogenico di cellule staminali mesenchimali da midollo osseo e da liquido follicolare	36
Colorazione citochimica con LipidTOX	36
RISULTATI	38
Analisi fenotipica e morfologica di cellule staminali mesenchimali isolate da fluido follicolare in coltura con microplastiche	38
Analisi fenotipica e morfologica di cellule staminali mesenchimali isolate da fluido follicolare in coltura con nanoplastiche	40
Cinetica di internalizzazione di nanoplastiche	41
Analisi fenotipica e morfologica di cellule staminali mesenchimali isolate da midollo osseo in coltura con nanoplastiche	43
Analisi comparativa della crescita e della morfologia di FF-MSC e BM-MSC in coltura con nanoplastiche e in condizioni di controllo	45
Immunofluorescenza: analisi qualitativa della localizzazione della clatrina in cellule staminali mesenchimali in coltura con micro- e nanoplastiche	48
Analisi qualitativa e comparativa della localizzazione di clatrina e calnexina di cellule staminali mesenchimali in coltura con nanoplastiche	50
Analisi della co-localizzazione della clatrina con l'apparato di Golgi	51
Meccanismo di stress ossidativo indotto da nanoplastiche	52
Analisi del differenziamento adipogenico in FF-MSC in coltura con nanoplastiche	55
Colorazione citochimica LipidTOX: analisi qualitativa della formazione di gocce lipidiche	58
Analisi del differenziamento adipogenico in BM-MSC in coltura con nanoplastiche	59
Colorazione citochimica LipidTOX: analisi qualitativa della formazione di gocce lipidiche	62

Analisi comparativa del differenziamento adipogenico di FF-MSC e BM-MSC in coltura con nanoplastiche e in condizioni di controllo	63
DISCUSSIONE	67
CONCLUSIONE	74
BIBLIOGRAFIA	76

INTRODUZIONE

Cellule staminali mesenchimali (*Mesenchymal Stem Cells* – MSC)

Sono cellule multipotenti che nell’embrione si formano a partire dal mesoderma, il foglietto embrionale intermedio che si sviluppa durante la gastrulazione; il quale dà origine alle MSC della colonna vertebrale, dei muscoli scheletrici, del midollo osseo, del tessuto adiposo, dello stroma degli organi viscerali, del cordone ombelicale, della placenta e del liquido follicolare. Le MSC della polpa dentale, della mascella, della mandibola e di parte delle ossa del cranio (regione cranio-facciale) originano, invece, dall’ectomesenchima, il quale si forma durante lo sviluppo del tubo neurale, dalle cellule della cresta neurale.

Fenotipo e proprietà biologiche

Le cellule staminali mesenchimali sono mononucleate, caratterizzate da un’eterogeneità morfologica; infatti, possono apparire più tondeggianti, stellate o allungate. In particolare, in coltura *in vitro*, formano colonie di cellule che creano fitte reti di lunghi prolungamenti che si connettono saldamente tra loro (**Fig. 1**).

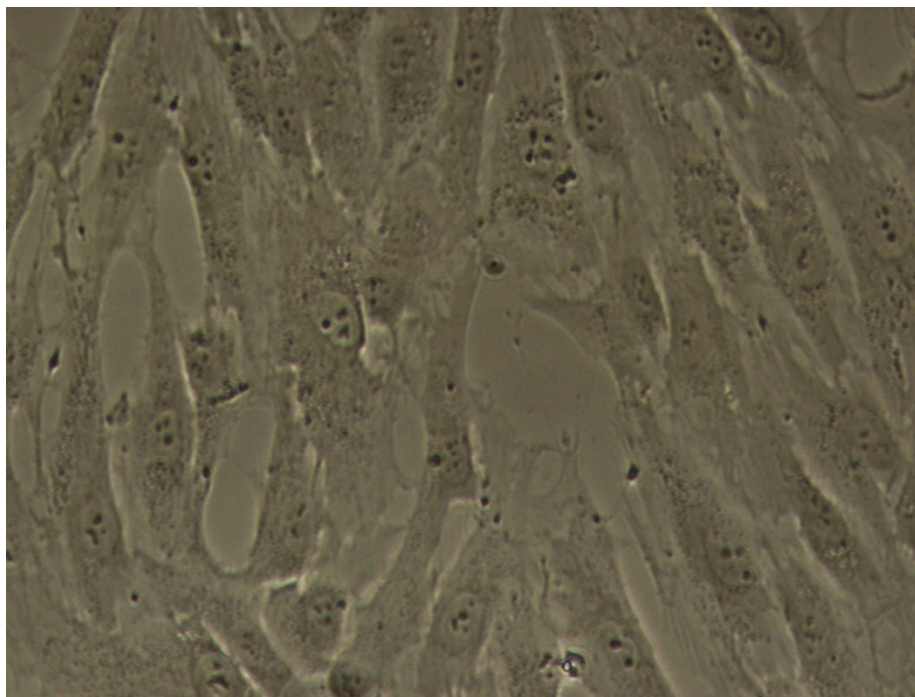


Fig. 1 Immagine che rappresenta la tipica morfologia allungata delle cellule staminali mesenchimali isolate da midollo osseo; è possibile individuare il fitto tappeto di cellule con prolungamenti che si interconnettono tra loro.

La Società Internazionale di Terapia Cellulare ha definito i criteri minimi per identificare le MSC umane; tra cui, la capacità di aderire alla plastica se mantenute nelle condizioni standard di coltura *in vitro*, l'espressione di particolari proteine di superficie, quali CD105, CD73 e CD90 e la mancata espressione di CD45, CD34 e CD14. Infine, in quanto multipotenti, sono in grado di differenziarsi in adipociti, osteociti e condrociti se sottoposte a specifici trattamenti di differenziamento [1].

Nonostante ciò, è stato dimostrato che, cellule staminali isolate da tessuti diversi, esprimono geni tessuto-specifici e mostrano positività a specifici marcatori di superficie, rappresentando, quindi, una popolazione cellulare eterogenea [2].

Infatti, le cellule staminali mesenchimali derivate da midollo osseo (*Bone Marrow* BM-MSC) esprimono CD29, CD73, CD90, CD105, CD106, CD140b e CD166, ma non CD31, CD45, CD34, CD133 o MHC di classe II [3]. Mentre, MSC provenienti da altri tessuti, come la placenta o il liquido amniotico esprimono altri antigeni di superficie

tessuto-specifici, come l'antigene embrionale specifico dello stadio-4 (SSEA-4) [4] e l'antigene di rigetto tumorale-1 (TRA-1) [5] (**Fig. 2**).

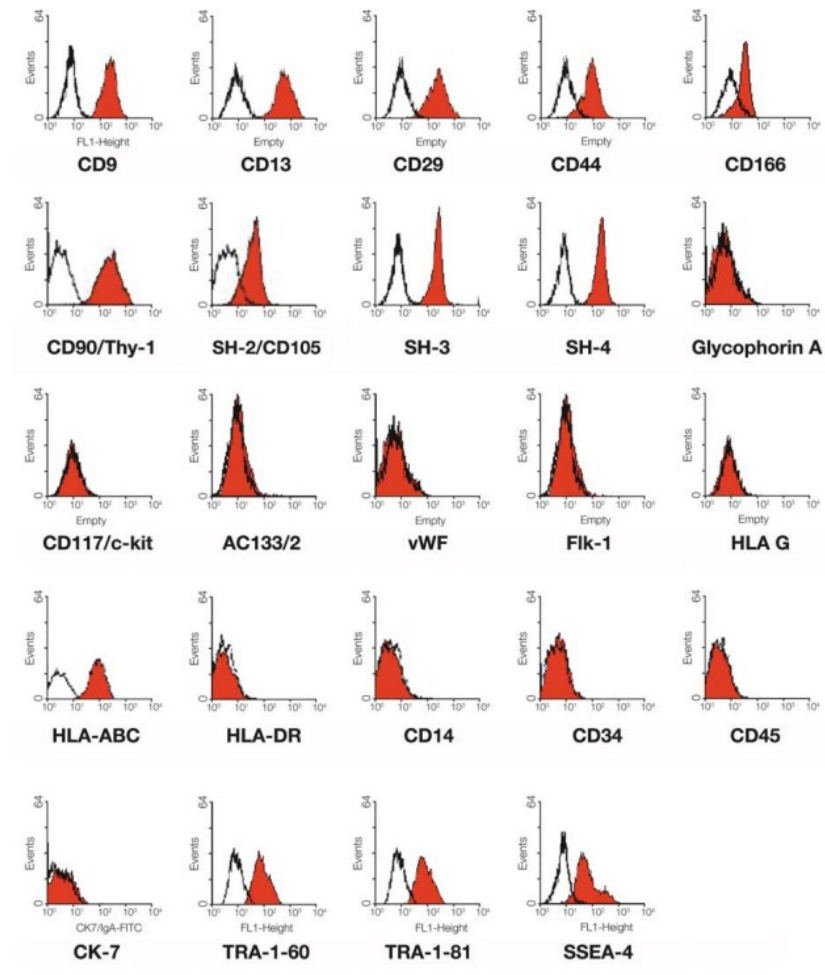


Fig. 2 Istogramma di immunofenotipizzazione rappresentativa dei marcatori di superficie di cellule staminali derivate dalla placenta. Si noti come queste cellule siano positive per i comuni marcatori delle MSC, quali SH-2/CD105, CD90/Thy-1, e CD29; ma sono anche fortemente positive per i marcatori di superficie cellulare associati alle cellule staminali embrionali di SSEA-4, TRA-1-60 e TRA 1-81. Immagine adattata da Linju Yen *et al.* [5].

Anche il tessuto adiposo è ricco di MSC, ossia le cellule lipoaspirate elaborate (PLA), positive per la proteina CD49d (assente nelle BM-MSC), e negative per il marcatore

CD106, il quale è correlato all'emopoiesi; pertanto, la sua mancata espressione nelle PLA è coerente con la localizzazione di queste cellule in un tessuto non ematopoietico [6].

Per la caratterizzazione di MSC si utilizzano comunemente marcatori espressi naturalmente su cellule endoteliali, epiteliali, sui linfociti B e T, su cellule *natural killer*, su cellule dendritiche o cellule del sangue (soprattutto piastrine ed eritrociti). Si tratta di molecole di adesione cellulare, integrine, selectine, chemochine o recettori di membrana coinvolti nei processi di apoptosi o necrosi [7].

Le cellule staminali mesenchimali hanno proprietà immunomodulatorie e sono coinvolte in processi infiammatori quali: autoimmunità, tolleranza al trapianto, evasione tumorale e tolleranza feto-materna. Un recente studio di Petrenko *et al.* [8] ha esaminato la capacità delle MSC, provenienti da diverse fonti, di sopprimere la proliferazione delle cellule mononucleate del sangue periferico indotta dalla fitoemoagglutina in coltura da contatto. I ricercatori hanno notato che le MSC hanno inibito quasi completamente l'infiammazione. Tuttavia, la risposta immunitaria è stata soppressa in modo più efficace solo nelle MSC derivate dal midollo osseo, confermandosi la fonte con un potenziale immunosoppressivo più rilevante.

Inoltre, hanno funzione di *turn-over* cellulare, di rigenerazione e riparazione di tessuti adulti danneggiati o compromessi. Nello specifico, diversi studi hanno dimostrato che le MSC sono implicate nel processo di riparazione delle ferite; infatti, vescicole extracellulari (extracellular vesicles – EV), derivate da cellule stromali mesenchimali umane, grazie all'elevata concentrazione di fosfatidilserina e fattore tissutale, innescano la risposta trombotica, promuovendo la coagulazione [9]. Lo stesso effetto è stato descritto da una ricerca di Silachev *et al.* [10], in cui alcune cellule staminali mesenchimali isolate dalla gelatina di Wharton dei cordoni ombelicali ed EV, derivate da esse, sono risultate positive all'Annexin V, confermando la loro natura procoagulante.

Fonti principali di isolamento

Le principali fonti di isolamento di MSC utilizzate per studi clinici sull'uomo, sono il midollo osseo, il tessuto adiposo (*Adipose Derived* - AD-MSC) e la gelatina di Wharton (*Wharton's Jelly* - WJ-MSC).

Midollo Osseo

Il midollo osseo è un organo linfoide primario situato nel canale midollare delle ossa lunghe e nelle trabecole delle ossa spugnose. Dopo la nascita è deputato all'emopoiesi, ossia alla produzione delle cellule del sangue (eritrociti, leucociti e piastrine), grazie alla presenza della nicchia di cellule staminali emopoietiche multipotenti (**Fig. 3**).

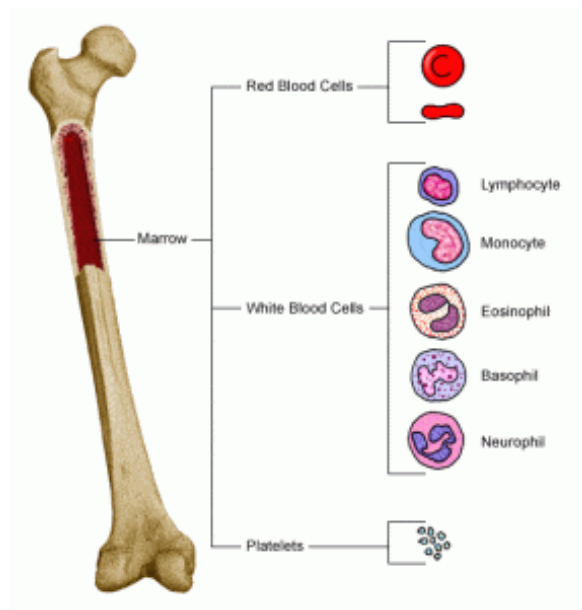


Fig. 3 Rappresentazione dell'attività emopoietica del midollo osseo. Immagine adattata da www.biopills.net.

Le BM-MSC negli esseri umani possono essere isolate dalla cresta iliaca, dal corpo vertebrale, dal femore o dallo sterno. Il midollo osseo è sempre stato considerato il *gold standard* per l'ottenimento di MSC adulte [11].

Di seguito sono riportati alcuni lavori che attestano l'utilizzo di MSC derivate da midollo osseo in diversi approcci terapeutici:

- Un recente studio [12] ha dimostrato che il trapianto di BM-MSC in pazienti con osteoartrite del ginocchio sintomatica ha permesso di ottenere un miglioramento delle condizioni di salute rispetto a MSC derivanti da tessuto adiposo o da cordone ombelicale. Tramite la *Visual Analogue Scale*, è stata individuata una netta attenuazione del dolore e, grazie alla misurazione del *Range of Motion*, un miglioramento della mobilità ed elasticità dell'osso.
- Una ricerca del 2025 di Haotong Yi *et al.* [13] ha dimostrato per la prima volta che le mesenchimali da midollo osseo riducono l'immunosoppressione post-ictus grazie all'utilizzo di migrasomi che, attraversando la barriera emato-testicolare, rilasciano specificatamente la proteina PIN1 in cellule timiche epiteliali, promuovendo quindi la ricostruzione e proliferazione di cellule T.
- Uno studio di Khamis *et al.* del 2023 [14] si è basato sulla somministrazione intraperitoneale di BM-MSC in ratti maschi con nefropatia diabetica. Queste cellule, raggiungendo il tessuto renale, sembrano contrastare il danno renale, diminuendo lo stress ossidativo, lo stress del reticolo endoplasmatico, l'infiammazione e l'apoptosi. In particolare, gli effetti evidenziati sono: una significativa riduzione dell'espressione delle proteine del citoscheletro (desmina, vimentina e nestina), una conseguente diminuzione dell'infiltrazione renale, oltre che una limitata proliferazione di cellule proinfiammatorie.
- Alapure *et al.* [15] hanno dimostrato che, BM-MSC di topo, seminate in un idrogel ibrido biodegradabile (ACgel), sembrano ridurre lesioni dovute a gravi ustioni e favorire la cicatrizzazione e riepitelizzazione, inducendo l'espressione di interleuchina-10 riparativa e di macrofagi M2.

Fonti alternative di isolamento

MSC umane possono essere isolate da fonti alternative quali la placenta, ricca di cellule amniotiche, la polpa dentale, il cordone ombelicale, e il liquido follicolare ovarico [16].

Liquido follicolare ovarico

Il liquido follicolare (*Follicular fluid* – FF) è un fluido biologico contenuto nell'antro follicolare che origina dall'azione secretoria delle cellule della granulosa e della teca, oltre che dal trasferimento di elementi del plasma sanguigno che attraversano la barriera emato-follicolare [17]. Nello specifico è costituito da un microambiente complesso che comprende principalmente ormoni, come gonadotropina corionica (*human chorionic gonadotropin* – hCG), l'ormone follicolo stimolante (*follicle stimulating hormone* – FSH), l'ormone luteinizzante (*luteinizing hormone* – LH), ormone della crescita (*Growth hormone* – GH), estradiolo, progesterone e androstenedione (ormone steroideo); nel FF sono presenti anche vescicole extracellulari, antiossidanti, anticoagulanti, elettroliti, specie reattive dell'ossigeno, interleuchine, fattori antiapoptotici, proteine, peptidi, amminoacidi e fattori di crescita, come fattori di crescita insulino-simile (*Insuline-like growth factor* – IGF), fattore di crescita dell'epidermide (*Epidermal growth factor* -EGF) e il fattore di crescita trasformante alfa (*Transforming growth factor alpha* - TGF- α).

Durante la folliculogenesi, il fluido follicolare si trova nell'antro follicolare e al momento dell'ovulazione, parte di questo viene espulso, insieme all'oocita, dall'ovaio (Fig. 4).

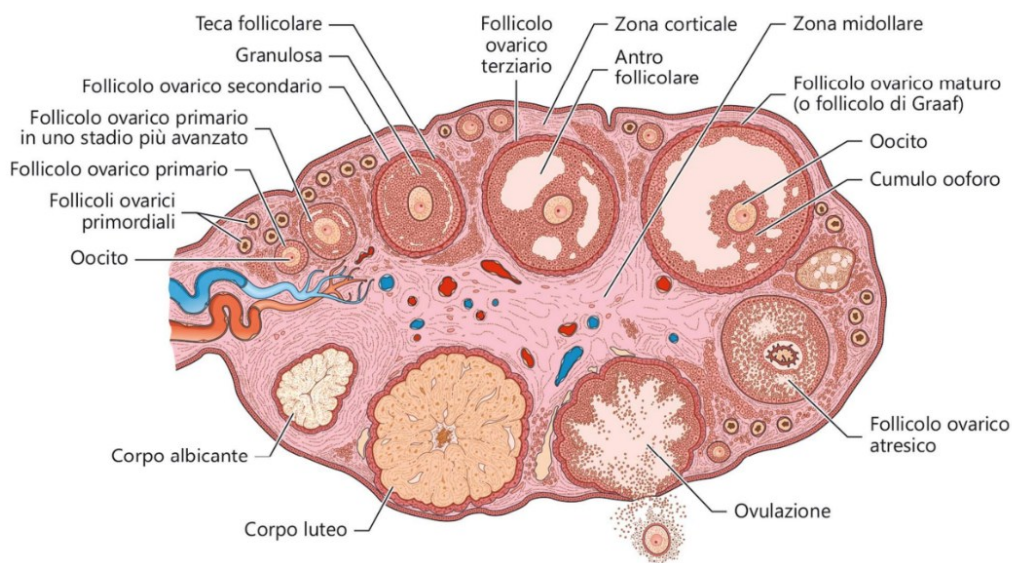


Fig. 4 Rappresentazione dell'anatomia ovarica, della follicologenesi e dell'ovulazione. Immagine modificata da Asklepios Medical Atlas.

Il liquido follicolare è l'unica sostanza biologica direttamente connessa all'ovocita e svolge un ruolo fondamentale nella comunicazione bidirezionale tra ovociti e cellule della granulosa, promuovendo la formazione del gamete femminile. Infatti, fornisce supporto, nutrienti e substrati energetici all'ovocita fino al suo rilascio nella tuba uterina.

Nello specifico, il follicolo di Graaf o follicolo antrale preovulatorio rappresenta lo stadio finale della follicologenesi, in cui l'antro ha raggiunto la sua massima espansione e l'ovocita, allo stadio di vescicola germinale, è immerso nel liquido follicolare e circondato dalle cellule del cumulo ooforo che lo ancorano alla parete. Il follicolo di Graaf è delimitato internamente dalla lamina basale (monstrato di matrice extracellulare) ed esternamente da due strati cellulari somatici, ossia la teca interna ed esterna, quest'ultima strettamente interconnessa da una rete vascolare ovarica. L'interazione controllata tra strati somatici e cellule del cumulo ooforo crea un microambiente che regola la maturazione ovocitaria attraverso il rilascio di ioni, metaboliti, glucosio e molecole segnale.

Anche le gonadotropine sono essenziali nel processo di sviluppo e maturazione dell'ovocita, in quanto influenzano la produzione di sostanze, tra cui l'acido ialuronico

da parte delle cellule della granulosa; controllano anche la meiosi degli oociti tramite la secrezione dell'AMP ciclico (cAMP) e agiscono sinergicamente con l'estradiolo (*estradiolo* - E2) nel migliorare la maturazione citoplasmatica dell'ovulo [18]. Infatti, E2 svolge un'azione non-genomica diretta sulla membrana plasmatica inducendo l'afflusso di calcio extracellulare nella cellula [19].

Al contrario, lo stress ossidativo risulta essere deleterio per la corretta maturazione degli ovociti; infatti, la presenza di Specie Reattive dell'Ossigeno (*Reactive Oxygen Species* – ROS) può indurre danni al DNA. In particolare, i follicoli ipossici contengono ovociti con un'alta probabilità di anomalie del fuso meiotico e conseguente possibile sviluppo di aneuploidie nell'embrione, che, nella maggior parte dei casi, si traducono in un'interruzione della gravidanza [20]. Il liquido follicolare contiene antiossidanti per contrastare l'azione di tali radicali liberi, quali l'enzima superossido dismutasi (*Superoxide dismutase* - SOD) e la glutatione perossidasi selenio-dipendente (*Selenium-dependent glutathione peroxidase* - SeGPx). Anche la melatonina (ormone pineale) sembra avere un effetto antiossidante di protezione per gli ovociti; infatti, la regolare somministrazione di 3 mg/giorno può migliorare il tasso di fecondazione [21].

Diversi studi hanno definito l'influenza del fluido follicolare nel processo di fecondazione, soprattutto in donne con problemi legati alla fertilità come la sindrome dell'ovaio policistico (*Polycystic Ovary Syndrome* – PCOS).

In particolare, de Resende *et al.* nel 2010 [22] hanno caratterizzato il profilo endocrino del liquido follicolare in pazienti sane (controlli) e affette da PCOS sottoposte a fecondazione *in vitro*. L'analisi ha evidenziato variazioni significative nei livelli di testosterone, estradiolo, progesterone e gonadotropina corionica umana in funzione del grado di maturazione follicolare. Inoltre, poiché la buona riuscita della fecondazione è associata ad alti livelli di progesterone nei follicoli [23], tale steroide rappresenta un potenziale biomarcatore per la valutazione della qualità del follicolo e quindi dell'ovocita in esso contenuto [24], anche se i meccanismi molecolari mediante i quali il progesterone modula la competenza ovocitaria non sono ancora stati del tutto compresi.

Infine, l'impiego di analisi metabolomiche e proteomiche integrate sul liquido follicolare ha permesso di mappare alterazioni delle vie metaboliche lipidiche ed i profili di espressione proteica in pazienti sane e con PCOS. Sono state identificate 144

proteine differenzialmente espresse nelle cellule della granulosa rispetto ai controlli, principalmente implicate nei meccanismi di degranulazione piastrinica, nella cascata della coagulazione e nei processi infiammatori. Inoltre, il microambiente follicolare di donne affette da PCOS mostra un incremento significativo di IL-6 (Interleukin-6) e TNF- α [25]. Ulteriori studi sono però necessari per individuare l'esatta eziopatogenesi e validare biomarcatori diagnostici accurati.

Il liquido follicolare sembra essere una valida fonte alternativa di MSC che a livello morfologico presentano la caratteristica popolazione cellulare eterogenea [26] (**Fig. 5**)

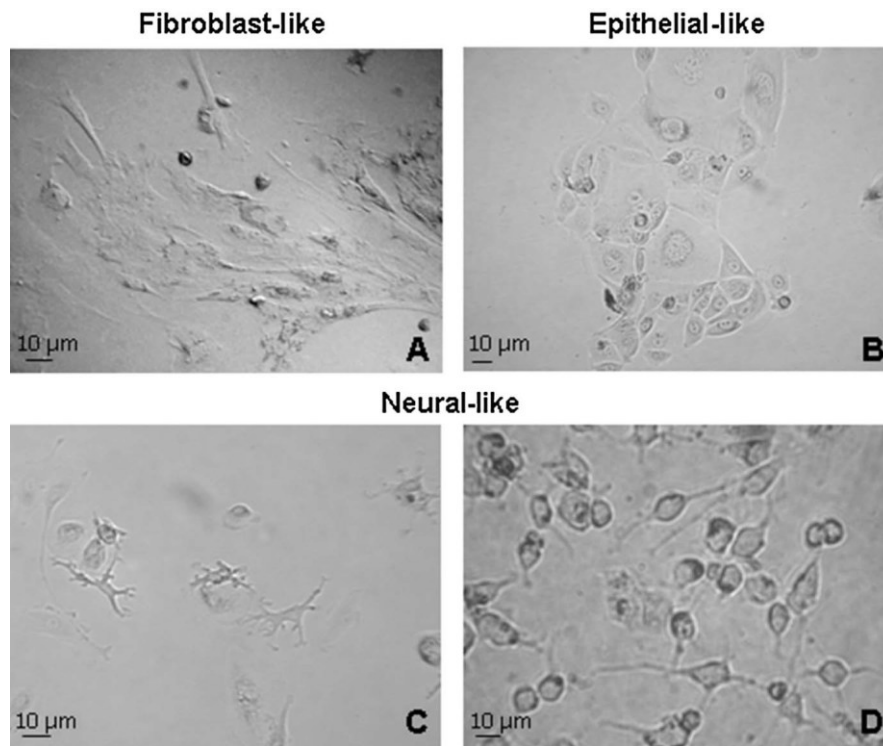


Fig. 5 Immagini rappresentative di colture cellulari primarie di FF-MSC seminate su vetrini coprioggetti. In A e B si evidenzia la coesistenza di popolazioni cellulari differenti, quali fenotipo simil-fibroblasto (A) o epiteliale cuboidale (B) dopo 24 ore di coltura. In C si può osservare una morfologia simil-neurale dopo 24 ore di coltura e in D un grande corpo cellulare sferico con protrusioni citoplasmatiche dopo 72 ore in coltura. Immagine adattata da Riva *et al.* [26].

Inoltre, le FF-MSC esprimono, sebbene con una percentuale diversa di positività, marcatori di superficie simili alle BM-MSC [26] (Fig. 6)

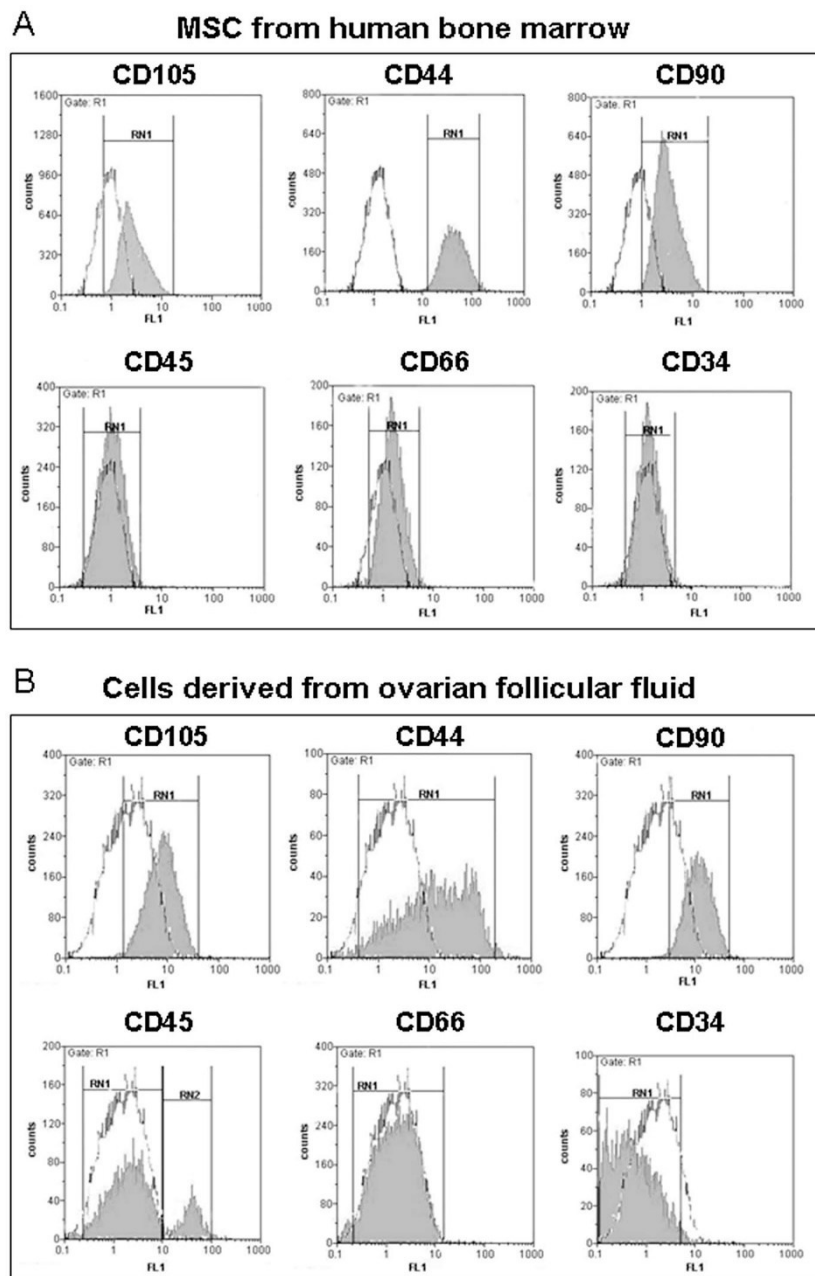


Fig. 6 Analisi citofluorimetrica dell'espressione degli antigeni di superficie CD105, CD44, CD90, CD45, CD66 e CD34 in BM-MSC (A) e FF-MSC (B). Si osservi una forte positività di CD105 in entrambi i tipi cellulari, una riduzione dell'espressione dei marcatori CD44 e CD90 nelle FF-MSC rispetto alle BM-MSC e una positività, del circa 30%, esclusiva delle FF-MSC per l'antigene CD45. Dopo 7 giorni di

coltura si riscontra l'assenza di CD66, CD34 e CD45 sia per le MSC da midollo osseo che da fluido follicolare. Immagine adattata da Riva *et al.* [26].

Capacità differenziative

Le MSC sono in grado di differenziarsi principalmente in osteociti, adipociti, condrociti e in tessuti mesodermici (tendini e legamenti), cardiomiociti e miociti (**Fig. 7**)

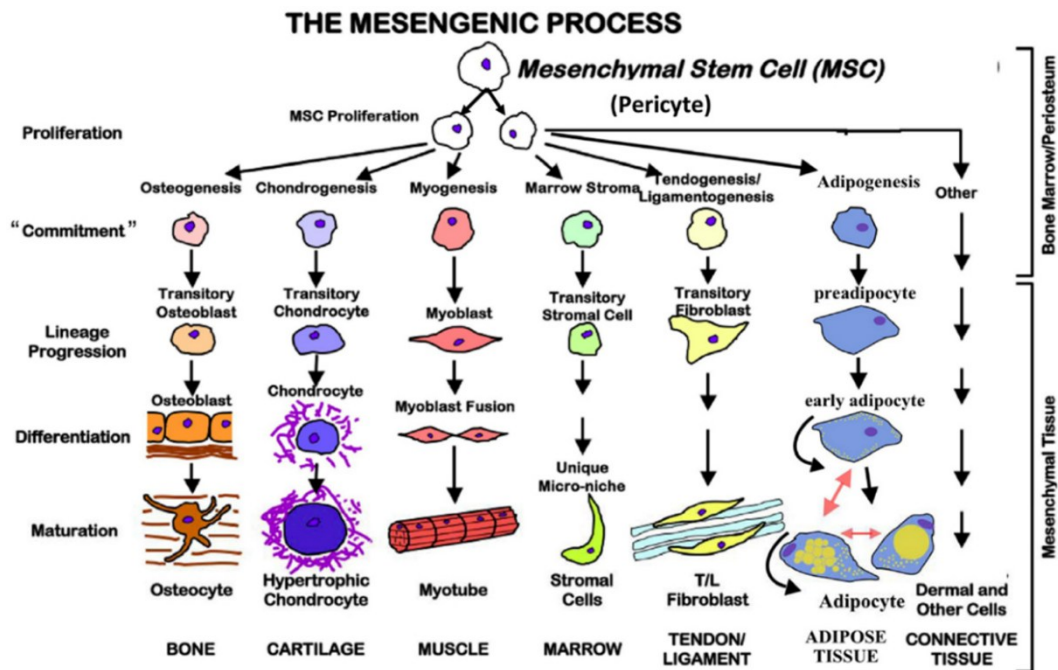


Fig. 7 Immagine che mostra i tipi di differenziamento delle MSCs. Essendo multipotenti, possiedono la capacità di proliferare e differenziarsi in diversi tipi cellulari in base ad appropriati segnali di differenziamento. Immagine adattata da Dimarino *et al.* [27].

In vitro, per promuovere la differenziazione adipogenica, le MSC possono essere incubate con desametasone, insulina, 3-isobutil-1-metilxantina e indometacina, che

inducono l'accumulo progressivo di goccioline ricche di lipidi e l'espressione del recettore $\gamma 2$ attivato da proliferatori perossisomiali (*Peroxisome proliferator- activated receptor gamma* - PPAR- γ), la lipoproteina lipasi e la proteina legante gli acidi grassi aP2 [28]. Nel corso del processo differenziativo, queste goccioline lipidiche tendono a confluire in un'unica grande goccia centrale, determinando la transizione morfologica delle cellule verso il fenotipo adipocitario maturo.

L'utilizzo del fattore di crescita dei fibroblasti 2 (*Fibroblast Growth Factor 2* - FGF-2), un noto agente mitogeno, è in grado di potenziare significativamente sia la proliferazione cellulare sia il differenziamento di tipo condrogenico in MSC umane. Nello specifico, l'aggiunta di FGF-2 induce una più cospicua deposizione di matrice extracellulare rispetto a cellule non trattate (utilizzate come controllo), con effetti evidenti già a partire dal 7° giorno di coltura. Questo differente comportamento biologico si riflette sulle caratteristiche dei pellet cellulari: mentre quelli mantenuti in condizioni di controllo presentano uno strato di cellule appiattite e immerse in una matrice contenente collagene di tipo I, i campioni stimolati con FGF-2 esibiscono un profilo fenotipico distinto. In questi ultimi, infatti, la presenza del collagene di tipo I risulta del tutto assente: al suo posto la matrice cartilaginea è costituita prevalentemente da collagene di tipo II e aggregano [29].

Un recente studio [30] ha condotto analisi *in vitro* volte a verificare gli effetti della sfingomielina sintasi 1 (*sphingomyelin synthase 1* - SGMS1) sul differenziamento osteogenico di cellule staminali mesenchimali. Nello specifico, è stato dimostrato che l'espressione di SGMS1 è indotta dal fattore di trascrizione *Runx2* e che tale enzima sembra promuovere non solo l'osteogenesi, ma anche l'angiogenesi, modulando l'attivazione e la secrezione del fattore di crescita endoteliale vascolare (*Vascular Endothelial Growth Factor* - VEGF). Coerentemente con questi risultati, le analisi *in vivo* hanno confermato la capacità di SGMS1 di promuovere e accelerare i processi di rigenerazione ossea nei ratti.

Infine, le caratteristiche delle cellule mesenchimali differenziate possono variare a seconda della fonte tissutale impiegata per il loro isolamento. Ad esempio, tramite opportune condizioni di induzione al differenziamento, le BM-MSC e quelle ottenute dalla gelatina di Wharton si differenziano nella linea adipogenica con un'efficienza

diversa. Nello specifico, le cellule mesenchimali isolate dalla gelatina di Wharton mostrano una ridotta capacità di formare tessuto adiposo maturo rispetto alle mesenchimali da midollo osseo. Da un punto di vista molecolare, questa diversità può essere dovuta all'interferenza esercitata dal 17β estradiolo, il quale interagisce con $PPAR\gamma$, promuove una diminuzione dell'espressione dei geni specifici del fenotipo adipocitario ed inibisce l'adipogenesi. Al contrario, non sono state riscontrate particolari variazioni nell'acquisizione del fenotipo condrogenico e osteogenico tra due tipi cellulari [31] (**Fig. 8**)

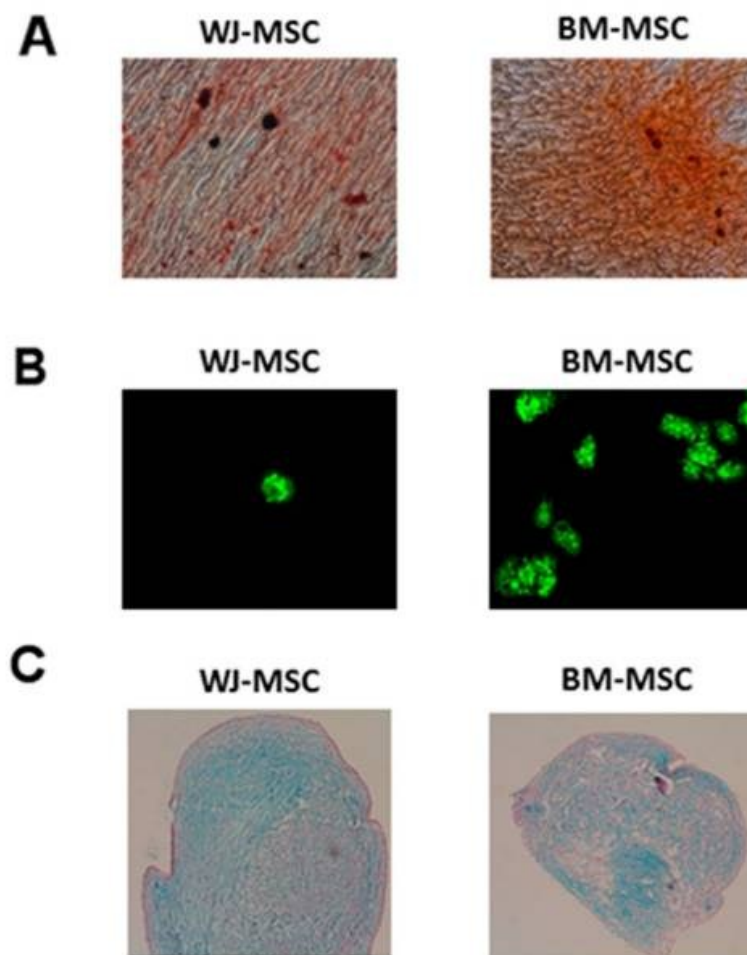


Fig. 8 Visualizzazione dei differenzamenti di cellule staminali mesenchimali derivate rispettivamente da midollo osseo e da gelatina di Wharton umani. Nella figura A è riportato il differenziamento osteogenico con colorazione Alizarin Red; nella figura B è mostrato il differenziamento adipogenico con colorazione

Adipored; nella figura C è riportato il differenziamento condrogenico con colorazione Alcian blu. Si noti che, i differenziamenti osteogenico e condrogenico sono equiparabili nelle due linee cellulari; invece, il differenziamento adipogenico è stato ottenuto con maggior efficacia nel midollo osseo. Immagine adattata da Laroye *et al.* [31].

Potenziali applicazioni cliniche

In medicina rigenerativa si sta studiando la possibilità di sviluppare nuove terapie utilizzando le MSC per ripristinare o sostituire la funzione di tessuti e organi del corpo umano.

Nello specifico, si sta valutando la loro efficacia a livello cellulare e molecolare come strumenti di supporto alla rigenerazione tissutale in malattie cardiovascolari, quali infarto miocardico acuto, cardiomiopatia, insufficienza cardiaca e ischemia miocardica, malattie del fegato, come cirrosi ed insufficienza epatica, trapianto di fegato, ictus ischemico ed anemia [32]

Le MSC possono essere impiegate per il trattamento di malattie autoimmuni, infatti, grazie al loro effetto immunomodulatorio, sono in grado di ostacolare la maturazione di cellule dendritiche, inibire l'attivazione dell'immunità innata e bloccare l'infiammazione producendo antagonisti del recettore IL-1 (*Interleukin-1*), IL-10 (*Interleukin-10*), o bloccando l'azione dei macrofagi [33].

Attualmente si sta studiando l'efficacia clinica di MSC in trapianti allogenici in pazienti con profonde ustioni [34], in sostituzione alla rigenerazione cutanea tramite trapianto autologo di cheratinociti non coltivati [35].

Inoltre, si sta anche analizzando il loro potenziale nella cura di patologie neurologiche. Questo tipo di ricerche è importante perché i neuroni dei mammiferi danneggiati o degenerati non sono in grado di riacquistare facilmente le loro normali funzioni, avendo una capacità di rigenerazione molto limitata. Nello specifico, BM-MSK possono attraversare la barriera ematoencefalica, migrare nel sito del danno e produrre fattori neurotrofici per migliorare la rigenerazione dei neuroni [36]. Diversi studi preclinici e clinici stanno testando la capacità delle MSC ottenute da varie fonti per il trattamento di

malattie muscoloscheletriche neurodegenerative come il morbo di Parkinson, il morbo di Alzheimer, la sclerosi multipla e la leucemia mieloide acuta [37].

Influenza di sostanze esogene

L'esposizione a determinate sostanze esogene, quali metalli pesanti, pesticidi, idrocarburi e altri agenti inquinanti su cellule non terminalmente differenziate, come le MSC, può compromettere la loro morfologia e quindi, la loro funzionalità.

In particolare, è stato dimostrato che l'esposizione prolungata (circa 21 giorni) ad una combinazione di pesticidi, quali composti organofosforici, ditiocarbamati, dicarbossimide e imidazolo, possono indurre nelle MSC senescenza per aumento dello stress ossidativo con conseguente alterazione delle capacità metaboliche [38]. Inoltre, queste sostanze tossiche promuovono un invecchiamento cellulare precoce a causa della sovraregolazione di geni connessi alle vie del fattore di crescita insulino-simile 1/ recettore del fattore di crescita insulino-simile 1 (*Insulin-like Growth Factor 1 / Insulin-like Growth Factor 1 Receptor* - IGF-1/IGF-1R) e possono anche alterare le proprietà immunomodulatorie delle MSC inibendo l'attivazione delle cellule T e compromettendo la produzione dell'interferone gamma (*Interferon gamma* – IFN γ) [39].

Anche l'esposizione prolungata all'atrazina, un erbicida tossico, sembra attenuare le risposte secretorie indotte da IFN γ nelle MSC. Nello specifico, gli effetti di questa sostanza inducono una ridotta secrezione della proteina-1 chemioattraente per i monociti (*Monocyte Chemoattractant Protein-1* - MCP-1), della monochina indotta dall'interferone-gamma (*Monokine Induced by Gamma interferon* – MIG) e della proteina 10 indotta dall'interferone gamma (*Interferon gamma-induced Protein 10* - IP10), causando un'alterazione della plasticità immunitaria ed un difetto nella sovraregolazione della molecola di superficie cellulare del complesso maggiore di istocompatibilità di classe II (*Major Histocompatibility Complex class II* - MHC II) [40], correlata a senescenza cellulare [41].

Recentemente è stato scoperto che una ridotta espressione dell'isocitrato deidrogenasi 1 (*Isocitrate Dehydrogenase 1* - IDH1) in MSC comporta una minor produzione di acido α -chetoglutarico (*Alpha-Ketoglutaric Acid* - AKG), un metabolita del ciclo degli acidi

tricarbossilici implicato nel metabolismo aerobico e nella longevità. IDH1 sembra fungere da geroprotettore per MSC, rallentando il processo di senescenza cellulare. Infatti, l'utilizzo di AKG esogeno o la sovraespressione di IDH1 promuovono l'idrossilazione della proteina ribosomiale S23 (RPS23) favorendo l'omeostasi proteica [42].

Micro e nanoplastiche nell'ambiente

Le micro- e nanoplastiche di polistirene sono dei polimeri organici sintetici o semisintetici, le cui dimensioni variano da 1 μm a 1 mm per le microplastiche e da 1 nm a 1 μm per le nanoplastiche; sono estremamente malleabili, mobili e resilienti, diffuse in tutti gli ecosistemi, ambienti, oggetti di uso quotidiano e persino nel cibo. Tali plastiche possiedono la capacità di accumularsi negli organi e nei tessuti umani e animali, compromettendo la salute di tutti gli esseri viventi. Si formano a seguito di processi degradativi tra cui la foto-ossidazione indotta delle radiazioni ultraviolette, che causano fragilità del materiale plastico integro e ne favoriscono la frammentazione in particelle micro-nanoscopiche a seguito di sollecitazioni meccaniche [43].

Influenza sulla salute

Le principali vie di esposizione umana alla contaminazione da micro- e nanoplastiche sono l'ingestione di acqua o alimenti che le contengono, l'inalazione di particelle aerodisperse e il contatto cutaneo con plastiche che si trovano in oggetti, tessuti o prodotti [44].

La plastica ingerita deriva dalla catena alimentare, dalla contaminazione delle materie prime per assorbimento dal suolo e dal materiale per imballaggi o contenitori alimentari [45] (**Fig. 9**).

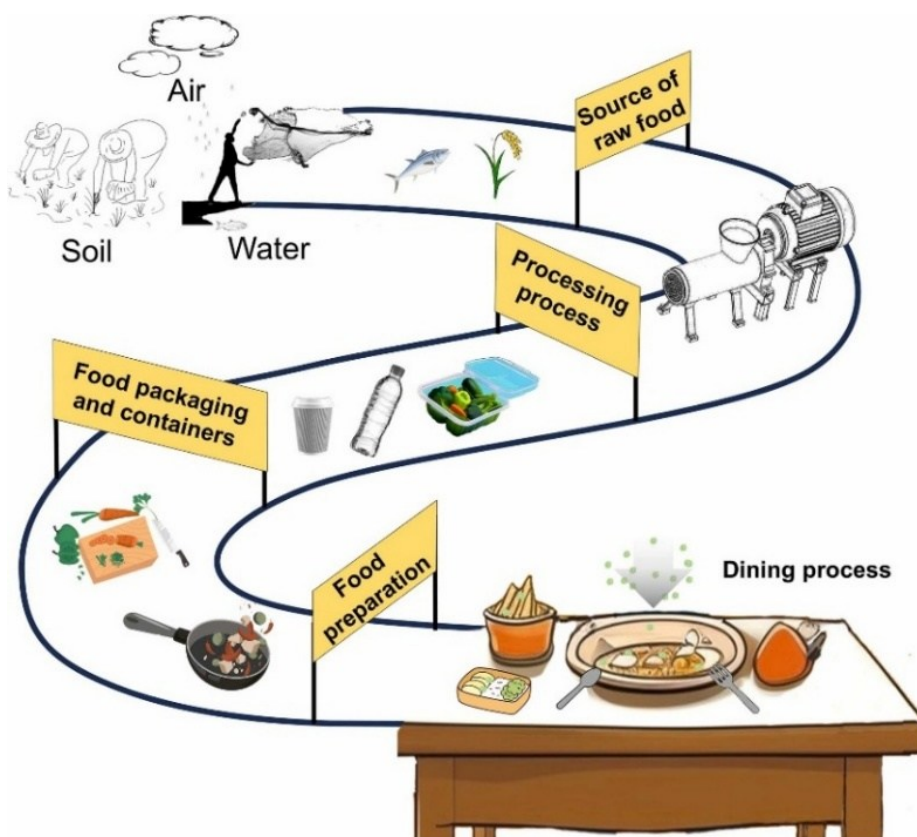


Fig. 9 Illustrazione delle potenziali fonti di micro e nanoplastiche negli alimenti.
Immagine adattata da Meng *et al.* [45].

In particolare, l'accumulo di microplastiche nel tratto gastrointestinale altera il microbiota intestinale, provocando disbiosi e quindi un dannoso squilibrio tra batteri buoni e cattivi [46]; queste particelle sono implicate anche nel generare irritazioni alle mucose intestinali ed infiammazione sistemica [47].

L'ingestione orale di nanoplastiche di polistirene può penetrare nella barriera emato-encefalica ed indurre neurotossicità [48]. Un recente studio [49] eseguito sul modello murino ha dimostrato che le nanoparticelle di polistirene (*Polystyrene Nanoparticles* - PS-NP), internalizzandosi nella microglia, ne alterano la morfologia e ne promuovono l'attivazione, con conseguente soppressione dell'attività neuronale; tale assorbimento non si verifica in neuroni e astrociti in cui le PS-NP sembrano aderire esclusivamente sulle membrane cellulari (**Fig. 10**).

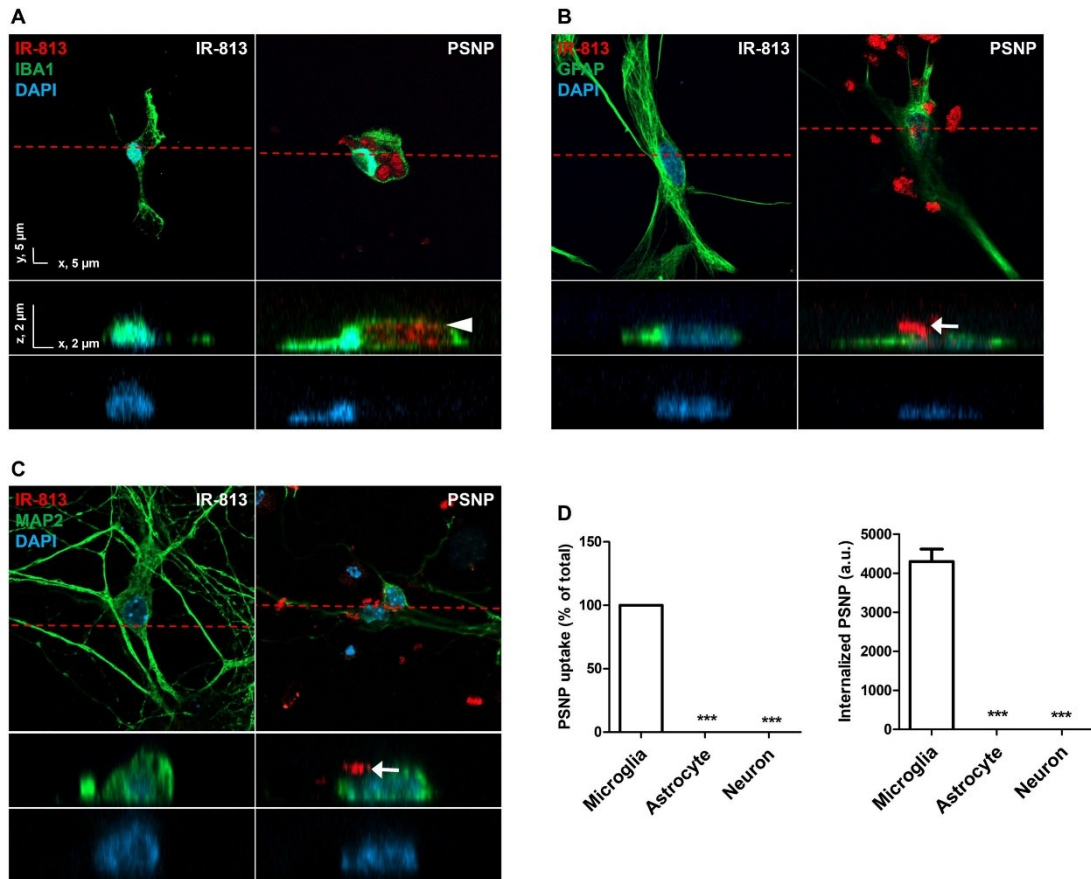


Fig. 10 Immunocolorazione di cellule della microglia (A), astrociti (B), e neuroni (C) marcati con IBA1, GFAP e MAP2, rispettivamente. Le cellule sono state coltivate con PS-NP marcate con il fluoroforo IR-813, utilizzato per individuare specificatamente la loro localizzazione intracellulare. Nel pannello A si osserva l'internalizzazione delle PS-NP (punta di freccia), mentre nei pannelli B e C, le PS-NP sono presenti sulla superficie cellulare (freccie). Nel pannello D è riportata la quantificazione dell'*uptake* cellulare (grafico a sinistra) e l'intensità di fluorescenza intracellulare delle PS-NP (grafico a destra). Immagine adattata da Me Paing *et al.* [49].

I dati presenti in letteratura [50] suggeriscono che, oltre alla concentrazione delle plastiche di polistirene, persino le loro dimensioni giochino un ruolo fondamentale nel generare danni alla salute. Infatti, plastiche con un diametro inferiore ai 10 μm si infiltrano e si depositano con più facilità e più in profondità, ad esempio, nel tessuto polmonare.

In linea con tali presupposti, lo studio condotto da Han *et al.* [51] ha dimostrato che l'esposizione ripetuta per via inalatoria a nanoplastiche di polistirene nei modelli murini determina una compromissione della barriera epiteliale alveolare. Analisi immunoistochimiche hanno evidenziato una riduzione nell'espressione della proteina occludina nei tessuti polmonari. In particolare, tale alterazione è presente nei gruppi trattati con 5 mg/kg di plastiche di piccole dimensioni (25 nm -100 nm), mentre non sono state osservate variazioni significative nei gruppi esposti ad un minor dosaggio (pari a 1 mg/kg) o a particelle di dimensioni maggiori (500 nm). Inoltre, nei tessuti polmonari di topi esposti a nanoplastiche di 25 e 100 nm è stato riscontrato un incremento del marcatore leucocitario CD45, indice dell'attivazione di una marcata risposta infiammatoria che alimenta la formazione di lesioni croniche nel parenchima polmonare.

Diversi studi hanno analizzato la generazione di ROS indotta da microplastiche e i relativi meccanismi di citotossicità. In particolare, Di Dong *et al.* [52] hanno dimostrato che la coltura di cellule epiteliali polmonari (cellule BEAS-2B) in terreni contenenti 1000 µg/cm² di plastiche induce entro le prime 24 ore risposte ossidative che superano la capacità di compensazione da parte di enzimi endogeni antiossidanti. Questa condizione determina un significativo incremento nella secrezione di citochine proinfiammatorie, come IL-6 e IL-8. Lo stress ossidativo attiva in modo aberrante diverse cascate di segnalazione intracellulare, tra cui la proteina chinasi attivata da mitogeni (*Mitogen-Activated Protein Kinase* - MAPK), la via di p53, le chinasi c-Jun N-terminali (JNK) o le chinasi p38, promuovendo l'insorgenza di stati patologici [53]. La via delle MAPK, ad esempio, è strettamente implicata nella regolazione del metabolismo cellulare e un suo inappropriato innesco contribuisce allo sviluppo di disordini metabolici, come il diabete di tipo 2 [54].

Effetti tossici sulla riproduzione

Una volta entrate nel flusso sanguigno, le micro- e nanoplastiche possono distribuirsi e accumularsi in diversi organi, inclusi ovaie, testicoli e placenta. La loro capacità di attraversare la barriera placentare e la barriera ematoencefalica favorisce la diffusione sistemica e la potenziale esposizione fetale [55]. Inoltre, la placenta può essere

raggiunta anche per via respiratoria materna, in seguito all'inalazione di particelle presenti nell'aria [56].

Per esempio, nel fluido follicolare di 18 donne sottoposte a procreazione assistita sono state rinvenute microplastiche. La loro presenza può essere dovuta alla penetrazione delle MP nel sistema circolatorio e successivamente nella barriera emato-follicolare [57] (**Fig. 11**).

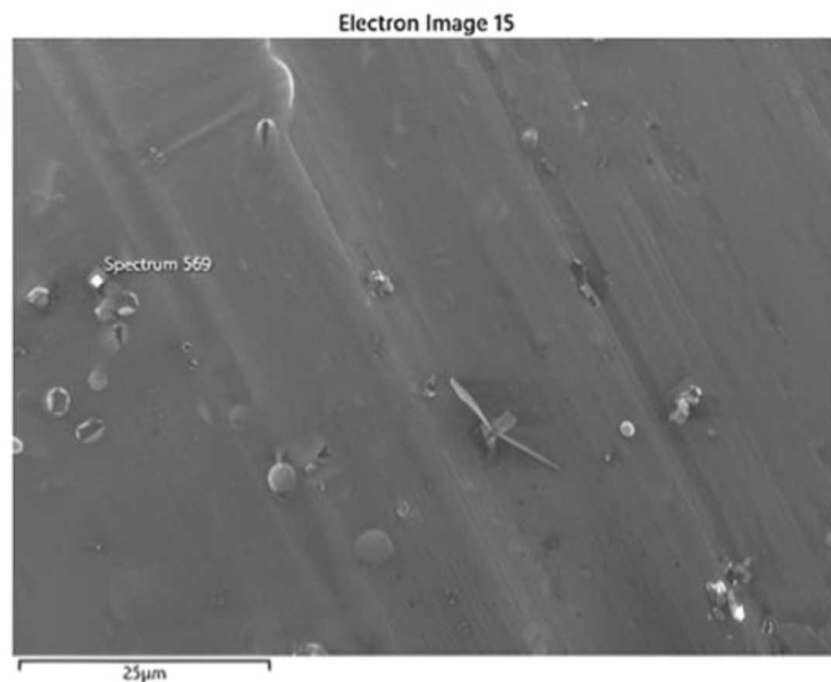


Fig. 11 Immagine in microscopia elettronica a scansione (SEM) di microparticelle (con diametro medio di 4,46 μm) presenti nel liquido follicolare ovarico umano. Immagine adattata da Montano *et al.* [57].

L'accumulo di particelle inquinanti può compromettere la salute riproduttiva, indurre infiammazione o stress ossidativo negli apparati riproduttivi ed alterare l'embriogenesi [58] (**Fig. 12**).

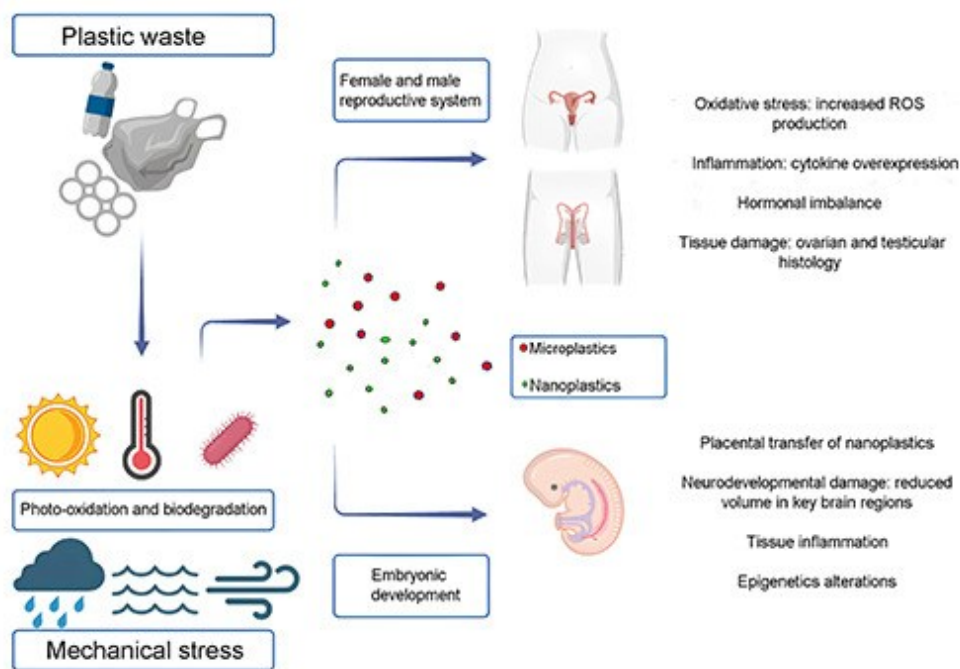


Fig. 12 Illustrazione che raffigura i possibili rischi che l'esposizione a micro e nanoplastiche provoca sulla salute riproduttiva umana. Tali particelle si formano a seguito di modifiche chimiche e fisiche di rifiuti plastici ambientali. Immagine adattata da Camia *et al.* [43].

Nello specifico, uno studio di Liu *et al.* [58] ha confrontato spermatociti di topo (della linea GC-2) esposti a microplastiche di polistirene con cellule GC-2 di controllo, non esposte all'inquinante. I risultati hanno evidenziato un aumento del numero di lisosomi autofagici nelle cellule trattate rispetto ai controlli. Parallelamente è stata osservata una diminuzione dei livelli di trascrizione della chinasi 1 indotta da PTEN (*PTEN-Induced Kinase 1* - PINK1) e Parkin, i quali agiscono come proteine regolatrici dell'autofagia. Inoltre, nelle cellule trattate è stato riscontrato uno squilibrio dell'omeostasi mitocondriale, con conseguente diminuzione nella produzione di ATP e un progressivo incremento del contenuto di ROS dopo 18 ore dall'inizio del trattamento.

In uno studio del 2023 di Zhao *et al.* [59] hanno valutato gli effetti dell'esposizione a microplastiche di polistirene sullo sviluppo testicolare e sulla fertilità in topi esposti durante le fasi pre- e post-natale. La somministrazione delle microplastiche per via orale è stata avviata dal primo giorno di gestazioni nelle topoline gravide e protratta fino al

raggiungimento della prepubertà (giorno 35 post-natale) e dell'età adulta (giorno 70 post-natale). Già a partire dal 35esimo giorno post-natale è stata riscontrata una significativa diminuzione nei livelli sierici degli ormoni testosterone ed inibina B, a causa di una disfunzione delle cellule di Leydig e del Sertoli. Analisi di trascrittomica hanno dimostrato che l'esposizione prolungata ai polimeri plastici promuove l'instaurarsi di una reazione infiammatoria cronica nel testicolo. Inoltre, l'analisi RNA-seq, ha evidenziato una regolazione negativa della transizione G1/S del ciclo cellulare mitotico e della via di segnalazione Hippo; quest'ultimo *pathway* è implicato nel processo di maturazione delle cellule germinali primordiali [60] e nella regolazione della secrezione di LH [61].

Gli effetti tossici sono stati analizzati anche a livello dell'apparato riproduttore femminile, in cui la presenza di micro e nanoparticelle innesca alti livelli di TNF- α e altre interleuchine proinfiammatorie, come IL-6 e IL-10 [43].

La presenza di microplastiche di polistirene nelle ovaie di topi influenza negativamente lo sviluppo dei follicoli ovarici; infatti, provoca una riduzione nella formazione dei follicoli antrali, senza alterare i livelli di FSH, LH ed E2 nel siero. Non sembra tuttavia alterare la maturazione degli ovociti, anche se il loro tasso di sopravvivenza è significativamente ridotto nei topi trattati rispetto ai topi di controllo. Infine, analisi di ROS, GSH e del tasso di apoptosi mediante marcatura con Annexin V su ovociti in metafase II ha evidenziato un incremento dei ROS negli ovociti esposti alle PS-MP, una riduzione di GSH nei campioni trattati rispetto a quelli di controllo e nessuna variazione significativa nel tasso di apoptosi tra ovociti trattati e controlli [62] (**Fig. 13**).

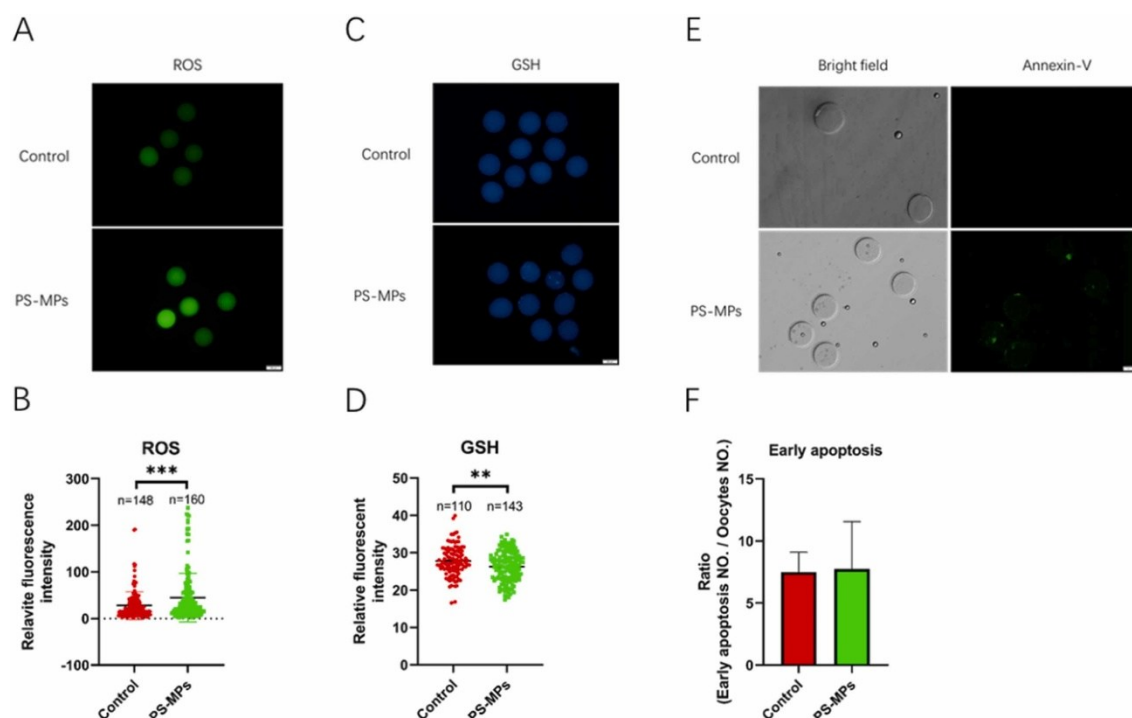


Fig. 13 Effetti di PS-MP su stress ossidativo (ROS), azione di antiossidanti (GSH) e apoptosi (Annexin V) di ovociti murini. Le plastiche sembrano aumentare i livelli di ROS (A e B) e diminuire quelli di GSH (C e D), mentre non influenzano particolarmente i processi apoptotici (E ed F). Immagine adattata da Liu *et al.* [62].

Durante lo sviluppo embrionale gli effetti di micro- e nanoplastiche possono essere gravemente nocivi sulla salute del feto [43].

Nello specifico, Wan *et al.* [63] hanno dimostrato nel modello murino che una dose alta di nanoplastiche di polistirene (fino a 100 mg/kg) provoca un aumento dei livelli di apoptosi in cellule del trofoblasto, che può indurre aborto spontaneo. Anche il cervello dei feti può subire alterazioni strutturali. È stato osservato che nei feti maschi si ha una riduzione della corteccia visiva mentre, nei feti femmine, sono presenti alterazioni nel sistema nervoso centrale, come nel bulbo [43].

Meccanismo di internalizzazione nell'organismo

I meccanismi di internalizzazione delle micro e nanoplastiche sembrano essere differenti. Le microplastiche, a causa della loro dimensione, tendono ad entrare

nell'organismo per micropinocitosi [43] mentre le nanoplastiche diffondono inizialmente sulla superficie della membrana cellulare, grazie a forze di *Van der Waals* ed interazioni idrofobiche che si instaurano tra il doppio strato fosfolipidico, carico negativamente, e le plastiche anch'esse negative. La successiva internalizzazione avviene principalmente attraverso un meccanismo di endocitosi mediato da clatrina e caveolina [64].

Uno studio di Smith *et al.* [65] ha dimostrato che l'aggiunta di nanoplastiche di polistirene fluorescenti in colture cellulari contenenti siero bovino fetale riduce significativamente sia l'adesione delle nanoplastiche alla membrana cellulare, sia la loro percentuale di internalizzazione. Inoltre, gli autori hanno indagato il coinvolgimento delle due principali vie di trasporto endocitico, analizzando i *pathway* clatrina- e caveolina-dipendenti. Nello specifico, l'espressione selettiva di EH29, inibitore dell'attività endocitica mediata da clatrina, e di Y14F, inibitore della via caveolina-dipendente, ha permesso di individuare il meccanismo d'ingresso cellulare. Dal momento che è stato riscontrato un decremento nell'efficienza di *uptake* di nanoplastiche esclusivamente in seguito all'inibizione di EH29, le evidenze suggeriscono che la via mediata da clatrina rappresenti il principale meccanismo responsabile dell'internalizzazione intracellulare delle nanoplastiche (**Fig. 14**).

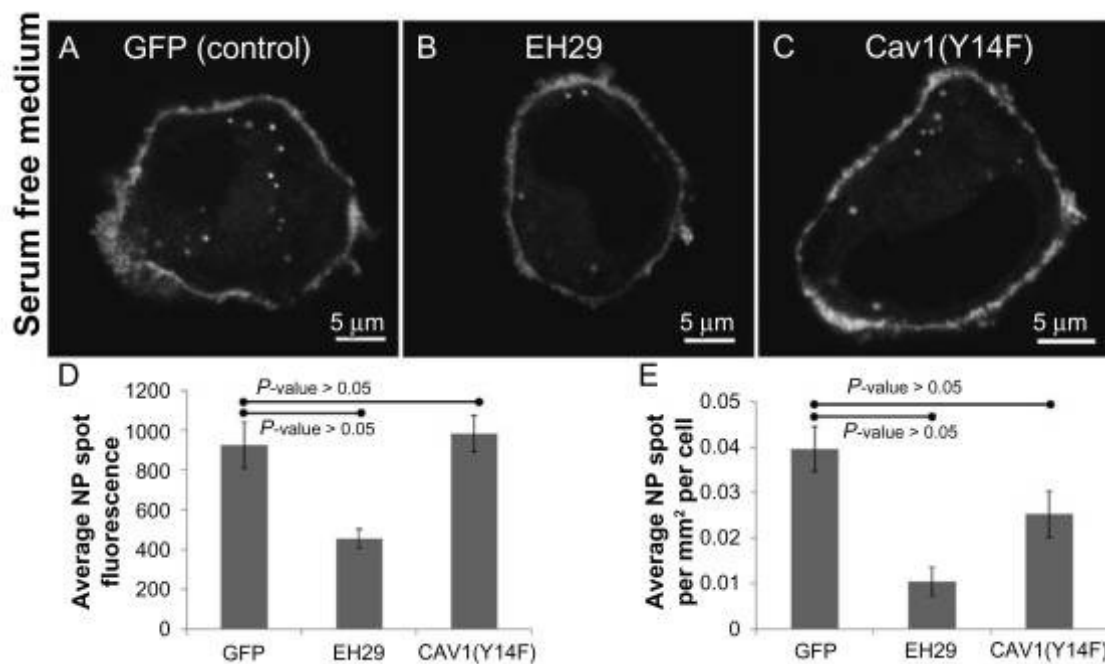


Fig. 14 Analisi dell'internalizzazione di nanoplastiche di polistirene fluorescenti in cellule cresciute con terreno privo di siero. In A è rappresentata una cellula che presenta nanoplastiche marcate con *Green Fluorescent Protein* (GFP). In B è rappresentata una cellula inibita per l'attività della clatrina (mancata espressione di EH29). In C è raffigurata la cellula con inibizione di caveolina (priva dell'espressione di Y14F). Nell'istogramma D è stata valutata la quantità di fluorescenza delle nanoplastiche nelle cellule sottoposte alle tre diverse condizioni e nell'istogramma E la loro densità. Si osserva che solo in mancanza di EH29 si assiste ad una significativa riduzione di luminosità e di densità degli accumuli di nanoparticelle intracellulari. Immagine adattata da Smith *et al.* [65].

Trasporto di sostanze inquinanti

Le micro e nanoplastiche fungono anche da vettori di sostanze chimiche come ftalati, eteri difenilici, polibromurati, composti idrocarburi policiclici aromatici, contaminanti organici, pesticidi e metalli pesanti [66]. Questo effetto viene definito “cavallo di Troia”, un fenomeno in cui l'azione combinata di plastiche ed altri agenti inquinanti aumentano la tossicità in tutti i sistemi dell'organismo [67].

Le nanoplastiche cariche negativamente, una volta internalizzate, possono generare forze elettrostatiche con cationi metallici tossici o altri agenti inquinanti carichi positivamente; ad esempio, possono legarsi al cadmio e aumentarne la citotossicità, promuovendo il rilascio di calcio intracellulare che attiva la via mitocondriale e provoca un aumento dell'apoptosi [68]

Le plastiche veicolano anche farmaci e antibiotici nell'organismo, alterando la loro funzionalità ed inducendo un effetto tossico. La reattività chimica degli oligomeri, di cui sono composte le particelle di polistirene, consente di formare legami ad idrogeno con antibiotici, come metronidazolo e ciprofloxacina. Tali interazioni stabili impediscono l'ossidazione e la successiva degradazione dei medicinali che vanno così ad accumularsi negli organi [69].

SCOPO DEL LAVORO

In questo lavoro di tesi sono stati studiati il meccanismo di internalizzazione e la cinetica delle micro- e nanoplastiche di polistirene fluorescenti nelle MSC. Inoltre, sono stati valutati l'induzione dell'apoptosi e l'eventuale produzione di specie reattive dell'ossigeno in seguito all'esposizione a nanoplastiche. Le MSC sono state isolate da midollo osseo e da liquido follicolare ovarico, quest'ultimo recuperato come materiale di scarto derivante dalle procedure di *pick-up* ovocitario.

Il secondo obiettivo della ricerca è stato di indagare se l'esposizione alle nanoplastiche potesse provocare particolari alterazioni durante il differenziamento adipogenico rispetto al fenotipo di controllo, conducendo parallelamente un'analisi comparativa tra i due tipi cellulari.

Infine, è stata effettuata la caratterizzazione fenotipica dei campioni differenziati mediante l'analisi HCS LipidTOX, per confermare il successo del differenziamento adipogenico e valutare qualitativamente la distribuzione e la morfologia delle gocce lipidiche.

MATERIALI E METODI

Isolamento di cellule staminali mesenchimali da midollo osseo (BM-MSC) e liquido follicolare (FF-MSC)

Le cellule staminali mesenchimali derivate da midollo osseo utilizzate nel presente progetto di tesi sono state gentilmente messe a disposizione dalla Cell Factory della Fondazione IRCCS Policlinico San Matteo di Pavia.

Le cellule staminali mesenchimali da liquido follicolare sono state isolate da campioni di pazienti sottoposte a trattamenti di procreazione medicalmente assistita presso il centro di PMA della Fondazione IRCCS Policlinico San Matteo di Pavia (Progetto di Ricerca Corrente n. 8062423).

Protocollo di isolamento di cellule staminali mesenchimali da liquido follicolare

La prima fase del protocollo di isolamento consiste nell'aggiunta di 10 ml di Lymphoprep (Nycomed Pharma, Oslo, Norway) al campione di liquido follicolare, seguita da centrifugazione a 800 g x 20 minuti.

Successivamente, le cellule presenti nello strato di *buffy coat* sono state recuperate e risospese in un volume di soluzione fisiologica pari a quello del *buffy coat* isolato. La sospensione cellulare è stata quindi centrifugata a 400 g × per 10 minuti, ottenendo un pellet cellulare.

Al termine dell'isolamento è stata eseguita la conta delle cellule mediante esclusione con Trypan Blue, al fine di determinarne il numero e valutarne la vitalità al tempo T0 (corrispondente al momento dell'isolamento). A tal fine, 10 µL di sospensione cellulare sono stati miscelati con 90 µL di soluzione di Trypan Blue (diluata 1:1 in PBS), e il conteggio è stato successivamente effettuato utilizzando una camera di Bürker.

Dopo centrifugazione a 400 g x 3 minuti, le cellule sono state messe in coltura in piastre Petri con fondo di vetro, con appropriato terreno di coltura DMEM (Euroclone), 15% di siero bovino fetale (FBS – Euroclone), 1% di antibiotico Penicilina/Streptomycin

(Euroclone), 1% L-Glutammina (Euroclone), 1% 2-mercaptoetanolo (Euroclone) e 1% Non-Essential Amino Acids (Euroclone) in incubatore a 37 °C con 5% CO₂.

Prima della messa in coltura delle cellule, le piastre di Petri con fondo in vetro sono state rivestite con gelatina e incubate a 37 °C in atmosfera umidificata con il 5% di CO₂ per 30 minuti, al fine di promuovere un'efficiente adesione cellulare.

Incorporazione di micro- e nanoplastiche di polistirene fluorescenti

Le micro- e nanoplastiche di polistirene fluorescenti (coniugate con FITC; Labospace), con diametri rispettivamente di 0,1 µm e 0.025 µm, sono state aggiunte al terreno di coltura tra il 1° ed il 3° giorno, alla concentrazione finale di 100 mg/mL.

Entrambe le tipologie di plastiche (micro e nano) sono state utilizzate per valutare gli effetti morfologici delle FF-MSD e per studiare, a livello qualitativo, la loro eventuale internalizzazione tramite endocitosi mediata da clatrina. Le analisi morfologiche condotte mediante microscopia confocale hanno evidenziato che le microplastiche, a causa delle loro maggiori dimensioni, non vengono internalizzate dalle cellule, ma rimangono adese alla superficie cellulare. Sulla base di questi risultati, la maggior parte degli esperimenti descritti in questa tesi sono stati eseguiti utilizzando esclusivamente le nanoplastiche.

Al fine di valutare la cinetica di internalizzazione, le FF-MSD sono state fissate dopo diversi tempi di coltura con nanoplastiche, rispettivamente dopo 5, 10, 24 e 48 ore. La fissazione è stata eseguita al buio mediante incubazione con paraformaldeide al 4% (PFA, Thermo Fisher Scientific), per 10 minuti a temperatura ambiente.

Immunofluorescenza

L'immunofluorescenza è una tecnica immunocitochimica utilizzata per l'identificazione e l'analisi della localizzazione di specifiche proteine d'interesse. Prevede l'utilizzo di anticorpi marcati per rilevare in modo preciso determinate strutture molecolari.

In particolare, in questo lavoro di tesi si è voluto indagare il ruolo della clatrina nell'internalizzazione delle micro- e nanoplastiche mediante il processo di endocitosi.

La tecnica eseguita è di immunofluorescenza indiretta: prevede una prima incubazione con un anticorpo primario, che si lega all'antigene target, seguita da una seconda incubazione con un anticorpo secondario coniugato ad un fluorocromo che lega il frammento cristallizzabile del primo, ossia la sua regione costante.

Nello specifico, in seguito alla fissazione, i campioni nelle Petri con fondo di vetro sono stati processati utilizzando questa tecnica che consiste in diverse fasi:

- Permeabilizzazione: è il primo passaggio di reazione e consiste in una soluzione costituita da 4,5 ml di PBS, 500 µl di FBS e 5 µl di Triton X100 (detergente non ionico, Sigma-Aldrich) per 45 minuti a temperatura ambiente al buio (in modo da non far precipitare la fluorescenza specifica delle nanoplastiche). Questo step è necessario per permettere la corretta penetrazione degli anticorpi all'interno delle cellule.
- Blocco: è il secondo passaggio della reazione e consiste nell'incubazione del campione in una soluzione composta da 4,5 ml di PBS, 500 µl di FBS e 10 µl di Tween-20 (Sigma-Aldrich), per 30 minuti a temperatura ambiente al buio. Questo step serve per bloccare i siti di legame aspecifici.
- Incubazione con anticorpo primario: l'anticorpo è diluito 1:200 nella soluzione di blocco e deve essere incubato in camera umida overnight a + 4 °C. In questi esperimenti sono stati utilizzati l'anticorpo anti-clatrina (CLTC, anti-rabbit; Abcam) e anti-calnexina (CANX, anti-chicken; Abcam), marcatore di controllo della proteina integrale del reticolo endoplasmatico.
- Incubazione con anticorpo secondario: è stato eseguito un breve lavaggio del campione in PBST (PBS + 0.1% di Tween-20), in seguito l'anticorpo secondario è stato diluito 1:500 nella soluzione di blocco ed incubato al buio per un'ora.

Per questi esperimenti gli anticorpi utilizzati sono:

- 1) Alexa Fluor 594 (Thermo Fisher Scientific) diretto contro l'anticorpo primario CLTC
 - 2) Alexa Fluor 647 (Thermo Fisher Scientific) diretto contro l'anticorpo primario CANX
- Colorazione dei nuclei con colorante DAPI (NucBlue, Thermo Fisher Scientific): il colorante è stato incubato per 10 minuti al buio a temperatura ambiente.

- Visualizzazione e acquisizione delle immagini mediante l'impiego del microscopio confocale Olympus Fluoview, che consente, tramite un apposito software, di svolgere un'analisi qualitativa riguardo alla distribuzione del segnale, delle nanoplastiche (individuate tramite FITC) e dei marcatori in esame, nel citoplasma delle cellule staminali mesenchimali.

Marcatura fluorescente dell'Apparato del Golgi ed Immunofluorescenza

La localizzazione dell'apparato di Golgi è stata analizzata in BM-MSC, sia coltivate in presenza di nanoplastiche sia nei controlli (i.e. cellule coltivate in assenza di plastiche), mediante l'impiego della sonda CellLight (Thermo Fisher Scientific). Il volume di reagente utilizzato per la marcatura è stato calcolato in funzione del numero stimato di cellule al momento del trattamento, del numero di particelle desiderato per cellula e della concentrazione del reagente, pari a 10^8 particelle per ml.

La sonda Golgi è stata diluita 1:1000 in terreno DMEM e incubata per 16 ore a 37 °C e le immagini sono state acquisite tramite il confocale Olympus Fluoview.

In seguito, si è eseguita un'immunofluorescenza indiretta, utilizzando l'anticorpo primario contro la clatrina. Infine, i nuclei sono stati colorati mediante l'uso del colorante DAPI e le immagini sono state acquisite al confocale Olympus Fluoview.

Valutazione delle specie reattive dell'ossigeno (ROS)

La produzione di ROS è stata analizzata in FF-MSC e BM-MSC, confrontando cellule coltivate in presenza di nanoplastiche con cellule di controllo.

Le cellule sono state incubate a 37 °C per 30 minuti con la sonda ROS (DCFH-DA; Thermo Fisher Scientific) precedentemente diluita 1:1000 in una soluzione di PBST. Successivamente, i nuclei sono stati colorati con DAPI e le cellule visualizzate al confocale Olympus Fluoview.

Valutazione dell'apoptosi mediante Annexin V

La valutazione della mortalità e apoptosi cellulare in BM-MSC, esposte o meno a nanoplastiche, è stata eseguita mediante l'impiego della sonda Annexin V (Abcam, UK) che si lega specificatamente alla fosfatidilserina esposta all'esterno della membrana cellulare.

L'Annexin V è stata diluita 1:100 in *Assay Buffer*, incubata a temperatura ambiente al buio per 30 minuti. Per la colorazione dei nuclei è stato utilizzato il marcatore DAPI. Infine, le cellule sono state analizzate al confocale Olympus Fluoview.

Differenziamento adipogenico di cellule staminali mesenchimali da midollo osseo e da liquido follicolare

Per questo lavoro di tesi le cellule sono state coltivate su Petri con fondo di vetro utilizzando terreno di coltura idoneo alla crescita cellulare fino al raggiungimento della confluenza, ossia al 5° giorno di coltura, come sopra specificato.

Le nanoplastiche sono state aggiunte direttamente al terreno il 3° giorno di coltura, quindi precedentemente all'inizio del differenziamento.

Dal 5° giorno di coltura è stato eseguito il differenziamento adipogenico usando il terreno di coltura specifico, costituito da *Adipogenesis Differentiation Basal Medium* (Stem Pro, Thermo Fisher Scientific), 10% di *Adipogenesis Supplement* e 0.05% di Gentamicina. Il cambio terreno è stato eseguito ogni 3-4 giorni per 7 giorni totali.

In seguito, le cellule sono state fissate utilizzando PFA al 4% per 10 minuti a temperatura ambiente.

Colorazione citochimica con LipidTOX

Dopo la fissazione, è stata effettuata una colorazione mediante l'impiego del marcatore idrofobico fluorescente HCS LipidTOX (Thermo Fisher Scientific), che identifica e localizza i lipidi neutri.

Nello specifico il LipidTOX è stato diluito 1:100 in una soluzione tampone di PBST e incubato per 30 minuti al buio a temperatura ambiente.

Al fine di valutare qualitativamente la presenza delle gocce lipidiche, in campioni coltivati e non in presenza di nanoplastiche, sono stati utilizzati due marcatori LipidTOX differenti, quali:

- LipidTOX Green Neutral Lipid Stain per i campioni senza l'aggiunta di nanoplastiche fluorescenti;
- LipidTOX Deep Red Neutral Lipid Stain per i campioni con aggiunta di nanoplastiche fluorescenti.

La visualizzazione e acquisizione delle immagini è avvenuta tramite l'impiego del microscopio confocale Olympus Fluoview.

RISULTATI

Analisi fenotipica e morfologica di cellule staminali mesenchimali isolate da fluido follicolare in coltura con microplastiche

Come specificato in materiali e metodi, le cellule isolate da fluido follicolare sono state coltivate in terreno di coltura a cui sono state aggiunte microplastiche di polistirene fluorescenti alla concentrazione di 100 mg/ml. Le colture sono state monitorate mediante microscopia ottica a intervalli di 48 ore, in concomitanza con i cambi di terreno, al fine di valutarne la proliferazione e la morfologia. L'analisi microscopica ha rivelato che le cellule hanno mantenuto la loro tipica morfologia mesenchimale, anche in presenza di microplastiche (**Fig.15 A**). Infatti, è stato possibile osservare un corpo cellulare allungato, nucleo centrale e molteplici prolungamenti citoplasmatici, analogo a quanto riscontrato nelle colture di controllo, ossia in assenza di microplastiche (**Fig.15 B**). Tuttavia, nelle cellule trattate, il citoplasma mostra una marcata granulosità.

Infine, le microplastiche sono apparse agglomerate in cluster di dimensioni piuttosto grossolane e di forma squadrata, distribuite in modo eterogeneo sulla superficie della Petri con fondo di vetro (come indicato dalle frecce – **Fig. 15 A**).

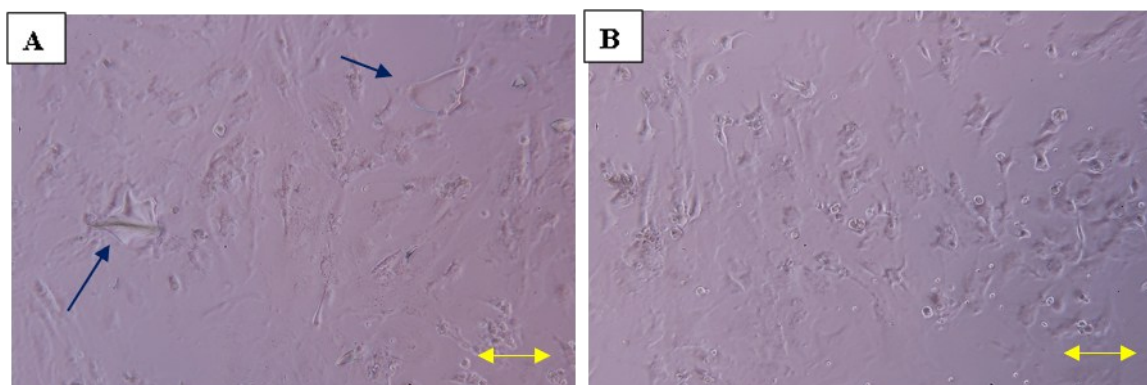


Fig. 15 Immagini esemplificative ottenute con microscopio ottico. **A:** FF-MSC in coltura con microplastiche di polistirene fluorescenti. **B:** FF-MSC senza microplastiche (controllo). Barra: 10 μ m. Ingrandimento 20X.

L'analisi condotta mediante microscopia confocale, eseguita dopo 5 giorni di coltura (corrispondenti a 72 ore di incubazione con microplastiche), ha permesso di determinare con precisione la forma e la disposizione spaziale delle microplastiche a livello cellulare. In particolare, le microplastiche fluorescenti sembrano localizzarsi superficialmente (**Fig. 16 A e B**), dove si osservano sia aggregati di forma sferica sia cluster irregolari distribuiti in modo eterogeneo. Tuttavia, la proliferazione cellulare è risultata analoga a quella del controllo (**Fig. 16 C**). Poiché le microplastiche, a causa delle loro maggiori dimensioni, non sembrano essere internalizzate dalle cellule, si è deciso di eseguire tutti gli esperimenti successivi utilizzando esclusivamente le nanoplastiche.

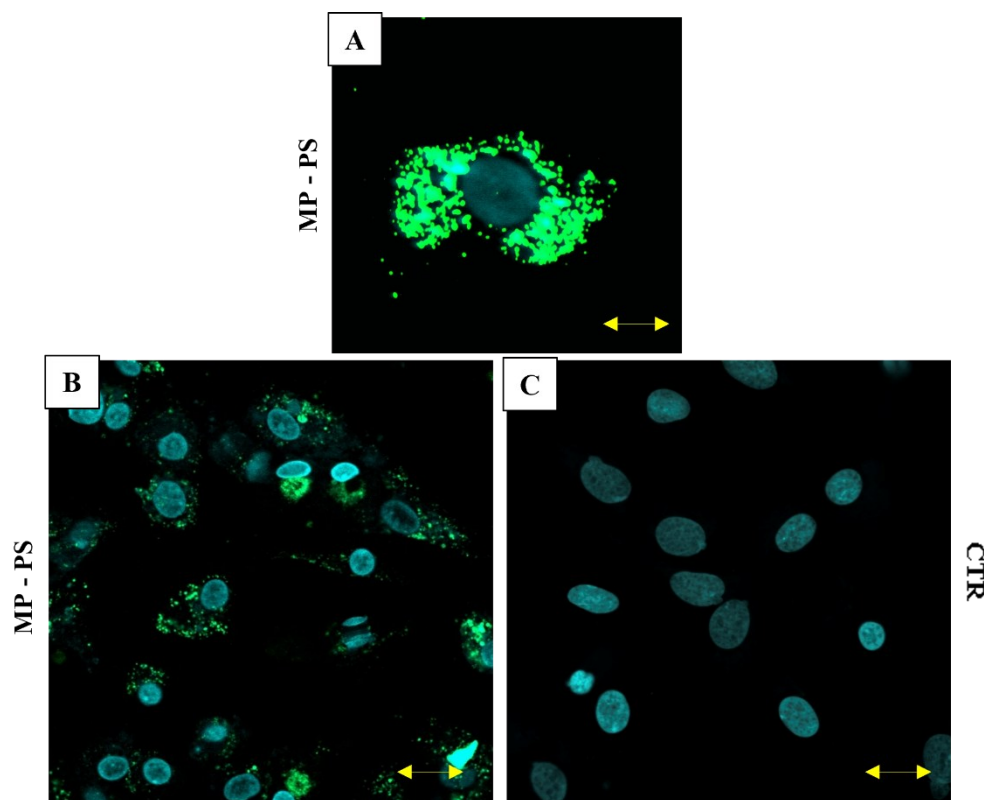


Fig. 16 Immagini esemplificative ottenute con microscopio confocale (Olympus Fluoview). FF-MSC in coltura con microplastiche di polistirene fluorescenti (FITC (A e B). FF-MSC di controllo (C). Il nucleo è stato contro colorato con DAPI. Barra: 10 μ m. Ingrandimento 120X (A), 60X (B) e 70X (C).

Analisi fenotipica e morfologica di cellule staminali mesenchimali isolate da fluido follicolare in coltura con nanoplastiche

Le cellule FF-MSC sono state poste in coltura e dopo 48 ore il terreno è stato addizionato con nanoplastiche di polistirene fluorescenti alla concentrazione di 100 mg/ml. Le FF-MSC sono state monitorate tramite microscopia ottica a 48 ore di distanza, in concomitanza con il cambio di terreno avvenuto ogni 2 giorni. Il monitoraggio dei campioni ha evidenziato che le cellule esposte a nanoplastiche (**Fig. 17 A**) hanno preservato la morfologia allungata e fusiforme tipica del fenotipo mesenchimale. Analogamente, la proliferazione cellulare è risultata sovrapponibile a quella osservata nei campioni di controllo (**Fig. 17 B**), senza evidenti alterazioni riconducibili al trattamento.

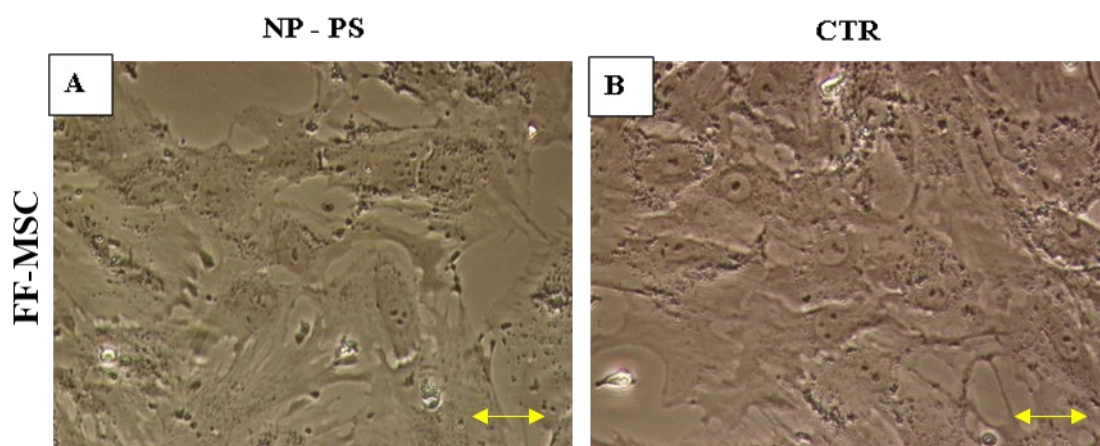


Fig. 17 Immagini esemplificative ottenute con microscopio ottico (Nikon, Eclipse TS2). FF-MSC in coltura con nanoplastiche fluorescenti (**A**). FF-MSC di controllo (**B**). Barra: 10 μ m. Ingrandimento 20X.

I campioni isolati da fluido follicolare sono stati successivamente osservati al microscopio confocale per osservare la distribuzione delle nanoplastiche (**Fig. 18 A**).

Dopo 5 giorni di coltura, il segnale fluorescente delle nanoplastiche risulta debole e localizzato esclusivamente in corrispondenza di aggregati di dimensioni maggiori, organizzati in cluster isolati (indicati dalle frecce in rosa – **Fig. 18 A**). Dal punto di vista della proliferazione non si osservano differenze apprezzabili nella crescita cellulare

rispetto ai campioni di controllo (**Fig. 18 B**). Tuttavia, le cellule esposte alle nanoplastiche presentano nuclei con alterazioni morfologiche, quali *bleb* nucleari e nuclei picnotici, indicativi di uno stato di sofferenza cellulare, come indicato dalle frecce in arancione in **Fig. 18 A**.

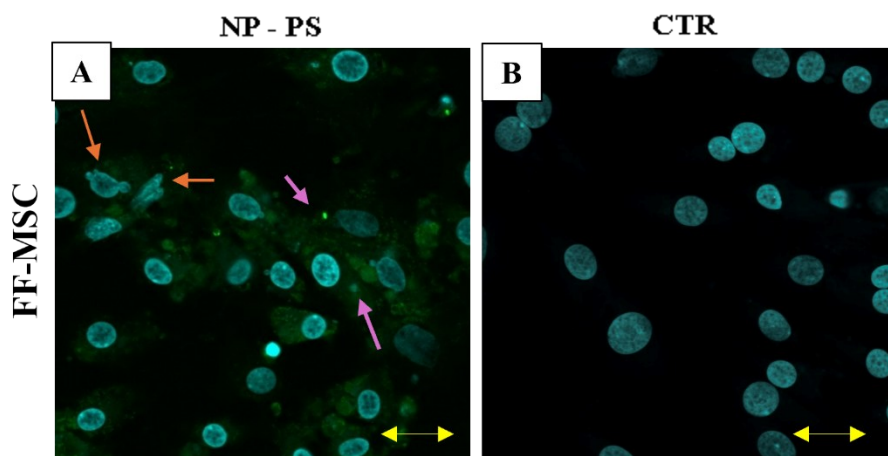


Fig. 18 Immagini esemplificative ottenute con microscopio confocale Olympus Fluoview. FF-MSC in coltura con nanoplastiche di polistirene fluorescenti (A). FF-MSC di controllo (B). Il nucleo è stato contro colorato con DAPI. Barra: 10 µm. Ingrandimento 60X.

Cinetica di internalizzazione di nanoplastiche

Al fine di valutare la cinetica di internalizzazione delle nanoplastiche, le FF-MSC piastrate su Petri con fondo di vetro, sono state fissate ad intervalli temporali definiti, specificamente a 5, 10, 24 e 48 ore dall'inizio dell'esposizione.

L'analisi di microscopia confocale, condotta a 5 ore dall'incubazione (**Fig. 19 A**), ha evidenziato un'iniziale distribuzione delle nanoplastiche all'interno del citoplasma. In questo *time-point* precoce, le nanoplastiche appaiono disperse e non organizzate in aggregati evidenti. In parallelo, l'analisi morfologica dei nuclei, marcati con DAPI, non ha mostrato alterazioni morfologiche o frammentazione: i nuclei appaiono ancora perfettamente integri e tondeggianti.

Anche a distanza di 10 ore dall'aggiunta di nanoplastiche (**Fig. 19 B**), il profilo di localizzazione delle plastiche si mantiene pressoché invariato; infatti, non si osservano ancora segni di una transizione verso un'internalizzazione attiva o verso una progressiva cinetica intracellulare. Contestualmente, la morfologia dei nuclei continua a rimanere stabile, preservando l'integrità strutturale già precedentemente osservata.

Al *time-point* di 24 ore (**Fig. 19 C**), si osserva un cambiamento nella distribuzione delle nanoplastiche fluorescenti. Nello specifico, il segnale fluorescente non appare diffuso in modo omogeneo, ma localizzato esclusivamente in precise aree del compartimento citoplasmatico, concentrandosi in strutture puntiformi ben definite. Questa diversa organizzazione del segnale suggerisce una progressiva riorganizzazione intracellulare delle plastiche e una risposta eterogenea delle cellule all'esposizione.

Al *time-point* finale di 48 ore (**Fig. 19 D**), si riscontra una drastica riduzione del segnale fluorescente dovuta presumibilmente alla completa internalizzazione delle plastiche. Le poche nanoplastiche ancora osservabili appaiono di dimensioni inferiori rispetto *ai time-points* precedenti. Contestualmente, una quota della popolazione cellulare presenta alterazioni della morfologia nucleare, compatibili con uno stato di sofferenza cellulare. Nel complesso, questi risultati suggeriscono che l'esposizione prolungata alle nanoplastiche sia associata a una progressiva modificazione della loro distribuzione intracellulare e all'insorgenza di alterazioni morfologiche cellulari che diventano evidenti nelle fasi più tardive dell'esposizione.

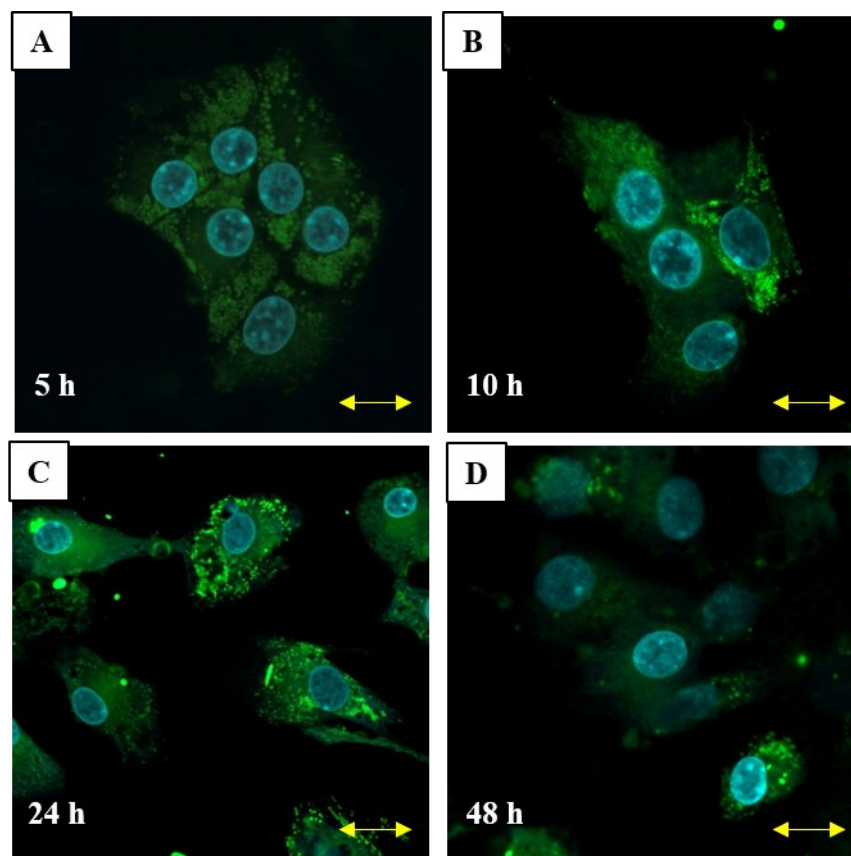


Fig. 19 Immagini esemplificative ottenute con microscopio confocale Olympus Fluoview della cinetica di internalizzazione delle nanoplastiche fluorescenti rispettivamente a 5h (A), 10 h (B), 24 h (C) e 48 h (D). Il nucleo è stato contro colorato con DAPI. Barra: 10 μ m. Ingrandimento 120X (A e B), 90X (C) e 138X (D).

Analisi fenotipica e morfologica di cellule staminali mesenchimali isolate da midollo osseo in coltura con nanoplastiche

Analogamente a quanto eseguito con le FF-MSC, le BM-MSC sono state poste in coltura; dopo 48 ore il terreno è stato addizionato con nanoplastiche di polistirene fluorescenti alla concentrazione di 100 mg/ml. Al contrario, le microplastiche non sono state incluse nelle analisi sperimentali successive, in quanto, come precedentemente descritto, le loro dimensioni apparivano incompatibili con un'efficiente internalizzazione cellulare. L'analisi al microscopio ottico, eseguita ogni 48 ore in concomitanza con il cambio terreno, ha evidenziato che l'esposizione alle nanoplastiche

determina una moderata riduzione della proliferazione cellulare (**Fig. 20 A**) rispetto ai campioni di controllo (**Fig. 20 B**). In parallelo, le cellule trattate mostrano una lieve variazione della morfologia, assumendo un fenotipo meno allungato e fusiforme rispetto alle cellule di controllo.

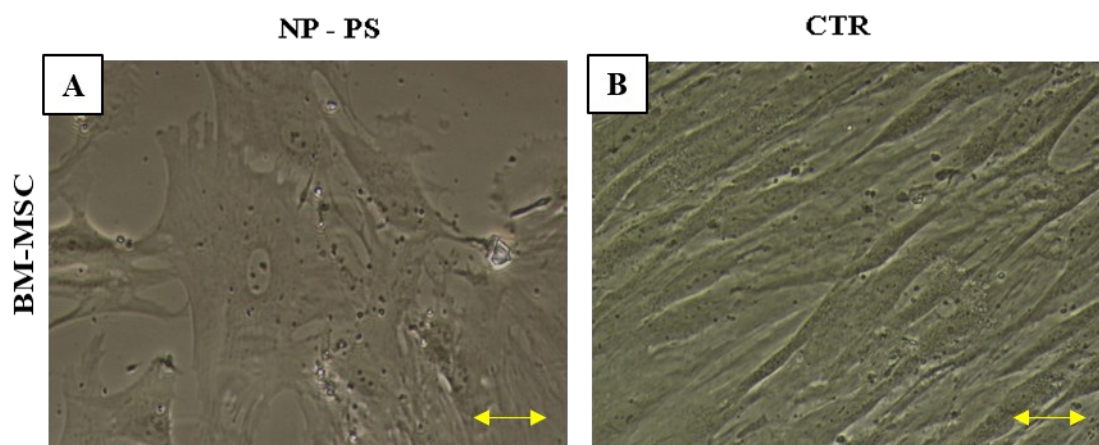


Fig. 20 Immagini esemplificative ottenute con microscopio ottico (Nikon, Eclipse TS2). BM-MSC in coltura con nanoplastiche di polistirene fluorescenti (A). BM-MSC di controllo (B). Barra: 10 μm . Ingrandimento 20X.

Dopo 5 giorni di coltura, i campioni isolati da midollo osseo sono stati visualizzati al microscopio confocale. Il confronto dei campioni esposti a nanoplastiche (**Fig. 21 A**) con i controlli (**Fig. 21 B**) non ha rivelato alterazioni morfologiche particolari. I nuclei, infatti, mantengono una morfologia regolare e tondeggianti. Inoltre, le nanoplastiche (**Fig. 21 A**) sembrano essere state efficacemente internalizzate, come la quantità ridotta di segnale fluorescente nello spazio extracellulare sembra suggerire.

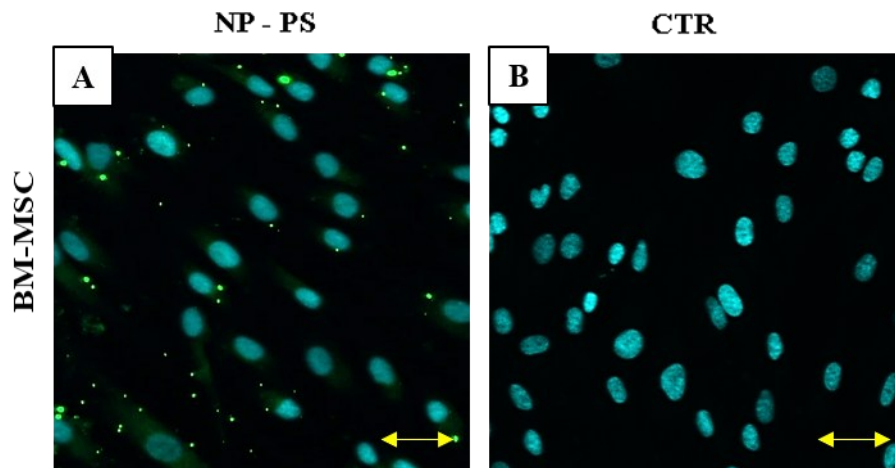


Fig. 21 Immagini esemplificative ottenute con microscopio confocale Olympus Fluoview. BM-MSC in coltura con nanoplastiche fluorescenti in FITC (A). BM-MSC di controllo (B). Il nucleo è stato contro colorato con DAPI. Barra: 10 μ m. Ingrandimento 47X (A) e 37X (B).

Analisi comparativa della crescita e della morfologia di FF-MSC e BM-MSC in coltura con nanoplastiche e in condizioni di controllo

Il confronto tra le due linee cellulari ha evidenziato differenze intrinseche riconducibili alla diversa origine delle MSC e alla loro risposta all'esposizione alle nanoplastiche. Dal punto di vista proliferativo, le BM-MSC hanno mostrato una capacità di crescita significativamente superiore rispetto alle FF-MSC, sia nelle condizioni di controllo sia dopo la coltura con nanoplastiche. In condizioni basali, entrambe le linee cellulari presentano il tipico fenotipo mesenchimale; tuttavia, le BM-MSC mostrano una morfologia più omogenea, caratterizzata da cellule prevalentemente allungate e fusiformi. Al contrario, le FF-MSC evidenziano una maggiore eterogeneità morfologica, con la presenza di cellule allungate (**Fig. 22 A**), tondeggianti (**Fig. 22 B**) e provviste di lunghi prolungamenti citoplasmatici (**Fig. 22 C**).

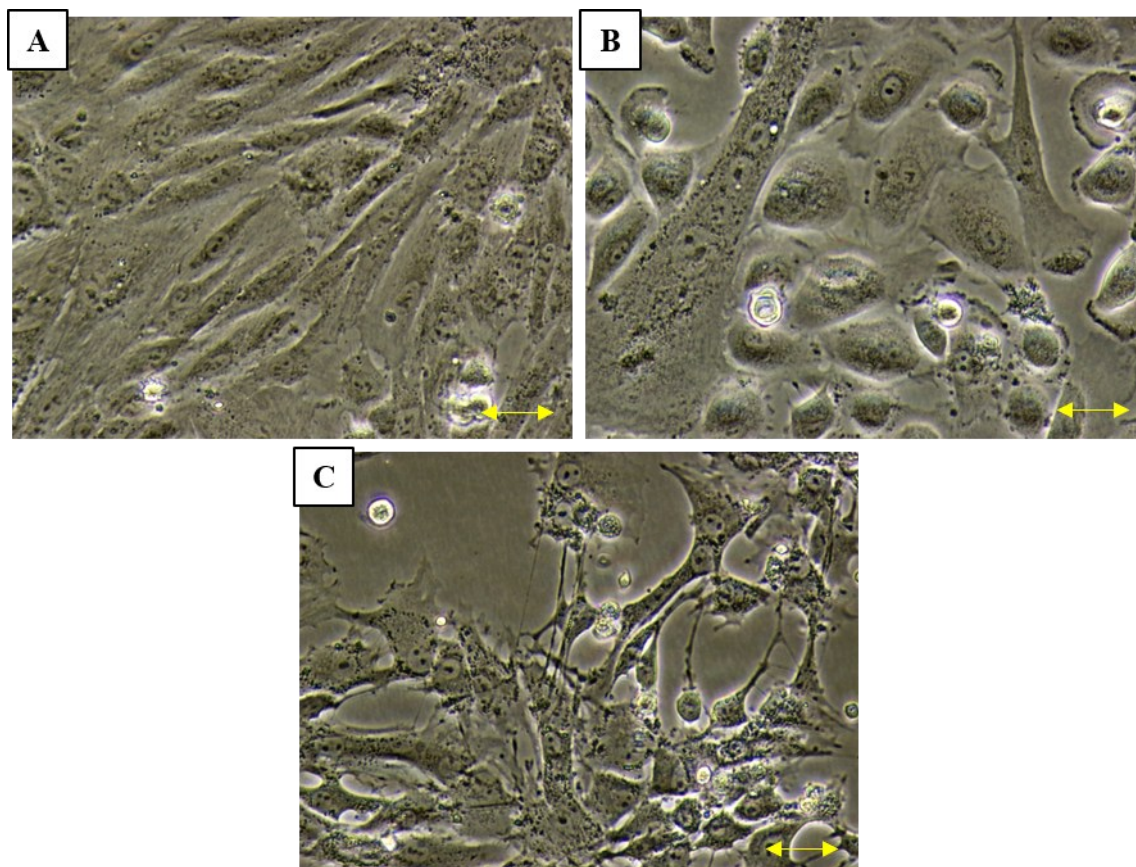


Fig. 22 Immagini esemplificative ottenute con microscopio ottico (Nikon, Eclipse TS2) di FF-MSC in condizioni basali: cellule allungate e fusiformi (A), cellule tondeggianti (B) e cellule con lunghi prolungamenti citoplasmatici (C). Barra: 10 μ m. Ingrandimento 20X.

Un'ulteriore differenza riguarda l'aspetto del citoplasma: sia nelle condizioni di controllo sia dopo l'esposizione a nanoplastiche, le FF-MSC presentano un citoplasma sensibilmente più granulare rispetto alle BM-MSC. Tale caratteristica potrebbe riflettere differenze funzionali tra le due popolazioni cellulari ed essere riconducibile a un maggior contenuto di organelli citoplasmatici, quali lisosomi, oppure a uno stato di senescenza cellulare, ipertrofia o attivazione di programmi di differenziamento. Sebbene tali ipotesi richiedano ulteriori approfondimenti sperimentali, questi risultati suggeriscono che le FF-MSC possiedono caratteristiche biologiche peculiari, meritevoli di futuri studi finalizzati a una più accurata caratterizzazione di questa promettente

popolazione cellulare ottenuta da un materiale biologico comunemente considerato di scarto.

L'esposizione a nanoplastiche non ha determinato evidenti alterazioni macroscopiche del fenotipo mesenchimale in nessuna delle popolazioni cellulari analizzate. In entrambe le linee, infatti, le cellule hanno mantenuto una morfologia complessivamente paragonabile a quella osservata nei rispettivi campioni di controllo. Tuttavia, nelle FF-MSC il trattamento con nanoplastiche è risultato associato a un citoplasma visivamente più granulare rispetto alle BM-MSC (**Fig. 23 A e C**), suggerendo una diversa risposta cellulare all'esposizione. Sebbene il fenotipo morfologico generale si sia mantenuto sostanzialmente stabile rispetto ai controlli (**Fig. 23 B e D**), non è possibile escludere che l'esposizione alle nanoplastiche abbia indotto alterazioni a livello molecolare o funzionale non rilevabili mediante la sola analisi morfologica. Tali modificazioni potrebbero interessare processi quali il metabolismo cellulare, la risposta allo stress, l'omeostasi degli organelli o l'espressione genica e rappresentano un importante punto di partenza per futuri studi volti a chiarire i meccanismi biologici alla base della risposta delle cellule staminali mesenchimali all'esposizione alle nanoplastiche.

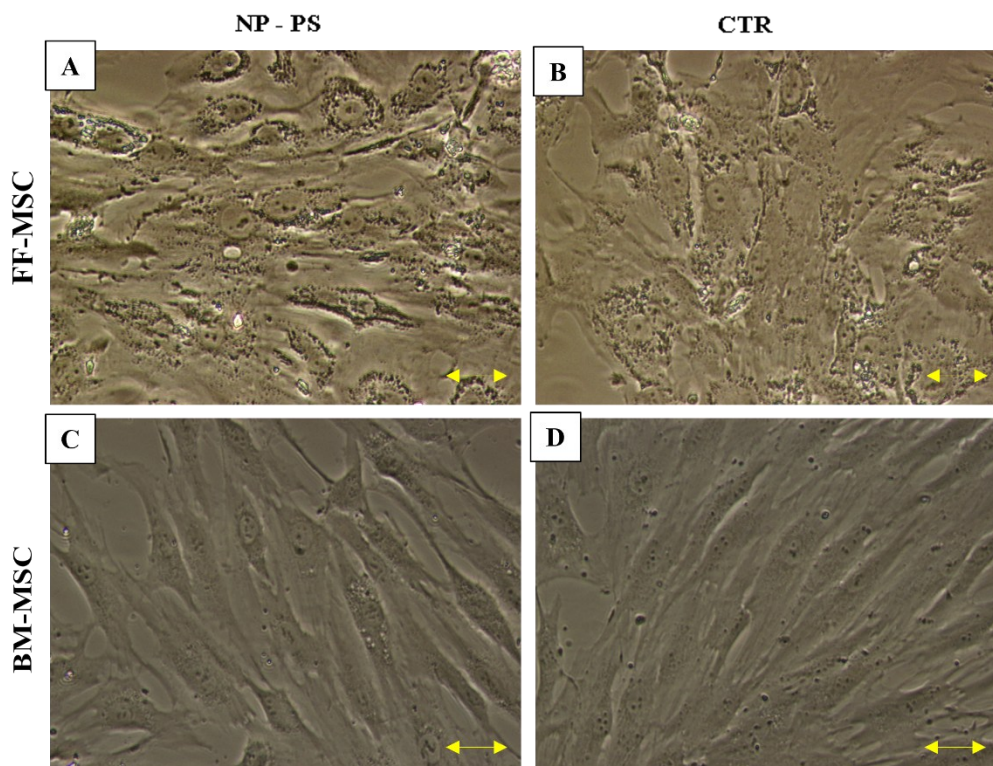


Fig. 23 Immagini esemplificative ottenute con microscopio ottico (Nikon, Eclipse TS2). FF-MSC e BM-MSC in coltura con nanoplastiche fluorescenti (A e C). FF-MSC e BM-MSC in condizioni di controllo (B e D). Barra: 10 μ m. Ingrandimento 20X.

Immunofluorescenza: analisi qualitativa della localizzazione della clatrina in cellule staminali mesenchimali in coltura con micro- e nanoplastiche

Al fine di valutare la localizzazione della clatrina in FF-MSC in coltura con micro- e nanoplastiche è stata eseguita un'analisi in immunofluorescenza. L'esperimento è stato condotto per valutare se la via di endocitosi mediata da clatrina fosse responsabile dell'internalizzazione sia delle micro- sia delle nanoplastiche, ricercando una possibile co-localizzazione tra il segnale della proteina e la fluorescenza intrinseca delle plastiche stesse. Dalle analisi è possibile osservare che le microplastiche, verosimilmente presenti sulla superficie cellulare, formano aggregati di grosse dimensioni (**Fig. 24 A**). Al contrario, le nanoplastiche sembrano essere internalizzate (**Fig. 24 B**). In entrambe le condizioni sperimentali, il segnale della clatrina si localizza in modo specifico in una ristretta regione perinucleare, riconducibile all'apparato del Golgi (**Fig. 24 C e D**).

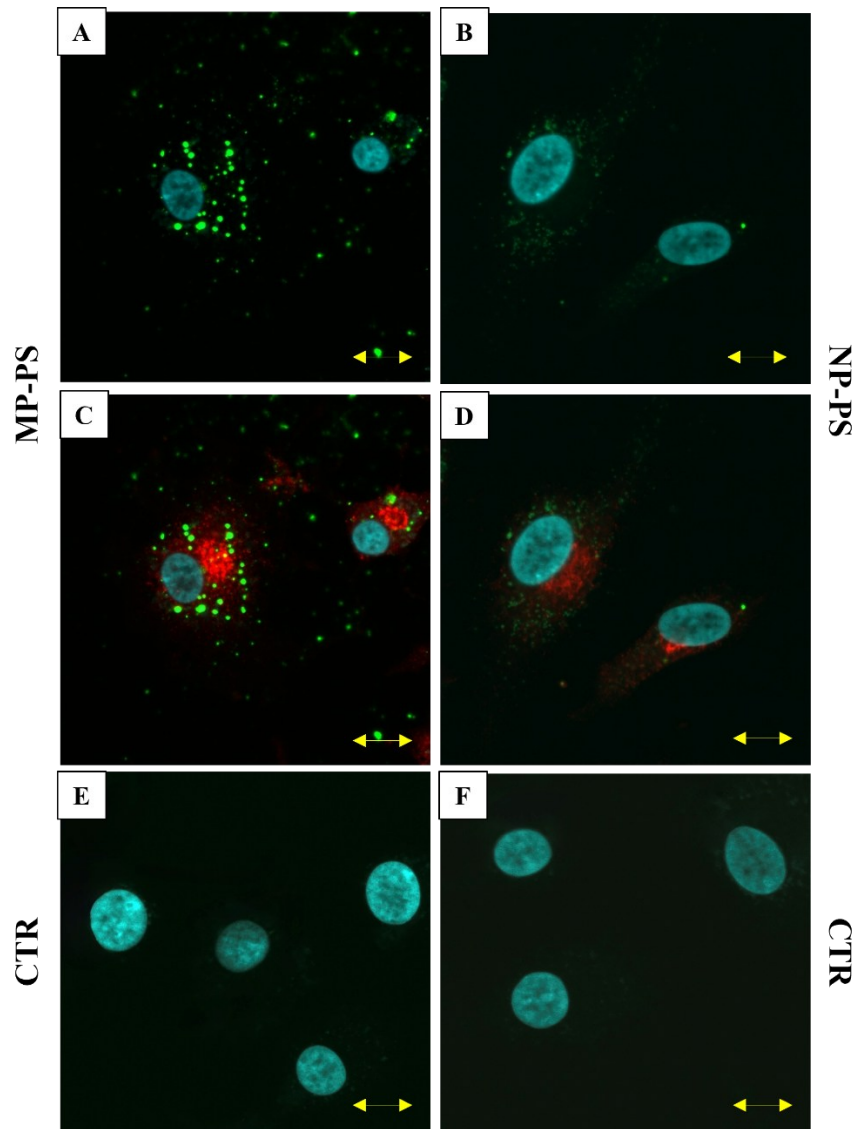


Fig. 24 Immagini al microscopio confocale Olympus Fluoview della localizzazione della clatrina in FF-MSC trattate con micro- (A e C) e nanoplastiche (B e D). Segnale micro- e nanoplastiche in FITC (A e B) e segnale della clatrina in rosso (Alexa 594; C e D). FF-MSC di controllo (E e F). Il nucleo è stato contro colorato con DAPI. Barra: 10 μm. Ingrandimento 120X (A e C), 138X (B e D) e 130X (E e F).

Analisi qualitativa e comparativa della localizzazione di clatrina e calnexina di cellule staminali mesenchimali in coltura con nanoplastiche

Per determinare in modo specifico la localizzazione intracellulare della clatrina, è stata effettuata una doppia immunofluorescenza utilizzando anticorpi contro clatrina e calnexina in modo da verificare un'eventuale sovrapposizione del segnale. I risultati mostrano una distribuzione dei due segnali leggermente differente: la clatrina, come sopra mostrato, sembra concentrarsi nella regione perinucleare, probabilmente specifica per l'apparato di Golgi (**Fig. 25 A**), mentre la calnexina si dispone in una regione che potrebbe essere specifica per il reticolo endoplasmatico (**Fig. 25 B**), mostrando che i due segnali non sono sovrapponibili (**Fig. 25 C**). Questo dato è stato confermato anche dall'analisi del coefficiente di Pearson che è risultato, in tutti gli esperimenti effettuati, pari a 0.2.

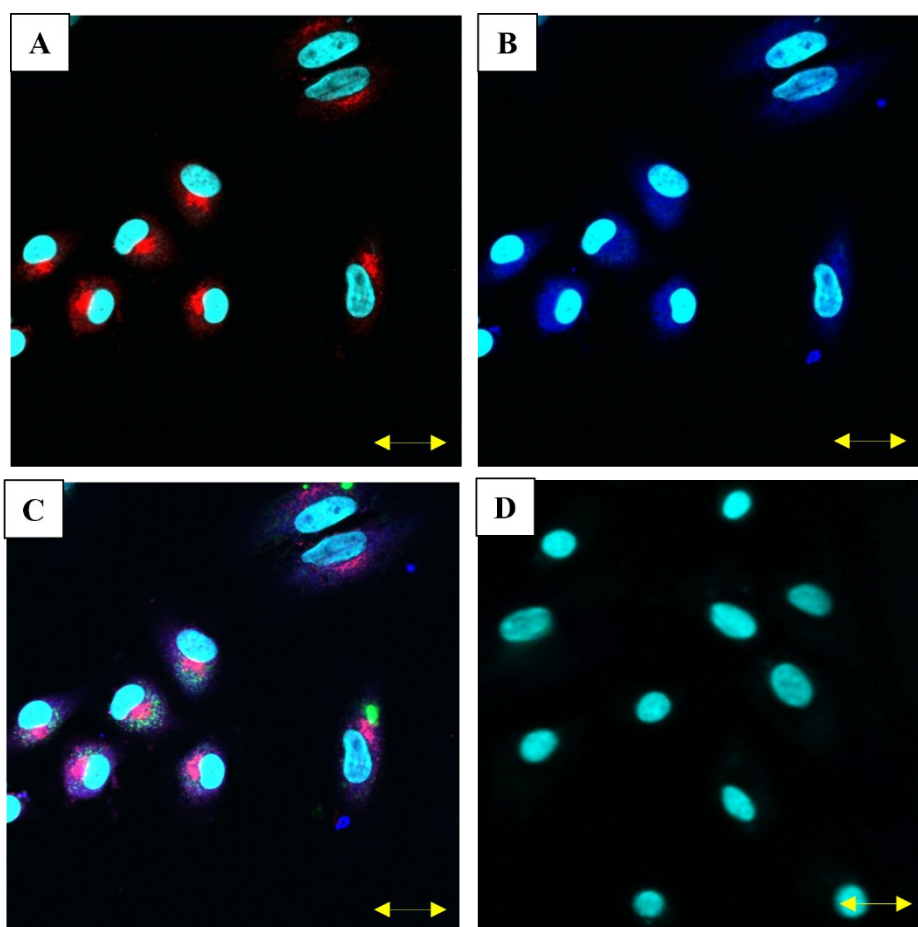


Fig. 25 Immagini al microscopio confocale Olympus Fluoview della localizzazione della clatrina e della calnexina in cellule FF-MSC coltivate in presenza di nanoplastiche. Le immagini mostrano i singoli canali: clatrina (Alexa 594; A), calnexina (Alexa 647; B), immagine di sovrapposizione di tutti i canali analizzati (C). Immagine di controllo (D). Il nucleo è stato contro colorato con DAPI. Barra: 10 μ m. Ingrandimento: 90X.

Analisi della co-localizzazione della clatrina con l'apparato di Golgi

I risultati preliminari ottenuti mediante marcatura dell'apparato di Golgi evidenziano una possibile co-localizzazione tra il segnale del Golgi e quello della clatrina, come mostrato nelle immagini riportate di seguito (**Fig. 26**). Tale osservazione suggerisce un potenziale coinvolgimento del compartimento del Golgi nei processi di traffico intracellulare delle vescicole rivestite da clatrina e, più in generale, nella dinamica di internalizzazione e smistamento delle nanoplastiche.

Sebbene questi dati abbiano carattere preliminare e richiedano ulteriori analisi quantitative di co-localizzazione (ad esempio mediante il coefficiente di Pearson), essi rappresentano un primo indizio del possibile coinvolgimento della via endocitica clatrina-dipendente e dei compartimenti intracellulari deputati al traffico vescicolare. Ulteriori esperimenti saranno pertanto necessari per confermare tale ipotesi e definire il ruolo dell'apparato di Golgi nel destino intracellulare delle nanoplastiche.

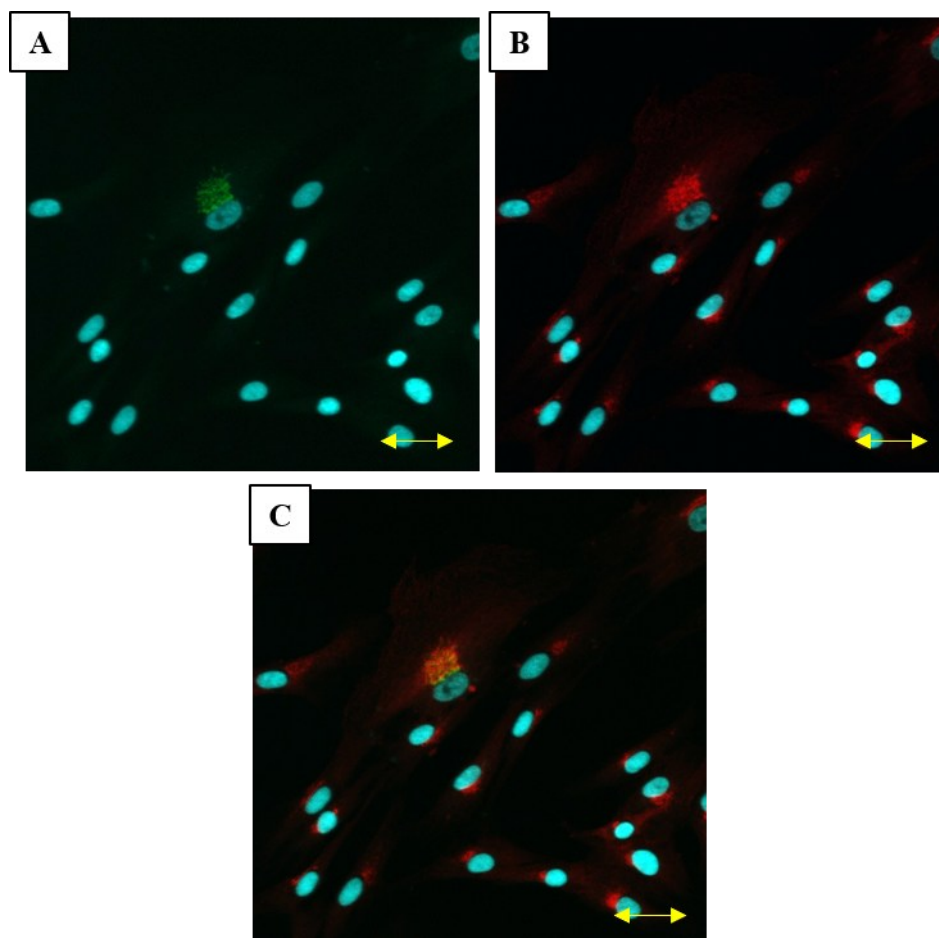


Fig. 26 Immagini al microscopio confocale Olympus Fluoview della localizzazione della clatrina e del marcatore CellLight in BM-MSC. I pannelli mostrano la localizzazione del marcatore CellLight in FITC (A), il segnale specifico della clatrina (Alexa 594; B) e l'immagine di sovrapposizione di tutti i canali analizzati (C). Il nucleo è stato contro colorato con DAPI. Barra: 10 μ m. Ingrandimento 41X.

Meccanismo di stress ossidativo indotto da nanoplastiche

La valutazione delle specie reattive dell'ossigeno effettuata a 7 giorni dall'esposizione di nanoplastiche ha mostrato l'assenza di un segnale ROS fluorescente particolarmente specifico sia nelle FF-MSC (**Fig. 27 A**) che nelle BM-MSC (**Fig. 27 C**).

Nonostante ciò, l'analisi morfologica ha evidenziato, specialmente in cellule derivate da fluido follicolare, una marcata sofferenza cellulare con nuclei deformi e segni apoptotici evidenti (come mostrato dalle frecce – **Fig. 27 A e B**). Inoltre, le cellule hanno mostrato

un'elevata suscettibilità intrinseca alla sonda ROS che ha compromesso drasticamente la stabilità della coltura, determinando il distacco di numerose cellule. Diversamente, le BM-MSC non hanno mostrato sofferenza dopo esposizione alla sonda. I risultati sono tuttavia paragonabili a quelli ottenuti da FF-MSC con un segnale diffuso e poco specifico nel citoplasma (**Fig. 27 C e D**).

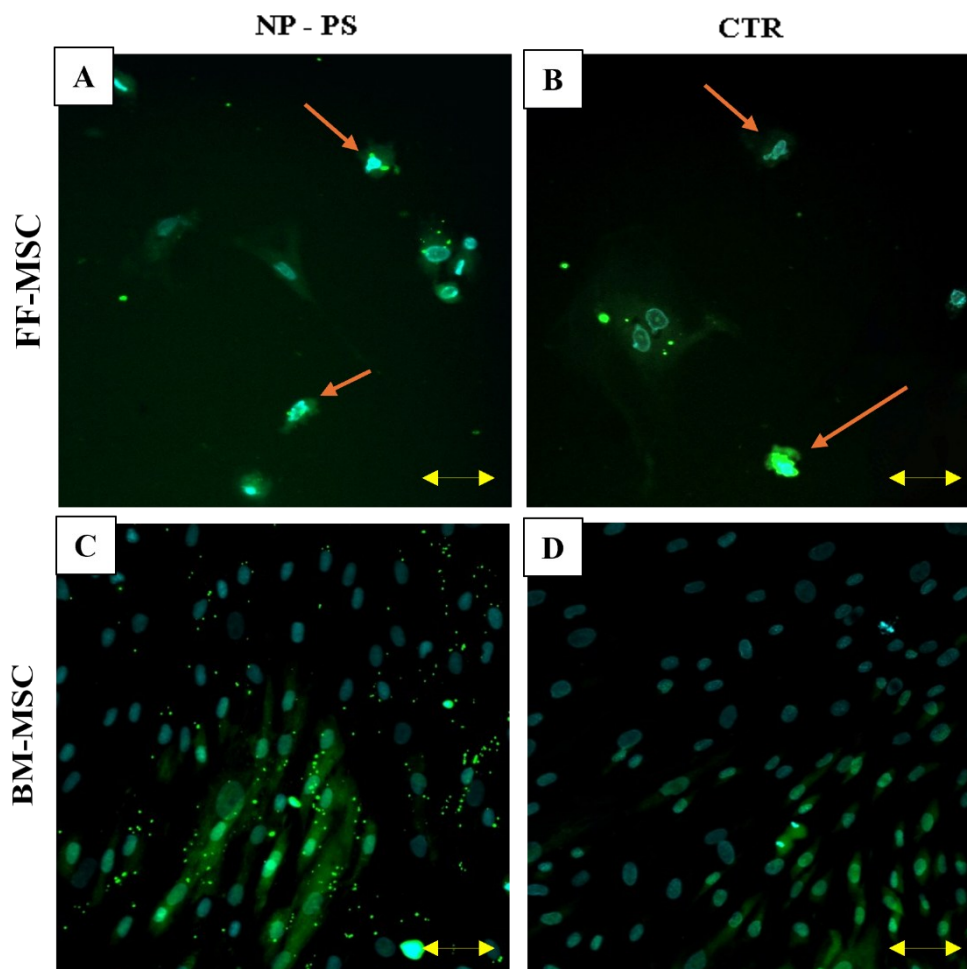


Fig. 27 Immagini esemplificative ottenute con microscopio confocale Olympus Fluoview della produzione di ROS da parte di FF-MSC e BM-MSC con nanoplastiche fluorescenti (A e C) e di controllo (B e D). Il nucleo è stato contro colorato con DAPI. Barra: 10 μ m. Ingrandimento 30X.

Valutazione del potenziale effetto pro-apoptotico indotto dalle nanoplastiche

Per valutare la possibile attivazione di *pathways* apoptotici è stata condotta l'analisi con Annexin V (**Fig. 28**). In linea con i dati ottenuti dalle analisi con i ROS, non si è osservata alcuna positività specifica per tale marcatore, né nelle cellule esposte alle nanoplastiche (**Fig. 28 A**) né nei controlli coltivati in assenza di plastiche (**Fig. 28 B e C**). Tuttavia, come evidenziato in **Fig. 28 A**, le cellule esposte alle nanoplastiche presentano una maggiore quantità di detriti cellulari rispetto ai controlli. Sebbene l'assenza di positività all'Annexin V non supporti l'attivazione di un processo apoptotico conclamato, la presenza di tali detriti potrebbe rappresentare un indice di sofferenza cellulare indotta dall'esposizione alle nanoplastiche o riflettere alterazioni cellulari precoci non ancora rilevabili mediante questo marcatore. Saranno pertanto necessari ulteriori approfondimenti per chiarire il significato biologico di questa osservazione.

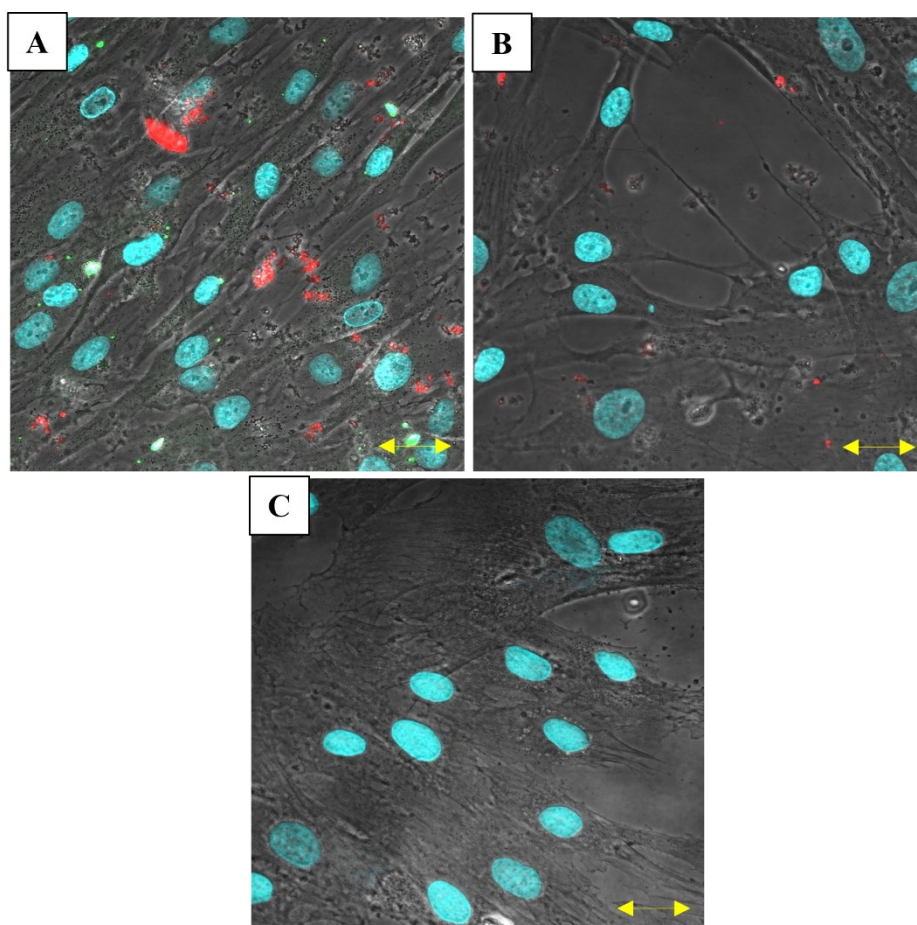


Fig. 28 Immagini esemplificative ottenute con microscopio confocale del segnale Annexin V in BM-MSC. Cellule coltivate con nanoplastiche fluorescente in FITC (A), cellule coltivate in assenza di nanoplastiche (B) e cellule di controllo (C). Il nucleo è stato contro colorato con DAPI. Barra: 10 μ m. Ingrandimento 60X.

Analisi del differenziamento adipogenico in FF-MSC in coltura con nanoplastiche

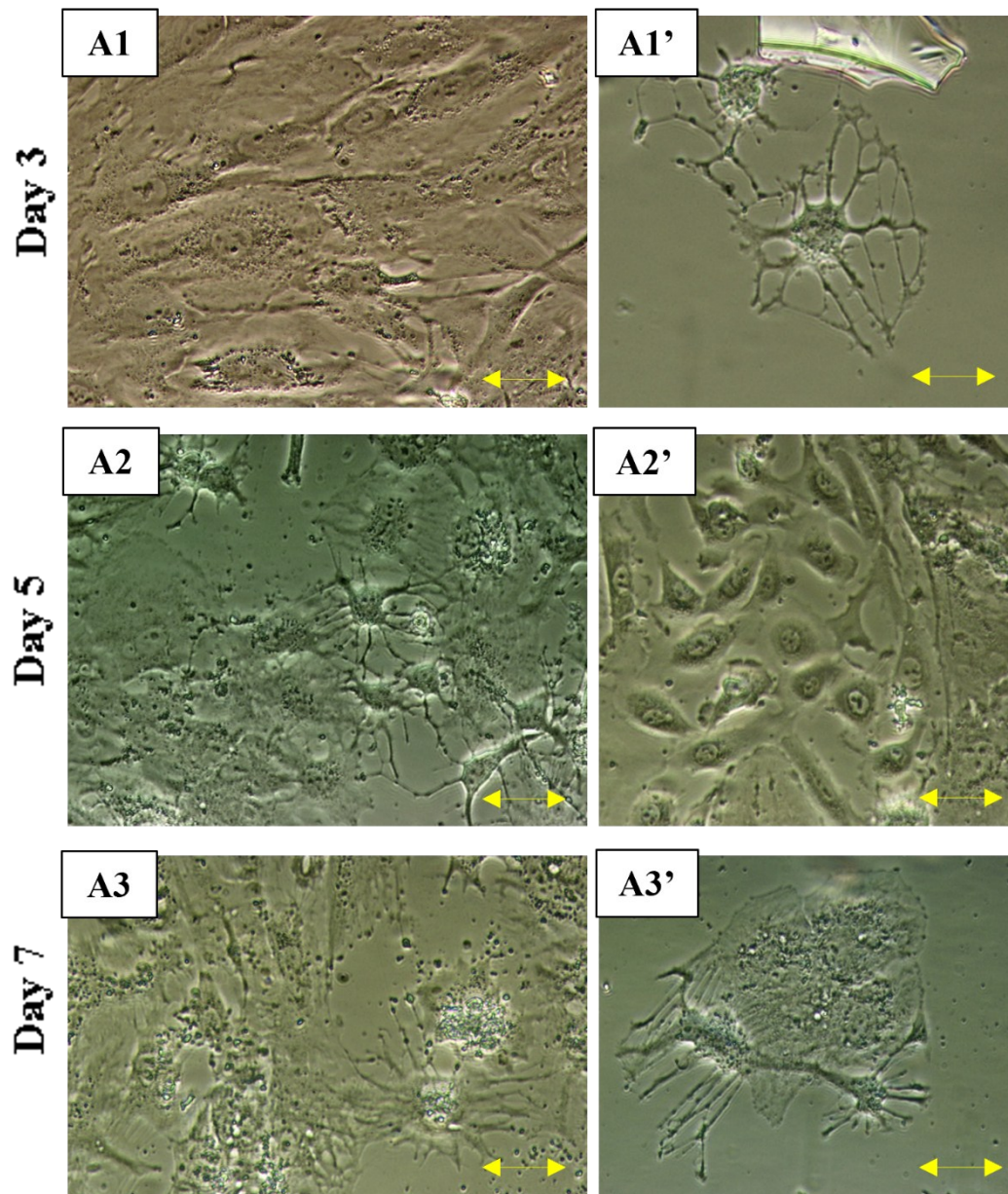
Per valutare l'effetto delle nanoplastiche di polistirene sul processo differenziativo, è stato eseguito un differenziamento adipogenico in FF-MSC. Le cellule isolate sono state addizionate con nanoplastiche per circa 48 ore; al terzo giorno è stato indotto il differenziamento utilizzando un terreno di coltura specifico, come descritto in materiali e metodi.

L'analisi morfologica (**Fig. 29**) ha rilevato la presenza di una popolazione particolarmente eterogenea nei campioni trattati con nanoplastiche (Adipo / PS-NP; **Fig. 29 A1-A3'**). Infatti, è stato possibile osservare la coesistenza di diverse sottopopolazioni cellulari rappresentate da cellule con morfologia fusiforme tipica delle mesenchimali (**Fig. 29 A1, A2 e A3**), cellule con conformazione simil epiteliale (**Fig. 29 A2'**) e, infine, cellule che assumono una peculiare conformazione “a ragnatela” (**Fig. 29 A1' e A3/A3'**). Tali variazioni morfologiche sono state individuate già nei primi 2 giorni di differenziamento.

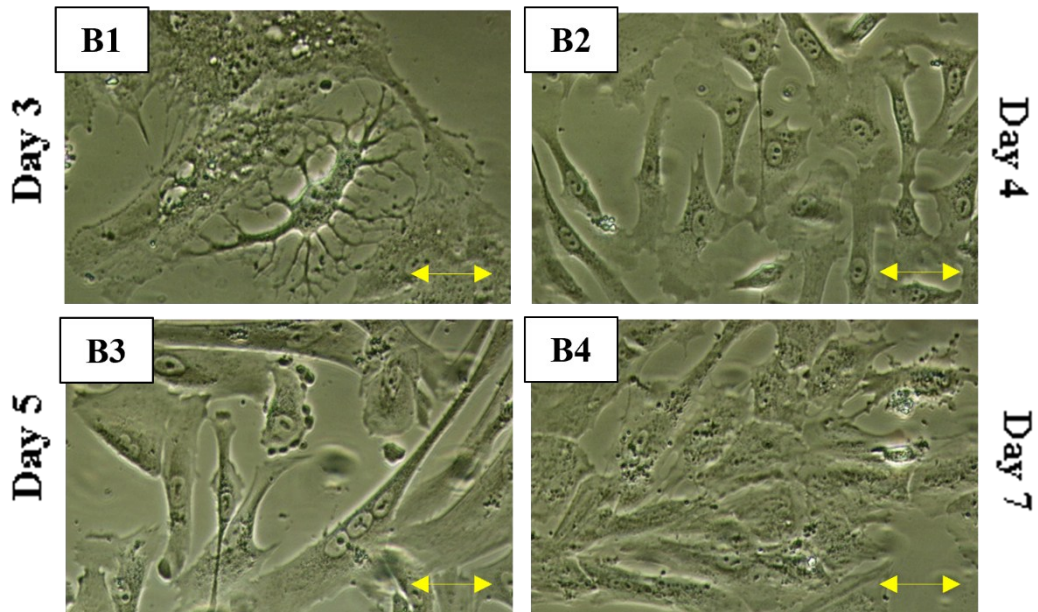
Nelle cellule differenziate in senso adipogenico in assenza di nanoplastiche (Adipo / CTR; **Fig. 29 B1-B4**), la popolazione cellulare ha mostrato una combinazione di morfologie: sono stati osservati elementi sporadici con conformazione “a ragnatela” (**Fig. 29 B1**), cellule con organizzazioni citoplasmatiche più allungate ed estese (**Fig. 29 B2 e B3**) e, infine, le classiche morfologie mesenchimali (**Fig. 29 B4**). È interessante notare che, nei campioni trattati con nanoplastiche la frequenza del fenotipo anomalo “a ragnatela” è risultata significativamente maggiore rispetto alle cellule di controllo.

Le cellule utilizzate come controllo negativo (CTR / CTR; **Fig. 29 C1-C2**), ossia mantenute in terreno standard e in assenza di nanoplastiche, sono state seguite in coltura per circa 12 giorni totali, preservando la tipica morfologia fusiforme del fenotipo mesenchimale.

FF-MSC: Adipo / NP-PS



FF-MSC: Adipo / CTR



FF-MSC: CTR / CTR

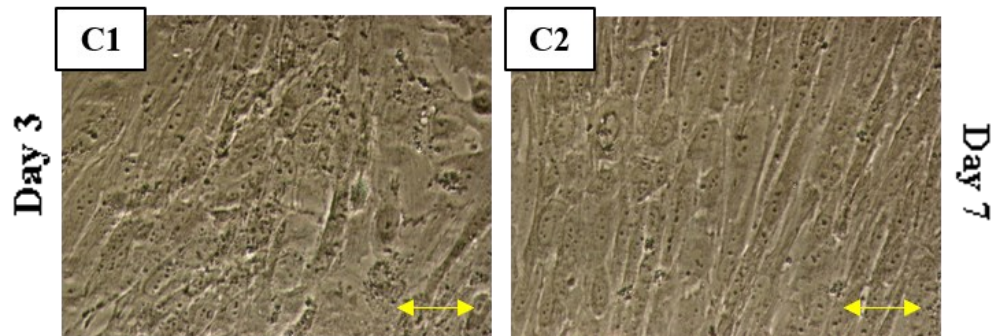


Fig. 29 Analisi morfologica in microscopia ottica del differenziamento adipogenico di FF-MSC ed effetto delle nanoplastiche. Cellule trattate con nanoplastiche (Adipo / NP-PS) rispettivamente a 3 (A1/A1'), 5 (A2/A2') e 7 giorni (A3/A3') di differenziamento. Cellule differenziate in assenza di nanoplastiche (Adipo / CTR) a 3 (B1), 4 (B2), 5 (B3) e 7 giorni (B4) di differenziamento. Controllo negativo (CTR / CTR) analizzato al giorno 3 (C1) e 7 (C2) di coltura. Barra: 10 μ m. Ingrandimento 20X.

Colorazione citochimica LipidTOX: analisi qualitativa della formazione di gocce lipidiche

Per approfondire le osservazioni condotte al microscopio ottico e definire l'effettiva organizzazione delle gocce lipidiche, le cellule sono state analizzate al microscopio confocale a seguito della colorazione con HCS LipidTOX.

In particolare, nell'analisi condotta sulle cellule coltivate in presenza di nanoplastiche (Adipo / PS-NP; **Fig. 30 A**), le gocce lipidiche sono apparse di dimensioni ridotte e localizzate soltanto in una frazione cellulare ristretta (pari al 10%). Al contrario, nelle cellule differenziate di controllo non esposte a nanoplastiche (Adipo / CTR; **Fig. 30 B**) si osservano molte più gocce lipidiche e di dimensioni maggiori. Infine, nei campioni mantenuti in terreno standard (CTR / CTR; **Fig. 30 C**), l'analisi ha confermato la complessiva assenza di gocce lipidiche.

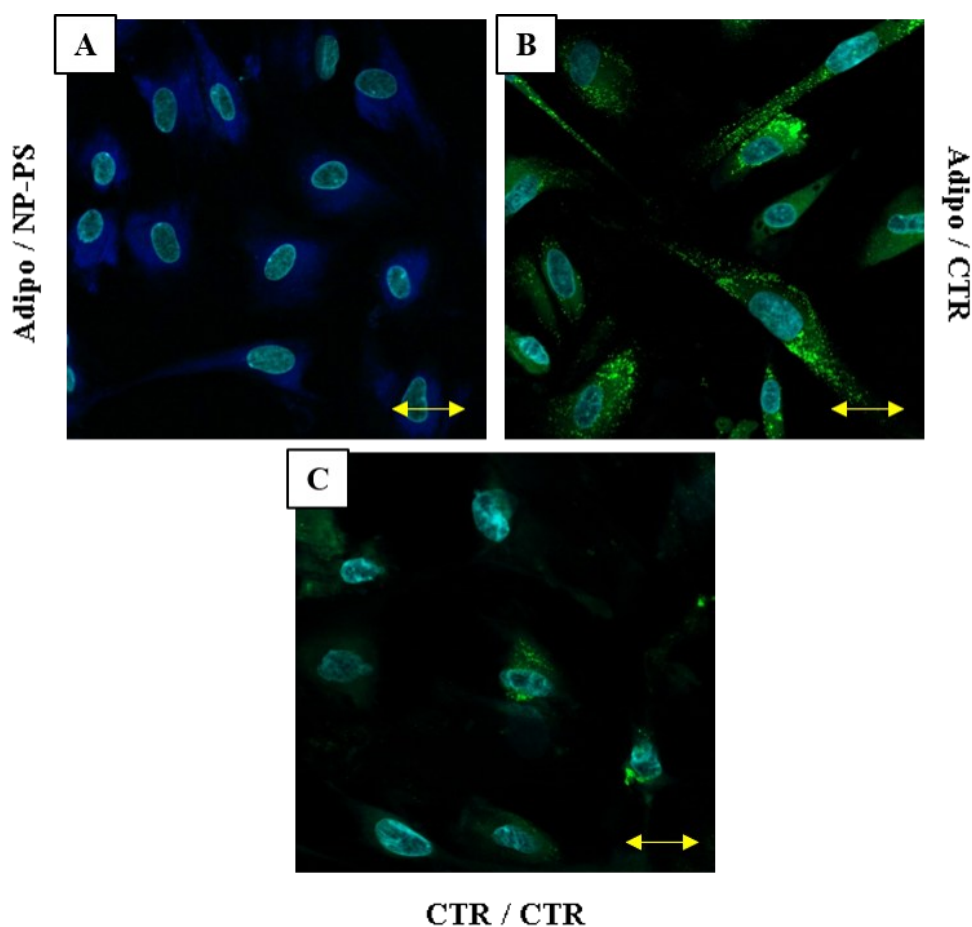
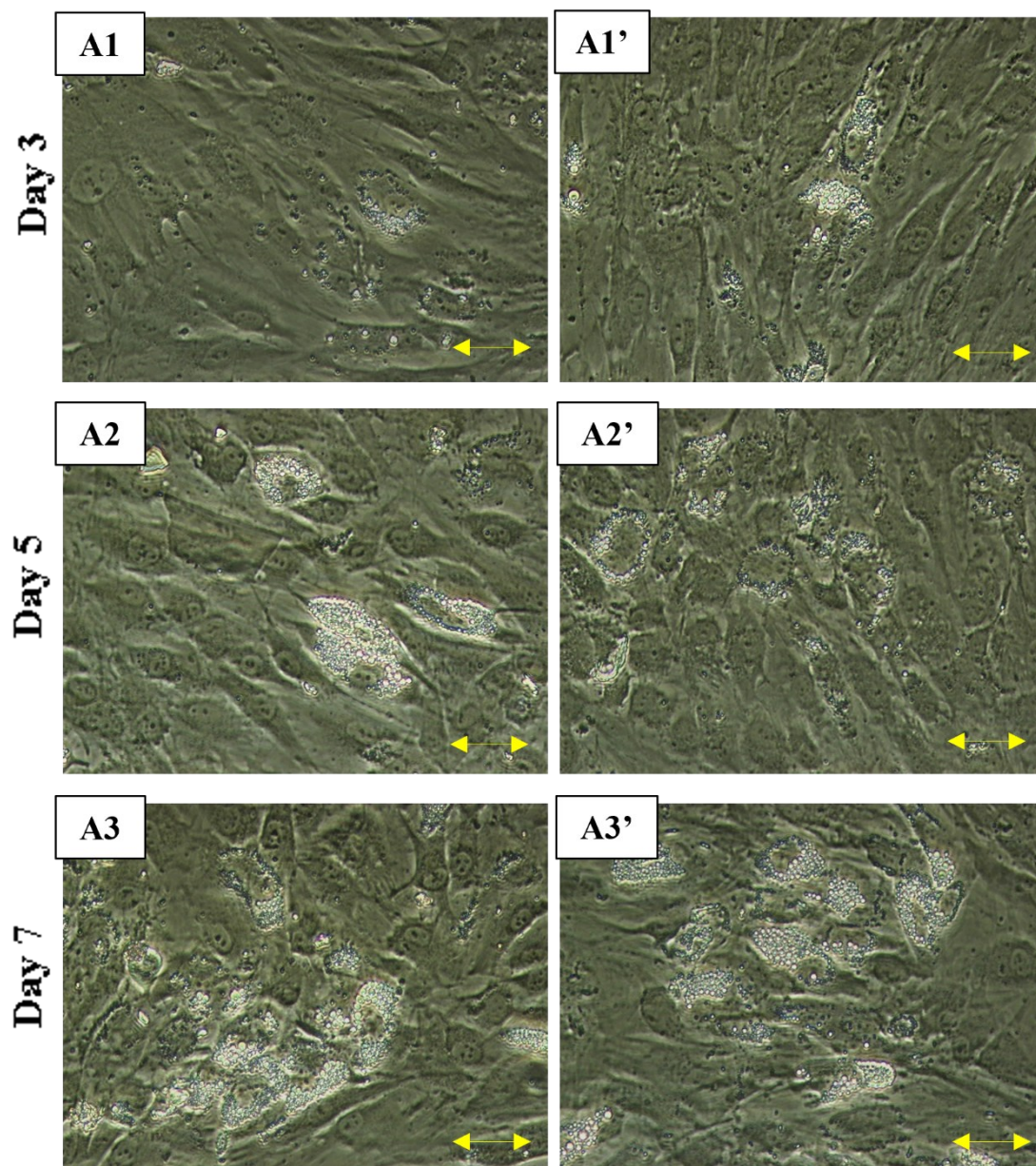


Fig. 30 immagini al microscopio confocale Olympus Fluoview della colorazione citochimica HCS LipidTOX in FF-MSC. **A:** cellule in differenziamento adipogenico in coltura con nanoplastiche; **B:** cellule differenziate in assenza di nanoplastiche; **C:** cellule di controllo cresciute in terreno standard. Barra: 10 μ m. Ingrandimento 20X.

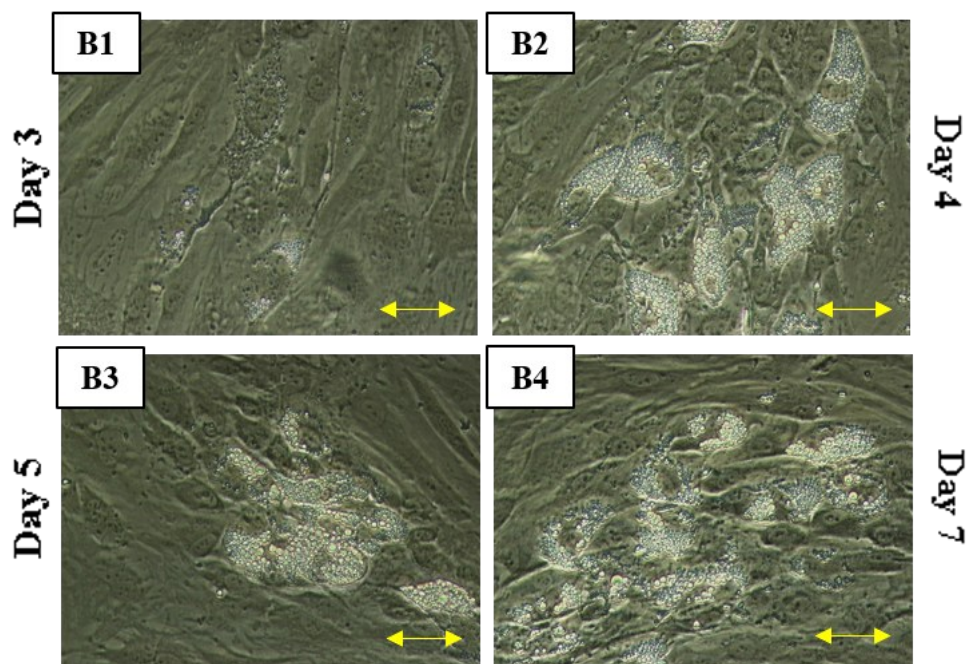
Analisi del differenziamento adipogenico in BM-MSC in coltura con nanoplastiche

La capacità di differenziamento adipogenico è stato analizzato anche in BM-MSC seguendo il protocollo utilizzato per le FF-MSC. I risultati mostrano che le cellule esposte a nanoplastiche (Adipo / NP-PS) hanno iniziato a differenziarsi già dopo tre giorni dall'inizio del differenziamento (**Fig. 31 A1-A3'**). In queste cellule è stata osservata la comparsa delle caratteristiche goccioline lipidiche di forma tondeggianti, il cui volume e densità sono progressivamente aumentati nel tempo sino al settimo giorno di coltura (**Fig. 31 A3/A3'**). Nonostante l'induzione del differenziamento, una parte delle cellule ha conservato, per tutta la durata dell'esperimento, la tipica morfologia allungata e fusiforme propria delle cellule staminali mesenchimali in stato indifferenziato. Al contrario, le cellule differenziate in assenza di nanoplastiche (Adipo / CTR; **Fig. 31 B1-B4**) hanno mostrato un grado di differenziamento adipogenico visibilmente più marcato e omogeneo, caratterizzato da un più cospicuo accumulo di vacuoli lipidici citoplasmatici (**Fig. 31 B4**) rispetto alla condizione descritta sopra. Infine, le cellule utilizzate come controllo negativo (CTR / CTR) hanno mantenuto la stabilità del fenotipo mesenchimale non differenziato sia al giorno 3 (**Fig. 31 C1**) che al giorno 7 (**Fig. 31 C2**) di coltura.

BM-MSC: Adipo / NP-PS



BM-MSC: Adipo / CTR



BM-MSC: CTR / CTR

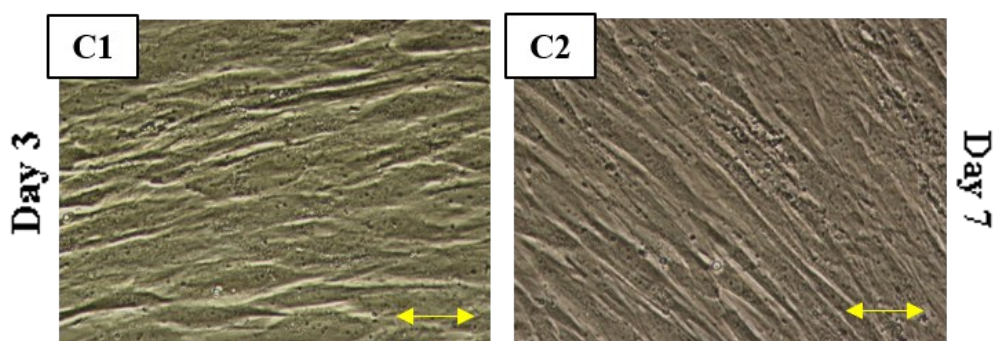


Fig. 31 Analisi morfologica in microscopia ottica (Nikon, Eclipse TS2) del differenziamento adipogenico di BM-MSC ed effetto delle nanoplastiche. Cellule trattate con nanoplastiche (Adipo / NP-PS) rispettivamente a 3 (A1/A1'), 5 (A2/A2') e 7 giorni (A3/A3') di differenziamento. Cellule differenziate in assenza di nanoplastiche (Adipo / CTR) a 3 (B1), 4 (B2), 5 (B3) e 7 giorni (B4) di differenziamento. Controllo negativo (CTR / CTR) analizzato al giorno 3 (C1) e 7 (C2) di coltura. Barra: 10 μm. Ingrandimento 20X.

Colorazione citochimica LipidTOX: analisi qualitativa della formazione di gocce lipidiche

L'analisi mediante microscopia confocale, eseguita dopo marcatura con LipidTOX, ha evidenziato che l'esposizione alle nanoplastiche è associata a una riduzione dell'efficienza del differenziamento adipogenico. Nelle cellule coltivate in presenza di nanoplastiche (Adipo / PS-NP; **Fig. 32 A**), le gocce lipidiche risultano infatti presenti solo in una quota limitata della popolazione cellulare (pari al 12%). Tuttavia, in alcune cellule si osservano gocce lipidiche di diametro maggiore, suggerendo l'avvio di un processo di maturazione adipogenica. Al contrario, nelle cellule differenziate in assenza di nanoplastiche (Adipo / CTR; **Fig. 32 B**), l'accumulo di gocce lipidiche è più esteso e omogeneo, con vacuoli lipidici di dimensioni maggiori, indicativi di un differenziamento adipogenico più avanzato. Come atteso, nei campioni di controllo non sottoposti a differenziamento (CTR / CTR; **Fig. 32 C**) non è stato rilevato alcun segnale positivo per LipidTOX, confermando l'assenza di accumulo lipidico e la specificità della marcatura.

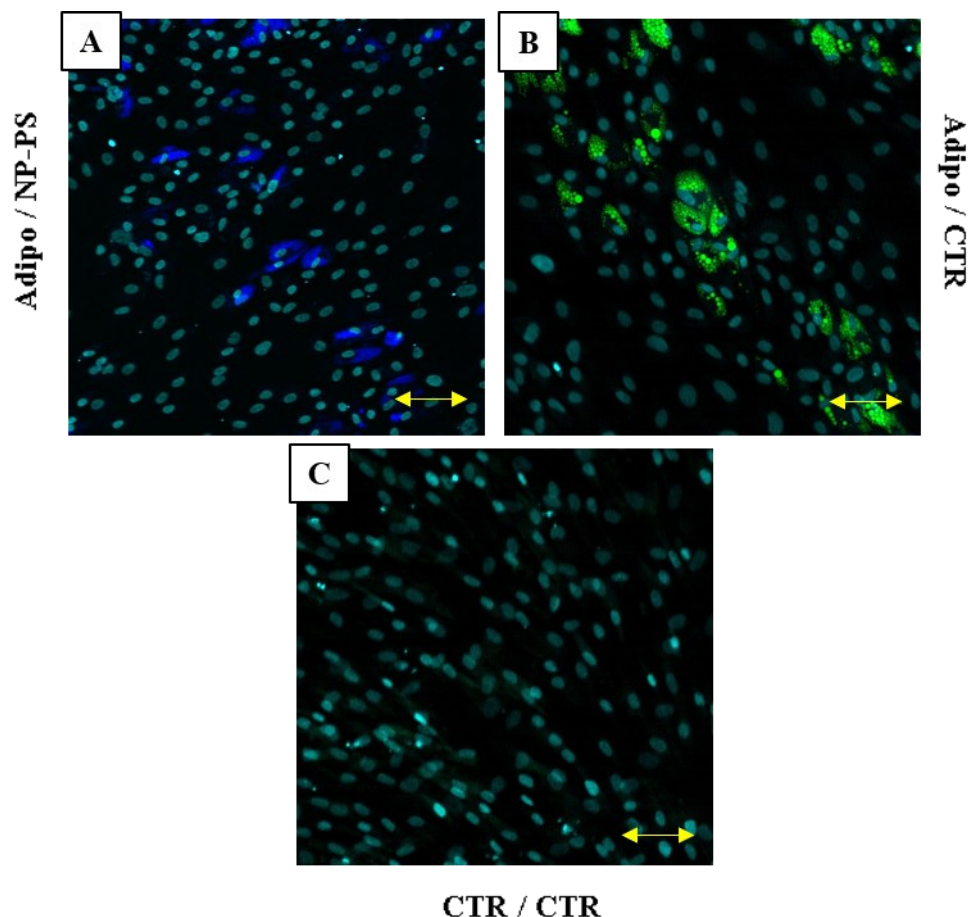


Fig. 32 Immagini al microscopio confocale Olympus Fluoview della colorazione citochimica HCS LipidTOX in BM-MSC. A: cellule in differenziamento adipogenico in coltura con nanoplastiche. B: cellule differenziate in assenza di nanoplastiche. C: cellule di controllo cresciute in terreno standard. Barra: 10 μ m. Ingrandimento 20X.

Analisi comparativa del differenziamento adipogenico di FF-MSC e BM-MSC in coltura con nanoplastiche e in condizioni di controllo

A livello morfologico, le FF-MSC sottoposte a differenziamento hanno mostrato un'elevata eterogeneità fenotipica durante l'intero periodo di coltura (**Fig. 33 A e C**). All'interno di questa popolazione è stato infatti possibile distinguere diverse sottopopolazioni cellulari, comprendenti cellule con una forma simil-epiteliale, altre con una forma peculiare simile ad una "ragnatela", estesa e ramificata, quest'ultima individuabile specificamente nelle cellule esposte a nanoplastiche (**Fig. 33 A**). Al

contrario, le BM-MSC si sono differenziate in modo più lineare mostrando una progressiva acquisizione della tipica morfologia sferica tipica delle cellule adipose (**Fig. 33 B e D**).

L'osservazione macroscopica in campo chiaro non ha permesso di discriminare in modo netto la formazione di gocce lipidiche nelle FF-MSC differenziate (**Fig. 33 A e C**), diversamente da quanto osservato nelle BM-MSC, nelle quali gli accumuli lipidici risultano facilmente individuabili, soprattutto nel controllo (**Fig. 33 D**). Inoltre, in entrambe le popolazioni cellulari, l'esposizione alle nanoplastiche appare associata a un rallentamento del processo differenziativo, come suggerito dal minor numero di cellule che acquisiscono il fenotipo adipogenico rispetto ai rispettivi controlli. In entrambi i casi il processo differenziativo sembra essere rallentato nelle cellule in coltura con nanoplastiche, dove sono individuabili un minor numero di cellule differenziate (**Fig. 33 A e B**).

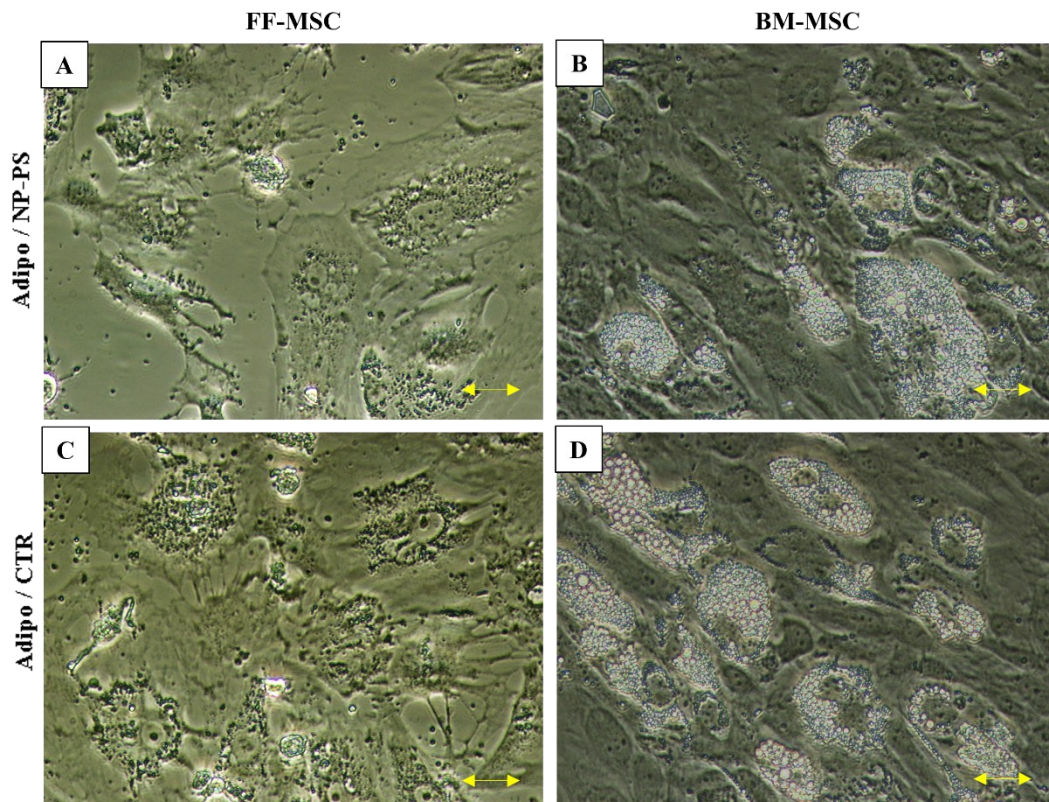


Fig. 33 Immagini comparative al microscopio ottico (Nikon, Eclipse TS2) del differenziamento adipogenico di FF-MSC e BM-MSC in coltura con nanoplastiche (A e B) e in condizioni di controllo (C e D). Barra: 10 μ m. Ingrandimento 20X.

L'analisi al microscopio confocale permette di apprezzare in modo evidente un profilo di differenziamento divergente: sia nelle cellule esposte a nanoplastiche sia nei controlli, le FF-MSC mostrano la formazione di gocce lipidiche di dimensioni nettamente inferiori (**Fig. 34 A e C**) rispetto a quelle riscontrate nelle BM-MSC (**Fig. 34 B e D**).

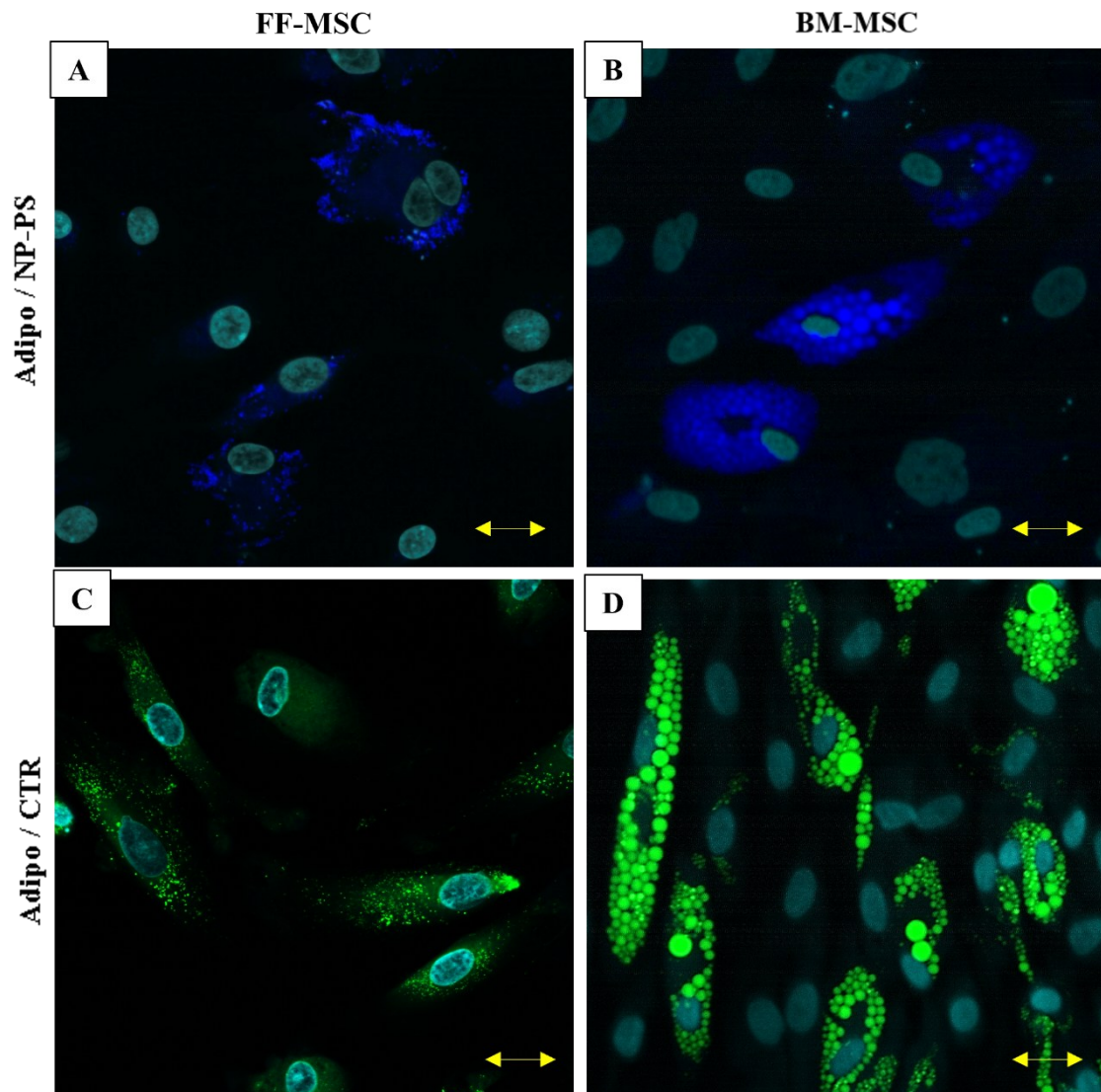


Fig. 34 Immagini comparative al confocale dell'analisi LipidTOX di FF-MSC e BM-MSC in coltura con nanoplastiche (A e B) e in condizioni di controllo (C e D). Barra: 10 μ m. Ingrandimento 60X.

DISCUSSIONE

La prima fase di questo lavoro di tesi sperimentale si è focalizzata sulla valutazione di eventuali alterazioni morfologiche indotte dalle micro- e nanoplastiche addizionate al terreno di coltura di cellule staminali mesenchimali, isolate da fluido follicolare e da midollo osseo.

La concentrazione di micro- e nanoplastiche di polistirene impiegata nel presente studio (100 µg/ml) è stata selezionata in accordo con la letteratura scientifica, che identifica tale dosaggio come ottimale per valutare gli effetti tossicologici su modelli cellulari *in vitro* [70]. L'osservazione preliminare in microscopia ottica (**Fig. 15, Fig. 17 e Fig. 20**) ha mostrato, soprattutto nelle FF-MSC coltivate in presenza di micro- e nanoplastiche, la presenza di un citoplasma molto granulare.

Al fine di caratterizzare in modo più specifico la presenza e la localizzazione delle plastiche, è stata condotta un'analisi in microscopia confocale sfruttando la fluorescenza intrinseca delle plastiche di polistirene. Le immagini hanno confermato l'accumulo delle microplastiche a livello della superficie cellulare (**Fig. 16**), dove appaiono sotto forma di corpi puntiformi discreti e agglomerati di grosse dimensioni. Al contrario, le nanoplastiche in FF-MSC e BM-MSC (**Fig. 18 e Fig. 21**), più difficili da osservare per via della loro dimensione, sono state riscontrate a livello citoplasmatico sebbene presenti in agglomerati caratterizzate da forme non sempre sferiche.

L'assunzione di questi profili geometricamente irregolari da parte di plastiche originariamente sferiche rappresenta un riscontro inedito di cui non si dispone ancora di una chiara spiegazione scientifica. Tuttavia, questa tendenza a formare aggregati può essere spiegata dalla teoria di *Derjaguin-Landau-Verwey-Overbeek* (DLVO), secondo cui la stabilità colloidale delle particelle è regolata dall'equilibrio tra le forze attrattive e forze repulsive. All'interno del terreno di coltura cellulare, la forza ionica generata dalla presenza di sali disciolti agisce neutralizzando le cariche elettriche negative presenti sulla superficie delle plastiche di polistirene, annullando le forze repulsive. Per cui, venendo meno lo scudo elettrostatico, le forze attrattive di *Van der Waals* e l'effetto idrofobico intrinseco del polistirene modificano l'equilibrio e promuovono

l'aggregazione istantanea e irreversibile delle plastiche sferiche, bloccandole in posizioni rigide e spigolose [71] (**Fig. 35**).

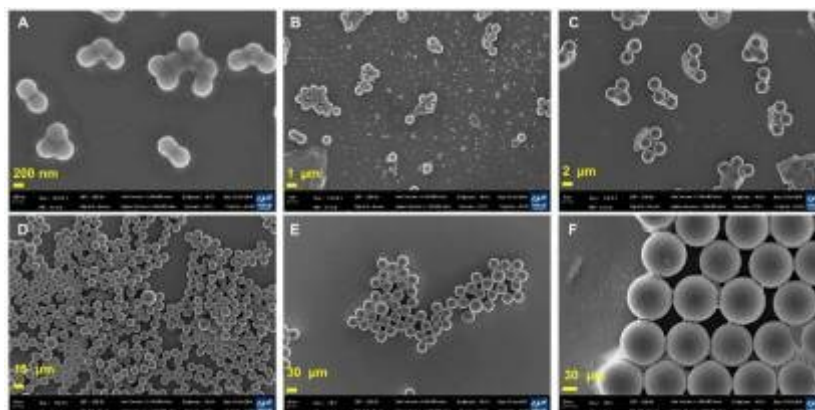


Fig. 35 Immagine che raffigura il potenziale meccanismo di aggregazione delle plastiche di polistirene a seguito di uno squilibrio tra forze attrattive e repulsive. Immagine adattata da Hwang et al. [71].

L'analisi della cinetica di internalizzazione delle nanoplastiche in cellule staminali mesenchimali (**Fig. 19**) ha permesso di individuare una prima fase di latenza, e una successiva fase tardiva di internalizzazione attiva.

Nello specifico, a 5 e 10 ore dall'aggiunta di nanoplastiche al terreno di coltura (**Fig. 19 A e B**), si riscontra un'elevata visibilità della fluorescenza intrinseca delle nanoplastiche, distribuite sulla superficie citoplasmatica.

A partire dalle 24 ore (**Fig. 19 C**) si osserva una progressiva e significativa riduzione della visibilità complessiva del segnale fluorescente che tende a scomparire alle 48 ore (**Fig. 19 D**). Questi dati suggeriscono un'effettiva internalizzazione dalla superficie cellulare verso i compartimenti intracellulari. La ridotta visibilità delle nanoplastiche nelle ore successive alle prime 10 ore è parzialmente riconducibile ad una perdita di segnale fluorescente, tipico del *photobleaching*. Infine, le alterazioni della struttura cito/nucleare, riscontrate soprattutto nelle fasi tardive dell'esposizione, suggeriscono che la presenza di nanoplastiche causi una graduale redistribuzione interna e una progressiva compromissione dell'architettura cellulare.

Per valutare il possibile coinvolgimento della clatrina nell'internalizzazione delle particelle di polistirene (**Fig. 24**), è stata eseguita un'analisi di immunofluorescenza nelle cellule staminali mesenchimali esposte a micro- e nanoplastiche. In tutte le condizioni sperimentali il segnale della clatrina è risultato essere presente in una regione ben definita del citoplasma. Sulla base di questa localizzazione, è stata inizialmente ipotizzata un'associazione con il reticolo endoplasmatico o con l'apparato di Golgi. Per identificare con maggiore precisione il compartimento intracellulare corrispondente, è stata valutata la potenziale co-localizzazione della clatrina con la calnexina, una proteina di membrana utilizzata come marcatore del reticolo endoplasmatico. L'analisi ha evidenziato pattern di distribuzione chiaramente distinti tra i due segnali fluorescenti: la clatrina risulta confinata ad una regione circoscritta e unilaterale rispetto al nucleo, mentre la calnexina si è distribuita in modo diffuso e reticolare attorno al perimetro nucleare (**Fig. 25**). L'assenza di una sovrapposizione apprezzabile tra i due segnali esclude una significativa co-localizzazione tra clatrina e calnexina, suggerendo che il compartimento in cui si concentra la clatrina non corrisponda al reticolo endoplasmatico. Tale osservazione ha indirizzato le successive indagini verso altri compartimenti coinvolti nel traffico vescicolare, in particolare l'apparato di Golgi. Successivamente, è stata verificata la localizzazione dell'apparato del Golgi tramite l'impiego del suo specifico marcatore CellLight; il segnale fluorescente è risultato piuttosto debole, visibilmente presente solo in una ridotta frazione cellulare (**Fig. 26 A**). Questo risultato può essere attribuito ad un'intrinseca asincronia replicativa delle cellule in coltura; infatti, l'apparato del Golgi è un organello estremamente dinamico, che subisce diversi rimodellamenti strutturali: solo le cellule che si trovano in una precisa fase metabolica e presentano una struttura del Golgi completamente sviluppata e compatta mostrano una marcata positività per il suo marcatore. Mediante immunofluorescenza è stata valutata la distribuzione della clatrina in cellule staminali mesenchimali in assenza di nanoplastiche di polistirene e la sua interazione con il marcatore CellLight; la clatrina anche in condizioni basali, ossia senza l'aggiunta di plastiche, è visualizzabile in una zona specifica riconducibile al Golgi, come la co-localizzazione con CellLight mostra (**Fig. 26 C**). La marcata localizzazione della clatrina a livello del Golgi suggerisce che la proteina sia attivamente coinvolta nel traffico intracellulare post-endocitico. Si può pertanto ipotizzare che l'internalizzazione

avvenga tramite endocitosi clatrina-mediata, sebbene la rapidità intrinseca di questo processo cinetico non abbia permesso di apprezzare l'evento di transito attraverso la membrana plasmatica. È infatti noto che l'intero ciclo endocitico, il quale comprende le fasi di nucleazione, curvatura della membrana, formazione della vescicola, scissione e infine decapsidazione, è estremamente rapido [73]. A questo proposito, è possibile supporre un meccanismo di *shuttling* funzionale dipendente dallo stimolo: la clatrina, dopo aver guidato l'endocitosi delle nanoplastiche, subirebbe una traslocazione retrograda verso il compartimento peri-nucleare insieme al proprio carico. Una volta raggiunto l'apparato del Golgi, la proteina cambierebbe la propria funzione biologica, intervenendo nello smistamento di componenti molecolari e recettoriali disregolati dall'esposizione alle nanoplastiche, reindirizzandoli verso i compartimenti *target*, quali i lisosomi per la degradazione o gli endosomi e la membrana plasmatica per il riciclo cellulare. Questa interpretazione, sebbene preliminare, pone le basi per ulteriori indagini sperimentali, quali studi di *live-cell imaging* in *time-lapse*, necessari per confermare l'effettivo processo di internalizzazione clatrina-mediata.

L'accumulo basale di clatrina a livello del Golgi può essere spiegato dalla sua specifica funzione biologica all'interno di questo compartimento. È infatti noto in letteratura [74] che, a seguito della frammentazione dell'apparato del Golgi che si verifica fisiologicamente durante la mitosi, l'organello disassemblato si organizza in un insieme di vescicole distribuite casualmente nel citoplasma. Durante le successive fasi di riassettaggio, la clatrina si posiziona sui bordi esterni delle cisterne in via di formazione e qui svolge un ruolo cruciale: si occupa del modellamento dei margini dell'organello e rimuove, tramite gemmazione, le molecole di carico smistate in modo errato [75] (**Fig. 36**).

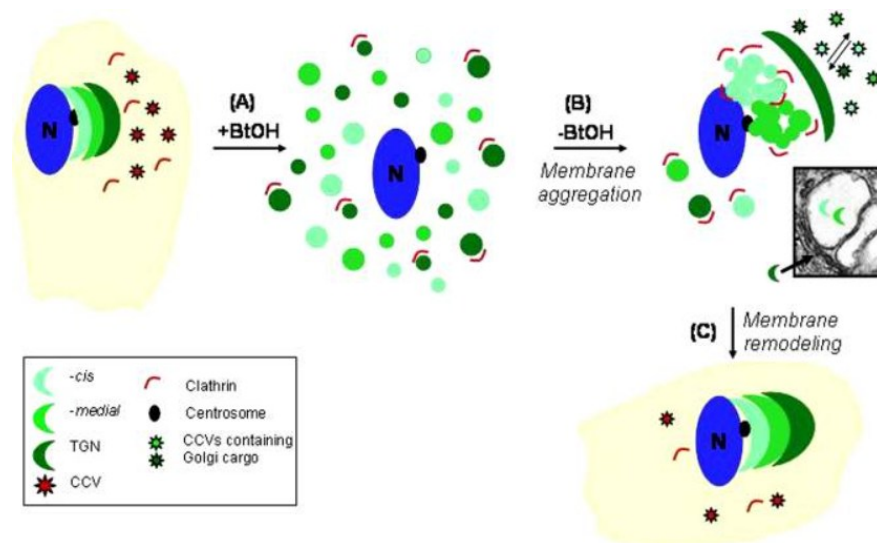


Fig. 36 Immagine che raffigura il modello sperimentale per la riformazione del Golgi. In A è stato utilizzato 1-BtOH per mimare la frammentazione dell'apparato del Golgi. In B sono mostrate le proteine che regolano lo smistamento differenziale delle componenti del Golgi, come CLTC, TGN e il complesso SNARE. In C è mostrato il meccanismo di rimodellamento e riassettaggio delle cisterne. Immagine adattata da Radulescu et al. [75].

La valutazione della produzione di ROS (**Fig. 27**) e la correlata analisi dell'attività apoptotica individuata da Annexin V (**Fig. 28**) ha dato esito negativo. Tale risultato è stato riscontrato sia nelle FF-MSC sia nelle BM-MSC, senza significative differenze tra i campioni trattati ed i rispettivi controlli, sebbene le cellule apparissero decisamente sofferenti, in particolar modo quelle isolate da fluido follicolare.

Una possibile spiegazione a questa contraddittorietà tra esiti negativi ROS e Annexin V e l'evidente sofferenza cellulare può derivare dalle caratteristiche intrinseche delle nanoplastiche di polistirene: in letteratura è riportato che in cellule della granulosa esse inducono tossicità ovarica mediante il rimodellamento fisico del citoscheletro, in particolare della F-actina, distruggendo le membrane lisosomiali [72]. Tale fenomeno prende il nome di apoptosi indotta da stress meccanico, ossia da un'alterazione di tipo fisico e non chimico causata dall'ingombro dalle plastiche.

Per cui le nanoplastiche sono in grado di attivare i pathway apoptotici senza la necessità di produrre radicali liberi, convalidando la negatività riscontrata con la sonda ROS e Annexin V [74].

Il differenziamento adipogenico delle FF-MSC ha evidenziato un esito sperimentale particolarmente interessante dal punto di vista morfologico. L'osservazione al microscopio ottico ha infatti mostrato, già nelle fasi iniziali del processo differenziativo, la coesistenza di popolazioni cellulari eterogenee, comprendenti cellule fusiformi con morfologia mesenchimale, cellule tondeggianti con citoplasma ridotto e aspetto simil-epiteliale e, infine, una popolazione caratterizzata da una morfologia peculiare, costituita da un corpo cellulare centrale tondeggiante da cui si dipartono numerosi prolungamenti sottili e ramificati, conferendo alla cellula un caratteristico aspetto "a ragnatela" (**Fig. 29**). Questo fenotipo, apparentemente non descritto in precedenza, è risultato significativamente più frequente nelle colture differenziate in presenza di nanoplastiche rispetto ai controlli sottoposti al solo differenziamento adipogenico.

Diversamente, il differenziamento adipogenico delle BM-MSC ha mostrato un profilo morfologico più canonico, caratterizzato dalla progressiva formazione di gocce lipidiche intracellulari (**Fig. 31**). Nei campioni di controllo, le gocce lipidiche hanno mostrato un graduale aumento delle dimensioni nel corso della differenziazione, mentre l'esposizione alle nanoplastiche ha determinato una riduzione sia del numero sia delle dimensioni delle gocce lipidiche, suggerendo una possibile interferenza delle nanoplastiche di polistirene con il normale processo di differenziamento adipogenico.

Le differenze osservate tra le due popolazioni cellulari potrebbero riflettere le peculiari caratteristiche biologiche delle FF-MSC. È plausibile, infatti, che la progressiva internalizzazione delle nanoplastiche e la loro interazione con i segnali biochimici presenti nel terreno di differenziamento adipogenico favoriscano una riorganizzazione del citoscheletro, responsabile dell'insorgenza del caratteristico fenotipo "a ragnatela" e di una modulazione della risposta differenziativa. Tuttavia, tale ipotesi richiede ulteriori approfondimenti sperimentali e analisi molecolari per chiarire i meccanismi biochimici coinvolti.

L'analisi mediante microscopia confocale, effettuata dopo colorazione con HCS LipidTOX, ha confermato quanto osservato all'analisi morfologica. Sia nelle FF-MSC (**Fig. 30**) sia nelle BM-MSC (**Fig. 32**) esposte alle nanoplastiche, le gocce lipidiche sono risultate significativamente inferiori per numero e dimensioni rispetto ai rispettivi controlli differenziati. Questi risultati supportano l'ipotesi che le nanoplastiche di polistirene interferiscano con il fisiologico processo di adipogenesi, compromettendo l'accumulo intracellulare di lipidi.

Un possibile meccanismo alla base di questo fenomeno potrebbe essere correlato alle proprietà elettrochimiche delle nanoplastiche utilizzate. Le PS-NP carbossilate (PS-NP-COOH) presentano infatti una carica superficiale netta negativa; poiché anche la superficie delle gocce lipidiche è caratterizzata da una carica negativa, la repulsione elettrostatica tra le due strutture potrebbe favorire l'accumulo delle nanoplastiche nel citosol in prossimità delle gocce lipidiche. Tale accumulo potrebbe esercitare un effetto di barriera sterica, ostacolando l'accesso ai trasportatori e ai recettori di membrana coinvolti nell'*uptake* degli acidi grassi liberi e riducendo, di conseguenza, la sintesi dei trigliceridi e la fisiologica formazione delle gocce lipidiche durante il differenziamento adipogenico [76].

Per concludere, tutte le analisi condotte hanno evidenziato come le FF-MSC costituiscano una popolazione cellulare peculiare e altamente eterogenea. Le loro capacità proliferative, di espansione in coltura e di differenziamento risultano infatti influenzate da molteplici fattori, tra cui le modalità di isolamento dopo il prelievo ovocitario, la composizione del fluido follicolare e, più in generale, le caratteristiche cliniche e lo stato di salute della paziente da cui derivano. Tale eterogeneità rappresenta un elemento da considerare nell'interpretazione dei risultati e sottolinea la necessità di ulteriori studi volti a identificare i principali fattori biologici responsabili della variabilità osservata. Nonostante ciò, il fluido follicolare rappresenta un materiale di scarto biologico ideale come fonte alternativa per l'isolamento di MSC, il cui impiego risulta tuttavia circoscritto se confrontato con il *gold standard* rappresentato dal midollo osseo.

CONCLUSIONE

Il presente lavoro di tesi ha approfondito gli effetti biologici delle micro- e nanoplastiche di polistirene su due popolazioni di cellule staminali mesenchimali, isolate rispettivamente da fluido follicolare e da midollo osseo, con l'obiettivo di valutarne l'interazione con le cellule, il potenziale citotossico e l'influenza sui processi di differenziamento adipogenico.

I risultati ottenuti hanno evidenziato che le microplastiche, a causa delle loro maggiori dimensioni, non vengono internalizzate dalle cellule, mentre le nanoplastiche sono in grado di penetrare nel compartimento intracellulare entro le prime 24–48 ore di esposizione. Le analisi di immunofluorescenza suggeriscono che il meccanismo di internalizzazione possa essere mediato dalla clatrina, sebbene tale ipotesi richieda ulteriori conferme sperimentali. La localizzazione della clatrina in prossimità dell'apparato di Golgi apre inoltre interessanti prospettive sul possibile coinvolgimento di questa proteina non solo nei processi endocitici, ma anche nelle successive fasi del traffico vescicolare intracellulare, potenzialmente alterate dall'esposizione alle nanoplastiche.

La valutazione dei principali meccanismi di citotossicità, mediante analisi della produzione ROS e saggio di apoptosi con Annexin V, non ha evidenziato differenze significative rispetto ai controlli. Questi risultati indicano che, nelle condizioni sperimentali adottate, le nanoplastiche di polistirene non inducono un marcato stress ossidativo né l'attivazione precoce dei principali *pathway* apoptotici. Tuttavia, tali evidenze non escludono la presenza di alterazioni più sottili a livello molecolare, metabolico o funzionale, che richiederanno ulteriori approfondimenti.

L'analisi del differenziamento adipogenico ha invece evidenziato effetti biologici più marcati. Nelle FF-MSC è stata osservata la comparsa di un peculiare fenotipo morfologico "a ragnatela", risultato significativamente più frequente nelle cellule esposte alle nanoplastiche rispetto ai controlli. Parallelamente, sia nelle FF-MSC sia nelle BM-MSC, la presenza delle nanoplastiche è risultata associata a una riduzione qualitativa del numero e delle dimensioni delle gocce lipidiche, suggerendo una possibile interferenza con il normale processo di adipogenesi. Nel complesso, i dati

ottenuti indicano che le FF-MSC mostrano una maggiore suscettibilità agli effetti delle nanoplastiche rispetto alle BM-MSC, probabilmente in relazione alle loro peculiari caratteristiche biologiche e funzionali.

Nel loro insieme, i risultati di questo studio contribuiscono ad ampliare le conoscenze sugli effetti delle nanoplastiche di polistirene sulle cellule staminali mesenchimali e pongono le basi per ulteriori studi volti a chiarire i meccanismi molecolari coinvolti nella risposta cellulare a questi contaminanti emergenti.

Le prospettive future della ricerca saranno orientate all'approfondimento dei meccanismi molecolari alla base delle alterazioni osservate, mediante l'analisi dell'espressione di geni e proteine coinvolti nei processi di differenziamento, infiammazione e rimodellamento cellulare, al fine di identificare eventuali *pathway* biologici disregolati dall'esposizione alle nanoplastiche. Inoltre, sfruttando il potenziale differenziativo delle FF-MSC e delle BM-MSC, saranno valutati anche i processi di differenziamento osteogenico e condrogenico, per verificare se gli effetti osservati sull'adipogenesi siano estendibili anche ad altre linee differenziali e per comprendere più approfonditamente l'impatto delle nanoplastiche sul destino cellulare delle cellule staminali mesenchimali.

BIBLIOGRAFIA

- [1] Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini F, Krause D, Deans R, Keating A, Prockop Dj, Horwitz E. *Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement.* Cytotherapy. 2006;8(4): p. 315-7.
- [2] Mobasheri A, Kalamegam G, Musumeci G, Batt ME. *Chondrocyte and mesenchymal stem cell-based therapies for cartilage repair in osteoarthritis and related orthopaedic conditions.* Maturitas. 2014 Jul;78(3): p.188-98.
- [3] Soncini M, Vertua E, Gibelli L, Zorzi F, Denegri M, Albertini A, Wengler GS, Parolini O. *Isolation and characterization of mesenchymal cells from human fetal membranes.* J Tissue Eng Regen Med. 2007 Jul-Aug;1(4): p. 296-305.
- [4] Battula VL, Trembl S, Abele H, Bühring HJ. *Prospective isolation and characterization of mesenchymal stem cells from human placenta using a frizzled-9-specific monoclonal antibody.* Differentiation. 2008 Apr;76(4): p. 326-36.
- [5] Yen BL, Huang HI, Chien CC, Jui HY, Ko BS, Yao M, Shun CT, Yen ML, Lee MC, Chen YC. *Isolation of multipotent cells from human term placenta.* Stem Cells. 2005;23(1): p. 3-9.
- [6] Zuk PA, Zhu M, Ashjian P, De Ugarte DA, Huang JI, Mizuno H, Alfonso ZC, Fraser JK, Benhaim P, Hedrick MH. *Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells.* Mol Biol Cell. 2002 Dec;13(12): p. 4279-95.
- [7] Rojewski MT, Weber BM, Schrezenmeier H. *Phenotypic Characterization of Mesenchymal Stem Cells from Various Tissues.* Transfus Med Hemother. 2008;35(3): p. 168-184.
- [8] Petrenko Y, Vackova I, Kekulova K, Chudickova M, Koci Z, Turnovcova K, Kupcova Skalnikova H, Vodicka P, Kubinova S. *A Comparative Analysis of Multipotent Mesenchymal Stromal Cells derived from Different Sources, with a Focus on Neuroregenerative Potential.* Sci Rep. 2020 Mar 9;10(1): p. 4290.

- [9] Chance TC, Rathbone CR, Kamucheka RM, Peltier GC, Cap AP, Bynum JA. *The effects of cell type and culture condition on the procoagulant activity of human mesenchymal stromal cell-derived extracellular vesicles*. J Trauma Acute Care Surg. 2019 Jul;87(1S Suppl 1): p. S74-S82.
- [10] Silachev DN, Goryunov KV, Shpilyuk MA, Beznoschenko OS, Morozova NY, Kraevaya EE, Popkov VA, Pevzner IB, Zorova LD, Evtushenko EA, Starodubtseva NL, Kononikhin AS, Bugrova AE, Evtushenko EG, Plotnikov EY, Zorov DB, Sukhikh GT. *Effect of MSCs and MSC-Derived Extracellular Vesicles on Human Blood Coagulation*. Cells. 2019 Mar 19;8(3): p. 258. doi:
- [11] Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD, Moorman MA, Simonetti DW, Craig S, Marshak DR. *Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells*. Science. 1999 Apr 2;284(5411): p. 143-7.
- [12] Chen X, Zheng J, Yin L, Li Y, Liu H. *Transplantation of three mesenchymal stem cells for knee osteoarthritis, which cell and type are more beneficial? a systematic review and network meta-analysis*. J Orthop Surg Res. 2024 Jun 20;19(1): p. 366.
- [13] Yi H, Hu M, Yuan L, Su X, Wu S, Li T, Wang S, Kang X, Liu Y, Liu Z, Qin Q, Yu W, Li Y, Qiu W, Cai W, Lu Z. *BM-MSC-derived migrasomes reverse stroke-induced thymic atrophy and immunosuppression via Pin1 delivery to thymic epithelial cells*. J Neuroinflammation. 2025 Nov 15;22(1): p. 271.
- [14] Khamis T, Abdelkhalek A, Abdellatif H, Dwidar N, Said A, Ahmed R, Wagdy K, Elgarhy R, Eltahan R, Mohamed H, Said Amer E, Hanna M, Ragab T, Kishk A, Wael J, Sarhan E, Saweres L, Reda M, Elkomy S, Mohamed A, Samy A, Khafaga A, Shaker Y, Yehia H, Alanazi A, Alassiri M, Tîrziu E, Bucur IM, Arisha AH. *BM-MSCs alleviate diabetic nephropathy in male rats by regulating ER stress, oxidative stress, inflammation, and apoptotic pathways*. Front Pharmacol. 2023 Nov 16;14: p.1265230. Erratum in: Front Pharmacol. 2024 May 13; 15:1 p. 394151.
- [15] Alapure BV, Lu Y, He M, Chu CC, Peng H, Muhale F, Brewerton YL, Bunnell B, Hong S. *Accelerate Healing of Severe Burn Wounds by Mouse Bone Marrow Mesenchymal Stem Cell-Seeded Biodegradable Hydrogel Scaffold Synthesized from*

Arginine-Based Poly(ester amide) and Chitosan. Stem Cells Dev. 2018 Dec 1;27(23): p. 1605-1620.

[16] Camia B, Monti M. *From Biological Waste to Therapeutic Resources: A Comprehensive Review of Stem Cell Sources, Characterization, and Biomedical Potentials*. Stem Cell Rev Rep. 2026 Jan;22(1): p. 5-25.

[17] Fortune JE. *Ovarian follicular growth and development in mammals*. Biol Reprod. 1994 Feb;50(2): p. 225-32.

[18] Mendoza C, Ruiz-Requena E, Ortega E, Cremades N, Martinez F, Bernabeu R, Greco E, Tesarik J. *Follicular fluid markers of oocyte developmental potential*. Hum Reprod. 2002 Apr;17(4): p.1017-22.

[19] Tesarik J, Mendoza C. *Direct non-genomic effects of follicular steroids on maturing human oocytes: oestrogen versus androgen antagonism*. Hum Reprod Update. 1997 Mar-Apr;3(2): p.95-100.

[20] Van Blerkom J, Antczak M, Schrader R. *The developmental potential of the human oocyte is related to the dissolved oxygen content of follicular fluid: association with vascular endothelial growth factor levels and perifollicular blood flow characteristics*. Hum Reprod. 1997 May;12(5): p.1047-55.

[21] Sabatini L, Wilson C, Lower A, Al-Shawaf T, Grudzinskas JG. *Superoxide dismutase activity in human follicular fluid after controlled ovarian hyperstimulation in women undergoing in vitro fertilization*. Fertil Steril. 1999 Dec;72(6): p.1027-3.

[22] de Resende LO, dos Reis RM, Ferriani RA, Vireque AA, Santana LF, de Sá Rosa e Silva AC, Martins Wde P. *Concentration of steroid hormones in the follicular fluid of mature and immature ovarian follicles of patients with polycystic ovary syndrome submitted to in vitro fertilization*. Rev Bras Ginecol Obstet. 2010 Sep;32(9): p.447-53.

[23] Carpintero NL, Suárez OA, Mangas CC, Varea CG, Rioja RG. *Follicular steroid hormones as markers of oocyte quality and oocyte development potential*. J Hum Reprod Sci. 2014 Jul;7(3): p. 187-93.

[24] Salehnia M, Zavareh S. *The effects of progesterone on oocyte maturation and embryo development*. Int J Fertil Steril. 2013 Jul;7(2): p. 74-81.

- [25] Qian Y, Tong Y, Zeng Y, Huang J, Liu K, Xie Y, Chen J, Gao M, Liu L, Zhao J, Hong Y, Nie X. *Integrated lipid metabolomics and proteomics analysis reveal the pathogenesis of polycystic ovary syndrome*. J Transl Med. 2024 Apr 17;22(1): p. 364.
- [26] Riva F, Omes C, Bassani R, Nappi RE, Mazzini G, Icaro Cornaglia A, Casasco A. *In-vitro culture system for mesenchymal progenitor cells derived from waste human ovarian follicular fluid*. Reprod Biomed Online. 2014 Oct;29(4): p.457-69.
- [27] Dimarino AM, Caplan AI, Bonfield TL. *Mesenchymal stem cells in tissue repair*. Front Immunol. 2013 Sep 4;4: p 201.
- [28] Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD, Moorman MA, Simonetti DW, Craig S, Marshak DR. *Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells*. Science. 1999 Apr 2;284(5411): p. 143-7.
- [29] Solchaga LA, Penick K, Porter JD, Goldberg VM, Caplan AI, Welter JF. *FGF-2 enhances the mitotic and chondrogenic potentials of human adult bone marrow-derived mesenchymal stem cells*. J Cell Physiol. 2005 May;203(2): p. 398-409.
- [30] Yang K, Luan YY, Wang S, Yan YS, Wang YP, Wu J, Sun YQ, Zhang J, Chen WQ, Xiang YL, Li ZL, Zhang DL, Yin CH. *SGMS1 facilitates osteogenic differentiation of MSCs and strengthens osteogenesis-angiogenesis coupling by modulating Cer/PP2A/Akt pathway*. iScience. 2024 Mar 5;27(4): p. 109358.
- [31] Laroye C, Gauthier M, Antonot H, Decot V, Reppel L, Bensoussan D. *Mesenchymal Stem/Stromal Cell Production Compliant with Good Manufacturing Practice: Comparison between Bone Marrow, the Gold Standard Adult Source, and Wharton's Jelly, an Extraembryonic Source*. J Clin Med. 2019 Dec 14;8(12): p. 2207.
- [32] Kobolak J, Dinnyes A, Memic A, Khademhosseini A, Mobasheri A. *Mesenchymal stem cells: Identification, phenotypic characterization, biological properties and potential for regenerative medicine through biomaterial micro-engineering of their niche*. Methods. 2016 Apr 15;99: p. 62-8.
- [33] Riordan NH, Ichim TE, Min WP, Wang H, Solano F, Lara F, Alfaro M, Rodriguez JP, Harman RJ, Patel AN, Murphy MP, Lee RR, Minev B. *Non-expanded adipose*

stromal vascular fraction cell therapy for multiple sclerosis. J Transl Med. 2009 Apr 24;7: p.29.

[34] Wittig O, Diaz-Solano D, Chacín T, Rodriguez Y, Ramos G, Acurero G, Leal F, Cardier JE. *Healing of deep dermal burns by allogeneic mesenchymal stromal cell transplantation*. Int J Dermatol. 2020 Aug;59(8): p. 941-950.

[35] Gerlach JC, Johnen C, Ottomann C, Bräutigam K, Plettig J, Belfekroun C, Münch S, Hartmann B. *Method for autologous single skin cell isolation for regenerative cell spray transplantation with non-cultured cells*. Int J Artif Organs. 2011 Mar;34(3):271-9. doi: 10.5301/ijao.2011.6508. Erratum in: Int J Artif Organs. 2014 Feb;37(2): p. 184.

[36] Arciniegas DB, Held K, Wagner P. *Cognitive Impairment Following Traumatic Brain Injury*. Curr Treat Options Neurol. 2002 Jan;4(1): p.43-57.

[37] Lee NK, Park SE, Kwon SJ, Shim S, Byeon Y, Kim JH, Na DL, Chang JW. *Agouti Related Peptide Secreted Via Human Mesenchymal Stem Cells Upregulates Proteasome Activity in an Alzheimer's Disease Model*. Sci Rep. 2017 Jan 4;7: p.39340.

[38] Hochane M, Trichet V, Pecqueur C, Avril P, Oliver L, Denis J, Brion R, Amiaud J, Pineau A, Naveilhan P, Heymann D, Vallette FM, Olivier C. *Low-Dose Pesticide Mixture Induces Senescence in Normal Mesenchymal Stem Cells (MSC) and Promotes Tumorigenic Phenotype in Premalignant MSC*. Stem Cells. 2017 Mar;35(3): p. 800-811.

[39] Leveque X, Hochane M, Geraldo F, Dumont S, Gratas C, Oliver L, Gaignier C, Trichet V, Layrolle P, Heymann D, Herault O, Vallette FM, Olivier C. *Low-Dose Pesticide Mixture Induces Accelerated Mesenchymal Stem Cell Aging In Vitro*. Stem Cells. 2019 Aug;37(8): p. 1083-1094.

[40] Uwazie CC, Pirlot BM, Faircloth TU, Patel M, Parr RN, Zastre HM, Hematti P, Moll G, Rajan D, Chinnadurai R. *Effects of Atrazine exposure on human bone marrow-derived mesenchymal stromal cells assessed by combinatorial assay matrix*. Front Immunol. 2023 Jul 31;14: p. 1214098.

[41] Chinnadurai R, Rajan D, Ng S, McCullough K, Arafat D, Waller EK, Anderson LJ, Gibson G, Galipeau J. *Immune dysfunctionality of replicative senescent mesenchymal stromal cells is corrected by IFN γ priming*. Blood Adv. 2017 Apr 25;1(11): p. 628-643.

- [42] Cui Z, Li J, Li C, Deng S, Liu W, Lei T, Cao J, Wang Z, Wang X, Ma S, Zhu Y, Yang H, Chen P. *Identifying the target, mechanism, and agonist of α -ketoglutaric acid in delaying mesenchymal stem cell senescence*. Cell Rep. 2025 Jul 22;44(7): p. 115917.
- [43] Camia B, Casasco A, Monti M. *Forever particles: histochemistry in the plasticene age*. Eur J Histochem. 2025 Jun 17;69(3): p. 4226.
- [44] Bastyans S, Jackson S, Fejer G. *Micro and nano-plastics, a threat to human health? Emerg Top Life Sci*. 2022 Dec 1;6(4): p. 411-422.
- [45] Meng J, Zhang L, Zhao S, Zhai Q, Zhang Q. *Micro- and nano-plastic contamination in foods and potential risk to human health*. Ecotoxicol Environ Saf. 2025 Sep 15;303: p. 119021.
- [46] Bora SS, Gogoi R, Sharma MR, Anshu, Borah MP, Deka P, Bora J, Naorem RS, Das J, Teli AB. *Microplastics and human health: unveiling the gut microbiome disruption and chronic disease risks*. Front Cell Infect Microbiol. 2024 Nov 25;14: p. 1492759.
- [47] Bhattacharyya S, Greer ML, Salehi M. *Impact of micro- and nanoplastics exposure on human health: focus on neurological effects from ingestion*. Front Public Health. 2025 Oct 31;13: p. 1681776.
- [48] Shan S, Zhang Y, Zhao H, Zeng T, Zhao X. *Polystyrene nanoplastics penetrate across the blood-brain barrier and induce activation of microglia in the brain of mice*. Chemosphere. 2022 Jul;298: p. 134261.
- [49] Paing YMM, Eom Y, Song GB, Kim B, Choi MG, Hong S, Lee SH. *Neurotoxic effects of polystyrene nanoplastics on memory and microglial activation: Insights from in vivo and in vitro studies*. Sci Total Environ. 2024 May 10;924: p. 171681.
- [50] Wieland S, Balmes A, Bender J, Kitzinger J, Meyer F, Ramsperger AF, Roeder F, Tengelmann C, Wimmer BH, Laforsch C, Kress H. *From properties to toxicity: Comparing microplastics to other airborne microparticles*. J Hazard Mater. 2022 Apr 15;428: p. 128151.

- [51] Han Z, Wang L, Li X, Dai Y, Guan X, Su Z, Li X, Wang X, Li T, Xu M. *Repeated inhalation exposure to polystyrene nanoplastics induced sustained pulmonary injury and fibrosis in mice*. *Ecotoxicol Environ Saf*. 2026 Mar 15;313: p. 120007.
- [52] Dong CD, Chen CW, Chen YC, Chen HH, Lee JS, Lin CH. *Polystyrene microplastic particles: In vitro pulmonary toxicity assessment*. *J Hazard Mater*. 2020 Mar 5;385: p. 121575.
- [53] Das A. *The emerging role of microplastics in systemic toxicity: Involvement of reactive oxygen species (ROS)*. *Sci Total Environ*. 2023 Oct 15;895: p. 165076.
- [54] Gehart H, Kumpf S, Ittner A, Ricci R. *MAPK signalling in cellular metabolism: stress or wellness?* *EMBO Rep*. 2010 Nov;11(11): p. 834-40.
- [55] Song X, Du L, Sima L, Zou D, Qiu X. *Effects of micro(nano)plastics on the reproductive system: A review*. *Chemosphere*. 2023 Sep;336: p. 139138.
- [56] Ragusa A, Svelato A, Santacroce C, Catalano P, Notarstefano V, Carnevali O, Papa F, Rongioletti MCA, Baiocco F, Draghi S, D'Amore E, Rinaldo D, Matta M, Giorgini E. *Plasticenta: First evidence of microplastics in human placenta*. *Environ Int*. 2021 Jan;146: p. 106274.
- [57] Montano L, Raimondo S, Piscopo M, Ricciardi M, Guglielmino A, Chamayou S, Gentile R, Gentile M, Rapisarda P, Oliveri Conti G, Ferrante M, Motta O. *First evidence of microplastics in human ovarian follicular fluid: An emerging threat to female fertility*. *Ecotoxicol Environ Saf*. 2025 Feb;291: p. 117868.
- [58] Liu T, Hou B, Wang Z, Yang Y. *Polystyrene microplastics induce mitochondrial damage in mouse GC-2 cells*. *Ecotoxicol Environ Saf*. 2022 Jun 1;237: p. 113520.
- [59] Zhao T, Shen L, Ye X, Bai G, Liao C, Chen Z, Peng T, Li X, Kang X, An G. *Prenatal and postnatal exposure to polystyrene microplastics induces testis developmental disorder and affects male fertility in mice*. *J Hazard Mater*. 2023 Mar 5;445: p. 130544.
- [60] Zhou M, Zhang M, Guo T, Zhao L, Guo X, Yin Z, Cheng L, Liu H, Zhao L, Li X, Li R. *Species origin of exogenous transcription factors affects the activation of*

endogenous pluripotency markers and signaling pathways of porcine induced pluripotent stem cells. Front Cell Dev Biol. 2023 Apr 21;11: p. 1196273.

[61] Lalonde-Larue A, Boyer A, Dos Santos EC, Boerboom D, Bernard DJ, Zamberlam G. *The Hippo Pathway Effectors YAP and TAZ Regulate LH Release by Pituitary Gonadotrope Cells in Mice*. Endocrinology. 2022 Jan 1;163(1): p. 238.

[62] Liu Z, Zhuan Q, Zhang L, Meng L, Fu X, Hou Y. *Polystyrene microplastics induced female reproductive toxicity in mice*. J Hazard Mater. 2022 Feb 15;424(Pt C): p. 127629.

[63] Wan S, Wang X, Chen W, Xu Z, Zhao J, Huang W, Wang M, Zhang H. *Polystyrene Nanoplastics Activate Autophagy and Suppress Trophoblast Cell Migration/Invasion and Migrasome Formation to Induce Miscarriage*. ACS Nano. 2024 Jan 30;18(4): p. 3733-3751.

[64] Liu L, Xu K, Zhang B, Ye Y, Zhang Q, Jiang W. *Cellular internalization and release of polystyrene microplastics and nanoplastics*. Sci Total Environ. 2021 Jul 20;779: p. 146523.

[65] Smith PJ, Giroud M, Wiggins HL, Gower F, Thorley JA, Stolpe B, Mazzolini J, Dyson RJ, Rappoport JZ. *Cellular entry of nanoparticles via serum sensitive clathrin-mediated endocytosis, and plasma membrane permeabilization*. Int J Nanomedicine. 2012;7: p. 2045-55.. Erratum in: Int J Nanomedicine. 2015 Jun 15;10: p. 3987.

[66] Ullah S, Ahmad S, Guo X, Ullah S, Ullah S, Nabi G, Wanghe K. *A review of the endocrine disrupting effects of micro and nano plastic and their associated chemicals in mammals*. Front Endocrinol (Lausanne). 2023 Jan 16;13: p. 1084236.

[67] Wu W, Wāng Y. *Network toxicology deciphers micro- and nanoplastics-mediated mixture hazard, predictive risk assessment, and regulatory translation*. Arch Toxicol. 2026 Jul 3.

[68] Li X, Hu S, Yu Z, He F, Zhao X, Liu R. *New Evidence for the Mechanisms of Nanoplastics Amplifying Cadmium Cytotoxicity: Trojan Horse Effect, Inflammatory Response, and Calcium Imbalance*. Environ Sci Technol. 2025 May 20;59(19): p. 9471-9485.

- [69] Perez-Sanchez E, Martínez A. *Interaction of nanoplastics with metronidazole and ciprofloxacin: The Trojan Horse effect*. PLoS One. 2025 Aug 20;20(8): p. 330708
- [70] Temerario L, Podda A, Bogliolo L, Mastrococco A, Ferrante MC, Pinto P, Dell'Aquila ME, Martino NA. *In vitro exposure to polystyrene microplastics exerts oocyte toxicity through cumulus cells damage in the sheep model*. Front Vet Sci. 2026 Mar 2;13: p 1771581.
- [71] Hwang J, Choi D, Han S, Jung SY, Choi J, Hong J. *Potential toxicity of polystyrene microplastic particles*. Sci Rep. 2020 Apr 30;10(1): p 7391.
- [72] Liu M, Wang S, Gao W, Zhang J, Zhang B, Rodgers RJ, Tian GG, Li X, Wu J. *Polystyrene nanoplastics disrupt ovarian development via cytoskeletal remodeling and epigenetic reprogramming particularly in granulosa cells*. J Hazard Mater. 2026 Mar 1;505: p 141467
- [73] Camia B, Longo M, Bergonzi A, Dezza I, Biggiogera M, Redi CA, Casasco A, Monti M. *The localization and function of the moonlighting protein Clathrin during oocyte maturation*. Dev Biol. 2025 Jan; 517: p 1-12.
- [74] Zhang Y, Hales BF, Robaire B. *Exposure to polystyrene nanoplastics induces lysosomal enlargement and lipid droplet accumulation in KGN human ovarian granulosa cells*. Arch Toxicol. 2025 Apr;99(4): p 1445-1454.
- [75] Radulescu AE, Siddhanta A, Shields D. *A role for clathrin in reassembly of the Golgi apparatus*. Mol Biol Cell. 2007 Jan;18(1): p 94-105.
- [76] Łazarski G, Rajtar N, Romek M, Jamróz D, Rawski M, Kepczynski M. *Interaction of Polystyrene Nanoplastic with Lipid Membranes*. J Phys Chem B. 2025 Apr 24;129(16): p 4110-4122.