

**UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI GENOVA**  
**SCUOLA DI SCIENZE MEDICHE E FARMACEUTICHE**



**DIPARTIMENTO DI SCIENZE DELLA SALUTE**

*XXXI Ciclo di Dottorato in:*  
**“Metodologie innovative applicate a malattie trasmissibili e  
cronico-degenerative: epidemiologia, statistica, prevenzione,  
management e nursing.**

*Curriculum:* **Prevenzione del cancro e delle malattie cronicodegenerative e biostatistica.”**

***Nanoparticelle paramagnetiche: vantaggi, rischi e  
prevenzione terziaria.***

Relatore:  
Prof. Alberto IZZOTTI

Dottoranda:  
Dr.ssa Bernardetta

LEDDA

Anno accademico 2018/2019

# INDICE

<b>1. INTRODUZIONE</b>	<b>1</b>
1.1 Biodistribuzione e localizzazione subcellulare delle nanoparticelle Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub>	4
1.2 Possibili effetti del Fe come fattore innescante stress ossidativo e cancerogenicità	7
1.3 Tumore alla Prostata	8
1.4 Terapia antitumorale e cardiotossicità	11
1.5 Nanoparticelle paramagnetiche come xenobiotici ambientali	13
1.6 Terapia oncologica a bersaglio molecolare	15
1.7 Tassolo	16
1.8 Obiettivi	19
<b>2. MATERIALI E METODI</b>	
2.1 Nanoparticelle di magnetite (Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> )	21
2.1.1 Scheda tecniche (Colorobbia s.r.l.)	21
2.2 Colture cellulari	24
2.2 Test di vitalità cellulare	26
2.2.1 Test ai Sali di Tetrazolio (MTT)	27
2.3.2 Colorazione vitale con Trypan blue	27
2.3.3 Test dell'efficienza clonale	29
2.3.4 Crystal Violetto	30
2.3.5 Reazione di Pearl's o reazione al Blu di Prussia	31

2.4	Quantificazione del Fe intracellulare	32
2.5	Microscopia a fluorescenza	33
2.6	Valutazione del danno genotossico tramite Comet Test	34
<b>3.</b>	<b>RISULTATI</b>	<b>36</b>
<b>4.</b>	<b>CONCLUSIONI</b>	<b>61</b>
<b>5.</b>	<b>BIBLIOGRAFIA</b>	<b>64</b>

## **2. *INTRODUZIONE***

I nanomateriali, aggregati di atomi con un diametro compreso tra 1 e 100 nm, possono essere dispersi nell'ambiente sotto forma di inquinanti generati da processi di combustione (come ad es. eruzioni vulcaniche, incendi, esplosioni, processi industriali) o come materiale di sintesi utilizzato in settori quali nanomedicina, costruzione di componenti elettroniche, automobili materiali da imballo. Le nanoparticelle sono costituite da sostanze inorganiche quali oro, argento, ossidi metallici (titanio e ferro) e semiconduttori (silicio e fosforo), quindi si tratta di sistemi differenti per dimensione e composizione. Il loro utilizzo è legato principalmente alle singolari caratteristiche chimico-fisiche e all'elevatissimo rapporto superficie/volume. Le loro dimensioni seguono leggi fisiche che si trovano tra la fisica quantistica (secondo cui acquisiscono comportamento ondulatorio e livelli energetici discreti e quantizzati) e quella classica che attribuisce uno spettro energetico continuo.

La nanomedicina interseca le conoscenze e la tecnologia delle nanoparticelle che possono essere utilizzate in campo medico e sanitario allo scopo di fornire nuove strategie di prevenzione, diagnosi e trattamento terapeutico. Evidenze scientifiche dimostrano che i nanomateriali per le loro singolari proprietà, hanno una elevata potenzialità in campi impegnati nella costruzione di impianti ortopedici, nello sviluppo di modelli per la crescita di tessuti *in vitro* e per sistemi diagnostici e di cura. Inoltre, le caratteristiche chimico-fisiche rendono questi materiali tessuto-specifici, tanto che, l'utilizzo delle nanoparticelle come carrier di farmaci o come marcatori diagnostici, trova un'ampia applicazione in ambito oncologico.

Per ottenere una efficace presenza in termini di accumulo di farmaco all'interno di una cellula bersaglio, il sistema di trasporto e di rilascio controllato deve superare una serie di barriere biologiche. Le nanostrutture, se adeguatamente progettate, possono rilasciare il farmaco nella cellula bersaglio solo in risposta ad un particolare stimolo, così da ridurre la tossicità, aumentare l'efficacia terapeutica o stimolare la riparazione dei tessuti danneggiati. Inoltre, l'applicazione clinica delle nanoparticelle può avere un duplice utilizzo, oltre a

permettere di veicolare e trasportare in modo controllato i farmaci, consente il trattamento in ipertermia, da impiegare principalmente nella lotta contro il cancro.

Le particelle funzionalizzate in modo da riconoscere solo le cellule malate, consentono il trattamento diretto, riducendo il danno a quelle vicine, sane. Ad esempio, grazie alle loro proprietà fototermiche le nanoparticelle metalliche possono essere usate nel trattamento ablativo laser dei tumori solidi o metastatici [Day ES et al, 2012; Hirsch LR et al, 2003]. Un esempio già in commercio è Magnablate, una nanoparticella di ossido di ferro stimolata per ablazione termica tramite campi magnetici. Questi terapeuti attaccano le cellule tumorali attraverso un meccanismo fisico, quindi, probabilmente possono creare un accoppiamento sinergico positivo con sostanze chimiche.

Negli ultimi anni la nanotecnologia si sta orientando verso la sintesi di etero-strutture nanocristalline quali il biossido di titanio ( $\text{TiO}_2$ ) e l'ossido di ferro ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ,  $\text{Fe}_2\text{O}_3$ ), che si combinano in un'unica particella formando ibridi con funzionalità multiple, legate alle proprietà chimico-fisiche caratteristiche di ciascuno dei componenti. D'altra parte, lo studio dell'efficacia e della sicurezza di questi materiali utilizzati in clinica e diagnostica prevedono non solo la scelta di una adeguata via di somministrazione, ma anche un opportuno sistema di imaging che consenta di ottenere una analisi diagnostica affidabile. In letteratura recenti studi riportano diversi sistemi utilizzati in ambiti preclinici e clinici. [Anselmo AC and Mitragotri S, 2016].

Malgrado le evidenze e gli indubbi risvolti positivi, è necessario intraprendere nuove ricerche che gettino luce sui bio-meccanismi, sugli effetti a lungo termine e sui potenziali comportamenti in organi e tessuti diversi. [Anselmo AC and Mitragotri S, 2015]. La nanomedicina mira a chiarire i meccanismi di bio-distribuzione e di attraversamento delle barriere biologiche considerando gli eventuali rapporti tra la struttura tridimensionale delle particelle somministrate e i meccanismi di trasporto delle cellule. Lo scopo ultimo è quello di veicolare e indirizzare le nano-strutture al sito bersaglio, quale ad esempio la massa

tumorale, per incrementare la biodisponibilità della terapia e minimizzare gli effetti collaterali che normalmente si sviluppano in seguito all'azione farmacologica in cellule o tessuti di organi sani.

Le nanoparticelle di ossido di ferro sono ampiamente usate come agenti di contrasto per l'imaging nelle analisi in risonanza magnetica di una grande varietà di tumori e patologie autoimmuni [Gupta AK and Gupta M, 2005; Wang Y et al, 2001; Na HB et al, 2009; Laurent S et al, 2008]. Tali applicazioni sono possibili grazie alle caratteristiche paramagnetiche innate delle nanoparticelle e alle piccole dimensioni che ne facilitano l'assorbimento, specie nelle cellule tumorali. Le caratteristiche chimico-fisiche di questi materiali permettono di ottenere immagini estremamente dettagliate circa la dimensione e la posizione della massa tumorale. Inoltre, la possibilità di legare alle nanoparticelle degli anticorpi permette di riconoscere selettivamente delle cellule target potenziando l'assorbimento e la specificità del trattamento. Recentemente è stato dimostrato che le particelle rivestite da PEG (PolyEthylenGlicole), risultano più efficienti in quanto riescono ad attraversare le barriere biologiche come ad esempio la barriera ematoencefalica [Mastorakos P et al, 2016; Suk JS et al, 2016; Tang BC et al, 2009].

Inoltre, preparati colloidali di ossidi di ferro, sono stati ampiamente utilizzati in terapie sostitutive del ferro per il trattamento dell'anemia sideropenica riducendo la tossicità associata alla somministrazione per via venosa del ferro libero [Macdougall IC, 2009; Danielson BG, 2004; Coyne DW et al, 2010; Schellekens H et al, 2014]. In letteratura vi sono numerose librerie di nanoparticelle che descrivono formulazioni, proprietà chimico-fisiche e potenziali campi di applicazione in clinica e in terapia.

Gli studi condotti al fine di dimostrare l'effettiva azione di queste formulazioni hanno riportato un diverso effetto di alcune di esse in linee tumorali diverse in termini di risposta al farmaco, per esempio il Paclitaxel [Anselmo AC and Mitragotri S, 2016; HrKach J et al 2012]. Nanoparticelle rivestite di PEG sono state coniugate ad antigeni di membrana e

farmaci pro-apototici, ad es. BIND Therapeutics e la piattaforma Accurin hanno scelto l'antigene di membrana tumorale prostatico specifico (PSMA) per il rilascio di Docetaxel, sfruttando per il trasporto del farmaco una nanoparticella di PEG-PLGA / PLA-PEG (BIND-014) [HrKach J et al, 2012].

Sulla scia di queste evidenze abbiamo deciso di legare le nostre nanoparticelle ad un farmaco antineoplastico molto utilizzato in clinica, il Paclitaxel, e ad un antigene di membrana specifico per la nostra linea tumorale, il PSMA. In questo modo abbiamo creato una piccola libreria di sostanze da testare su diverse linee tumorali che presentano una risposta maggiore o minore al Paclitaxel. Questo allo scopo di ottenere una applicazione ottimale del farmaco anche su cellule normalmente meno responsive.

### **1.1 Biodistribuzione e localizzazione subcellulare delle nanoparticelle Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>**

Le ridotte dimensioni delle nanoparticelle le rendono attualmente oggetto di studio per i potenziali effetti tossici derivanti dall'esposizione e dal conseguente accumulo in organi o tessuti. La tossicità potrebbe originarsi dalla capacità delle nanoparticelle di oltrepassare le membrane biologiche in funzione delle caratteristiche chimico-fisiche proprie, con successivo accumulo nel comparto citoplasmatico o nucleare [Guarnieri D et al, 2014]. La membrana cellulare ha uno spessore di 10 nm e potrebbe essere attraversata dalle nanoparticelle per diffusione semplice, raggiungendo i comparti interni tramite diffusione passiva o endocitosi [Guarnieri D et al, 2014; Trovato MC et al, 2018].

Studi sperimentali dimostrano che le N di dimensione inferiore a 10 nm diffondono passivamente nell'ambiente intracellulare [Mun AE et al, 2014]. La dispersione delle nanoparticelle è soggetta a movimento browniano, quindi la diffusione è legata al rapporto

tra gradiente di potenziale chimico e coefficiente di attrito della particella correlata al solvente [Katayama K et al, 2009].

La diffusione di nanoparticelle con diametro compreso tra 3 e 84 nm (ad es. cloruro di sodio e ossidi di ferro) è direttamente proporzionale alla temperatura dell'ambiente (Rudyaka VY et al, 2009). I meccanismi che regolano la diffusione delle nanoparticelle, sono stati studiati in diversi modelli *in vivo* e *in vitro* [Shang L et al, 2014; Jiang X et al, 2010]. Esperimenti eseguiti su cellule eritrocitarie, modello incapace di endocitosi, hanno confermato che le nanoparticelle sono internalizzate tramite un processo di diffusione passiva [Shang L et al, 2014] che non altera nè danneggia la struttura della membrana [Wang T et al, 2012]. Inoltre, studi sulla cinetica hanno dimostrato che il processo di internalizzazione si innesca solo quando viene superata una soglia critica di densità che prevede l'accumulo delle NP nell'interfaccia extracellulare della membrana biologica [Jiang X et al, 2010].

L'uso di proteine di fusione virali ha permesso di tracciare il trasporto trans-membrana delle NP dimostrando che i processi di internalizzazione dal comparto extracellulare a quello intracellulare permettono indirettamente il passaggio delle stesse [Kyrychenko A et al, 2014]. Le strutture cellulari in cui preferenzialmente le nanoparticelle si accumulano sono mitocondri e lisosomi [Fröhlich E, 2012; Moscatelli A et al, 2007].

La citotossicità delle N è strettamente correlata alle caratteristiche chimico-fisiche e alla loro dimensione [Jana NR, 2001; Bona KR, 2015]. Ad esempio, effetti non tossici si osservano per le nanoparticelle d'oro con dimensioni comprese tra 5 e 40 nm, tra 5 e 100 nm per l'argento e tra 1 e 100 nm per l'ossido di ferro [Jana NR, 2001; 23 Bona KR, 2015].

La capacità di diffondere passivamente nell'ambiente intracellulare fa sì che le N non richiedano un dispendio di energia per i meccanismi di internalizzazione o di digestione operato dai lisosomi. Inoltre, l'impossibilità di degradazione delle nano strutture nei singoli



elementi atomici scongiura la possibilità di effetti citotossici dei metalli che potrebbero gettare le basi per l'innescare di meccanismi patologici cellulari e tissutali [Guarnieri D et al, 2014]. Le N di Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> e Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> ad esempio, sono utilizzate nella risonanza magnetica (MRI) per il trattamento e la diagnosi del cancro e per i trattamenti di ipertermia magnetica in campo oncologico [Long NV et al, 2014; Long NV et al, 2015].

Nanoparticelle con dimensioni inferiori a 60 nm possono essere internalizzate tramite processi di pinocitosi, comune a tutte le cellule, e fagocitosi attuata solo da cellule specializzate come macrofagi, neutrofili e i monociti [Iversen TG et al, 2011].

La pinocitosi consiste in invaginazioni progressive della membrana cellulare, che danno origine a vescicole citoplasmatiche contenenti le nanoparticelle [Conner S et al, 2003] e rappresenta un processo più rapido rispetto all'endocitosi. Studi ultrastrutturali su polline di *Nicotiana tabacum L.* hanno evidenziato la presenza di carichi endocitici multipli di nanoparticelle d'oro [Serda RE et al, 2007] e rivelato siti di internalizzazione nella membrana plasmatica sub-apicale che riciclano le nanoparticelle tramite l'apparato del Golgi [Serda RE et al, 2007]. Questi risultati, tuttavia, non sono stati confermati nelle cellule tumorali prostatiche [Biswas S et al, 2014; Groves E et al, 2008].

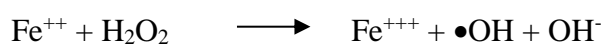
La fagocitosi permette l'entrata nel citoplasma delle grandi particelle di diametro superiore a 500 nm [Groves E et al, 2008], precedentemente riconosciute e legate alle immunoglobuline o dal complemento o dalle proteine del siero del sangue per costruire complessi proteici-N [Koua L et al, 2013]. In tutti i casi il legame con la superficie cellulare e l'interazione con il recettore determina l'invaginazione della membrana, la formazione di una vescicola che racchiude la N [Koua L et al, 2013], l'internalizzazione della stessa che si fonde con i lisosomi, originando così fagosomi di diametro pari a 0,5-10 µm [Aderem A and Underhill DM, 1999]. Il contenuto è distrutto per acidificazione e digestione enzimatica dei lisosomi secondo "l'effetto cavallo di Troia" potenziato dal lisosoma. Questo effetto è stato

verificato per diversi tipi di nanoparticelle, come quelle metalliche, gli ossidi di metallo e di semiconduttori [Sabella S et al, 2014].

## 1.2 Possibili effetti del Fe come fattore innescante stress ossidativo e cancerogenicità

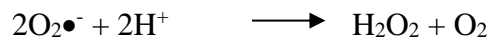
Esiste una stretta relazione tra capacità dei metalli di produrre ROS e RSN nei sistemi biologici e cancerogenicità [Valko et al. 2006; Leonard et al. 2004; Pekarkova et al. 2001; Halliwell et al. 1996]. Numerose indagini sull'uomo e sugli animali hanno evidenziato una significativa relazione diretta tra aumento della concentrazione di ferro nei comparti corporei e dell'incidenza delle patologie oncologiche, neurodegenerative e cardiovascolari [Berg et al. 2001; Siah et al. 2005]. La teoria più accreditata attribuisce la causa di tale correlazione all'aumento della produzione dei ROS conseguente ai danni subiti dalle macromolecole cellulari (lipidi e DNA).

Il ferro è un metallo di transizione, che può essere coinvolto, in quanto tale, nella classica reazione di Fenton e/o analoghe (reazioni Fenton-like), in cui passano ad uno stato di ossidazione maggiore usando come substrato l'acqua ossigenata (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>).



Quest'ultima è prodotta fisiologicamente durante la respirazione mitocondriale, dal metabolismo del Citocromo P450 e dei perossisomi [Inoue et al. 2003] e la sua ossidazione porta alla formazione di una molecola estremamente reattiva, il radicale •OH. A livello di entrambi i lati della membrana mitocondriale si produce anche l'anione superossido (anche detto ROS primario) ad opera di enzimi con specifica azione antiossidante: GSH (Glutatione), SOD (Super Ossido Dismutasi) e GPx (Glutatione Perossidasi). Di per se

questo anione non può ossidare le macromolecole, ma fornisce il substrato della SOD per la formazione del perossido di idrogeno (Desideri et al. 2003) secondo la reazione:



I ROS secondari a livello cellulare possono formarsi solo se sono disponibili metalli di transizione come il ferro [Valko et al. 2006], rilasciato in forma libera solo in caso di stress (Liochev SY et al. 2002) grazie all'azione di enzimi quali quelli della famiglia deidratasi-Liasi, che rende disponibile il Fe(II) per la reazione di Fenton [Leonard SS et al. 2004; Stohs SJ et al. 1995; Pekarkova I et al. 2001; Liochev SI et al. 2002].

Il radicale superossido è in grado di causare danni a livello genomico attaccando gli atomi di idrogeno più esterni del desossiribosio, quindi può agire su purine, pirimidine e glucidi, causando rotture al doppio e al singolo filamento e conseguentemente errori di replicazione, traduzione o trascrizione che possono portare alla cancerogenesi [Marnett et al. 2000; Cooke et al. 2003].

Gli organismi hanno sviluppato un sistema di difesa per neutralizzare queste specie altamente reattive e tossiche dell'ossigeno, che comprende enzimi quali SOD e Catalasi [Mates et al. 1999] e antiossidanti non enzimatici quali le vitamine C, E, i Carotenoidi, i Flavonoidi e gli antiossidanti tiolici come GSH.

### **1.3 Tumore alla Prostata**

Il Piano nazionale della prevenzione 2010-2012 diffuso dal Ministero della Salute del Dipartimento di Sanità Pubblica emanato in seguito al documento elaborato dall'Osservatorio Nazionale di Screening ha evidenziato come il tumore alla prostata rappresenti la neoplasia maschile più diffusa nei soggetti con età superiore ai 50 anni raggiungendo una prevalenza superiore al 50% nella classe di età compresa tra i 50 e i 60 anni. L'incremento dell'incidenza osservabile dal 2000 in poi può essere giustificata

dall'utilizzo della valutazione dell'antigene del PSA per la diagnosi precoce del tumore alla prostata. Lo studio concluse che non vi erano sufficienti evidenze per definire un programma di screening definitivo e che la valutazione del PSA creava sovra-diagnosi in quanto risulta incrementato anche in condizioni patologiche a eziologia non tumorale. I fattori di rischio connessi all'insorgenza del tumore prostatico potrebbero essere connessi all'età del soggetto, all'assetto ormonale del singolo, allo stile di vita, all'esposizione ad interferenti endocrini e ai determinanti genetici ereditati. La terapia di solito è mirata verso il recettore androgenico (AR) o al gene target per il controllo della crescita. Ad esempio, la terapia antiandrogenica impedisce alle cellule tumorali della prostata di assumere diidrotestosterone (DHT) necessario all'accrescimento e all'ulteriore sviluppo della neoplasia. Tuttavia la terapia ormonale di rado è curativa, perché il tumore di solito sviluppa resistenza nell'arco di uno o due anni a causa della perdita o mutazione del tumore o per lo sviluppo di una strategia di sopravvivenza adottata dal tumore stesso. La terapia ormonale è dunque di solito impiegata quando il tumore si è espanso oltre la prostata e può essere impiegata anche in alcuni pazienti sottoposti a radioterapia o chirurgia per prevenirne le recidive.

Recentemente il Prostate Specific Membrane Antigen (PSMA) rappresenta un interessante biomarker, poiché si tratta di una glicoproteina di membrana strettamente associata con gli adeno-carcinomi prostatici, specialmente quelli ad alto grado di differenziazione, associati a livelli fisiologici di PSA. L'associazione dei dosaggi dei due markers favorirebbe l'individuazione dei pazienti falsi-negativi nei confronti del dosaggio del PSA in quanto il PSMA viene espresso indipendentemente dalla regolazione del PSA.

Il PSMA, conosciuto anche come glutammato carbossipeptidasi II, N-acetil-L-glutammato peptidasi 1e N-acetilaspargilglutammato peptidasi, è una peptidase transmembrana di tipo II costituita da 750 amminoacidi, codificata dal gene folato idrolasi 1 (*folh1*). Il PSMA è normalmente presente in bassa quantità nelle cellule dell'epitelio prostatico, ma risulta progressivamente up-regolato durante la progressione della malattia,

correlandosi negativamente con la prognosi. Per questo risulta molto interessante in termini di diagnosi, localizzazione e trattamento della patologia. Attualmente il PSMA è sfruttato in clinica come target terapeutico (immunoscintigrafia). Il PSMA risulta legato strettamente all'angiogenesi grazie all'iniziale interazione con l'integrina  $\beta 1$ , coinvolta nel processo di adesione cellulare, anche se il ruolo effettivo di PSMA non è dimostrato.

Per comprendere come questo si verifici sono stati condotti inizialmente degli esperimenti *in vitro* e *in vivo* su topi knockout per *folh1*. In questo modo è stato possibile verificare che PSMA, interagendo con la struttura della proteina RACK1, interrompe il segnale della via Integrina  $\beta 1$  – Insulin-like Growth Factor Receptor-1 (IGF-1R) e conseguentemente il pathway della MAPK, inattivando così il pathway AKT [Caromile LA et al, 2017].

Recenti studi hanno dimostrato che il recettore PSMA, oltre che essere utilizzato come target terapeutico a cui indirizzare dei radionucleotidi, può essere usato per internalizzare potenziali molecole ad uso terapeutico. Infatti, studi condotti con anticorpi anti-PSMA hanno dimostrato che dopo il legame con il recettore questi possono essere internalizzati. Questo legame è stato verificato in cellule epiteliali, ma non in quelle basali o stromali. Uno studio condotto su 184 tumori ha dimostrato una correlazione tra l'espressione di PSMA e lo stadio del tumore, specie nelle fasi di neo-vascularizzazione associate alla crescita (cellule renali, transizionali della vescica, embrionali-testicolari, neuro-endocrine, colon, mammella). La quantità di PSMA espressa dal tessuto correla con i diversi stadi del tumore, determinando un incremento statisticamente significativo quando dal tessuto epiteliale benigno si passa ad un alto grado di neoplasia intra-epiteliale, a quello ad alto grado e infine a cellule maligne. Diversamente da quanto accade per il PSA, l'espressione del PSMA è inversamente proporzionale ai livelli di androgeni che si interfacciano con la singola cellula. Inoltre, studi condotti da Denmeade SR et al, 2003, suggeriscono che nelle cellule tumorali, di stadio avanzato, in cui si è perso il controllo della crescita androgenico vi è una maggiore

espressione di recettori per il PSMA. Ciò lo rende un ottimo target terapeutico in quei tumori che hanno perso il recettore ormonale e che quindi non dipendono più dagli androgeni [Chang SS, 2004].

In letteratura sono riportati molti dati riguardo il trattamento di diverse linee cellulari tumorali con nanoparticelle di ossidi di ferro e la produzione di specie reattive all'ossigeno, che provano la presenza di stress ossidativo e/o danno al DNA [Sato A et al, 2013]. In questo contesto risultano particolarmente utili i dati forniti dal Comet test alcalino, che permettono la valutazione e quantificazione del danno genomico conseguente a quello ossidativo.

#### **1.4 Terapia antitumorale e cardiotossicità**

L'incidenza delle patologie neoplastiche nell'ultimo secolo ha subito un incremento determinato fondamentalmente dall'aumento della vita media della popolazione generale. Questo ha determinato la necessità di nuove terapie antitumorali che, se da una parte determinano la guarigione o il rallentamento dello sviluppo della malattia, dall'altra causano innumerevoli effetti collaterali e tossici per l'intero organismo, come le cardiopatie. Le terapie chemioterapiche coinvolgono principalmente: antracicline (epirubicina e doxorubicina), tassani (docetaxel e paclitaxel), derivati del fluoro (5 fluorouracile e capecitabina), derivati del platino (cis-platino e carbo-platino), metotrexate, vinorelbina e gemcitabina, utilizzati singolarmente o in combinazione seguendo specifici protocolli.

I taxani come il Paclitaxel o Tassotere sono dei farmaci aritmogenici e cardiotossici con effetti cronotropici diretti sulle cellule del Purkinje e indiretti per rilascio di istamina mediato dal suo veicolante, il Cremophor EL (CrEL). Classicamente il Paclitaxel viene utilizzato in associazione con doxorubicina, ciclofosfamide, metotrexate e 5-fluorouracile. Clinicamente il Paclitaxel porta ad aritmie significative, in particolare: aritmie atriali e ventricolari,

fibrillazione e tachicardia ventricolare, blocco atrio-ventricolare secondo un meccanismo che passa attraverso il recettore dell'istamina. Le principali raccomandazioni si basano sul monitoraggio continuo, specie in pazienti con problematiche pregresse.

Il CrEL, adiuvante utilizzato per solubilizzare farmaci scarsamente idrosolubili, come i Taxani, presenta diversi effetti secondari quali: ipersensibilità anafilattoide, iperlipidemia, anomalie del pattern delle lipoproteine, aggregazione eritrocitaria, neuropatia periferica. In chemioterapia, inoltre, modifica il profilo di tossicità di alcuni agenti antitumorali somministrati in concomitanza, ma aventi meccanismi di interfaccia cinetica diversi [Gelderblom H et al, 2001].

Nel gruppo di farmaci utilizzati durante la terapia oncologica spesso si somministrano molecole che modulano l'angiogenesi per contenere lo sviluppo della massa tumorale. Queste sono principalmente farmaci di nuova generazione costituiti da anticorpi contro i recettori del VEGFR (Vascular Endothelial Growth Factor). Gli studi più recenti a riguardo indicano, però, che terapie mirate contro il VEGF sono associate ad ipertensione, cardiotossicità e tromboembolie [Vaklavas C et al, 2010] incrementando il numero di casi di cardiotossicità [Brana I. & Tabernero J., 2010].

La produzione di una nuova classe farmacologica, gli anticorpi monoclonali, ha permesso di sviluppare terapie che riconoscono specificamente recettori di membrana coinvolti in quei processi di innesco e controllo delle principali vie di segnale di crescita o morte delle cellule. Ad esempio, Trastuzumab è un anticorpo monoclonale che si lega all'Epidermal Growth Factor Receptor umano (EGFR2), in particolare su Her2, impedendo la trasduzione del segnale che comporta la crescita cellulare. In una meta-analisi del 2007 si dimostrò la sua efficacia nel trattamento del cancro alla mammella HER2+ in termini di diminuzione di mortalità e recidive [Onitilo AA *et al*, 2014]. Inoltre, il duplice potenziale di questa molecola nell'inibire i meccanismi di riparazione del danno ossidativo, supporta l'azione delle antracicline. Malgrado l'innegabile effetto positivo in termini di sopravvivenza e risposta

alla terapia oncologica, però, il farmaco risulta associato a cardiotossicità [Sendur MA *et al*, 2013] sia usato da solo, che in associazione a farmaci chemioterapici con un effetto sinergico degli stessi.

Un ulteriore esempio è rappresentato dal Ramucirumab, un altro farmaco di nuova generazione approvato nel 2014 impiegato nel trattamento del tumore gastro-esofageo, principalmente adenocarcinoma dello stomaco o gastro-esofageo. Il chemioterapico di elezione di questi due tumori è il Paclitaxel e la terapia biologica associata, Ramucirumab, il cui target è rappresentato dal VEGFR2 si traduce in un effetto cardiotossico sinergico. Malgrado l'entusiasmo iniziale legato all'uso dei farmaci di nuova generazione, le evidenze cliniche hanno sottolineato ancor di più che l'introduzione di farmaci direttamente al sito d'azione tramite carriers atossici a livello sistemico potrebbe essere una soluzione migliore in termini generali. Questa riflessione ha supportato ulteriormente l'intenzione di dimostrare la non tossicità del nostro carrier e verificare l'azione citotossica nel nostro modello di tumore prostatico.

## **1.5 Nanoparticelle paramagnetiche come xenobiotici ambientali**

Si definisce “xenobiotico” una sostanza estranea al metabolismo di un organismo vivente. In questa ampia definizione rientrano farmaci, tossine (derivanti da funghi e muffe), sostanze chimiche di origine sintetica o naturale, inquinanti atmosferici (particolato atmosferico e sottoprodotti di combustione, gas), derivati del petrolio (plastiche, idrocarburi aromatici, aromi e fragranze), additivi alimentari. L'assunzione degli xenobiotici può avvenire per ingestione, inalazione e contatto e gli effetti dell'esposizione variano da soggetto a soggetto a seconda della dose e del tempo di esposizione (intolleranza acquisita), della predisposizione genetica e dell'integrità del DNA (danni epigenetici pregressi).



Gli xenobiotici creano interferenze più o meno gravi a livello del metabolismo dell'organismo esposto creando mutazioni a livello genomico ex novo o peggiorando un danno pregresso.

La predisposizione genetica è legata principalmente ad un gruppo di geni, nello specifico: PON1, CYP2D6, NAT2, la famiglia della Glutathione transferasi (GSTM1, GSTT1, GSTP1), SOD e CAT. [Achraf Khedhaier et al, 2008; Faa P and Faa MV, 2016; Facciola G et al, <http://www.farmacovigilanza.org/corsi/facciola/all.htm>; Flockhart DA, 2007; Dr. Martin Pall [http://mcs-danmark.dk/home/sites/default/files/documents/pdf/277\\_N-MCSbrief.pdf](http://mcs-danmark.dk/home/sites/default/files/documents/pdf/277_N-MCSbrief.pdf); Chiara De Luca et al; 11. Gail McKeown-Eyssen et al, 2004; [www.genecards.org](http://www.genecards.org); 18. <http://www.malacards.org> ; 19. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov>].

I danni principali sono di tipo epigenetico (addotti al DNA) e danno ossidativo delle membrane cellulare, nucleare e mitocondriale. Le principali verifiche, quindi, sono legate alla ricerca di addotti e/o danno alle membrane tramite test di valutazione dello squilibrio delle membrane o test che rilevano l'accumulo nel tessuto adiposo degli xenobiotici liposolubili, o ancora test per quantificare la sofferenza dei linfociti. L'inattivazione dei processi di trascrizione dei geni soprariportati possono essere correlati con effetti patologici diretti al sistema nervoso centrale, infatti, sono documentate patologie di tipo psichiatrico associate a concentrazioni elevate di xenobiotici nel sangue.

Le nanoparticelle vengono disperse nell'ambiente sia in seguito ad attività geologica che antropologica e gli organismi viventi a loro volta ne sono esposti [Buzea C et al, 2007]. Infatti, in alcuni ecosistemi vi è un incremento dell'incidenza di malattie infiammatorie o tumorali correlabili ad esempio all'attività vulcanica o alla composizione mineralogica del sito [Buzea C et al, 2007; Horwell CJ, 2007; Rose WI and Durant AJ, 2009]. Durante le eruzioni vulcaniche vengono disperse nell'ambiente particelle solide con dimensioni inferiori o uguali a 2 µm, metalli pesanti come Pb, Hg, Cu, Zn e Cd e metalli di transizione superficiale come Fe<sup>2+</sup> [Horwell CJ, 2007].

## 1.6 Terapia oncologica a bersaglio molecolare

L'elevatissimo rapporto superficie-volume sommata alla possibilità di essere un vettore di molecole di vario genere, rende le nanoparticelle degli ottimi candidati in ambito di terapia e diagnosi. Particolare interesse hanno suscitato le nanoparticelle costituite da metalli preziosi come l'oro a causa della loro elevata inerzia che li rende altamente biocompatibili ma poco manipolabili. Inizialmente, per ovviare a questa caratteristica, le nanoparticelle di oro sono state coniugate a metalli più reattivi come la magnetite, ma successivamente gli ossidi di ferro si sono dimostrati molto utili anche da soli. Le nanoparticelle di ossidi di ferro e in particolare la magnetite ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ) rappresentano una buona alternativa nella diagnosi (imaging biomolecolare in risonanza magnetica e prelievo biopsia in casi di tumore alla prostata) e terapia in ambito oncologico (biocarrier per trasportare selettivamente all'interno delle cellule farmaci o altre molecole attive).

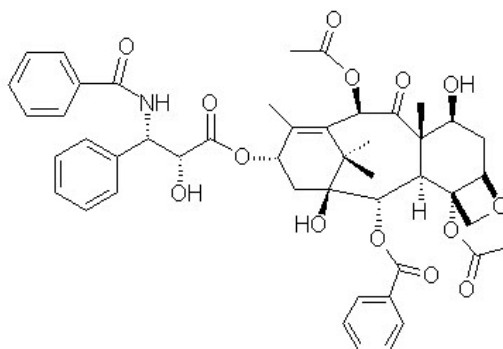
Una caratteristica di questi elementi è la possibilità di produrre calore se sottoposti a campo elettromagnetico alternato generando uno stato di ipertermia ( $42\text{-}46^\circ\text{C}$ ) all'interno delle cellule in cui sono presenti. L'incremento della temperatura così crea due effetti, da una parte rende il farmaco più attivo agendo sulla cinetica di reazione, dall'altra, l'elevata temperatura raggiunta dalla cellula può innescare, attraverso lo shock subito, le vie di trasduzione che portano all'attivazione del processo di apoptosi. Inoltre, le nanoparticelle di ferro, opportunamente rivestite da un polimero che ne agevola l'entrata nelle cellule (come ad esempio il PEG), possono essere opportunamente coniugate internamente a farmaci, che, in questo modo, possono essere veicolati direttamente al sito d'azione.

Gli aptameri sono oligonucleotidi a filamento singolo selezionati per la loro capacità di legarsi direttamente a proteine specifiche, più vantaggiosi rispetto agli anticorpi monoclonali

per la migliore penetrazione tissutale, facilità di modificazione *in vitro*, maggiore stabilità e minore probabilità di essere distrutti dalle difese immunitarie dell'ospite. In aggiunta abbiamo deciso di sperimentare un approccio ancora più specifico sfruttando l'azione di un aptamero specifico per l'antigene di superficie Prostate Specific Membrane Antigen (PSMA). Nel contesto di questo lavoro il nostro interesse si è focalizzato sul PSMA.

## 1.7 Tassolo

Il Tassolo è un farmaco chemioterapico sfruttato in clinica, inizialmente, per la terapia del tumore al seno e alle ovaie e, successivamente, nel trattamento di altri tumori, come quello al polmone, il carcinoma prostatico, quello gastrico avanzato e il Sarcoma di Kaposi. Commercializzato a partire dal 1993, è stato sfruttato nella terapia di più di 1.000.000 di pazienti.

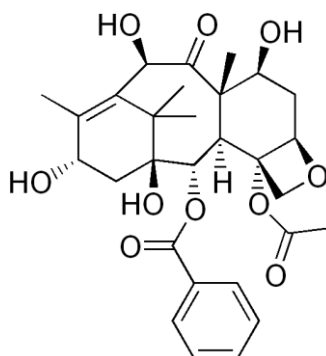


Paclitaxel

Paclitaxel rappresenta solo un membro dei tassani estratto dall'albero di Tasso, nella cui corteccia si localizzano diversi metaboliti e precursori biosintetici, quali cefalomannina, baccatina III e 10-deacetil baccatina III. Le baccatine sono molto interessanti dal punto di vista sintetico in quanto possono essere sfruttate come precursori nel processo di semi-sintesi

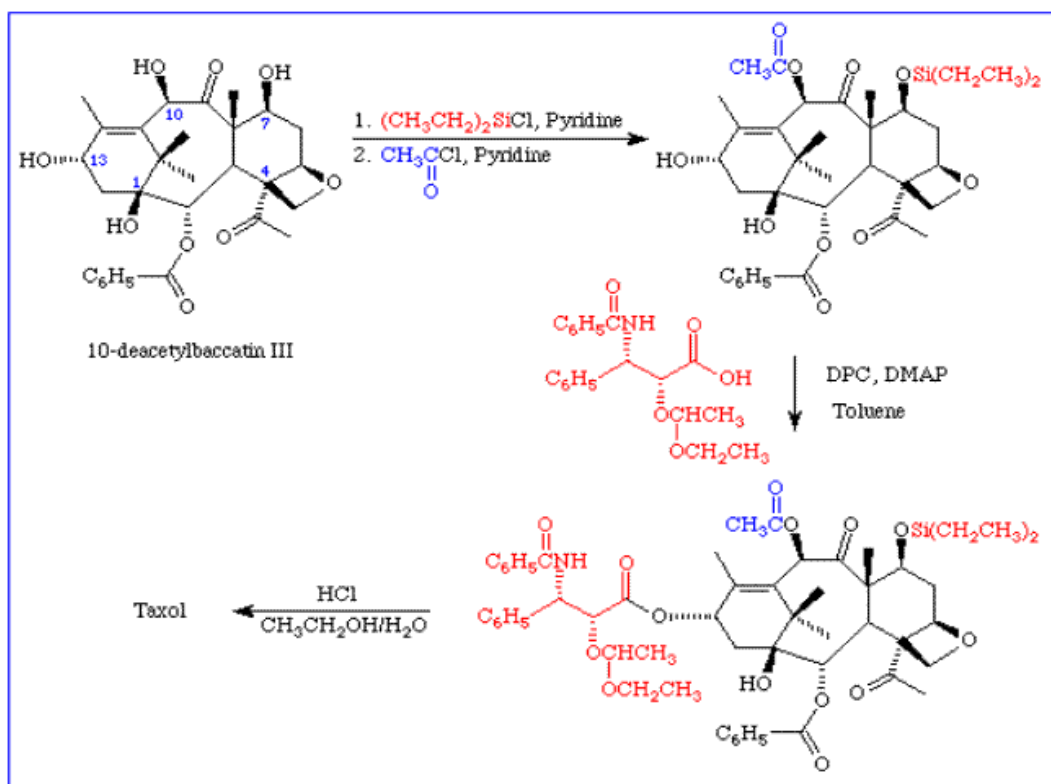
del Paclitaxel o altri analoghi di seconda generazione, contenenti la struttura dell'anello tassanico.

Dato l'elevato potere terapeutico del Taxolo® negli ultimi decenni nuove molecole di sintesi o fonti alternative di Paclitaxel o altri tassani correlati sono state prodotte.



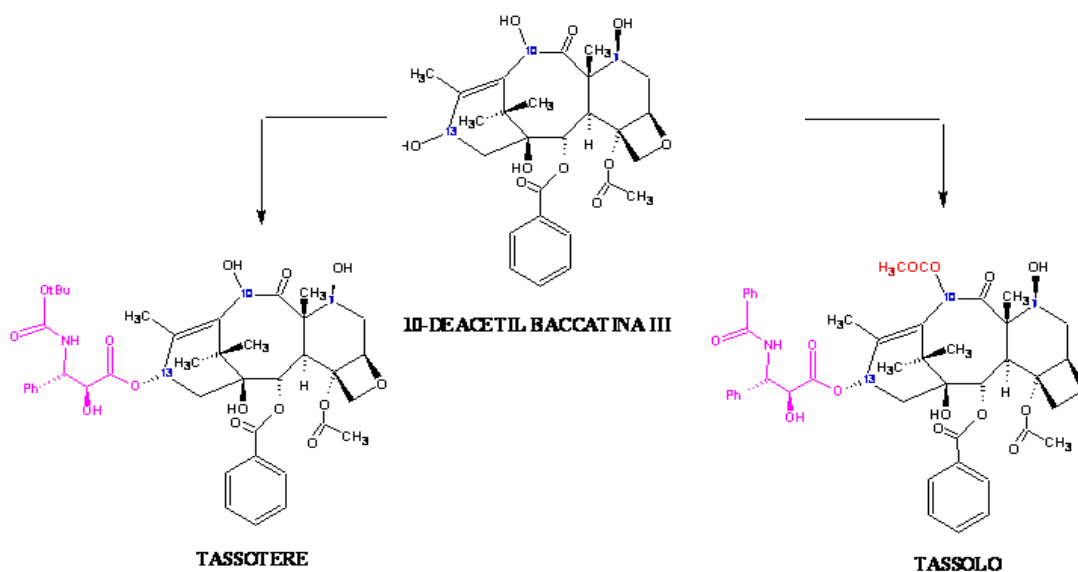
10-Deacetylbaicatin III

L'aumento della richiesta di farmaco ha, però, posto drammaticamente il problema della mancanza di materia prima. La soluzione è stata ricercata dapprima nella sintesi chimica del tassolo, ma, vista la complessità della molecola, il processo risultava estremamente svantaggioso in termini di resa e di costi. Nel 1992 il gruppo del prof. Holton della Florida State University ha proposto una semi-sintesi a partire dalla 10-deacetylbaicatin III, un precursore naturale del tassolo, con una resa dell'80%. Tale sintesi, brevettata dalla Bristol-Myers Squibb, è il metodo attualmente utilizzato per produrre il tassolo impiegato nella terapia antitumorale.



Nel tempo gli innumerevoli tentativi di allestire colture vegetali a partire da materiale derivante dal tasso non hanno dato i risultati sperati, per questo la principale fonte di farmaco resta, ancor oggi, la semi-sintesi chimica.

Nel 2006 il gruppo della dr.ssa M. Miele, con cui ho collaborato presso il Laboratorio di Biotecnologie Vegetali - CBA, ha reso pubblici i propri dati relativi alla presenza di Tassolo e tassani in una pianta diversa dal Tasso molto più diffusa e facile da coltivare *in vitro*: il nocciolo [Bestoso F. *et al*, 2006]. A riguardo è stato ottenuto un brevetto (n. application: EP1739184A1; US 20070026506A1).



Le nuove scoperte hanno portato a due deduzioni:

1. Il Tassolo e i tassani sono presenti non solo nelle piante di Tasso, ma anche in altre varietà vegetali presenti diffusamente in territorio europeo.
2. Il Tassolo e i tassani sono metaboliti secondari e, in quanto tali, sono prodotti dalle piante in condizioni di stress (fisico e/o chimico) in risposta a stimoli esterni, quindi, *in vitro* si può influire sulla loro produzione tramite elicitatori da aggiungere al brodo di coltura liquida in fermentatori.

## 1.8 Obiettivi

L'interesse sempre crescente verso le nanotecnologie ha comportato una forte spinta verso la produzione di questi prodotti, anche se ancora molto c'è da capire e approfondire sulle caratteristiche e i meccanismi d'azione dei nanomateriali. Dalla letteratura stanno emergendo innumerevoli indicazioni sulla tossicità delle nanoparticelle, legata soprattutto al gran numero di variabili che la influenzano: dimensioni, composizione chimica, forma, struttura e carica superficiale. A causa di ciò bisogna sottolineare come ogni nanoparticella

è un caso a sé e come tale va studiato singolarmente. rilevanti sono le possibili applicazioni in campo biomedico, che spaziano da sistemi di somministrazione innovativi e più efficaci di farmaci specie in campo oncologico, ai biosensori, alla nanotecnologia molecolare.

Lo scopo di questo lavoro è quello di caratterizzare nanoparticelle paramagnetiche di  $\text{Fe}_2\text{O}_3$  da utilizzare in ambito di *drug delivery*. In particolare abbiamo voluto caratterizzare le nanoparticelle di magnetite PEGilate per appurarne l'eventuale tossicità su cellule umane somatiche e tumorali. In seconda battuta abbiamo voluto affrontare le problematiche dovute alle terapie oncologiche per cercare di allungare i periodi privi di malattia e migliorare la qualità di vita dei pazienti. In questo contesto abbiamo voluto coniugare le nostre nanoparticelle al farmaco chemioterapico Tassolo o Paclitaxel o Taxotere per cercare di ottenere una riduzione della dose applicata e applicabile durante la terapia oncologica e delle conseguenti patologie cronico-degenerative ad essa correlate (es. cardiomiopatie).

### 3. **INTRODUZIONE**

#### 2.3 **Nanoparticelle di magnetite (Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>)**

##### 2.2.2 *Scheda tecniche (Colorobbia s.r.l.)*

La ditta Colorobbia srl ha partecipato in modo attivo al nostro studio producendo e fornendoci le nanoparticelle nude e coniugate utilizzate in tutti i nostri test. A seguire un estratto della scheda prodotto che accompagnava il prodotto al momento della spedizione [Baldi G, 2014].

#### **Campione**

Batches: NBR\_21  
NBR21\_-PTX (60microG/G NBR)  
NBR\_21-Fluo (Cy3.5 legata internamente)  
NBR\_21-PTX-Apta.

#### **Descrizione**

Forma chimica: sospensione acquosa di nanoparticelle ibride inorganiche/organiche di magnetite.

Stabilità: da definire, ma stimata fino a 3 mesi.

#### **Formulazione**

Contenuto Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>: 13,0 mM (0,3% wt)

pH: 7,4

Mezzo disperdente: Tampone fosfato 1 mM.

Analisi elementare eseguita con ICP-Plasma Varian 710-ES.



Una aliquota di Paclitaxel in polvere (Serva; 10 mg; cod.31360.02) è stata pesata in sterilità e nelle condizioni di sicurezza opportune per le sostanze cancerogene ed è stata sciolta in DMSO in modo da ottenere una prima soluzione madre, pari a 2mM.

Dalla soluzione madre 2 mM di Paclitaxel (T) si prepara la diluizione intermedia pari a 0,2microM, concentrazione della soluzione madre di tassolo legato internamente alle nanoparticelle fornita da Colorobbia (NT), da questa si otterranno le diluizioni successive applicate negli esperimenti.

Le concentrazioni più alte (pari a 1 e 2  $\mu$ M) sono preparate a partire dalla prima soluzione madre (2mM).

Le soluzioni contenenti le nanoparticelle devono essere preparate in boccettini di vetro pre-sterilizzati in autoclave (121°C per 30') mettendo in ordine rigoroso prima il volume desiderato di nanoparticelle e poi il diluente (terreno completo diverso per ogni tipologia cellulare, o PBS). Le diluizioni del Paclitaxel possono essere preparate in provette a fondo conico di plastica monouso e sterili.

Dil. Paclitaxel (Stock=2mM)	Dil. Paclitaxel (Stock=0,2mM)	Conc. ( $\mu$ M)
	1:20	0,01
	1:40	0,005
	1:60	0,0033
	1:80	0,0025
	1:100	0,0020
	1:200	0,0010
	1:500	0,0004
	1:1000	0,0002
	1:10.000	0,00002
1:1000		1
1:2000		2

**Tab. 1.** Corrispondenza tra diluizione indicata e concentrazione effettiva di paclitaxel (T). tali concentrazioni sono valide anche per le nanoparticelle (N) coniugate a paclitaxel (NT) e a paclitaxel e aptamero A10 (NTA).

Da una soluzione madre 13 mM di  $Fe_3O_4$  si preparano in vetro e al buio le diluizioni elencate nella tabella a seguire, che rappresentando la concentrazione di Ferro presente.

Gli esperimenti sul modello cellulare da noi scelto sono stati condotti utilizzando terreno completo diverso a seconda della tipologia cellulare presa in considerazione e costituito nello specifico come segue: RPMI al 10% FCS per le PC3 0.8 e le LNCaP e MEM al 10% FCS per le MRC5.

I controlli con le sole nanoparticelle sono preparati diluendo le stesse in PBS sterile in contenitori di vetro.

Dil. Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> (Stock 13mM)	Conc. (mM)
1:20	0,65
1:40	0,325
1:60	0,217
1:80	0,165
1:100	0,13
1:200	0,065
1:500	0,026
1:1000	0,013
1:10.000	0,0013

**Tab.2.** Corrispondenza tra diluizione indicata e concentrazione effettiva di magnetite, Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>, nelle nanoparticelle (N). Tali concentrazioni sono valide sia per le nanoparticelle (N) coniugate a paclitaxel (NT), che per quelle coniugate a paclitaxel e aptamero A10 (NTA).

Nel corso dell'esposizione dei risultati e della discussione verranno riportate principalmente le diluizioni perché esiste una differenza tra la concentrazione di magnetite, quindi di ferro, e di Paclitaxel presenti effettivamente nel pozzetto o nella piastra.

## 2.4 Colture cellulari

a) **PC3 0.8** - tumore alla prostata derivante da una metastasi ossea di IV grado, queste cellule androgeno-indipendenti risultano estremamente aggressive. La linea non risponde a: androgeni, glucocorticoidi e fattori di crescita (EGF e/o FGF) ed è negativa per i marcatori PSA e PMSA ed è caratterizzata da un alto potenziale metastatico. Le cellule sono mantenute in coltura in monostrato in mezzo: RPMI-1640 (Roswell Park Memorial Institute medium

1640 – GIBCO Life Technologies, Monza – Italia) arricchito con il 10% di Siero Bovino Fetale (FBS), 100 IU/ml Penicillina, 100 microG/ml Streptomicina e Glutamina 1%, in termostato a 37°C in atmosfera controllata al 5% di CO<sub>2</sub> e umidificata. Le cellule appena scongelate sono lavate una volta con PBS sterile e centrifugate a 1200 rpm per 5', risospese in 10ml di terreno completo, poste in fiasca da 25cm<sup>2</sup> e lasciate crescere in incubatore fino a confluenza. Le subcolture sono allestite ogni 48h tramite lavaggio con PBS sterile e Tripsina – EDTA 0,25% in soluzione e sono utilizzate per i tests dopo almeno un passaggio. Le cellule sono preparate in numero adeguato all'uso e per il mantenimento della linea. In linea generale, dopo circa una settimana dallo scongelamento, le cellule sono staccate e contate, si preleva la quantità necessaria per gli esperimenti e il resto è rimesso in coltura per ottenerne un maggior numero, infine, sono congelate in terreno di Congelamento ottenuto come segue: RPMI-1640; FBS 95%; Dimetilsolfossido (DMSO) 10% (v/v).

b) **LNCaP** - adenocarcinoma prostatico androgeno-sensibili, derivate da un linfonodo metastatico di un paziente con malattia refrattaria. Questa linea è interessante come modello per lo studio dei meccanismi di androgeno-refrattarietà e sono caratterizzate da recettori per gli androgeni con una alta affinità per le progesterone. Gli stessi recettori si legano a estrogeni e glucocorticoidi con un grado più basso, questo meccanismo basato sulla diversa affinità di legame è responsabile della regolazione della crescita cellulare di questa linea. Le cellule sono mantenute in coltura in monostrato in mezzo: RPMI-1640 (Roswell Park Memorial Institute medium 1640 – GIBCO Life Technologies, Monza – Italia) arricchito con il 15% di Siero Bovino Fetale (FBS), 100 IU/ml Penicillina, 100 microG/ml Streptomicina e Glutamina 1%, in termostato a 37°C in atmosfera controllata al 5% di CO<sub>2</sub>. e umidificata. Le cellule appena scongelate sono lavate una volta con PBS sterile e centrifugate a 1200 rpm per 5', risospese in 10ml di terreno completo, poste in fiasca da 25cm<sup>2</sup> e lasciate crescere in

incubatore fino a confluenza non superiore all'80%. Le subcolture sono allestite ogni 48h tramite lavaggio con PBS sterile e Tripsina – EDTA 0,25% in soluzione e sono utilizzate per i tests dopo almeno un passaggio. Le cellule sono preparate in numero adeguato all'uso e per il mantenimento della linea. In linea generale, dopo circa una settimana dallo scongelamento, le cellule sono staccate e contate, si preleva la quantità necessaria per gli esperimenti e il resto è rimesso in coltura per ottenerne un maggior numero, infine, sono congelate in terreno di Congelamento ottenuto come segue: RPMI-1640; FBS 97%; Dimetilsolfossido (DMSO) 10% (v/v).

c) **MRC5** - derivano da fibroblasti di epitelio polmonare embrionale umano e rappresentano il modello di riferimento. Le cellule sono mantenute in coltura in monostrato in mezzo: Minimum Essential Medium Eagle (MEM; EuroClone Italia) arricchito con il 10% di Siero Bovino Fetale (FBS), 100 IU/ml Penicillina, 100 microG/ml Streptomicina e Glutamina 1%, in termostato a 37°C in atmosfera controllata al 5% di CO<sub>2</sub> e umidificata. Le cellule appena scongelate sono lavate una volta con PBS sterile e centrifugate a 1200 rpm per 5', risospese in 10ml di terreno completo, poste in fiasca da 25cm<sup>2</sup> e lasciate crescere in incubatore fino a confluenza. Le subcolture sono allestite ogni 48h tramite lavaggio con PBS sterile e Tripsina – EDTA 0,25% in soluzione e sono utilizzate per i tests dopo almeno un passaggio. Le cellule sono preparate in numero adeguato all'uso e per il mantenimento della linea. In linea generale, dopo circa una settimana dallo scongelamento, le cellule sono staccate e contate, si preleva la quantità necessaria per gli esperimenti e il resto è rimesso in coltura per ottenerne un maggior numero, infine, sono congelate in terreno di Congelamento ottenuto come segue: RPMI-1640; FBS 95%; Dimetilsolfossido (DMSO) 10%(v/v).

## **2.5 Test di vitalità cellulare**

### **2.3.1 Test ai Sali di Tetrazolio (MTT)**

Il metodo è stato scelto allo scopo di individuare una eventuale azione citotossica delle nanoparticelle e le dosi sub-tossiche cui lavorare con le nanoparticelle legate al chemioterapico. Il test misura la quantità di formazano insolubile (di colore blu) che si forma dopo riduzione della forma solubile (di colore giallo) da parte dei mitocondri.

Le cellule sono state disposte in piastre da 96 pozzetti alla concentrazione di 10.000 cellule/pozzetto e dopo 24h si provvede all'aggiunta delle nanoparticelle. La piastra viene disegnata in modo da avere 6-8 pozzetti non trattati (Controlli; CTR) e gli altri con i trattamenti ripetuti 6-8 volte. Le misure sono fatte a 2 tempi: 24 e 48h per aggiunta del sale di tetrazolio MTT (3-(4,5-Dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide; M5655, Sigma-Aldrich, Milano-Italia) e lasciando ad incubare per 3h. Dopo aggiunta della soluzione acida solubilizzante (SDS 10%, HCl 0,01%) delle membrane e del Formazano, si procede con le letture in assorbanza al luminometro LB940 Mithras in assorbanza a  $\lambda=570\text{nm}$ .

Per ciascun trattamento sono stati calcolati i valori Medi  $\pm$  Deviazione Standard (S.D.) e il T-test di Student per valutare la significatività delle differenze tra trattati e controlli.

### **2.3.2 Colorazione vitale con Trypan blue**

Il Trypan Blue (Blu benzamina, Blu naftilamina, Blu Niagara) deve il suo nome alla proprietà di essere tossico per il parassita tripanosoma ed è comunemente usato nella colorazione vitale con un metodo definito come colorazione per esclusione. Infatti, le membrane cellulari sono normalmente impermeabili a tale colorante, mentre le cellule morte, sia apoptotiche che necrotiche, si colorano di blu (senza possibilità di distinzione).

Le cellule sono poste in piastre da 12 pozzetti a concentrazione pari a 100.000 cellule/pozzetto/ml e lasciate crescere in incubatore per 24h. Il giorno dopo il terreno è sostituito con terreno fresco contenente le nanoparticelle (N, NT, NTA alla sola diluizione 1:100) e il Paclitaxel alle concentrazioni: 1:100, 1  $\mu$ M e 2  $\mu$ M. I trattamenti sono condotti a tre tempi: 24h, 48h e 72h.

Al termine del trattamento raccogliere il terreno di coltura (Culture Medium, CM) in provette sterili a fondo conico da 15ml, fare un lavaggio con PBS sterile e raccogliere anche questo nello stesso contenitore. Centrifugare a 1200 rpm per 5', eliminare il surnatante e risospendere in 1ml di terreno.

Aggiungere nei pozzetti contenenti le cellule adese 2gocce di Tripsina-EDTA 0,25% in soluzione, lasciare agire 1' a 37°C in incubatore, aggiungere 3ml di terreno completo e staccare le cellule spipettando accuratamente. Recuperare la sospensione cellulare in provette sterili a fondo conico e lavare i pozzetti con terreno fresco, da raccogliere e unire al precedente. Centrifugare a 1200 rpm per 5', eliminare il surnatante e risospendere il pellet in 1 ml di terreno fresco.

Prelevare 20 microL di sospensione cellulare o di sospensione ottenuta dal CM e aggiungere un ugual volume di Trypan Blue 0,4%, quindi trasferire 10 microL nella camera di conta Emocounter o in camera di Burkner ad ingrandimento 20x. Contare le cellule vive (luminescenti) e quelle morte (colorate di blu) contando almeno 3 campi, in modo da fare la media dei valori ottenuti.

Calcolare il numero di cellule/ml moltiplicando:

$$\text{valore medio} \times \text{diluizione (se effettuata)} \times 10^4 = n. \text{ cellule/ml}$$

Se il volume fosse diverso da 1ml allora si dovrebbe moltiplicare ulteriormente per il volume effettivo al fine di ottenere il numero di cellule totali.

I risultati di tutte le conte (pellet e CM) sono riportati in tabella Excel e illustrati su istogrammi.

Per ciascun trattamento sono stati calcolati i valori Medi  $\pm$  Deviazione Standard (S.D.) e il T-test di Student per valutare la significatività delle differenze tra trattati e controlli.

### **2.6.3 Test dell'efficienza clonale**

La colorazione al Blu di Metilene è stata scelta allo scopo di valutare la presenza e la corretta morfologia delle colonie ottenute seminando un determinato e volutamente numero esiguo di cellule. Il Blu di Metilene è il sale del Cloruro di Metilene, che in ambiente acquoso si dissocia in Metilene, ione carico positivamente (di colore blu) e cloruro, incolore e carico negativamente. Le cellule sono state disposte in piastre da 60mm alla concentrazione di 200 cellule/piastra in 3mL di terreno completo. Incubare 1 giorno per far attaccare e ambientare le cellule e applicare i trattamenti per i tempi di volta in volta indicati. Alla scadenza dei tempi di trattamento sostituire il terreno con altro fresco. Lasciare crescere in incubatore per almeno 8 giorni. Controllare al microscopio che siano presenti colonie costituite da almeno 150-200 cellule e aggiungere al terreno 10gcc di soluzione al Blu di Metilene. Incubare 30' a RT. Eliminare il terreno rovesciandolo via delicatamente e lasciare asciugare la piastra a RT. Il giorno dopo lavare sotto acqua corrente e contare le colonie fissate al fondo della piastra e colorate di blu. I dati riportati nei grafici sono calcolati in valore percentuale e riferiti al numero di colonie dei controlli.

Per ciascun trattamento sono stati calcolati i valori Medi  $\pm$  Deviazione Standard (S.D.) e il T-test di Student per valutare la significatività delle differenze tra trattati e controlli.



## 2.6.4 Crystal Violetto

Il Cristal violetto (cloruro di esametilpararosanilina) è un colorante che si lega al DNA in maniera stabile e proporzionale similmente all' Etidio Bromuro. Grazie a questa sua caratteristica, il colorante permette la quantificazione del materiale genetico e quindi del numero di cellule, anche se non può discriminare tra cellule vive e morte.

Le cellule sono state disposte in piastre da 96 pozzetti alla concentrazione di 10.000 cellule/pozzetto, dopo 24h si provvede all'aggiunta delle nanoparticelle. Le misure sono fatte a 24h, tempo in cui sicuramente si può osservare l'effetto del Paclitaxel. I pozzetti sono lavati con PBS e fissati in PFA (paraformaldeide) 4% per 10' a RT (temperatura ambiente). Dopo un lavaggio in PBS, aggiungere il colorante Crystal violet – soluzione al 20% in Acqua/Metanolo. Incubare 10' a RT e lavare almeno 6 volte sotto acqua corrente. Far asciugare la piastra a RT e aggiungere la soluzione lisante contenente SDS 1%, metanolo 50% e Acqua dist. Letture in assorbanza al luminometro LB940 Mithras in assorbanza a  $\lambda=540-600\text{nm}$ . il risultato del test sarà un valore in % delle cellule vive confrontando i trattati con i controlli in modo paritetico al test MTT.

I valori di assorbanza sono stati trasferiti in un foglio Excel e il calcolo riportato negli istogrammi rappresenta un valore percentuale ottenuto dal rapporto tra il trattato e il controllo di riferimento.

Per ciascun trattamento sono stati calcolati i valori Medi  $\pm$  Deviazione Standard (S.D.) e il T-test di Student per valutare la significatività delle differenze tra trattati e controlli.

## 2.6.5 Reazione di Pearl's o reazione al Blu di Prussia

Per la preparazione dei vetrini da colorare tramite la reazione al Blu di Prussia sono state coltivate in condizioni di sterilità cellule delle linee tumorali PC3 e LNCaP e somatiche MRC5. Le cellule staccate e opportunamente contate sono state seminate su vetrini coprioggetto precedentemente sterilizzati in autoclave (121°C per 30') alla concentrazione di 300.000 cellule/vetrino. Il giorno dopo il terreno di coltura è stato sostituito con mezzo fresco aggiunto con nanoparticelle (N, NT, NTA) alla diluizione 1:100 (0,13mM) e poste in incubatore (T= 37°C, 5% CO<sub>2</sub> in atmosfera umida) per i tempi stabiliti (20', 2h, 24h, 48h). Alla scadenza dei tempi di incubazione, i vetrini sono stati prelevati e trasferiti in piastre contenenti Metanolo (MeOH) per 15' a T=4°C per ottenere la fissazione delle cellule ai vetrini stessi, che successivamente sono posti sotto cappa chimica con flusso per ottenere l'asciugatura completa. Il giorno successivo si procede con la colorazione utilizzando le soluzioni del Kit Iron Staining contenente Ferro Cianuro di Potassio (HT-20, Sigma), che, reagendo con il ferro in ambiente acido (HCl), porta alla formazione di un precipitato ferroso di colore blu le cellule fissate e contenenti il precipitato sono contro-colorate con pararosanilina (fornita nel kit), che permette di vedere ben colorate in rosa le strutture cellulari (membrane, nuclei e citoplasma), in contrasto con il blu del precipitato, laddove presente.

In seguito alla colorazione, i vetrini devono essere lasciati sotto cappa chimica in flusso perché asciughino del tutto dall'acqua ed infine, il giorno successivo, sono montati su vetrini portaoggetto tramite Mounting (SIGMA). Una volta asciutti i vetrini possono essere visionati e fotografati al microscopio.

## 2.7 Quantificazione del Fe intracellulare

Al fine di calcolare esattamente la quantità di nanoparticelle entrate nelle cellule, abbiamo deciso di effettuare un test di rivelazione del ferro presente in lisati cellulari ottenuti da colture esposte alle nanoparticelle diluizione 1:100 per diversi tempi. La quantificazione è stata operata sia sul pellet che sui terreni di coltura.

Distribuire le cellule in piastra da 60mm fino a confluenza (500.000 cells/piastra per MRC5; 1.000.000 cells/piastra per LNCaP; 2.000.000 cells/piastra per PC3) e trattarle con N 0,13mM (corrispondente alla diluizione 1:100) per tempi differenti (20', 2h, 24h e 48h) prevedendo un Controllo (**CTR**) per ogni tempo e un trattato con aggiunta ed allontanamento immediato del terreno contenente le N (**t0**). Tutti i campioni sono stati previsti in triplicato. Al termine del trattamento si procede con la raccolta del terreno di coltura (**CM**) e delle cellule (**C**) separatamente; entrambi i campioni sono stati opportunamente contati, lavati con PBS e centrifugati (5' a 5000rpm), per ottenere i pellet di cellule pronti per la lisi successiva e dei surnatanti in cui il materiale ferroso fosse il più possibile concentrato sul fondo della provetta ed evitare qualunque dispersione del campione. Tutte le suddette operazioni sono state condotte in tubi a fondo conico da 15 ml in modo da non dover fare spostamenti in altri contenitori e comportare quantificazioni falsate.

Tutti i campioni così preparati sono stati conservati fino al momento della spedizione presso la ditta Colorobbia in frigo a +4°C.

I pellets sono stati spediti non lisati, a temperatura ambiente e senza surnatante perché la presenza degli apparati cellulari consentono una migliore protezione durante la spedizione del materiale ferroso dai danni ossidativi provocati dall'ambiente esterno e l'eventuale danneggiamento delle cellule non comporta misure falsate della componente ferrosa. In sede la ditta Colorobbia ha provveduto alla quantificazione via HPLC del ferro presente nei campioni previa lisi dei pellets effettuata con 500 microL di Soluzione Lisante (SDS 10% +

HCl 0,01M). La lisi cellulare è operata sia su CM che su C, anche se la presenza cellulare nei surnatanti si può definire in generale trascurabile. Ai fini della quantificazione e come approssimazione generale abbiamo deciso di considerare le cellule appartenenti al pellet quelle derivanti dal distacco e lavaggio post-tripsinizzazione. Le cellule già staccate dal monostrato e recuperate con il surnatante e lavaggio pre-tripsinizzazione sono considerate facenti parte del terreno di coltura. Si procede costruendo una curva standard a concentrazione nota di ferro, dalla quale per regressione lineare si ottiene la pendenza della retta, tramite la quale si può determinare la concentrazione dei campioni. Le misurazioni ottenute sono in assorbanza effettuando una misura specifica a 370nm e una di riferimento a 750nm. Gli Standard sono stati ottenuti preparando delle diluizioni seriali di Nanoparticelle in Soluzione Lisante e misurando tali sospensioni alle 2 lunghezze d'onda previste dal metodo (370 e 750 nm).

## **2.8 Microscopia a fluorescenza**

Per la preparazione dei campioni fissati su vetrino da studiare con il microscopio a fluorescenza sono state utilizzate cellule della linea PC3 ed LNCaP alla concentrazione di 10.000 cellule/vetrino piastrate direttamente su vetrini copri-oggetto precedentemente sterilizzati in autoclave.

Dopo 24h dalla semina è stato cambiato il terreno con mezzo fresco contenente le nanoparticelle (N, NT, NTA) alla diluizione 1:100.

Preparare preventivamente una soluzione madre di DAPI alla concentrazione di 5 mg/ml in acqua milliQ o DMF (la polvere è poco solubile, per ottenere una solubilizzazione completa porre in agitazione e sonicare). la soluzione madre può essere conservata per lunghi periodi a -20°C.

Per l'uso finale la soluzione deve essere diluita 1:250, da preparare al momento, al buio e da conservare a +4°C.

I vetrini sono stati prelevati e fissati con Metanolo : Acetone = 1:1 per 15' dopo 20', 2h, 4h e 24h di trattamento. I nuclei sono stati contro-colorati con DAPI e i vetrini montati con copri-oggetto fissato con Mowiol per preservare la fluorescenza il più a lungo possibile.

I vetrini così preparati sono stati conservati al buio a +4°C fino al momento della valutazione al microscopio.

## **2.6 Valutazione del danno genotossico tramite Comet Test**

Con questo test abbiamo voluto appurare l'esistenza di danni a livello del nucleo con rotture che potrebbero essere causate dalla struttura metallica delle nanoparticelle, il confronto in positivo di tale eventualità è stato condotto con cellule trattate in parallelo con nanoparticelle legate al Paclitaxel. Nel contempo abbiamo voluto apprezzare la situazione in caso di trattamento con nanoparticelle legate all'aptamero. Per le finalità esposte sopra abbiamo deciso di applicare il test alle sole linee tumorali: LNCaP e PC3.

Le cellule dopo almeno un passaggio in coltura pre-test, sono state staccate con Tripsina, contate e seminate in duplicato in piastre da 24 pozzetti in concentrazione pari a 20.000 cellule/pozzetto/mL di terreno.

Il giorno successivo alla semina sono stati fatti i trattamenti con N, NT, NTA, Tassolo (T) alla concentrazione pari a 1:100 (vedere tabelle relative), T 1 microM, T 2 microM, mantenuti per 24h.

Il giorno successivo le cellule sono staccate con tripsina, raccolte e poste in centrifuga a 1200 rpm per 5'. Il pellet è risospeso direttamente in 300 microL di Agar Low Melting point Agarose alla concentrazione di 10.000 cellule/ml, quindi trasferito a 4°C per 5'. I vetrini devono essere posti in immersione in vaschette porta-vetrini di vetro contenenti Buffer di

Lisi (2.5 M NaCl, 100 mM EDTA, 10 mM Tris-HCl, pH 10 con l'aggiunta al momento di Triton X-100 all'1% e DMSO al 10%). Incubare o.n. a 4°C.

Il giorno successivo si procede con la corsa elettroforetica in Running buffer alcalino (0.3 M NaOH, 1 mM EDTA, pH 13) freddo, a 300 mA e 25 V per 30'. Alla fine della corsa bisogna portare a pH neutro con Neutralization buffer per 20'. Se i vetrini sono letti immediatamente si procede alla colorazione con Etidio Bromuro (2 µg/ml in H<sub>2</sub>O), se no si disidratano con Etanolo 95% e si conservano a temperatura ambiente al buio.

Al momento dell'uso si devono idratare i vetrini immergendoli 5' in acqua milliQ. Successivamente sono colorati con Etidio Bromuro e mantenuti in cameretta umida al buio. La lettura dei vetrini è fatta con microscopio in fluorescenza a 200x (Leica Microsystems, Mannheim, Germany) equipaggiato con fotocamera digitale. Abbiamo ottenuto circa 20 foto/vetrino al fine di acquisire circa 100 nuclei da analizzare usando il sistema di imaging automatizzato CASP o Comet Assay (SoftwareProject, <http://www.casp.sourceforge.net>). Il danno al DNA (siti alcali-sensibili e rotture al doppio e al singolo filamento) era quantificato in termini di % di code di DNA. Tutti i risultati sono espressi come valori Medi ± Deviazione Standard (S.D.) e il T-test di Student ANOVA per valutare la significatività delle differenze tra trattati e controlli.

### 3. ***RISULTATI E DISCUSSIONE***

La tossicità delle nanoparticelle (N) è stata valutata mediante test dell'MTT, inizialmente condotto solo per le N, successivamente anche per le N coniugate al Paclitaxel (NT), nanoparticelle coniugate al Paclitaxel e all'aptamero A10 specifico per il recettore PSMA (NTA), in ogni caso il confronto è stato fatto con il Paclitaxel libero (T). Tutti gli esperimenti eseguiti in triplicato sono stati condotti sulle tre diverse linee cellulari (LNCaP, PC3, MRC5) e per ogni punto sperimentale sono stati utilizzati 8 replicati biologici. I risultati ottenuti sono stati espressi come percentuale di variazione rispetto al controllo che è stato considerato 100. I valori dei test di citotossicità denotano le capacità metabolica delle linee utilizzate e sono riportati in tabella 3, 4 e 5.

Al fine di valutare la potenziale tossicità generata dalle N di Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> sono stati eseguiti diversi saggi a concentrazioni comprese tra 0,13 mM e 0,0013 mM. Inoltre, le cellule sono state trattate sia con il T alle concentrazioni che vengono rilevate nel plasma dei pazienti in terapia (1 e 2 μM), sia alle concentrazioni di T, che legato alle N, viene trasportato nell'ambiente cellulare dopo inoculo con le NT (0,0020 e 0,00002 μM).

I risultati ottenuti dai test eseguiti sulle tre linee cellulari indicano che la concentrazione più alta di N (0,13 mM) non produce effetti citotossici e il range di mortalità nelle diverse prove si attesta intorno al 10% (Fig. 1A, 2A, 3A). Questo risultato ci conferma che il potenziale effetto tossico delle N di Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> è poco rilevante, confermando i risultati riportati in letteratura che documentano l'utilizzo di queste ultime in diagnostica. Nello specifico per la linea tumorale LNCaP a 24h il tasso di mortalità raggiungeva l'8,25%, mentre a 48h l'8,33% (Fig. 1A). Nella linea di PC3, cellule più aggressive androgeno-indipendenti, il tasso di mortalità in seguito all'inoculo di N passava dal 2,91% dopo 24h all'8,57% dopo 48h di contatto (Fig. 2A). Diversamente, nella linea di fibroblasti polmonari MRC5, dopo il

contatto con le N a 24h non si osservava variazione di mortalità quando confrontata con il proprio controllo. A 48h la percentuale di cellule morte raggiungeva valori che si attestavano intorno al 10,19% (Fig. 3A). Le differenze osservate a 24h tra le due linee tumorali e la linea di fibroblasti umani potrebbero essere dovute alle caratteristiche intrinseche delle cellule. Nello specifico, le linee tumorali hanno un ciclo cellulare molto più breve (22-24h) rispetto alle linee di MRC5 (34-36h) e questo potrebbe influenzare i processi di uptake rendendo le linee tumorali più attive nel captare ed inglobare le stesse. D'altra parte la presenza di un maggior numero di mitocondri difettivi nelle cellule tumorali, rispetto alle cellule normali, potrebbe essere parte attiva nell'incremento dei ROS determinato dall'ingresso delle N generanti un squilibrio redox che contribuisce alla mortalità delle cellule.

Le tre linee cellulari sono state inoculate con il preparato NT alle stesse concentrazioni riportate per N. Le LNCaP mostravano una differenza statisticamente significativa ( $P < 0,05$ ) nella mortalità (20%) a tutte le concentrazioni testate ma solo dopo 48h. L'effetto risultava più importante quando le LNCaP venivano inoculate con T libero, infatti, le percentuali di mortalità raggiunge valori che si attestavano intorno al 60% con un  $P < 0,001$ .

Diversamente per le linee cellulari di PC3 e MRC5 alle diverse dosi testate di NT non si osserva una risposta dose dipendente, ma una più bassa vitalità rilevabile sia alle 24h che alle 48h (Fig. 2 e Tab. 4 e 5). In particolare, una più alta mortalità è osservabile nelle cellule trattate con NT a 48h rispetto alle corrispondenti dosi di T libero. Osservando la Fig. 2B, delle PC3 inoculate con 0,065 mM di NT, corrispondente ad una dose di T adsorbito pari a 0,001  $\mu\text{M}$ , si osserva un incremento della mortalità del 26% se paragonati ai campioni trattati con T libero alle stesse concentrazioni.

L'inoculo nelle linee cellulari di NTA, in cui l'aptamero coniugato alle NT riconosce specificatamente il recettore del PSMA, mostra un maggiore effetto citotossico nella linea di LNCaP che risulta PSMA<sup>+</sup>. Infatti, mentre nelle cellule di PC3 e MRC5 non si osservano differenze significative tra i trattamenti con NT e NTA nelle cellule LNCaP si osserva un



incremento statisticamente significativo ( $P < 0,05$ ) superiore al 10% dopo 48h dal trattamento. Ciò potrebbe essere dovuto al fatto che l'internalizzazione del complesso NTA segue le vie della pinocitosi, trasporto che determina l'internalizzazione delle membrane contenente il recettore in un modello che richiede dispendio di energia, diversamente da quanto avviene per le N che verosimilmente seguono una via di diffusione passiva.

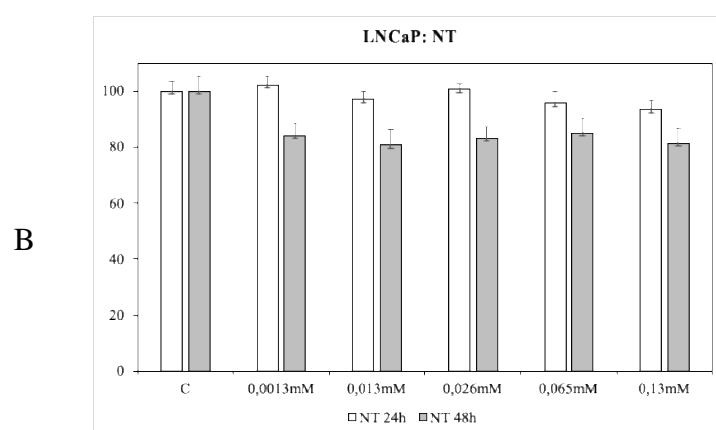
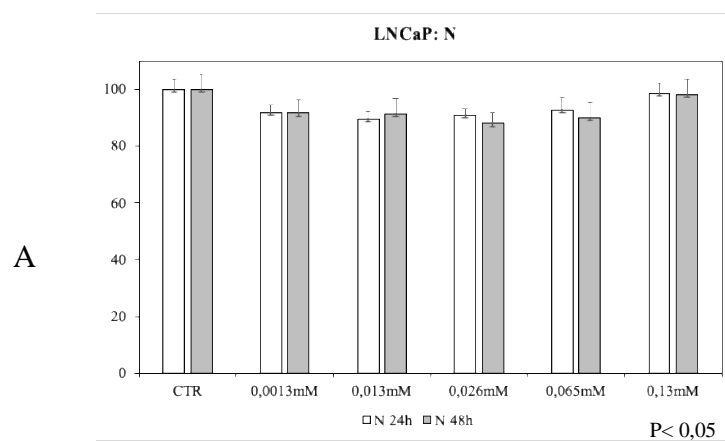
LNCaP MTT	C	0,0013mM	0,013mM	0,026mM	0,065mM	0,13mM
N 24h	100 ±0,034	91,75±0,029	89,60±0,028	91,07±0,020	92,92±0,043	98,63±0,035
N 48h	100,00±0,055	91,67±0,046	91,31±0,054	87,99±0,038	90,10±0,053	98,38±0,053

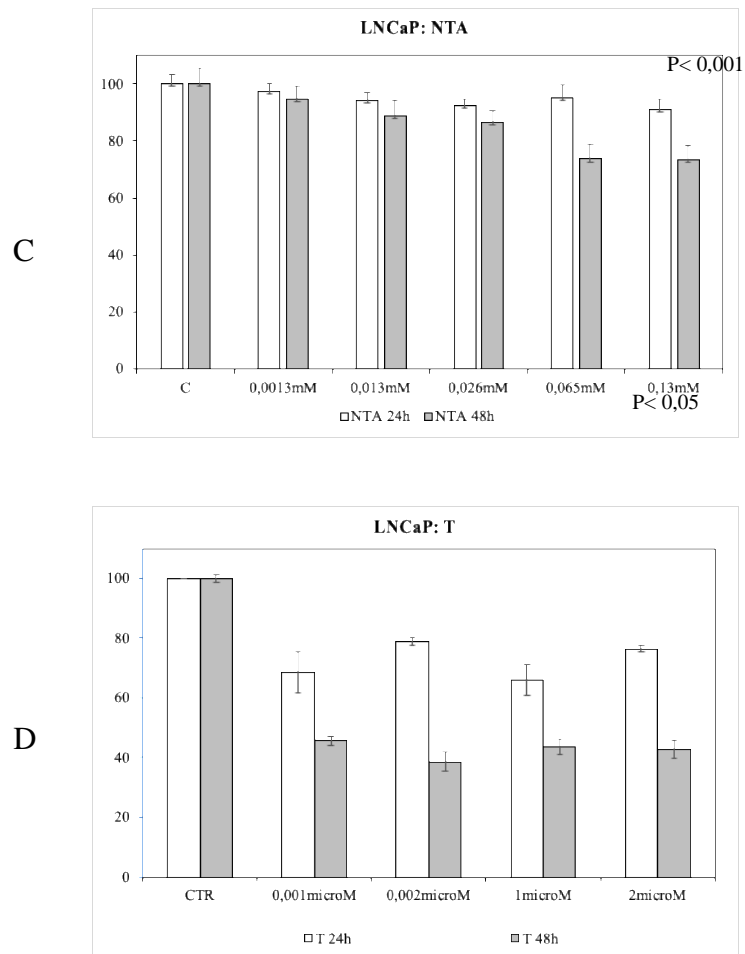
LNCaP MTT						
Conc. Fe	C	0,0013mM	0,013mM	0,026mM	0,065mM	0,13mM
Conc. T	C	0,00002μM	0,0002μM	0,0004μM	0,001μM	0,002μM
NT 24h	100,00±0,055	102,33±0,064	97,08±0,058	100,66±0,048	95,76±0,055	93,43±0,053
NT 48h	100,00±0,068	84,12±0,061	80,78±0,066	83,39±0,066	84,96±0,059	81,62±0,065

LNCaP MTT						
Conc. Fe	C	0,0013mM	0,013mM	0,026mM	0,065mM	0,13mM
Conc. T	C	0,00002μM	0,0002μM	0,0004μM	0,001μM	0,002μM
NTA 24h	100,00±0,10	97,41±0,062	94,37±0,063	92,55±0,058	95,24±0,07	91,04±0,053
NTA 48h	100,00±0,10	94,63±0,13	88,93±0,18	86,71±0,084	73,67±0,087	73,31±0,094

LNCaP MTT	C	0,001 $\mu$ M	0,002 $\mu$ M	1 $\mu$ M	2 $\mu$ M
T 24h	100,00 $\pm$ 0,06	68,56 $\pm$ 13,46	78,8 $\pm$ 2,83	65,95 $\pm$ 10,53	76,48 $\pm$ 2,27
T 48h	100,00 $\pm$ 0,10	45,69 $\pm$ 2,34	38,62 $\pm$ 3,02	43,59 $\pm$ 4,98	42,58 $\pm$ 5,98

**Tab. 3.** Tabelle riportanti la media dei valori percentuali ottenuti da 10 test MTT  $\pm$  St.dev. per i trattamenti effettuati con N, NT ed NTA sulla linea LNCaP.





**Fig.1.** Grafici relativi all'andamento della vitalità  $\pm$  St.dev per la linea LNCaP dopo trattamento con N (A), NT (B), NTA (C) e T (D). I risultati del test di vitalità MTT mostrano per le cellule trattate con NT ed NTA una mortalità statisticamente significativa, ma minore rispetto a quelle trattate con T utilizzato sia alla concentrazione pari a quella presente nelle NT, sia a quelle maggiori utilizzate in clinica.

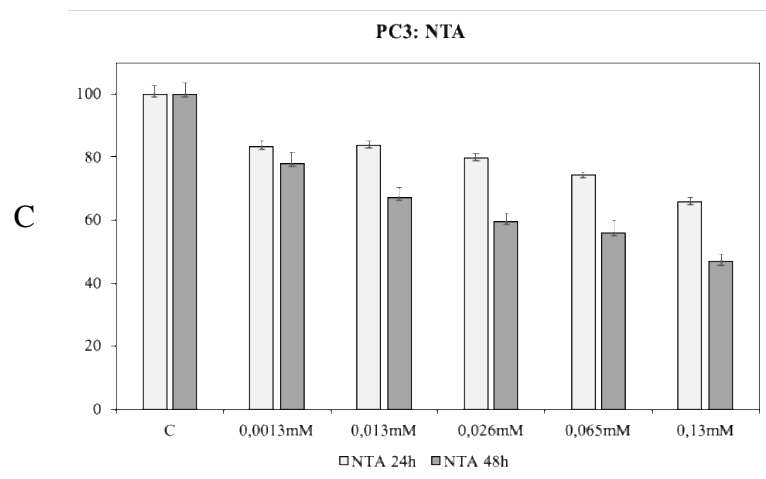
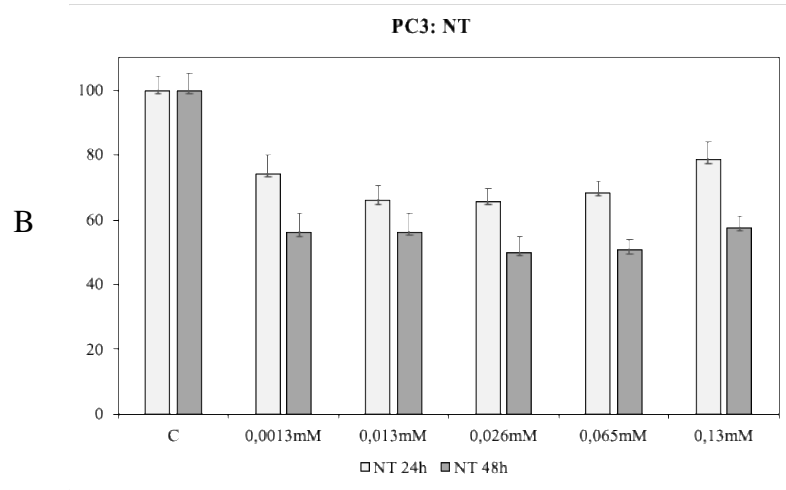
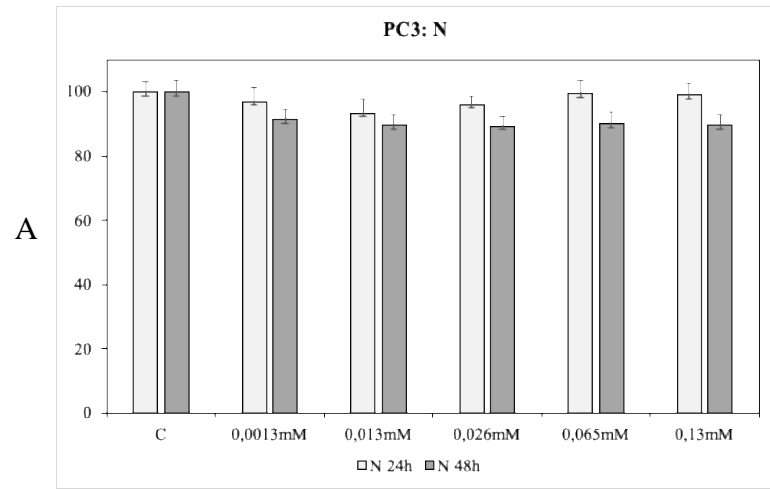
<b>PC3 MTT</b>	<b>C</b>	<b>0,0013mM</b>	<b>0,013mM</b>	<b>0,026mM</b>	<b>0,065mM</b>	<b>0,13mM</b>
<b>N 24h</b>	100 ±0,034	97,09±0,042	93,46±0,044	96,30±0,026	99,51±0,041	99,04±0,038
<b>N 48h</b>	100,00±0,036	91,43±0,032	89,62±0,032	89,25±0,033	90,10±0,037	89,58±0,033

<b>PC3 MTT</b>						
<b>Conc. Fe</b>	<b>C</b>	<b>0,0013mM</b>	<b>0,013mM</b>	<b>0,026mM</b>	<b>0,065mM</b>	<b>0,13mM</b>
<b>Conc. T</b>	<b>C</b>	<b>0,00002µM</b>	<b>0,0002µM</b>	<b>0,0004µM</b>	<b>0,001µM</b>	<b>0,002µM</b>
<b>NT 24h</b>	100,00±0,041	74,28±0,059	65,89±0,046	65,63±0,042	68,35±0,036	78,49±0,054
<b>NT 48h</b>	100,00±0,052	56,06±0,06	56,11±0,059	49,97±0,049	50,67±0,034	57,73±0,035

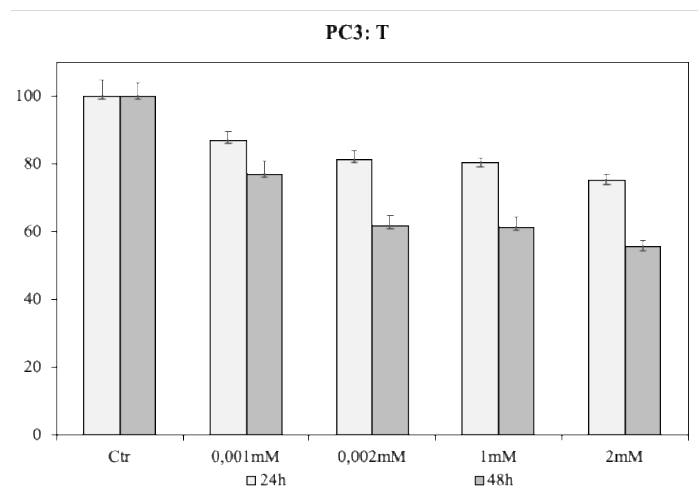
<b>PC3 MTT</b>						
<b>Conc. Fe</b>	<b>C</b>	<b>0,0013mM</b>	<b>0,013mM</b>	<b>0,026mM</b>	<b>0,065mM</b>	<b>0,13mM</b>
<b>Conc. T</b>	<b>C</b>	<b>0,00002µM</b>	<b>0,0002µM</b>	<b>0,0004µM</b>	<b>0,001µM</b>	<b>0,002µM</b>
<b>NTA 24h</b>	100,00±0,024	83,56±0,015	83,75±0,013	79,79±0,013	74,26±0,012	65,75±0,016
<b>NTA 48h</b>	100,00±0,036	77,88±0,037	67,43±0,029	59,64±0,027	55,94±0,041	46,88±0,025

<b>PC3 MTT</b>					
<b>Conc. Fe</b>	<b>C</b>	<b>0,065mM</b>	<b>0,13mM</b>		
<b>Conc. T</b>	<b>C</b>	<b>0,001µM</b>	<b>0,002µM</b>	<b>1µM</b>	<b>2µM</b>
<b>T 24h</b>	100,00±0,048	86,92±0,026	81,29±0,028	80,25±0,013	75,01±0,017
<b>T 48h</b>	100,00±0,036	76,99±0,037	61,85±0,029	61,49±0,027	55,54±0,02

**Tab. 4.** Tabelle riportanti la media dei valori percentuali ottenuti da 10 test MTT ± St.dev. per i trattamenti effettuati con N, NT ed NTA sulla linea PC3.



D



**Fig.2.** Grafici relativi all'andamento della vitalità  $\pm$  St.dev per la linea PC3 dopo trattamento con N (0,13mM), NT (T 0,002 $\mu$ M), NTA (T 0,002 $\mu$ M) e T a diverse concentrazioni.

MRC5 MTT	C	0,0013mM	0,013mM	0,026mM	0,065mM	0,13mM
N 24h	100,00 $\pm$ 0,031	105,68 $\pm$ 0,051	103,84 $\pm$ 0,024	101,66 $\pm$ 0,028	101,70 $\pm$ 0,026	106,18 $\pm$ 0,022
	100,00 $\pm$ 0,031	89,81 $\pm$ 0,037	92,85 $\pm$ 0,035	87,79 $\pm$ 0,024	88,50 $\pm$ 0,027	89,85 $\pm$ 0,025

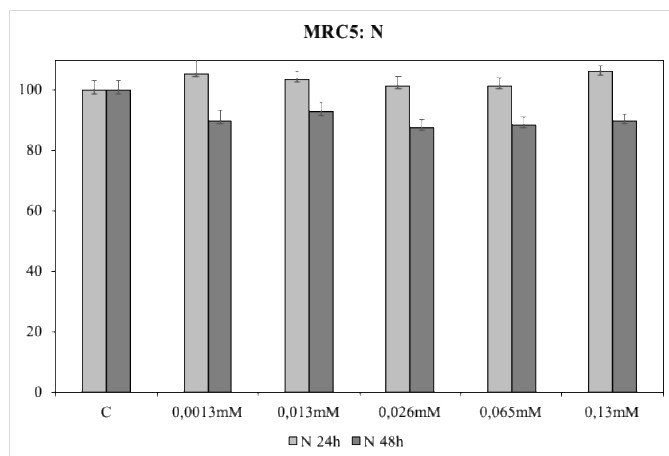
MRC5 MTT						
Conc. Fe	C	0,0013mM	0,013mM	0,026mM	0,065mM	0,13mM
Conc. T	C	0,00002 $\mu$ M	0,0002 $\mu$ M	0,0004 $\mu$ M	0,001 $\mu$ M	0,002 $\mu$ M
NT 24h	100,00 $\pm$ 0,048	79,21 $\pm$ 0,031	76,31 $\pm$ 0,042	74,79 $\pm$ 0,03	68,52 $\pm$ 0,033	69,28 $\pm$ 0,038
	100,00 $\pm$ 0,033	70,15 $\pm$ 0,027	65,51 $\pm$ 0,029	61,72 $\pm$ 0,025	64,05 $\pm$ 0,063	69,95 $\pm$ 0,068

<b>MRC5 MTT</b>						
<b>Conc. Fe</b>	<b>C</b>	<b>0,0013mM</b>	<b>0,013mM</b>	<b>0,026mM</b>	<b>0,065mM</b>	<b>0,13mM</b>
<b>Conc. T</b>	<b>C</b>	<b>0,00002μM</b>	<b>0,0002μM</b>	<b>0,0004μM</b>	<b>0,001μM</b>	<b>0,002μM</b>
<b>NTA 24h</b>	100,00 ± 0,039	86,71 ± 0,056	77,87 ± 0,032	80,15 ± 0,034	78,65 ± 0,033	76,06 ± 0,027
<b>NTA 48h</b>	100,00 ± 0,035	81,75 ± 0,028	68,10 ± 0,028	68,14 ± 0,023	67,18 ± 0,031	64,35 ± 0,035

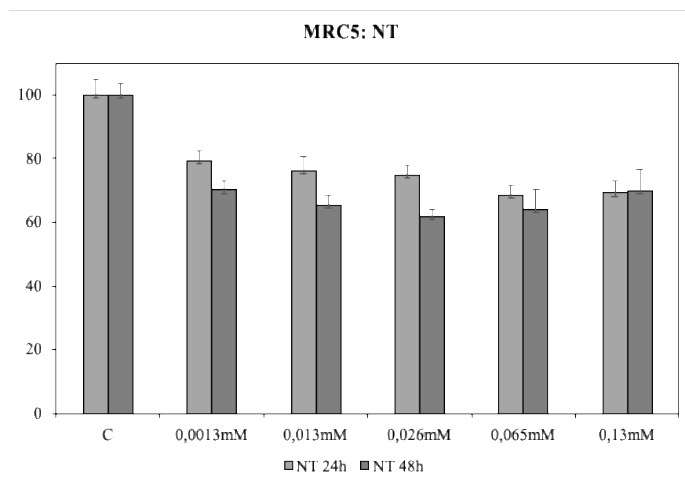
<b>MRC5 MEDIA MTT</b>					
<b>Conc. Fe</b>	<b>C</b>	<b>0,065mM</b>	<b>0,13mM</b>		
<b>Conc. T</b>	<b>C</b>	<b>0,001μM</b>	<b>0,002μM</b>	<b>1μM</b>	<b>2μM</b>
<b>T 24h</b>	100,00 ± 0,048	88,24 ± 0,026	86,94 ± 0,028	68,52 ± 0,013	69,28 ± 0,017
<b>T 48h</b>	100,00 ± 0,036	82,94 ± 0,037	84,26 ± 0,029	64,05 ± 0,027	69,95 ± 0,02

**Tab. 5.** Tabelle riportanti la media dei valori percentuali ottenuti da 10 test MTT ± St.dev. per i trattamenti effettuati con N (0,13mM), NT (T 0,002μM), NTA (T 0,002μM) e T con la linea MRC5.

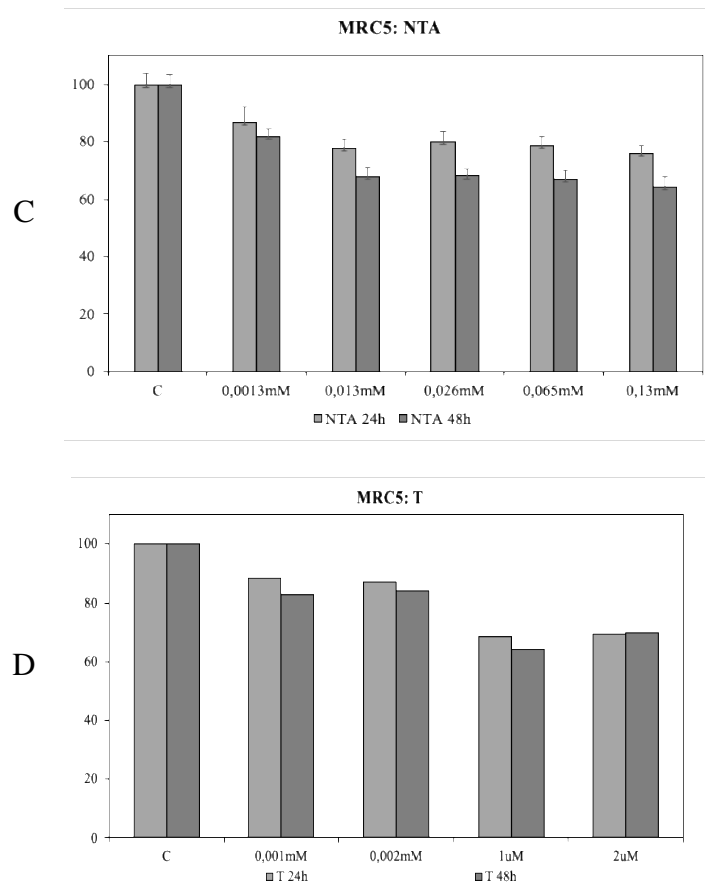
A



B







**Fig.3.** Grafici relativi all'andamento della vitalità  $\pm$  St.dev per la linea MRC5 dopo trattamento con N (Fe 0,13mM), NT (T 0,002 $\mu$ M) ed NTA (T 0,002 $\mu$ M).

Il test è stato condotto sulle sole linee tumorali PC3 ed LNCaP con N (Fe 0,13mM), NT (Fe 0,13mM e T 0,002 $\mu$ M), NTA (Fe 0,13mM e T 0,002 $\mu$ M) e T allo scopo di verificare la sopravvivenza a lungo termine delle cellule tumorali in modo da valutare il danno arrecato dal trattamento alla capacità replicativa delle cellule dopo 24h di contatto.

L'efficienza clonale (ossia la capacità di formare colonie) è un parametro capace di misurare un danno anche parziale al complesso assetto enzimatico di cui la cellula necessita per replicarsi ed è particolarmente idonea a delineare una risposta dose-relata ad elevata sensibilità.

I valori espressi in percentuale sono il risultato del rapporto tra la media delle conte delle unità formanti colonia (UFC) di trattati e controlli. Il trattamento è stato condotto utilizzando le concentrazioni più alte testate nel test MTT, pari a 0,13mM di Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> con una concentrazione di 0,002 μM di T adsorbito.

Anche in questi test i risultati non evidenziano una tossicità statisticamente significativa determinata dall'inoculo in entrambe le linee cellulari con le N se paragonate al corrispettivo controllo.

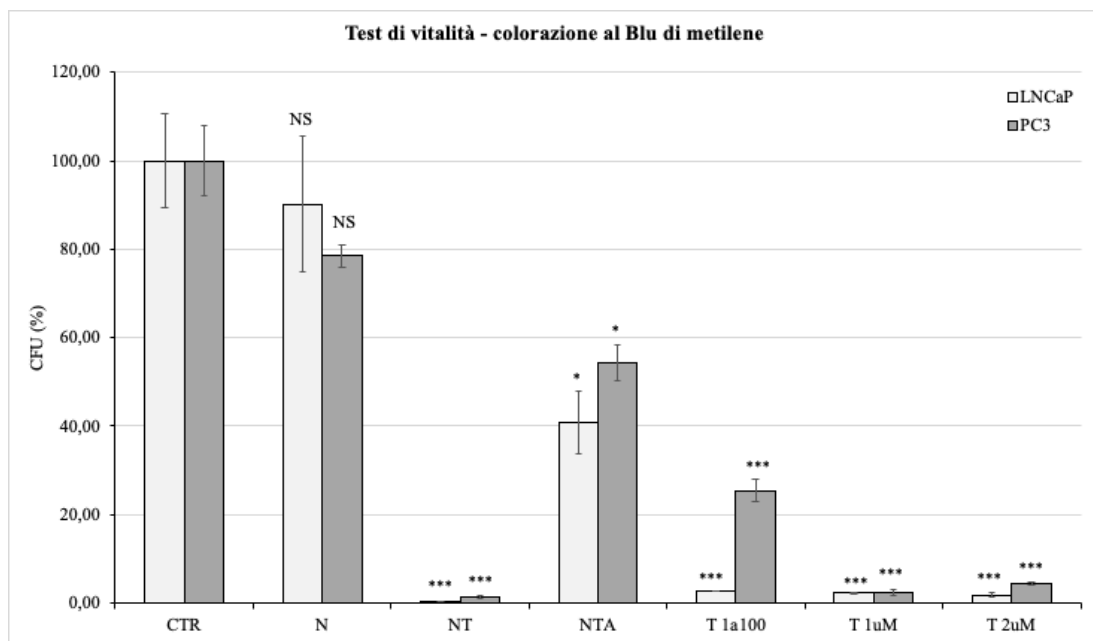
Il trattamento con il T ha determinato una risposta nettamente diversa in termini di numero di colonie dopo 8 giorni dal trattamento. Infatti, la linea delle PC3, considerate cellule più maligne rispetto alle LNCaP in quanto refrattarie agli ormoni, se trattata con T mostrava una persistenza del numero di colonie pari al 25,43% rispetto al controllo con una percentuale che si attesta al 1,29% in seguito a contatto con NT. Questa potrebbe essere un'indicazione della più alta capacità di tale complesso nel veicolare il farmaco all'interno del sistema cellulare attraverso un sistema di trasporto passivo. La linea delle LNCaP di per sé più responsiva al trattamento con il T libero (2,73%), evidentemente in risposta alle proprie caratteristiche biologiche, dopo trattamento con NT determinava la completa assenza delle colonie (Fig. 4; Tab. 6). Un'ulteriore osservazione degna di nota è che il trattamento *in vitro* delle due linee cellulari con dosi di T simili alle concentrazioni plasmatiche rilevate nei pazienti in terapia antitumorale, risultano meno efficaci se paragonati ai risultati ottenuti nei substrati trattati con NT ciò potrebbe essere un'indicazione utilizzabile in clinica durante il trattamento di patologie neoplastiche in cui è necessario l'utilizzo del T. E' bene inoltre evidenziare che il complesso NTA seppur più efficace ma non in modo statisticamente significativo nelle cellule di LNCaP non determinano una mortalità così marcata in seguito al trattamento così come avviene per NT. Questo potrebbe essere dovuto da una parte all'ingombro sterico risultante dalla coniugazione dell'aptamero con le N e il T e dall'altra all'incapacità della cellula di operare dei processi richiedenti energia in un contesto in cui il

trattamento con antiblastico quale il tassolo determini una sofferenza generalizzata dell'intero sistema cellulare. Inoltre, i risultati ottenuti tramite il saggio del Cristal violetto (dati non riportati) dopo 24h di trattamento con i vari preparati indicano come il contatto delle cellule con le NT determini una mortalità che si attesta intorno al 40%, ciò suggerisce che i valori ottenuti dal trattamento in acuto non è sufficiente per la valutazione dei reali effetti a lungo termine delle NT.

<b>LNCaP</b>	<b>CTR</b>	<b>N</b>	<b>NT</b>	<b>NTA</b>	<b>T 1:100 (0,002<math>\mu</math>M)</b>	<b>T 1<math>\mu</math>M</b>	<b>T 2<math>\mu</math>M</b>
<b>%</b>	100 $\pm$ 10,49	90,13 $\pm$ 15,27	0,06 $\pm$ 0,14	40,73 $\pm$ 7,07	2,73 $\pm$ 0,00	2,27 $\pm$ 0,14	1,82 $\pm$ 0,58

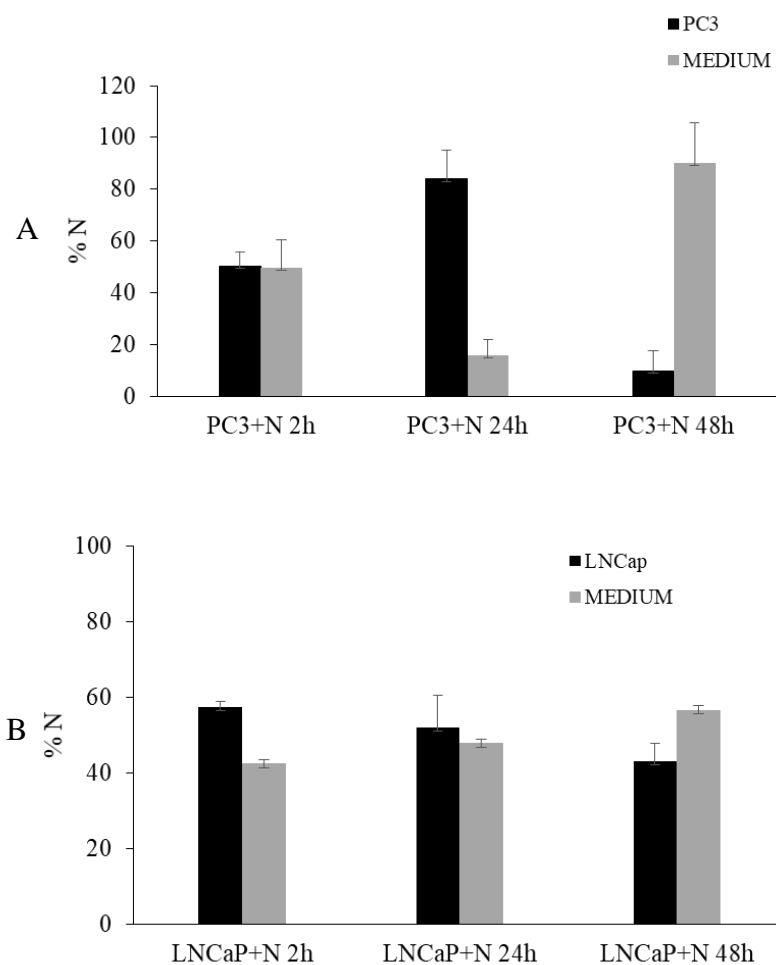
<b>PC3</b>	<b>CTR</b>	<b>N</b>	<b>NT</b>	<b>NTA</b>	<b>T 1:100 (0,002<math>\mu</math>M)</b>	<b>T 1<math>\mu</math>M</b>	<b>T 2<math>\mu</math>M</b>
<b>%</b>	100 $\pm$ 7,99	78,43 $\pm$ 2,52	1,29 $\pm$ 0,25	54,37 $\pm$ 4,12	25,43 $\pm$ 2,55	2,38 $\pm$ 0,67	4,31 $\pm$ 0,29

**Tab. 6.** Valori relativi al trattamento delle cellule delle linee tumorali LNCaP e PC3 con N (0,13mM), NT, NTA e T a diverse concentrazioni.



**Fig.4.** Unità Formanti Colonia (UFC) dopo trattamento per 8 giorni delle linee tumorali LNCaP e PC3 con N, NT, NTA a diluizione 1:100 e T a diverse concentrazioni.

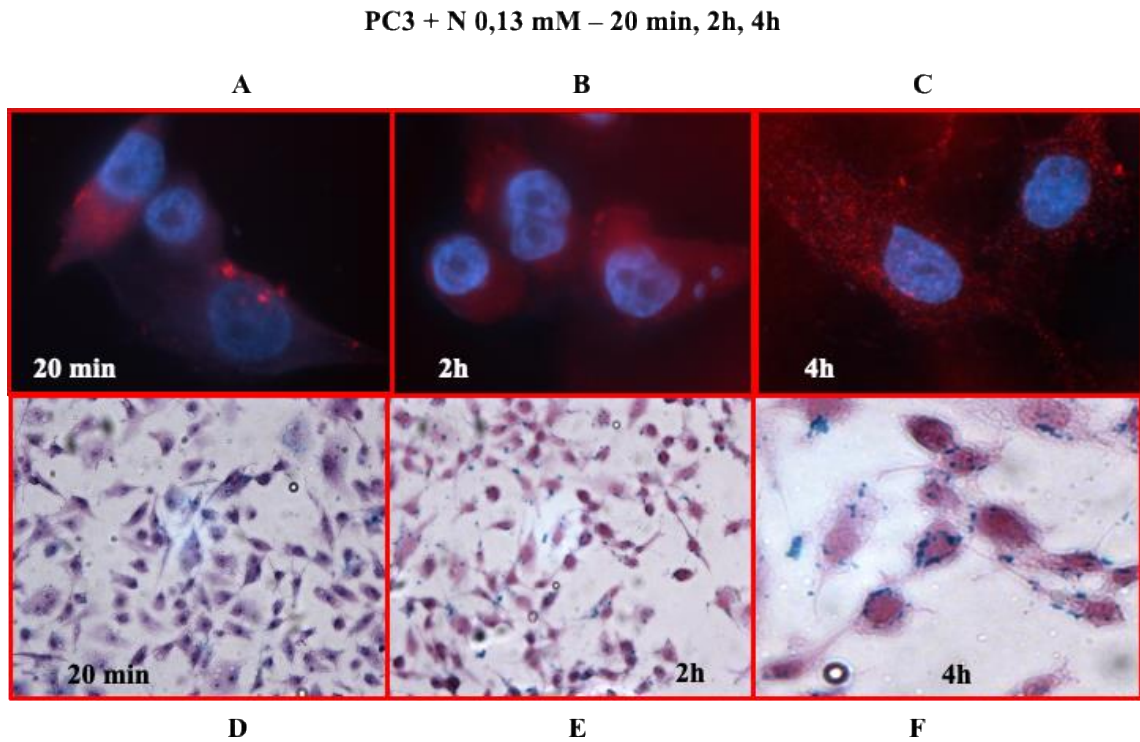
La valutazione delle N nelle PC3 e nelle LNCaP dopo 2h, 24h e 48h di contatto, eseguita con HPLC sia sul terreno di crescita (in modo da determinare la concentrazione di N non internalizzate) che, sul substrato cellulare previa lisi, ha dimostrato che, sia le PC3 che le LNCaP, inglobano le N in modo analogo a breve termine (Fig. 5). Successive osservazioni a tempi più lunghi hanno dimostrato che vi è una differente dinamica nel flusso di ingresso e uscita delle N.



**FIG. 5.** Nei grafici A e B si può apprezzare l'entrata di N nelle cellule in termini di quantità di ferro (in  $\mu\text{G}$ ) rapportata al corrispettivo terreno di coltura. I valori sono stati espressi in percentuale e il confronto riguarda le sole linee tumorali (LNCaP nel pannello B; PC3 nel pannello A).

Parallelamente, l'osservazione di preparati citologici al microscopio ottico previa colorazione al Blu di Prussia, ha mostrato una localizzazione delle N prevalentemente al livello citoplasmatico e più precisamente nella zona perinucleare (Fig. 6F). Ulteriori indagini eseguite al microscopio a fluorescenza, in cui le N sono state marcate con delle cianine hanno evidenziato che, già dopo 20 min (Fig.6A). Le N erano ben distribuite nel comparto

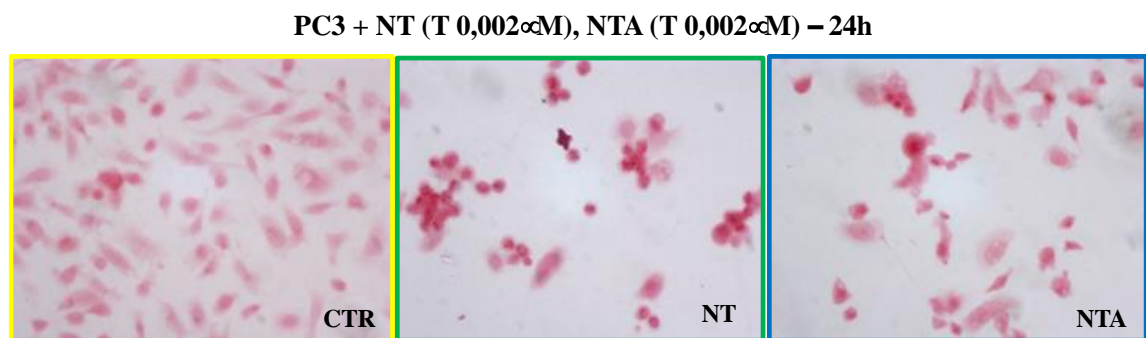
citoplasmatico ed inoltre il nucleo, colorato con DAPI, non mostrava anomalie strutturali riferibili a processi apoptotici (Fig. 6A, B, C). Queste osservazioni concordano con i risultati sopradescritti in cui il numero di cellule vitali resta invariato così come la loro attività metabolica.



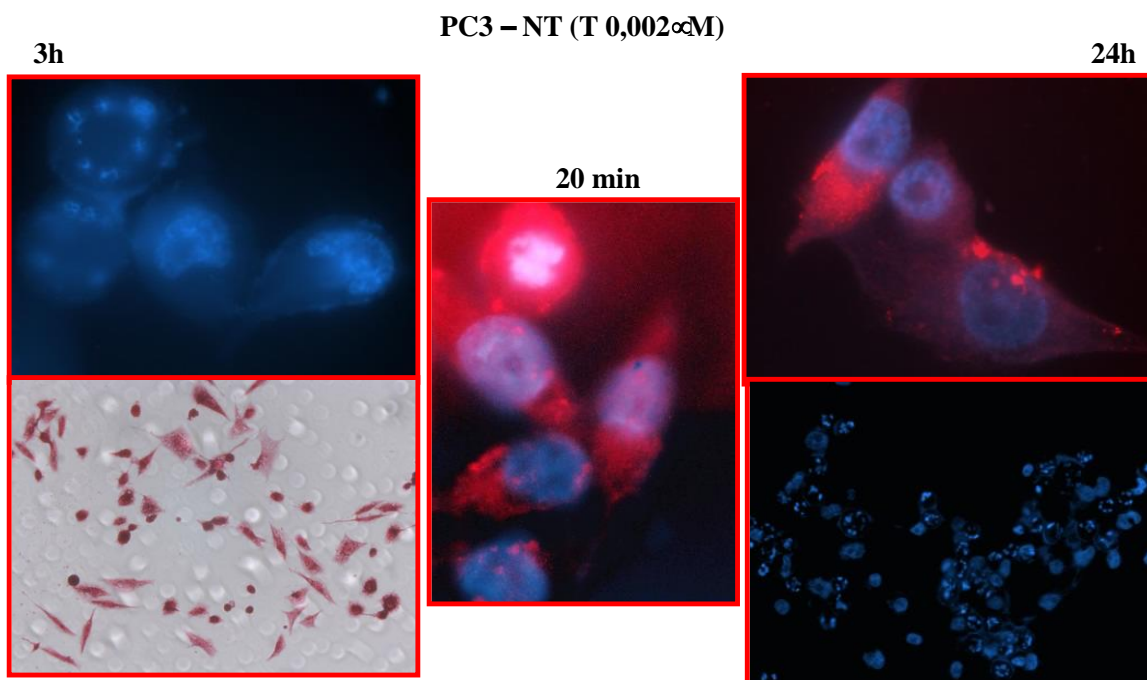
**Fig. 6.** Le cellule della linea PC3 sono state poste in coltura, trattate e colorate in parallelo con colorazione al Blu di Prussia (D, E, F) e fluorocromo Cy3.5 (A, B, C). in entrambe le serie di pannelli si può apprezzare la presenza delle nanoparticelle in maniera consistente all'interno del citoplasma, ma non si denota alcun danno né a livello nucleare, né a livello morfologico a tempi molto brevi (20 min) o maggiori (2h e 4h).

Nelle cellule inoculate con NT ed NTA già dopo 20' di trattamento sono visibili al microscopio ottico cellule con una riduzione delle dimensioni riconducibili ad un processo di condensazione citoplasmatica (Fig. 7). Questo effetto potrebbe essere riconducibile alla

più alta biodisponibile del T vista la maggiore dinamica di flusso delle N nelle PC3 evidenziato dall'analisi eseguita in HPLC. Infatti, dopo 24h di contatto viene osservata un'evidente alterazione morfologica seguita da una riduzione del numero di cellule riconducibile all'effetto del T (Fig. 7). Come risaputo l'azione farmacologica del T consiste nell'inibire l'assemblaggio della tubulina con conseguente inibizione del fuso mitotico. Ciò comporta inevitabilmente l'arresto del ciclo che si traduce in una contrazione cellulare ben visibile microscopicamente (Fig. 7) plausibile all'insorgere del processo apoptotico. Le cellule trattate con NT alterano la propria struttura morfologica divenendo sferiche ed addensate o mostrano una morfologia "a vela", in cui lo stato di sofferenza determina la formazione di citoplasma dilatato e di un nucleo ipertrofico (Fig. 7). Le stesse cellule colorate con DAPI e osservate al microscopio a fluorescenza mostravano frammentazione nucleare e cromosomi non condensati segni riconducibili ad un processo di catastrofe mitotica (Fig. 8) che sfociano in morte cellulare per apoptosi.



**Fig. 7.** Le cellule PC3 trattate con NT e NTA mostrano dopo 24h di trattamento una morfologia caratteristica, dove si nota la presenza di cellule "a vela" e citoplasma contratto. Nel caso del trattamento con N, anche dopo 24h, non si possono fare le stesse osservazioni.

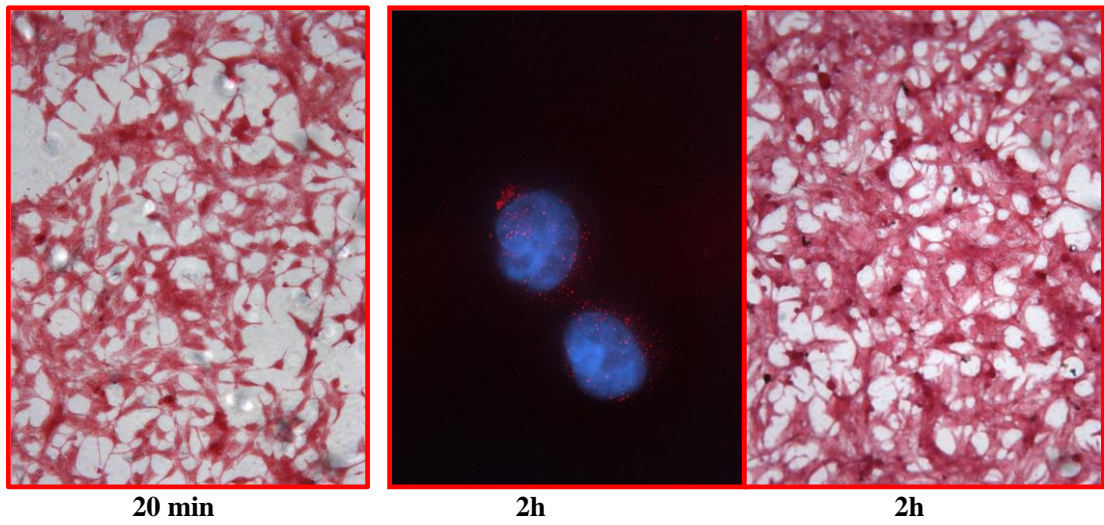


**Fig.8.** Le stesse cellule della linea PC3 trattate con N, in parallelo sono state trattate con NT per tempi diversi e ciò ha evidenziato l'effetto del farmaco già dopo breve tempo, ma principalmente (e come atteso) a 24h tramite colorazione nucleare con il DAPI.

Le analisi microscopiche effettuate sulle LNCaP evidenziano la presenza di N nel comparto citoplasmatico già dopo 20 min. L'osservazione è in linea con i risultati ottenuti dall'analisi in HPLC. L'unica differenza da annotare tra la linea di PC3 e LNCaP sta nella diversa velocità di efflusso delle N. Questo effetto potrebbe essere giustificato dal più alto livello di espressione delle proteine MDR (Multidrug Resistance Protein) nelle linee di PC3 rispetto alle LNCaP.

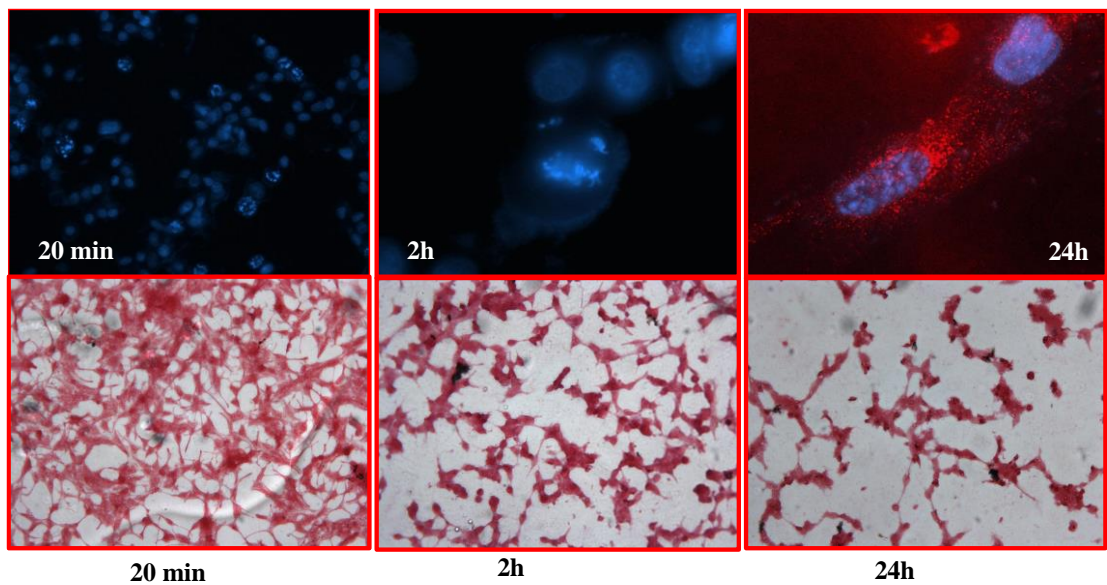


LNCaP +N 0,13 mM - 20 min; 2h; 24h.



**Fig. 9.** Le cellule della linea LNCaP presentano le N all'interno del citoplasma, ma in maniera meno marcata rispetto alle PC3 allo stesso tempo, 2h. Anche in questo caso, comunque la morfologia non appare mutata.

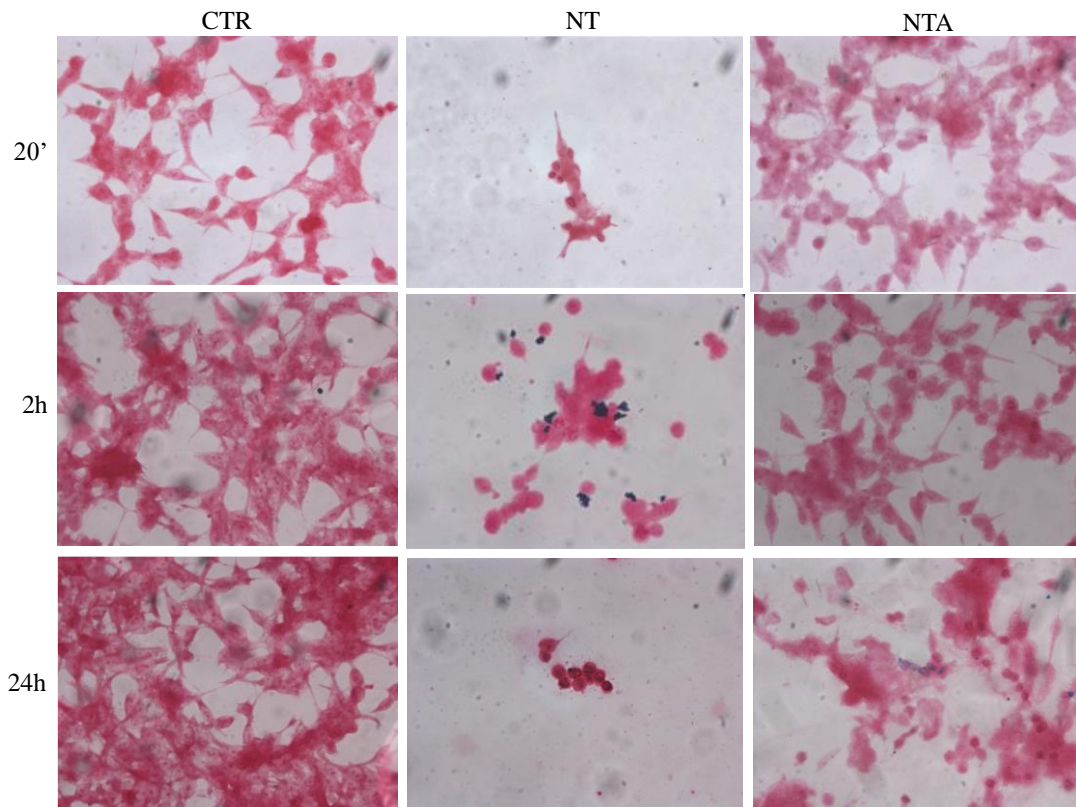
LNCaP +NT (Fe 0,13mM; T 0,002mM) - 20 min; 2h; 24h.



**Fig. 10.** Il trattamento con NT ha comportato nella linea LNCaP la catastrofe mitotica dopo 2h di trattamento e il cambio morfologico con retrazione del citoplasma dopo 24h.

Le LNCaP inoculate con NT dopo 2h di contatto mostrano alterazione morfologica, che risulta maggiormente evidente dopo 24h, anche se in minor percentuale rispetto alle PC3 (Fig.11).

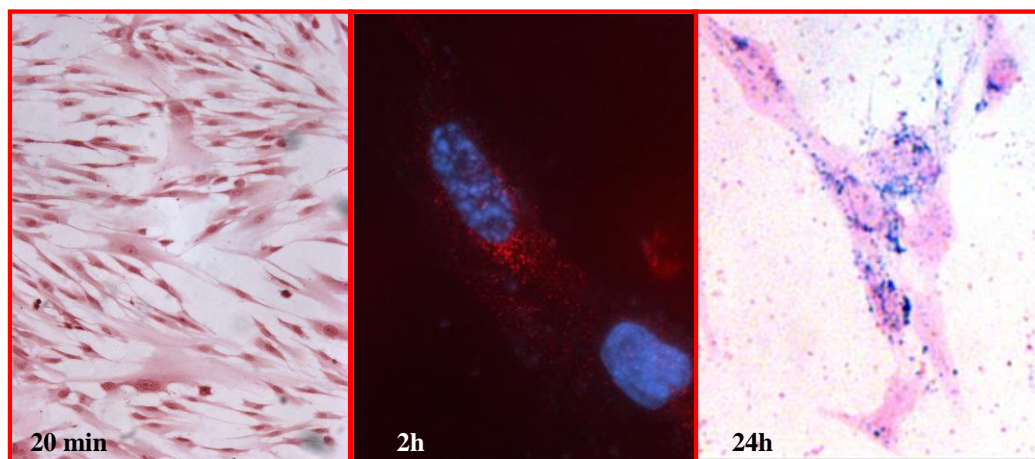
**LNCaP + N 0,13 mM, NT (T 0,002 $\mu$ M), NTA (T 0,002 $\mu$ M) – 20 min, 2h, 24h.**



**Fig. 11.** Anche nel caso della linea LNCaP le N legate a tassolo comportano un effetto fortemente citotossico, visibile, seppur in modo meno marcato, anche nel trattamento con NTA. L'effetto è visibile già a tempi molto breve(20 min), risulta più marcato dopo 2h di trattamento e catastrofico dopo 24h.

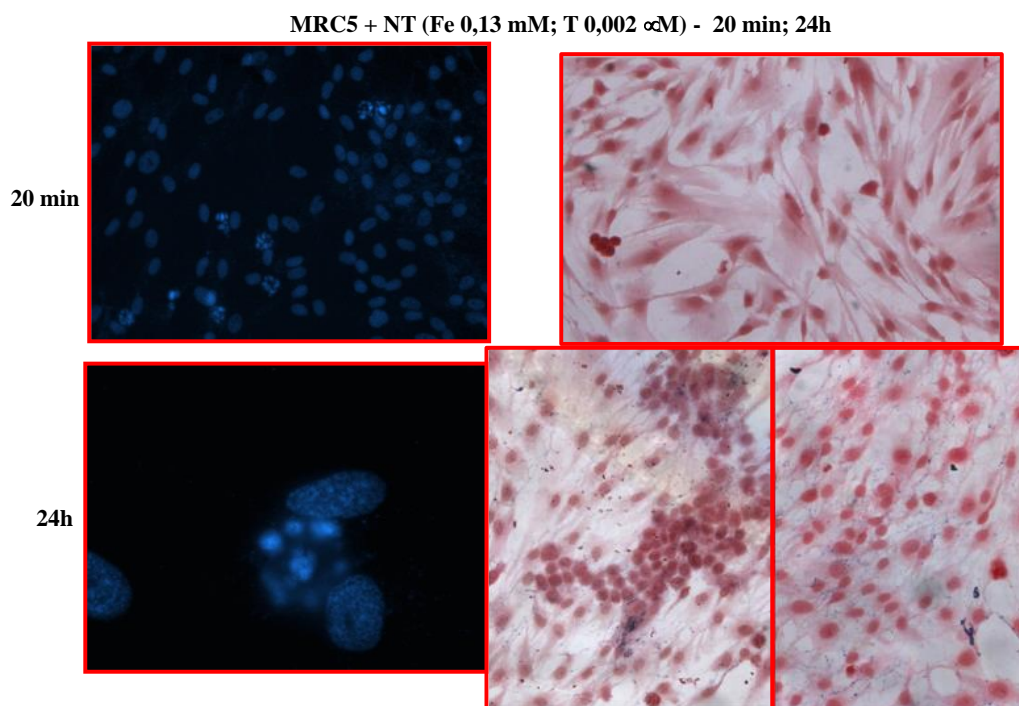
Le MRC5 trattate con N presentano una marcata concentrazione nel citoplasma e intorno al nucleo, ma risultano integre per forma e struttura, mantenendo anche salde le interconnessioni, che per queste cellule sono particolarmente importanti nella formazione del fitto monostrato. (Fig.12)

MRC5 + N 0,13mM - 20 min; 2h; 24h.



**Fig. 12.** Le cellule MRC5 incorporano le N, che, dopo 2h, sono ben visibili in fluorescenza, occupando, come nel caso delle altre linee tumorali, tutto lo spazio disponibile all'interno del citoplasma. Dopo 24h la presenza delle N risulta ben visibile con un precipitato consistente e molto diffuso anche tramite la colorazione al blu di Prussia.

Quando le MRC5 sono trattate con NT a tempi brevi (20 min e 2h) non riscontriamo particolari differenze rispetto al controllo, ma dopo 24h notiamo anche per queste cellule il tipico cambio morfologico strutturale, pur mantenendo la conformazione in monostrato. Nel comparto nucleare sono apprezzabili segni di catastrofe mitotica anche se il substrato cellulare mantiene integra la struttura e l'adesione al vetrino. (Fig. 13)



**Fig. 13.** Le MRC5 a tempi brevi non presentano alcun segno di reazione al trattamento con NT. Dopo 24h di contatto con il complesso, invece, si riscontrano contrazione citoplasmatica e segni di catastrofe mitotica, quindi .

L'indagine condotta tramite il test di vitalità con il colorante Trypan blu sulle linee tumorali PC3 ed LNCaP, ha evidenziato un picco nell'effetto citotossico tardivo per la linea LNCaP (72h) rispetto alle PC3 (48h), che si quantifica in circa 24h (dati non mostrati). Il test è stato condotto preliminarmente al comet test per ottenere indicazioni di ordine generale.

Studi sperimentali condotti su linfociti di donatori sani isolati dal sangue periferico e trattati con diverse concentrazioni di T e vitamina B12, hanno dimostrato che l'azione del farmaco non è unicamente legata al blocco del fuso mitotico, ma bensì anche alla capacità di generare ROS (Alzoubi K et al, 2013). I risultati ottenuti dagli esperimenti condotti presso il nostro laboratorio hanno dimostrato che l'inoculo del T nelle linee tumorali di prostata a

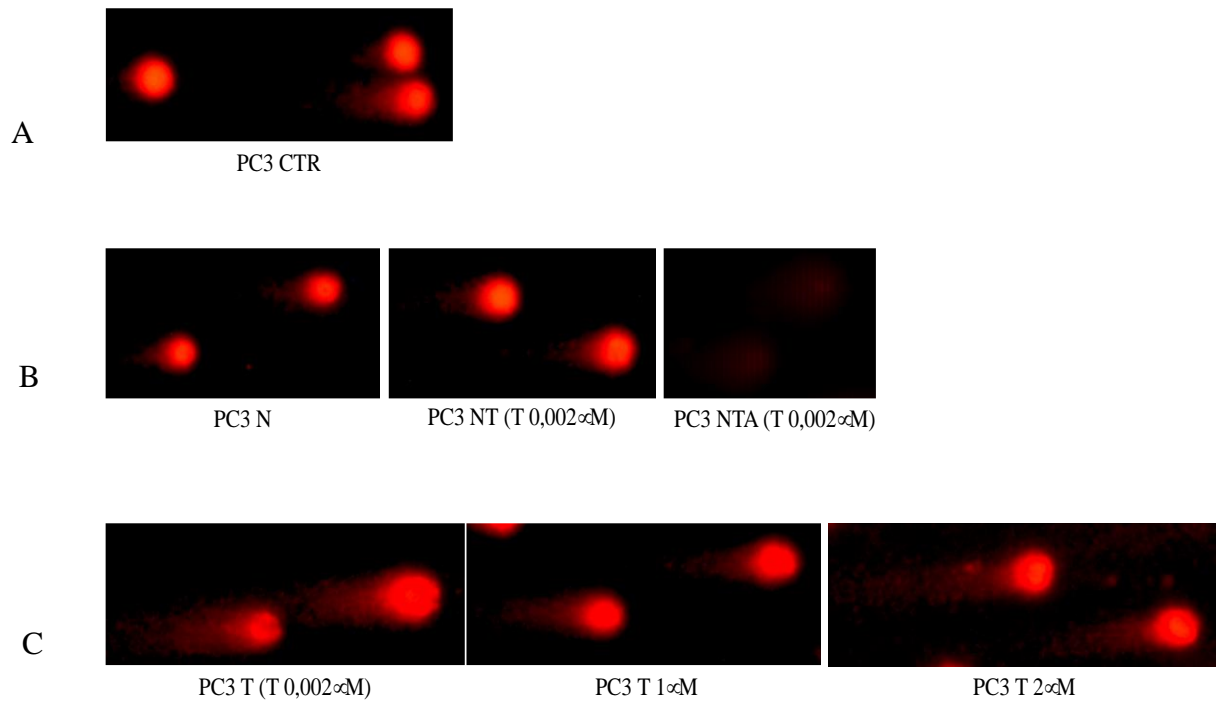
concentrazioni di 0,002  $\mu\text{M}$  che a quella terapeutica (2  $\mu\text{M}$ ), hanno indotto un danno genotossico come rilevato dal Comet Test. Come ipotizzato dai risultati ottenuti dai test di vitalità (compresi la colorazione vitale con trypan blue e il cristal violetto, di cui non riportiamo i risultati), le cellule inoculate con N presentavano una più bassa vitalità riconducibile all'incremento dei ROS in seguito al trattamento.

Anche per quanto riguarda la valutazione del danno genotossico le linee cellulari trattate con N esibivano un incremento della percentuale di DNA nella coda (% Tail DNA). Tale incremento seppur presente in entrambe le linee cellulari, risultava più significativo nelle PC3 ( $P < 0,001$ ) rispetto alle LNCaP ( $P < 0,01$ ), ciò potrebbe essere un ulteriore dato a sostegno della nostra ipotesi di una maggiore capacità delle PC3 di internalizzare le N.

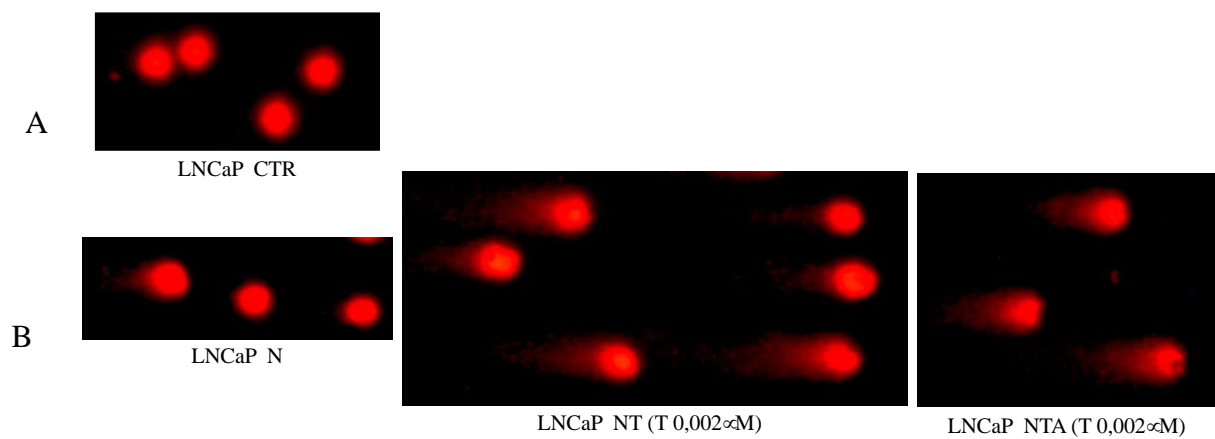
Quando il monostrato cellulare veniva messo a contatto con NT, come riportato nella Fig. 14, un marcato aumento del danno genotossico era evidenziato in entrambe le linee. Tale incremento non trova significatività se confrontato con il dato ottenuto in seguito all'inoculo di T alla stessa concentrazione di quella adsorbita alle N per la linea LNCaP. Diversamente, la linea di PC3 mostrava un incremento altamente significativo ( $P < 0,01$ ) del danno al DNA quando confrontato sia con la corrispettiva dose libera di T, che con quella di 2  $\mu\text{M}$ .

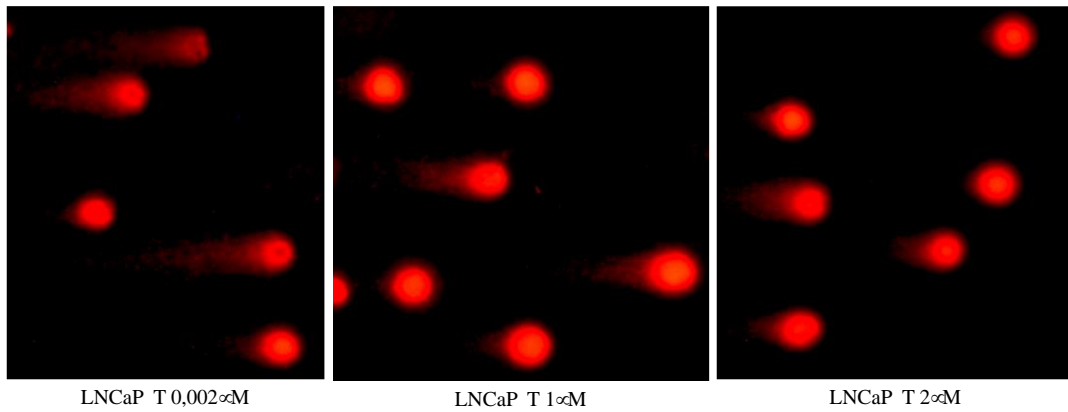
Nel caso del trattamento con NTA, si osserva un danno genotossico apparentemente maggiore rispetto a quello generato dal complesso NT (Fig. 14 B e 15 B), specie per la linea PC3 (Fig. 14 B), ma dall'istogramma non si evidenzia una differenza statisticamente significativa né rispetto al trattamento con NT, né rispetto a quello con T libero (Fig.16).

Questi dati gettano luce sulla capacità delle N di essere internalizzate molto più rapidamente nelle linee PC3 rispetto alle LNCaP riuscendo a veicolare una quantità di T tale da determinare un danno genotossico superiore a quello che riesce a provocare il farmaco libero anche alle concentrazioni più alte (Fig.16).



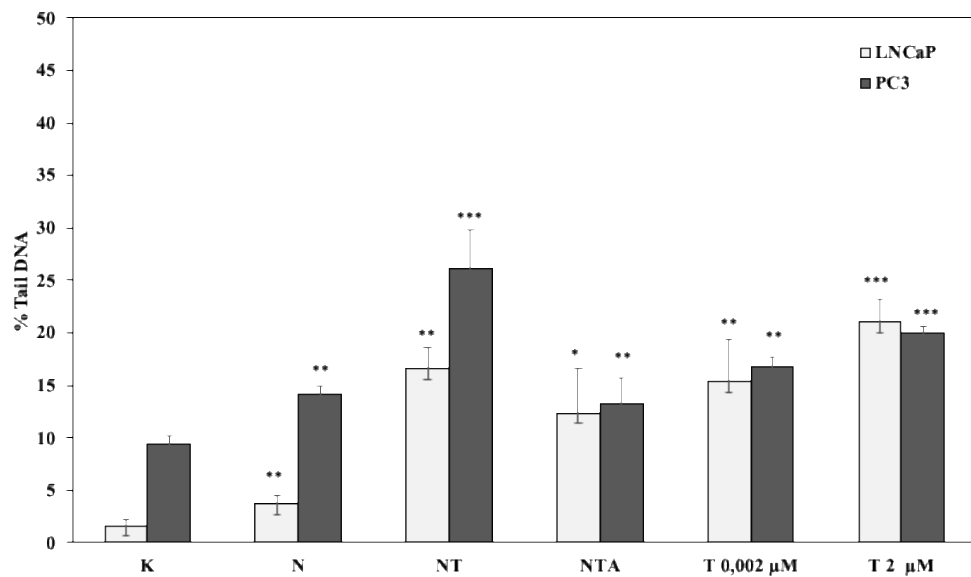
**Fig. 14.** Il comet test effettuato sulle PC3 ha dimostrato l'esistenza di un danno genotossico nelle cellule trattate con NT, che sembrerebbe ancora più marcato nel trattamento con NTA, persino rispetto a quello provocato dal T libero a tutte le concentrazioni applicate.





C

**Fig. 15.** Il comet test effettuato sulle LNCaP evidenzia un danno genotossico in quelle cellule trattate con NT e NTA, che sembrerebbe paritetico a quello provocato dal T libero.



**Fig.16.** Rappresentazione schematica dell'esito del comet test sulle due linee tumorali di LNCaP e PC3 dopo trattamento con N (0,13mM), NT (T 0,002μM), NTA (T 0,002μM) e Paclitaxel libero (0,002 μM, 1 μM e 2 μM). Tramite l'istogramma si può confermare la presenza di un danno genotossico causato in maniera statisticamente significativo da NT a danno delle LNCaP, ma soprattutto delle PC3.

#### **4. CONCLUSIONI**

I risultati degli esperimenti riportati in questa tesi, analizzano i potenziali utilizzi delle N ferromagnetiche in prevenzione terziaria con particolare riferimento al trattamento delle patologie cronico-degenerative su base oncologica. Le caratteristiche chimico-fisiche delle N, la possibilità di essere coniugate ad una qualsiasi molecola e di essere veicolate e riscaldate quando eccitate con un campo magnetico, rendono le N degli ottimi candidati nella prevenzione e cura delle patologie tumorali. Infatti, oltre ad essere inerti, possono oltrepassare facilmente e rapidamente le membrane biologiche, essere veicolate al sito di interesse e, tramite campo magnetico alternato, eccitate fino ad emettere calore, potenziando così l'effetto citotossico del farmaco liberato che risulta più attivo a temperature maggiori (42 °C).

La letteratura documenta ampiamente l'utilizzo delle N ferromagnetiche nella diagnostica classificandole come materiale scarsamente tossico. Risultati analoghi sono stati ottenuti *in vitro* sulle linee di carcinoma prostatico da noi utilizzate (LNCaP, PC3) e sui fibroblasti dell'epitelio polmonare embrionale umani (MRC5). Il legame del T alle N eseguito dalla ditta Colorobbia s.r.l. ci ha permesso di stabilire l'effettivo valore farmacologico del complesso ed inoltre di poterlo tracciare al microscopio previa opportuna colorazione. Le immagini microscopiche ottenute dimostrano chiaramente come le N riescono ad oltrepassare la membrana accumulandosi nel comparto citoplasmatico. Ulteriori indagini eseguite in HPLC descrivono come la distribuzione delle N tra il terreno di crescita e il comparto cellulare avvenga con dinamiche del tutto diverse tra le due linee prese in considerazione. Ciò rappresenta una ulteriore conferma del processo passivo con cui le N oltrepassano le membrane, ma di come, successivamente, le stesse N sono eliminate e il processo risulta più rapido in quelle cellule che hanno acquisito un'elevata capacità di



espulsione delle macromolecole attraverso i canali delle proteine MDR. Infatti, le PC3 linea tumorale originata dalla prostata, ma isolata da focolai metastatici alle ossa, mostra una dinamica di espulsione e internalizzazione delle N molto più attiva rispetto alle LNCaP, caratteristica che le rende molto meno sensibili nella pratica clinica ai piani terapeutici applicati nei soggetti con metastasi prostatiche.

Tutte le prove eseguite sia tramite test MTT e di efficienza clonale hanno evidenziato che le N da sole non presentavano effetti citotossici degni di nota, allo stesso tempo le NT determinavano un marcato incremento della mortalità sia nelle PC3 che nelle LNCaP anche quando paragonate alle stesse dosi di T libero. Ulteriori indagini eseguite con NT complessate con un aptamero (A10) allo scopo di veicolare in modo mirato le NT su quelle cellule che esprimono il recettore di membrana PSMA, hanno evidenziato che non vi sono sostanziali differenze riconducibili all'azione farmacologica del T nelle LNCaP anche se la linea, notoriamente, esprime il PSMA a differenza delle PC3.

Il tassolo, utilizzato per la capacità di inibire la formazione del fuso mitotico con conseguente innesco dei processi apoptotici, quando utilizzato legato alle N ha la capacità di determinare un danno genotossico, che, ricerche condotte da altri autori, riconducono alla genesi di ROS. I nostri dati dimostrano che il T legato alle N determina la rottura del DNA in piccole porzioni a singolo filamento in entrambe le linee anche se il livello di danno genotossico è più marcato nelle PC3, questo potrebbe essere riconducibile alla maggiore capacità di internalizzazione delle N. Risulta degno di nota il fatto che la mortalità delle cellule trattate con il NT raggiunge valori più alti rispetto a quelle trattate con il T libero a concentrazioni anche mille volte più alte rispetto a quello coniugato alle NT.

In conclusione i dati ottenuti mostrano come le caratteristiche biologiche delle cellule utilizzate e quindi dei tessuti che da esse derivano, sono un fattore vincolante nell'applicabilità della terapia. Il più alto tasso di mortalità delle PC3 in risposta al trattamento con NT è riconducibile alla caratteristica intrinseca delle cellule tumorali più

maligne che sviluppano strategie di espulsione e/o internalizzazione delle molecole biologiche come il glutathione indispensabile alla sopravvivenza.

Questa caratteristica di per sé segno di aggressività del tumore può rappresentare una via utilizzabile in prevenzione terziaria in quei soggetti che, nonostante il trattamento farmacologico e/o chirurgico suggerito dagli specialisti del settore, si ritrovano ad affrontare una condizione di malattia cronica in cui l'unico intervento possibile è rappresentato dalla possibilità di rallentare il decorso della malattia migliorando la qualità della vita.

## 5. **BIBLIOGRAFIA**

- Aderem A, Underhill DM. Mechanisms of phagocytosis in macrophages. *Annu Rev Immunol* 1999;17:593–623.
- Agnihotria S, Mukherjiabc S, Mukherji S. Size-controlled silver nanoparticles synthesized over the range 5–100 nm using the same protocol and their antibacterial efficacy. *RSC Adv* 2014;4:3974–83.
- Alzoubi K, Khabour O, Khader M, Mhaidat N, Al-Azzam S. Evaluation of vitamin B12 effects on DNA damage induced by paclitaxel. *Journal Drug and Chemical Toxicology*, Volume 37, 2014 - Issue 3. Pages 276-280. Doi: 10.3109/01480545.2013.851686.
- Andronico D, Del Carlo P. PM10 measurements in urban settlements after lava fountain episodes at Mt. Etna, Italy: pilot test to assess volcanic ash hazard to human health. *Nat Hazards Earth Syst Sci* 2016;16:29–40.
- Anselmo AC, Mitragotri S. A review of clinical translation of inorganic nanoparticles. *AAPS J.* 2015;17(5):1041–1054.
- Anselmo AC, Mitragotri S. *Bioeng Transl Med.* 2016 Jun 3;1(1):10-29. doi: 10.1002/btm2.10003. eCollection 2016 Mar. Nanoparticles in the clinic.
- Anselmo AC, Mitragotri S. Nanoparticles in the clinic. *Bioengineering & Translational Medicine* 2016; 1: 10-29.
- Baldi G, Ravagli C, Mazzantini F, Loudos G, Jaume Adan, Masa M, Psimadas D, Fragogeorgi EA, Locatelli E, Innocenti C, Sangregorio C, Franchini MC. *In vivo* anticancer evaluation of the hyperthermic efficacy of anti-human epidermal growth factor receptor-targeted PEG-based nanocarrier containing magnetic nanoparticles *International Journal of Nanomedicine* 2014;9 3037–3056
- Barsotti S, Andronico D, Neri A, Del Carlo P, Baxter PJ, Aspinall WP, et al. Quantitative assessment of volcanic ash hazards for health and infrastructure at Mt. Etna (Italy) by numerical simulation. *J Volcanol Geoth Res* 2010;192(1):85–96.
- Barua S, Mitragotri S. Challenges associated with penetration of nanoparticles across cell and tissue barriers: a review of current status and future prospects. *Nano Today.* 2014;9(2):223–243.
- *Bioeng Transl Med.* 2016 Jun 3;1(1):10-29. doi: 10.1002/btm2.10003. eCollection 2016 Mar.
- Biological definition of multiple chemical sensitivity from redox state and cytokine profiling and not from polymorphisms of xenobiotic- metabolizing enzymes. Chiara De Luca, Maria G. Scordo, Eleonora Cesareo, Saveria Pastore, Serena Mariani, Gianluca Maiani, Andrea Stancato, Beatrice Loreti, Giuseppe Valacchi, Carla Lubrano, Desanka Raskovic, Luigia De Padova, Giuseppe Genovesi, Liudmila G. Korkina. Pubblicato su *Toxicology and Applied Pharmacology* ;

- Biswas S, Torchilin VP. Nanopreparations for organelle-specific delivery in cancer. *Adv Drug Deliv Rev* 2014;66:26–41.
- Bona KR, Xu Y, Gray M, Fair D, Hayles H, Milad L, et al. Short- and long-term effects of prenatal exposure to iron oxide nanoparticles: influence of surface charge and dose on developmental and reproductive toxicity. *Int J Mol Sci* 2015;16(12):30251–6.
- Bonvalot S, Le Pechoux C, De Baere T, et al. Phase I study of NBTXR3 nanoparticles, in patients with advanced soft tissue sarcoma (STS). *J Clin Oncol.* 2014;32(15):.
- Borchard G, Fluhmann B, Muhlebach S. Nanoparticle iron medicinal products—requirements for approval of intended copies of non-biological complex drugs (NBCD) and the importance of clinical comparative studies. *Regul Toxicol Pharmacol.* 2012;64(2):324–328.
- Buzea C, Pacheco II, Robbie K. Nanomaterials and nanoparticles: sources and toxicity. *Biointerphases* 2007;2(4):MR17–71.
- Caromile LA, Dortche K, Rahman MM, Grant CL, Stoddard C, Ferrer FA, Shapiro LH. PSMA redirect cell survival signaling from the MAPK to the PI3K-AKT pathways to promote the progression of prostate cancer. *Sci Signal* 10(470): doi:10.1126/scisignal.aag3326. PMC 2017.
- Case-control study of genotypes in multiple chemical sensitivity: CYP2D6, NAT1, NAT2, PON1 and MTHFR. Gail McKeown-Eyssen, Cornelia Baines, David EC Cole, Nicole Riley, Rachel F Tyndale, Lynn Marshall and Vartouhi Jazmaji. *Int. J. Epidemiol.* Advance Access published July 15, 2004 ;
- Chadda R, Howes MT, Plowman SJ, Hancock JF, Parton RG, Mayor S. Cholesterol-sensitive Cdc42 activation regulates actin polymerization for endocytosis via the GEEC pathway. *Traffic* 2007;8:702–17.
- Chang SS. Overview of Prostate Specific Membrane Antigen. *Reviews in Urology.* Vol.6 suppl 10, 2004.
- Chowdhury R, Ellis P. Trastuzumab (Herceptin®) and ado-trastuzumab emtansine (Kadcyla®): treatments for HER2-positive breast cancer. *Handbook of Therapeutic Antibodies: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA;* 2014:2041–2068.
- Conner S, Schmid SL. Regulated portals of entry into the cell. *Nature* 2003;422:37–44.
- Coyne DW, Auerbach M. Anemia management in chronic kidney disease: intravenous iron steps forward. *Am J Hematol.* 2010;85(5): 311–312.
- Danielson BG. Structure, chemistry, and pharmacokinetics of intravenous iron agents. *J Am Soc Nephrol.* 2004;15(suppl 2):S93–S98.
- Day ES, Zhang L, Thompson PA, et al. Vascular-targeted photothermal therapy of an orthotopic murine glioma model. *Nanomedicine.* 2012;7(8):1133–1148.
- Denmeade SR, Sokoll LJ, Dalrymple S, et al. Dissociation between androgen responsiveness for malignant growth vs. expression of prostate specific differentiation

markers PSA, hK2, and PSMA in human prostate cancer models. *Prostate*. 2003;54:249–257.

- Dr. Martin Pall Multiple Chemical Sensitivity: Toxicological and Sensitivity Mechanisms. [http://mcs-danmark.dk/home/sites/default/files/documents/pdf/277\\_N-MCSbrief.pdf](http://mcs-danmark.dk/home/sites/default/files/documents/pdf/277_N-MCSbrief.pdf).
- Duramad O, Laysang A, Li J, Ishii Y, Namikawa R. Pharmacologic expansion of donor-derived, naturally occurring CD41 Foxp31 regulatory T cells reduces acute graft-versus-host disease lethality without abrogating the graft-versus-leukemia effect in murine models. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2011;17(8):1154–1168.
- Flockhart DA. Drug Interactions: Cytochrome P450 Drug Interaction Table. Indiana University School of Medicine (2007). “/clinpharm/ddis/clinical-table/” <http://medicine.iupui.edu/clinpharm/ddis/>;
- Fröhlich E. The role of surface charge in cellular uptake and cytotoxicity of medical nanoparticles. *Int J Nanomedicine* 2012;7:5577–91.
- Gabriella Facciola, Maria Gabriella Scordo. Citocromo P450 e interazioni tra farmaci. Istituto di Farmacologia - Università degli Studi di Messina. <http://www.farmacovigilanza.org/corsi/facciola/all.htm>;
- Genecards: Espressione del gene, modifiche, disturbi associati, pubblicazioni scientifiche. [www.genecards.org](http://www.genecards.org);
- Gold S, Monaghan P, Mertens P, Jackson T. A clathrin independent macropinocytosis-like entry mechanism used by bluetongue virus-1 during infection of BHK cells. *PLoS One* 2010;5:e11360.
- Groves E, Dart AE, Covarelli V, Caron E. Molecular mechanisms of phagocytic uptake in mammalian cells. *Cell Mol Life Sci* 2008;65(13):1957–76.
- Guarnieri D, Sabella S, Muscetti O, Belli V, Malvindi MA, Fusco S, et al. Transport across the cell-membrane dictates nanoparticle fate and toxicity: a new paradigm in nanotoxicology. *Nanoscale* 2014;6(17):10264–73.
- Gupta AK, Gupta M. Synthesis and surface engineering of iron oxide nanoparticles for biomedical applications. *Biomaterials*. 2005; 26(18):3995–4021.
- Hansen CG, Nichols BJ. Molecular mechanisms of clathrin-independent endocytosis. *J Cell Sci* 2009;122(11):1713–21.
- Henry BD, Neill DR, Becker KA, et al. Engineered liposomes sequester bacterial exotoxins and protect from severe invasive infections in mice. *Nat Biotechnol*. 2015;33(1):81–88.
- Hill MM, Bastiani M, Luetterforst R, Kirkham M, Kirkham A, Nixon SJ, et al. PTRF-Cavin, a conserved cytoplasmic protein required for caveola formation and function. *Cell* 2008;132:113–24.

- Hirsch LR, Stafford R, Bankson J, et al. Nanoshell-mediated near- infrared thermal therapy of tumors under magnetic resonance guidance. *Proc Natl Acad Sci.* 2003;100(23):13549–13554.
- Horwell CJ. Grain-size analysis of volcanic ash for the rapid assessment of respiratory health hazard. *J Environ Monit* 2007;9:1107–15.
- Howard M, Zern BJ, Anselmo AC, Shuvaev VV, Mitragotri S, Muzykantov V. Vascular targeting of nanocarriers: perplexing aspects of the seemingly straightforward paradigm. *ACS Nano.* 2014;8(5):4100–4132.
- Hrkach J, Von Hoff D, Mukkaram Ali M, et al. Preclinical development and clinical translation of a PSMA-targeted docetaxel nanoparticle with a differentiated pharmacological profile. *Sci Transl Med.* 2012;4(128):128ra139.
- Implication of xenobiotic metabolizing enzyme gene (CYP2E1, CYP2C19, CYP2D6, mEH and NAT2) polymorphisms in breast carcinoma February 2008 *BMC Cancer* 8(1):109 DOI: 10.1186/1471-2407-8-109 Achraf Khedhaier, Elham Hassen, Nouredine Bouaouina, Show all 6 authors, Lotfi Chouchane]
- Intolleranza agli xenobiotici ambientali: evidenze cliniche Piero Faa, M. Valeria Faa. *Il Cesalpino* 42/2016 *Ambiente e Salute*;
- Iversen TG, Frerker N, Sandvig K. Uptake of ricinB-quantum dot nanoparticles by a macropinocytosis-like mechanism. *J Nano- biotechnol* 2012;10(33):10–33.
- Jana NR, Gearheart L, Murphy CJ. Seeding growth for size control of 5–40 nm diameter gold nanoparticles. *Langmuir* 2001;17(22):6782–6.
- Jana NR, Gearheart L, Murphy CJ. Seeding growth for size control of 5–40 nm diameter gold nanoparticles. *Langmuir* 2001;17(22):6782–6.
- Jiang X, Röcker C, Hafner M, Brandholt S, Dörlich RM, Nienhaus GU. Endo- and exocytosis of zwitterionic quantum dot nanoparticles by live HeLa cells. *ACS Nano* 2010;4(11):6787–97.
- Kadar E, Fisher A, Stolpe B, Calabrese S, Lead J, Valsami-Jones E, et al. Colloidal stability of nanoparticles derived from simulated cloud-processed mineral dusts. *Sci Total Environ* 2014;466– 467:864–70.
- Kaiser E, Chiba P, Zaky K. Phospholipases in biology and medicine. *Clin Biochem.* 1990;23(5):349–370.
- Kamaly N, Xiao Z, Valencia PM, Radovic-Moreno AF, Farokhzad OC. Targeted polymeric therapeutic nanoparticles: design, development and clinical translation. *Chem Soc Rev.* 2012;41(7):2971–3010.
- Katayama K, Nomura H, Ogata H, Eitoku T. Diffusion coefficients for nanoparticles under flow and stop-flow conditions. *Phys Chem Chem Phys* 2009;11:10494–9.
- Kirchhausen T. Clathrin. *Annu Rev Biochem* 2000;69:699–727.

- Kirkham M, Fujita A, Chadda R, Nixon SJ, Kurzchalia TV, Sharma DK, et al. Ultrastructural identification of uncoated caveolin-independent early endocytic vehicles. *J Cell Biol* 2005;168(3):465–76.
- Klibanov AL. Microbubble contrast agents: targeted ultrasound imaging and ultrasound-assisted drug-delivery applications. *Invest Radiol*. 2006;41(3):354–362.
- Koua L, Suna J, Zhaib Y, Hea Z. The endocytosis and intracellular fate of nanomedicines: implication for rational design. *Asian J Pharm Sci* 2013;8(1):1–10.
- Kyrychenko A, Freitas JA, He J, Tobias DJ, Wimley WC, Ladokhin AS. Structural plasticity in the topology of the membrane-inter-acting domain of HIV-1 gp41. *Biophys J* 2014;106(3):610–20.
- Laboratorio Genoma: Farmacogenetica. La variabilità inter-individuale nella risposta ai farmaci. [http://www.laboratoriogenoma.eu/prestazioni\\_categoria.asp?IdCat=31](http://www.laboratoriogenoma.eu/prestazioni_categoria.asp?IdCat=31);
- Larsen JE, Henriksen JR, Bæksted M, Andresen TL, Jacobsen GK, Jørgensen K. Liposome-based drug delivery using secretory phospholipase A2 as a tumor-specific release mechanism: preclinical evaluation of efficacy, pharmacokinetics, and individual patient expression profiles. *Clin Cancer Res*. 2006;12(suppl 19):B24–B24.
- Laurent S, Forge D, Port M, et al. Magnetic iron oxide nanoparticles: synthesis, stabilization, vectorization, physicochemical characterizations, and biological applications. *Chem Rev*. 2008;108(6): 2064–2110.
- Lombardo D, Ciancio N, Campisi R, Di Maria A, Bivona L, Poletti V, et al. A retrospective study on acute health effects due to volcanic ash exposure during the eruption of Mount Etna (Sicily) in 2002. *Multidiscip Respir Med* 2013;8(1):51.
- Long NV, Thi CM, Yong Y, Cao Y, Wu H, Nogami M. Synthesis and characterization of Fe-based metal and oxide based nanoparticles: discoveries and research highlights of potential applications in biology and medicine. *Recent Pat Nanotechnol* 2014;8(1):52–61.
- Long NV, Yang Y, Teranishi T, Thi CM, Cao Y, Nogami M. Bio-medical applications of advanced multifunctional magnetic nanoparticles. *J Nanosci Nanotechnol* 2015;15(12):10091–107.
- Macdougall IC. Evolution of iron compounds over the last century. *J Renal Care*. 2009;35(suppl 2):8–13.
- Macdougall IC. Evolution of iv iron compounds over the last century. *J Renal Care*. 2009;35(suppl 2):8–13.
- Maggiorella L, Barouch G, Devaux C, et al. Nanoscale radiotherapy with hafnium oxide nanoparticles. *Future Oncol*. 2012;8(9):1167– 1181.
- Malacards (humans diseases database): Elenco complete delle malattie associate alle mutazioni genetiche. <http://www.malacards.org> ;

- Malandrino P, Scollo C, Marturano I, Russo M, Tavarelli M, Attard M, et al. Descriptive epidemiology of human thyroid cancer: experience from a regional registry and the “volcanic factor”. *Front Endocrinol (Lausanne)* 2013;4:65.
- Mastorakos P, Song E, Zhang C, et al. Biodegradable DNA nano- particles that provide widespread gene delivery in the brain. *Small*. 2016;12:678–685.
- Mills OP, Rose WI. Shape and surface area measurements using scanning electron microscope stereo-pair images of volcanic ash particles. *Geosphere* 2010;6(6):805–11.
- Mirre C, Monlauzeur L, Garcia M, Delgrossi MH, Le Bivic A. Detergent-resistant membrane microdomains from Caco-2 cells do not contain caveolin. *Am J Physiol* 1996;271(3 Pt 1):C887–94.
- Monick MM, Baltrusaitis J, Powers LS, Borcharding JA, Caraballo JC, Mudunkotuwa I, et al. Effects of Eyjafjallajökull volcanic ash on innate immune system responses and bacterial growth in vitro. *Environ Health Perspect* 2013;121(6):691–8.
- Moscatelli A, Ciampolini F, Rodighiero S, Onelli E, Cresti M, Santo N, et al. Distinct endocytic pathways identified in tobacco pollen tubes using charged nanogold. *J Cell Sci* 2007;120(21):3804–19.
- Mulherkar N, Raaben M, de la Torre JC, Whelan SP, Chandran K. The Ebola virus glycoprotein mediates entry via a non- classical dynamin-dependent macropinocytic pathway. *Virology* 2011;419:72–83.
- Mun AE, Hannell C, Rogers SE, Hole P, Williams AC, Khutoryanskiy VV. On the role of specific interactions in the diffusion of nanoparticles in aqueous polymer solutions. *Langmuir* 2014;30(1):308–17.
- Muro S, Wiewrodt R, Thomas A, Koniaris L, Albelda SM, Muzykantov VR, et al. A novel endocytic pathway induced by clustering endothelial ICAM-1 or PECAM-1. *J Cell Sci* 2013;116:1599–609.
- Na HB, Song IC, Hyeon T. Inorganic nanoparticles for MRI contrast agents. *Adv Mater*. 2009;21(21):2133–2148.
- NCBI (National Center for Biotechnology Information): Informazioni biomediche e genetiche. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov>
- Ng CT, Tang FM, Li JJ, Ong C, Yung LL, Bay BH. Clathrin-mediated endocytosis of gold nanoparticles in vitro. *Anat Rec (Hoboken)* 2015;298(2):418–27.
- Ohye H, Sugawara M. Dual oxidase, hydrogen peroxide and thyroid diseases. *Biol Med (Maywood)* 2010;235(4): 424–33.
- Otsuka H, Nagasaki Y, Kataoka K. PEGylated nanoparticles for biological and pharmaceutical applications. *Adv Drug Deliv Rev*. 2003; 55(3):403–419.
- Panariti A, Misericocchi G, Rivolta I. The effect of nanoparticle uptake on cellular behavior: disrupting or enabling functions? *Nanotechnol Sci Appl* 2012;5:87–100.



- Peer D, Karp JM, Hong S, Farokhzad OC, Margalit R, Langer R. Nanocarriers as an emerging platform for cancer therapy. *Nat Nanotechnol.* 2007;2(12):751–760.
- Pellegriti G, De Vathaire F, Scollo C, Attard M, Giordano C, Arena S, et al. Papillary thyroid cancer incidence in the volcanic area of Sicily. *J Natl Cancer Inst* 2009;101(22):1575–83.
- Petros RA, DeSimone JM. Strategies in the design of nanoparticles for therapeutic applications. *Nat Rev Drug Discov.* 2010;9(8):615– 627.
- Phillips E, Penate-Medina O, Zanzonico PB, et al. Clinical translation of an ultrasmall inorganic optical-PET imaging nanoparticle probe. *Sci Transl Med.* 2014;6(260):260ra149.
- Policard A, Bessis M. Pinocytosis (Lewis' phenomenon and its history). *Rev Hematol* 1959;14:487–95.
- Rose WI, Durant AJ. Fine ash content of explosive eruptions. *J Volcanol Geotherm Res* 2009;186(1–2):32–9.
- Ross JS, Slodkowska EA, Symmans WF, Pusztai L, Ravdin PM, Hortobagyi GN. The HER-2 receptor and breast cancer: ten years of targeted anti-HER-2 therapy and personalized medicine. *Oncology* 2009;14(4):320–368.
- Rudyaka VY, Dubtsov SN, Baklanov AM. Measurements of the temperature dependent diffusion coefficient of nanoparticles in the range of 295–600 K at atmospheric pressure. *J Aerosol Sci* 2009;40(10):833–43.
- Ruggeri RM, Campenni A, Baldari S, Trimarchi F, Trovato M. What is new on thyroid cancer biomarkers. *Biomark Insights* 2008;29(3):237–52.
- Sabella S, Carney RP, Brunetti V, Malvindi MA, Al-Juffali N, Vecchio G, et al. A general mechanism for intracellular toxicity of metal-containing nanoparticles. *Nanoscale* 2014;6(12):7052–61.
- Sakhrani NM, Padh H. Organelle targeting: third level of drug targeting. *Drug Des Devel Ther* 2013;7:585–99.
- Sato A, Itcho N, Ishiguro H, Okamoto D, Kobayashi N, Kawai K, Kasai H, Kurioka D, Uemura H, Kubota Y, Watanab M. Magnetic nanoparticles of  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  enhance docetaxel-induced prostate cancer cell death. *International Journal of Nanomedicine* 2013;8 3151–3160.
- Schellekens H, Stegemann S, Weinstein V, et al. How to regulate nonbiological complex drugs (NBCD) and their follow-on versions: points to consider. *AAPS J.* 2014;16(1):15–21.
- Schellekens H, Stegemann S, Weinstein V, et al. How to regulate nonbiological complex drugs (NBCD) and their follow-on versions: points to consider. *AAPS J.* 2014;16(1):15–21. ]

- Schutt EG, Klein DH, Mattrey RM, Riess JG. Injectable microbubbles as contrast agents for diagnostic ultrasound imaging: the key role of perfluorochemicals. *Angew Chem Int Ed.* 2003;42(28):3218–3235.
- Schwartz JA, Price RE, Gill-Sharp KL, et al. Selective nanoparticle- directed ablation of the canine prostate. *Lasers Surg Med.* 2011;43 (3):213–220.
- Serda RE, Adolphi NL, Bisoffi M, Sillerud LO. Targeting and cellular trafficking of magnetic nanoparticles for prostate cancer imaging. *Mol Imaging* 2007;6(4):277–88.
- Shang L, Nienhaus K, Nienhaus GU. Engineered nanoparti- cles interacting with cells: size matters. *J Nanobiotechnology* 2014;12(5):12–5.
- Stern JM, Solomonov VVK, Sazykina E, Schwartz JA, Gad SC, Goodrich GP. Initial evaluation of the safety of nanoshell-directed photothermal therapy in the treatment of prostate disease. *Int J Toxicol.* 2016;35:38–46.
- Sugawara M, Sugawara Y, Wen K, Giulivi C. Generation of oxygen free radicals in thyroid cells and inhibition of thyroid peroxi- dase. *Exp Biol Med (Maywood)* 2002;227(2):141–6.
- Suk JS, Xu Q, Kim N, Hanes J, Ensign LM. PEGylation as a strategy for improving nanoparticle-based drug and gene delivery. *Adv Drug Deliv Rev.* 2016;99:28–51.
- Tang BC, Dawson M, Lai SK, et al. Biodegradable polymer nano- particles that rapidly penetrate the human mucus barrier. *Proc Natl Acad Sci.* 2009;106(46):19268–19273.
- Teeguarden JG, Hinderliter PM, Orr G, Thrall BD, Pounds JG. Particokinetics in vitro: dosimetry considerations for in vitro nanoparticle toxicity assessments. *Toxicol Sci* 2007;95:300–12.
- Trovato MC, Andronico D, Sciacchitano S, Ruggeri RM, Picerno I, Di Pietro A and Visalli G. Nanostructures: between natural environment and medical practice. *Rev Environ Health.* 2018; 33(3): 295–307.
- Vogel CL, Cobleigh MA, Tripathy D, et al. Efficacy and safety of trastuzumab as a single agent in first-line treatment of HER2- overexpressing metastatic breast cancer. *J Clin Oncol.* 2002;20(3): 719–726.
- Wang T, Bai J, Jiang X, Nienhaus GU. Cellular uptake of nanopar- ticles by membrane penetration: a study combining confocal microscopy with FTIR spectroelectrochemistry. *ACS Nano* 2012;28(2):1251–9.
- Wang Y-XJ, Hussain SM, Krestin GP. Superparamagnetic iron oxide contrast agents: physicochemical characteristics and applications in MR imaging. *Eur Radiol.* 2001;11(11):2319–2331.
- Wickham T, Futch K. Abstract P5-18-09: a phase I study of MM- 302, a HER2-targeted liposomal doxorubicin, in patients with advanced, HER2-positive breast cancer. *Cancer Res.* 2012;72(suppl 24):P5-18-09.

- Yang H, Liu C, Yang D, Zhang H, Xi Z. Comparative study of cytotoxicity, oxidative stress and genotoxicity induced by four typical nanomaterials: the role of particle size, shape and composition. *J Appl Toxicol* 2009;29(1):69–78.
- Zagar TM, Vujaskovic Z, Formenti S, et al. Two phase I dose-escalation/pharmacokinetics studies of low temperature liposomal doxorubicin (LTLTD) and mild local hyperthermia in heavily pretreated patients with local regionally recurrent breast cancer. *Int J Hyperthermia*. 2014;30(5):285–294.