



**Politecnico
di Torino**

*Corso di laurea in
INGEGNERIA BIOMEDICA*

**PREPARAZIONE E CARATTERIZZAZIONE
DI NANOPARTICELLE PER IL
TRATTAMENTO DEL GLIOBLASTOMA**

Relatore:

Chiar.ma Prof.ssa Clara Mattu

Correlatore:

Chiar.mo Prof. Carlo Cosimo Campa

Dott. Andrea Bezze

Candidato:

Francesca Rignanese

Anno accademico 2022 - 2023

Abstract

Glioblastoma multiforme (GBM) is a grade 4 glioma originating from astrocytic glial cells and known as the most common and malignant primary tumor of central nervous system. Standard treatment of GBM consists of surgical resection of the tumor mass followed by chemoradiotherapy with temozolomide (TMZ). However, given the highly infiltrative nature of GBM and its complexity, it is nearly impossible to completely remove the tumor mass without affecting the surrounding healthy tissue; moreover, systemic administration of therapeutic agents may be inefficient due to the presence of physiological barriers, such as the blood-brain barrier (BBB). For this reason, new treatment strategies and better drug delivery systems are needed. Cell mediated drug delivery (CMDD) of drug-loaded nanoparticles (NPs) may be a viable alternative to standard strategies as it would bypass the BBB and enhance targeted drug delivery to the tumor site. The main purpose of this thesis is to investigate the possibility of using microglia cells (HMC-3) as NPs transporters for drug delivery in the treatment of GBM. To assess this strategy, lipid and polymer-based NPs with fluorescent markers were prepared (Rhod-NPs); the internalization kinetics of NPs in HMC-3, GBM cells (U87-MG and U251) and astrocytes (HASTR-ci35) were investigated by FACS. GBM cells and HMC-3 both exhibited high internalization capacity after 24h of incubation with Rhod-NPs, in contrast to HASTR, which did not internalize NPs before 48h. In collaboration with the Chemical Biology group of IIGM, intracellular pathways were studied to better understand the mechanisms of NPs internalization by tumor cells. Specifically, Rabs/Rhod-NPs co-localization profiles were examined, revealing a preferential accumulation of NPs in endocytic compartments. NPs loaded with the proteasome inhibitor Bortezomib (BTZ-NPs) were prepared and their efficacy was tested on 2D and 3D in vitro cell cultures at different time points (24h, 48h) and at different drug concentrations (from 10 nM up to 500 nM). Treatment with BTZ-NPs is effective in reducing viability with an increasing effect as the administered concentration increases, although less than treatment with BTZ. Multicellular tumor spheroids (MTS) were prepared as 3D GBM in vitro models to evaluate the effectiveness of CMDD using HMC-3 loaded with BTZ-NPs. Analyses revealed the effective ability of HMC-3 to migrate through the hydrogel towards GBM MTS both transversally and longitudinally. Moreover, a reduction in the MTS size was observed, which suggested successful CMDD. To determine the influence of matrix stiffness on tumor invasion, the invasion mechanism of GBM MTS was studied in two distinct hydrogels of different mechanical properties (collagen and VitroGel) that simulated the extracellular matrix. Analysis

highlighted that the infiltration of GBM MTS depends on the cellular composition of the spheroids and the stiffness of the gel. The stiffer VitroGel limits the infiltration of spheroids, compared to the collagen-based hydrogel. Additionally, the treatment with BTZ and BTZ-NPs reduced the infiltration capacity. Although BTZ-NPs are less effective than BTZ at the same dosage, high concentrations can significantly reduce MTS growth with no negative effects.

Overall, CMDD of BTZ-NPs was achieved in 3D cultures under different conditions warranting its further investigation to treat GBM. However, additional tests on more complex GBM models are needed to confirm the applicability of this approach to treat GBM.

Lista delle figure

- Figura 1:** *il Microambiente Tumorale del GBM e i diversi tipi di nicchia di GSC. Immagine da un articolo di Barthel et al. [26]..... 8*
- Figura 2:** *Sistemi di somministrazione di farmaco anti-GBM nanodimensionati e relativi meccanismi di rilascio. Immagine da un articolo di Wei W. et al. [24]. 14*
- Figura 3:** *Rappresentazione schematica del processo di preparazione di Nanosfere d'oro coniugate con TMZ e funzionalizzate con anti-EphA3. Immagine estratta dall'articolo di Wang et al. [40]. 15*
- Figura 4:** *Rappresentazione schematica del Nanogel a base di fosforilcolina e azobenzene. Immagine da un articolo di She et al.[42] 16*
- Figura 5:** *Rappresentazione schematica della struttura di liposomi coniugati con acido ialuronico (HA) ad alta densità. Immagine da un articolo di Hayward S. et al.[45]. ... 18*
- Figura 6:** *Rappresentazione schematica del sistema di rilascio intratumorale Hydrogel-NPs. Immagine da un articolo di Brachi G. et al. [54]. 20*
- Figura 7:** *Quantificazione della distribuzione del PTX nel fegato (a), nella milza (b) e nel cervello (c) di topi portatori di G422 trattati chirurgicamente dopo la somministrazione endovenosa di diverse formulazioni di PTX al dosaggio di 5 mg kg⁻¹ nel tempo. 21*
- Figura 8:** *Rappresentazione schematica del sistema di rilascio di Paclitaxel (PTX) basato su liposomi funzionalizzati con Dipalmitoilfosfatidilserina (DPPS) trasportati mediante cellule di microglia (BV2). Immagine da un articolo di Du Y. et al. [59]. 23*
- Figura 9:** *Rappresentazione schematica del sistema di rilascio di Zolendronato (ZOL) basato su un sistema nanodimensionato rivestito con la membrana di cellule di microglia (BV2). Immagine da un articolo di Quiao et al. [61]. 24*
- Figura 10:** *Struttura delle Nanoparticelle. BTZ è incapsulato nel nucleo polimerico a base di poliuretano (NS-HC2000), rivestito da un guscio esterno a base lipidica (DSPE-PEG e EGG-PG). Per ottenere NPs fluorescenti sono state aggiunte piccole quantità di Egg-Liss-Rhod. Immagine creata con Biorender.com..... 27*

Figura 11: Rappresentazione schematica delle fasi di preparazione delle NPs. Immagine creata con Biorender.com	29
Figura 12: Rappresentazione schematica del saggio di vitalità MTS.....	37
Figura 13: Rappresentazione schematica del processo di preparazione di sferoidi. ...	38
Figura 14: a) Diametro idrodinamico e indice di polidispersità: confronto della dimensione e del PDI per NPs e NPs-BTZ; b) Potenziale zeta: confronto tra NPs e BTZ-NPs.	45
Figura 15: Rilascio cumulativo del BTZ: cinetiche di rilascio del farmaco su un periodo di osservazione di 7 giorni.	47
Figura 16: Quantificazione dell'internalizzazione cellulare con citometria a flusso su cellule U251 e U87. Confronto per diverse concentrazioni di Rhod-NPs (0,05 mg/mL; 0,1 mg/mL; 0,2 mg/mL; 0,25 mg/mL; 0,5 mg/mL; 1mg/mL) dopo 24h di incubazione (n=4). Il riquadro rosso evidenzia le condizioni in cui è stato possibile raggiungere un'internalizzazione superiore al 90% per entrambe le linee cellulari. I confronti multipli sono stati eseguiti utilizzando il two-way ANOVA. **** p<0.0001.	48
Figura 17: Quantificazione dell'internalizzazione cellulare con citometria a flusso: a) cellule U251; b) cellule U87. Confronto per diversi tempi di incubazione (24h e 48h) e per diverse concentrazioni di Rhod-NPs (0,25 mg/mL; 0,5 mg/mL; 1mg/mL) (n=4). I confronti multipli sono stati eseguiti utilizzando il two-way ANOVA. *** p<0.001. ...	49
Figura 18: Immagini in fluorescenza delle cellule U251 trattate con Rhod-Nps alla concentrazione di 0,05 mg/mL per a)30 min; b)24h. I nuclei (marcati in DAPI) sono rappresentati in blu, mentre la F-Actina dei citoscheletri (marcata con Falloidina fluorescente) è evidenziata in verde. Le NPs fluorescenti (contenenti Rodamina) sono indicate in rosso. Barra di scala 20 µm.....	50
Figura 19: Immagini in fluorescenza delle cellule U251 trattate con Rhod-Nps alla concentrazione di 0,10 mg/mL per a)30 min; b)24h. I nuclei (marcati in DAPI) sono rappresentati in blu, mentre la F-Actina dei citoscheletri (marcata con Falloidina fluorescente) è evidenziata in verde. Le NPs fluorescenti (contenenti Rodamina) sono indicate in rosso. Barra di scala 20 µm.....	50
Figura 20: Quantificazione dell'internalizzazione cellulare con citometria a flusso: cellule HASTR. Confronto per diversi tempi di incubazione (24h e 48h) e per diverse	

concentrazioni di Rhod-NPs (0,25 mg/mL; 0,5 mg/mL; 1mg/mL) (n=4). I confronti multipli sono stati eseguiti utilizzando il two-way ANOVA. **** $p < 0.0001$ 51

Figura 21: Immagini in fluorescenza delle cellule HASTR trattate con Rhod-Nps alla concentrazione di 0,05 mg/mL per a)30 min; b)24h. I nuclei (marcati in DAPI) sono rappresentati in blu, mentre la F-Actina dei citoscheletri (marcata con Falloidina fluorescente) è evidenziata in verde. Le NPs fluorescenti (contenenti Rodamina) sono indicate in rosso. Barra di scala 20 μm 52

Figura 22: Immagini in fluorescenza delle cellule HASTR trattate con Rhod-Nps alla concentrazione di 0,10 mg/mL per a)30 min; b)24h. I nuclei (marcati in DAPI) sono rappresentati in blu, mentre la F-Actina dei citoscheletri (marcata con Falloidina fluorescente) è evidenziata in verde. Le NPs fluorescenti (contenenti Rodamina) sono indicate in rosso. Barra di scala 20 μm 53

Figura 23: Quantificazione dell'internalizzazione cellulare con citometria a flusso: cellule HMC3. Confronto per diversi tempi di incubazione (24h e 48h) e concentrazioni di Rhod-NPs (0,25 mg/mL; 0,5 mg/mL; 1mg/mL) (n=4). I confronti multipli sono stati eseguiti utilizzando il two-way ANOVA. **** $p < 0.0001$; * $p < 0.05$ 54

Figura 24: Immagini in fluorescenza delle cellule HMC3 trattate con Rhod-Nps alla concentrazione di 0,05 mg/mL per a)30 min; b)24h. I nuclei (marcati in DAPI) sono rappresentati in blu, mentre la F-Actina dei citoscheletri (marcata con Falloidina fluorescente) è evidenziata in verde. Le NPs fluorescenti (contenenti Rodamina) sono indicate in rosso. Barra di scala 20 μm 55

Figura 25: Immagini in fluorescenza delle cellule HMC3 trattate con Rhod-Nps alla concentrazione di 0,10 mg/mL per a)30 min; b)24h. I nuclei (marcati in DAPI) sono rappresentati in blu, mentre la F-Actina dei citoscheletri (marcata con Falloidina fluorescente) è evidenziata in verde. Le NPs fluorescenti (contenenti Rodamina) sono indicate in rosso. Barra di scala 20 μm 55

Figura 26: Immagini in fluorescenza delle cellule U251 trattate con NPs alla concentrazione di 1 mg/mL per 24h. La localizzazione delle vescicole endosomiali precoci (marcate con anticorpi anti-Rab5) e tardive (marcate con anticorpi anti-Rab7) è evidenziata in rosso e verde, rispettivamente. I nuclei (marcati in DAPI) sono rappresentati in blu, mentre le NPs fluorescenti (contenenti Rodamina) sono indicate in bianco. Barra di scala XX μm 57

Figura 27: Risultati del saggio di vitalità ottenuti dopo 24h dalla somministrazione di BTZ e BTZ-NPs. Il test è stato eseguito su cellule U251 trattate con diverse concentrazioni di farmaco incapsulato e farmaco libero (n=3).	59
Figura 28: Immagini in campo chiaro delle cellule U251 dopo 24h di trattamento con BTZ e BTZ-NPs. Barra di scala: 100µm.....	59
Figura 29: Risultati del saggio di vitalità ottenuti dopo 48h dalla somministrazione di BTZ e BTZ-NPs. Il test è stato eseguito su cellule U251 trattate con diverse concentrazioni di farmaco incapsulato e farmaco libero (n=3).	60
Figura 30: Immagini in campo chiaro di cellule U251 dopo 48h di trattamento con BTZ e BTZ-NPs. Barra di scala: 100µm.....	61
Figura 31: Risultati del saggio di vitalità ottenuti dopo 24h dalla somministrazione di BTZ e BTZ-NPs. Il test è stato eseguito su cellule U87 trattate con diverse concentrazioni di farmaco incapsulato e farmaco libero (n=3).	62
Figura 32: Risultati del saggio di vitalità ottenuti dopo 48h dalla somministrazione di BTZ e BTZ-NPs. Il test è stato eseguito su cellule U87 trattate con diverse concentrazioni di farmaco incapsulato e farmaco libero (n=3). I confronti multipli sono stati eseguiti utilizzando il two-way ANOVA. **p<0.01; ***p<0.001, ****p<0.0001.	62
Figura 33: Risultati del saggio di vitalità ottenuti dopo 24h dalla somministrazione di BTZ e BTZ-NPs. Il test è stato eseguito su cellule HASTR trattate con diverse concentrazioni di farmaco incapsulato e farmaco libero (n=3). I confronti multipli sono stati eseguiti utilizzando il two-way ANOVA. ***p<0.0001; ****p<0.0001.....	63
Figura 34: Immagini in campo chiaro cellule HASTR dopo 48h di trattamento con BTZ e BTZ-NPs. Barra di scala: 100µm.....	64
Figura 35: Risultati del saggio di vitalità ottenuti dopo 48h dalla somministrazione di BTZ e BTZ-NPs. Il test è stato eseguito su cellule HASTR trattate con diverse concentrazioni di farmaco incapsulato e farmaco libero (n=3). I confronti multipli sono stati eseguiti utilizzando il two-way ANOVA. ****p<0.0001.....	65
Figura 36: Immagini in campo chiaro di cellule HASTR dopo 48h di trattamento con BTZ e BTZ-NPs. Barra di scala: 100µm.....	66
Figura 37: Risultati del saggio di vitalità ottenuti dopo 24h dalla somministrazione di BTZ e BTZ-NPs. Il test è stato eseguito su cellule HMC3 trattate con diverse	

concentrazioni di farmaco incapsulato e farmaco libero (n=3). I confronti multipli sono stati eseguiti utilizzando il two-way ANOVA. ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$ 67

Figura 38: Immagini in campo chiaro di cellule HMC3 dopo 24h di trattamento con BTZ e BTZ-NPs. Barra di scala: 100 μm 68

Figura 39: Risultati del saggio di vitalità ottenuti dopo 48h dalla somministrazione di BTZ e BTZ-NPs. Il test è stato eseguito su cellule HMC3 trattate con diverse concentrazioni di farmaco incapsulato e farmaco libero (n=3). I confronti multipli sono stati eseguiti utilizzando il two-way ANOVA. **** $p < 0.0001$ 69

Figura 40: Immagini in campo chiaro di cellule HMC3 dopo 48h di trattamento con BTZ e BTZ-NPs. Barra di scala: 100 μm 70

Figura 41: Risultati del saggio di vitalità ottenuti dopo 24h dalla somministrazione di BTZ e BTZ-NPs. Il test è stato eseguito su sferoidi di U251 trattati con diverse concentrazioni di farmaco incapsulato e farmaco libero (n=3). I confronti multipli sono stati eseguiti utilizzando il two-way ANOVA. ** $p < 0.01$ 71

Figura 42: Immagini in campo chiaro di sferoidi di U251 dopo 24h di trattamento con BTZ e BTZ-NPs. Barra di scala: 100 μm 72

Figura 43: Risultati del saggio di vitalità ottenuti dopo 48h dalla somministrazione di BTZ e BTZ-NPs. Il test è stato eseguito su sferoidi di U251 trattati con diverse concentrazioni di farmaco incapsulato e farmaco libero (n=3). I confronti multipli sono stati eseguiti utilizzando il two-way ANOVA. * $p < 0.05$ 72

Figura 44: Sferoidi di U251 dopo 48h di trattamento con BTZ e BTZ-NPs. Barra di scala: 100 μm 73

Figura 45: Risultati del saggio di vitalità ottenuti dopo 24h dalla somministrazione di BTZ e BTZ-NPs. Il test è stato eseguito su sferoidi di U87 trattati con diverse concentrazioni di farmaco incapsulato e farmaco libero (n=3). I confronti multipli sono stati eseguiti utilizzando il two-way ANOVA. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$ 73

Figura 46: Immagini in campo chiaro di sferoidi di U87 dopo 24h di trattamento con BTZ e BTZ-NPs. Barra di scala: 100 μm 74

Figura 47: Risultati del saggio di vitalità ottenuti dopo 48h dalla somministrazione di BTZ e BTZ-NPs. Il test è stato eseguito su sferoidi di U87 trattati con diverse concentrazioni di farmaco incapsulato e farmaco libero (n=3). I confronti multipli sono

stati eseguiti utilizzando il two-way ANOVA. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; **** $p < 0.0001$ 75

Figura 48: Immagini in campo chiaro di sferoidi di U87 dopo 48h di trattamento con BTZ e BTZ-NPs. Barra di scala: 100 μ m..... 75

Figura 49: Risultati del saggio di vitalità ottenuti dopo 24h dalla somministrazione di BTZ e BTZ-NPs. Il test è stato eseguito su sferoidi di HASTR trattati con diverse concentrazioni di farmaco incapsulato e farmaco libero (n=3). I confronti multipli sono stati eseguiti utilizzando il two-way ANOVA. * $p < 0.05$ 76

Figura 50: Immagini in campo chiaro di sferoidi di HASTR dopo 24h di trattamento con BTZ e BTZ-NPs. Barra di scala: 100 μ m..... 77

Figura 51: Risultati del saggio di vitalità ottenuti dopo 48h dalla somministrazione di BTZ e BTZ-NPs. Il test è stato eseguito su sferoidi di HASTR trattati con diverse concentrazioni di farmaco incapsulato e farmaco libero (n=3). I confronti multipli sono stati eseguiti utilizzando il two-way ANOVA. * $p < 0.05$; **** $p < 0.0001$ 78

Figura 52: Immagini in campo chiaro di sferoidi di HASTR dopo 48h di trattamento con BTZ e BTZ-NPs. Barra di scala: 100 μ m..... 78

Figura 53: Risultati del saggio di vitalità ottenuti dopo 24h dalla somministrazione di BTZ e BTZ-NPs. Il test è stato eseguito su sferoidi di HMC3 trattati con diverse concentrazioni di farmaco incapsulato e farmaco libero (n=3). I confronti multipli sono stati eseguiti utilizzando il two-way ANOVA. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$ 79

Figura 54: Immagini in campo chiaro di sferoidi di HMC3 dopo 24h di trattamento con BTZ e BTZ-NPs. Barra di scala: 100 μ m..... 80

Figura 55: Risultati del saggio di vitalità ottenuti dopo 48h dalla somministrazione di BTZ e BTZ-NPs. Il test è stato eseguito su sferoidi di HMC3 trattati con diverse concentrazioni di farmaco incapsulato e farmaco libero (n=3). I confronti multipli sono stati eseguiti utilizzando il two-way ANOVA. **** $p < 0.0001$ 80

Figura 56: Sferoidi di HMC3 dopo 24h di trattamento con BTZ e BTZ-NPs. Barra di scala: 100 μ m..... 81

Figura 57: Area tumorale relativa post trattamento con concentrazioni crescenti di BTZ relativa a: a) sferoidi di U87; b) sferoidi TM. 82

- Figura 58:** Area tumorale relativa post trattamento con concentrazioni crescenti di BTZ relativa a: a) sferoidi di U87; b) sferoidi di U87 + HMC3..... 83
- Figura 59:** Immagini relative a sferoidi di U87 in gel di collagene-I con HMC3 in diverse condizioni di trattamento: a) Controllo, non trattato; b) BTZ 10 nM; c) BTZ 50 nM; d) BTZ 200 nM. Barra di scala: 500 μ m. 83
- Figura 60:** Area tumorale relativa post trattamento con concentrazioni crescenti di BTZ e BTZ-NPs relativa a sferoidi TM in presenza e assenza di HMC3. 84
- Figura 61:** Intensità di fluorescenza di sferoidi Tumor Mix incorporati in gel di collagene dopo il trattamento con BTZ e BTZ-NPs a diverse concentrazioni (10, 50, 200 nM) per 96 ore di osservazione a) senza HMC3; b) con HMC3. 85
- Figura 62:** Sferoidi TM in gel di collagene-I con HMC3 trattati con BTZ e BTZ-NPs alla concentrazione di 200 nM. Le cellule HMC3, marcate con Vybrant™ Dil Cell-Labeling Solution, sono rappresentate in rosso, mentre le cellule U87 e GBM-8 (marcate con GFP) sono evidenziate in verde. Barra di scala 500 μ m. 86
- Figura 63:** Immagini di sferoidi TM in VitroGel® 3D a diverse concentrazioni (1:3; 1:5; 1:10; 1:20) ottenute con microscopio ottico a quattro time point (24h; 48h; 72h; 96h). Barra di scala: 500 μ m. 87
- Figura 64:** Intensità di fluorescenza di sferoidi Tumour Mix dopo il trattamento con BTZ e BTZ-NPs a diverse concentrazioni (10, 50, 200 nM) incorporati in gel a) di collagene; b) VitroGel. 89
- Figura 65:** Quantificazione dell'internalizzazione cellulare con citometria a flusso: cellule H-MC3. Confronto per diversi tempi di incubazione (24h, 48h, 72) e concentrazioni di Rhod-NPs (0,25 mg/mL; 0,5 mg/mL; 1mg/mL). a) Internalizzazione percentuale di Rhod-NPs (n=4) ****p<0.0001; b) Intensità di fluorescenza media (n=4). ****p<0.0001. I confronti multipli sono stati eseguiti utilizzando il two-way ANOVA. 90
- Figura 66:** Intensità di fluorescenza media dei surnatanti di HMC3 post 48h e 72h incubazione con Rhod-NPs a diverse concentrazioni (non trattato; 0,25 mg/mL; 0,5 mg/mL; 1 mg/mL) (n=4). I confronti multipli sono stati eseguiti utilizzando il two-way ANOVA. *p<0.05. 92
- Figura 67:** Immagine in fluorescenza dell'infiltrazione delle cellule di microglia (somministrate alla densità di 1000 e 2000 cellule/pozzetto) all'internodi sferoidi TM a

96h dalla somministrazione. Le cellule HMC3, marcate con Vybrant™ Dil Cell-Labeling Solution, sono rappresentate in rosso, mentre le cellule U87 e GBM-8 (marcate con GFP) sono evidenziate in verde. Barra di scala: 100 µm. 93

Figura 68: HMC3 dopo 48h dall'essere state caricate in gel di collagene alla densità di semina di a) 25 000; b) 50 000 cellule per pozzetto. L'interfaccia tra il gel contenente le cellule e il gel vuoto è evidenziata con una linea tratteggiata. Le cellule HMC3, marcate con Vybrant™ Dil Cell Labelling Solution, sono rappresentate in rosso. Barra di scala: 500µm..... 94

Figura 69: Immagine in fluorescenza della migrazione delle cellule di microglia verso gel contenenti sferoidi TM, a 48h dalla semina. Le cellule HMC3, marcate con Vybrant™ Dil Cell Labelling Solution, sono rappresentate in rosso, mentre le cellule U87 e GBM-8 (marcate con GFP) sono evidenziate in verde. a) Immagine in campo verde dello sferoide TM. Barra di scala: 100 µm; b) Immagine in campo rosso delle cellule HMC3. Barra di scala: 100 µm; c) Immagine merge. Barra di scala: 100µm d) Ingrandimento sull'intorno dello sferoide. Barra di scala: 500 µm. 95

Figura 70: Immagine in fluorescenza della migrazione verticale delle cellule di microglia verso gel contenenti sferoidi TM (in alto) o vuoti (in basso), acquisite a due diverse quote a 48h dalla semina. Le cellule HMC3, marcate con Vybrant™ Dil Cell Labelling Solution, sono rappresentate in rosso, mentre le cellule U87 e GBM-8 (marcate con GFP) sono evidenziate in verde. Barra di scala:100 µm. 96

Figura 71: Risultati del saggio di vitalità ottenuti dopo 24h e 48h dal trattamento con HMC3 che avevano precedentemente internalizzato BTZ-NPs. Il test è stato eseguito su cellule U251 trattate con diverse densità cellulari (500 HMC3, 1000 HMC3, 2000 HMC3, 4000 HMC3) (n=3)..... 97

Figura 72: Risultati del saggio di vitalità ottenuti dopo 72h dal trattamento con HMC3 che avevano precedentemente internalizzato BTZ-NPs. Il test è stato eseguito su sferoidi TM trattati con diverse densità cellulari (controllo, 2000 HMC3, 4000 HMC3, 8000 HMC3) (n=3)..... 98

Acronimi e Abbreviazioni

OMS Organizzazione Mondiale della Sanità

OMS CNS4 Classificazione OMS dei Tumori del Sistema Nervoso Centrale del 2016

OMS CNS5 Classificazione OMS dei Tumori del Sistema Nervoso Centrale del 2021

GBM Glioblastoma

AIOM Associazione Italiana Oncologia Medica

IDH Isocitrato Deidrogenasi

NOS Not Otherwise Specified

NEC Not Elsewhere Classified

TME Microambiente Tumorale

ECM Matrice Extracellulare

NSCs Cellule Staminali Neuronali

OPCs Cellule Progenitrici di Oligodendrociti

GSC Cellule Staminali di GBM

MRI Imaging Magnetico Nucleare

TC Tomografia Computerizzata

RT Radioterapia

SRS Radiochirurgia stereotassica

TZM Temozolomide

FDA Food and Drug Administration

MTIC carbossiamide monometil triazeno imidazolo

MGMT O-6-metilguanina-DNA metiltransferasi

BBB Blood Brain Barrier

HIFUS High intensity focused ultrasound

LDLR Recettori delle Lipoproteine a Bassa Densità

MPS sistema dei fagociti mononucleari

DPPS dipalmitoil fosfatidilserina

BTZ Bortezomib

Rod-NPs NPs marcate con colorante fluorescente Rodamina

FACS Fluorescent-Activated Cell Sorter

PCL policaprolattone

EGG-PG L- α -fosfatidilglicerolo

DSPE-PEG 1,2-Distearoil-sn-glicero-3-fosfoetanalammina-Poly (etilenglicole)

EggLiss-Rhod PEDSPE-PEG l- α -fosfatidiletanolamina N-(lissaminerhodamineB-sulfonyl

IIGM Italian Institute of Genomic Medicine

ATCC American Type Culture Collection

GFP proteina verde fluorescente

MEM minimal essential medium

FBS siero fetale bovino

1% P/S 1% di penicillina/streptomicina

EGF fattore di crescita epidermico

FGF fattore di crescita dei fibroblasti

U-251 MG cellule di GBM umane differenziate

U87 MG cellule di GBM umane differenziate

GBM-8 cellule staminali tumorali

HMC-3 linee cellulari di microglia umana

HASTR/ci35 astrociti umani immortalizzati in modo condizionale, clone 35

ACN acetonitrile

RT temperatura ambiente

DLS Dynamic light scattering

DAPI 4',6-Diamidino-2-phenylindole

PFA Paraformaldeide

Sommario

Abstract.....	III
Lista delle figure.....	V
Acronimi e Abbreviazioni.....	XIII
Introduzione	1
1.1 Tumori cerebrali.....	1
1.1.1 Gliomi	3
1.2 Glioblastoma	3
1.2.1 Classificazione	4
1.2.2 Fattori di rischio	5
1.2.3 Eterogeneità e microambiente tumorale	5
1.2 Trattamento GBM	9
1.2.1 Terapie tradizionali	9
1.2.2 Nanoterapie	12
1.2.3 Terapie basate sul trasporto mediato da cellule	20
1.2.3 Meccanismi di trasporto intracellulare associato all'azione di nanomedicine	24
1.3 Scopo del lavoro.....	25
Materiali e Metodi.....	27
2.1 Materiali	27
2.1.1 Nanoparticelle	27
2.1.2 Colture cellulari	28
2.2 Metodi.....	29
2.2.1 Preparazione delle nanoparticelle	29
2.2.2 Caratterizzazione delle nanoparticelle	30
2.2.3 Valutazione della capacità di uptake di NPs	32
2.2.4 Valutazione dei profili di co-localizzazione Rabs/NPs	34
2.2.5 Valutazione dell'efficacia dei trattamenti farmacologici	36

2.2.6 Valutazione del ruolo della ECM nella risposta al trattamento	39
2.2.7 Valutazione dell'efficacia del trattamento con NPs mediato dalla microglia	41
2.2.8 Analisi statistica	44
Discussione e Risultati	45
3.1 Preparazione e caratterizzazione delle nanoparticelle.....	45
3.2 Valutazione della capacità di <i>uptake</i> di NPs	47
3.3 Valutazione dei profili di co-localizzazione Rabs/NPs.....	56
3.4 Risposta al trattamento farmacologico con BTZ e BTZ-NPs	58
3.4.1 Risposta delle monoculture 2D	58
3.4.2 Risposta degli sferoidi 3D	71
3.5 Valutazione del ruolo della ECM nella risposta al trattamento.....	81
3.5.1. Valutazione dell'efficacia di trattamento in gel di collagene	81
3.5.2 Valutazione dell'influenza della rigidità del gel sull'infiltrazione degli sferoidi	86
3.5.3. Valutazione del ruolo della rigidità nella risposta al trattamento.....	88
3.6 Valutazione dell'efficacia del trattamento con NPs mediato dalla microglia	89
3.6.1 Valutazione della capacità di esocitosi	89
3.6.2 Migrazione e infiltrazione di cellule HMC3 all'interno di sferoidi TM	92
3.6.3 Test di vitalità	97
Conclusioni.....	99
Bibliografia	102

Introduzione

1.1 Tumori cerebrali

I tumori cerebrali sono il risultato della crescita incontrollata e anomala delle cellule nei tessuti del cervello, tale da impedirne il corretto funzionamento. Come per tutti i tumori, è possibile distinguere, attraverso una biopsia, i tumori cerebrali benigni e maligni a seconda della capacità di invadere o meno i tessuti circostanti. Le cellule di un tumore benigno non invadono i tessuti adiacenti, non diffondono in tutto il corpo e spesso conservano le caratteristiche principali del tessuto di origine. Al contrario, i tumori maligni sono caratterizzati da cellule più aggressive e capaci di invadere i tessuti limitrofi, sfruttando la circolazione linfatica e sanguigna per raggiungere tessuti lontani dalla sede tumorale. Questo fenomeno di diffusione del cancro, oltre il tessuto di origine, è noto come metastasi.[1]

I tumori cerebrali possono essere ulteriormente classificati, a seconda dell'origine, in tumori cerebrali primitivi e secondari. Vengono definiti primitivi i tumori che si sviluppano direttamente dal tessuto cerebrale, mentre, i tumori secondari vengono generati da cellule provenienti da un tumore originato in un altro organo e che successivamente ha formato metastasi nel cervello. [2]

I tumori del cervello raramente causano metastasi in altri organi, ma tipicamente derivano da cellule metastatiche provenienti da altri distretti, come il polmone, la cute e il seno.[3] In questo caso, la presenza di cellule tumorali che non derivano dal sistema nervoso conferisce un ulteriore grado di complessità al tumore stesso.[3]

Le neoplasie del sistema nervoso centrale rappresentano circa l'1,6% di tutti i tumori. [3] Nel 2020, in Italia, sono state stimate circa 6.100 nuove diagnosi (uomini =3.500; donne = 2.600) con sopravvivenza netta a 5 anni dalla diagnosi pari al 24% negli uomini e 27% nelle donne, percentuale purtroppo ancora troppo bassa.[4]

Una componente di valutazione cruciale per l'analisi del piano terapeutico e per la definizione della prognosi è la classificazione dei tumori cerebrali in base al *grading*. Questa scala descrive la gravità dei tumori in base alle caratteristiche morfologiche delle cellule neoplastiche osservate al microscopio, sulla loro predisposizione all'invasione di tessuti sani e la velocità con cui il tumore si diffonde. Sicuramente la malignità di un tumore è influenzata anche dall'età e dalle condizioni generali del paziente.[2]

Questo tipo di classificazione prevede l'assegnazione di un grado di malignità ai tumori del cervello variabile da 1 a 4:

- Grado 1: tumore benigno, di lenta progressione e non invasivo rispetto ai tessuti limitrofi;
- Grado 2: tumore non maligno con crescita lenta, ma in grado di penetrare nel tessuto cerebrale circostante;
- Grado 3: tumore maligno, le cellule si moltiplicano e crescono rapidamente, invadendo e decomponendo il tessuto cerebrale circostante fino alla sua distruzione;
- Grado 4: tumore maligno altamente aggressivo e ancora più invasivo.[2]

Qualsiasi parte del sistema nervoso centrale può essere colpita da una degenerazione cancerosa. Sono stati individuati, perciò, molti tipi di tumore legati a quest'area [3] che vengono classificati in relazione alla cellula del sistema nervoso da cui derivano e dalla quale prendono poi il nome. In particolare, l'Organizzazione Mondiale della Sanità (OMS) ha pubblicato la quinta edizione della Classificazione OMS dei Tumori del Sistema Nervoso Centrale (OMS CNS5) nel 2021, come aggiornamento del sistema di classificazione pubblicato nel 2016. In passato, la classificazione dei tumori del sistema nervoso centrale si basava esclusivamente sulle caratteristiche istologiche dei tessuti tumorali, ma a partire dal 2021 vengono presi in considerazione anche alcuni marcatori molecolari come parametri (biomarcatori) di classificazione, fondamentali per stimare ulteriormente la prognosi per diversi tipi di tumore.[5] La classificazione OMS CNS5 ha introdotto diversi cambiamenti rispetto all'edizione precedente del 2016. Tra le principali modifiche, vi è l'introduzione del concetto di classificazione "intra-tipo tumorale", che prevede di attribuire diversi gradi istopatologici a un tipo specifico di tumore. Per questo motivo, alcuni termini modificatori sono diventati obsoleti: nella classificazione dei gliomi diffusi, il termine "anaplastico", che era precedentemente associato al grado 3, non è più considerato. La regola secondo cui il genotipo prevale sul fenotipo è stata confermata per l'identificazione del tipo di tumore, ora valida anche per l'attribuzione del grado istopatologico in alcuni casi particolari.[6] Un altro concetto importante, introdotto dall'OMS CNS5, è l'identificazione delle differenze cliniche e molecolari tra i gliomi diffusi che colpiscono principalmente gli adulti (denominati "tipo adulto") e quelli che si verificano principalmente nei bambini (detti "tipo pediatrico"). [7]

In definitiva, i tipi principali di tumori individuati, residenti nel sistema nervoso centrale, sono i gliomi, gli adenomi ipofisari, i meningiomi, gli ependimomi, i medulloblastomi, i neurinomi e i linfomi primitivi. [8]

1.1.1 Gliomi

I tumori cerebrali maligni più comuni sono i gliomi diffusi adulti che rappresentano il 30% di tutti i tumori cerebrali primari e l'80% di tutti i tumori maligni. La sopravvivenza globale (*overall survival, OS*) dipende dal sottotipo di glioma: i tassi di sopravvivenza dei gliomi di basso grado sono più alti di 5 anni rispetto ai gliomi di alto grado (80% rispetto al 5%). [7]

I gliomi sono responsabili della maggior parte dei decessi da tumori cerebrali primari e si ritiene che provengano da cellule staminali o progenitrici neurogliali. Sono classificati istologicamente come astrocitomi, oligodendrogliomi, gliomi oligoastrociti misti o ependimomi, in base alle somiglianze morfologiche con i tipi di cellule neurogliali che si trovano nel cervello sano.[9] Un glioma può essere definito come focale o diffuso, a seconda che si presenti come una massa tumorale localizzata o diffusa in altre parti del cervello e, tipicamente, si forma a livello di cervelletto, tronco encefalico e telencefalo.[9]

I gliomi nei bambini sono molecularmente diversi da quelli negli adulti. Anche se presentano un'incidenza crescente all'aumentare dell'età, la maggior parte dei gliomi di tipo pediatrico è rappresentata da astrocitomi pilocitici di grado 1, con crescita circoscritta, prognosi favorevole e frequenti fusioni o mutazioni geniche.[10]

1.2 Glioblastoma

Il glioblastoma (GBM) è un glioma di grado 4, originato da cellule gliali astrocitarie e riconosciuto come il tumore primario del cervello e del sistema nervoso centrale più comune e maligno. Esso, infatti, rappresenta il 14,5% di tutti i tumori del sistema nervoso centrale e il 48,6% dei tumori maligni del sistema nervoso centrale ed è stato riscontrato che la sopravvivenza globale mediana dei pazienti affetti da GBM è di soli 15 mesi. [11] L'incidenza è maggiore negli uomini rispetto alle donne, nonché tra i caucasici rispetto agli altri gruppi etnici. [12]

La fondazione Aiom (associazione italiana oncologia medica) afferma, infatti, che il GBM colpisce circa 1 500 italiani all'anno, la maggior parte dei quali sono uomini (il 54% rispetto al 46% delle donne). [13]

Questo tumore affligge principalmente pazienti di età superiore a 50 anni. Tuttavia, i glioblastomi possono verificarsi anche in bambini, adolescenti e giovani adulti, con crescenti prove che i tumori in queste fasce di età sono geneticamente diversi da quelli nei pazienti anziani.[10] Non è da escludere la possibilità che questo tipo di tumore possa verificarsi negli adolescenti di età compresa tra i 15 e i 19 anni, che

rappresentano il 7% della popolazione generale. Tipicamente, la forma secondaria si verifica in pazienti giovani, con una media di 39 anni e in genere consente una migliore possibilità di sopravvivenza.[13]

1.2.1 Classificazione

Sulla base della loro presentazione clinica, i GBM sono stati storicamente classificati in due gruppi: "primari" e "secondari". I tumori denominati GBM secondari sono classificati come tumori che mostrano segni clinici, radiologici o istopatologici di progressione maligna, generati a partire da un tumore preesistente di grado inferiore; i GBM primari, invece, non hanno tale derivazione e sono diagnosticati come tumori avanzati. Da un punto di vista istopatologico, però, i GBM primari e secondari risultano essere identici e indistinguibili. Pertanto, molta ricerca si è concentrata sull'identificazione di alterazioni genetiche nei GBM, al fine di distinguere sottoclassi di pazienti con GBM con diverse prognosi e/o risposte a terapie specifiche. [14]

Attualmente, uno degli elementi più cruciali che deve essere preso in considerazione nella valutazione della prognosi e del trattamento delle varie sottoclassi di gliomi è lo stato genetico dell'IDH (Isocitrato deidrogenasi). [15]

Uno studio di sequenziamento genomico degli esoni, condotto da *Parsons et al.*[14], è stato il primo ad identificare in modo specifico l'alterazione genetica dell'IDH nel GBM. Il gene IDH1 codifica per la proteina IDH1 presente nel citoplasma e si trova sul cromosoma 2q33. La proteina IDH1 catalizza la carbossilazione ossidativa dell'isocitrato in α -chetoglutarato (α -KG), per cui è fondamentale per il ciclo di Krebs. Lo studio di *Parsons* ha esaminato 22 campioni di GBM da una varietà di pazienti, scoprendo, nel 12% dei campioni di GBM analizzati, una mutazione tale per cui l'istidina nell'amminoacido 132 di IDH1 è stata sostituita dall'arginina 132 (mutazione R132H IDH1), suggerendo l'importanza nel processo di trasformazione del GBM. [14]

Sulla base di tali recenti scoperte sulle mutazioni nel gene IDH, stando a quanto pubblicato nel 2021 in riferimento all'OMS CNS5, è emerso che è possibile distinguere i gliomi diffusi dell'adulto in tre sottotipi:

1. GBM IDH *wild-type*;
2. astrocitoma IDH-mutante;
3. oligodendroglioma IDH-mutante 1p19q.

A differenza della precedente classificazione del 2016, il GBM non è più classificato come IDH *wild-type* o mutante, ma, sulla base di altri marcatori, i tumori IDH-mutanti sono ora classificati come astrocitomi o oligodendrogliomi.[15]

Talvolta possono emergere discrepanze tra le caratteristiche cliniche, istologiche, immunoistologiche e genetiche del tumore, per cui non sempre è possibile associare un GBM ad una delle categorie della OMS CNS5. C'è anche la possibilità che una sottounità GBM esista con una combinazione sconosciuta di caratteristiche che non è ancora nella classificazione OMS.[11]

Il GBM era precedentemente definito come GBM multiforme, facendo riferimento all'eterogeneità del tumore, ma, a partire dalla quarta edizione della classificazione OMS CNS4, il termine "multiforme" è stato rimosso e questo tipo di tumore è stato denominato semplicemente "Glioblastoma" e successivamente definito in OMS CNS5 come tumore astrocitico diffuso negli adulti, strettamente del tipo IDH.[7]

1.2.2 Fattori di rischio

Il GBM tende a svilupparsi, nella maggior parte dei casi, nei lobi frontali, temporali e parietali e, raramente, colpisce altre strutture come il tronco cerebrale ed il cervelletto.[11] Numerosi casi di tumori cerebrali centrali (non solo GBM) sono stati descritti dopo un trauma cranico. Sfortunatamente, la ricerca disponibile è limitata, pertanto è difficile dimostrare una relazione causa-effetto. Un altro fattore di rischio noto è sicuramente l'alcool che ha il potenziale di influenzare negativamente le cellule gliali poiché in grado di superare la barriera ematoencefalica (*Blood Brain Barrier*, BBB). [11]

Simili alla maggior parte degli altri tumori, i gliomi sono essenzialmente malattie genetiche delle singole cellule, associati a rare sindromi familiari. Tra i molteplici fattori ambientali, le radiazioni ionizzanti sono state riconosciute come la principale causa della malattia. [10] L'esposizione alle radiazioni associate a percorsi di radioterapia, per esempio, può portare al danneggiamento del materiale genetico che si traduce in un aumento della probabilità di mutazione. Un'altra mutazione frequente nel GBM, oltre a quella relativa al gene che codifica per la proteina IDH, si presenta a livello del promotore TERT (trascrittasi inversa telomerica). [15] L'unità subcatalitica della telomerasi, codificata dal gene TERT, è un enzima che partecipa alla "ricostruzione" delle subunità telomeriche, in quanto possiede la capacità di allungare in modo stabile i telomeri. Questo fenomeno garantisce l'immortalità delle cellule del tumore poiché l'accorciamento dei telomeri ad ogni ciclo replicativo è uno dei segnali chiave della senescenza ed è responsabile della resistenza acquisita dal tumore.[15]

1.2.3 Eterogeneità e microambiente tumorale

La marcata ipercellularità, l'atipia nucleare, la proliferazione microvascolare e la necrosi sono caratteristiche istologiche che distinguono il GBM dagli astrocitomi di grado inferiore.[16]

Il GBM è un tumore altamente vascolarizzato[17]: come tutti i tumori, promuove la formazione di nuovi vasi sanguigni per nutrirsi ed invadere i tessuti circostanti. I vasi di nuova formazione tendono a svilupparsi come i glomeruli renali e sono caratterizzati da cellule endoteliali atipiche, iperplastiche, con forma e dimensioni variabili.[12] La superficie di questi vasi è coperta da uno strato di periciti discontinuo, non collegato ai processi astrocitari.[12] L'ipervascolarizzazione tumorale è da ricondursi alla sovraregolazione di diversi recettori e fattori pro-angiogenici, tali da stimolare le vie di segnalazione dell'angiogenesi attraverso l'attivazione di oncogeni e/o la sottoregolazione dei geni soppressori del tumore. [18]

Questo aumentato afflusso di sangue non coinvolge però l'intera massa tumorale, portando alla formazione di focolai necrotici sia a livello centrale che a livello periferico con piccoli focolai necrotici diffusi di forma irregolare. [19] Il nucleo necrotico è più morbido del tessuto circostante e si pensa che si formi dopo che la densità cellulare è aumentata oltre una soglia specifica o dopo eventi vaso-occlusivi che causano ipossia. [20]. In condizioni ipossiche, molte proteine, come il fattore inducibile dall'ipossia (HIF) -1 α , vengono utilizzate per riprogrammare le cellule tumorali che, adattandosi, diventano più aggressive, resistenti alle terapie e in grado di sfuggire all'immunosorveglianza. [19]

L'ipossia è solo uno dei segnali che può influenzare le cellule del microambiente tumorale (TME): esso fornisce una varietà di segnali dinamici che promuovono la proliferazione, l'invasione e la resistenza.[20] In caso di tumore, le caratteristiche della matrice extracellulare (ECM) cambiano, influenzando la progressione del tumore stesso. Le cellule di GBM possono indurre le cellule stromali a produrre quantità di laminina, fibronectina e collagene di tipo IV maggiori rispetto al tessuto nervoso sano, aumentando il modulo elastico dell'ECM.[20] Questo fenomeno comporta l'amplificazione del recettore del fattore di crescita epidermico (EGFR) e, conseguentemente, un incremento del tasso di proliferazione. Il fluido interstiziale, inoltre, presenta un volume di gran lunga superiore rispetto al normale, generando uno stato tensorio alterato, tale da costituire una barriera agli agenti chemioterapici.[20]

Il TME è composto, oltre che da matrice extracellulare, da una moltitudine di fattori secreti e cellule stromali, vascolari e immunitarie. Macrofagi del plesso corioideo, macrofagi degli organi circumventricolari, macrofagi meningei e microglia sono le cellule immunitarie residenti nel sistema nervoso centrale, responsabili del mantenimento dell'omeostasi e delle risposte immunitarie.[21] Purtroppo, però, in presenza di GBM, le cellule microgliali non sono efficaci nel contrastare lo sviluppo del tumore ma possono addirittura favorirlo, nonostante il reclutamento mediante

chemioattrattori ne determini l'accumulo all'interno e intorno alla massa tumorale.[21] In particolare, il sistema di microglia e macrofagi associati al GBM (GAMMs) è composto per il 15% da un *cluster* di microglia residente attivata, che tende a localizzarsi principalmente nelle aree peritumorali, e, per il restante 85% da macrofagi periferici, derivati da monociti, infiltrati a livello delle regioni perivascolari.[21] È stato scoperto che l'abbondanza di GAMMs è correlata all'invasività del GBM, all'immunosoppressione e alla prognosi sfavorevole dei pazienti. Pertanto, queste cellule sono considerate un buon bersaglio per le tecniche immunoterapiche.[21]

Oltre ai GAMMs, il GBM è in grado di influenzare anche l'attività funzionale degli astrociti. [22] Gli astrociti sono cellule molto abbondanti nel sistema nervoso, superando di oltre cinque volte il numero dei neuroni. Si tratta di cellule gliali specializzate presenti nell'intero sistema nervoso centrale (SNC) ed esercitano molte funzioni fondamentali, come il mantenimento dell'omeostasi e il supporto trofico e metabolico. [23] In risposta a varie forme di minaccia, gli astrociti attivano un meccanismo di difesa noto come astrogliosi reattiva, tentando di formare un tessuto cicatriziale in grado di isolare il danno rispetto al tessuto sano. Tuttavia, in presenza di GBM, gli astrociti non sono in grado di contenere le cellule neoplastiche. In questo caso si parla di astrociti promotori della progressione del GBM (*Tumor Associated Astrocytes, TAAs*), poiché rilasciano molecole che supportano lo sviluppo e l'avanzamento del tumore.[22]

Il GBM si origina a partire da tre differenti tipi cellulari nel parenchima cerebrale: cellule staminali neuronali (NSCs), astrociti derivanti da NSCs e cellule progenitrici di oligodendrociti (OPCs). [24] Esso si sviluppa presentando un'elevata varietà cellulare, tra cui una piccola popolazione è rappresentata dalle cellule staminali di GBM (GSCs).[21] Identificate per la prima volta nel 2002, le GSCs hanno molte somiglianze funzionali e fenotipiche con le NSC, tra cui la capacità di auto-rinnovamento, e inoltre contribuiscono al mantenimento, alla propagazione del tumore e alla resistenza alla terapia. La staminalità delle GSCs viene mantenuta in un microambiente specifico chiamato "nicchia" [21], analogo a quella della zona subventricolare (SVZ) dove risiedono le NSCs. Le nicchie nei gliomi rappresentano le zone di massima espressione del tumore, adatte per la conservazione delle GSCs e tali da conferire al tumore ulteriori caratteristiche maligne, tra cui la spiccata ipervascolarizzazione e connessa angiogenesi. Nello specifico sono stati identificati diversi tipi di nicchie[25] (Fig.1):

- perivascolari (PVN), caratterizzate dalla presenza di GSCs in stretto contatto con le cellule endoteliali (Fig. 1b);

- perinecrotiche (PNN), caratterizzate dalla presenza di GSCs attorno ai focolai necrotici (Fig. 1c);
- invasive (IN), caratterizzate dalla presenza di GSCs che formano dei manicotti attorno ai vasi: i glioblastomi non metastatizzano attraverso il sistema linfatico o vascolare, ma la diffusione avviene lungo la direzione dei vasi (Fig. 1d). [26]

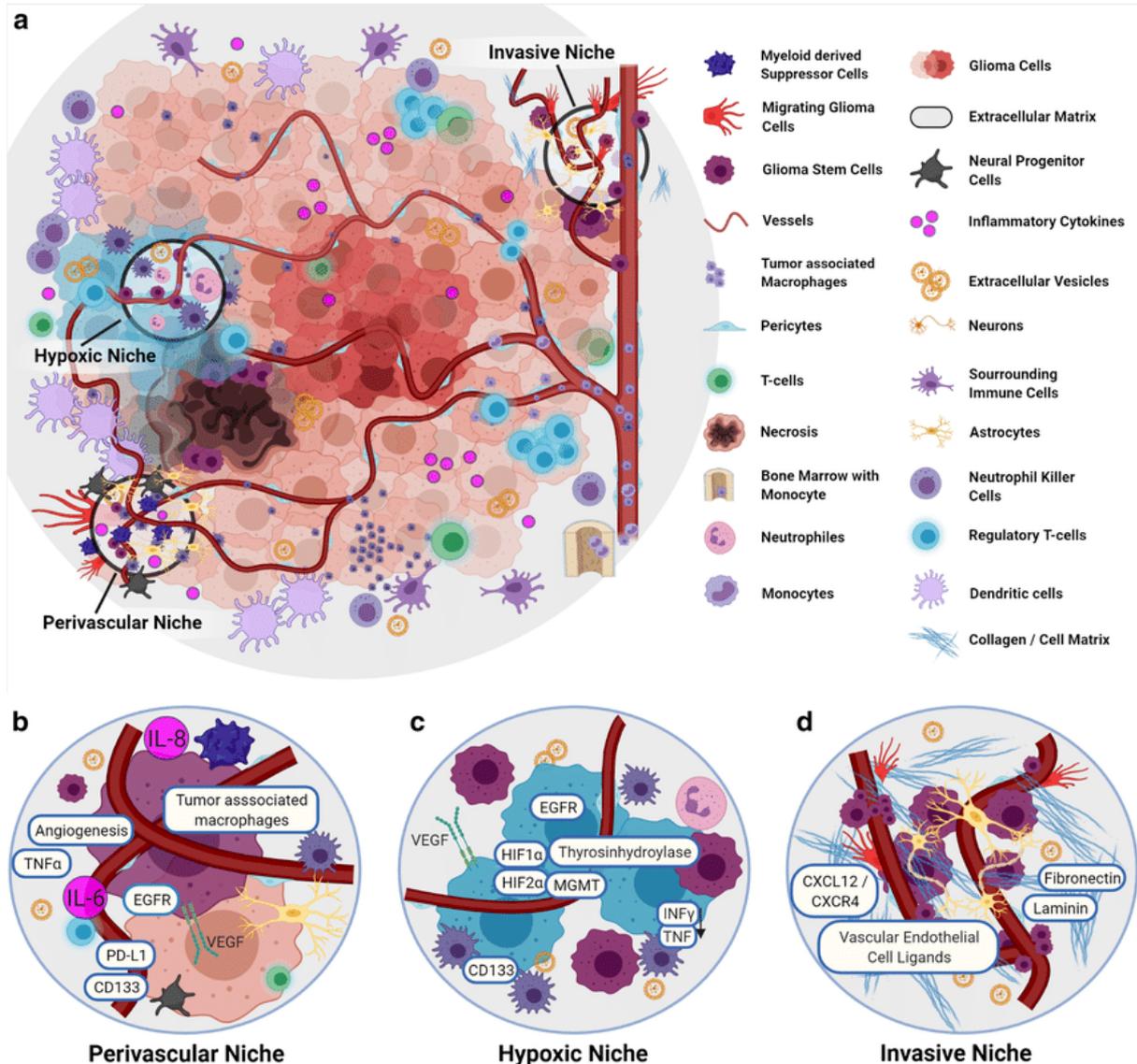


Figura 1: il Microambiente Tumorale del GBM e i diversi tipi di nicchia di GSC. Immagine da un articolo di Barthel et al. [26]

L'eterogeneità tumorale è stata riscontrata anche dal punto di vista dell'espressione genica. Il *Cancer Genome Atlas* (TCGA), in seguito ai recenti progressi nell'analisi bioinformatica dei tumori, ha identificato quattro distinti sottotipi molecolari di GBM [27]:

1. classico, caratterizzato dall'amplificazione dell'EGFR, alla perdita del cromosoma 10, l'amplificazione del cromosoma 7 e l'espressione genica di marker tipici degli astrociti (21% dei GBM);
2. mesenchimale, mostra mutazioni del gene di NF1 (neurofibromina1) e PTEN (proteina omologa della fosfatasi e della tensina) e una minore amplificazione di EGFR (recettore del fattore di crescita epidermico) rispetto ad altri gliomi;
3. proneurale, mostra amplificazioni focali di PDGFRA (recettore A del fattore di crescita derivato dalle piastrine) e mutazioni di IDH1 e TP53 (proteina tumorale 53);
4. neurale, mostra *markers* caratteristici sia del sottotipo classico che del sottotipo proneurale.

I sottotipi mesenchimale e classico sono tipicamente più aggressivi, mentre il sottotipo proneurale è meno aggressivo e si manifesta più spesso in pazienti giovani. [24]

1.2 Trattamento GBM

1.2.1 Terapie tradizionali

Il trattamento *standard* del GBM consiste nella resezione chirurgica della massa tumorale seguita da chemioradioterapia con temozolomide (TMZ) [12]. Tuttavia, diversi lavori si sono concentrati sullo sviluppo di terapie mirate e personalizzate per il paziente. Queste nuove terapie si basano su studi recenti che hanno identificato all'interno delle cellule tumorali alcune mutazioni di geni specifici, a cui può essere attribuito un alto valore predittivo e prognostico.[11] Ciononostante, il GBM rimane un cancro incurabile e l'obiettivo dei trattamenti è prolungare l'aspettativa e migliorare la qualità di vita del paziente.[11]

1.2.1.1 Resezione chirurgica

Sebbene la maggior parte delle terapie contro il GBM prevede approcci multipli e combinati, il trattamento chirurgico rimane il metodo di elezione nella cura e gestione del paziente. Il tasso di sopravvivenza è correlato all'estensione della resezione tumorale, con la resezione totale che rappresenta l'approccio ottimale (quando possibile).[12]

Una risorsa sempre più cruciale per la rimozione di GBM è rappresentata dalle tecniche di *imaging* che permettono di identificare, approssimativamente, i margini tumorali e la localizzazione delle strutture vitali nel cervello che devono essere preservate, sia a livello prechirurgico che intraoperatorio. Il *gold standard* per la diagnosi di tumori cerebrali, per la migliore risoluzione anatomica e maggiore contrasto del tessuto molle, è rappresentato dall' *imaging* a risonanza magnetica nucleare (MRI), spesso in

concomitanza con tecniche di tomografia computerizzata (TC).[24] Tuttavia, data la natura altamente infiltrativa del GBM e l'assenza di margini ben definiti, a causa della formazione di strutture *finger-like* (impercettibili con gli attuali metodi di *imaging*), risulta quasi impossibile rimuovere completamente la massa tumorale, senza intaccare il tessuto sano circostante.

Le cellule tumorali tendono a svilupparsi lungo le fibre neuronali (*neuropils*) senza cambiamenti macroscopici importanti. Pertanto, risulta molto complesso rimuovere completamente il tumore e, quindi, curare il paziente con la sola resezione chirurgica. [11]

I limiti associati alla resezione chirurgica si traducono nella necessità di combinare altre terapie, in modo da ridurre il rischio di recidiva.

1.2.1.2 Radioterapia

Anche se i gliomi sembrano essere abbastanza radioresistenti,[28] la radioterapia svolge un ruolo cruciale nella cura di questi tumori. La radioterapia per i tumori cerebrali viene tipicamente applicata dopo l'intervento chirurgico, auspicabilmente entro 4-6 settimane, al fine di distruggere il tessuto tumorale che non è stato asportato e rimuovere le cellule neoplastiche rimaste in circolo, anche dopo la resezione. Le tecniche radioterapiche tipicamente vengono sfruttate anche nel trattamento di recidive e nel caso di tumori secondari. [28]

Le tecniche di radioterapia (RT) più utilizzate a livello clinico per il trattamento del GBM includono la RT convenzionale 2D, la RT conformazionale 3D, la RT modulata in intensità, la radiochirurgia stereotassica (SRS), la Brachiterapia, la RT particellare, anche nota come terapia protonica. Nonostante le differenze nel principio di funzionamento e applicazione della radiazione, l'azione biologica alla base del trattamento è la creazione di danni al doppio filamento di DNA delle cellule tumorali.[12] In genere, la radioterapia viene somministrata in due frazioni per un totale di 40–60 Gy per sei settimane.[12] Poiché il successo della terapia dipende dalla capacità di erogare sul tumore radiazioni mirate con altissima precisione, è necessario usare dispositivi RT dotati di sofisticati collimatori a più fogli che consentono di limitare raggio d'azione nei tessuti circostanti a 1-2 cm.[12]

1.2.1.3 Chemioterapia

Il trattamento chemioterapico consiste nella somministrazione di uno o più farmaci antitumorali in grado di inibire la crescita e la divisione delle cellule tumorali fino a provocarne la morte. [2]

Lo *standard* clinico è rappresentato dalla somministrazione del temozolomide (TMZ) (75 mg/m² al giorno) durante la radioterapia, seguita da sei cicli successivi di TMZ (150-200 mg/m² al giorno per 5 giorni ogni 28 giorni).[29]

L'uso del TMZ è stato approvato dalla FDA (*Food and Drug Administration*) nel 2005 a seguito di uno studio clinico che ha coinvolto 573 pazienti con diagnosi di GBM.[15]

Il TMZ è un agente alchilante del DNA capace di indurre l'arresto del ciclo cellulare e quindi l'apoptosi. A pH fisiologico è convertito nel composto attivo di breve durata MTIC (carbossiamide monometil triazeno imidazolo) che viene poi ulteriormente idrolizzato. Diversi studi hanno individuato diverse linee cellulari sensibili al TMZ, tra cui A172, U87, U251 e U373. Un potenziale problema con l'uso di TMZ per trattare i pazienti con GBM è che il tumore può acquisire resistenza al TMZ attraverso l'alterazione dell'espressione di proteine alchilanti del DNA ed enzimi di riparazione del DNA, ma anche variazioni delle vie di segnalazione cellulare. [30] Nei pazienti resistenti a TMZ, la MGMT (O-6- metilguanina-DNA metiltransferasi), risulta sovraregolata, favorendo la produzione di una proteina riparatrice del danno al DNA che rimuove gli agenti alchilanti. Anche se è stato dimostrato che l'espressione della MGMT può essere ridotta incrementando l'azione del soppressore tumorale p53 (proteina tumorale 53), la presenza della BBB pone limitazioni per la terapia con p53.[31]

1.2.1.4 Limiti delle terapie tradizionali e nuove terapie

La complessità strutturale e l'eterogeneità intertumorale e intratumorale rappresentano una sfida importante nel trattamento del GBM e rendono necessario lo sviluppo di nuove strategie terapeutiche.

La maggior parte dei tumori sviluppa reti vascolari più fitte e disordinate rispetto ai tessuti sani, con un endotelio disorganizzato, sottile e fenestrato.[12] Dato che il tessuto tumorale promuove la formazione di nuovi vasi sanguigni per nutrirsi ed invadere i tessuti circostanti, sono presenti diversi studi su trattamenti mirati alla limitazione dei fenomeni di angiogenesi tumorale.[32]

In particolare, la *chemioterapia anti-angiogenica* è una tecnica basata sulla somministrazione dell'anticorpo monoclonale Bevacizumab. Il Bevacizumab viene somministrato per via endovenosa a settimane alterne, comunemente con una dose di 10 mg/kg di peso corporeo. L'effetto anti-angiogenico deriva dall'associazione tra l'anticorpo e il fattore di crescita endoteliale vascolare A (VEGF-A), che porta all'inibizione di quest'ultimo. [33] Il Bevacizumab non migliora in modo significativo la sopravvivenza complessiva dei pazienti con glioblastoma di nuova diagnosi, ma viene utilizzato prevalentemente per trattare i glioblastomi ricorrenti. [24]

Un'altra sfida per il trattamento del GBM è la somministrazione di farmaci chemioterapici attraverso la via sistemica. Anche dopo una rimozione estesa, i tumori cerebrali di solito recidivano localmente, nonostante l'applicazione di trattamenti chemioterapici adiuvanti, a causa della presenza della BBB.[34] La BBB è composta da unità neurovascolari che prevengono l'afflusso di molecole endogene ed esogene dannose dal flusso sanguigno. L'effetto di barriera, dovuto alle giunzioni strette tra le cellule endoteliali e alle complesse interazioni tra periciti, membrana basale e astrociti, rappresenta un importante fattore limitante per la terapia antitumorale. [34]

A differenza del tessuto cerebrale sano, la BBB nel GBM presenta una maggiore permeabilità, dovuta a vasi sanguigni mal formati e con perdite.[12] Poiché le alterazioni della BBB non sono uniformi, alcune aree del tumore presentano vasi sanguigni con elevata permeabilità, mentre in altre i vasi sono più ostruiti. Quindi, anche se un farmaco chemioterapico è in grado di penetrare nel tessuto tumorale, spesso non riesce a raggiungere i livelli terapeutici in tutti i distretti. [24]

Questo problema ha portato alla necessità di sviluppare tecniche per aumentare la permeabilità della BBB. Un esempio è rappresentato dalla *High intensity focused ultrasound (HIFUS)* che consente di aumentare in maniera non invasiva la permeabilità attraverso la BBB per facilitare la somministrazione sistemica di agenti terapeutici contro il GBM. Il principio di funzionamento si basa sull'azione combinata di onde ultrasoniche insieme alla somministrazione sistemica di microbolle che fungono da agente di contrasto. Le oscillazioni delle microbolle all'interno dei vasi sanguigni provocano stress di taglio in grado di compromettere l'integrità delle giunzioni strette caratteristiche della BBB.[15]

Il problema della permeabilità della BBB può essere bypassato impiantando, tramite tecniche di chirurgia minimamente invasiva, un microcatetere direttamente nel tumore.[15] La *convection-enhanced delivery (CED)* permette una somministrazione di farmaco localizzata e ad alte dosi per vasti volumi di interesse minimizzando i corrispondenti effetti sistemici.[15]

1.2.2 Nanoterapie

La *National Nanotechnology Initiative* definisce la nanotecnologia come la manipolazione di materiali da 1 a 100 nm,[35] ma, nel campo biomedico, i ricercatori preferiscono estendere la definizione per includere strutture in un intervallo di dimensioni fino a centinaia di nanometri.[35] L'introduzione dei nanomateriali nell'area biomedica ha stravolto le strategie tradizionali sia in termini di applicazioni diagnostiche che terapeutiche.[35]

I sistemi di somministrazione di farmaci (*Drug Delivery Systems*, DDS) nanodimensionati (nanomedicine) possono rappresentare una strategia promettente per incrementare l'accumulo degli agenti terapeutici a livello del sito tumorale. Molti trattamenti contro i tumori cerebrali risultano inefficaci perché il farmaco somministrato raggiunge solo in minima parte l'organo bersaglio a causa delle barriere biologiche presenti al livello sistemico.[36] L'accumulo di farmaco fuori dal tessuto bersaglio impedisce raggiungimento della dose efficace (compromettendo l'efficacia terapeutica) e può causare effetti collaterali, a causa dell'assorbimento indesiderato di farmaci citotossici da parte di cellule sane.[2] I DDS possono essere sintetizzati con tecniche di ingegneria *top-down* o *bottom-up* a partire da vari materiali (quali polimeri, lipidi, proteine, metalli, o semiconduttori) per ottenere diverse forme quali sfere solide, coni retinici, tubi o altre geometrie complesse a seconda della funzione da esercitare.[34]

L'utilizzo di nanotrasportatori, opportunamente ingegnerizzati, permette invece di aumentare il tempo di circolazione dei farmaci, limitare il riconoscimento da parte del sistema fagocitario mononucleare e incrementare l'accumulo nel tessuto bersaglio.[36] In particolare, in base alla modalità di raggiungimento del *target*, i DDS su scala nanometrica possono essere classificati come sistemi di:

- *targeting attivo*: richiede un riconoscimento specifico delle cellule tumorali da parte dei DDS tramite interazioni ligando-recettore, ottenute funzionalizzando i sistemi nanodimensionati con strutture (ad esempio, anticorpi) in grado di legare selettivamente alle cellule tumorali;[24]
- *targeting passivo*: dovuto solo alle piccole dimensioni delle nanoparticelle. I tumori presentano una rete vascolare difettosa con porosità, dette fenestrature, piuttosto grandi (400-700 nm).[37] Queste alterazioni vascolari consentono alle sostanze micromolecolari (da 100 nm a 200 nm) di permeare ed essere trattenute, selettivamente, nell'ambiente circostante il tumore (effetto di aumentata permeabilità e ritenzione (*enhanced permeability and retention*, EPR)); [35]
- *targeting stimolo-mediato*: si tratta di sistemi di rilascio intelligenti in grado di degradarsi o indurre la rottura di specifici legami chimici in risposta a stimoli interni come variazioni di pH, ipossia, presenza di specie reattive dell'ossigeno, attività enzimatica, ecc., oppure stimoli esterni che includono l'esposizione ad ultrasuoni, variazioni di temperatura, applicazione di campi magnetici, ecc.[24]

Tuttavia, i DDS con *targeting* passivo sono privi di selettività verso le cellule tumorali e la BBB, pertanto risultano essere poco adatti al trattamento del GBM. [35] Al contrario,

i DDS con targeting attivo permettono di migliorare l'efficacia del trasporto di farmaci somministrati nella terapia di GBM, in quanto, la funzionalizzazione con peptidi, proteine, aptameri o piccole molecole permette un riconoscimento specifico delle cellule tumorali.[35]

Negli ultimi anni sono stati studiati diversi sistemi nanodimensionati per la somministrazione di farmaci per il trattamento del GBM:

- Nanosfere d'oro
- Nanogel
- Micelle polimeriche
- Liposomi
- Nanoparticelle polimeriche

Di seguito, in Fig. 2, è mostrata una rassegna delle diverse tipologie di nanomedicine che possono essere utilizzate per il trattamento del GBM e una rappresentazione schematica dei vari tipi di targeting.

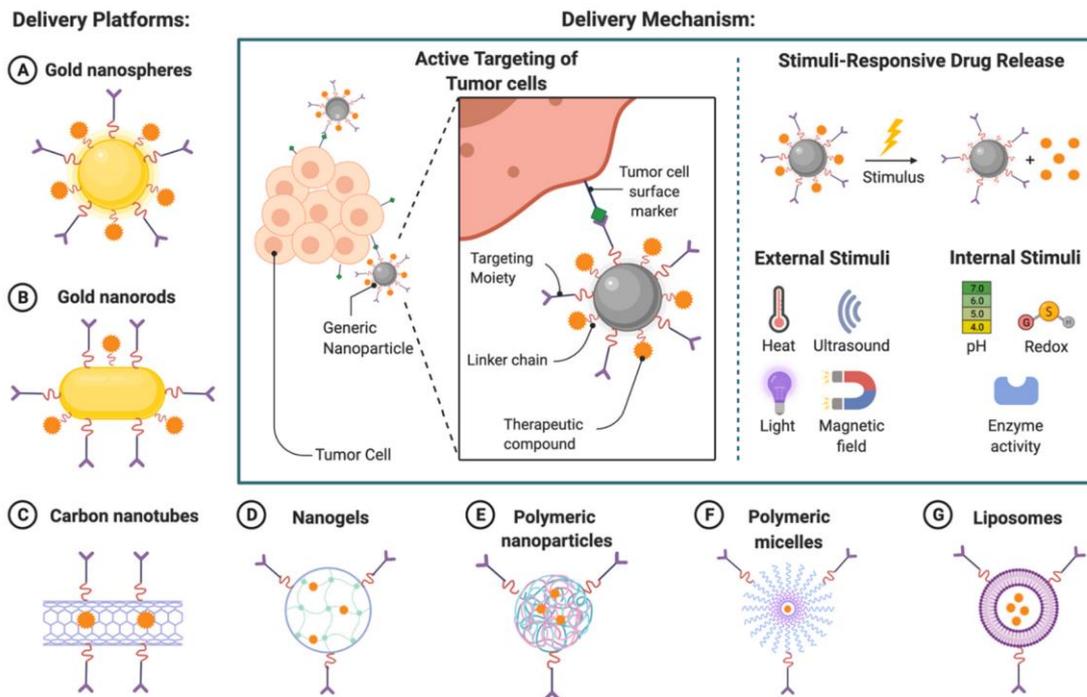


Figura 2: Sistemi di somministrazione di farmaco anti-GBM nanodimensionati e relativi meccanismi di rilascio. Immagine da un articolo di Wei W. et al. [24].

1.2.2.1. Nanosfere d'oro

Le nanosfere sono sistemi a matrice solida, di dimensioni comprese tra 1 e 1000 nm (1 μ m), in cui il principio attivo (farmaco o materiale biologicamente attivo) è

intrappolato o disciolto. [38] Le nanoparticelle d'oro sono state particolarmente utilizzate come vettori per il rilascio di farmaci per via della buona biocompatibilità e la bassa tossicità.[39] Esse possono essere facilmente funzionalizzate e possono essere ottenute in dimensioni variabili tra 1 e 100 nm.[40] Per il trattamento del GBM, in un articolo di Wang et. al. [40] è stata dimostrata la possibilità di utilizzare nanosfere d'oro coniugate con TMZ come sistema di rilascio di farmaci somministrato per via intranasale. Il processo di sintesi e funzionalizzazione delle nanosfere è schematizzato in Fig. 3. In particolare, per migliorare l'efficacia del trattamento, il TMZ è stato coniugato a nanosfere d'oro precedentemente funzionalizzate con anticorpi anti-EphA3 (recettore 3 dell'efrina di tipo A). Il recettore EphA3 è strettamente coinvolto nella proliferazione delle cellule tumorali e risulta sovrappreso nelle cellule iniziatrici di GBM. La modifica superficiale con anti-EphA3 è un esempio di targeting attivo in grado di aumentare l'accumulo del farmaco nella massa del GBM. Inoltre, la scelta della somministrazione intranasale ha permesso di ridurre gli effetti collaterali associati alla via sistemica, ha permesso di bypassare la BBB portando ad un accumulo maggiore di TMZ in prossimità del GBM. I risultati *in vivo* su modelli murini hanno mostrato come l'uso di nanosfere funzionalizzate consenta di incrementare il tasso di apoptosi delle cellule tumorali, aumentando la sopravvivenza media sino a 42 giorni (rispetto a 17 giorni nei controlli e 20 nei soggetti trattati con solo TMZ). [40]

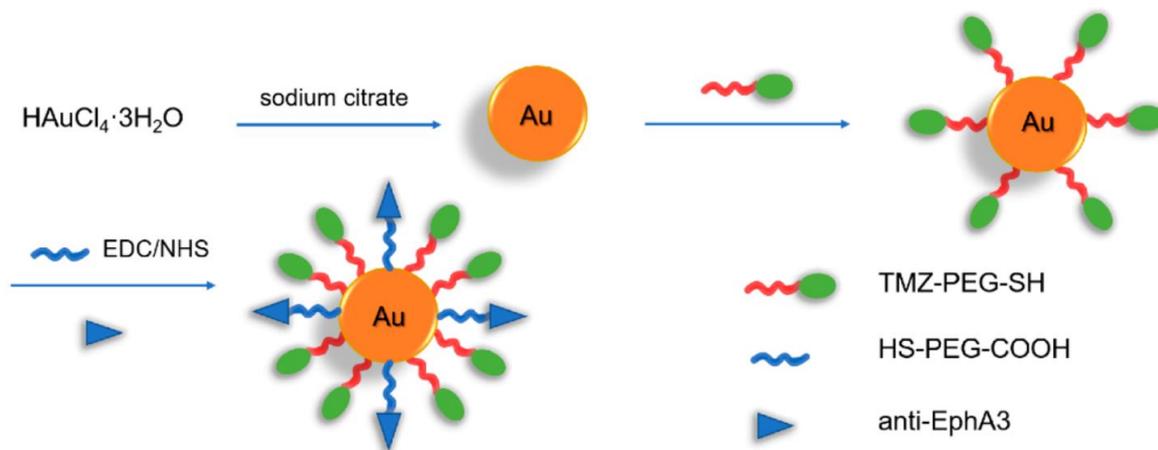


Figura 3: Rappresentazione schematica del processo di preparazione di Nanosfere d'oro coniugate con TMZ e funzionalizzate con anti-EphA3. Immagine estratta dall'articolo di Wang et al. [40].

1.2.2.2 Nanogel

I *Nanogel* sono nanomateriali polimerici leggermente reticolati in grado di trattenere grandi quantità di acqua.[41] Si tratta di sistemi adatti al trasporto e al rilascio di farmaci idrofili in quanto stabili e generalmente robusti, nonostante l'elevato contenuto di acqua.[41] I principali vantaggi dei DDS basati su *nanogel* sono la

possibilità di incapsulare facilmente farmaci e di aggiungere funzionalizzazioni utili a creare sistemi di rilascio “intelligenti”, ossia che consentono la fuoriuscita del farmaco solo in risposta a stimoli specifici.[41] Ad esempio, She D. et. al. [42] realizzarono dei *nanogel*, a base di fosforilcolina, per il trasporto di Doxorubicina (DOX) (schematizzati in Fig. 4). Questo lavoro ha introdotto per la prima volta l’uso dell’azobenzene come reticolante per ottenere il *nanogel*. In particolare, l’efficacia anti-glioblastoma dei *nanogel* caricati con DOX è stata valutata *in vivo* su topi affetti da glioblastoma ortotopico trattati rispettivamente con soluzione salina, DOX libero, *nanogel* non degradabile per effetto dell’ipossia caricato con DOX e *nanogel* degradabile per effetto dell’ipossia caricato con DOX. Nei topi trattati con *nanogel* caricati con DOX e degradabili in ambiente ipossico è stato rilevato un aumento del tasso di inibizione del GBM (valutato sulla base dell’intensità di bioluminescenza del tumore). Inoltre, è stato osservato un aumento notevole del tempo di sopravvivenza (30 giorni) rispetto al controllo (18 giorni) e ai gruppi trattati con DOX libero (19 giorni) o *nanogel* non degradabili (23 giorni). L’azobenzene, come i suoi derivati, si degrada in ambiente ipossico, come quello di molti tumori solidi, tra cui il GBM. Pertanto, questo reticolante consente di avere *nanogel* che si degradano solo all’interno del microambiente tumorale, limitando gli effetti *off-target* grazie a questa particolare strategia di rilascio attivato da stimoli di ipossia.[42]

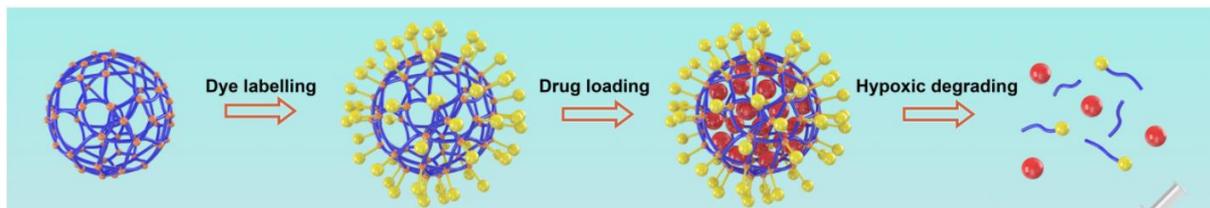


Figura 4: Rappresentazione schematica del Nanogel a base di fosforilcolina e azobenzene. Immagine da un articolo di She et al.[42]

1.2.2.3 Micelle polimeriche

In ambiente acquoso, le molecole polimeriche possono combinarsi spontaneamente disponendosi in modo da formare un nucleo interno isolato dall’acqua. Questo processo porta alla formazione di micelle polimeriche, tipicamente con dimensioni variabili da 10 a 100 nm.[43] Le micelle polimeriche, con il nucleo idrofobico, rappresentano un esempio di DDS adatto per il trasporto di farmaci scarsamente solubili, come ad esempio il Paclitaxel (PTX).[43] Tipicamente esso veniva diluito in soluzioni saline per essere somministrato per via endovenosa, ma questo approccio può causare effetti collaterali come ipersensibilità e nefrotossicità. [44]

In uno studio di Zhan et al. [44] è stato osservato come sia possibile migliorare l'efficacia antitumorale incapsulando il PTX all'interno di micelle a base di un co-polimero a blocchi composto da polietilenglicole e acido polilattico (PEG-PLA). La solubilità in acqua del farmaco, migliorata dall'incapsulamento nella micella, ha permesso di incrementare il tempo di circolazione del PTX nel sangue. Per migliorare la capacità di targeting, le micelle sono state funzionalizzate con sequenze RGD. È stato osservato che le cellule U87 e le cellule dell'endotelio tumorale tendono a sovraesprimere l'integrina $\alpha\beta3$, per cui il peptide c(RGDyK), che presenta un'elevata affinità di legame con l'integrina $\alpha\beta3$, è stato utilizzato come ligando nella funzionalizzazione delle micelle. Il successo di questo approccio è stato dimostrato effettuando degli studi di biodistribuzione *in vivo* in topi con tumori di glioblastoma U87MG impiantati per via sottocutanea. I risultati mostrano come vi sia un accumulo preferenziale delle micelle funzionalizzate nel tumore principalmente attraverso il meccanismo di associazione mediato dal peptide c(RGDyK). Inoltre, il tempo medio di sopravvivenza dei topi trattati con micelle funzionalizzate (48 giorni) era significativamente superiore rispetto ai soggetti trattati con sistemi commerciali (Taxol), per cui la sopravvivenza era di soli 38,5 giorni. [44]

1.2.2.4 Liposomi

I liposomi sono strutture costituite da un doppio strato di fosfolipidi, i quali si dispongono spontaneamente a formare vescicole quando sono dispersi in ambiente acquoso. All'interno della vescicola è possibile identificare regioni idrofile (il nucleo, in prossimità delle teste idrofile) e regioni idrofobiche (in corrispondenza delle code dei fosfolipidi).[35]

La presenza di compartimenti distinti, con affinità diversa con l'acqua, consente di trasportare all'interno dei liposomi farmaci con caratteristiche chimiche diverse, realizzando sistemi per il rilascio simultaneo di diversi agenti.[35] Un esempio di utilizzo di liposomi come DDS di doxorubicina è presentato nello studio di Hayward S. et al. [45]. La coniugazione dell'acido ialuronico (HA) ai liposomi (Fig.5) ha permesso di ottenere nanomedicine in grado di legarsi selettivamente alle cellule di GBM. Infatti, queste cellule tumorali sovraesprimono, rispetto alle cellule sane, il recettore CD44, proteina transmembrana che si lega selettivamente all'HA. La selettività di questi sistemi basati su liposomi è stata validata *in vitro*, su modelli cerebrali costituiti da una combinazione di cellule gliali sane (come astrociti e microglia) e cellule di glioblastoma (A172) mediante analisi di citometria a flusso. Sono stati effettuati test di vitalità post trattamento per determinare concentrazione letale per uccidere il 50% della popolazione cellulare (LC50) su astrociti corticali, microglia e cellule A172 di GBM. I risultati hanno mostrato che, nel caso di DOX incapsulata in liposomi, la LC50 per le cellule A172 era quasi 5 volte più bassa di quella per gli astrociti corticali e quasi 3 volte

più bassa della LC50 per le cellule di microglia. Queste evidenze confermando il vantaggio significativo dell'impiego dell'HA come ligando attivo per il targeting del GBM, in quanto consente di aumentare la selettività del trattamento e limitare la tossicità sulle cellule residenti del cervello.[45]

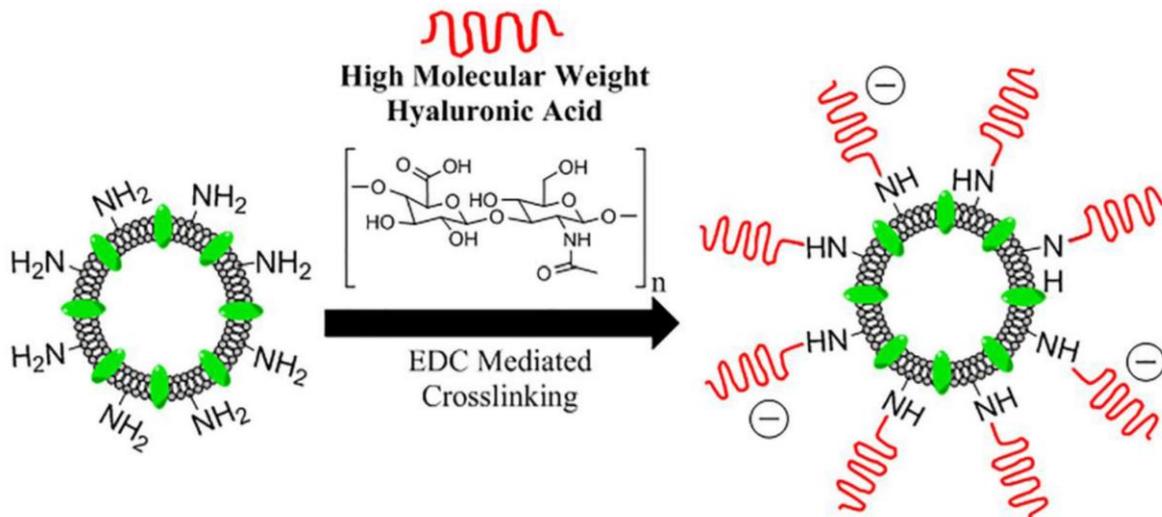


Figura 5: Rappresentazione schematica della struttura di liposomi coniugati con acido ialuronico (HA) ad alta densità. Immagine da un articolo di Hayward S. et al.[45].

1.2.2.5 Nanoparticelle polimeriche

Grazie alla loro elevata versatilità, le nanoparticelle (NPs) sono i trasportatori più studiati ed utilizzati nello sviluppo di nanomedicine.[34] In generale, le nanoparticelle hanno un grande rapporto superficie/volume e questo conferisce un'elevata capacità di carico.[46] Le NPs Polimeriche (PNPs) possono essere ottenute a partire da polimeri sintetici (poliacrilammide, e-poli-caprolattone e poliacrilato) o naturali (albumina, gelatina, chitosano e polisaccaridi) [47]. Esse sono in grado di limitare la tossicità dei farmaci, ma al tempo stesso aumentare la biodisponibilità, l'emivita e la solubilità in acqua.[48] Le nanoparticelle polimeriche presentano, rispetto ad altri tipi di nanoparticelle, migliore cinetica di rilascio, migliore compatibilità con alcuni agenti attivi, nessun problema di ossidazione.[49] Questi sono solo alcuni dei vantaggi che hanno spinto all'applicazione di NPs polimeriche contenenti farmaco nel trattamento del GBM. Un esempio è rappresentato dallo studio di Maleki H. et al. [50] in cui sono state realizzate, per nano-precipitazione, NPs in metossipoli (etilenglicole)-poli (acido lattico-co-glicolico) contenenti PTX ed etoposide (ETP) (NP mPEG-PLGA) per migliorare l'efficacia terapeutica nel trattamento del GBM intracranico. Il vantaggio di utilizzare una terapia combinata con più farmaci consiste nel poter regolare vie di segnalazione distinte, garantendo un'aumentata citotossicità a ridotto dosaggio di ciascun farmaco [51]. Eseguendo test di vitalità cellulare su cellule di glioma U87 e C6, è stata osservata

una notevole differenza tra l'effetto citotossico prodotto dai farmaci in forma libera (inferiore all'80%) e le NPs di mPEG-PLGA co-caricate con PTX/ETP (citotossicità intorno al 92%). L'efficacia del trattamento è stata analizzata anche *in vivo* attraverso l'analisi di sopravvivenza Kaplan-Meier su ratti con glioma intracranico. I risultati ottenuti hanno che la somministrazione di mPEG-PLGA co-caricate con PTX/ETP consente di raggiungere una sopravvivenza media di 72 giorni, significativamente più alta di quella rivelata su controlli e soggetti trattati con solo PTX e ETP (rispettivamente, 34, 36 e 37 giorni). Lo studio ha mostrato come molti degli effetti indesiderati associati alla somministrazione dei due farmaci, PTX ed ETP, possono essere risolti grazie all'incapsulamento in NPs polimeriche, capaci di indurre una significativa regressione del tumore.[51]

1.2.2.6 Limiti dei sistemi di rilascio di farmaci nanodimensionati

I sistemi di somministrazione di farmaci su scala nanometrica (DDS) hanno dimostrato di possedere il potenziale per aumentare l'efficacia della terapia contro il GBM, in quanto in grado di migliorare la stabilità e la solubilità dei farmaci, le cinetiche di trasporto e di rilascio.[47] Tuttavia, i DDS non sempre sono in grado di penetrare nel microambiente tumorale, a causa di diverse barriere biologiche come l'alta pressione intratumorale, l'elevata rigidità della ECM del GBM e la presenza della BBB.[52] Inoltre è indispensabile identificare le concentrazioni di DDS ottimali che consentano di somministrare una dose limitata con una cinetica di rilascio tale da ridurre il rischio di effetti citotossici sistemici senza compromettere l'efficacia di trattamento. [53]

Come suggerito dal lavoro di Brachi G. et al. [54], la somministrazione locale di NPs può rappresentare una valida soluzione alternativa a questi problemi. Infatti, consente non solo di aggirare la BBB, ma anche permette anche di raggiungere elevate concentrazioni di farmaco nel sito del tumore con una bassa tossicità sistemica. In questo studio, il rilascio locale è ottenuto incapsulando all'interno di un *Hydrogel* iniettabile termoresponsivo delle NPs a base poliuretano (PUR) marcate con cianina 7 e contenenti un modello di farmaco fluorescente (BODIPY) è stato incapsulato. In Fig.6 è mostrata una rappresentazione schematica del sistema di rilascio.

La termoresponsività dell'Hydrogel è data dall'utilizzo di Poloxamer 407, polimero biocompatibile che in soluzione è in grado di subire una transizione sol-gel in risposta a variazioni di temperatura. Il vantaggio risiede nel fatto che è possibile preparare facilmente la soluzione polimerica a temperatura ambiente e nel momento dell'iniezione nel sito tumorale, a causa dell'aumento della temperatura, si assiste alla transizione in gel. La presenza del gel permette di evitare la dispersione delle NPs e quindi migliorare l'efficacia del trattamento. [54] Inoltre, la ritenzione di NPs e NPs in

Hydrogel (HG-NPs) è stata esaminata nel tempo mediante IVIS. I risultati mostrano che l'iniezione intracranica delle NPs e delle HG-NPs è stata ben tollerata data l'assenza di segni neurologici di tossicità in tutti gli animali trattati. [54]

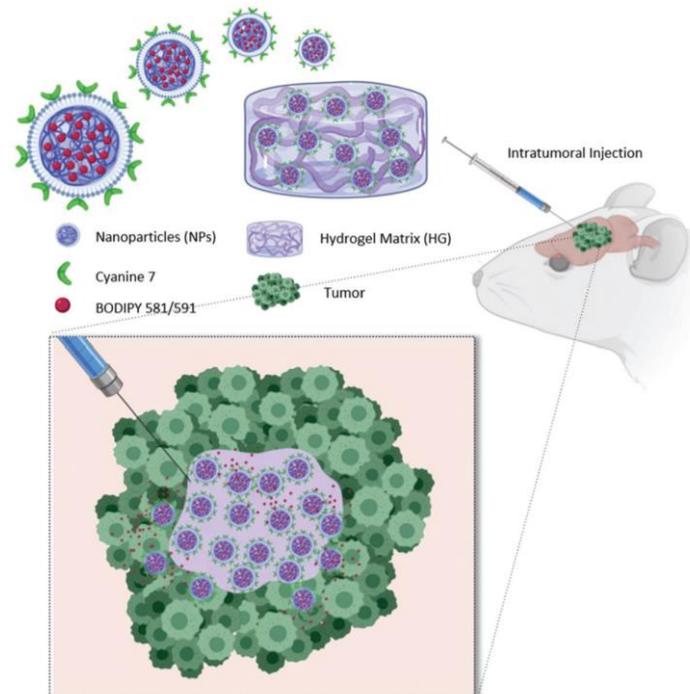


Figura 6: Rappresentazione schematica del sistema di rilascio intratumorale Hydrogel-NPs. Immagine da un articolo di Brachi G. et al. [54].

1.2.3 Terapie basate sul trasporto mediato da cellule

Paul Ehrlich ha scoperto che l'elevata selettività della BBB per le molecole non si applica allo stesso modo alle cellule.[55] Questa scoperta ha aperto la strada a nuove modalità di targeting, basate sull'impiego di cellule dei tessuti tumorale e cerebrale come carrier di NPs e farmaci.[55]

I carrier cellulari o basati su componenti cellulari (ad esempio, la membrana cellulare) presentano molteplici caratteristiche vantaggiose come l'elevata biocompatibilità, biomimeticità, lunga circolazione, migliore stabilità del caricamento del farmaco. L'analisi della letteratura sul trasporto mediato da cellule svolta da Li Y. et al. [56] ha mostrato come le cellule del sangue (piastrine, eritrociti) siano state le prime ad essere state studiate come trasportatori. Benché rappresentino tuttora l'opzione più studiata, anche altre cellule, come i macrofagi residenti, hanno mostrato risultati promettenti.

Lo stato infiammatorio tipico dell'insorgenza di un tumore promuove il reclutamento delle cellule immunitarie coinvolte nei meccanismi di difesa.[57] Il rilascio di chemochine e citochine da parte di cellule tumorali e stromali nel microambiente

tumorale permette l'infiltrazione di varie tipologie di cellule immunitarie, tra cui i neutrofili. I neutrofili sono cellule circolanti nel sangue che partecipano ai meccanismi di risposta alle infiammazioni e, data la capacità di migrare dal flusso sanguigno al sito infiammato, si presentano come ottimi candidati per il trasporto di farmaci o DDS. [53]

In uno studio di Xue J. et [57] è stato studiato un approccio basato sul trasporto di nanoparticelle mediato da neutrofili applicato al trattamento di fenomeni di recidiva del glioma. Questi ricercatori hanno incapsulato l'agente chemioterapico PTX all'interno di liposomi cationici (PTX-CL), successivamente internalizzati in neutrofili derivati dal midollo osseo di topo (PTX-CL/NE). Per valutare la selettività del sistema di rilascio PTX-CL/NE è stato quantificato il PTX rilasciato dalle PTX-CL/NE in diversi organi di topi trattati chirurgicamente con G422. La figura 7a, estratta dallo studio in oggetto, e PTX-CL/NE hanno presentato un accumulo lento nel fegato rispetto al farmaco libero (Taxol) e PTX-CL. Tuttavia, è stato osservato un accumulo più elevato di PTX (Fig. 7b) nella milza a causa al naturale accumulo dei neutrofili in questo distretto. Ciononostante, i PTX-CL/NE hanno prodotto un accumulo estremamente elevato di PTX nel cervello infiammato a differenza delle altre formulazioni (come mostrato in figura 7c). Inoltre, è stata determinata la quantità di DiR (1,1'-dioctadecyl3,3',3'-tetramethylindotricarbocyanine iodide) negli organi per valutare i profili di distribuzione dei trattamenti nei diversi modelli. I PTX-CL/DiR-NEs hanno mostrato la più alta area sotto la curva del segnale DiR (1.162 e 86 volte superiore a quella del Taxol e della PTX-CL) nel cervello. Inoltre, si è verificato un maggiore accumulo di PTX nel cervello dei topi portatori di glioma trattati chirurgicamente (rispetto a quelli non trattati), correlata a una maggiore presenza di NE dopo la somministrazione endovenosa di PTX-CL/NE. Inoltre, la sopravvivenza media più lunga è stata osservata per i topi trattati con PTXCL/NEs: il tasso di sopravvivenza del 50% ha raggiunto i 61 giorni, rispetto ai 29 giorni del Taxol e ai 38 giorni del PTX-CL.

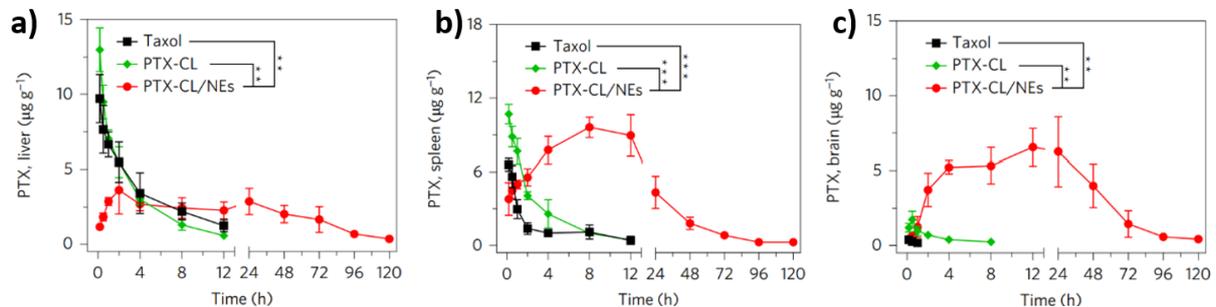


Figura 7: Quantificazione della distribuzione del PTX nel fegato (a), nella milza (b) e nel cervello (c) di topi portatori di G422 trattati chirurgicamente dopo la somministrazione endovenosa di diverse formulazioni di PTX al dosaggio di 5 mg kg^{-1} nel tempo.

Queste osservazioni hanno dimostrato il fatto che una strategia di trasporto di DDS mediato da neutrofili può rappresentare una metodica alternativa in grado di migliorare gli attuali trattamenti. [57]

Per il trattamento dei tumori cerebrali, anche i macrofagi possono essere impiegati come trasportatori di farmaci e nanomedicine. I macrofagi sono cellule coinvolte nella difesa primaria dell'organismo, detta immunità "innata", capaci di attivare le loro funzioni di sorveglianza in risposta a nuovi segnali di pericolo (per esempio, infezioni, tumori).[58] I macrofagi, che vengono reclutati in caso di necessità, aderiscono con forza all'endotelio della BBB e trasmigrano nel parenchima cerebrale per esplicare le loro funzioni. Essi possono essere facilmente isolati dal paziente tramite il midollo osseo in gran quantità, hanno una capacità naturale di fagocitosi dei nanomateriali (in quanto riconosciuti come corpi estranei) e di migrazione attraverso le barriere ematiche [58].

Tra le cellule immunitarie innate residenti nel SNC, le cellule della microglia sono coinvolte nella prima fase di risposta a stimoli potenzialmente pericolosi, per cui possono anche essere reclutate dalle cellule di glioma e penetrare nella massa tumorale [59]. In uno studio di Du Y. et al. [59], le cellule della microglia (BV2) vengono utilizzate come vettore di trasporto per fornire PTX per il trattamento del glioma (Fig.8). Poiché il PTX è un farmaco antitumorale citossico, l'agente è stato incapsulato in liposomi (Lp) per limitare gli effetti collaterali sulla microglia. Inoltre, i Lp sono stati funzionalizzati con la dipalmitoil fosfatidilserina (DPPS) per incrementare la fagocitosi. I test preliminari *in vitro* hanno confermato la capacità di migrazione delle BV2 contenenti liposomi (Lp/BV2) attraverso un modello *transwell* di endotelio cerebrale verso le cellule di glioma. I risultati su modelli murini di glioblastoma hanno dimostrato come vi sia una riduzione comparabile del volume del tumore dopo la somministrazione endovenosa di Lp/BV2 (0,25 mg kg⁻¹ PTX) e Lp (2 mg kg⁻¹ PTX), nonostante una riduzione di otto volte del dosaggio di PTX all'interno della microglia rispetto ai liposomi liberi. Questi risultati confermano che il sistema di trasporto basato su cellule della microglia permette di incrementare la penetrazione del farmaco attraverso la BBB, facilitando il rilascio mirato e selettivo in prossimità delle cellule di glioma. [59]

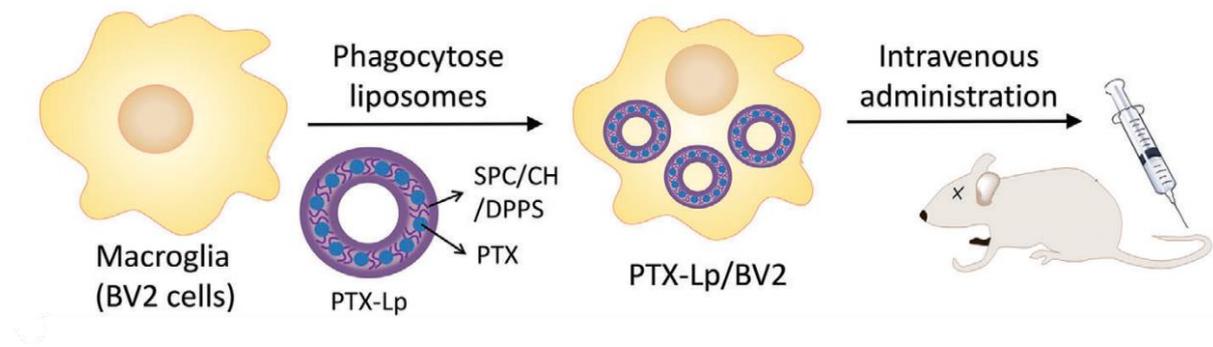


Figura 8: Rappresentazione schematica del sistema di rilascio di Paclitaxel (PTX) basato su liposomi funzionalizzati con Dipalmitoilfosfatidilserina (DPPS) trasportati mediante cellule di microglia (BV2). Immagine da un articolo di Du Y. et al. [59].

Una strategia biomimetica alternativa al trasporto mediato da cellule si basa sull'uso di membrane cellulari per il rivestimento di nanoparticelle sintetiche.[60] Questo tipo di biofunzionalizzazione ha permesso alle nanoparticelle di “imitare” le cellule umane, sfuggendo alla fagocitosi da parte del sistema fagocitario mononucleare (MPS) e circolare per periodi più lunghi nel sangue [60].

Uno studio di Quiao et al. [61] fornisce un esempio di rivestimento di sistemi nanodimensionati con la membrana di cellule di microglia. La procedura di sintesi di nanoparticelle biomimetiche per il rilascio di zolendronato (ZOL) seguita in questo lavoro è schematizzata in Figura 9. In breve, la membrana cellulare delle cellule di microglia (BV2) è stata estratta mediante frantumazione meccanica, poi utilizzata per rivestire nanoparticelle caricate con zolendronato (ZOL-NPs). Attraverso la sottoregolazione della farnesil pirofosfato sintetasi (FPPS), lo ZOL provoca l'apoptosi delle cellule GBM resistenti alla TMZ e aumenta anche la percentuale di macrofagi associati al GBM. La citotossicità sulle cellule GL261 e GL261/TR è stata valutata ed è emerso che Le ZOL-NPs hanno mostrato una citotossicità dose-dipendente. In particolare, l'IC50 (concentrazione di farmaco in grado di indurre l'apoptosi del 50% delle cellule) è stata misurata per lo ZOL libero e ZOL-NPs. L'IC50 misurata per lo ZOL libero sulle cellule GL261 e GL261/TR era di 48,45 µg/mL, mentre L'IC50 di ZOL-NPs su cellule GL261 e GL261/TR era rispettivamente di 14.30 µg/mL e 21.96 µg/mL. Questi risultati mostrano che le ZOL-NPs rivestite con membrana cellulare di BV2 non solo hanno la capacità di raggiungere attivamente il sito tumorale ma hanno anche chiaramente ridotto la crescita del GBM resistente al TMZ attraverso l'induzione dell'apoptosi. [61]

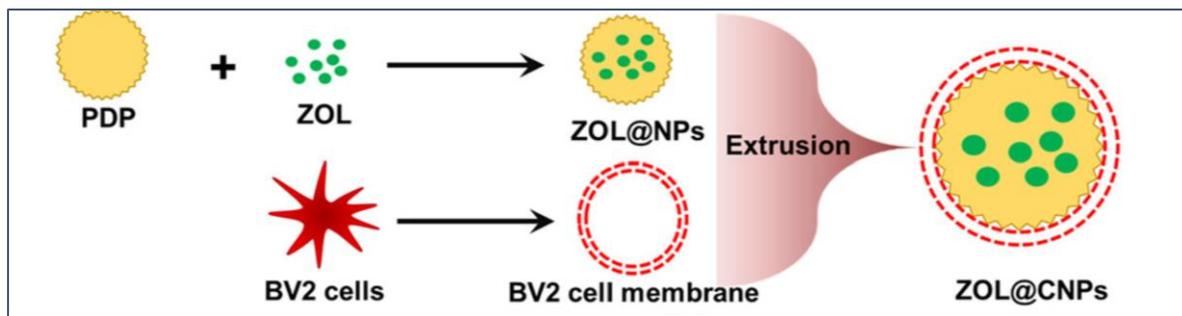


Figura 9: Rappresentazione schematica del sistema di rilascio di Zolendronato (ZOL) basato su un sistema nanodimensionato rivestito con la membrana di cellule di microglia (BV2). Immagine da un articolo di Quiao et al. [61].

1.2.3 Meccanismi di trasporto intracellulare associato all'azione di nanomedicine

Come descritto in precedenza, per massimizzare gli effetti terapeutici le nanoparticelle possono essere funzionalizzate e ingegnerizzate in modo da rispondere in maniera specifica al processo patologico del GBM. Tuttavia, i meccanismi di trasporto intracellulari delle NPs alla base dell'azione terapeutica rimangono ancora poco esplorati.[62]

Le NPs vengono internalizzate attraverso meccanismi di endocitosi, internalizzate all'interno di endosomi precoci da cui poi passano, seguendo la via endocitica, agli endosomi tardivi o ai lisosomi per essere poi degradati.[63] Poiché l'efficacia d'azione di NPs dipende dalla capacità di eludere la degradazione lisosomiale, comprendere il *patway* intracellulare delle NPs è fondamentale per prevedere e influenzare il meccanismo d'azione delle particelle stesse. Tuttavia, le tecnologie attuali consentono solo un limitato monitoraggio dei meccanismi di internalizzazione.[64]

Da uno studio di Sandin P. [62] è emerso che tutte le strutture di membrana che partecipano ad eventi di traffico esprimono *marker* appartenenti alla famiglia Rab GTPasi. Gli autori hanno quindi ipotizzato che il percorso intracellulare intrapreso dalle NPs possa essere monitorato sfruttando la co-localizzazione tra le NPs e i diversi Rab. Questa intuizione è stata validata effettuando un'analisi con microscopia confocale in *time-lapse* su nanoparticelle somministrate in cellule viventi (Hela). I diversi compartimenti intracellulari (endosomi tardivi, endosomi precoci, lisosomi, endosomi di riciclaggio) sono state marcate con diversi anticorpi fluorescenti specifici rispettivamente per Rab7, Rab5, Rab9 e Rab11. Raccogliendo informazioni spaziali e temporali e, in particolare, sono stati definiti i profili di co-localizzazione tra NPs da 40 nm e i diversi compartimenti endocitici. Questi studi hanno rivelato che le NPs transitano rapidamente attraverso le membrane positive a Rab5 (endosomi precoci),

prima di passare in compartimenti che esprimono Rab9 e Rab7 (lisosomi e endosomi tardivi, responsabili della degradazione delle NPs). Solo una piccola parte di NPs internalizzate è stata rilevata nelle membrane Rab11-positive, indicando che il riciclaggio di queste NPs verso la superficie cellulare non è una via preferenziale. [62]

Questo studio ha mostrato, quindi, un approccio efficace e innovativo per l'identificazione dei compartimenti intracellulari coinvolti nel *trafficking* di NPs, la cui comprensione è essenziale per lo sviluppo di nuovi materiali e nanosistemi in grado di veicolare i farmaci in modo efficiente e sicuro.

1.3 Scopo del lavoro

Il presente lavoro di tesi si propone di sviluppare e investigare nuovi sistemi per il rilascio controllato di farmaci chemioterapici per il trattamento del Glioblastoma, basati su nanoparticelle e cellule del microambiente tumorale. Per questo motivo, sono state sintetizzate delle nanoparticelle (NPs) polimeriche con struttura core-shell utilizzate come veicolo di trasporto di Bortezomib (BTZ). Il BTZ è un inibitore del proteasoma e agisce su molte vie di segnalazione.[65] Poiché questo farmaco causa significativi effetti citotossici quando viene somministrato in forma libera e non può penetrare attraverso la barriera ematoencefalica [66], è indispensabile utilizzare trasportatori che garantiscano un miglior controllo su circolazione sistemica e cinetiche di rilascio.

Dopo aver caratterizzato le NPs e la cinetica di rilascio del BTZ, è verificata l'effettiva capacità di internalizzazione delle NPs da parte di diverse cellule tumorali di GBM (U251 e U87), che rappresentano il target terapeutico. È stato studiato anche l'uptake da parte di cellule residenti del cervello, come cellule della microglia (HMC-3), potenzialmente candidate al trasporto di NPs, e astrociti (HASTR), per valutare eventuali effetti collaterali su cellule tipicamente presenti in prossimità del sito tumorale.

Per valutare l'efficacia del trattamento con NPs e confrontarne gli effetti rispetto alla somministrazione di farmaco libero, sono stati poi effettuati test di vitalità su modelli *in vitro* 2D e 3D a diversi *time-point* e con diverse concentrazioni di farmaco. La realizzazione di sferoidi cellulari 3D ha permesso di definire modelli *in vitro* più articolati e accurati rispetto alle colture bidimensionali. Gli sferoidi ottenuti sono stati, inoltre, inseriti in *hydrogel* con proprietà meccaniche simili alla matrice extracellulare (ECM) del GBM per determinare l'influenza della rigidità della matrice sull'invasione

tumorale e sulla risposta al trattamento. In particolare, il meccanismo di invasione degli sferoidi tumorali multicellulari è stato studiato in due diversi *hydrogel* (a base di collagene e polisaccaridi). L'aggiunta di queste matrici, che replicano alcuni componenti chiave della ECM, ha consentito di definire un modello *in vitro* 3D di GBM più complesso e affidabile, che è stato utilizzato per l'ulteriore validazione del trattamento con BTZ e NPs.

Sebbene i risultati ottenuti abbiano evidenziato come l'uso di NPs consenta di ridurre gli effetti negativi del trattamento con farmaco libero, mantenendo una buona azione antitumorale, la principale limitazione all'applicazione clinica resta il limitato accumulo nel sito tumorale. Le NPs tipicamente vengono somministrate per via endovenosa e una volta entrate nella circolazione sistemica, sulla superficie delle NPs vengono assorbite una serie di proteine e biomolecole, che formano una corona proteica. Tale rivestimento attiva il sistema dei fagociti mononucleari (MPS) con il risultato che una porzione significativa di NPs viene rapidamente eliminata dalla circolazione sanguigna. [67] Per prolungare il tempo di circolazione sanguigna delle NPs mirate al cervello, è necessario inoltre evitare l'escrezione renale. [67] Infine, l'accumulo di NPs all'interno dei tumori cerebrali è ostacolato dall'elevata rigidità della ECM e dalla presenza della BBB. [52]

Per superare queste limitazioni, perciò, è stato deciso di utilizzare le cellule della microglia come trasportatori di NPs in modo da sfruttare la loro capacità di penetrazione nel parenchima cerebrale attraverso la BBB. [59] Per validare l'efficacia di questo approccio, è stata studiata la capacità di internalizzazione e rilascio di NPs fluorescenti da parte della microglia, attraverso tecniche di citometria a flusso e quantificazione in fluorescenza. L'efficacia terapeutica del trasporto mediato da cellule è stata valutata su modelli tumorali bidimensionali e tridimensionali, somministrando diverse quantità di cellule di microglia che avevano precedentemente internalizzato BTZ-NPs. Infine, è stata studiata la capacità di migrazione delle cellule della microglia verso sferoidi tumorali attraverso gel replicanti la GBM ECM, per confermare la possibilità di sfruttare il naturale tropismo verso il GBM come meccanismo di *targeting* attivo.

Materiali e Metodi

2.1 Materiali

2.1.1 Nanoparticelle

Le nanoparticelle sintetizzate hanno una struttura *core-shell*, rappresentata schematicamente in Fig. 10. Il *core* polimerico, che consente l'incapsulamento e il rilascio di farmaci idrofobici, è stato realizzato utilizzando un poliuretano proprietario a base di policaprolattone (PCL) (NS-HC2000) precedentemente sintetizzato dal gruppo di ricerca [68]. Per ottenere, invece, il guscio esterno sono stati miscelati due diversi lipidi: L- α -phosphatidylglycerol (Egg, Chicken) (sodium salt) (EGG-PG) and 1, 2-Distearoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine-Poly (ethylene glycol) (DSPE-PEG), entrambi acquistati da Avanti® Polar Lipids.

Per sintetizzare NPs fluorescenti, durante la fase di formazione dell'involucro, è stato aggiunto un lipide marcato con un fluoroforo, l- α -fosfatidiletanolamina N-(lissaminerhodamineB-sulfonyl) (EggLiss-Rhod PEDSPE-PEG, Avanti® Polar Lipids) oppure 1,2-distearoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine-N-[amino(polyethylene glycol)-2000]-N-(Cyanine 5) (DSPE PEG(2000)-N-Cy5, Avanti® Polar Lipids).

Il Bortezomib (BTZ, Selleck Chemicals), inibitore del proteasoma, è stato incapsulato nel nucleo polimerico delle NPs. Tutti i solventi erano di grado analitico.

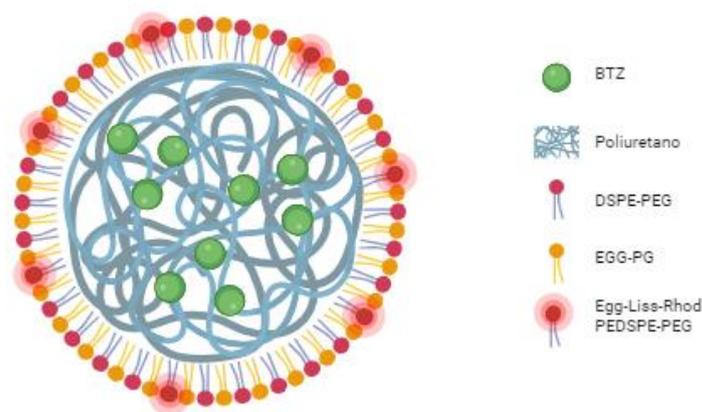


Figura 10: Struttura delle Nanoparticelle. BTZ è incapsulato nel nucleo polimerico a base di poliuretano (NS-HC2000), rivestito da un guscio esterno a base lipidica (DSPE-PEG e EGG-PG). Per ottenere NPs fluorescenti sono state aggiunte piccole quantità di Egg-Liss-Rhod. Immagine creata con Biorender.com

2.1.2 Colture cellulari

Tutte le linee cellulari sono state incubate a 37°C, in un'atmosfera al 5% di CO₂, ad eccezione degli astrociti cerebrali umani che sono stati incubati a 33°C. Le cellule sono state generalmente coltivate in *flask* T75 e passate in subcultura all'occorrenza (tipicamente ogni 2/3 giorni), utilizzando la tripsina (Gibco™) come agente di distacco. Di seguito un elenco di tutte le linee cellulari utilizzate:

- Le cellule di GBM umane differenziate **U-251 MG**, fornite dall'*Italian Institute of Genomic Medicine* (IIGM) sono state coltivate in DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*), addizionato con il 10% di siero fetale bovino (FBS, Gibco™) e con l'1% di penicillina/streptomicina (1% P/S) (Gibco™).
- Le cellule di GBM umane differenziate **U87 MG**, fornite dall'*American Type Culture Collection*, ATCC® HTB14TM, e la loro versione fluorescente ottenuta mediante trasfezione con proteina verde fluorescente (GFP), sono state coltivate in MEM (*Minimal Essential Medium*), addizionato con il 10% FBS (Gibco™) e 1% P/S (Gibco™).
- Le cellule staminali tumorali **GBM-8**, derivate da tessuto tumorale cerebrale umano, sono state fornite da un collaboratore (*Houston Methodist Research Institute*) e coltivate in *flask* non adesive utilizzando *Neurobasal Medium* (Gibco™), con l'aggiunta di eparina alla concentrazione di 2 mg/ml, supplemento di B27 allo 0,2%, supplemento di N2 allo 0,5%, 20 mg/ml di fattore di crescita epidermico (EGF), 20 mg/ml di fattore di crescita dei fibroblasti (FGF) e 1,4% di L-Glutamina (tutti acquistati da Gibco™).
- Le linee cellulari di microglia umana **HMC-3** (HMC3, ATCC® CRL3304TM) sono state coltivate in MEM integrato con 12% FBS, 1% P/S.
- Astrociti umani immortalizzati in modo condizionale, **HASTR/ci35**, clone 35 sviluppato dall'Università di Farmacia e Scienze della Vita di Tokyo, sono stati coltivati in terreno Gibco Astrocyte (*Life Technologies*, Cat# A1261301) con supplemento di antibiotici (1% P/S) e Blastocidina S Hydrochloride (Fisher BioReagents).

Per mimare l'ECM sono stati utilizzati due diversi tipi di *hydrogel* in cui sono stati poi inserite cellule e/o sferoidi:

- **Hydrogel di Collagene di tipo I** 4mg/mL, (AMSBio Cultrex® 3D collagene di tipo I, coda di ratto, 5 mg/mL, #3447-020-01), diluito con 1M HEPES (ThermoFisher 15630-122, pH 7.2-7.5) e 37 g/L NaHCO₃ (Sigma S5761-500G), in rapporto 8:1:1.
- **VitroGel® 3D High Concentration**, *TheWell Bioscience*, Inc.

2.2 Metodi

2.2.1 Preparazione delle nanoparticelle

La procedura di sintesi per nanoprecipitazione delle NPs è schematizzata in figura 11. È stata preparata una soluzione lipidica di EGG-PG (200 μg) e DSPE-PEG (240 μg) in acqua bidistillata (ddH₂O 1,56 mL), mantenuta sotto agitazione (250 rpm) a 60°C per evitare l'aggregazione lipidica e la conseguente formazione di micelle. Questa temperatura permette di ottenere gusci lipidici sferici che poi andranno a rivestire il core polimerico. Per le nanoparticelle fluorescenti, 10 μg di Egg-Liss-Rhod PEDSPE-PEG o DSPE PEG(2000)-N-Cy5 sono stati aggiunti alla soluzione lipidica in acqua. Il poliuretano NS-Hc2000 è stato sciolto in acetonitrile (ACN) per ottenere 1 mL di soluzione polimerica alla concentrazione di 1 mg/mL, aggiunta goccia a goccia alla soluzione lipidica, mantenuta sempre in agitazione, per indurre la formazione spontanea di NPs. Per incapsulare farmaco all'interno delle NPs, 50 μg di BTZ sono stati aggiunti alla soluzione polimerica in ACN. È stato gocciolato 1 mL di acqua bidistillata per favorire l'evaporazione del solvente. Per isolare le NPs in sospensione, sono stati eseguiti 2 cicli di centrifuga utilizzando unità filtranti centrifughe Amicon® Ultra (dotate di una membrana con *cutoff* da 10 kDa) per 13 minuti a 3200 rpm e a temperatura ambiente (RT). Le particelle sono state risospese in 1 mL di acqua prima di eseguire il secondo ciclo di centrifuga.

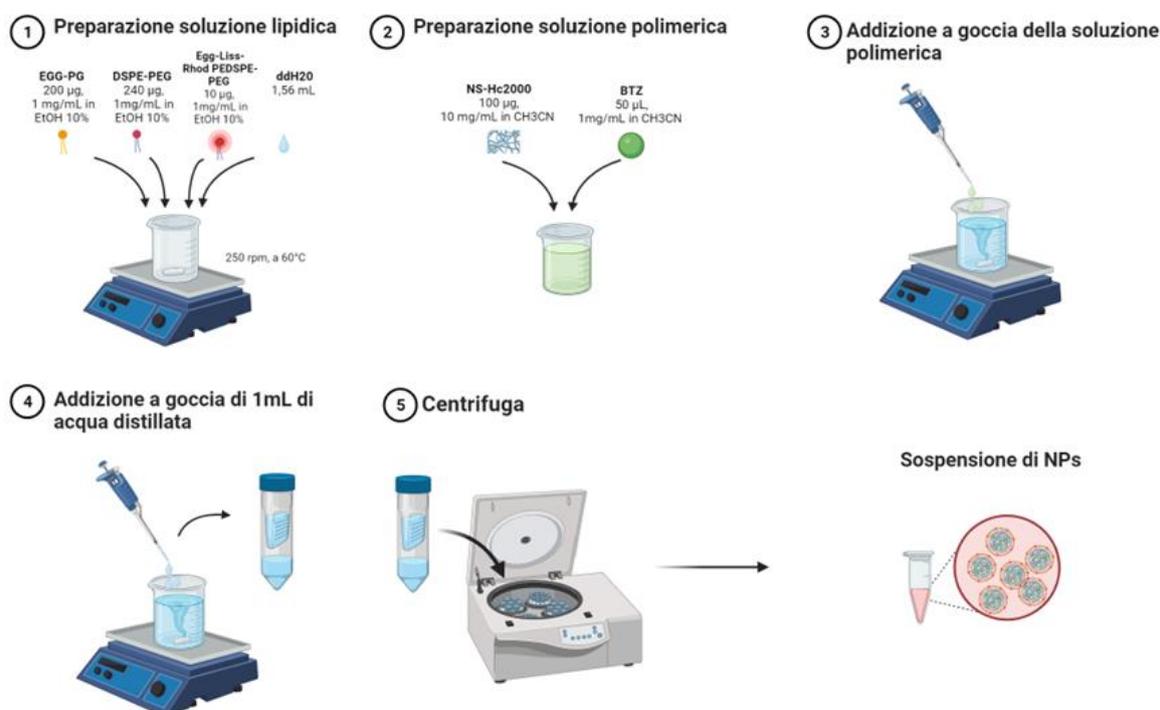


Figura 11: Rappresentazione schematica delle fasi di preparazione delle NPs. Immagine creata con Biorender.com

2.2.2 Caratterizzazione delle nanoparticelle

2.2.2.1 Resa del processo di sintesi

È stata valutata la resa del processo di sintesi di NPs liofilizzando (LaboGene CoolSafe 4-15L) la sospensione di NPs e pesando la massa della polvere ottenuta, secondo l'equazione (2.1):

$$Resa (\%) = \frac{\text{Peso della formulazione}}{\text{Peso del polimero} + \text{Peso del farmaco} + \text{Peso delle componenti lipidiche}} \quad (2.1)$$

dove:

- Il *peso della formulazione* è la massa di NPs ottenuta alla fine del processo;
- Il *peso del polimero* è la massa di NS-HC2000 aggiunto inizialmente in soluzione (1 mg);
- Il *peso del farmaco* rappresenta la quantità di BTZ inizialmente aggiunta alla soluzione di polimero (50 µg);
- Il *peso dei componenti lipidici* è definito come la somma di EGG-PG (200 µg) e DSPE-PEG (240µg) nella soluzione iniziale.

2.2.2.2 Efficacia di Incapsulamento

L'efficacia di incapsulamento (EE) delle NPs è stata determinata quantificando il contenuto di BTZ attraverso lo spettro di assorbanza a 270 nm, valutato utilizzando uno spettrofotometro UV/VIS (Lambda 365, Perkin Elmer®, Waltham, MA, USA).

In particolare, al termine della sintesi, le NPs contenenti BTZ (BTZ-NPs) sono state liofilizzate (LaboGene CoolSafe 4-15L) per una notte e disciolte in 0,5 mL di ACN in modo da indurre la distruzione del nucleo polimerico e il rilascio di farmaco. Si è quindi misurato il valore di assorbanza al picco caratteristico del BTZ (270 nm), da cui è stata valutata la quantità di farmaco presente nelle NPs attraverso una curva di calibrazione empirica.

L'efficacia di incapsulamento è stata quindi ottenuta a partire da questi dati e utilizzando la seguente formula (equazione 2.2):

$$EE(\%) = \frac{\text{Quantità di farmaco nelle NPs}}{\text{Quantità di farmaco fornita inizialmente}} \times 100 \quad (2.2)$$

dove:

- la *quantità di farmaco nelle NPs* è la massa di BTZ rilevata mediante spettroscopia UV/VIS;

- la *quantità di farmaco fornita* è la massa di BTZ inserita nella soluzione di sintesi (50 µg per ogni formulazione di NPs).

2.2.2.3 Rilascio del Farmaco

La valutazione del rilascio cumulativo di farmaco è stata effettuata incubando le BTZ-NPs (disciolte in ddH₂O) a 37 °C per diversi intervalli di tempo: 1h, 3h, seguite da valutazioni ogni 24h per una settimana.

Dopo ogni intervallo di tempo, la sospensione di NPs è stata centrifugata (Beckman Coulter Allegra X30) a 10500 rpm per 15 minuti a temperatura ambiente. In questo modo è stato possibile separare il pellet di NPs, precipitato sul fondo, e il surnatante contenente il farmaco rilasciato. Il pellet è stato ridisperso in 1mL di acqua distillata, mentre il surnatante è stato prelevato e trasferito in un'altra *Eppendorf*. La sospensione di NPs ottenuta è stata posta nuovamente nell'incubatore fino al *time point* successivo, mentre il surnatante è stato conservato in congelatore a -20 °C.

Al termine della procedura di raccolta dei surnatanti per i *time point* definiti, i campioni sono stati liofilizzati per una notte, poi solubilizzati in 0,5 mL di acetonitrile e la quantità di farmaco rilasciata per ogni *time point* è stata rilevata con uno spettrofotometro UV/VIS (Lambda 365, Perkin Elmer®, Waltham, MA, USA) utilizzando la stessa procedura descritta in precedenza.

2.2.2.4 Analisi al DLS

Per valutare il diametro idrodinamico e il potenziale zeta delle NPs (sia vuote che contenenti BTZ) è stata utilizzata la tecnica del *Dynamic light scattering* (DLS).

Con questa tecnica è possibile misurare la dimensione delle NPs a partire dalla valutazione del loro moto browniano in sospensione. Infatti, muovendosi in maniera casuale, le NPs urtano le une con le altre con una velocità tanto maggiore quanto minore è la loro dimensione.

In particolare, lo strumento utilizzato (Litesizer™ 500, Anton Paar) è dotato di un laser di tipo HeNe 633/830 nm che, colpendo la sospensione, viene disperso rispetto alla direzione iniziale a causa della presenza delle particelle.

L'intensità della dispersione viene registrata in diversi istanti e confrontata con il valore iniziale. Viene calcolata la funzione di autocorrelazione che correla l'intensità dello *scattering* rilevato nel tempo rispetto all'intensità dello *scattering* all'istante iniziale. Se l'intensità misurata negli istanti successivi è molto simile rispetto a quella misurata al tempo 0, la funzione di autocorrelazione sarà vicina al valore 1, questo significa diffusione lenta delle particelle, quindi particelle con dimensioni maggiori. Al contrario, la funzione di autocorrelazione assumerà un valore tendente a 0 nel caso di particelle più piccole che diffondono molto velocemente.

Dalla funzione di autocorrelazione possiamo stimare D (coefficiente di diffusione) da cui si ricava il diametro idrodinamico, misura della dimensione della particella e dello strato idratato attorno ad essa (R_h), per mezzo dell'equazione (2.3) di *Stokes-Einstein*:

$$D = \frac{k_B T}{6\pi\eta R_h} \quad (2.3)$$

dove:

- k_B = costante di Boltzmann = $1.38 * \frac{10^{-23} J}{K}$;
- T = temperatura;
- η = viscosità;
- D = coefficiente di diffusione;

Le caratteristiche della soluzione, la dimensione del nucleo, la forma delle NPs e le proprietà superficiali influenzano fortemente questo parametro.

Il DLS consente anche di valutare la distribuzione della dimensione delle particelle, attraverso l'indice di polidispersità (PDI). Il PDI può essere espresso in percentuale rispetto al valor medio o come valore nell'intervallo da 0 a 1.

Il potenziale zeta è un parametro indice della stabilità della sospensione di particelle. Esso rappresenta nello specifico la misura della carica superficiale delle particelle. La misura viene effettuata utilizzando lo stesso strumento precedentemente menzionato e usando specifiche omega Cuvettes Litesizer™ (struttura in policarbonato con elettrodi in oro). Gli elettrodi permettono di applicare una differenza di potenziale all'interno della cella che induce il moto delle particelle (cariche) da un elettrodo verso l'altro con una certa velocità che sarà dipendente dalla carica superficiale della particella stessa.

2.2.3 Valutazione della capacità di uptake di NPs

Per investigare la capacità di internalizzazione di NPs da parte delle diverse popolazioni cellulari del microambiente tumorale (cellule della microglia, tumorali di GBM, astrociti) sono state eseguite delle analisi quantitative tramite la citometria a flusso (*fluorescence activated cell sorting*, FACS) e sono stati effettuati degli *staining* cellulari per visualizzare qualitativamente il fenomeno di internalizzazione delle NPs fluorescenti.

2.2.3.1 Analisi quantitativa al FACS

L'analisi al FACS ha permesso di valutare la percentuale di cellule che hanno effettivamente internalizzato NPs per diversi tempi di incubazione a diverse concentrazioni. Per eseguire l'analisi al FACS, le cellule (U87, U-251, HASTR, H-MC3)

sono state seminate in una *multiwell* da 24 pozzetti (alcuni precedentemente rivestiti con collagene I per consentire l'adesione degli HASTR) alla concentrazione di 100 000 cellule/pozzetto in un volume di 500 μ L del corrispondente mezzo di coltura. Il mezzo di coltura è stato rimosso 24h dopo la semina e sono state somministrate NPs fluorescenti marcate con Rodamina (*Rhodamine*, Rhod) (ottenute secondo il protocollo precedentemente riportato) a diverse concentrazioni in un volume di 500 μ L del corrispondente mezzo di coltura. Sono state considerate differenti concentrazioni di Rhod-NPs a seconda dei tipi cellulari in esame:

- 0,05 mg/mL, 0,1 mg/mL, 0,2 mg/mL, 0,25 mg/mL, 0,5 mg/mL, 1mg/mL per U87 e U-251;
- 0,25 mg/mL, 0,5 mg/mL, 1mg/mL per HASTR, e HMC3.

Al termine del tempo di incubazione (24h o 48h) il mezzo è stato rimosso ed è stato effettuato un risciacquo con 500 μ L di tampone fosfato salino (*Phosphate buffered saline*, PBS) per ogni campione. Le cellule sono state staccate e sono state centrifugate a 1500 rpm per 5 min a 25°C. Il pellet di cellule è stato disperso in PBS e analizzato usando Guava® easyCyte™ Systemsflow Flow Cytometers (Luminex®) utilizzando il filtro *Yellow Fluorescence Protein*. Le cellule non trattate sono state utilizzate come controllo per la definizione delle regioni di interesse.

2.2.3.2 Analisi qualitativa: *Staining* con Dapi e Falloidina

Al fine di visualizzare l'internalizzazione delle NPs da parte delle cellule U251, U87, H-MC3 e HASTR, è stato effettuato uno *staining* con DAPI (4',6-Diamidino-2-phenylindole, Thermo Scientific™) e Falloidina (Sigma-Aldrich) su cellule sottoposte a diversi intervalli di incubazione (30min o 24 h) con Rhod-NPs (alle concentrazioni di 50 μ g/mL, 100 μ g/mL).

Le cellule sono state seminate alla concentrazione di 50 000 cellule/pozzetto in un volume di 500 μ L su vetrini (24x50mm #1.5, Erpedia) posti all'interno di una piastra *multiwell* da 24 pozzetti. Le cellule sono state trattate con le diverse concentrazioni di Rhod-NPs 24h dopo la semina. Per ogni linea, cellule non trattate sono state utilizzate come controllo. Al termine del tempo di incubazione (30 min/ 24h), è stato prelevato il terreno da ciascun pozzetto e sono stati effettuati due lavaggi con 500 μ L di PBS.

I campioni sono stati poi fissati, per preservare la morfologia cellulare, con 300 μ L di Paraformaldeide (PFA) al 4% (Thermo scientific™ J19943) lasciata in incubazione per 20 min a RT, seguiti da tre lavaggi con 500 μ L di PBS.

Quindi, le cellule sono state permeabilizzate con 50 μ L per vetrino di Triton X-100 allo 0,5% in PBS per 10 minuti, seguiti da un lavaggio in PBS (50 μ L).

A seguire, una fase di bloccaggio con 50 μ L per vetrino di *SuperBlock™ Blocking Buffer* (*Thermo Scientific™*) per 30 min. Il *Blocking Buffer* è stato rimosso e 50 μ L di Falloidina (10 μ M, Sigma-Aldrich) diluita in *Blocking Buffer* (20 μ L per 1 mL) sono stati lasciati in incubazione per 40 min a RT al buio. La falloidina è usata per marcare selettivamente i filamenti di F-actina nel citoscheletro cellulare.

Le cellule sono state lavate due volte con PBS (50 μ L), quindi sono stati aggiunti 50 μ L di DAPI (*Thermo Scientific™*) 300 nM in PBS e incubati per 10 minuti a RT al buio.

Le cellule sono state infine risciacquate tre volte con PBS (50 μ L) e i vetrini sono stati trasferiti su vetrini da microscopio utilizzando un mezzo di montaggio (*Fluoromount™ Aqueous Mounting Medium, Sigma-Aldrich*). Il DAPI viene utilizzato per marcare il nucleo delle cellule, è un colorante blu fluorescente del DNA che si lega alle regioni AT del DNA a doppio filamento.

I campioni sono stati esaminati con microscopia confocale usando Nikon ECLIPSE Ti2. Le immagini finali sono state elaborate sovrapponendo i canali mediante il software ImageJ.

2.2.4 Valutazione dei profili di co-localizzazione Rabs/NPs

In collaborazione con il gruppo di Biologia Chimica dell'IIGM, sono stati studiati i meccanismi di traffico intracellulare per comprendere meglio i fenomeni di internalizzazione delle NPs da parte delle cellule tumorali. Sono stati effettuati *staining* in immunofluorescenza per valutare il grado di co-localizzazione tra le NPs fluorescenti internalizzate dalle cellule U251 e marcatori associati alle vescicole endosomiali precoci (*early endosomes*, Rab 5) e tardive (*late endosomes*, Rab 7).

In particolare, le cellule U251 sono state seminate alla concentrazione di 100 000 cellule/pozzetto in un volume di 500 μ L su vetrini (24x50mm #1.5, Erpedia) posti all'interno di una piastra *multiwell* da 48 pozzetti.

Dopo 24h dalla semina i campioni sono stati trattati con NPs (1 mg/mL) marcate in fluorescenza con il lipide DSPE PEG (2000) -N-Cy5, lasciate in incubazione per 24h. I campioni non trattati sono stati utilizzati come controllo.

Al termine del periodo di incubazione, il mezzo di coltura è stato rimosso e sono stati effettuati due lavaggi in PBS. Quindi, i campioni sono stati fissati per preservare la morfologia cellulare con 50 μ L di PFA 4% per 20 min a RT. Dopo il fissaggio, sono stati eseguiti tre lavaggi con 50 μ L di PBS.

Quindi, le cellule sono state permeabilizzate aggiungendo 50 μ L per vetrino di Saponina (Sigma-Aldrich SAE0073) allo 0,1% in PBS per 10 minuti a RT, seguiti da due lavaggi in PBS (50 μ L). Per ogni vetrino, sono stati aggiunti 50 μ L di *quenching buffer* (NH_4Cl 50 mM in PBS) lasciati in incubazione per 20 min a RT, al fine di eliminare l'autofluorescenza associata ai gruppi aldeide della PFA.

A seguito di tre lavaggi con 50 μ L PBS, è stato eseguito il bloccaggio dei campioni con 50 μ L per vetrino di albumina sierica bovina (BSA, Sigma -Aldrich A2514-SAE0073) al 3%, incubato per 1 h a RT.

È stata poi preparata una soluzione di anticorpi primari diluiti in BSA al 3%:

- Anticorpo primario *Anti-human Rab5* (purificato in topo), rapporto di volume 1:100 (BD *Biosciences*);
- Anticorpo primario *Anti-human Rab11* (purificato in coniglio), rapporto di volume 1:100 (BD *Biosciences*).

Dopo aver aspirato BSA, sono stati aggiunti 50 μ L per vetrino di soluzione di anticorpi primari, lasciati in incubazione per 1:30 h a RT.

Quindi sono stati effettuati due lavaggi con 50 μ L di PBS e dispersi per vetrino 50 μ L di soluzione di anticorpi secondari, contenente:

- Anticorpo secondario *Anti-mouse* (rosso), rapporto di volume 1:1000 (BD *Biosciences*);
- Anticorpo secondario *Anti-rabbit* (verde), rapporto di volume 1:2000 (BD *Biosciences*).

Alcuni campioni sono stati esposti esclusivamente agli anticorpi secondari (senza la precedente fase di incubazione con anticorpi primari) per rilevare eventuali aspecificità del secondario.

Dopo 30 min di incubazione a RT al buio (dark), sono stati effettuati due lavaggi in PBS (50 μ L).

Per marcare i nuclei cellulari, sono stati aggiunti 50 μ L di DAPI, lasciati in incubazione 1 min a RT al buio. Infine, è stato effettuato un lavaggio con 50 μ L di PBS seguito da un ulteriore lavaggio con 50 μ L di acqua bidistillata (ddH₂O).

I vetrini sono stati conservati a 4°C per 24h, prima di essere trasferiti su vetrini da microscopio utilizzando un mezzo di montaggio. I campioni sono stati esaminati con microscopio Leica DMI 3000 B. Le immagini finali sono state elaborate sovrapponendo i canali mediante il software ImageJ.

2.2.5 Valutazione dell'efficacia dei trattamenti farmacologici

2.2.5.1 Saggio di vitalità 2D

Per valutare la risposta al trattamento farmacologico con BTZ e BTZ-NPs, è stato eseguito un saggio di vitalità cellulare (*CellTiter 96® AQueous One Solution Cell Proliferation Assay*) dopo 24h e 48h dal trattamento su quattro linee cellulari differenti: U-87, U251, HASTR, H-MC3. La Fig. 12 sintetizza in maniera schematica il protocollo seguito.

Sono state acquisite, inoltre, immagini per 2 giorni, ogni 24h, utilizzando un microscopio ZOE™ *Fluorescent Cell Imager*.

In primo luogo, tutte le linee cellulari sono state seminate in una piastra a 96 pozzetti (Jet Biofil®), ad una densità di 10 000 cellule/pozzetto. La piastra è stata tenuta in un incubatore per 24h per consentire una corretta adesione delle cellule prima del trattamento. Quindi, i campioni cellulari sono stati trattati con BTZ in forma libera o con dosi equivalenti di farmaco incapsulato nelle NPs (BTZ-NPs) alle concentrazioni di 10nM, 20nM, 50nM, 100nM, 200nM, 500nM. I campioni non trattati sono stati utilizzati come controllo. Le cellule sono state tenute in incubatore per 24h o 48h al termine delle quali è stata valutata la vitalità cellulare con il saggio *CellTiter 96® AQueous One Solution Cell Proliferation Assay*, secondo le indicazioni del produttore. In breve, sono stati aggiunti 20 µL di *CellTiter 96® AQueous One Solution Reagent* per ogni 100 µL di mezzo presenti nei pozzetti. La piastra è stata tenuta 3h in incubatore, poi è stata effettuata una lettura in assorbanza a 490 nm con un lettore di piastre (*BioTek® Synergy HTX Multimode Reader*). I dati in assorbanza ottenuti sono proporzionali alla vitalità cellulare. In particolare, la soluzione reagente contiene un sale di tetrazolio, 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium, *inner salt* (MTS), e un reagente di accoppiamento di elettroni (fenazina etosolfato; PES). Le cellule metabolicamente attive riducono il composto di tetrazolio MTS in un prodotto solubile colorato di formazan. La quantità di prodotto formazan è direttamente proporzionale al numero di cellule vive in coltura e al valore in assorbanza rilevato con il lettore di piastre. I dati di assorbanza ottenuti sono stati confrontati con i valori di assorbanza dei controlli non trattati per ottenere la percentuale di vitalità cellulare.

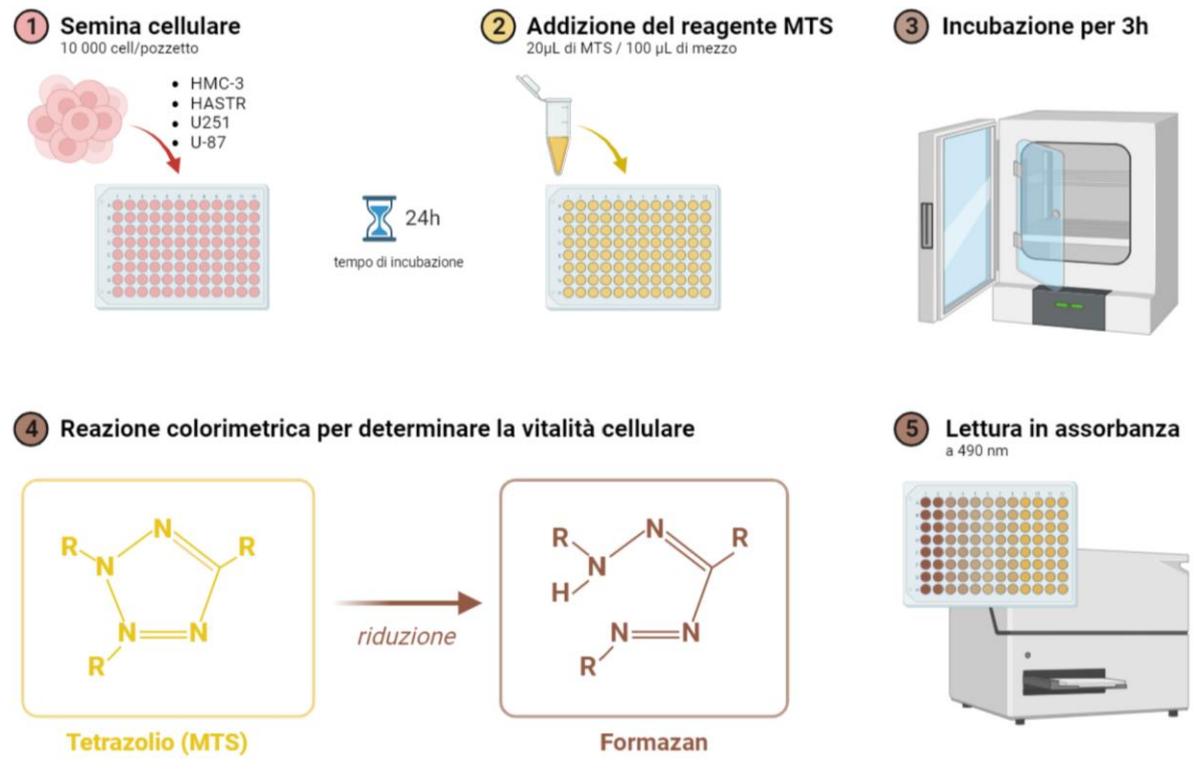


Figura 12: Rappresentazione schematica del saggio di vitalità MTS.

2.2.5.2 Sviluppo di modelli di sferoidi 3D

Sono stati preparati diversi tipi di sferoidi multicellulari seguendo la procedura schematizzata in Fig. 13. In breve, le diverse linee cellulari sono state seminate con una densità di 4 000 cellule/pozzetto in 100 µL di mezzo in piastre antiadesive con fondo a U (*Thermo Scientific™ Nunclon™ Sphera™ 96-Well, Nunclon SpheraTreated, U-Shaped-Bottom Microplate*) per fornire un modello cellulare tridimensionale. In particolare, sono stati ottenuti:

- monoculture di cellule tumorali primarie (U87);
- monoculture di cellule tumorali primarie (U251);
- monoculture di cellule di microglia umana (HMC-3);
- monoculture di astrociti umani, (HASTR/ci35);
- co-culture di U87 (90%) e GBM-8 (10%), che saranno denominati d'ora in avanti *Tumour Mix (TM)*.

Le cellule sono state lasciate in incubazione per 4 giorni per garantire la formazione di sferoidi maturi.

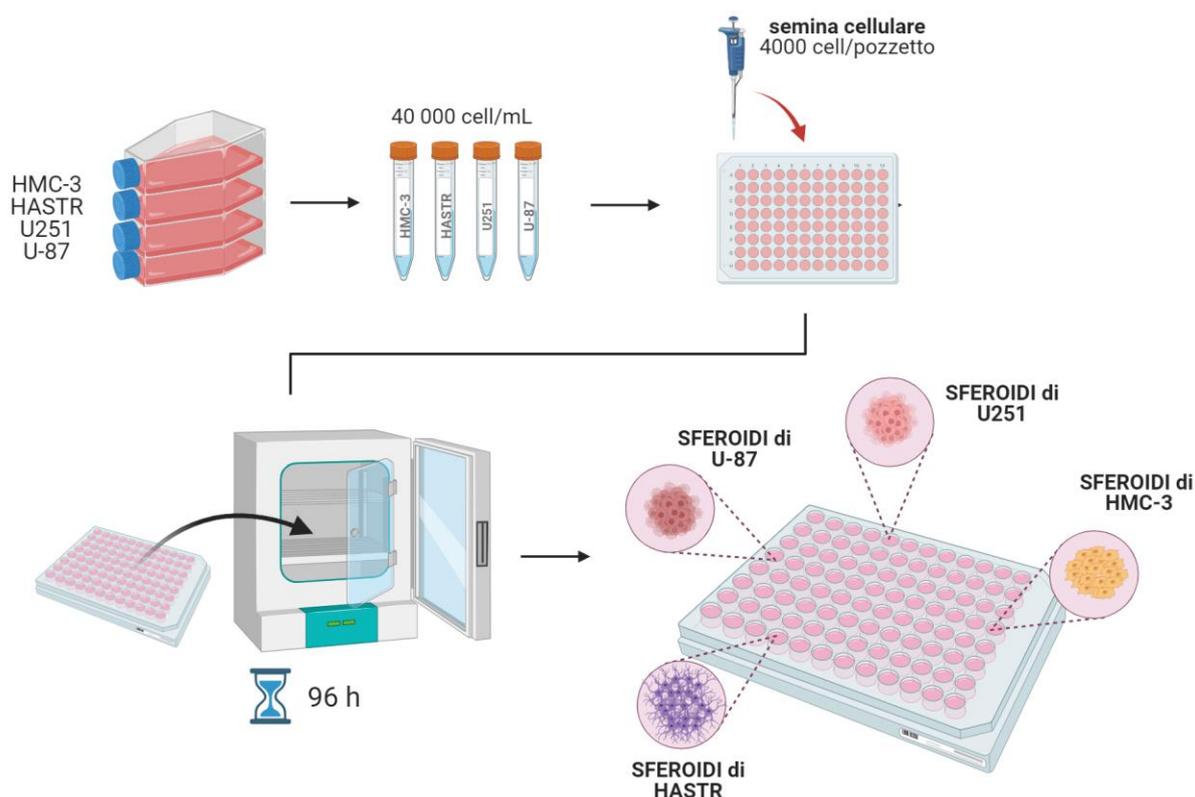


Figura 13: Rappresentazione schematica del processo di preparazione di sferoidi.

2.2.5.3 Saggio di vitalità 3D

Dopo la loro completa maturazione, gli sferoidi di U251, di U-87, di H-MC3 e di HASTR sono stati trattati con BTZ in forma libera o a dosi equivalenti di farmaco all'interno delle NPs (BTZ-NPs). La vitalità delle cellule degli sferoidi dopo il trattamento è stata valutata a diversi *time point* (24h, 48h) utilizzando il saggio di vitalità *CellTiter-Glo® 3D* (Promega).

Sono state acquisite immagini in campo chiaro (*brightfield*) a entrambi i *time point*, utilizzando un microscopio *ZOE™ Fluorescent Cell Imager*.

In particolare, per confrontare l'effetto dei due metodi di trattamento, gli sferoidi, posti in una *multiwell* da 96 con fondo a U, sono stati trattati con BTZ-NPs e con il farmaco libero (BTZ) alle concentrazioni di 10nM, 20nM, 50nM, 100nM, 200nM, 500nM in 200 µL di mezzo per pozzetto. Sferoidi non trattati sono stati utilizzati come controlli. Gli sferoidi sono stati lasciati in incubazione con i trattamenti per 24h e 48h. Quindi, seguendo le indicazioni del produttore, 100 µL di mezzo sono stati prelevati da ogni pozzetto e sono stati aggiunti 100 µL di reagente *CellTiter-Glo® 3D* al buio. In seguito, le piastre sono state lasciate in agitazione per 5 min a 400 rpm, al riparo dalla luce, con un *ThermoShaker Biometra TSC* per facilitare la lisi cellulare. Gli sferoidi sono

stati quindi trasferiti in una piastra a 96 pozzetti a fondo bianco (*Thermo Scientific™*). Il segnale di luminescenza è stato rilevato con un lettore di piastre (*Synergy™ HTX Multi-Mode Microplate Reader*) dopo aver eseguito un ulteriore ciclo di agitazione dalla durata di 5 min. Il reagente *CellTiter-Glo® 3D* contiene un substrato (luciferina) e un agente di lisi, che induce la rottura della membrana cellulare e il rilascio di Adenosina trifosfato (ATP). Una luciferasi termostabile (*Ultra-Glo™ Recombinant Luciferase*) agisce sul substrato consumando ATP e generando un segnale luminescente, proporzionale alla quantità di ATP rilasciata. indicatore dell'attività metabolica cellulare (e quindi della vitalità delle cellule degli sferoidi).

2.2.6 Valutazione del ruolo della ECM nella risposta al trattamento

2.2.6.1 Valutazione dell'efficacia di trattamento in gel di collagene

Al fine di studiare il ruolo della matrice extracellulare del glioblastoma, è stato preparato un *idrogel* di collagene-I (4 mg/mL) mescolando *AMSbio Cultrex® 3D collagen I* da coda di ratto (5 mg/mL, #3447-020-01) con 1 M di HEPES (*ThermoFisher 15630-122*, pH 7.2-7.5) e 37 g/L di NaHCO₃ (*Sigma S5761-500G*), in rapporto 8:1:1. La miscela ottenuta è stata pipettata ripetutamente in ghiaccio per omogenizzarla e, quindi, brevemente centrifugata per eliminare le bolle d'aria.

Gli sferoidi costituiti da sole cellule U87 o dalla composizione *Tumour Mix* (cellule U87-GFP e GBM-8-GFP, in rapporto 90:10) sono stati preparati come descritto precedentemente e nella soluzione di collagene I in una piastra da 96 pozzetti (tenuta in ghiaccio). Dopo il trasferimento, la piastra a 96 pozzetti è stata posta nell'incubatore a 37°C per 15 min per consentire la gelificazione dei gel.

Al fine di studiare il ruolo delle cellule microgliali nell'invasione tumorale e nella risposta al trattamento, alcuni sferoidi sono stati incorporati nell'idrogel di collagene contenente anche cellule H-MC3, marcate con il tracciante *Vybrant™ Dil Cell-Labeling Solution*, secondo le indicazioni del produttore. In breve, le cellule sono state sospese a una densità di 1×10^6 /mL nel mezzo di coltura, a cui sono stati aggiunti 5 µL della soluzione di tracciante. La sospensione è stata incubata a 37°C per 15 min e, successivamente, centrifugata a 1500 rpm per 5 min per isolare il precipitato cellulare. Le cellule sono state lavate due volte in terreno di coltura, prima dell'uso, per rimuovere il tracciante in eccesso. Le cellule H-MC3 sono state disperse alla densità di 100 cellule/µL ed è stato aggiunto un volume totale di 10 µL per pozzetto.

Gli sferoidi sono stati trattati sia con il farmaco libero (BTZ) che con BTZ-NPS a diverse concentrazioni (10, 50 e 200 nM) e monitorati per 4 giorni, acquisendo immagini ogni 24h. Le immagini sono state analizzate per determinare la vitalità cellulare e il *pattern* di invasione attraverso la matrice di idrogel dopo il trattamento. La vitalità è stata calcolata normalizzando l'intensità di fluorescenza di GFP dei campioni trattati rispetto all'intensità di fluorescenza dei controlli non trattati, misurata su immagini acquisite sul piano mediano degli sferoidi mediante il microscopio Nikon ECLIPSE Ti2 come intensità cumulativa nella regione di interesse. L'area di invasione è stata misurata utilizzando lo strumento automatico di definizione delle regioni di interesse (ROI) del microscopio Nikon ECLIPSE Ti2.

2.2.6.2 Valutazione dell'influenza della rigidità del gel

Per studiare l'effetto della rigidità dell'*idrogel* sul comportamento di sferoidi tumorali, gli sferoidi TM sono stati incapsulati in un idrogel commerciale a base di polisaccaridi (*VitroGel® 3D hydrogel solution, The Well Biosciences*) più rigido rispetto al collagene, ma con modulo elastico modulabile.

In particolare, l'*idrogel* è stato preparato a diverse concentrazioni secondo le istruzioni del produttore, diluendo prima la *VitroGel 3D hydrogel solution* con la *Dilution Solution (Type 1)* fornita in diversi rapporti (1:3, 1:5, 1:10 e 1:20). Le soluzioni ottenute sono state versate in una piastra da 96 pozzetti e sono stati aggiunti gli sferoidi ottenuti secondo la procedura precedentemente descritta. Le soluzioni contenenti sferoidi sono state lasciate gelificare in incubatore a 37°C.

Gli sferoidi sono stati monitorati per 4 giorni, acquisendo immagini dal giorno 2 al giorno 4 ogni 24 ore con un microscopio confocale (Nikon ECLIPSE Ti2).

Utilizzando il rapporto di diluizione 1:3, gli sferoidi Tumour Mix sono stati anche utilizzati per ottenere dati quantitativi sulla vitalità, quando sottoposti a trattamento con BTZ-NPs o BTZ a diverse concentrazioni (10, 50 e 200 nM). La vitalità degli sferoidi è stata determinata come descritto in precedenza, utilizzando il segnale GFP delle cellule tumorali come indicatore di vitalità cellulare.

Gli sferoidi sono stati monitorati per 4 giorni, acquisendo dati dal giorno 2 al giorno 4 ogni 24h. Le immagini sono state acquisite utilizzando un microscopio confocale (Nikon ECLIPSE Ti2) ogni 24 h.

2.2.7 Valutazione dell'efficacia del trattamento con NPs mediato dalla microglia

Poiché la presenza della BBB limita l'accumulo di farmaci e nanomedicine per il trattamento del GBM, si è studiata la possibilità di utilizzare le cellule della microglia come trasportatori di BTZ- NPs in grado di superare tali restrizioni. Le potenzialità di questo approccio sono state dimostrate nello studio di Du Y. et al. [59], in cui le cellule della microglia murina (BV2) vengono utilizzate come vettore di trasporto per fornire Paclitaxel per il trattamento del glioma. Similmente, in questo lavoro è stata esplorata la possibilità di utilizzare cellule umane di microglia (H-MC3) come trasportatori di BTZ- NPs.

2.2.7.1 Analisi dell'internalizzazione e rilascio di NPs da parte di H-MC3

Preliminarmente, si è valutata la capacità delle cellule della microglia di internalizzare e, in seguito, rilasciare le NPs utilizzate per il trasporto di BTZ, in diverse condizioni. Al fine di valutare il numero di microglia contenenti NPs tramite l'analisi al FACS, le cellule H-MC3 sono state seminate in una *multiwell* da 24 (in 500 μ L di mezzo) a una densità di 100 000 cellule/pozzetto. A 24 h dalla semina, le cellule sono state trattate con Rhod-NPs alle concentrazioni di 0,25 mg/mL, 0,5 mg/mL, 1 mg/mL. Dopo 24 h di incubazione, il mezzo contenente le NPs è stato rimosso e sostituito con mezzo fresco. A 24 h e 48 h da questa operazione, i surnatanti di ogni pozzetto sono stati raccolti e trasferiti in una piastra nera a fondo ottico (*Thermo Scientific™ Nunc™ MicroWell™*) da 96 pozzetti. La presenza di NPs rilasciate dalle cellule è stata rilevata effettuando una lettura in fluorescenza con eccitazione a 560 nm ed emissione a 590 nm con un lettore di piastra (*Varioskan LUX Multimode Microplate Reader*). Dopo il recupero del surnatante le cellule sono state staccate e preparate per l'analisi al FACS secondo la procedura precedentemente descritta, per rilevare eventuali variazioni nel numero di cellule contenenti NPs.

2.2.7.2 Migrazione e infiltrazione di cellule HMC3 all'interno di sferoidi

Per verificare la possibilità di utilizzare il trasporto mediato da cellule per migliorare l'accumulo di NPs all'interno della massa tumorale, è stata verificata la capacità di infiltrazione della microglia attraverso gel replicanti le proprietà della ECM del GBM. Nello specifico, sferoidi di tipo TM sono stati ottenuti secondo la procedura precedentemente descritta e immersi in 50 μ L di soluzione di Collagene I, lasciata polimerizzare 15 min in incubatore.

Nel mentre, le cellule H-MC3 sono state staccate e marcate con il tracciante *Vybrant™ Dil Cell-Labelling Solution* come descritto nella sezione 2.2.6.1. Quindi, 10 μ L di mezzo

di coltura contenenti cellule HMC3 (25.000 o 50.000) sono stati dispensati in pozzetti contenenti 50 μ L di soluzione di collagene-I, lasciati polimerizzare per 15 min a 37°C.

I due gel (uno contenente sferoidi TM e l'altro contenente cellule H-MC3) sono stati quindi rimossi dai rispettivi pozzetti, tagliati usando la punta di una micropipetta e combinati in un pozzetto pulito in modo che un pezzo del gel contenente le H-MC3 fosse posto a contatto con un pezzo di gel contenente lo sferoide TM. Il gel contenente H-MC3 a contatto con un pezzo di gel vuoto è stato usato come controllo. Questo setup ha permesso di valutare la migrazione orizzontale delle H-MC3 verso sferoidi TM.

Per valutare eventuali fenomeni di migrazione verticale, le cellule HMC3 (25 000 o 50 000 cellule/pozzetto, marcate con *Vybrant™ Dil Cell-Labeling Solution*) sono state seminate sul fondo dei pozzetti in una piastra a 96 pozzetti (*Jet Biofil®*) e lasciate aderire per 2h. Sono stati poi aggiunti 50 μ L di soluzione di collagene-I sopra le cellule e, prima della gelificazione, sono stati inseriti degli sferoidi TM. Come controllo, è stata eseguita la stessa procedura, ma senza incorporare gli sferoidi TM nel gel di collagene. Per valutare i fenomeni di migrazione, sono state acquisite, al microscopio confocale (Nikon ECLIPSE Ti2), immagini in corrispondenza del piano su cui giacciono gli sferoidi in diversi punti temporali.

2.2.7.3 Test di vitalità

2.2.7.3.1 Test di vitalità 2D su cellule U251

L'efficacia del trattamento mediato da cellule è stata valutata, in primo luogo, effettuando un test di vitalità 2D su cellule U251 trattate con diverse quantità di cellule H-MC3, precedente lasciate in incubazione con NPs contenenti farmaco.

Inizialmente le cellule U251 sono state seminate in una piastra a 96 pozzetti (*Jet Biofil®*), ad una densità di 10 000 cellule/pozzetto mentre le H-MC3 sono state seminate in una piastra da 24 pozzetti ad una densità di 100 000 cellule/pozzetto in un volume di 500 μ L di mezzo. Le piastre sono state tenute in un incubatore per 24h per consentire una corretta adesione delle cellule prima dei trattamenti. Quindi, le cellule H-MC3 sono state incubate con BTZ-NPs alla concentrazione di 1mg/mL. Le cellule H-MC3 sono state tenute in incubatore per 2h per consentire l'internalizzazione delle nanoparticelle senza compromettere la vitalità delle microglia. Al termine dell'incubazione, le cellule sono state staccate e contaminate in modo da preparare le diluizioni per il trattamento. Quindi le cellule U251 sono state trattate con diverse quantità di cellule H-MC3 che avevano precedentemente internalizzato BTZ- NPs (500, 1000, 2000 o 4000 cellule HMC3 per pozzetto).

Cellule U251 a cui erano state aggiunte uguali quantità di H-MC3 non trattate sono state usate come controllo. Dopo 24h e 48h dal trattamento, si è valutata la vitalità

cellulare utilizzando il saggio *CellTiter 96® AQueous One Solution*, secondo le indicazioni del produttore. In breve, 20 µL di *CellTiter 96® AQueous One Solution Reagent* sono stati aggiunti per ogni 100 µL di mezzo presenti nei pozzetti. La piastra è stata tenuta 3h in incubatore, poi è stata effettuata una lettura in assorbanza a 490 nm con un lettore di piastre (*BioTek® Synergy HTX Multimode Reader*). I dati in assorbanza ottenuti sono proporzionali alla vitalità cellulare e sono stati confrontati con i valori di assorbanza dei controlli non trattati per ottenere la percentuale di vitalità cellulare.

2.2.7.3.2 Test di vitalità 3D su Tumour Mix

L'efficacia del trattamento mediato da cellule è stata valutata anche effettuando un test di vitalità in condizioni di coltura tridimensionali. Sono stati utilizzati sferoidi di tipo TM (90% U87, 10% GBM-8), inseriti in gel a base di collagene-1 e trattati con diverse concentrazioni di cellule di microglia, precedente lasciate in incubazione con NPs contenenti farmaco.

In particolare, le cellule H-MC3 per pozzetto sono state seminate in una *multiwell* da 24 pozzetti a una densità di 100 000 cellule/pozzetto. 24h dopo la semina, le sono state incubate con BTZ-NPs alla concentrazione di 1mg/mL tenute in incubazione per 2h. Le cellule, quindi, sono state staccate e contate in modo preparare le diluizioni per i trattamenti.

Sferoidi di tipo TM sono stati preparati secondo la procedura precedentemente descritta e trasferiti in un pozzetto di una piastra da 96 in cui erano stati dispensati 50 µL di soluzione di collagene. La piastra è stata posta in incubatore per 15 min per facilitare il processo di gelificazione. Quindi gli sferoidi sono stati trattati utilizzando diverse quantità di cellule H-MC3 (2000, 4000 o 8000 cellule per pozzetto) che avevano precedentemente internalizzato BTZ-NPs.

Sferoidi non trattati sono stati usati come controllo. Il giorno successivo al trattamento la vitalità cellulare degli sferoidi è stata valutata attraverso il saggio *CellTiter® Blue assay* (Promega) secondo le indicazioni fornite dal produttore. In breve, dopo aver rimosso 100 µL di mezzo da ogni pozzetto, sono stati aggiunti 100 µL di una soluzione di reazione ottenuta diluendo il *CellTiter® Blue Reagent* (Promega), in mezzo di coltura in rapporto 1:6. Il reagente è stato lasciato in incubazione per 2h e 30 min, poi il contenuto dei vari pozzetti è stato prelevato e trasferito in una *multiwell* a fondo scuro (*Thermo Scientific™ Nunc™ MicroWell™*) per la lettura in fluorescenza (emissione a 560/590 nm) al lettore di piastre (*BioTek® Synergy HTX Multimode Reader*). La vitalità cellulare è stata definita normalizzando i valori di intensità di fluorescenza ottenuti sui campioni trattati rispetto ai valori ottenuti sul controllo.

2.2.8 Analisi statistica

I risultati sono stati riportati in formato $\text{media} \pm \text{deviazione standard}$, valutati su un numero di campioni n specificato nelle diverse sezioni dei risultati. L'analisi statistica è stata effettuata con il software *GraphPad Prism* (*GraphPad*, San Diego, CA) utilizzando per i confronti il metodo di analisi della varianza (*One- o Two-Way ANOVA*), con intervallo di confidenza al 95%.

Discussione e Risultati

3.1 Preparazione e caratterizzazione delle nanoparticelle

NPs vuote e BTZ-NPs sono state ottenute con successo sfruttando il metodo della nanoprecipitazione e analizzate mediante DLS per valutare diametro idrodinamico medio, indice di polidispersità e potenziale zeta.

Come si evince dalla Figura 14a, l'incapsulamento del BTZ all'interno delle NPs sintetizzate ha comportato un aumento delle dimensioni rispetto al caso di NPs vuote. In particolare, il diametro idrodinamico medio misurato varia da 139 ± 28 nm per NPs vuote a 157 ± 14 nm per BTZ-NPs, conformi con i valori precedentemente misurati da altri membri del gruppo di ricerca [68]. L'aumento delle dimensioni, dovuto all'inserimento del BTZ all'interno matrice polimerica delle NPs, è stato osservato in altri studi in letteratura ed è spesso considerato un indice dell'effettivo incapsulamento del farmaco. [69], [70]

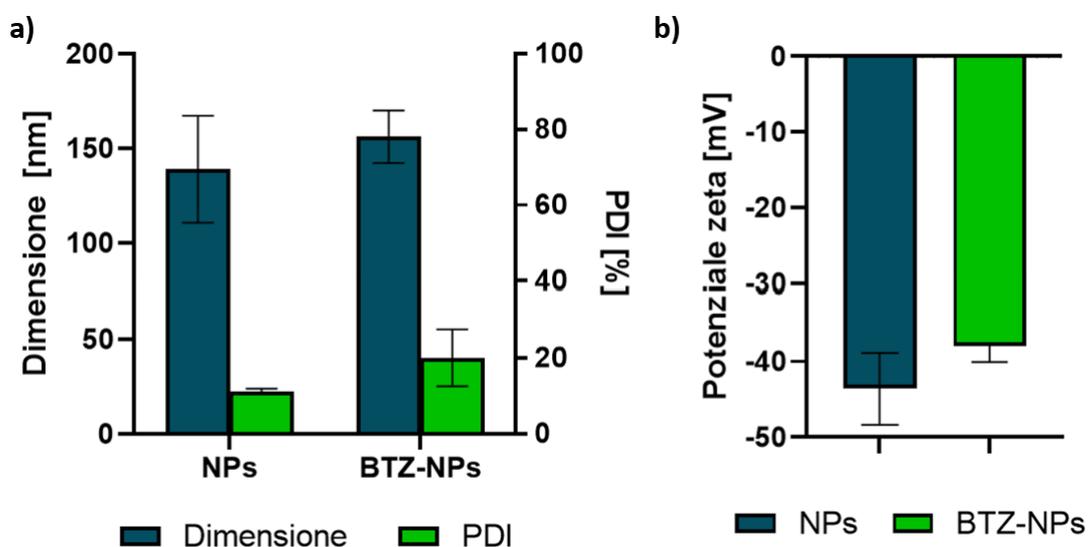


Figura 14: a) Diametro idrodinamico e indice di polidispersità: confronto della dimensione e del PDI per NPs e NPs-BTZ; b) Potenziale zeta: confronto tra NPs e BTZ-NPs.

L'indice di polidispersità (PDI), fornisce informazioni sulla distribuzione dimensionale delle nanoparticelle ed è mostrato in figura 14a. Il PDI ottenuto per le NPs vuote ($11 \pm 1\%$), espresso in percentuale rispetto al diametro idrodinamico medio, conferma

che le NPs prodotte sono monodisperse, ossia si ha una distribuzione di dimensioni stretta con NPs di diametro simile tra loro, con un leggero aumento per le BTZ-NPs ($20 \pm 7\%$).

Le analisi al DLS hanno inoltre permesso di determinare il potenziale Z, che risulta essere $-43,59 \pm 4,75$ mV per NPs vuote e $-37,88 \pm 2,17$ mV per BTZ-NPs (Fig. 14.b), senza differenza significative. Il potenziale zeta fornisce nello specifico la misura della carica superficiale delle particelle e rappresenta un indicatore di stabilità della sospensione di nanoparticelle in quanto maggiore è in valore assoluto, maggiore sarà la forza di repulsione tra le particelle che quindi tenderanno sempre meno a formare aggregati.[71]

È stata inoltre valutata la resa del processo di sintesi di NPs caricate con BTZ ($74 \pm 19\%$) liofilizzando e pesando la sospensione di NPs e rapportando il valore ottenuto alla somma delle masse degli elementi di sintesi utilizzati.

L'efficacia di incapsulamento (EE) del BTZ nelle NPs sintetizzate, calcolata mediante spettrofotometria UV/Vis è risultata pari a $11 \pm 1.9\%$. A parità di condizioni di processo e proprietà delle NPs, l'EE ottenuta è leggermente inferiore a quella ottenuta per altri farmaci idrofobici (come il Docetaxel), i quali però presentavano un peso molecolare più elevato [68]. Tuttavia, l'EE è comparabile a quella ottenuta in altri studi su NPs per il rilascio controllato di BTZ.[72]

In Figura 15 è mostrato, invece, il profilo di rilascio cumulativo del BTZ costruito su un periodo di osservazione di 7 giorni. Il quantitativo di farmaco rilasciato è percentuale rispetto al valore iniziale di BTZ presente nelle NPs. Dal grafico emerge un importante *burst release* iniziale, probabilmente dovuto ad un accumulo di farmaco sulla superficie delle NPs. Si ha poi un rilascio prolungato nel tempo, abbastanza costante, legato alla degradazione progressiva delle NPs. I dati sono relativi al rilascio di farmaco in acqua, situazione non conforme rispetto a quanto accade *in vivo*. Ci si aspetta, quindi, una cinetica di rilascio accelerata rispetto a quella ottenuta, data la presenza di biomolecole ed enzimi in grado di velocizzare la degradazione delle NPs e il processo di rilascio del farmaco.[73]

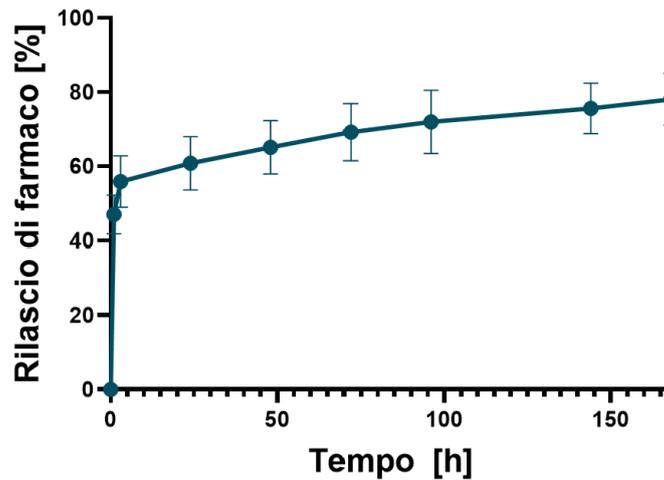


Figura 15: Rilascio cumulativo del BTZ: cinetiche di rilascio del farmaco su un periodo di osservazione di 7 giorni.

3.2 Valutazione della capacità di *uptake* di NPs

Inizialmente, è stata valutata la capacità di internalizzazione delle NPs da parte di diverse cellule di GBM, rappresentanti il target terapeutico di interesse. Sono state scelte le linee U87 e U251, in quanto presentano caratteristiche simili alle cellule tumorali di fenotipo neuronale e mesenchimale, rispettivamente.[74] In Figura 16 è mostrato il confronto tra la percentuale di cellule U87 e U251 che hanno internalizzato Rhod-NPs (somministrate alle concentrazioni di 0,05 mg/mL, 0,01 mg/mL, 0,2 mg/mL, 0,25 mg/mL, 0,5 mg/mL, 1 mg/mL) dopo 24h di incubazione. Il grafico evidenzia un *trend* di internalizzazione crescente all'aumentare della concentrazione di trattamento per entrambe le linee cellulari, raggiungendo poi un valore di assestamento prossimo al 100% a concentrazioni maggiori (superiori a 0,25 mg/mL per le U87 e 1 mg/mL per le U251). È possibile notare, inoltre, come le U251 abbiano un *uptake* meno marcato (rispetto alle U87) quando esposte a concentrazioni più basse, probabilmente per via delle documentate differenze di attività metabolica presenti tra le due linee cellulari.[75] Inoltre, vi sono numerosi parametri che influenzano l'internalizzazione delle nanoparticelle da parte delle cellule, tra cui spiccano la dimensione e la forma delle particelle, la concentrazione di trattamento, il tipo di materiale, le caratteristiche superficiali. [53]

La presenza del guscio lipidico è vantaggiosa in termini di internalizzazione in quanto i processi di assorbimento delle NPs sono favoriti proprio dall'affinità tra il guscio lipidico delle NPs e la membrana delle cellule tumorali.[68]

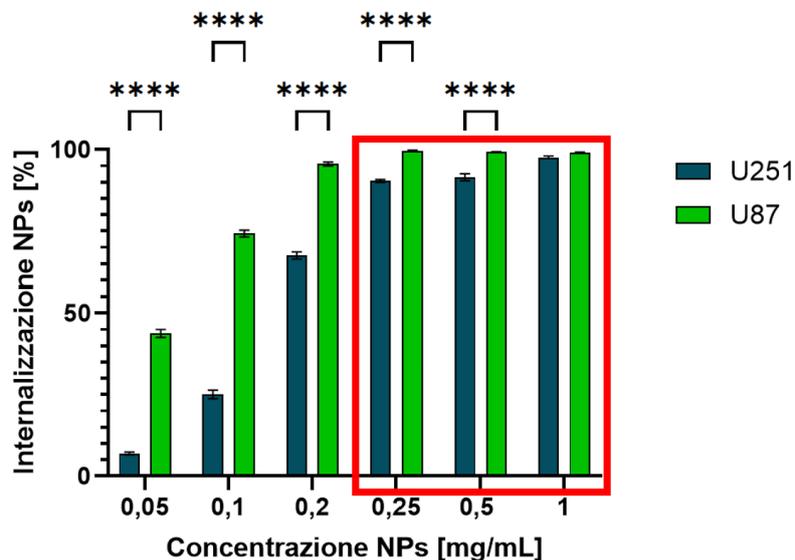


Figura 16: Quantificazione dell'internalizzazione cellulare con citometria a flusso su cellule U251 e U87. Confronto per diverse concentrazioni di Rhod-NPs (0,05 mg/mL; 0,1 mg/mL; 0,2 mg/mL; 0,25 mg/mL; 0,5 mg/mL; 1mg/mL) dopo 24h di incubazione (n=4). Il riquadro rosso evidenzia le condizioni in cui è stato possibile raggiungere un'internalizzazione superiore al 90% per entrambe le linee cellulari. I confronti multipli sono stati eseguiti utilizzando il *two-way ANOVA*. **** $p < 0.0001$.

L'analisi al FACS è stata ripetuta dopo 48h di incubazione per valutare la capacità che le cellule U251 e U87 hanno di mantenere nel tempo un certo livello di assorbimento di Rhod-NPs. I dati ottenuti sono stati confrontati con i valori di internalizzazione alle medesime concentrazioni di trattamento ottenuti dopo 24h di incubazione e sono sintetizzati in figura 17. Per le cellule U251 (Fig.17a), dopo 48h di incubazione con Rhod-NPs, si osserva la medesima tendenza identificata nelle 24h precedenti: si ha un'internalizzazione crescente all'aumentare della concentrazione. Solo per la concentrazione di 0,25 mg/mL di Rhod-NPs si osserva un lieve calo di internalizzazione percentuale nel tempo (dal 90% all'80%) che, tuttavia, non risulta significativo. Per le restanti concentrazioni analizzate (0,5 mg/mL; 1 mg/mL) l'internalizzazione percentuale aumenta, raggiungendo il 100% dopo 48h di incubazione. Le cellule U87 (Fig. 17b) avevano raggiunto, per le tre concentrazioni di interesse, la totalità di NPs internalizzate già dopo 24h e questo livello di *uptake* è stato mantenuto anche per le successive 24h.

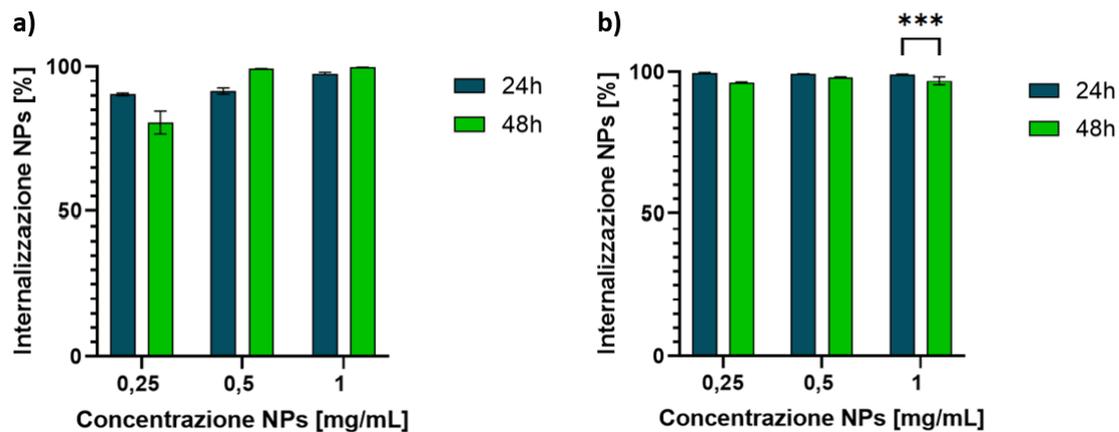


Figura 17: Quantificazione dell'internalizzazione cellulare con citometria a flusso: a) cellule U251; b) cellule U87. Confronto per diversi tempi di incubazione (24h e 48h) e per diverse concentrazioni di Rhod-NPs (0,25 mg/mL; 0,5 mg/mL; 1mg/mL) (n=4). I confronti multipli sono stati eseguiti utilizzando il *two-way ANOVA*. *** $p < 0.001$.

La valutazione della capacità di *uptake* di Rhod-NPs da parte delle cellule tumorali di GBM (U51) è stata valutata anche da un punto di vista qualitativo effettuando uno *staining* con DAPI e Falloidina su campioni cellulari sottoposti a diversi tempi di incubazione con Rhod-NPs (30 min (Fig.18a e Fig. 19a); 24h (Fig. 18b e Fig.19b)). Le immagini ottenute tramite microscopia confocale hanno permesso di constatare che le nanoparticelle sono state internalizzate con successo da parte delle cellule U251, sia nel caso di trattamento con Rhod-NPs alla concentrazione di 0,05 mg/mL (Fig. 18) che nel caso di trattamento con Rhod-NPs alla concentrazione di 0,1 mg/mL (Fig. 19). Lo *staining* dei filamenti di F-actina con Falloidina ha permesso di ottenere una visualizzazione del citoscheletro cellulare, mentre il DAPI è stato utilizzato per marcare il nucleo. In tutti i casi, è possibile verificare come il segnale associato alle NPs sia diffuso in tutto il citoplasma, sebbene si possa osservare un accumulo preferenziale in prossimità del nucleo cellulare. Inoltre, è possibile osservare come all'aumentare del tempo di incubazione cresca la quantità di NPs internalizzate, come è particolarmente evidente alla concentrazione di 0,5 mg/mL (Fig. 18). Per un tempo di incubazione di 30 min, le immagini mostrano come vi siano differenze nella quantità di NPs presenti nel citoplasma cellulare a seconda della concentrazione somministrata. In particolare, il segnale fluorescente associato alle NPs è più evidente per la concentrazione di 1 mg/mL (Figura 19 a) rispetto a quello osservato per le cellule sottoposte alla concentrazione di 0.5 mg/mL (Figura 19 b). Al contrario, non sembrano esserci differenze significative per tempi di incubazione più lunghi (Figure 18 b e 19b).

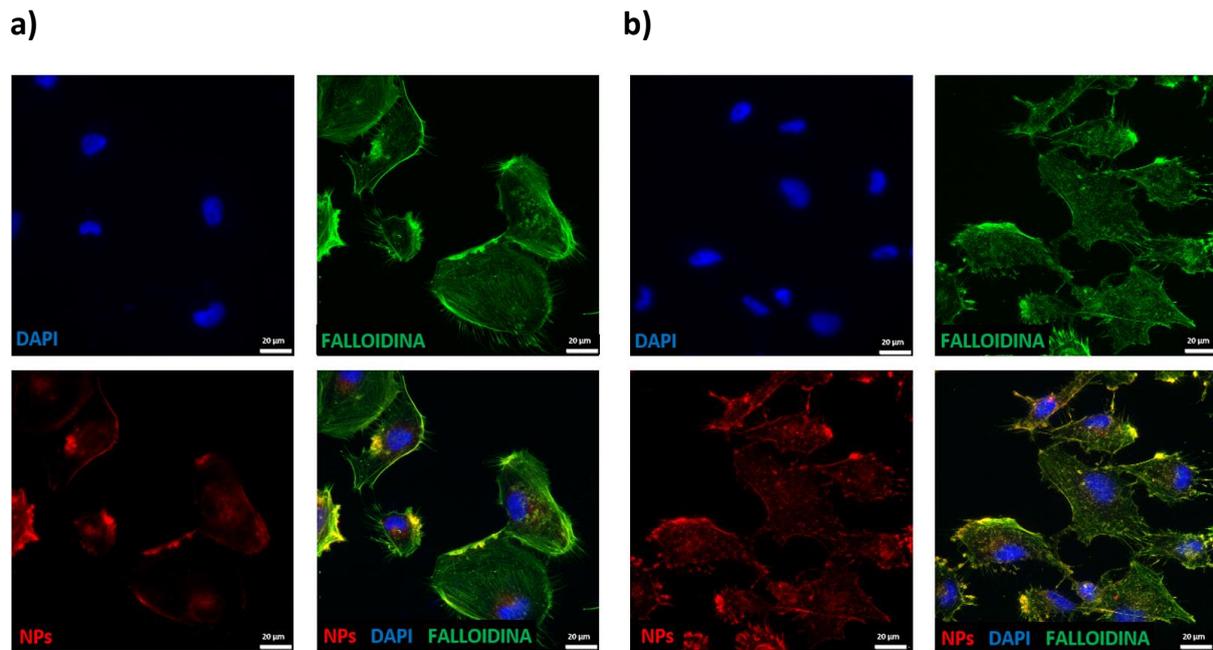


Figura 18: Immagini in fluorescenza delle cellule U251 trattate con Rhod-NPs alla concentrazione di 0,05 mg/mL per a)30 min; b)24h. I nuclei (marcati in DAPI) sono rappresentati in blu, mentre la F-Actina dei citoscheletri (marcata con Falloidina fluorescente) è evidenziata in verde. Le NPs fluorescenti (contenenti Rodamina) sono indicate in rosso. Barra di scala 20 µm.

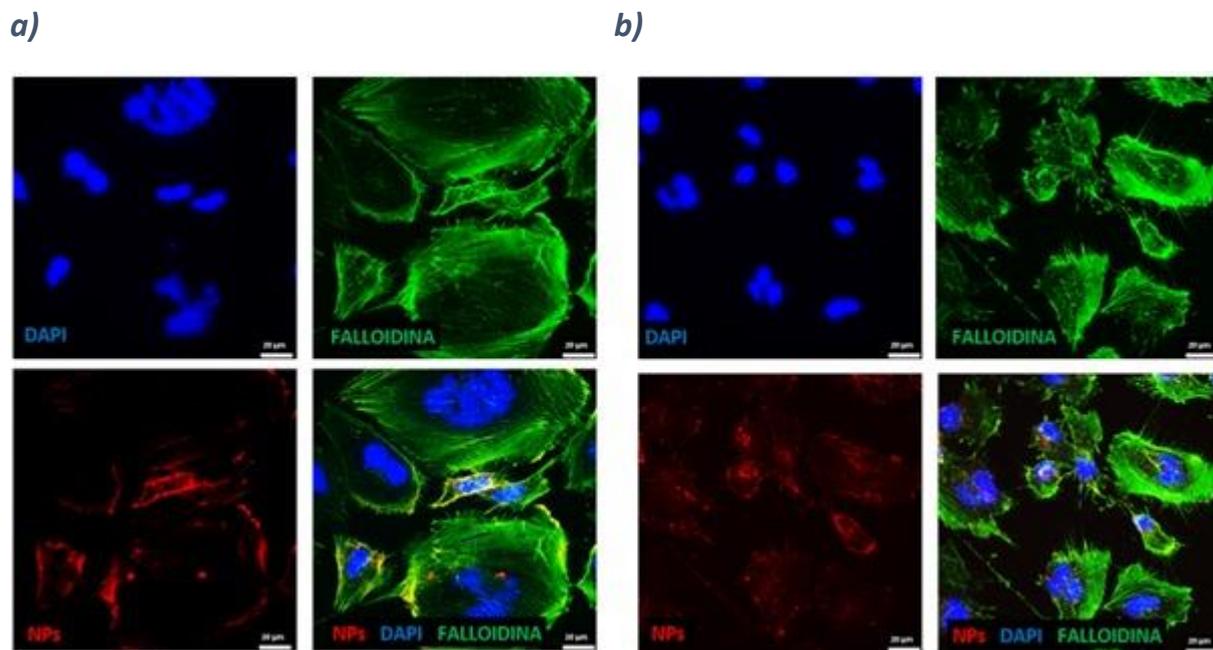


Figura 19: Immagini in fluorescenza delle cellule U251 trattate con Rhod-NPs alla concentrazione di 0,10 mg/mL per a)30 min; b)24h. I nuclei (marcati in DAPI) sono rappresentati in blu, mentre la F-Actina dei citoscheletri (marcata con Falloidina fluorescente) è evidenziata in verde. Le NPs fluorescenti (contenenti Rodamina) sono indicate in rosso. Barra di scala 20 µm.

Data la natura complessa ed eterogenea del microambiente del GBM, è necessario analizzare la capacità di internalizzazione anche delle cellule non tumorali presenti all'interno dei tessuti coinvolti dal tumore.

È stato ampiamente dimostrato che in presenza di GBM, gli astrociti associati al tumore (TAAs) non sono in grado di contenere le cellule neoplastiche, ma diventano promotori della progressione del GBM, rilasciando molecole che supportano lo sviluppo del tumore.[22]

Per poter prevedere, quindi, eventuali effetti collaterali associati alle NPs su queste cellule, è stata valutata la capacità di *uptake* di NPs da parte delle cellule astrocitarie (HASTR), come mostrato in figura 20.

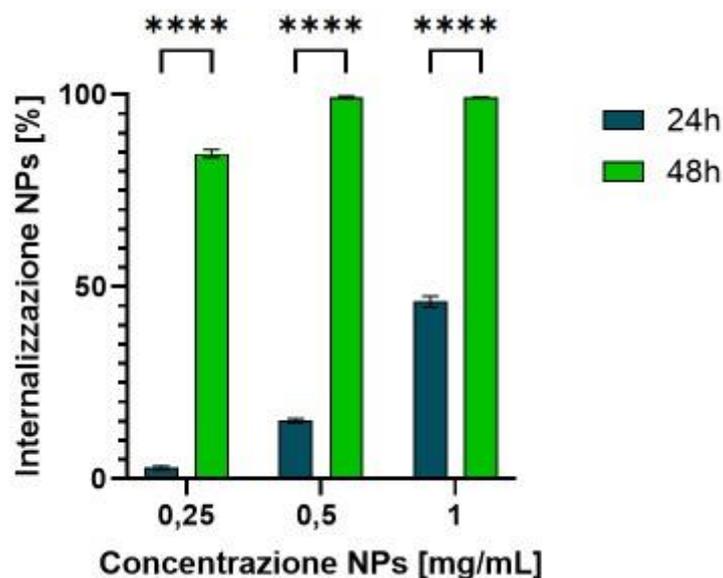


Figura 20: Quantificazione dell'internalizzazione cellulare con citometria a flusso: cellule HASTR. Confronto per diversi tempi di incubazione (24h e 48h) e per diverse concentrazioni di Rhod-NPs (0,25 mg/mL; 0,5 mg/mL; 1mg/mL) (n=4). I confronti multipli sono stati eseguiti utilizzando il *two-way ANOVA*. **** p<0.0001.

I risultati suggeriscono che gli astrociti presentino una cinetica di internalizzazione più lenta, rispetto alle cellule tumorali di GBM precedentemente analizzate. Infatti, dopo 24h di incubazione con Rhod-NPs, solo la concentrazione più alta (1mg/mL) consente di raggiungere il 50 % di cellule positive alle Rhod-NPs. Al contrario, si osserva un'internalizzazione limitata (inferiore al 5%) incubando con Rhod-NPs alla concentrazione di 0,25 mg/mL. Tuttavia, per tutte le concentrazioni analizzate si registrano livelli di uptake prossimi al 100% solo dopo 48h di incubazione.

La limitata capacità di internalizzare NPs è stata riscontrata anche osservando immagini ottenute al microscopio confocale su campioni cellulari di HASTR

precedentemente trattati con Rhod-NPs alla concentrazione di 0,05 mg/mL e 0,1 mg/mL lasciate in incubazione per 30 min e 24h. Come si può notare dalle immagini di Fig. 21 e Fig. 22 il segnale rilevato relativo alle NPs è molto debole e poco diffuso. Come osservato in Fig. 21, per la concentrazione di 0,5 mg/mL, non è possibile rilevare alcun segnale, indipendentemente dal tempo di incubazione (al netto della presenza di alcuni artefatti). Per le concentrazioni più elevate (Fig.22), si può identificare un maggior accumulo di NPs al crescere del tempo di incubazione, seppure sempre molto più ridotto rispetto a quello osservato per le cellule tumorali.

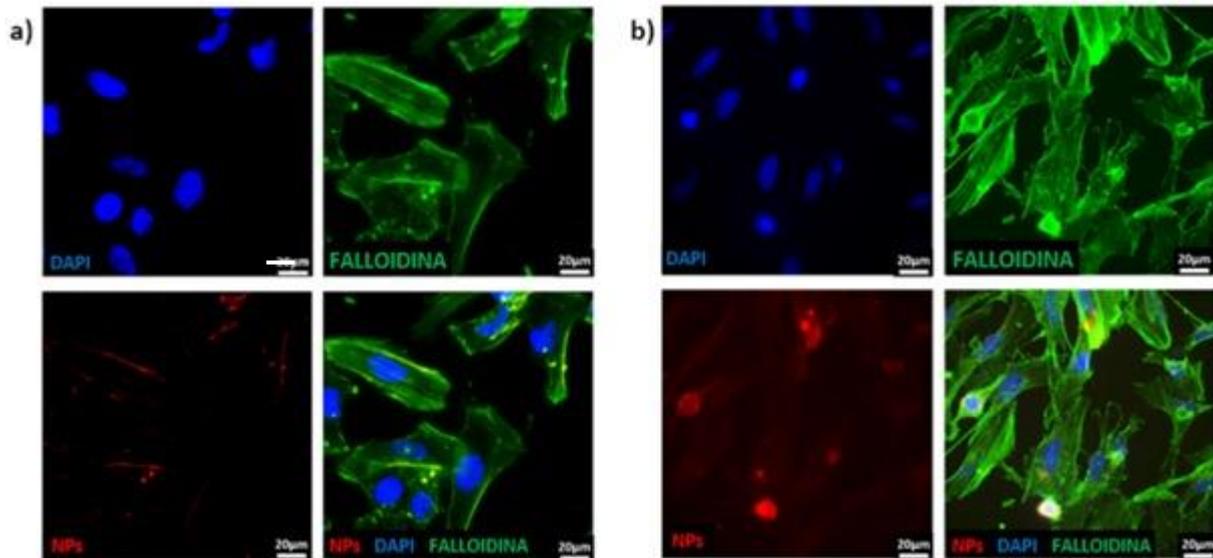


Figura 21: Immagini in fluorescenza delle cellule HASTR trattate con Rhod-NPs alla concentrazione di 0,05 mg/mL per a)30 min; b)24h. I nuclei (marcati in DAPI) sono rappresentati in blu, mentre la F-Actina dei citoscheletri (marcata con Falloidina fluorescente) è evidenziata in verde. Le NPs fluorescenti (contenenti Rodamina) sono indicate in rosso. Barra di scala 20 µm.

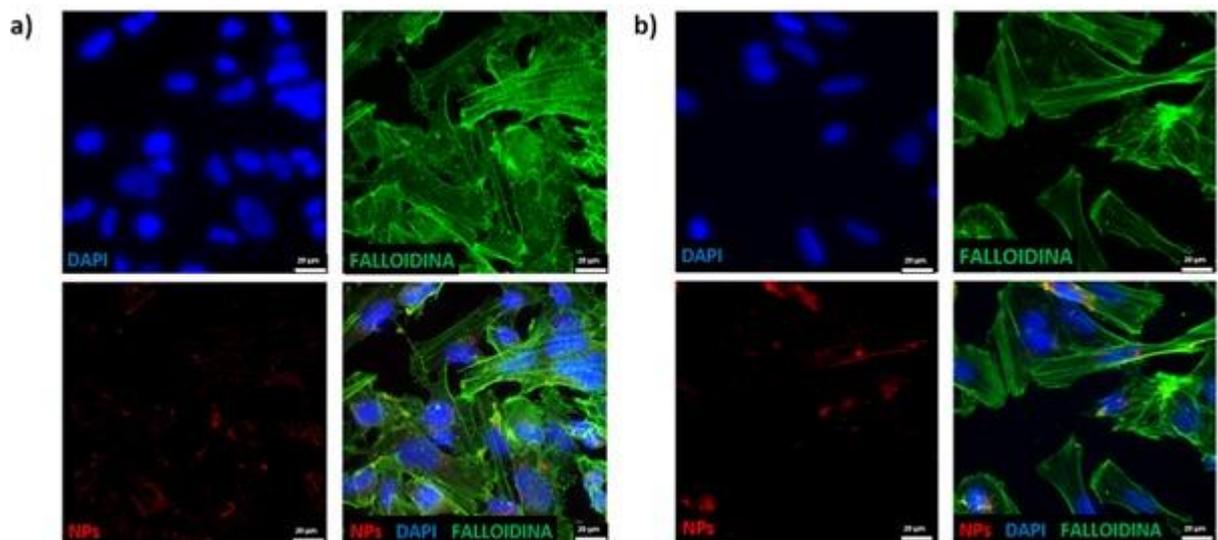


Figura 22: Immagini in fluorescenza delle cellule HASTR trattate con Rhod-NPs alla concentrazione di 0,10 mg/mL per a)30 min; b)24h. I nuclei (marcati in DAPI) sono rappresentati in blu, mentre la F-Actina dei citoscheletri (marcata con Falloidina fluorescente) è evidenziata in verde. Le NPs fluorescenti (contenenti Rodamina) sono indicate in rosso. Barra di scala 20 μ m.

Le cellule della microglia associate al GBM rappresentano il 15% dell'infiltrato immunitario [21] e in diversi studi, tra cui quello di Du Y. et al. [59] è stata dimostrata la possibilità di utilizzare le cellule della microglia come *carrier* di NPs. In letteratura, è stato osservato che le cellule della microglia, come tutti i macrofagi, internalizzano più facilmente nanoparticelle grandi (diametro: 150 nm) rispetto a nanoparticelle piccole (diametro 30 nm), a differenza delle cellule tumorali. [76]

Pertanto, è indispensabile analizzare la capacità di internalizzazione di Rhod-NPs (alle concentrazioni di 0,25mg/mL, 0,5mg/mL e 1mg/mL) da parte delle cellule HMC3, per prevedere se vi possa essere un accumulo preferenziale nelle cellule della microglia (rispetto a quelle tumorali).

Il grafico illustrato in figura 23 mostra percentuali di internalizzazione elevate per tutte le concentrazioni analizzate dopo 24h di incubazione, con un picco, prossimo al 95%, in corrispondenza della concentrazione più alta (1mg/mL). Nelle 24h successive si assiste ad un incremento significativo dell'internalizzazione percentuale, evidente già alla concentrazione più bassa (0,25 mg/mL, con una crescita dal 70% all'85%) e crescente all'aumentare della concentrazione, raggiungendo un'internalizzazione prossima al 100% per la concentrazione di 1 mg/mL.

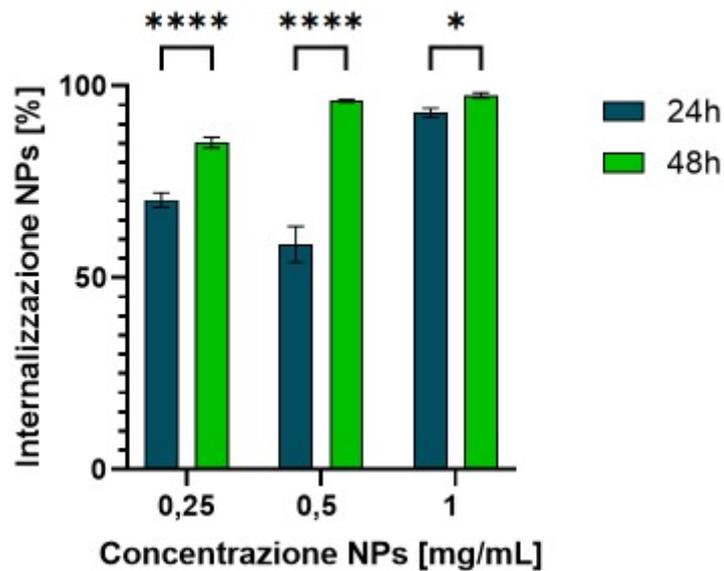


Figura 23: Quantificazione dell'internalizzazione cellulare con citometria a flusso: cellule HMC3. Confronto per diversi tempi di incubazione (24h e 48h) e concentrazioni di Rhod-NPs (0,25 mg/mL; 0,5 mg/mL; 1mg/mL) (n=4). I confronti multipli sono stati eseguiti utilizzando il *two-way ANOVA*. ****p<0.0001; *p<0.05.

Come emerge dalle immagini al microscopio confocale riportate in figura 24 e in figura 25, la presenza di NPs internalizzate è evidente per tutte le concentrazioni e time point analizzati. Si può osservare come l'*uptake* di NPs da parte delle cellule HMC3 cresce nel tempo a parità di concentrazione, come è particolarmente evidente confrontando le immagini in Figura 21 a e b, relative alla concentrazione più bassa (0,05 mg/mL). Analogamente, il segnale di fluorescenza associato alle NPs cresce all'aumentare della concentrazione somministrata.

I risultati delle analisi al microscopio e al citofluorimetro confermano come le cellule della microglia presentino un'alta internalizzazione delle NPs, che potrebbe ostacolare l'accumulo nelle cellule tumorali. Tuttavia, questo alto *uptake* potrebbe essere utile per realizzare sistemi di trasporto di nanomedicine basati su queste cellule.

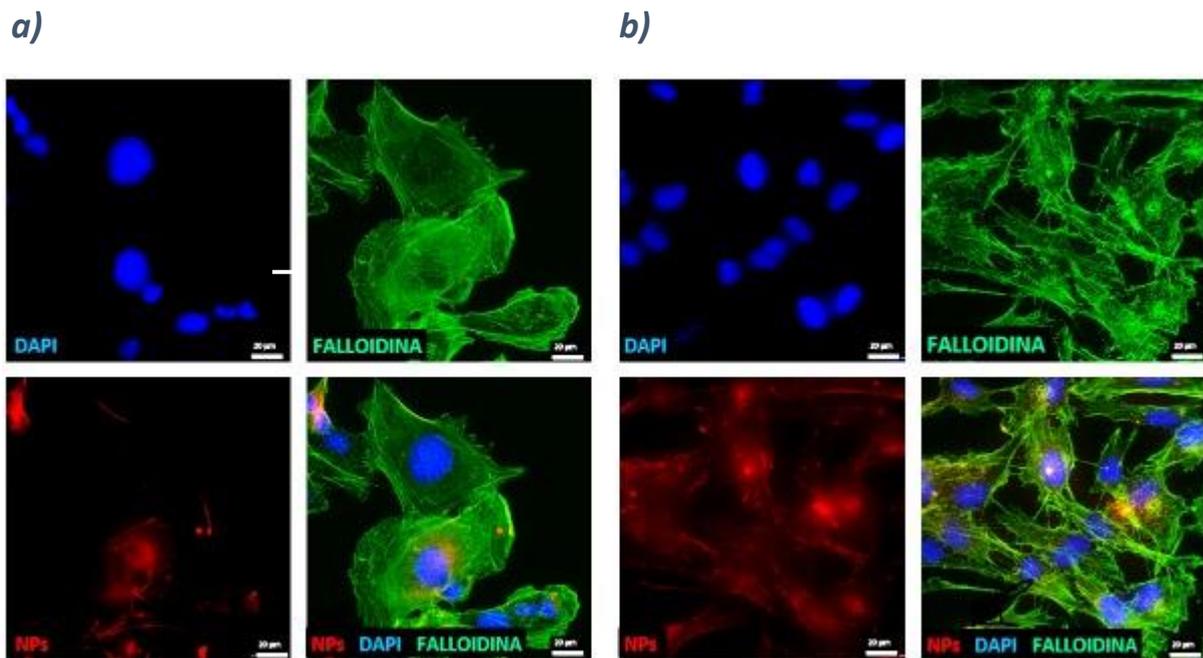


Figura 24: Immagini in fluorescenza delle cellule HMC3 trattate con Rhod-NPs alla concentrazione di 0,05 mg/mL per a)30 min; b)24h. I nuclei (marcati in DAPI) sono rappresentati in blu, mentre la F-Actina dei citoscheletri (marcata con Falloidina fluorescente) è evidenziata in verde. Le NPs fluorescenti (contenenti Rodamina) sono indicate in rosso. Barra di scala 20 μm.

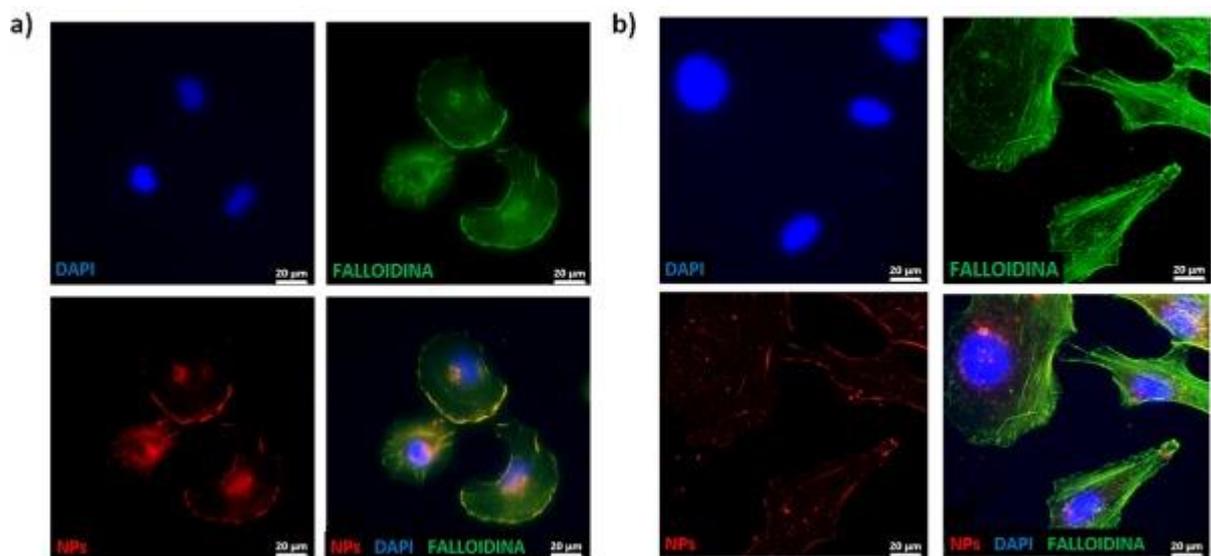


Figura 25: Immagini in fluorescenza delle cellule HMC3 trattate con Rhod-NPs alla concentrazione di 0,10 mg/mL per a)30 min; b)24h. I nuclei (marcati in DAPI) sono rappresentati in blu, mentre la F-Actina dei citoscheletri (marcata con Falloidina fluorescente) è evidenziata in verde. Le NPs fluorescenti (contenenti Rodamina) sono indicate in rosso. Barra di scala 20 μm.

3.3 Valutazione dei profili di co-localizzazione Rabs/NPs

Poiché l'efficacia d'azione delle NPs dipende dalla capacità di eludere la degradazione lisosomiale, la comprensione del percorso intracellulare intrapreso dalle NPs potrebbe aprire nuovi scenari nella pianificazione di una terapia mirata ed efficace per il trattamento del glioblastoma. Come precedentemente indicato nello studio di Sandin P. et al.[62] sono state marcate alcune proteine specifiche (Rab-GTPasi 5 e 7) associate ai diversi compartimenti endocitici, al fine di identificare la loro localizzazione citoplasmatica nelle cellule tumorali di glioblastoma U251. Fig. 26 mostra un'immagine in immunofluorescenza in cui gli anticorpi per le proteine Rab 5 (marcate in rosso) identificano gli endosomi tardivi, mentre gli endosomi precoci sono marcati in verde grazie a anticorpi specifici per la proteina Rab7. Tuttavia, i segnali relativi a Rab7 e Rab5 appaiono molto distribuiti a livello del citoplasma delle cellule U251, per cui non è stato possibile distinguere la localizzazione preferenziale delle NPs marcate in bianco in figura x) in un compartimento endocitico specifico. Tuttavia, le immagini confermano che le NPs vengono internalizzate con successo all'interno del corpo cellulare dopo 24 h di incubazione. La parziale co-localizzazione tra NPs e Rab7 suggerisce che almeno una parte delle particelle vada incontro a un *pathway* di degradazione all'interno degli endosomi tardivi.

L'insuccesso di questa prova può essere legato ad una moltitudine di aspetti, primo fra tutti le limitazioni tecnologiche del microscopio utilizzato per acquisire le immagini. In futuro, sarà necessario migliorare la fase di staining e valutare diverse tempistiche e concentrazioni di incubazione delle NPs. In alternativa, si potrebbe pensare di utilizzare marker più selettivi associati a specifici compartimenti endocitici, in modo da ridurre il rischio di detezione di segnali così diffusi. In definitiva, le dinamiche intracellulari delle NPs a livello delle U251 rimangono ignote e ancora da investigare.

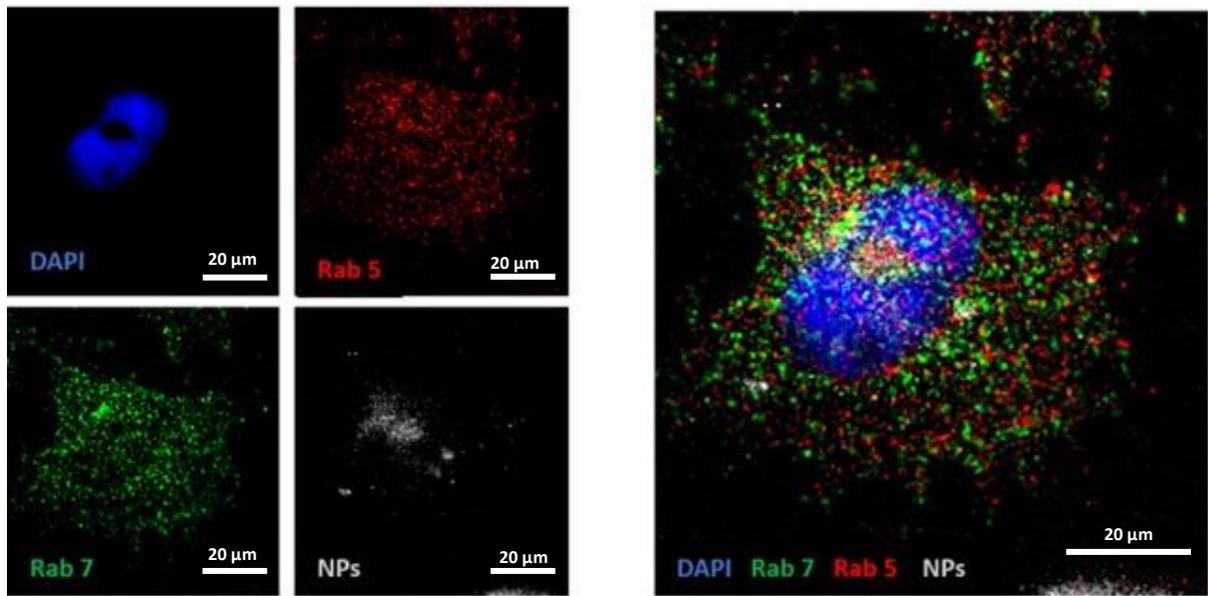


Figura 26: Immagini in fluorescenza delle cellule U251 trattate con NPs alla concentrazione di 1 mg/mL per 24h. La localizzazione delle vescicole endosomiali precoci (marcate con anticorpi anti-Rab5) e tardive (marcate con anticorpi anti-Rab7) è evidenziata in rosso e verde, rispettivamente. I nuclei (marcati in DAPI) sono rappresentati in blu, mentre le NPs fluorescenti (contenenti Rodamina) sono indicate in bianco. Barra di scala 20 μ m.

3.4 Risposta al trattamento farmacologico con BTZ e BTZ-NPs

L'efficacia del trattamento farmacologico è stata valutata eseguendo saggi di vitalità cellulare su modelli cellulari bidimensionali e tridimensionali (sferoidi) su quattro linee cellulari caratteristiche del microambiente del GBM (U-87, U251, HASTR, HMC3), dopo 24h e 48h di trattamento. Una ulteriore valutazione è stata possibile analizzando le immagini acquisite al microscopio ZOE™ *Fluorescent Cell Imager*, per verificare eventuali differenze morfologiche indotte dai diversi trattamenti.

3.4.1 Risposta delle monoculture 2D

In prima analisi, è stata testata l'efficacia del trattamento con BTZ e BTZ-NPs su modelli bidimensionali di GBM (monocolture di U251 e U87). I valori di vitalità ottenuti sono stati espressi in percentuale rispetto al valore di vitalità relativo al controllo non trattato.

I risultati ottenuti dopo 24h e 48h di trattamento mostrano come le cellule U251 subiscano effetti limitati indipendentemente dalla modalità di somministrazione del trattamento farmacologico. Dopo 24h (Fig.27), non si osservano differenze statisticamente significative tra il trattamento con farmaco libero e con farmaco incapsulato. Fatta eccezione per il trattamento alla concentrazione più bassa di BTZ-NPs, l'effetto citotossico prodotto risulta simile per tutte le concentrazioni analizzate e per entrambi i tipi di trattamento, con riduzione di vitalità intorno al 20-25%. L'analisi delle immagini ottenute al microscopio (Fig.28) è coerente con i dati di vitalità ottenuti, in quanto è possibile osservare, per entrambi i tipi di trattamento e per tutte le concentrazioni analizzate, la presenza di poche cellule staccate e tondeggianti, su un tappeto di cellule adese a dimostrazione che il trattamento è stato poco efficace nelle prime 24h.

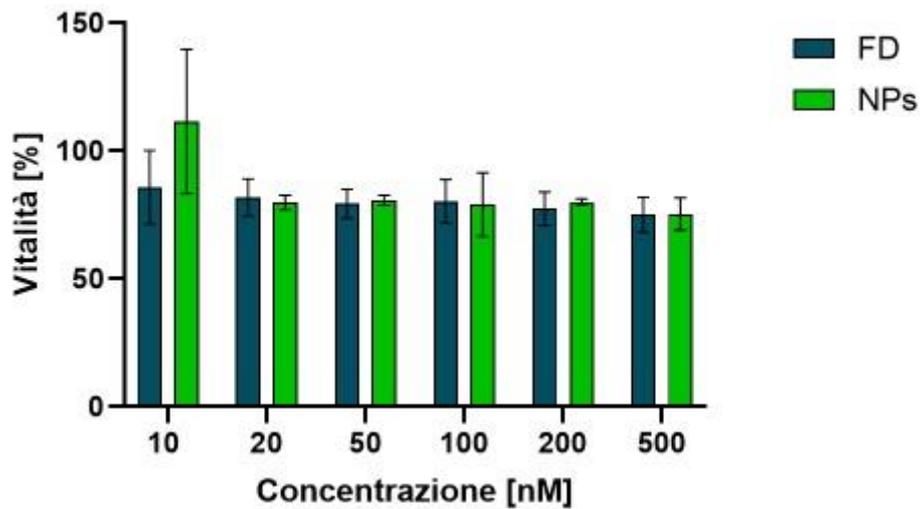


Figura 27: Risultati del saggio di vitalità ottenuti dopo 24h dalla somministrazione di BTZ e BTZ-NPs. Il test è stato eseguito su cellule U251 trattate con diverse concentrazioni di farmaco incapsulato e farmaco libero (n=3).

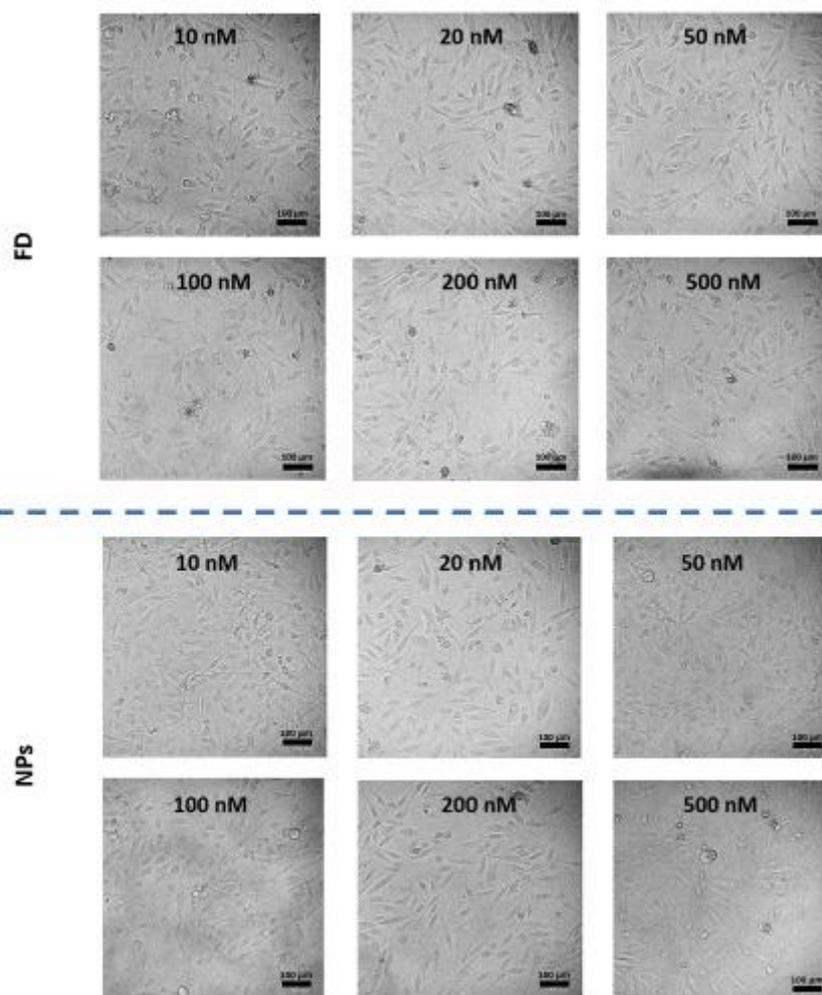


Figura 28: Immagini in campo chiaro delle cellule U251 dopo 24h di trattamento con BTZ e BTZ-NPs. Barra di scala: 100µm.

I risultati ottenuti per tempi di trattamento maggiori (48h) (Fig.29) mostrano come, per entrambi i trattamenti, l'efficacia aumenti nel tempo (con cali di vitalità superiori al 40% per le concentrazioni più elevate). Si osserva nuovamente che non vi sono differenze significative nella risposta prodotta da farmaco libero e BTZ-NPs. Per entrambe le tipologie di trattamento, si osserva una parziale dipendenza dell'efficacia di trattamento dalla concentrazione. Infatti, il trattamento con la concentrazione più bassa (10 nM) causa una limitata riduzione della vitalità (che assume valori intorno al 70 % per entrambi i trattamenti), mentre per tutte le altre concentrazioni si ha un calo più evidente.

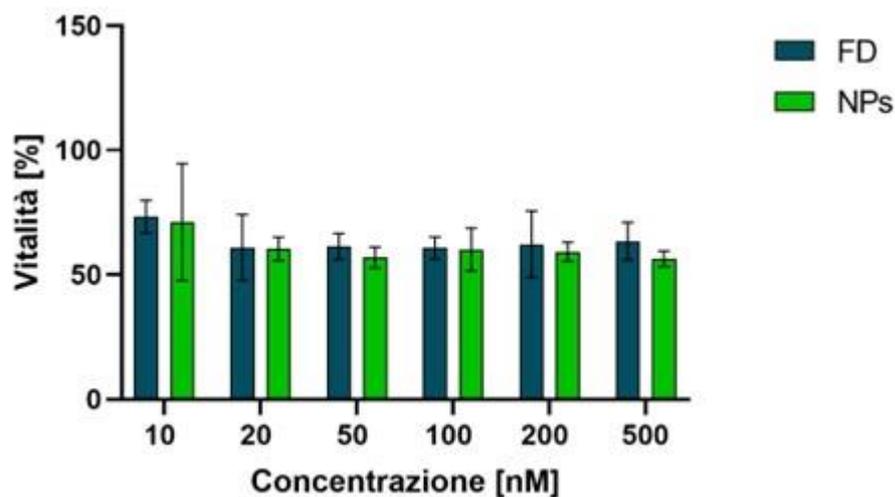


Figura 29: Risultati del saggio di vitalità ottenuti dopo 48h dalla somministrazione di BTZ e BTZ-NPs. Il test è stato eseguito su cellule U251 trattate con diverse concentrazioni di farmaco incapsulato e farmaco libero (n=3).

Come è possibile osservare in Fig. 30, per entrambe le condizioni di trattamento, le cellule rimangono per la maggior parte ben adese sul fondo quando vengono sottoposte a basse concentrazioni (inferiori a 100 nM), mentre solo una piccola porzione si stacca, assumendo una forma tondeggiante. Al contrario è possibile osservare per le concentrazioni più elevate come si abbia un maggior numero di cellule distaccate, e come questo sia più evidente al crescere della concentrazione. Tuttavia, il numero di cellule ben adese rimane comunque rilevante, a dimostrazione della scarsa sensibilità delle cellule U251 al BTZ, sia nella formulazione libera, che in quella incapsulata in NPs.

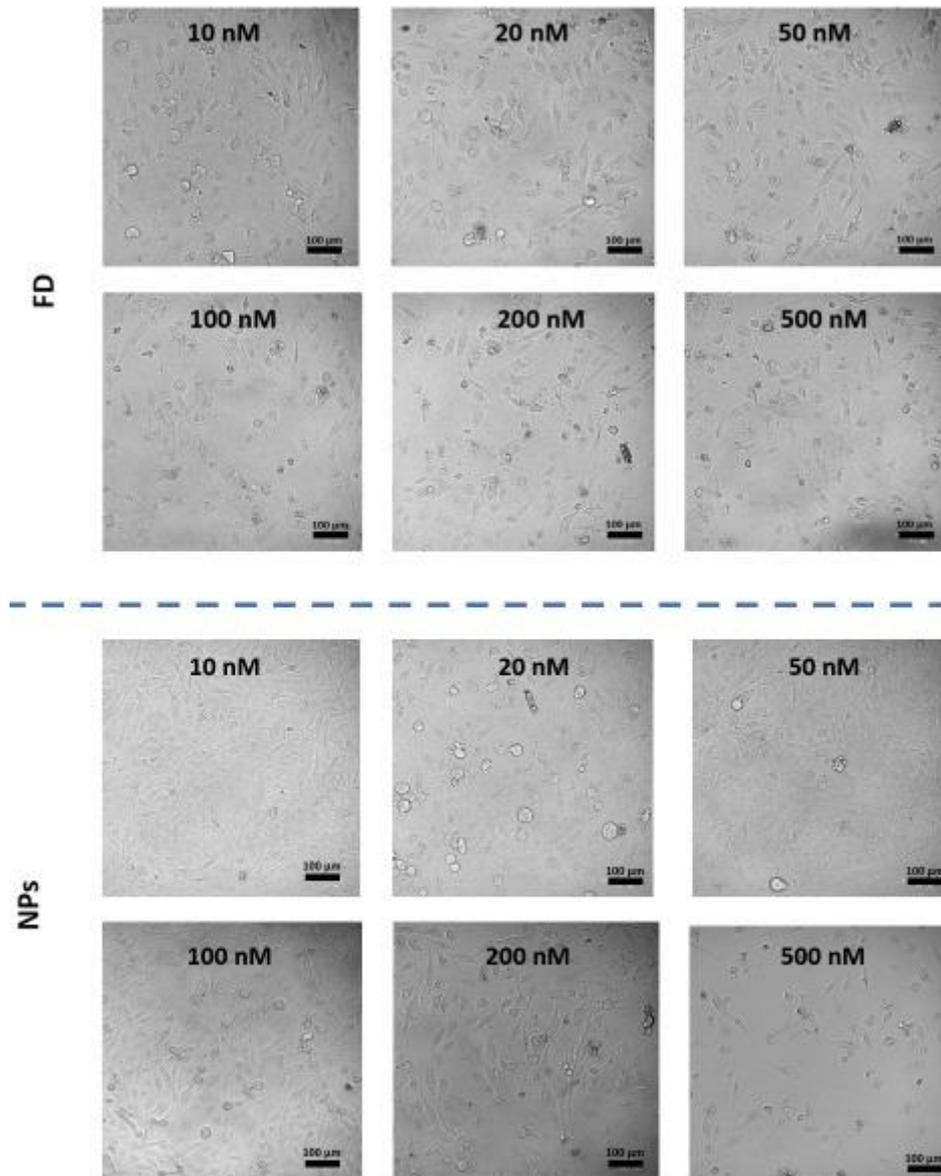


Figura 30: Immagini in campo chiaro di cellule U251 dopo 48h di trattamento con BTZ e BTZ-NPs. Barra di scala: 100µm.

Le cellule U87 risultano essere, dopo 24h dal trattamento, maggiormente sensibili al BTZ rispetto alle cellule U251. In generale, anche in questo caso, il trattamento con farmaco libero è risultato più efficace rispetto al trattamento con NPs, senza riscontrare differenze statisticamente significativamente in relazione alla concentrazione di trattamento, come è possibile constatare dal grafico riportato in Fig. 31.

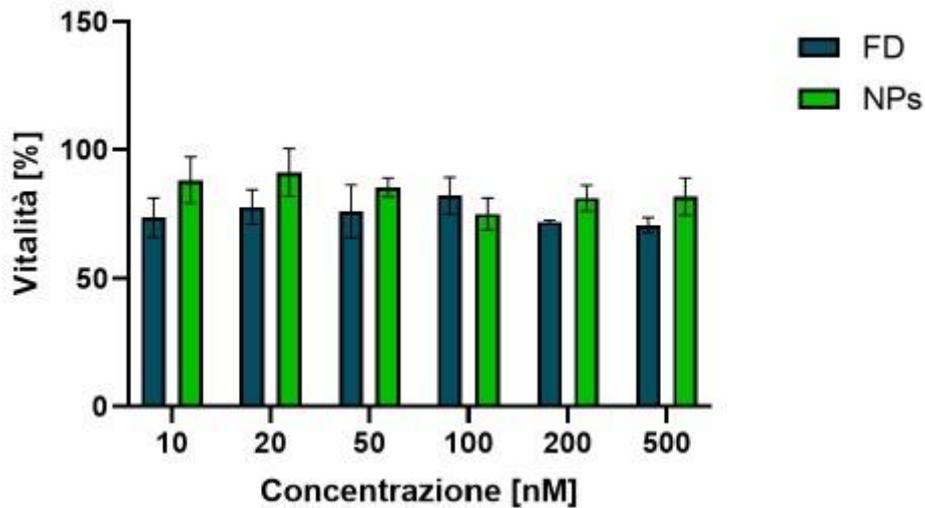


Figura 31: Risultati del saggio di vitalità ottenuti dopo 24h dalla somministrazione di BTZ e BTZ-NPs. Il test è stato eseguito su cellule U87 trattate con diverse concentrazioni di farmaco incapsulato e farmaco libero (n=3).

La valutazione dell'efficacia di trattamento su tempi più lunghi ha permesso di valutare la risposta delle cellule U87 ai due differenti trattamenti dopo 48h di incubazione. Complessivamente, dal grafico in Fig. 32, si nota un calo significativo della vitalità, per tutte le concentrazioni di entrambi i trattamenti. L'incubazione con farmaco libero ancora una volta ha portato ad un effetto maggiorato rispetto al farmaco incapsulato, con differenze statisticamente significative per tutte le concentrazioni tranne quella più bassa (10 nM).

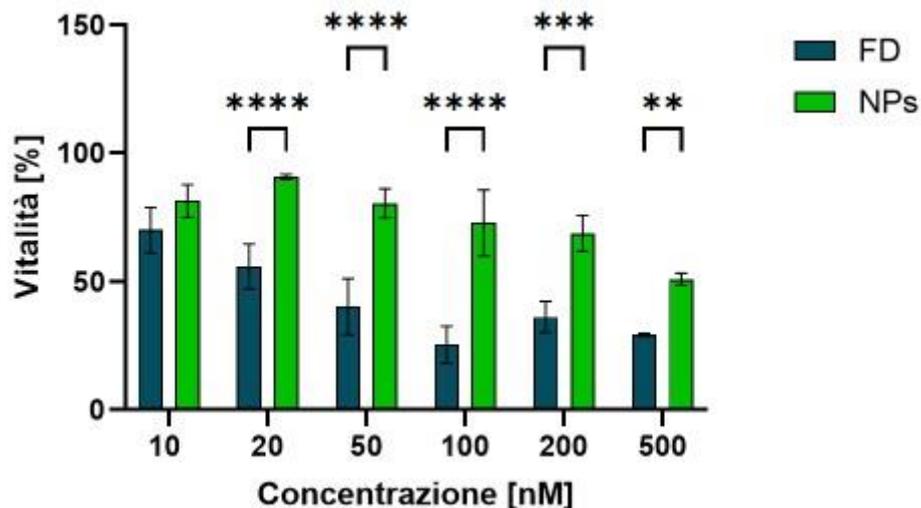


Figura 32: Risultati del saggio di vitalità ottenuti dopo 48h dalla somministrazione di BTZ e BTZ-NPs. Il test è stato eseguito su cellule U87 trattate con diverse concentrazioni di farmaco incapsulato e farmaco libero (n=3). I confronti multipli sono stati eseguiti utilizzando il *two-way ANOVA*. **p<0.01; ***p<0.001, ****p<0.0001.

L'analisi della vitalità effettuata su cellule non tumorali ha permesso di studiare gli effetti del trattamento sulle cellule residenti del microambiente del GBM. Lo scopo di queste prove è identificare delle condizioni di trattamento ottimali che consentano di avere una buona efficacia di trattamento sulle cellule tumorali, ma limitino la citotossicità sulle cellule sane in prossimità del tumore. L'analisi della vitalità effettuata su cellule HASTR dopo 24h dal trattamento (Fig. 33) ha permesso di constatare che le cellule astrocitarie sono molto sensibili al BTZ. Inoltre, il calo di vitalità cresce (anche se in modo limitato) al crescere della concentrazione, con una riduzione massima della vitalità che si aggira intorno al 40% per la concentrazione di 500 nM. Le cellule astrocitarie non rappresentano il target di interesse, perciò una riduzione della vitalità così importante non è auspicabile. Tuttavia, i risultati mostrano come l'effetto citotossico del BTZ possa essere limitato incapsulando il farmaco in NPs. Infatti, la riduzione di vitalità a seguito del trattamento con BTZ-NPs è più contenuta rispetto a quella osservata a concentrazioni equivalenti di BTZ, con una differenza particolarmente significativa per le concentrazioni intermedie.

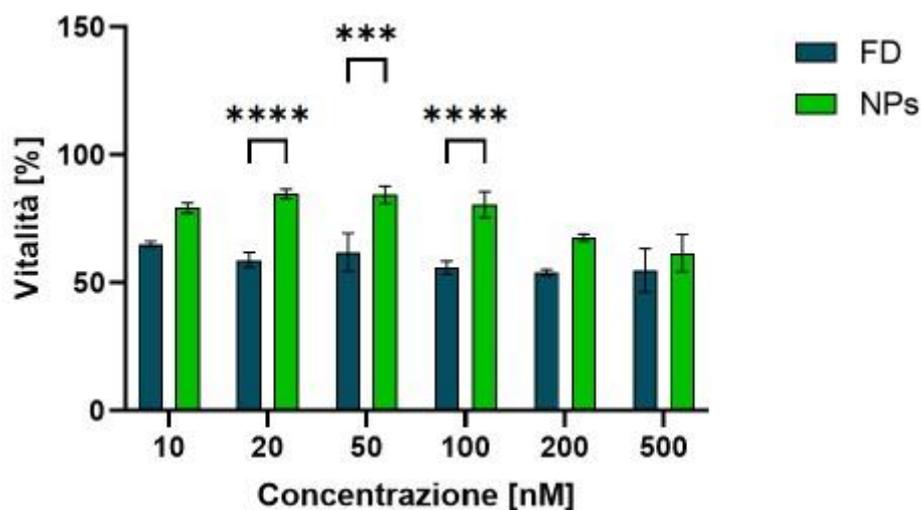


Figura 33: Risultati del saggio di vitalità ottenuti dopo 24h dalla somministrazione di BTZ e BTZ-NPs. Il test è stato eseguito su cellule HASTR trattate con diverse concentrazioni di farmaco incapsulato e farmaco libero (n=3). I confronti multipli sono stati eseguiti utilizzando il *two-way ANOVA*. *** $p < 0.0001$; **** $p < 0.0001$.

Le immagini mostrate in Fig.34 confermano che, a seguito del trattamento con farmaco libero per 24 h, si ha un significativo cambio della morfologia degli astrociti. Inoltre, si osserva un distacco tanto maggiore quanto più elevata la concentrazione somministrata. Al contrario, in caso di trattamento con BTZ-NPs, è possibile osservare come si abbia un minor numero di cellule distaccate e con morfologia sferica, rispetto ai campioni sottoposti a concentrazioni equivalenti di BTZ.

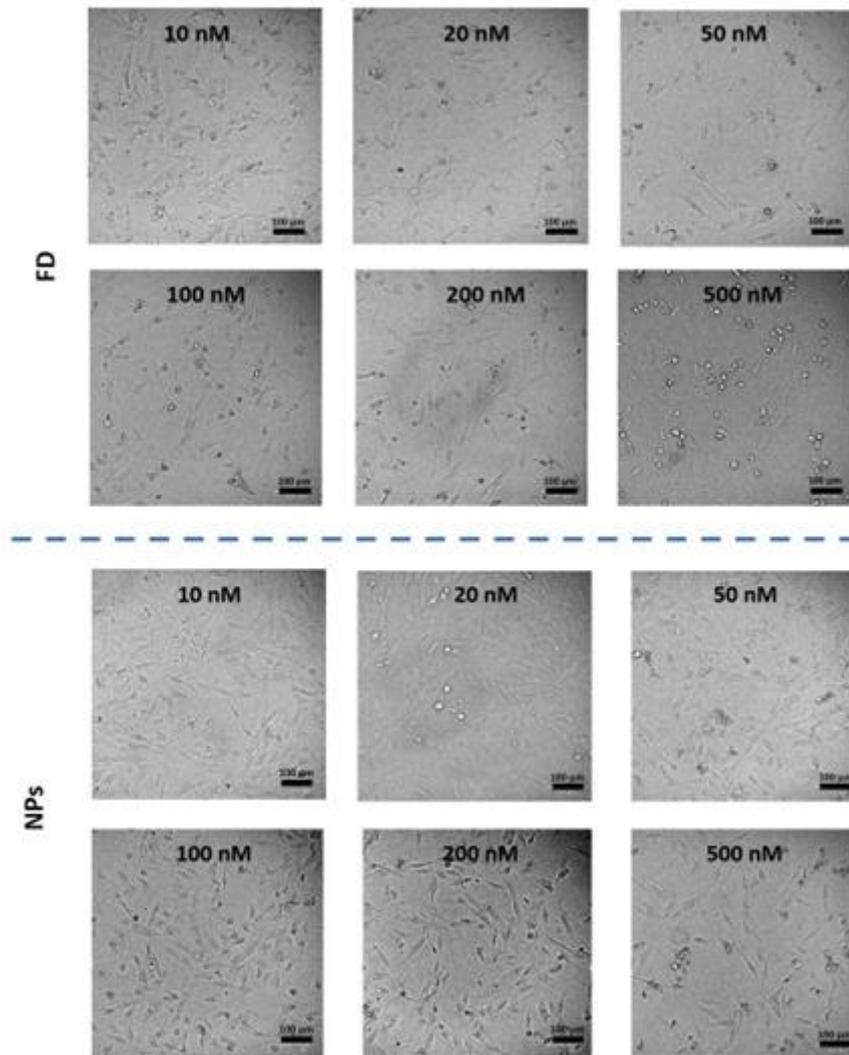


Figura 34: Immagini in campo chiaro cellule HASTR dopo 48h di trattamento con BTZ e BTZ-NPs. Barra di scala: 100µm.

Come è possibile osservare dai grafici in Fig. 35, dopo 48 h di trattamento l'effetto citotossico del farmaco libero sulle cellule HASTR risulta ulteriormente incrementato. Infatti, anche somministrando basse concentrazioni di BTZ (10 nM), si osservano valori di vitalità intorno al 45 %. All'aumentare della concentrazione di trattamento si raggiungono livelli di sopravvivenza ancora più bassi (10 % circa), a conferma dell'importanza degli effetti collaterali che il BTZ può provocare sulle cellule del cervello. Tuttavia, anche per tempi di trattamento più lunghi (48 h), l'incapsulamento del BTZ nelle NPs riduce significativamente l'effetto citotossico per la maggior parte delle concentrazioni considerate (10 nM, 20 nM, 50 nM, 100 nM). Non sono invece presenti variazioni rilevanti per trattamenti alle concentrazioni più elevate.

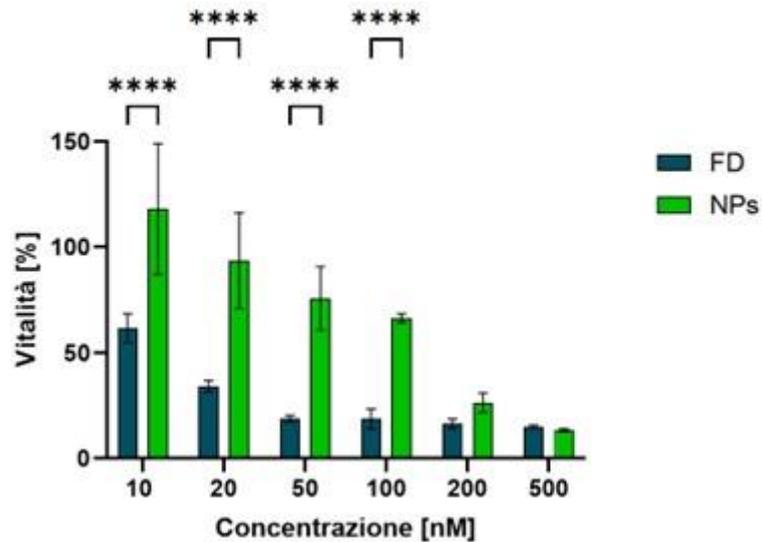


Figura 35: Risultati del saggio di vitalità ottenuti dopo 48h dalla somministrazione di BTZ e BTZ-NPs. Il test è stato eseguito su cellule HASTR trattate con diverse concentrazioni di farmaco incapsulato e farmaco libero (n=3). I confronti multipli sono stati eseguiti utilizzando il *two-way ANOVA*. ****p<0.0001.

Coerentemente con i dati ottenuti sulla vitalità, le immagini in figura 36, relative allo stato dopo 48h di trattamento, mostrano cellule che sono per lo più tondeggianti e staccate. Solo per le concentrazioni di trattamento con BTZ-NPs inferiori a 100 nM è possibile rilevare cellule ancora adese sul fondo.

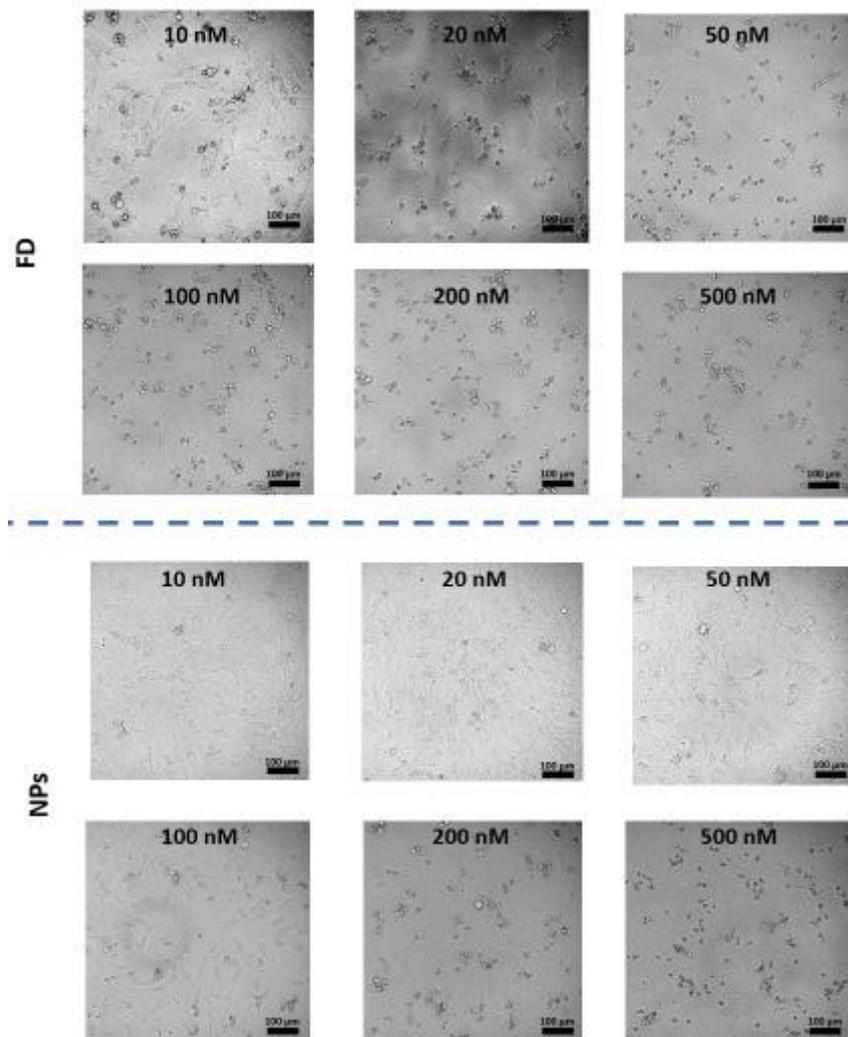


Figura 36: Immagini in campo chiaro di cellule HASTR dopo 48h di trattamento con BTZ e BTZ-NPs. Barra di scala: 100µm.

Anche i risultati dei test di vitalità sulle cellule della microglia riportati in Fig.37, mostrano, come per gli astrociti, differenze importanti nella risposta alle due tipologie di trattamento dopo 24h. Per entrambe le modalità di trattamento non si osservano variazioni dipendenti dalla concentrazione. Tuttavia, piuttosto si può notare che la somministrazione di farmaco libero comporta una riduzione della vitalità di circa il 30% in più rispetto al trattamento con BTZ-NPs, a parità di concentrazione per tutte le concentrazioni considerate.

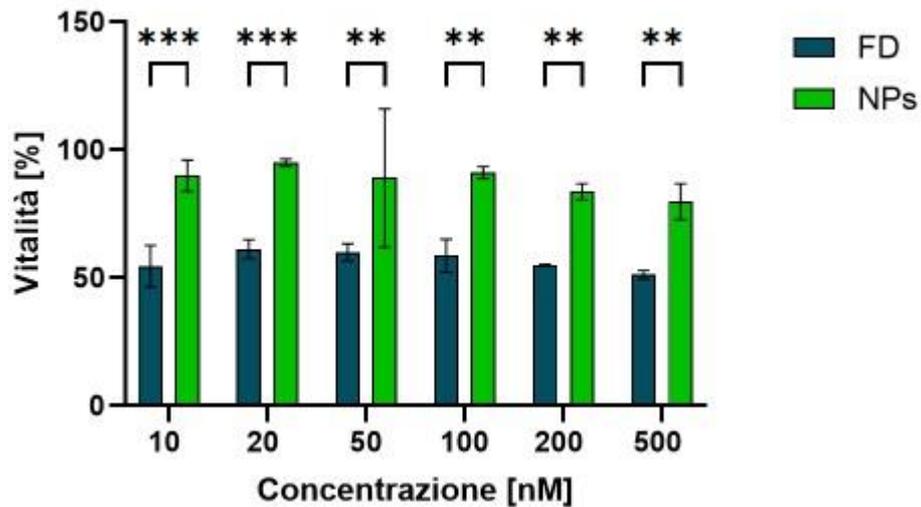


Figura 37: Risultati del saggio di vitalità ottenuti dopo 24h dalla somministrazione di BTZ e BTZ-NPs. Il test è stato eseguito su cellule HMC3 trattate con diverse concentrazioni di farmaco incapsulato e farmaco libero (n=3). I confronti multipli sono stati eseguiti utilizzando il *two-way ANOVA*. **p<0.01; ***p<0.001.

Osservando le immagini ottenute dopo 24 h al microscopio in campo chiaro in Fig. 38, si può notare come per tutte le concentrazioni di trattamento con farmaco libero considerate, la maggior parte delle cellule non si trovi più in condizioni di adesione e abbia assunto una morfologia sferica, ad ulteriore conferma dell'elevata citotossicità del BTZ sulle HMC3. Soltanto nel caso di trattamento con BTZ-NPs a concentrazioni inferiori a 100 nM una parte consistente delle microglia rimane adesa, suggerendo che almeno in queste condizioni le NPs possano ridurre gli effetti citotossici indesiderati.

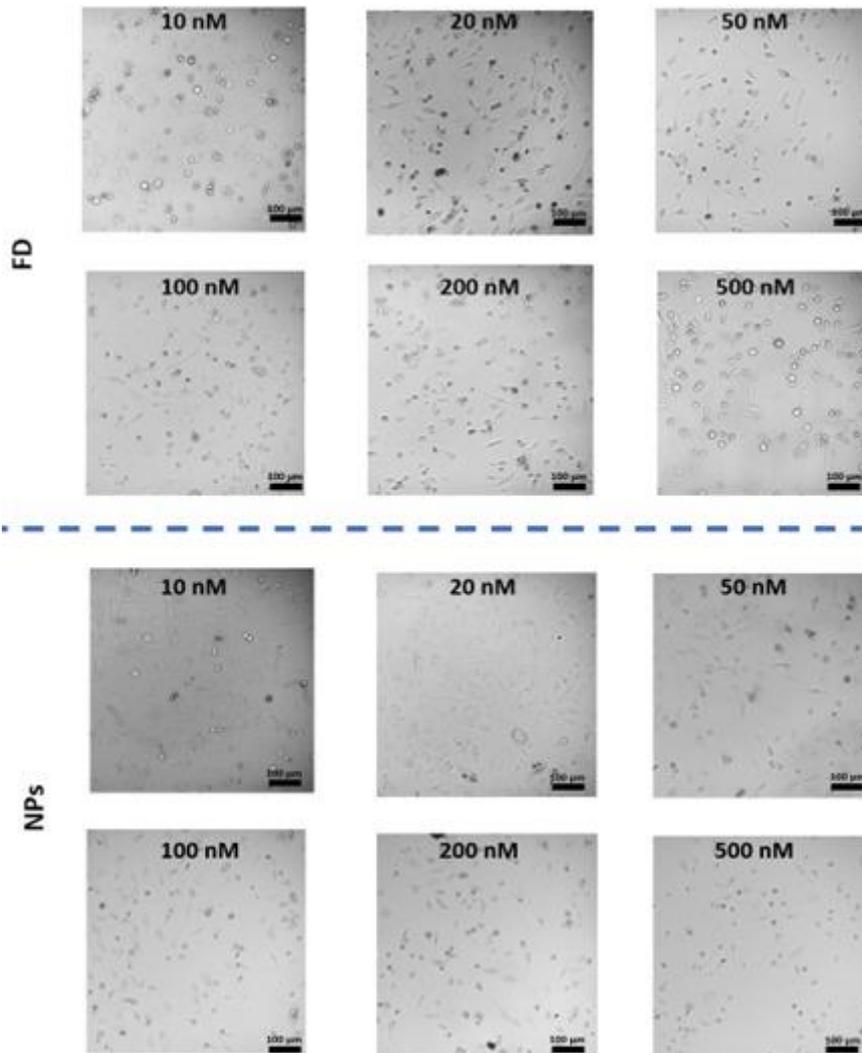


Figura 38: Immagini in campo chiaro di cellule HMC3 dopo 24h di trattamento con BTZ e BTZ-NPs. Barra di scala: 100µm.

La tossicità del trattamento cresce significativamente con il tempo di incubazione. Infatti, come illustrato dalla Fig. 39, dopo 48h di incubazione con il farmaco libero il calo della vitalità cellulare è ancora più drastico di quello osservato al *time point* precedente, con valori intorno al 20% anche per le concentrazioni più basse. Non sembra esserci una dipendenza tra questo calo di vitalità e la concentrazione di BTZ somministrata, probabilmente perché tutti i valori considerati superano la soglia critica di tossicità. Al contrario, i risultati mostrano come la tossicità del trattamento mediato da NPs cresca all'aumentare della concentrazione somministrata. La vitalità rimane molto alta per basse concentrazioni (10 nM e 20 nM, con valori prossimi al 100%). È stato misurato un calo di vitalità significativo (nonché superiore rispetto a quello rilevato a 24 h) per concentrazioni pari e superiori a 50 nM. La vitalità cellulare decresce significativamente al crescere delle concentrazioni successive, fino ad avere,

alla concentrazione di 500 nM, un effetto analogo a quello osservato a seguito del trattamento con farmaco libero.

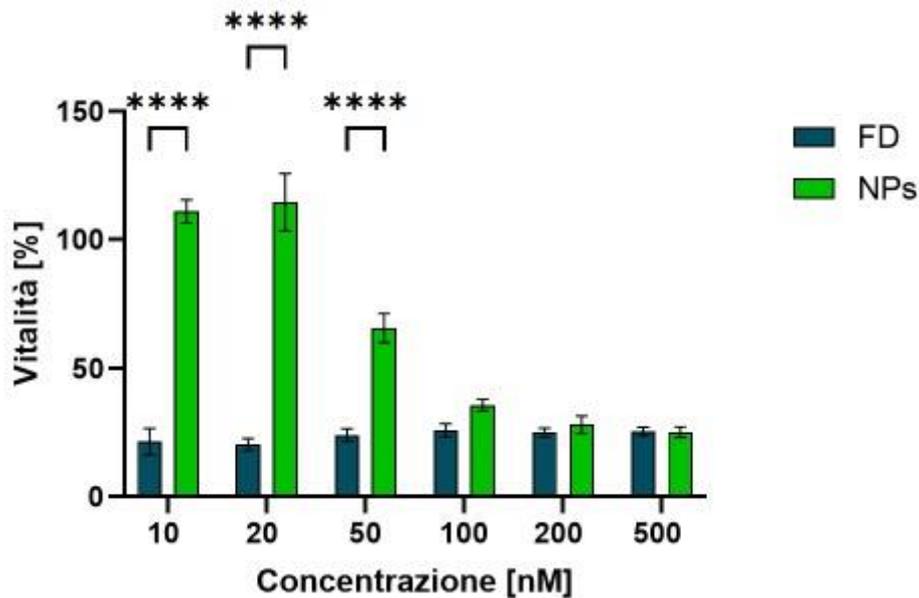


Figura 39: Risultati del saggio di vitalità ottenuti dopo 48h dalla somministrazione di BTZ e BTZ-NPs. Il test è stato eseguito su cellule HMC3 trattate con diverse concentrazioni di farmaco incapsulato e farmaco libero (n=3). I confronti multipli sono stati eseguiti utilizzando il *two-way ANOVA*. ****p<0.0001.

La Fig. 40 raccoglie le immagini acquisite dopo 48 h di incubazione delle cellule della microglia con diverse concentrazioni di BTZ e BTZ-NPs. Le differenze morfologiche tra le cellule trattate con diverse concentrazioni di BTZ libero sono praticamente impercettibili. In accordo con quanto riscontrato nei precedenti test di vitalità (in cui la riduzione della vitalità era pressoché costante alle varie concentrazioni), l'analisi qualitativa delle cellule al microscopio ha confermato che le cellule HMC3 sono quasi totalmente staccate e non vitali, indipendentemente dalla concentrazione di BTZ considerata. D'altra parte, in caso di trattamento con BTZ-NPs, questo fenomeno di perdita dell'adesione si osserva a partire dalla concentrazione di 50 nM e diventa sempre più importante all'aumentare della concentrazione. A concentrazioni più basse (10 nM e 20 nM), invece, le cellule si presentano ben adese sul fondo.

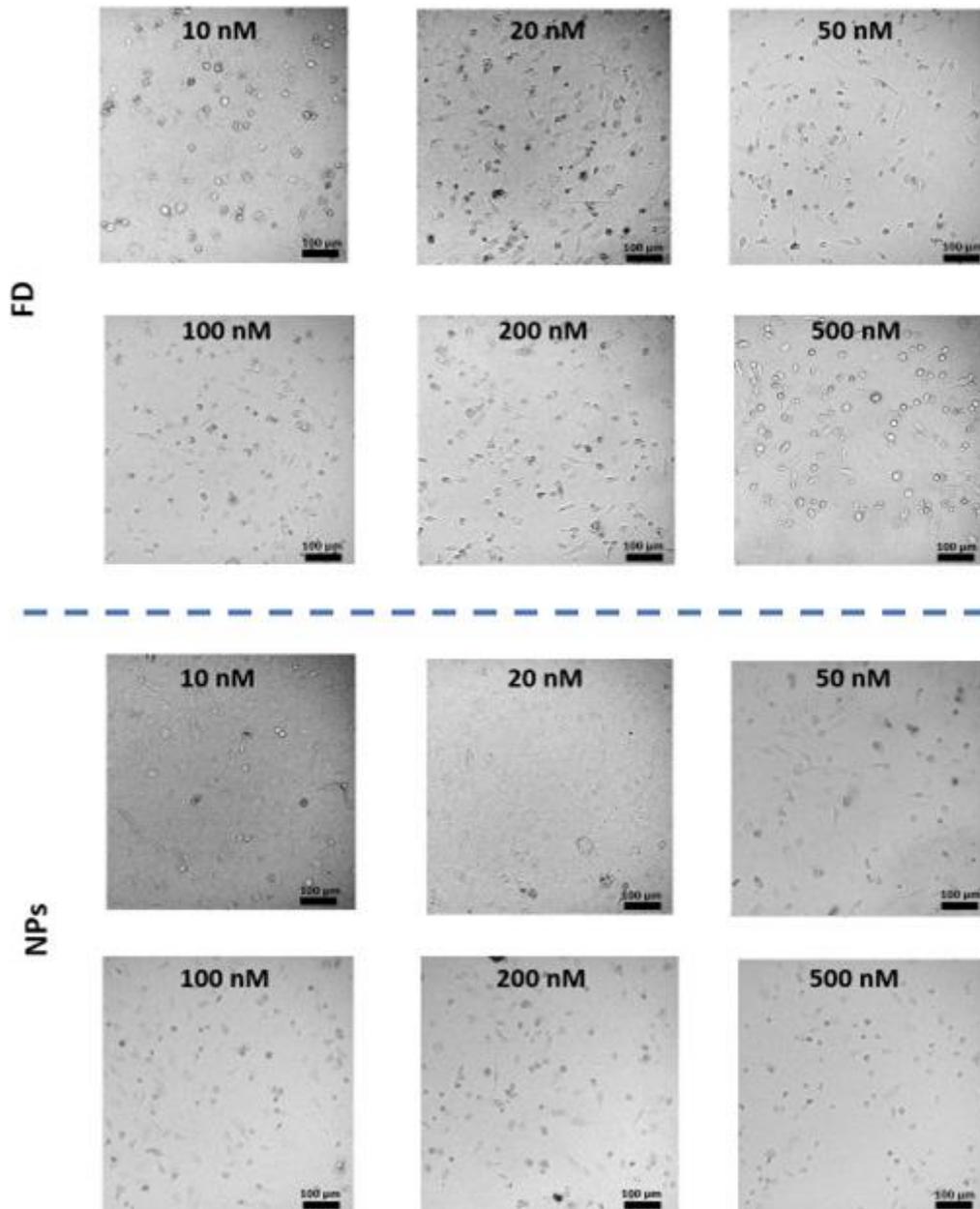


Figura 40: Immagini in campo chiaro di cellule HMC3 dopo 48h di trattamento con BTZ e BTZ-NPs. Barra di scala: 100µm.

Nel complesso, i risultati dei test su modelli bidimensionali hanno mostrato come il trattamento con BTZ libero, sebbene abbastanza efficace sulle cellule tumorali, causi anche una tossicità ancora più forte sulle cellule sane residenti nel cervello. Al contrario, il trattamento mediato con NPs permette di ridurre gli effetti citotossici sulle cellule non tumorali (e, in particolar modo, sulla microglia), garantendo comunque significativi cali di vitalità delle cellule target del GBM. Tuttavia, le colture bidimensionali rappresentano modelli semplici incapaci di replicare le complesse interazioni tra cellule e ambiente alla base dei fenomeni di resistenza al trattamento.

Pertanto, è indispensabile ricorrere a modelli tridimensionali più biomimetici, al fine di disporre di un sistema più affidabile per la valutazione dell'efficacia di trattamento.

3.4.2 Risposta degli sferoidi 3D

Per valutare l'efficacia del trattamento con BTZ-NPs sono stati effettuati dei test di vitalità su sferoidi di cellule tumorali (U251 e U87) e cellule non tumorali (HASTR e HMC3) utilizzando il saggio di vitalità *CellTiter-Glo*® 3D (Promega).

Valutazione dell'efficacia di trattamento su sferoidi tumorali

Dopo 24h dal trattamento, gli sferoidi di U251 hanno mostrato un lieve calo della vitalità nel caso di trattamento con BTZ, come si può osservare dal grafico in Fig.41. Vi sono differenze poco significative al variare della concentrazione di farmaco somministrata (variazione nel range dal 75% al 85%). L'effetto del trattamento con farmaco libero sugli sferoidi di U251 risulta ancora più limitato di quello osservato in coltura bidimensionale. A parità di concentrazione, il trattamento mediato da NPs produce cali di vitalità inferiori rispetto a quello con BTZ libero, seppure le differenze siano statisticamente significative in soli due casi.

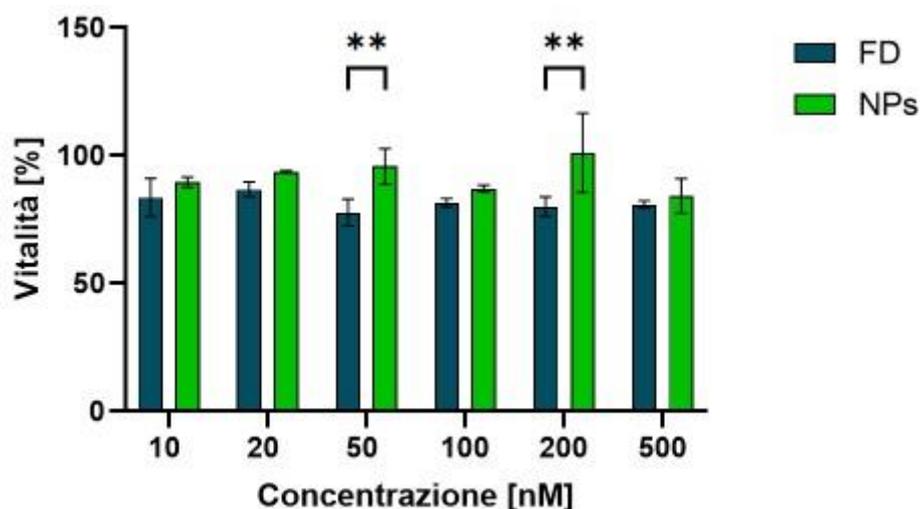


Figura 41: Risultati del saggio di vitalità ottenuti dopo 24h dalla somministrazione di BTZ e BTZ-NPs. Il test è stato eseguito su sferoidi di U251 trattati con diverse concentrazioni di farmaco incapsulato e farmaco libero (n=3). I confronti multipli sono stati eseguiti utilizzando il *two-way ANOVA*. **p<0.01.

L'effetto poco pronunciato di entrambi i trattamenti (BTZ e BTZ-NPs) è stato confermato anche analizzando le immagini ottenute al microscopio e presentate in Fig.42. In entrambi i casi si notano sferoidi ben formati e compatti, anche per concentrazioni più elevate di trattamento. L'assenza di significative variazioni di forma

o dimensione degli sferoidi dimostra nuovamente che gli hanno risentito poco dell'effetto del farmaco, che sia stato esso fornito in forma libera o incapsulato.

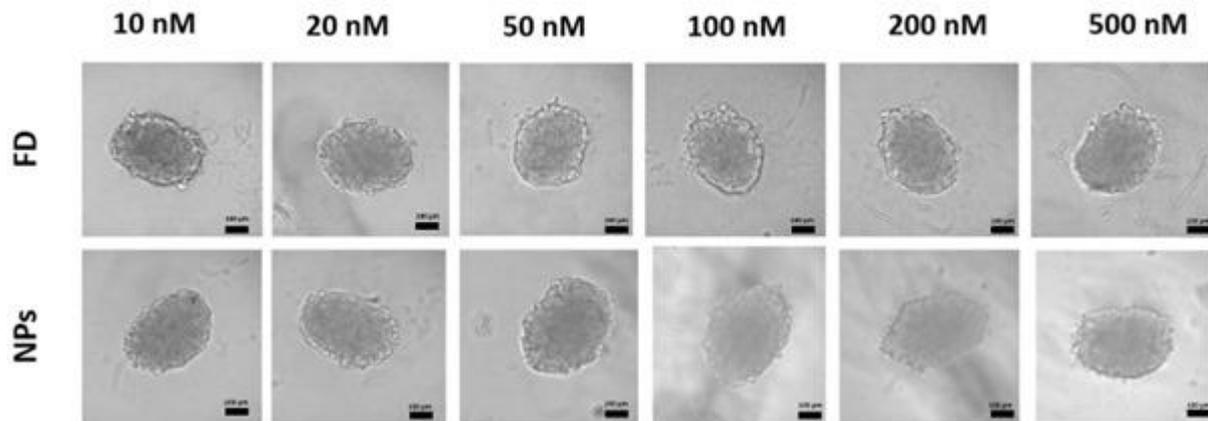


Figura 42: Immagini in campo chiaro di sferoidi di U251 dopo 24h di trattamento con BTZ e BTZ-NPs. Barra di scala: 100 µm.

L'azione antitumorale del BTZ è stata testata anche sul lungo periodo, effettuando un test di vitalità su sferoidi U251 dopo 48h dal trattamento. Come si evince dal grafico mostrato in Fig. 43, non sussistono differenze significativamente nella risposta al trattamento con BTZ libero e BTZ-NPs. Tuttavia, si osservano vitalità comparabili a quelle osservate a 24 h, senza variazioni significative al crescere della concentrazione somministrata. I risultati mostrano quindi come in questa configurazione più biomimetica l'effetto del farmaco su queste cellule tumorali risulti limitato rispetto a quanto osservato nei test bidimensionali.

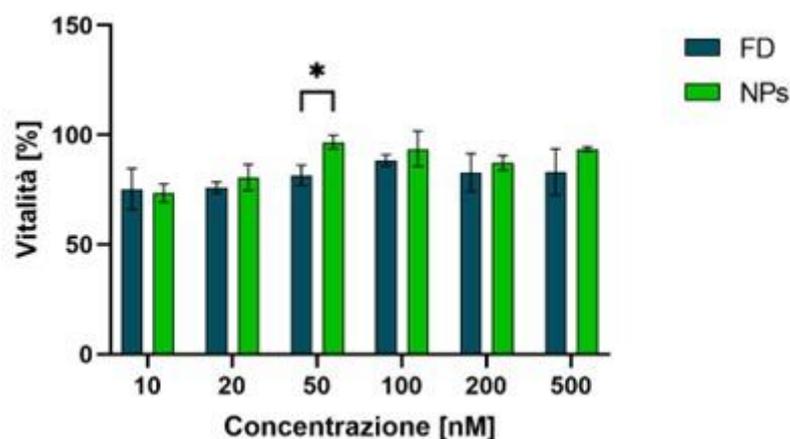


Figura 43: Risultati del saggio di vitalità ottenuti dopo 48h dalla somministrazione di BTZ e BTZ-NPs. Il test è stato eseguito su sferoidi di U251 trattati con diverse concentrazioni di farmaco incapsulato e farmaco libero (n=3). I confronti multipli sono stati eseguiti utilizzando il *two-way ANOVA*. * $p < 0.05$.

Coerentemente con i dati di vitalità raccolti, gli sferoidi dopo 48h dal trattamento (mostrati in Fig. 44) mostrano ancora una struttura consolidata e non presentano cali

di dimensioni rispetto alle 24h (Fig.40), a dimostrazione del fatto che l'effetto di entrambi i trattamenti risulta piuttosto limitato indipendentemente dalla concentrazione somministrata.

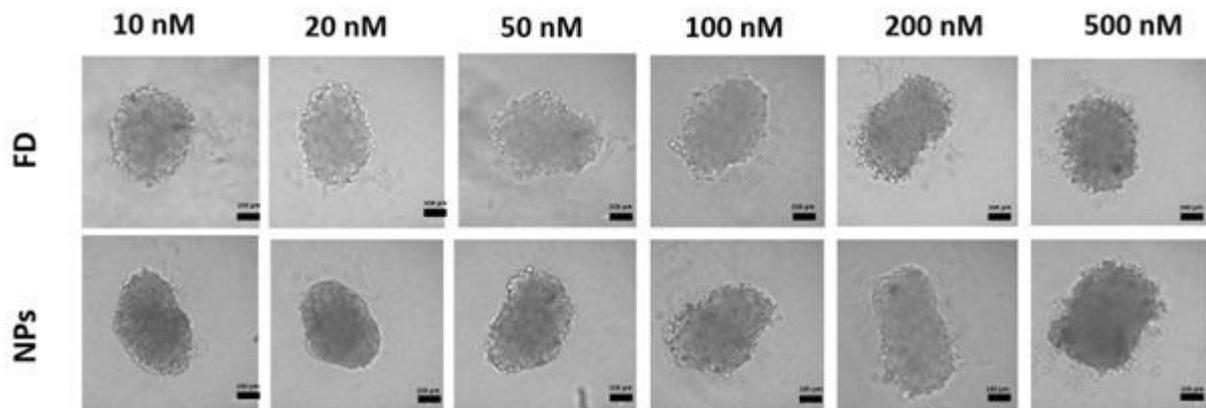


Figura 44: Sferoidi di U251 dopo 48h di trattamento con BTZ e BTZ-NPs. Barra di scala: 100 µm.

Il grafico in Fig.45 mostra come gli sferoidi di U87 risultino più sensibili al farmaco, rispetto a quelli di U251, considerando gli stessi tempi di trattamento (24h). Il calo sulla vitalità è in generale più marcato nel caso di BTZ libero rispetto al BTZ-NPs, ma non è stata individuata una tendenza coerente con l'aumento della concentrazione. Per entrambi i tipi di trattamento si osserva un picco di vitalità alla concentrazione di 20 nM. La concentrazione di trattamento più elevata, causa la riduzione di vitalità più rilevante, senza differenze significative tra farmaco libero e nanoparticelle.

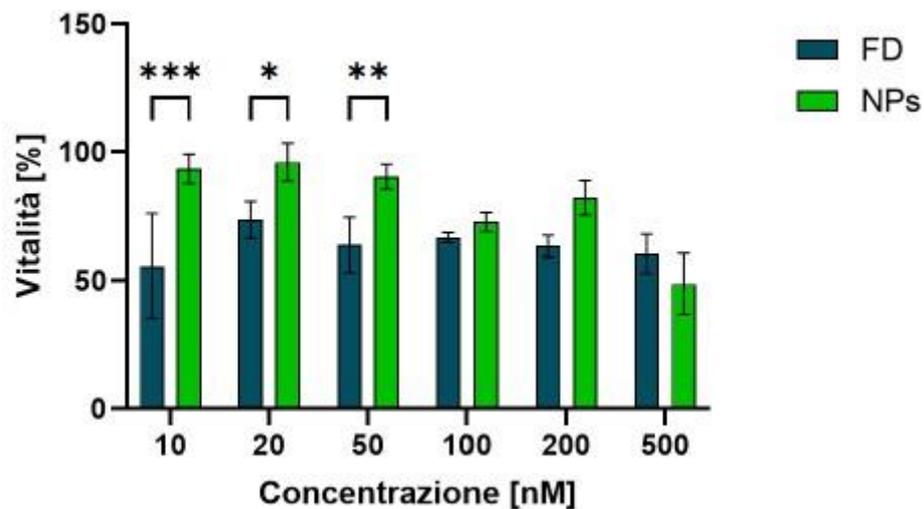


Figura 45: Risultati del saggio di vitalità ottenuti dopo 24h dalla somministrazione di BTZ e BTZ-NPs. Il test è stato eseguito su sferoidi di U87 trattati con diverse concentrazioni di farmaco incapsulato e farmaco libero (n=3). I confronti multipli sono stati eseguiti utilizzando il *two-way ANOVA*. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$.

La valutazione morfologica degli sferoidi di U87 dopo 24h di trattamento (Fig. 46) conferma che gli sferoidi rimangono tondi e compatti in tutte le condizioni. Si osserva solo una limitata disgregazione ai margini, che sembra più rilevante per la concentrazione più elevata (500 nM). Non sussistono differenze significative tra i trattamenti

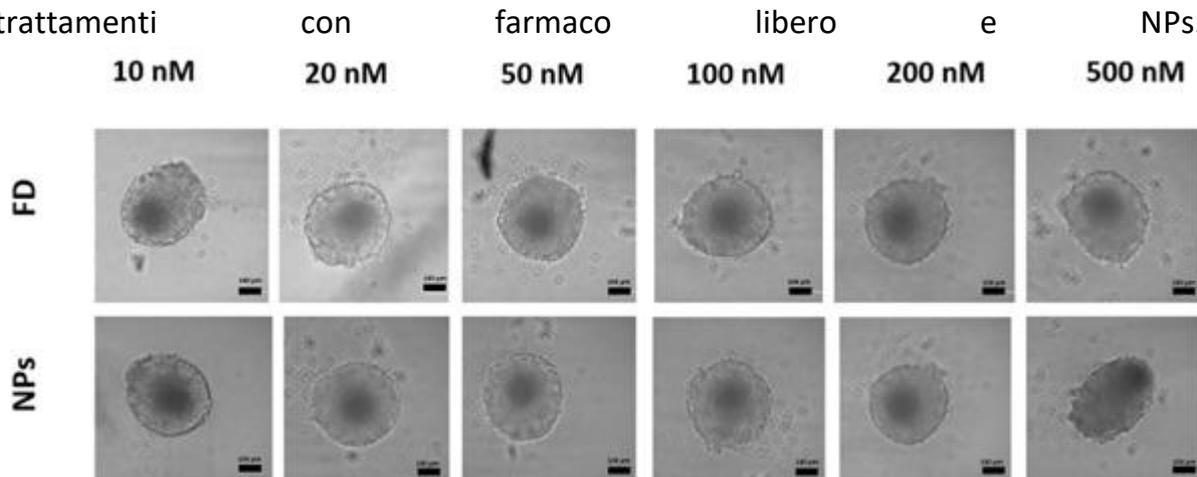


Figura 46: Immagini in campo chiaro di sferoidi di U87 dopo 24h di trattamento con BTZ e BTZ-NPs. Barra di scala: 100µm.

Al contrario di quanto osservato per gli sferoidi di U251, gli sferoidi di U87 sembrano avere una risposta migliore ai trattamenti dopo 48h. La somministrazione di BTZ e BTZ-NPs alla concentrazione più alta (500 nM) è quella che mostra un effetto maggiore sulla vitalità (in entrambi i casi minore del 30 %), senza differenze significative tra le due modalità di trattamento. Per le concentrazioni più basse, i risultati evidenziano che il BTZ libero permette di ottenere un'efficacia di trattamento maggiore rispetto alle BTZ-NPs.

Per entrambe le modalità di trattamento, l'efficacia cresce all'aumentare della concentrazione. In particolare, le NPs contenenti BTZ sembrerebbero non avere incidenza sulla vitalità se somministrate in bassa concentrazione. Tuttavia, aumentandone la quantità, si assiste anche in questo caso ad una diminuzione della vitalità percentuale piuttosto significativa al crescere della concentrazione di trattamento.

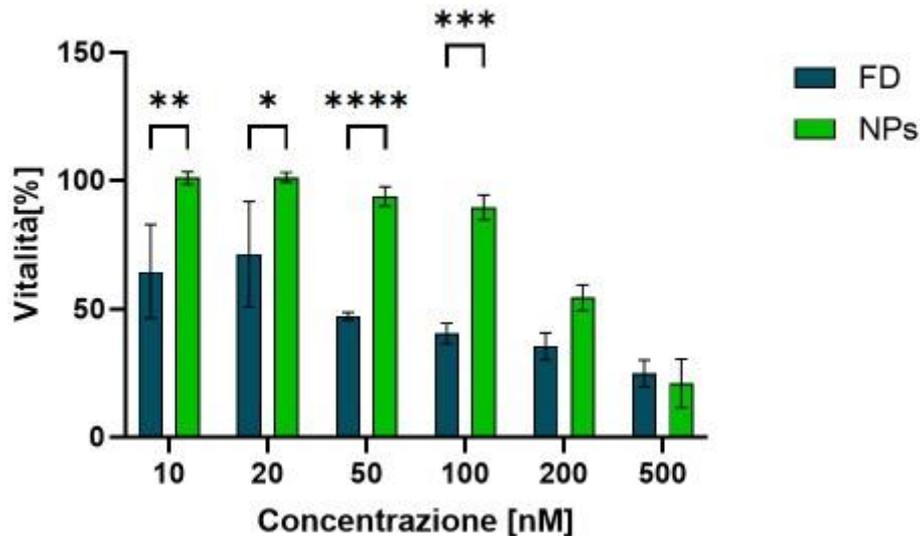


Figura 47: Risultati del saggio di vitalità ottenuti dopo 48h dalla somministrazione di BTZ e BTZ-NPs. Il test è stato eseguito su sferoidi di U87 trattati con diverse concentrazioni di farmaco incapsulato e farmaco libero (n=3). I confronti multipli sono stati eseguiti utilizzando il *two-way ANOVA*. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; **** $p < 0.0001$.

Le immagini scattate al microscopio dopo 48h di trattamento mostrano che sferoidi di U87 presentano ancora una struttura riconoscibile e abbastanza compatta. Per il trattamento con BTZ libero (a tutte le concentrazioni) o con le concentrazioni più elevate di BTZ-NPs, i margini degli sferoidi risultano più irregolari e si ha un maggior numero di cellule distaccate.

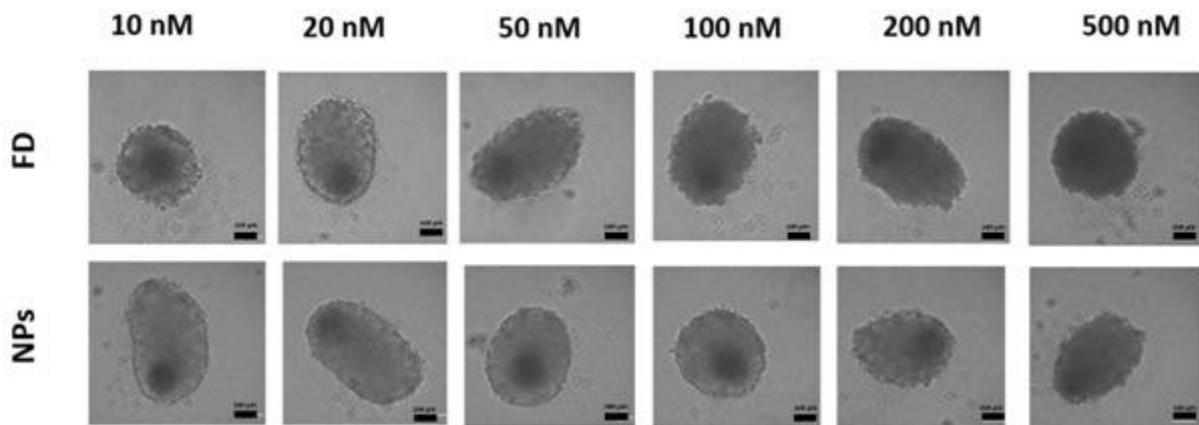


Figura 48: Immagini in campo chiaro di sferoidi di U87 dopo 48h di trattamento con BTZ e BTZ-NPs. Barra di scala: 100 μ m.

I risultati confermano come, anche in una configurazione tridimensionale, il trattamento con BTZ risulta più efficace nei confronti delle cellule U87, suggerendo che il target preferenziale della terapia potrebbe essere rappresentato dalle cellule di GBM con fenotipo neuronale. Al contrario, l'efficacia risulta molto più limitata su cellule U251, che presentano caratteristiche simili alle cellule tumorali con fenotipo

mesenchimale. Inoltre, il trattamento con BTZ-NPs è efficace nel ridurre la vitalità delle cellule tumorali, sebbene produca una risposta più contenuta a concentrazioni più basse. Queste differenze, presumibilmente dovute alla cinetica di rilascio del BTZ e alla limitata penetrazione delle NPs nello sferoide, dovranno essere ulteriormente investigate in futuro.

Valutazione dell'efficacia di trattamento su cellule non tumorali

L'analisi della vitalità effettuata su sferoidi di HASTR dopo 24h dal trattamento (Fig. 49) ha permesso di constatare che, anche in questo caso, l'effetto citotossico è maggiore nel caso di trattamento con farmaco libero, che produce un effetto maggiore al crescere della concentrazione somministrata. In particolare, la vitalità cala dal 72% per il trattamento con BTZ 10 nM al 41% per la concentrazione più elevata (500 nM). Al contrario, il trattamento con concentrazioni basse di NPs non si osservano cali di vitalità rispetto al controllo non trattata. L'utilizzo di nanoparticelle sembrerebbe quindi limitare la tossicità del farmaco per questi tempi di incubazione. Tuttavia, somministrando BTZ-NPs alla concentrazione di 200 nM e 500 nM, le differenze con il trattamento con farmaco libero non risultano significative, sebbene il valor medio delle vitalità risulti comunque superiore.

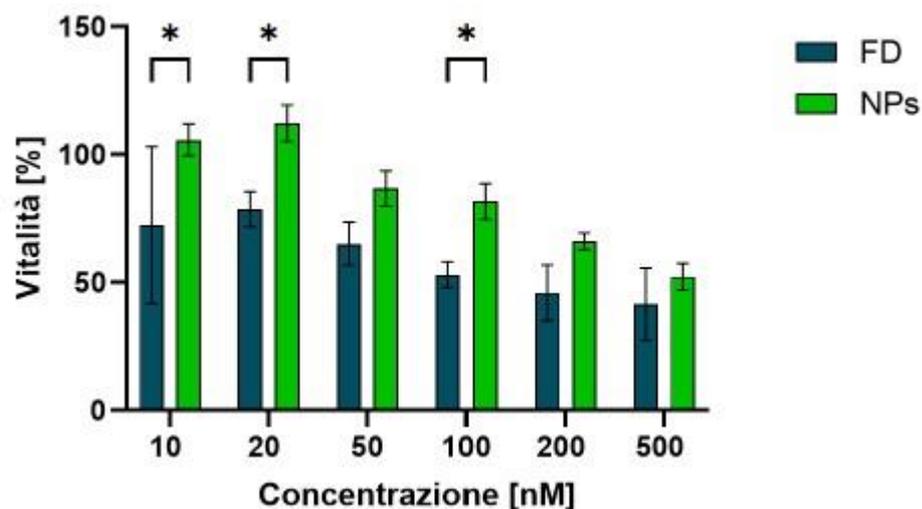


Figura 49: Risultati del saggio di vitalità ottenuti dopo 24h dalla somministrazione di BTZ e BTZ-NPs. Il test è stato eseguito su sferoidi di HASTR trattati con diverse concentrazioni di farmaco incapsulato e farmaco libero (n=3). I confronti multipli sono stati eseguiti utilizzando il *two-way ANOVA*. *p<0.05.

Come è possibile notare dalle immagini in campo chiaro riportate in Fig. 50, l'effetto citotossico del BTZ produce una marcata disgregazione degli sferoidi di HASTR, particolarmente evidente per concentrazioni di trattamento più elevate. Gli sferoidi perdono la caratteristica forma tondeggianti e compatta e assumono forme irregolari. Tale fenomeno è meno marcato nel caso di trattamento con BTZ-NPs, a parità di concentrazione. In particolare, si osserva un significativo tasso di disgregazione solo

per concentrazioni di trattamento più elevate. Al contrario, per concentrazioni inferiori di BTZ-NPs, gli sferoidi mantengono una forma quasi sferica, con una limitata perdita di compattezza ai margini.

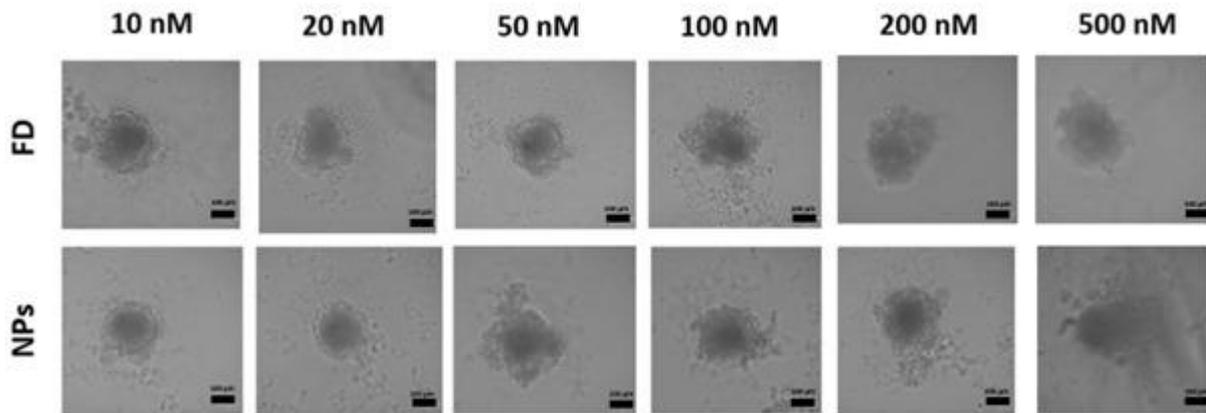


Figura 50: Immagini in campo chiaro di sferoidi di HASTR dopo 24h di trattamento con BTZ e BTZ-NPs. Barra di scala: 100 μ m.

Il trattamento con farmaco libero, prolungato per 48h, ha portato ad una significativa diminuzione della vitalità degli sferoidi di HASTR (Fig. 51). Solo per il trattamento con la concentrazione più bassa (10 nM) di farmaco libero si è osservato un 50% di sopravvivenza degli sferoidi, mentre, per le restanti concentrazioni, il calo di vitalità è drastico e proporzionale con l'aumento di concentrazione. L'incapsulamento del BTZ in NPs consente di limitare notevolmente la risposta da parte degli sferoidi di HASTR, soprattutto per basse concentrazioni. Come mostrato in figura, gli sferoidi di HASTR sono poco sensibili alle concentrazioni di BTZ-NPs più basse (10 nM e 20 nM), per le quali la vitalità è prossima al 100%. Alla concentrazione di 50 nM si inizia ad osservare una limitata riduzione della vitalità (82%). La vitalità cellulare che diminuisce ulteriormente per concentrazioni crescenti, fino a produrre un effetto analogo al farmaco libero (vitalità prossime al 2% per entrambi i trattamenti alla concentrazione 500 nM).

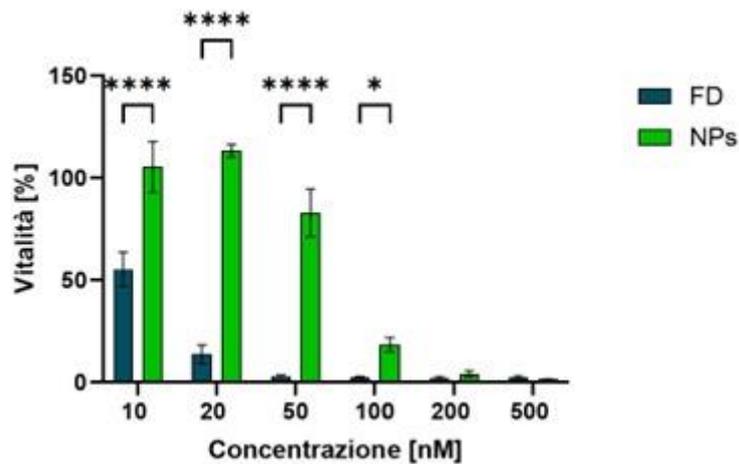


Figura 51: Risultati del saggio di vitalità ottenuti dopo 48h dalla somministrazione di BTZ e BTZ-NPs. Il test è stato eseguito su sferoidi di HASTR trattati con diverse concentrazioni di farmaco incapsulato e farmaco libero (n=3). I confronti multipli sono stati eseguiti utilizzando il *two-way ANOVA*. * $p < 0.05$; **** $p < 0.0001$.

Come riportato in Fig. 52, gli sferoidi di HASTR appaiono molto disaggregati dopo 48h, in maniera ancora più evidente di quanto osservato al *time point* precedente. Nonostante le differenze osservate nei livelli di vitalità cellulare, non si notano significative variazioni morfologiche a seconda della concentrazione o della tipologia di trattamento.

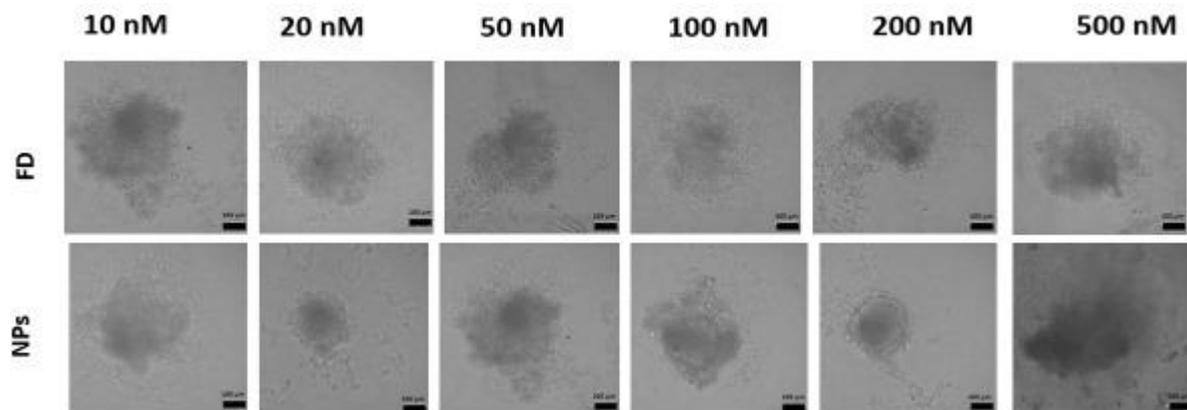


Figura 52: Immagini in campo chiaro di sferoidi di HASTR dopo 48h di trattamento con BTZ e BTZ-NPs. Barra di scala: 100 μ m.

I dati di vitalità dopo 24h di trattamento relativi agli sferoidi di HMC3 sono rappresentati in figura 53. Come osservato per gli astrociti, il calo della vitalità è più rilevante all'aumentare della concentrazione di trattamento. Per concentrazioni più basse si riscontra un calo di vitalità ridotto sia per il trattamento con farmaco libero (vitalità intorno al 75%) che per il trattamento con farmaco incapsulato. L'utilizzo di nanoparticelle, inoltre, permette di limitare completamente la tossicità del farmaco per concentrazioni fino a 50 nM, per le quali si registra un valore di vitalità prossimo

al 100%. All'aumentare ulteriore della concentrazione la vitalità decresce, anche se rimane comunque maggiore rispetto a quella osservata somministrando concentrazioni equivalenti di farmaco libero.

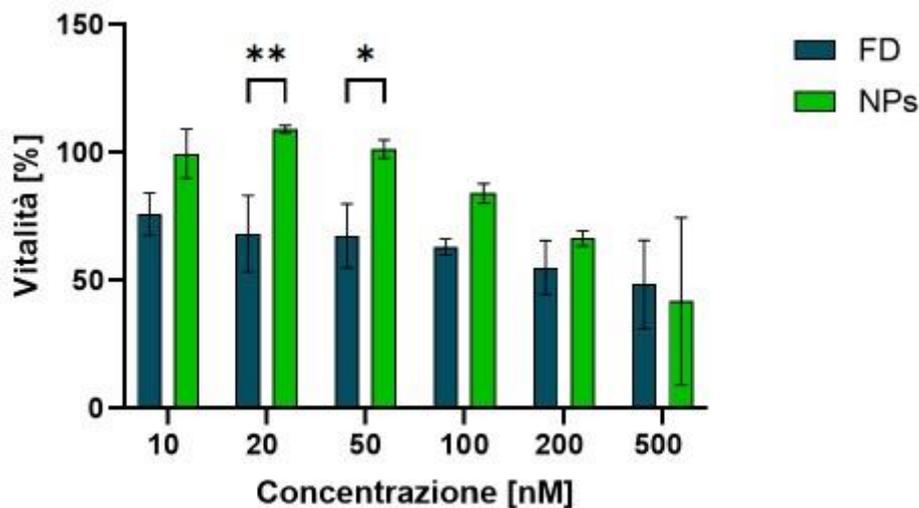


Figura 53: Risultati del saggio di vitalità ottenuti dopo 24h dalla somministrazione di BTZ e BTZ-NPs. Il test è stato eseguito su sferoidi di HMC3 trattati con diverse concentrazioni di farmaco incapsulato e farmaco libero (n=3). I confronti multipli sono stati eseguiti utilizzando il *two-way ANOVA*. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$.

Le immagini ottenute sugli sferoidi di HMC3 dopo 24h di trattamento con farmaco libero e farmaco incapsulato (Fig.54) mostrano delle tendenze coerenti con i dati di vitalità precedentemente rilevati. In particolare, il trattamento con farmaco libero induce la disgregazione degli sferoidi, per i quali non è possibile delineare precisamente i contorni e individuare differenze in relazione alla concentrazione. Il trattamento con farmaco incapsulato mostra, invece, differenze importanti relative alla forma degli sferoidi, in quanto per basse concentrazioni (10 nM e 20 nM) gli sferoidi di HMC3 risultano essere ben definiti e compatti, a differenza degli sferoidi trattati con concentrazioni maggiori per i quali emerge un leggero disgregamento.

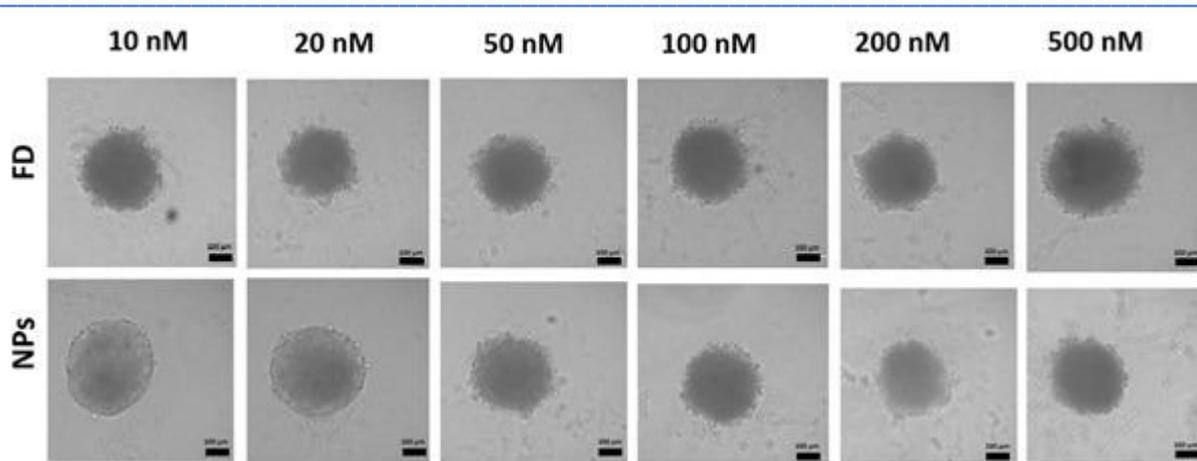


Figura 54: Immagini in campo chiaro di sferoidi di HMC3 dopo 24h di trattamento con BTZ e BTZ-NPs. Barra di scala: 100µm.

Analizzando i dati di vitalità ottenuti dopo 48h (Fig.55) è possibile notare l'effetto significativo che il trattamento con farmaco libero ha avuto sulla vitalità degli sferoidi di HMC3, tale da preservare solo una minima percentuale di cellule già a partire dalla concentrazione di 20 nM. Alle concentrazioni più alte (200 nM e 500 nM) le due tipologie di trattamento risultano completamente equivalenti in termini di effetto sulla vitalità, che inferiore al 5%. Al contrario, alle concentrazioni più basse (10 nM e 20 nM), il trattamento con nanoparticelle permette di limitare notevolmente la tossicità del farmaco, con valori di vitalità registrati prossimi al 100 %.

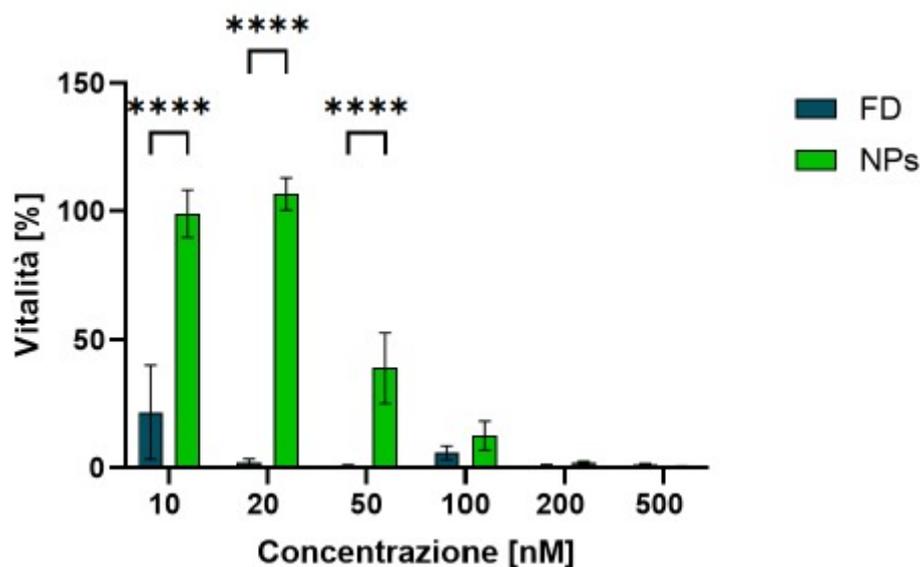


Figura 55: Risultati del saggio di vitalità ottenuti dopo 48h dalla somministrazione di BTZ e BTZ-NPs. Il test è stato eseguito su sferoidi di HMC3 trattati con diverse concentrazioni di farmaco incapsulato e farmaco libero (n=3). I confronti multipli sono stati eseguiti utilizzando il *two-way ANOVA*. ****p<0.0001.

A questa riduzione sostanziale della vitalità è associata una significativa disgregazione degli sferoidi, come osservabile dalla Fig. 56. Gli unici casi in cui gli sferoidi sembrano mantenere un certo grado di compattezza è quello relativo al trattamento con concentrazioni basse di BTZ-NPs, per i quali la vitalità è rimasta invariata.

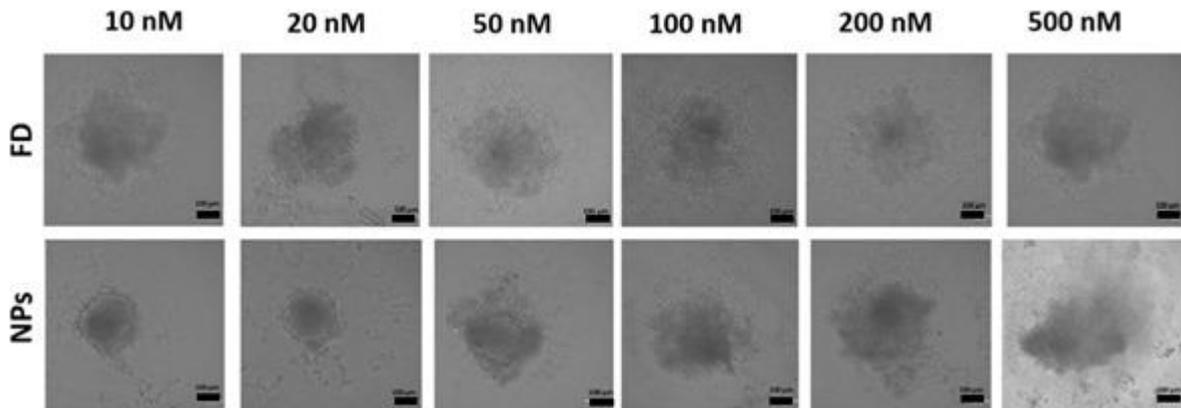


Figura 56: Sferoidi di HMC3 dopo 24h di trattamento con BTZ e BTZ-NPs. Barra di scala: 100µm.

L'utilizzo di NPs sembra quindi limitare l'effetto citotossico del farmaco su astrociti e microglia principalmente per concentrazioni basse e tempi di somministrazione brevi. Poiché in queste condizioni anche l'effetto del trattamento sulle cellule tumorali risulta limitato. Pertanto, in futuro potrebbe essere necessario sviluppare ulteriori modifiche alle NPs per garantire un *targeting* attivo più selettivo.

3.5 Valutazione del ruolo della ECM nella risposta al trattamento

3.5.1. Valutazione dell'efficacia di trattamento in gel di collagene

Gli sferoidi tumorali costituiti da sole cellule U87 o dalla composizione *Tumour Mix* (cellule U87-GFP e GBM-8-GFP, in rapporto 90:10) sono stati incorporati in una matrice idrogel a base di collagene-I, per valutare il ruolo della ECM del GBM nella risposta al trattamento farmacologico con BTZ e BTZ-NPs. Infatti, il collagene è una proteina normalmente poco presente nel cervello sano, ma che risulta sovraespressa nella ECM del GBM, dove svolge un ruolo chiave nella progressione tumorale. [77]

Il grafico in figura 29 sintetizza i dati sulla capacità di invasione degli sferoidi nei gel a seguito del trattamento, ottenuti acquisendo immagini ogni 24h per quattro giorni

Gli sferoidi U87 non trattati hanno mostrato una forte tendenza nel tempo ad invadere l'idrogel di collagene, occupando dopo 4 giorni un'area 8 volte superiore rispetto all'area occupata inizialmente (Fig. 57 a). Stesso comportamento è attribuibile agli sferoidi TM non trattati in collagene, anche se leggermente meno marcato (Fig.57 b). D'altra parte, il trattamento con concentrazioni crescenti di BTZ ha portato a una riduzione dell'invasione cellulare sia nel caso di sferoidi di U87 che di sferoidi TM per i quali, in particolare si è osservata una riduzione nel tempo proporzionale alla concentrazione di trattamento.

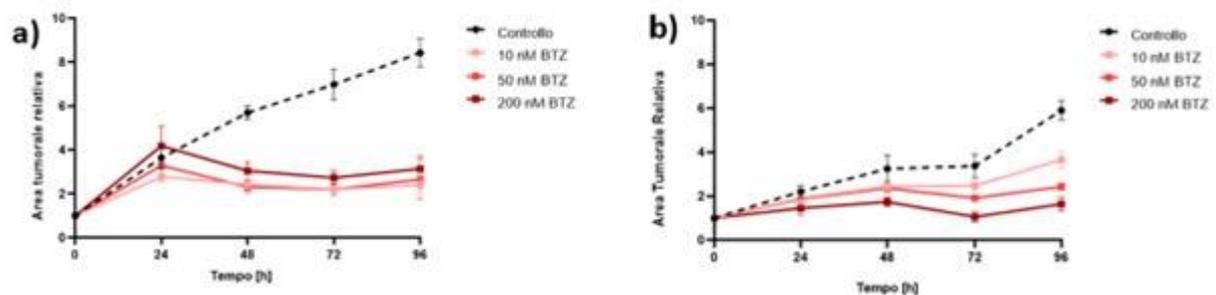


Figura 57: Area tumorale relativa post trattamento con concentrazioni crescenti di BTZ relativa a: a) sferoidi di U87; b) sferoidi TM.

In generale è stato osservato che il trattamento con BTZ, indipendentemente dalla concentrazione, riduce la capacità di infiltrazione delle cellule tumorali nel gel di collagene. Al contrario, le concentrazioni più basse risultano meno efficaci nel ridurre l'area di infiltrazione degli sferoidi TM, suggerendo che la presenza delle cellule staminali tumorali di GBM (GSCs) possa indurre fenomeni di chemioresistenza simili a quelli osservati diversi studi *in vivo*. [71]

È stato ampiamente dimostrato che il sistema di microglia e macrofagi associati al GBM (GAMMs) è positivamente correlato all'invasività del GBM, all'immunosoppressione e alla prognosi sfavorevole dei pazienti. [21]

Per questo motivo, è stato investigato l'influenza che le cellule microgliali esercitano sull'invasione tumorale e sulla risposta al trattamento con BTZ su sferoidi di sole cellule U87 immersi in gel a base di collagene-I. Come evidente dai grafici mostrati in figura 58, la presenza delle HMC3 (Fig.58b) non ha influenzato la risposta al BTZ in quanto non sono state registrate differenze significative in termini di area di infiltrazione delle cellule tumorali nel gel a parità di concentrazione di trattamento.

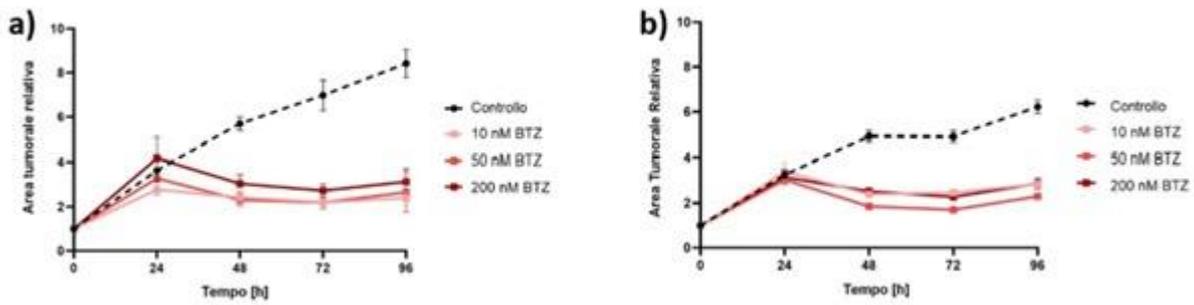


Figura 58: Area tumorale relativa post trattamento con concentrazioni crescenti di BTZ relativa a: a) sferoidi di U87; b) sferoidi di U87 + HMC3

Le cellule della microglia, quindi, sembrerebbero non influenzare l'efficacia del trattamento sugli sferoidi di U87 in gel. Tuttavia, è stato possibile verificare che tali cellule risultano fortemente suscettibili al trattamento con il BTZ libero. L'acquisizione di immagini al microscopio ha permesso di valutare qualitativamente l'effetto del farmaco libero sulle HMC3 presenti nel gel. Come si può notare dalle immagini raccolte in Fig. 59, all'aumentare della concentrazione di trattamento con farmaco libero è associata una riduzione del numero di cellule HMC3 presenti nel gel. L'effetto è tanto più evidente quanto maggiore è la concentrazione di BTZ somministrata. Questa evidenza conferma che il trattamento con il farmaco libero può rappresentare una fonte di tossicità per le cellule residenti in prossimità del GBM, a meno che non vengano usati opportuni sistemi di rilascio controllato.

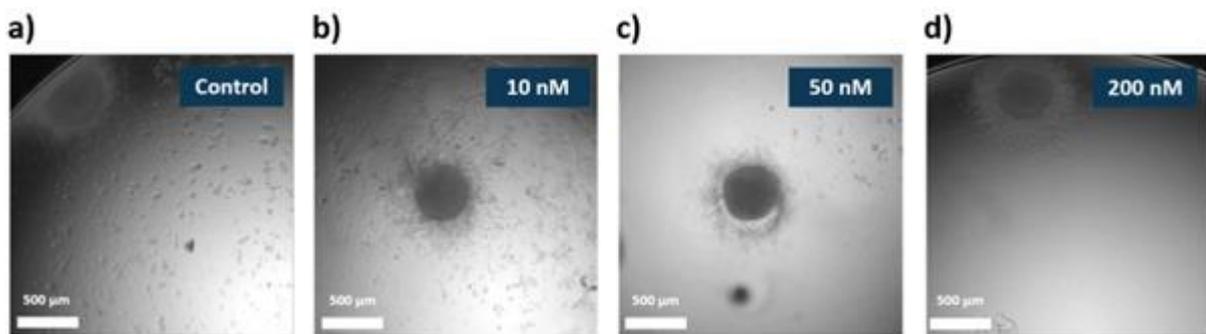


Figura 59: Immagini relative a sferoidi di U87 in gel di collagene-I con HMC3 in diverse condizioni di trattamento: a) Controllo, non trattato; b) BTZ 10 nM; c) BTZ 50 nM; d) BTZ 200 nM. Barra di scala: 500 µm.

È stato quindi confrontata l'efficacia di trattamento con uguali concentrazioni di BTZ e BTZ-NPs somministrati a sferoidi TM, incapsulati in gel a base di collagene con e senza cellule della microglia. La Figura 60 mostra l'area di invasione degli sferoidi TM nel gel di collagene (normalizzati rispetto all'area iniziale) dopo i diversi trattamenti.

Come mostrato nella Figura 60a e 60c, tutti i trattamenti con il farmaco libero hanno comportato una riduzione dell'area di invasione dello sferoide, proporzionale alla

concentrazione di BTZ somministrata. L'effetto maggiore si ottiene con le concentrazioni più alte di trattamento con BTZ, che consente di ridurre l'area di infiltrazione di 6 volte rispetto a quella del controllo. Nel caso di trattamento con BTZ-NPs, solo la concentrazione più elevata consente di raggiungere un effetto paragonabile al farmaco libero (sia in presenza che in assenza di microglia), come è osservabile dalle Fig. 60b e 60d.

È interessante notare che anche in questo caso la presenza delle HMC3 non influenza l'invasione tumorale in presenza di trattamento. Tuttavia, in presenza di cellule HMC3, il controllo non trattato raggiunge un'area di invasione di circa 6 volte superiore al valore iniziale già dopo 48h (Figura 60a), condizione che viene raggiunta invece in assenza di HMC3 dopo 96h (Figura 60c). Questa evidenza suggerisce che possano sussistere meccanismi di *crossstalk* tra le cellule della microglia e le cellule staminali tumorali che supportano i processi di invasione tumorale.[78]

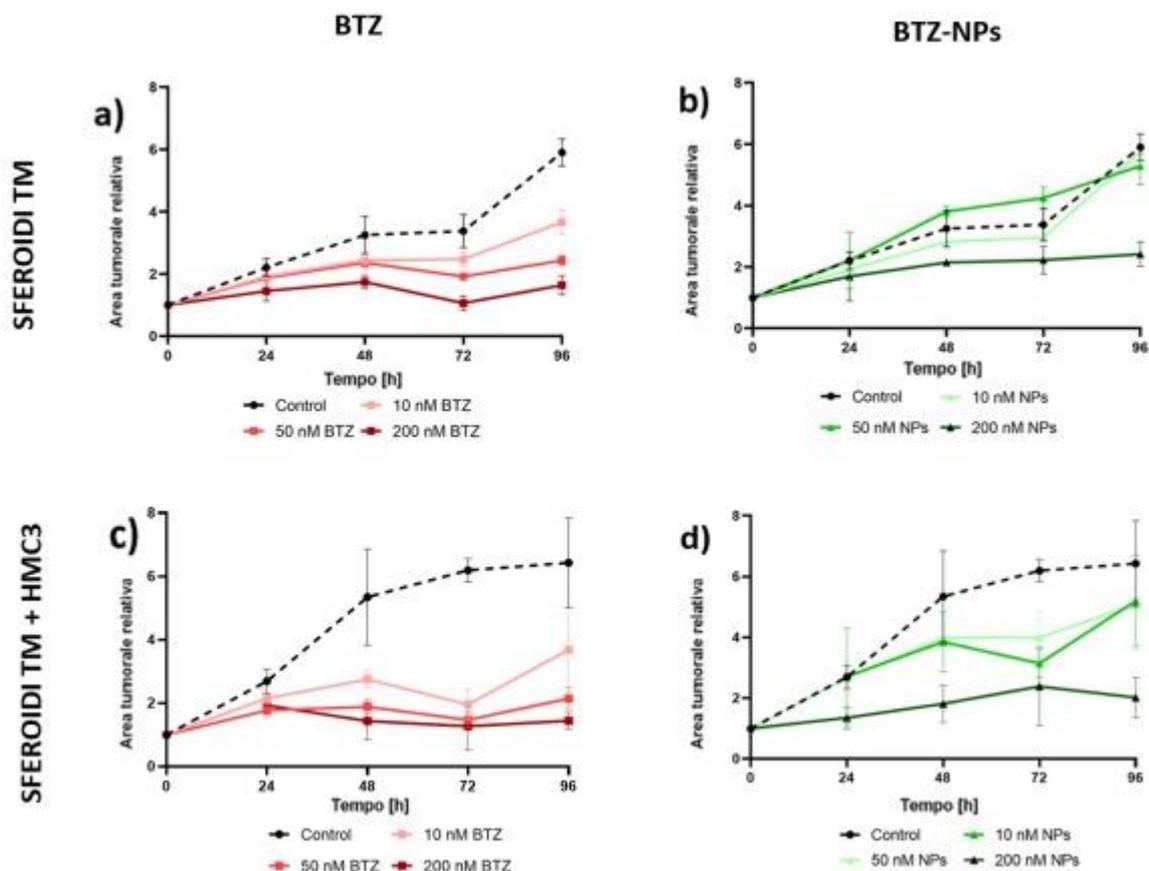


Figura 60: Area tumorale relativa post trattamento con concentrazioni crescenti di BTZ e BTZ-NPs relativa a sferoidi TM in presenza e assenza di HMC3.

La figura 61 riporta la vitalità cellulare degli sferoidi TM in assenza di HMC3 (Fig. 61 a) e in presenza di HMC3 (Fig.61 b), valutata in funzione dell'intensità di fluorescenza delle cellule tumorali (U87-GFP e GBM-8-GFP), a seguito del trattamento con BTZ e

BTZ-NPs. Complessivamente, l'intensità di fluorescenza percentuale decresce nel tempo e rispetto al controllo per entrambi i casi studiati, ad eccezione del trattamento BTZ-NPs alla concentrazione di 50 nM in assenza di HMC3. A parità di concentrazione, il trattamento con farmaco libero ha una maggiore influenza sulla vitalità degli sferoidi TM, mentre solo la concentrazione più elevata di NPs (200 nM) provoca una risposta comparabile a quella ottenuta con la minor concentrazione di farmaco libero (10nM). Inoltre, dal confronto sembrerebbe che l'introduzione delle cellule HMC3 nel gel non abbia influito negativamente sull'efficacia di trattamento.

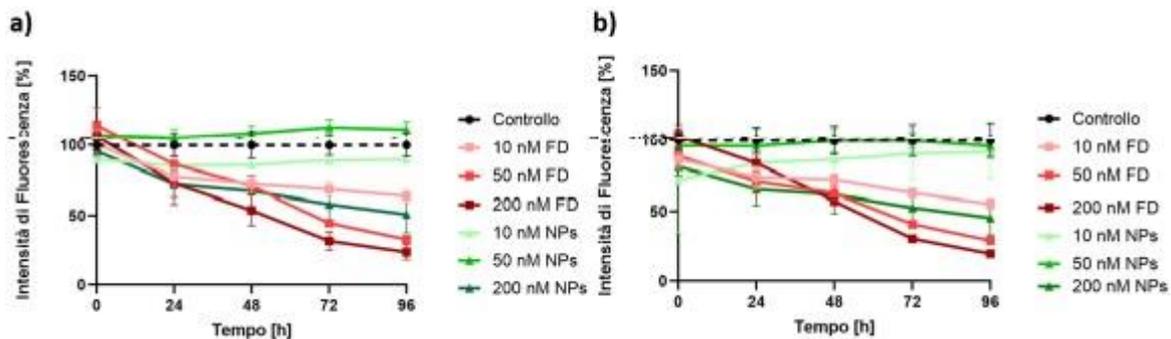


Figura 61: Intensità di fluorescenza di sferoidi Tumor Mix incorporati in gel di collagene dopo il trattamento con BTZ e BTZ-NPs a diverse concentrazioni (10, 50, 200 nM) per 96 ore di osservazione a) senza HMC3; b) con HMC3.

In entrambe le tipologie di trattamento (BTZ e BTZ-NPs), l'effetto maggiore sulla vitalità si riscontra nel caso di concentrazione più alta (200 nM). Nella Figura 62 sono mostrate immagini relative a sferoidi di tipo TM in gel di collagene con HMC3, trattati con farmaco libero e incapsulato alla concentrazione di 200 nM. Dal confronto con il controllo non trattato si osserva una riduzione significativa delle dimensioni dello sferoide TM per entrambi i trattamenti, anche se più contenuta nel caso di trattamento con BTZ-NPs. D'altra parte, però, è evidente come il farmaco libero abbia un forte effetto citotossico anche sulle cellule della microglia, mentre il trattamento mediato da NPs non sembra causare effetti collaterali. Pertanto, si può ipotizzare che l'utilizzo di NPs per il rilascio controllato di BTZ sembrerebbe essere una strategia valida per limitare la tossicità del farmaco sulle cellule residenti del cervello, senza compromettere in maniera significativa l'efficacia di trattamento.

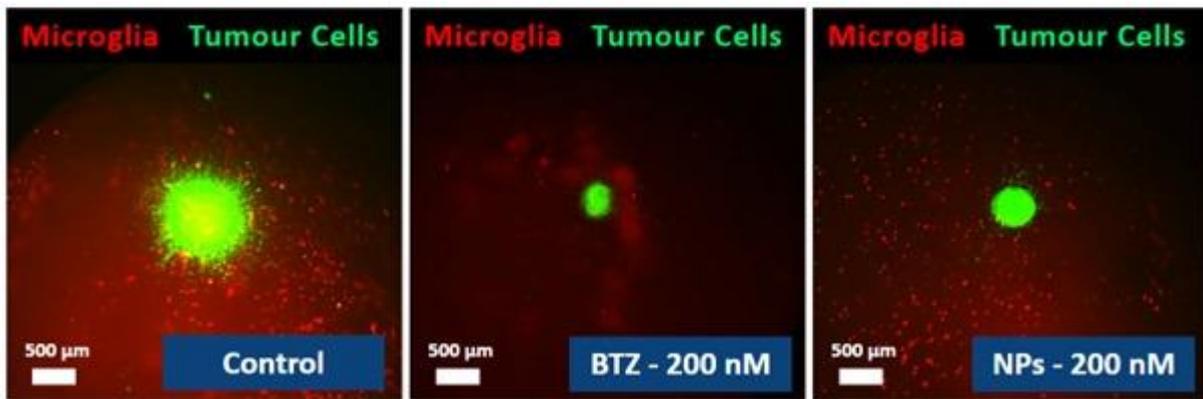


Figura 62: Sferoidi TM in gel di collagene-I con HMC3 trattati con BTZ e BTZ-NPs alla concentrazione di 200 nM. Le cellule HMC3, marcate con *Vybrant™ Dil Cell-Labeling Solution*, sono rappresentate in rosso, mentre le cellule U87 e GBM-8 (marcate con GFP) sono evidenziate in verde. Barra di scala 500 µm.

3.5.2 Valutazione dell'influenza della rigidità del gel sull'infiltrazione degli sferoidi

Per ricreare un modello 3D del GBM più simile alla realtà, gli sferoidi TM sono stati incorporati in un gel, VitroGel® 3D hydrogel, a base di polisaccaridi. Infatti, i polisaccaridi presenti nella ECM del GBM, come i glicosamminoglicani (GAG), sono tra i responsabili dell'elevato modulo elastico del tessuto tumorale.

Preliminarmente, è stato valutato come la realizzazione di VitroGel® 3D a diverse concentrazioni (1:3; 1:5,1:10; 1:20) potesse influire sulla capacità di infiltrazione degli sferoidi tumorali. Sono state perciò ottenute immagini nel tempo (24h/48h/72h/96h) mostrate in Figura 63.

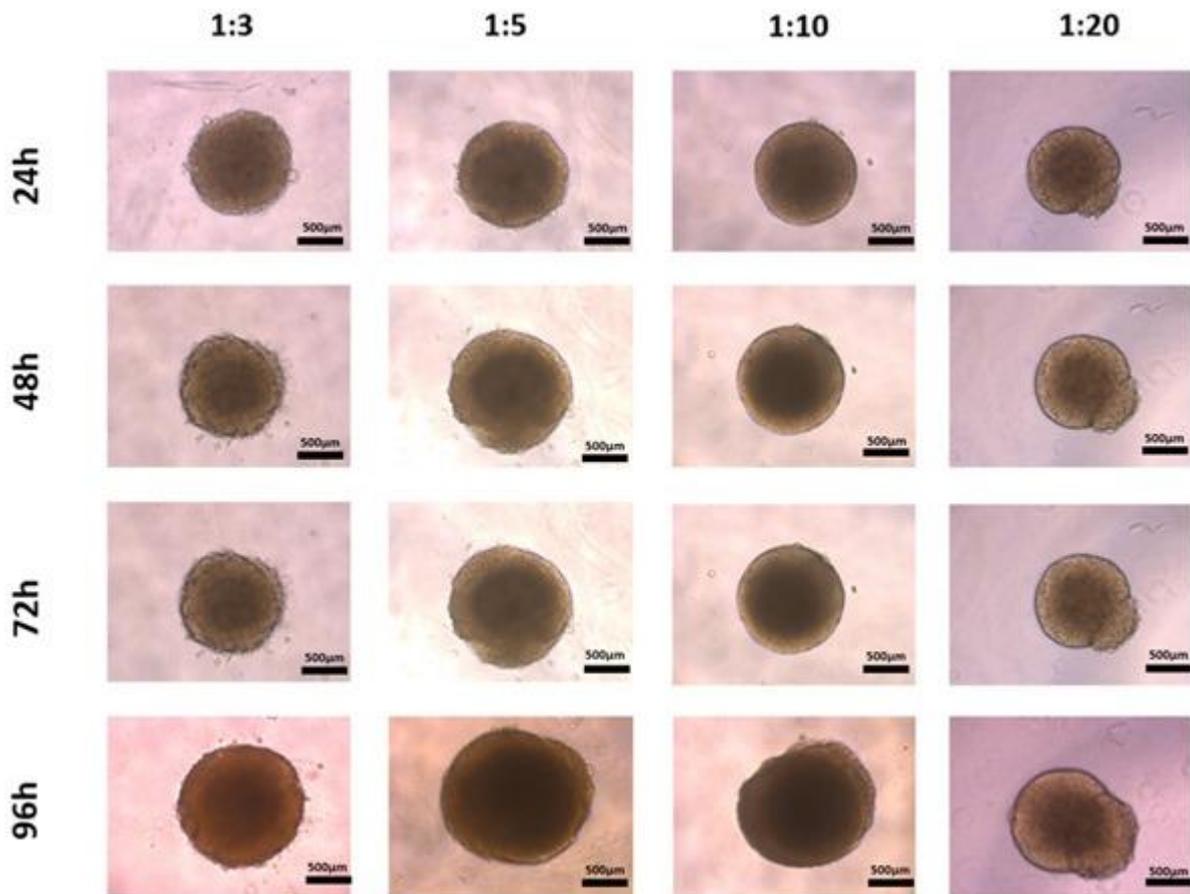


Figura 63: Immagini di sferoidi TM in VitroGel® 3D a diverse concentrazioni (1:3; 1:5; 1:10; 1:20) ottenute con microscopio ottico a quattro *time point* (24h; 48h; 72h; 96h). Barra di scala: 500 µm.

È stato osservato che, nel caso di sferoidi immersi in VitroGel® 3D alle concentrazioni più alte (1:3 e 1:5), la forma degli sferoidi è rimasta pressoché invariata nel tempo ad evidenza del fatto che la rigidezza del gel contribuisce al mantenimento della compattazione dello sferoide.

D'altra parte, leggeri cambiamenti nella forma degli sferoidi sono stati osservati per le due concentrazioni più basse (1:10 e 1:20).

In generale, per tutte le concentrazioni esaminate, non sono stati osservati fenomeni di infiltrazione del gel, in conformità con quanto osservato da altri studi sullo stesso materiale.[79] Questi risultati, probabilmente dovuti alla maggiore rigidezza del VitroGel rispetto al collagene e all'assenza di funzionalità adesive, confermano l'effetto della rigidezza e della composizione della matrice sul comportamento degli sferoidi tumorali.

3.5.3. Valutazione del ruolo della rigidità nella risposta al trattamento

L'influenza della rigidità della matrice extracellulare nella risposta al trattamento è stata valutata confrontando i valori percentuali di intensità di fluorescenza [%] ottenuti nel caso di sferoidi TM immersi in gel di collagene e in VitroGel in assenza di HMC3.

La Figura 64.a, relativa al caso di sferoidi TM immersi in collagene, mostra come tutti i trattamenti con il farmaco libero hanno comportato una significativa riduzione dell'intensità della fluorescenza, proporzionale alla concentrazione di BTZ somministrata. Lo stesso effetto, anche se meno marcato, è stato osservato in caso di farmaco incapsulato (BTZ-NPs) tranne che per la concentrazione di 50 nM, per la quale si osserva un comportamento confrontabile con quello del controllo non trattato. Si può quindi supporre che le NPs diffondano con maggiore difficoltà rispetto al farmaco libero attraverso la matrice di gel di collagene.

La Figura 64.b mostra, invece, gli andamenti di intensità di fluorescenza percentuale relativa agli sferoidi TM in VitroGel. Complessivamente, la presenza di un gel più rigido influisce negativamente sull'efficacia del trattamento sugli sferoidi TM. Infatti, si hanno effetti significativi solamente dopo diversi giorni di trattamento (96h) alle concentrazioni più alte di farmaco libero. Tuttavia, anche in questo caso, il calo di vitalità risulta molto più contenuto rispetto a quello rilevato per sferoidi in gel di collagene, suggerendo che la rigidità della matrice possa influenzare i fenomeni di resistenza al trattamento.

Inoltre, il trattamento con BTZ-NPs sembrerebbe non dare nessun effetto sulla vitalità degli sferoidi, confermando che la rigidità della matrice può rappresentare un'importante barriera per la diffusione e l'infiltrazione delle NPs. Pertanto, risulta indispensabile sviluppare sistemi di trasporto che possano incrementare la capacità di penetrazione delle particelle, ad esempio sfruttando la capacità di alcune cellule di migrare e degradare anche matrici rigide.[80]

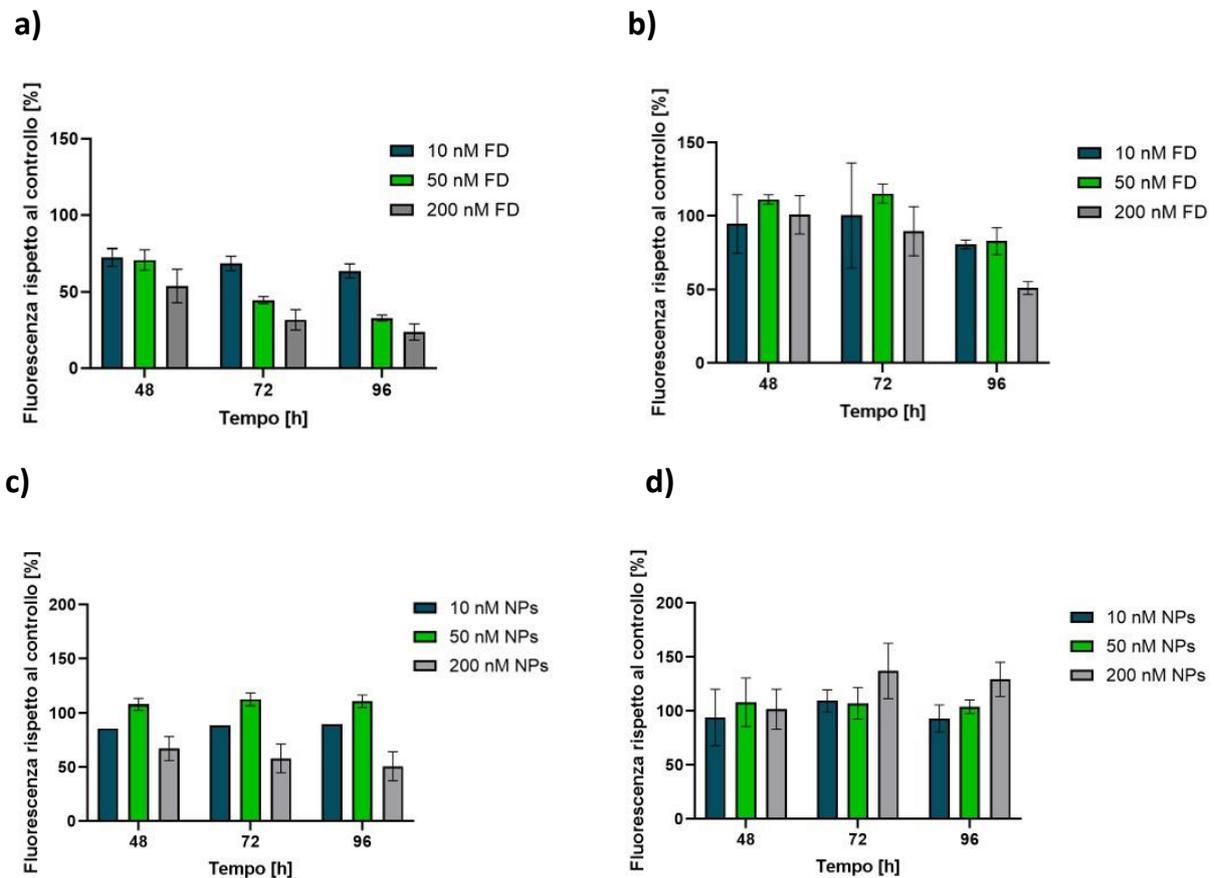


Figura 64: Intensità di fluorescenza di sferoidi Tumour Mix dopo il trattamento con BTZ e BTZ-NPs a diverse concentrazioni (10, 50, 200 nM) incorporati in gel a) e c) di collagene; b) e d) Vitrogel.

3.6 Valutazione dell'efficacia del trattamento con NPs mediato dalla microglia

3.6.1 Valutazione della capacità di esocitosi

Gli esperimenti precedentemente (vedi Sezione 3.2) condotti sulle cellule della microglia (HMC3) hanno permesso di constatare la loro buona capacità di internalizzare NPs, grazie all'elevata attività fagocitica di queste cellule. [58]

Affinché le NPs trasportate dalle microglia possano essere utili al trattamento, è necessario che esse vengano internalizzate dal trasportatore e successivamente rilasciate nel sito di interesse. Pertanto, è stato valutato tramite analisi FACS come vari la percentuale di cellule positive alle Rhod-NPs e l'intensità di fluorescenza media lasciando alle microglia la possibilità di rilasciare in mezzo di coltura le NPs che avevano precedentemente internalizzato nell'acro di 24 h. Il grafico in figura 65a mostra come al giorno 0 (i.e., dopo 24 h di incubazione con le Rhod-NPs), per tutte le concentrazioni

più della metà delle cellule ha internalizzato delle NPs (sino a raggiungere valori superiori al 90% per la concentrazione di 1 mg/mL). Tuttavia, è possibile osservare come, dopo aver rimosso le NPs e lasciato le cellule in incubazione con mezzo fresco, il numero di cellule positive alle Rhod-NPs cali significativamente nei giorni successivi. Questo comportamento è particolarmente evidente alla concentrazione di 1 mg/mL: dopo 24 h (giorno 1) il numero di cellule positive è il 30% e scende al 20% al giorno 2.

Un'ulteriore conferma è fornita dall'analisi della fluorescenza media delle cellule ai diversi *time point*, riportata in figura 65b. L'intensità di fluorescenza media può essere assunta come una valutazione indicativa del numero di particelle mediamente internalizzate dalle cellule. Per tutte le concentrazioni, è chiaramente visibile una tendenza decrescente durante l'incubazione in solo mezzo di coltura. Analogamente a quanto detto per la percentuale di internalizzazione, differenze importanti nella riduzione della fluorescenza media si osservano principalmente alla concentrazione di 1mg/mL: si passa da una fluorescenza media circa pari a 50 dopo 24 h (giorno 1), valore che scende a circa 40 al giorno 2.

Questo andamento suggerisce la possibilità che parte delle NPs inizialmente internalizzate possano essere state degradate dalle HMC3 o escitate nel mezzo di coltura.

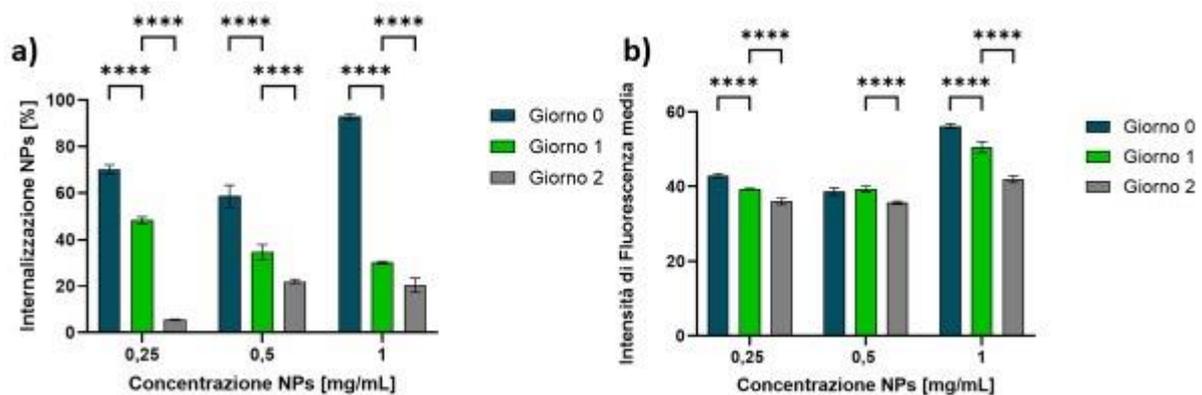


Figura 65: Quantificazione dell'internalizzazione cellulare con citometria a flusso: cellule H-MC3. Confronto per diversi tempi di incubazione (24h, 48h,72) e concentrazioni di Rhod-NPs (0,25 mg/mL; 0,5 mg/mL; 1mg/mL). a) Internalizzazione percentuale di Rhod-NPs (n=4) ****p<0.0001; b) Intensità di fluorescenza media (n=4). ****p<0.0001. I confronti multipli sono stati eseguiti utilizzando il *two-way ANOVA*.

I fenomeni di escitosi, come quelli di endocitosi, molto probabilmente dipendono dalla dimensione, la forma e le caratteristiche superficiali delle NPs.[81] [83]

Si potrebbe pensare che la concentrazione di NPs intracellulare possa influenzare i processi di esocitosi, ma esistono pareri discordanti anche a causa della limitatezza dei dati. [81] Ci sono studi, come quello di Ho et al.[82] , che hanno evidenziato come l'assorbimento di NPs non sia correlato alla percentuale di NPs esocitate. Tuttavia, risultati diversi sono stati riportati da uno studio a cura di Manshian et al. [83] sui *Quantum Dots* (QD), da cui è emersa invece sia la dipendenza dalla dose di incubazione che dal tempo di incubazione.

Nella valutazione dei processi di esocitosi, il tipo cellulare sicuramente ha un effetto non trascurabile [84] come dimostrato da uno studio di Strobel et al. che ha evidenziato la presenza di una correlazione positiva tra l'esocitosi di NPs di CeO_2 e il consumo di colesterolo presente nella membrana cellulare. [85]

Per validare l'ipotesi di un avvenuta esocitosi delle NPs da parte delle cellule HMC3 (che in precedenza avevano internalizzato Rhod-NPs a diverse concentrazioni per 24h), sono state effettuate letture in fluorescenza sul surnatante raccolto dopo 24h e 48h di incubazione in mezzo fresco. È stato analizzato anche il surnatante di cellule non trattate con Rhod-NPs, da utilizzare come controllo.

Come si evince dal grafico di Fig. 66, dal confronto con il controllo non trattato, un segnale in fluorescenza è stato rilevato per tutti i campioni analizzati. I risultati non sembrano mostrare una correlazione lineare tra l'intensità di fluorescenza del surnatante (e quindi, tra il numero di NPs rilasciate) e la concentrazione di NPs somministrata, in accordo con le osservazioni dello studio di Ho et al [82]. Si può invece osservare come l'intensità di fluorescenza del surnatante cali nel tempo per tutte le condizioni. Questo risultato è spiegabile considerando i fenomeni di decadimento e quenching che possono coinvolgere i fluorofori.[86] Tuttavia, è anche possibile che parte delle vescicole extracellulari (EV) contenenti le NPs rilasciate venga nuovamente internalizzata da altre cellule, come osservato a livello cerebrale nei meccanismi di comunicazione mediati da EV. [87]

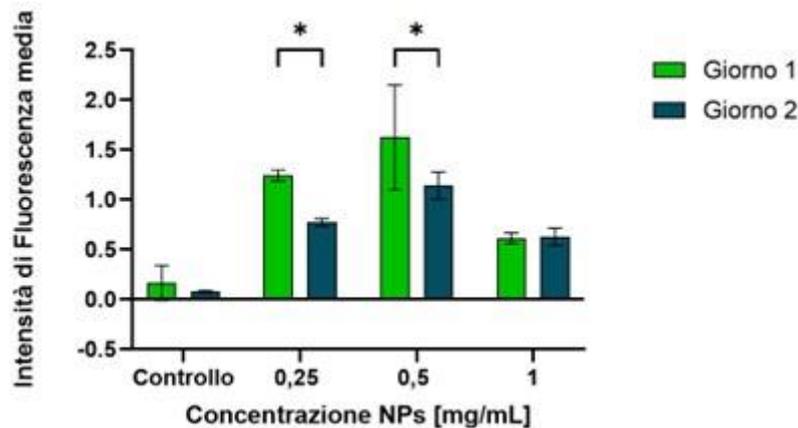


Figura 66: Intensità di fluorescenza media dei surnatanti di HMC3 post 48h e 72h incubazione con Rhod-NPs a diverse concentrazioni (non trattato; 0,25 mg/mL; 0,5 mg/mL; 1 mg/mL) (n=4). I confronti multipli sono stati eseguiti utilizzando il *two-way ANOVA*. * $p < 0.05$.

Il segnale in fluorescenza rilevato avvalora l'ipotesi che parte delle NPs fagocitate siano state rilasciate nel mezzo, anche in associazione alla riduzione nel tempo del segnale in fluorescenza relativo alle cellule HMC3.

In generale, l'esocitosi delle NPs da parte dei macrofagi è stata studiata raramente, forse perché ritenuti principalmente in grado di "distruggere" le sostanze che internalizzano. Tuttavia, Ho et al. hanno scoperto che alcuni macrofagi (come i Raw264.7) possono rilasciare NPs, anche se con meno evidenza rispetto a cellule non macrofagiche (C166 e HeLa). [88]

Pertanto, poiché esistono anche evidenze della capacità delle microglia di internalizzare e successivamente rilasciare materiale esterno tramite le EV,[89] è possibile supporre che possano essere in grado di rilasciare NPs, sebbene con meccanismi ignoti e ancora da investigare.

Tuttavia, queste osservazioni confermano ulteriormente le potenzialità delle cellule della microglia come sistemi di trasporto di NPs per il rilascio di farmaco.

3.6.2 Migrazione e infiltrazione di cellule HMC3 all'interno di sferoidi TM

Come dimostrato da alcuni dei precedenti esperimenti *in vitro*, una delle principali cause della minore efficacia del trattamento basato su NPs è la limitata capacità di accumulo nella massa tumorale. Pertanto, è fondamentale verificare se l'impiego delle cellule della microglia come trasportatori di nanomedicine possa facilitare la penetrazione nel GBM. Per confermare la capacità di infiltrazione della microglia, 2000 e 4000 HMC3 marcate in fluorescenza con *Dil Cell™ Labelling Solution* sono stati

somministrate a sferoidi TM fluorescenti, contenuti all'interno di una piastra antiadesiva.

Le immagini ottenute al microscopio (Fig. 67) dopo 96h di trattamento mostrano un effettiva infiltrazione da parte delle cellule HMC3 all'interno degli sferoidi in entrambe le condizioni di trattamento. All'aumentare della densità di HMC3, è possibile osservare una distribuzione più diffusa e uniforme all'interno degli sferoidi. Tuttavia, in entrambi i casi, la microglia riesce a penetrare anche nelle zone più interne, in prossimità del *core* necrotico, che invece sono difficilmente raggiunte dalle NPs.[90]

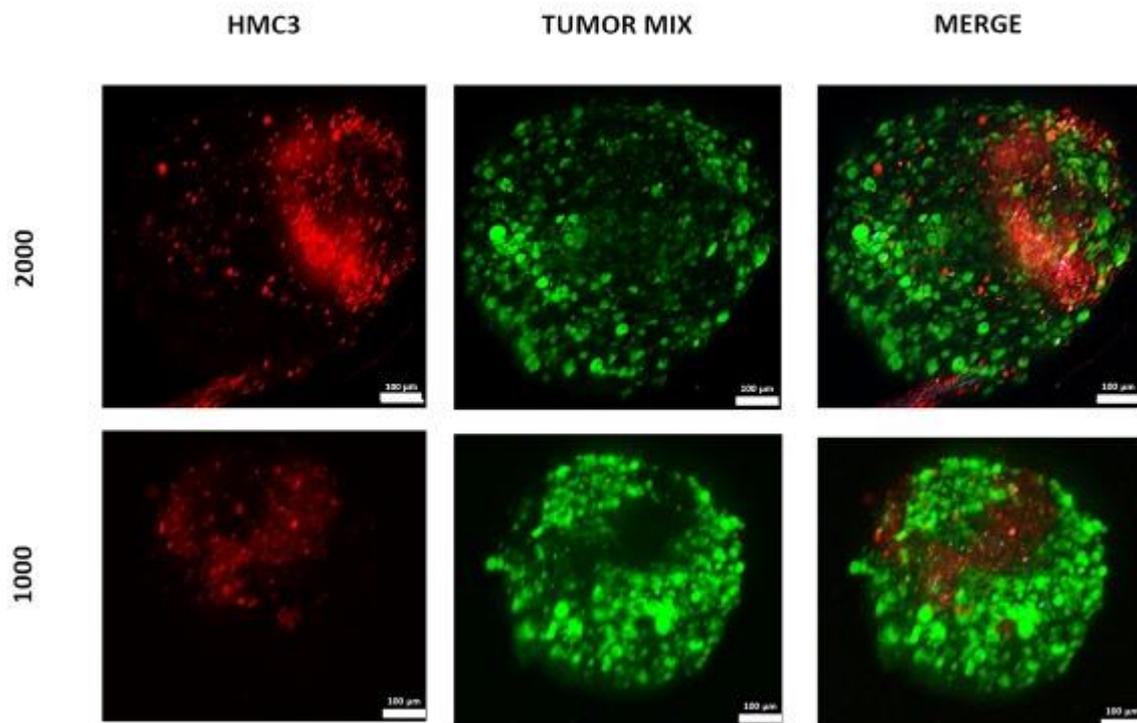


Figura 67: Immagine in fluorescenza dell'infiltrazione delle cellule di microglia (somministrate alla densità di 1000 e 2000 cellule/pozzetto) all'internodi sferoidi TM a 96h dalla somministrazione. Le cellule HMC3, marcate con *Vybrant™ Dil Cell- Labelling Solution*, sono rappresentate in rosso, mentre le cellule U87 e GBM-8 (marcate con GFP) sono evidenziate in verde. Barra di scala: 100 µm.

Diversi studi hanno investigato i fattori che regolano queste interazioni tra cellule gliali e cellule dei gliomi. [91] Da uno studio di Saio [92] è emerso la chemiotassi delle cellule immunitarie all'interno della massa tumorale è promossa dalla presenza di proteine chemiotattiche monocitarie (MCP). In particolare, è stato osservato che diverse linee di glioma esprimono prevalentemente MCP-3 in grado proprio di facilitare l'infiltrazione di macrofagi/microglia nei tessuti tumorali. [92]

Al fine di verificare queste ipotesi in un *setup* sperimentale più biomimetico, la capacità di migrazione delle cellule della microglia verso sferoidi tumorali è stata

inoltre studiata all'interno di gel a base di collagene I, in modo da replicare la ECM del GBM.

La migrazione in direzione orizzontale è stata verificata in due condizioni distinte: nel primo caso le cellule della microglia sono state incapsulate in un gel di collagene interfacciato con un gel vuoto, mentre nel secondo caso il gel in cui erano inserite le microglia è stato posto in prossimità di gel contenente uno sferoide TM. In questo modo, è stato possibile determinare se la migrazione sia indotta dalla presenza dello sferoide e dal tropismo delle cellule della microglia verso le cellule tumorali.

Come è possibile osservare dall'immagine in Fig.68, dopo 48 h dall'incapsulamento, non è stata osservata alcuna migrazione delle cellule HMC3 in assenza di sferoide tumorale in entrambe le direzioni. Indipendentemente dalla densità di semina, le cellule HMC3 sono rimaste confinate nel gel in cui erano racchiuse, senza superare l'interfaccia con il gel vuoto.

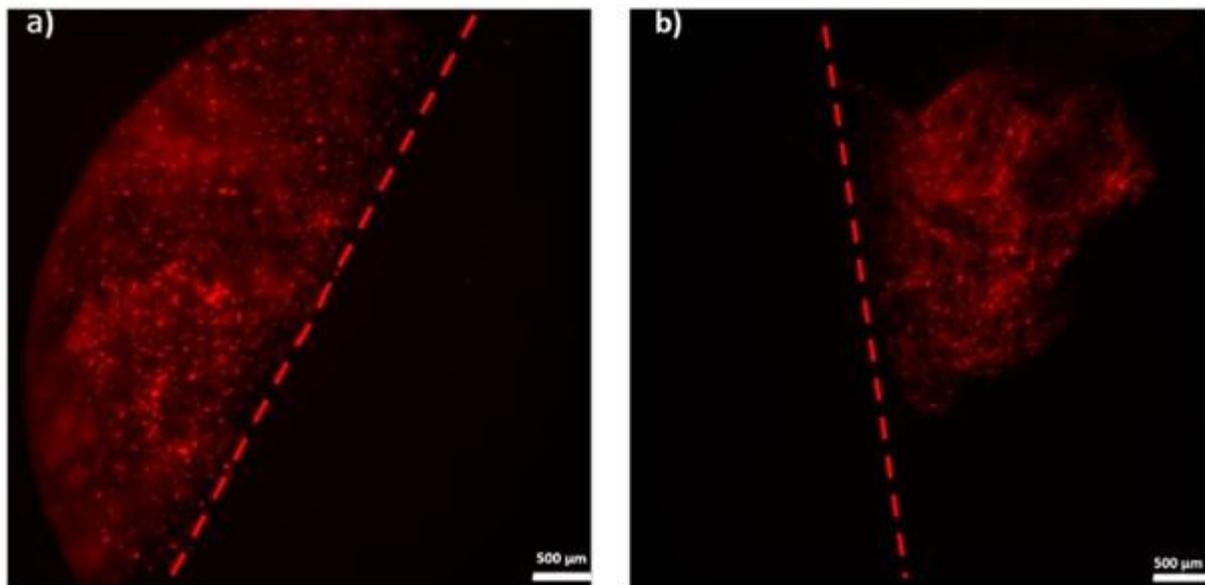


Figura 68: HMC3 dopo 48h dall'essere state caricate in gel di collagene alla densità di semina di a) 25 000; b) 50 000 cellule per pozzetto. L'interfaccia tra il gel conenente le cellule e il gel vuoto è evidenziata con una linea tratteggiata. Le cellule HMC3, marcate con *Vybrant™ Dil Cell Labelling Solution*, sono rappresentate in rosso. Barra di scala: 500µm.

Al contrario, quando il gel contenente le microglia viene interfacciato con la matrice contenente sferoidi TM, si assiste ad una pronunciata migrazione delle HMC3 attraverso l'interfaccia tra i gel verso lo sferoide, come mostrato in Figura 69. Inoltre, le cellule della microglia possono penetrare anche all'interno dello sferoide. Queste osservazioni dimostrano che la migrazione delle microglia è effettivamente indotta dalla presenza dello sferoide, confermando la naturale capacità di *homing* di tali cellule

verso il tumore. Inoltre, la presenza del gel non ha influito negativamente sulla migrazione e infiltrazione nello sferoide.

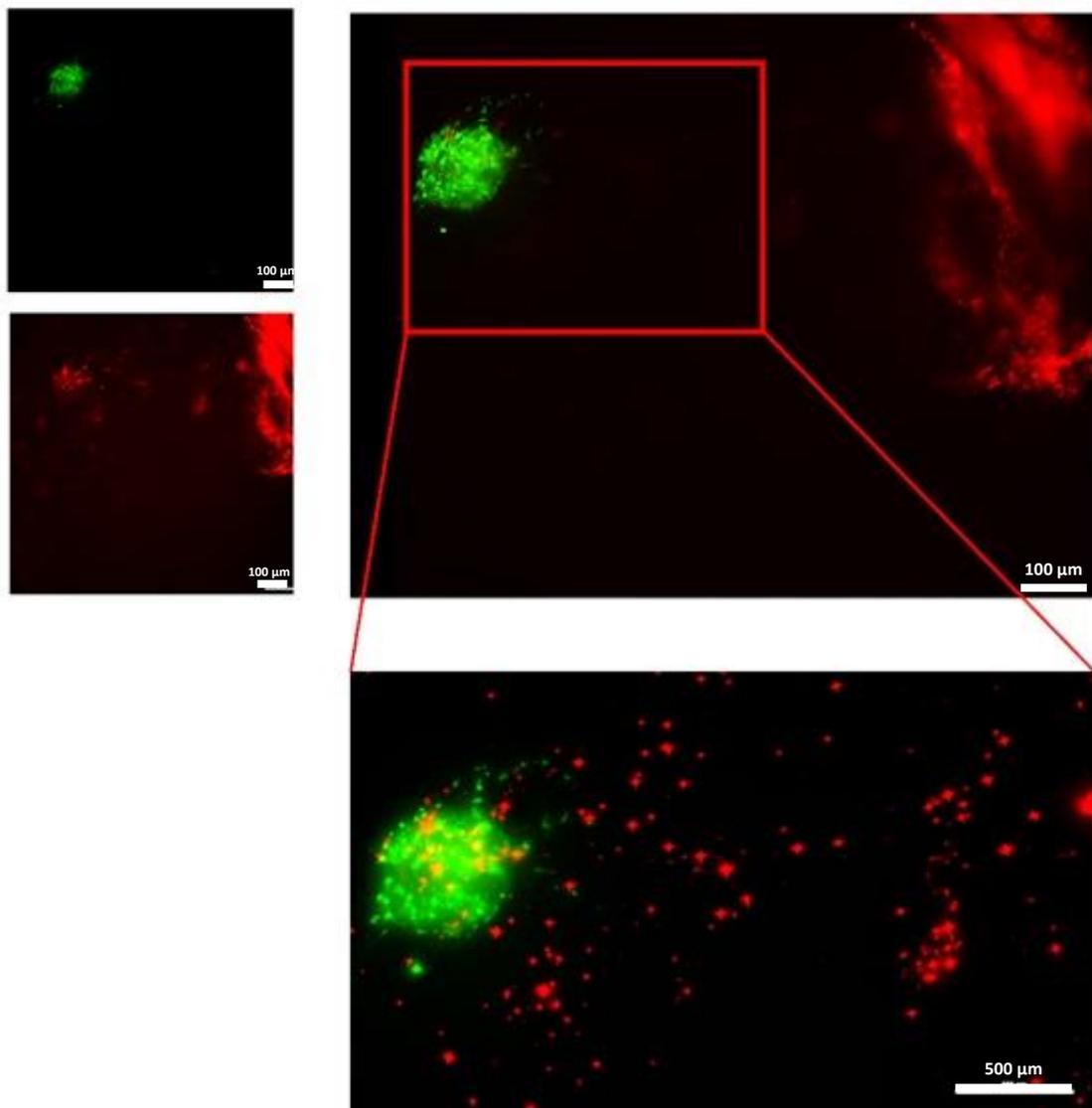


Figura 69: Immagine in fluorescenza della migrazione delle cellule di microglia verso gel contenenti sferoidi TM, a 48h dalla semina. Le cellule HMC3, marcate con *Vybrant™ Dil Cell Labelling Solution*, sono rappresentate in rosso, mentre le cellule U87 e GBM-8 (marcate con GFP) sono evidenziate in verde. a) Immagine in campo verde dello sferoide TM. Barra di scala: 100 μm; b) Immagine in campo rosso delle cellule HMC3. Barra di scala: 100 μm; c) Immagine merge. Barra di scala: 100μm d) Ingrandimento sull'intorno dello sferoide. Barra di scala: 500 μm.

È stata valutata la capacità di migrazione delle HMC3 anche utilizzando un setup verticale, ossia seminando HMC3 sul fondo dei pozzetti di una piastra, su cui sono stati inseriti gel vuoti o contenenti sferoidi TM. Le immagini in fluorescenza in Figura 70 mostrano come in entrambi i casi le cellule di microglia risultino omogeneamente adese sul fondo della piastra. Tuttavia, solo in presenza dello sferoide TM è possibile

osservare un'invasione delle HMC3 all'interno del gel. Infatti, osservando alla medesima quota i gel non contenenti sferoidi, non è possibile rilevare la presenza di microglia. Anche in questo caso, è stato confermato come la migrazione sia indotta dall'interazione tra cellule tumorali e microglia, confermando che i sistemi di trasporto basati su queste ultime potrebbero non solo migliorare l'infiltrazione delle NPs attraverso la ECM, ma anche garantire un *targeting* attivo selettivo verso il GBM.

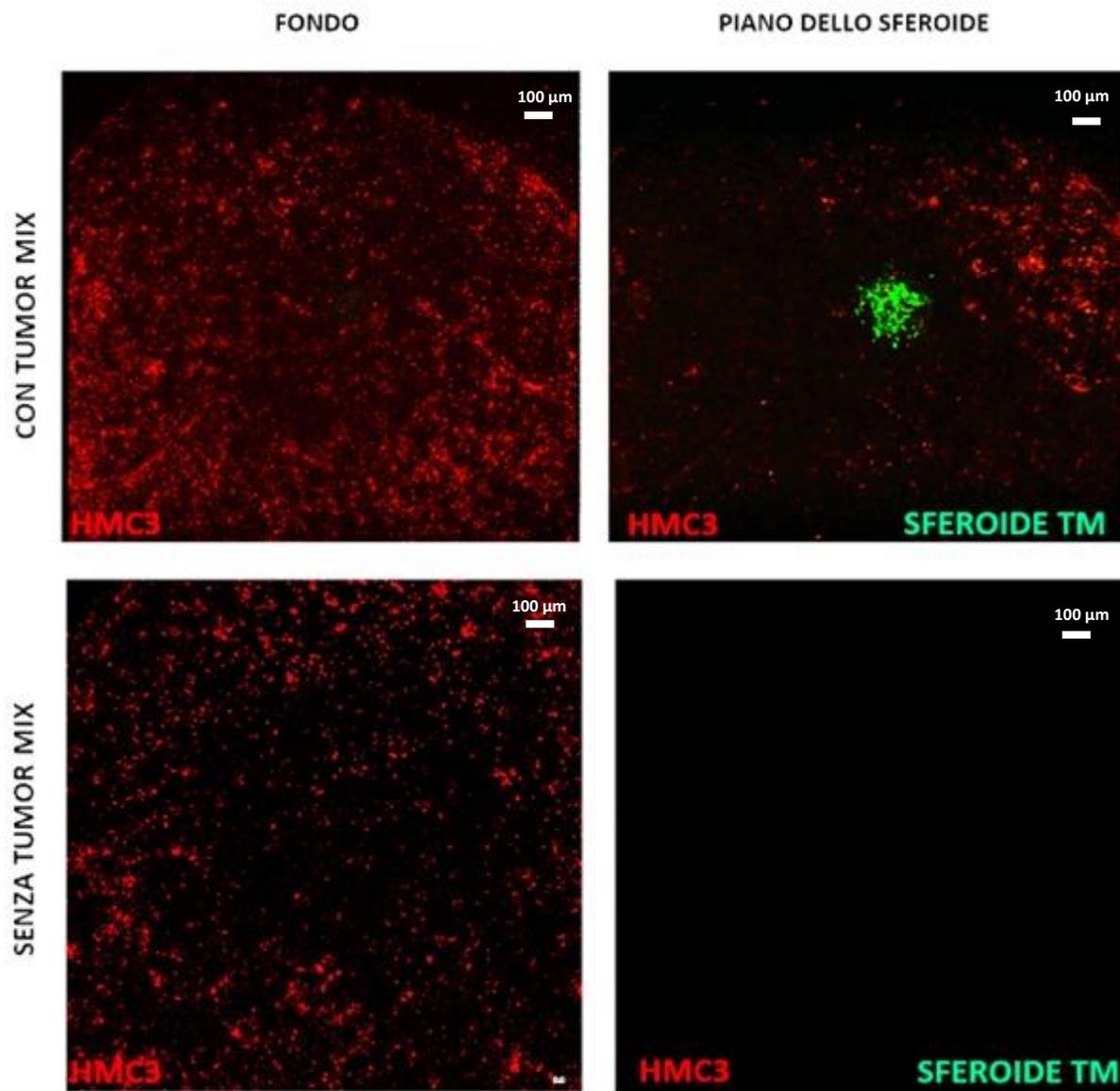


Figura 70: Immagine in fluorescenza della migrazione verticale delle cellule di microglia verso gel contenenti sferoidi TM (in alto) o vuoti (in basso), acquisite a due diverse quote a 48h dalla semina. Le cellule HMC3, marcate con *Vybrant™ Dil Cell Labelling Solution*, sono rappresentate in rosso, mentre le cellule U87 e GBM-8 (marcate con GFP) sono evidenziate in verde. Barra di scala:100 μm.

3.6.3 Test di vitalità

Gli esperimenti in precedenza condotti dimostrano che le HMC3 possono effettivamente raggiungere sferoidi di cellule tumorali. Questo fenomeno di migrazione delle HMC3 può essere sfruttato per trasportare NPs caricate con BTZ per il trattamento del GBM. Per valutare l'efficacia del trattamento mediato da cellule è stato effettuato un test di vitalità 2D su U251 e un test di vitalità 3D su sferoidi di tipo Tumor Mix in gel a base di collagene. In entrambi i test i trattamenti sono stati fatti con diverse concentrazioni di cellule di HMC3, precedentemente lasciate in incubazione con NPs contenenti farmaco.

3.6.4.1 Test di vitalità 2D su U251 post trattamento mediato da HMC3

Il grafico mostrato in Fig.71 mostra il confronto tra le vitalità, in percentuale rispetto al controllo, dopo 24h e 48h dal trattamento, delle cellule U251 trattate con concentrazioni crescenti di HMC3 che precedentemente avevano internalizzato BTZ-NPs. Fornendo quantità basse di cellule contenenti NPs (500 o 1000 cellule/pozzetto), non è stato possibile apprezzare effetti significativi sulla vitalità per entrambi i *time point* analizzati. Tuttavia, a partire dalla densità di 2000 HMC3/pozzetto, si assiste ad un calo della vitalità lieve dopo 24h, ma significativo dopo 48h. In particolare, la vitalità cala intorno al 65% a seguito del trattamento per 48 h con una densità di 4000 cellule/pozzetto (comparabile a quella osservata per il trattamento con NPs e farmaco libero). Quindi, l'effetto del trattamento sembrerebbe emergere solo con tempi di trattamento lunghi e densità elevata di cellule. Questo effetto dipende probabilmente dalla cinetica di rilascio delle NPs da parte delle cellule della microglia, che deve essere tuttavia ancora investigata nel dettaglio.

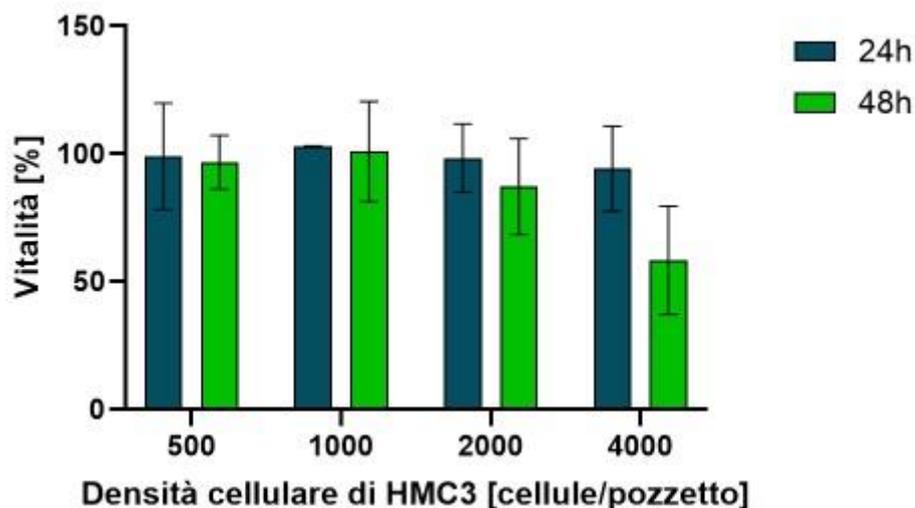


Figura 71: Risultati del saggio di vitalità ottenuti dopo 24h e 48h dal trattamento con HMC3 che avevano precedentemente internalizzato BTZ-NPs. Il test è stato eseguito

su cellule U251 trattate con diverse densità cellulari (500 HMC3, 1000 HMC3, 2000 HMC3, 4000 HMC3) (n=3).

3.6.4.2 Test di vitalità su sferoidi TM post trattamento mediato da HMC3

Il grafico in Fig. 72 riporta i risultati dei test di vitalità, ottenuti su sferoidi Tumor Mix (incapsulati in gel di collagene) a 72 h dalla somministrazione di diverse quantità di cellule HMC3 contenenti BTZ-NPs. Dal confronto con il controllo, si osserva un *trend* decrescente di vitalità percentuale (valutata rispetto alla vitalità rilevata al giorno di trattamento) in concomitanza con l'aumento del numero di cellule HMC3 utilizzate per il trattamento.

Questi dati preliminari suggeriscono che le cellule della microglia possano efficacemente migrare attraverso il gel, trasportando le NPs sino allo sferoide tumorale, il quale subisce un significativo effetto dal trattamento.

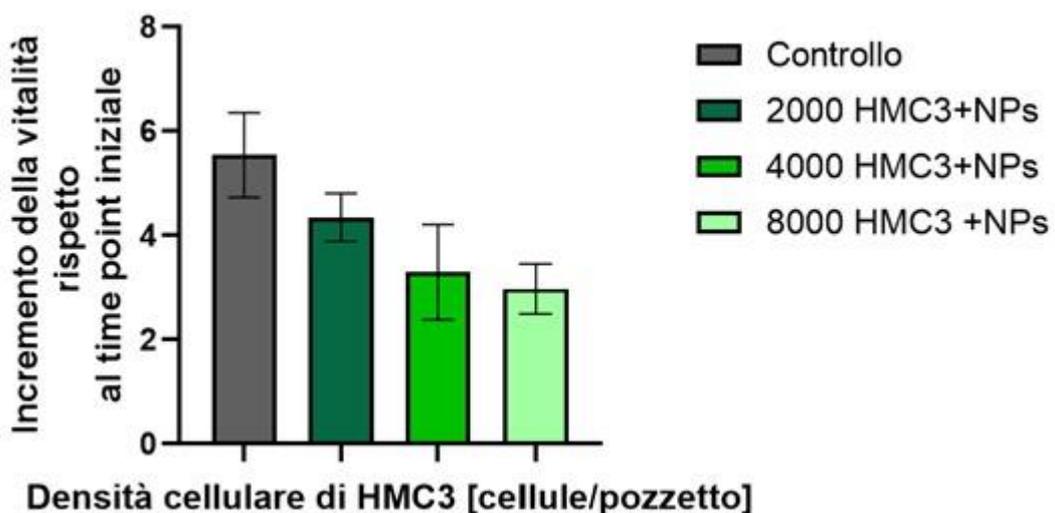


Figura 72: Risultati del saggio di vitalità ottenuti dopo 72h dal trattamento con HMC3 che avevano precedentemente internalizzato BTZ-NPs. Il test è stato eseguito su sferoidi TM trattati con diverse densità cellulari (controllo, 2000 HMC3, 4000 HMC3, 8000 HMC3) (n=3).

Conclusioni

In questo lavoro di tesi è stata esplorata la possibilità di utilizzare nanoparticelle (NPs) e cellule di microglia come sistemi di trasporto e rilascio per nuovi farmaci (Bortezomib, BTZ) da applicare al trattamento del glioblastoma.

Le NPs con struttura *core-shell* a base polimerica e lipidica sono state prodotte mediante nanoprecipitazione e la caratterizzazione, mediante DLS, ha permesso di apprezzare le dimensioni ridotte delle NPs e il basso PDI. Le NPs hanno incapsulato con successo il BTZ e sono state in grado di rilasciarlo in modo prolungato, dopo un *burst* iniziale. L'effettiva capacità di internalizzazione delle NPs è stata verificata con successo, mediante analisi al FACS, da parte di cellule tumorali di GBM (U251 e U87) e cellule residenti del cervello, come cellule della microglia (HMC-3) e astrociti (HASTR). Le cellule tumorali di GBM hanno dimostrato la capacità di internalizzare la totalità delle NPs somministrate dopo 48h di incubazione. Inoltre, le cellule U87 (che presentano caratteristiche simili alle cellule di GBM con fenotipo neuronale) presentano un livello di *uptake* importante già dopo 24h. D'altra parte, le cellule astrocitiche hanno mostrato complessivamente un *uptake* più lento, mentre le cellule di microglia presentano un'internalizzazione molto elevata grazie alla loro attività fagocitica.

L'efficacia di trattamento con NPs contenenti il Bortezomib, è stata valutata con successo, comparando l'effetto con quello prodotto da concentrazioni equivalenti di farmaco libero, eseguendo dei test di vitalità su modelli cellulari bidimensionali e tridimensionali (sferoidi) di U251, U87, HMC-3 e HASTR. I risultati ottenuti hanno mostrato complessivamente che l'incapsulamento del farmaco all'interno di strutture nanodimensionate permette di limitare la tossicità del farmaco sulle cellule residenti del cervello (HMC3 e HASTR), a fronte di una parziale riduzione dell'efficacia sulle cellule tumorali. Tuttavia, poiché l'efficacia cresce all'aumentare del tempo di incubazione e della concentrazione somministrata, è possibile identificare delle condizioni di trattamento che garantiscano un buon compromesso tra queste due esigenze. Inoltre, la ridotta tossicità delle BTZ-NPs sulle cellule della microglia suggerisce che queste cellule possano essere anche potenzialmente impiegate come trasportatori di nanoparticelle, senza subire alterazioni di vitalità o comportamento.

Per definire un modello più biomimetico di glioblastoma, è stato aggiunto un elemento di complessità rappresentato dall'introduzione di sferoidi tumorali all'interno di un hydrogel (di diversa composizione) che simulano i due componenti principali della

matrice extracellulare del GBM (collagene e polisaccaridi). I risultati hanno mostrato che il trattamento con farmaco libero causa una maggiore riduzione della capacità di infiltrazione e proliferazione degli sferoidi tumorali a parità di concentrazione, rispetto alle BTZ-NPs. Tuttavia, inserendo anche cellule di HMC3 nel gel, è stato osservato che, mentre il farmaco libero causa una tossicità rilevante sulle cellule della microglia, la somministrazione di alte concentrazioni di NPs riduce significativamente la crescita degli sferoidi tumorali, senza causare effetti collaterali rilevanti sulle cellule della microglia.

Inoltre, i risultati hanno mostrato che la composizione e le proprietà meccaniche della matrice influenzano la risposta al trattamento farmacologico, che risulta meno efficace in gel più rigidi. Tale differenza è ancora più evidente nel caso di somministrazione delle NPs, le quali non generano cali di vitalità rilevanti a causa della ridotta infiltrazione di nanoparticelle negli hydrogel più rigidi a base di polisaccaridi.

Per ovviare a questa ridotta penetrazione delle NPs attraverso la matrice extracellulare del tumore è stata studiata la capacità delle microglia di internalizzare NPs, trasportarle e rilasciarle nel sito tumorale. L'utilizzo di sistemi di trasporto mediato da cellule della microglia potrebbe consentire di superare questa importante barriera all'accumulo di farmaco. Gli sferoidi di tipo Tumor Mix (90% U87, 10% GBM-8) sono stati inglobati con successo in un gel a base di collagene, per studiare la capacità delle microglia di migrare verso la massa tumorale, in un *setup* orizzontale che verticale. I risultati hanno mostrato come le cellule della microglia possano penetrare attraverso il gel e migrare verso lo sferoide tumorale. Inoltre, la migrazione si verifica solo in presenza di sferoidi tumorali, a conferma della presenza di un naturale tropismo delle cellule della microglia verso il GBM, che potrebbe essere impiegato come sistema di targeting attivo.

La possibilità d'effettuare trattamenti con sistemi di trasporto cellulo-mediato, sono state effettuate delle valutazioni quantitative della vitalità di modelli bidimensionali (cellule U251) e tridimensionali (sferoidi di tipo Tumor Mix) che hanno mostrato un effettivo calo della vitalità post trattamento, aprendo la strada a future terapie di nanomedicina che sfruttino la microglia come cellula portatrice di NPs per migliorare la loro infiltrazione.

In studi futuri, per validare questa strategia, sarà necessario realizzare modelli tridimensionali più complessi in grado di replicare non solo la composizione della ECM ma anche la sua struttura fisica. Tutte queste ipotesi dovranno essere studiate, inoltre, su un modello vascolarizzato, possibilmente arricchito con componenti della barriera emato-encefalica e del tessuto cerebrale. In alternativa alle cellule della microglia

Conclusioni

potranno essere valutate ipotesi di trattamento che coinvolgono altre cellule da utilizzare come trasportatori cellulari, come i macrofagi circolanti.

In definitiva, questo lavoro ha fornito indicazioni fondamentali sia per lo sviluppo e la caratterizzazione di nanoparticelle per il trattamento di GBM sia per elaborazione di un sistema di rilascio di farmaci basato su cellule della microglia e rappresenta un promettente punto di partenza per ulteriori sviluppi futuri.

Bibliografia

- [1] Scaltriti Maurizio, "MEDICAL FACTS-Tumori benigni e maligni: cos'hanno in comune, la diagnosi e la terapia." Accessed: Aug. 05, 2023. [Online]. Available: <https://www.medicalfacts.it/2021/05/27/tumori-benigni-e-maligni-coshanno-in-comune-la-diagnosi-e-la-terapia-lapprofondimento-di-scaltriti/#:~:text=Un%20tumore%20%C3%A8%20dunque%20una,diffondono%20in%20tutto%20il%20corpo.>
- [2] "22_Tumori_cerebrali".
- [3] "AIRC- Tumore del cervello." Accessed: Aug. 06, 2023. [Online]. Available: <https://www.airc.it/cancro/informazioni-tumori/guida-ai-tumori/tumore-al-cervello>
- [4] "Associazione Italiana di Oncologia Medica-I numeri del Cancro in Italia 2022." [Online]. Available: www.medinews.it
- [5] D. N. Louis *et al.*, "The 2021 WHO Classification of Tumors of the Central Nervous System: a summary," *Neuro Oncol*, vol. 23, no. 8, pp. 1231–1251, Aug. 2021, doi: 10.1093/neuonc/noab106.
- [6] Redazione, "NeuroMag."
- [7] A. Colopi *et al.*, "Impact of age and gender on glioblastoma onset, progression, and management," *Mech Ageing Dev*, vol. 211, p. 111801, Apr. 2023, doi: 10.1016/j.mad.2023.111801.
- [8] "AIMAC, associazione italiana malati di cancro ."
- [9] "Glioma: tipologie, sintomi, cause e percorso terapeutico." Accessed: Aug. 17, 2023. [Online]. Available: <https://privato.policlinicogemelli.it/approfondimenti/glioma/>
- [10] M. Weller *et al.*, "Glioma," *Nature Reviews Disease Primers*, vol. 1. Nature Publishing Group, Jul. 16, 2015. doi: 10.1038/nrdp.2015.17.
- [11] S. Grochans *et al.*, "Epidemiology of Glioblastoma Multiforme–Literature Review," *Cancers*, vol. 14, no. 10. MDPI, May 01, 2022. doi: 10.3390/cancers14102412.

- [12] K. Urbanska, J. Sokolowska, M. Szmidt, and P. Sysa, "Glioblastoma multiforme - An overview," *Wspolczesna Onkologia*, vol. 18, no. 5. Termedia Publishing House Ltd., pp. 307–312, 2014. doi: 10.5114/wo.2014.40559.
- [13] G. Associazione, A. Fabi, I. Nazionale Dei Tumori, R. Elena, and R. G. Lombardi, "Conoscere il Guida per i pazienti A cura di."
- [14] D. W. Parsons *et al.*, "An Integrated Genomic Analysis of Human Glioblastoma Multiforme." [Online]. Available: www.sciencemag.org
- [15] J. V. R. Cruz *et al.*, "Obstacles to Glioblastoma Treatment Two Decades after Temozolomide," *Cancers*, vol. 14, no. 13. MDPI, Jul. 01, 2022. doi: 10.3390/cancers14133203.
- [16] D. J. Brat *et al.*, "Pseudopalisades in Glioblastoma Are Hypoxic, Express Extracellular Matrix Proteases, and Are Formed by an Actively Migrating Cell Population," *Cancer Res*, vol. 64, no. 3, pp. 920–927, Feb. 2004, doi: 10.1158/0008-5472.CAN-03-2073.
- [17] C. Pacheco, C. Martins, J. Monteiro, F. Baltazar, B. M. Costa, and B. Sarmento, "Glioblastoma Vasculature: From its Critical Role in Tumor Survival to Relevant in Vitro Modelling," *Frontiers in Drug Delivery*, vol. 2, Feb. 2022, doi: 10.3389/fddev.2022.823412.
- [18] B. K. Ahir, H. H. Engelhard, and S. S. Lakka, "Tumor Development and Angiogenesis in Adult Brain Tumor: Glioblastoma," *Mol Neurobiol*, vol. 57, no. 5, pp. 2461–2478, May 2020, doi: 10.1007/s12035-020-01892-8.
- [19] J. H. Park and H. K. Lee, "Current Understanding of Hypoxia in Glioblastoma Multiforme and Its Response to Immunotherapy," *Cancers (Basel)*, vol. 14, no. 5, p. 1176, Feb. 2022, doi: 10.3390/cancers14051176.
- [20] K. J. Wolf, J. Chen, J. D. Coombes, M. K. Aghi, and S. Kumar, "Dissecting and rebuilding the glioblastoma microenvironment with engineered materials," *Nature Reviews Materials*, vol. 4, no. 10. Nature Publishing Group, pp. 651–668, Oct. 01, 2019. doi: 10.1038/s41578-019-0135-y.
- [21] A. D'Alessio, G. Proietti, G. Sica, and B. M. Scicchitano, "Pathological and Molecular Features of Glioblastoma and Its Peritumoral Tissue," *Cancers (Basel)*, vol. 11, no. 4, p. 469, Apr. 2019, doi: 10.3390/cancers11040469.

- [22] K. Murk and R. Hülse, "Forced but effective partners in crime: how astrocytes drive the progression of glioblastoma," *Brain*, vol. 145, no. 9, pp. 2952–2954, Sep. 2022, doi: 10.1093/brain/awac302.
- [23] M. V. Sofroniew and H. V. Vinters, "Astrocytes: Biology and pathology," *Acta Neuropathologica*, vol. 119, no. 1, pp. 7–35, Jan. 2010. doi: 10.1007/s00401-009-0619-8.
- [24] W. Wu *et al.*, "Glioblastoma multiforme (GBM): An overview of current therapies and mechanisms of resistance," *Pharmacological Research*, vol. 171. Academic Press, Sep. 01, 2021. doi: 10.1016/j.phrs.2021.105780.
- [25] D. Schiffer, M. Mellai, E. Bovio, I. Bisogno, C. Casalone, and L. Annovazzi, "Glioblastoma niches: from the concept to the phenotypical reality," *Neurological Sciences*, vol. 39, no. 7. Springer-Verlag Italia s.r.l., pp. 1161–1168, Jul. 01, 2018. doi: 10.1007/s10072-018-3408-0.
- [26] L. Barthel *et al.*, "Glioma: molecular signature and crossroads with tumor microenvironment," *Cancer and Metastasis Reviews*, vol. 41, no. 1, pp. 53–75, Mar. 2022, doi: 10.1007/s10555-021-09997-9.
- [27] V. Agrahari, A. Kim, and V. Agrahari, "Nanotherapy for Brain Tumor Drug Delivery." [Online]. Available: <http://www.springer.com/series/7657>
- [28] J. Jacob *et al.*, "Radioterapia dei tumori cerebrali primitivi dell'adulto," *EMC - Neurologia*, vol. 19, no. 1, pp. 1–11, Apr. 2019, doi: 10.1016/s1634-7072(18)41587-5.
- [29] A. C. Tan, D. M. Ashley, G. Y. López, M. Malinzak, H. S. Friedman, and M. Khasraw, "Management of glioblastoma: State of the art and future directions," *CA Cancer J Clin*, vol. 70, no. 4, pp. 299–312, Jul. 2020, doi: 10.3322/caac.21613.
- [30] S. Y. Lee, "Temozolomide resistance in glioblastoma multiforme," *Genes and Diseases*, vol. 3, no. 3. Chongqing yi ke da xue, di 2 lin chuang xue yuan Bing du xing gan yan yan jiu suo, pp. 198–210, Sep. 01, 2016. doi: 10.1016/j.gendis.2016.04.007.
- [31] F. Pourgholi, M. hajivalili, J. N. Farhad, H. S. Kafil, and M. Yousefi, "Nanoparticles: Novel vehicles in treatment of Glioblastoma," *Biomedicine and Pharmacotherapy*, vol. 77. Elsevier Masson SAS, pp. 98–107, Feb. 01, 2016. doi: 10.1016/j.biopha.2015.12.014.

- [32] A. B. Zhang *et al.*, “Exploring the Past, Present, and Future of Anti-Angiogenic Therapy in Glioblastoma,” *Cancers (Basel)*, vol. 15, no. 3, p. 830, Jan. 2023, doi: 10.3390/cancers15030830.
- [33] H. G. Wirsching and M. Weller, “Glioblastoma,” in *Malignant Brain Tumors: State-of-the-Art Treatment*, Springer International Publishing, 2016, pp. 265–288. doi: 10.1007/978-3-319-49864-5_18.
- [34] Y. Cheng, R. A. Morshed, B. Auffinger, A. L. Tobias, and M. S. Lesniak, “Multifunctional nanoparticles for brain tumor imaging and therapy,” *Advanced Drug Delivery Reviews*, vol. 66, pp. 42–57, 2014. doi: 10.1016/j.addr.2013.09.006.
- [35] Z. Liu, X. Ji, D. He, R. Zhang, Q. Liu, and T. Xin, “Nanoscale Drug Delivery Systems in Glioblastoma,” *Nanoscale Res Lett*, vol. 17, no. 1, p. 27, Feb. 2022, doi: 10.1186/s11671-022-03668-6.
- [36] E. Blanco, H. Shen, and M. Ferrari, “Principles of nanoparticle design for overcoming biological barriers to drug delivery,” *Nat Biotechnol*, vol. 33, no. 9, pp. 941–951, Sep. 2015, doi: 10.1038/nbt.3330.
- [37] Y. Matsumura and H. Maeda, “A new concept for macromolecular therapeutics in cancer chemotherapy: mechanism of tumoritropic accumulation of proteins and the antitumor agent smancs.,” *Cancer Res*, vol. 46, no. 12 Pt 1, pp. 6387–92, Dec. 1986.
- [38] M. Teixeira, M. J. Alonso, M. M. M. Pinto, and C. M. Barbosa, “Development and characterization of PLGA nanospheres and nanocapsules containing xanthone and 3-methoxyxanthone,” *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, vol. 59, no. 3, pp. 491–500, Apr. 2005, doi: 10.1016/j.ejpb.2004.09.002.
- [39] E. E. Connor, J. Mwamuka, A. Gole, C. J. Murphy, and M. D. Wyatt, “Gold Nanoparticles Are Taken Up by Human Cells but Do Not Cause Acute Cytotoxicity,” *Small*, vol. 1, no. 3, pp. 325–327, Mar. 2005, doi: 10.1002/sml.200400093.
- [40] L. Wang *et al.*, “Intranasal Delivery of Temozolomide-Conjugated Gold Nanoparticles Functionalized with Anti-EphA3 for Glioblastoma Targeting,” *Mol Pharm*, vol. 18, no. 3, pp. 915–927, Mar. 2021, doi: 10.1021/acs.molpharmaceut.0c00911.

- [41] J. C. Cuggino, E. R. O. Blanco, L. M. Gugliotta, C. I. Alvarez Igarzabal, and M. Calderón, "Crossing biological barriers with nanogels to improve drug delivery performance," *Journal of Controlled Release*, vol. 307, pp. 221–246, Aug. 2019, doi: 10.1016/j.jconrel.2019.06.005.
- [42] D. She, H. Huang, J. Li, S. Peng, H. Wang, and X. Yu, "Hypoxia-degradable zwitterionic phosphorylcholine drug nanogel for enhanced drug delivery to glioblastoma," *Chemical Engineering Journal*, vol. 408, p. 127359, Mar. 2021, doi: 10.1016/j.cej.2020.127359.
- [43] M.-C. Jones and J.-C. Leroux, "Polymeric micelles – a new generation of colloidal drug carriers," *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, vol. 48, no. 2, pp. 101–111, Sep. 1999, doi: 10.1016/S0939-6411(99)00039-9.
- [44] C. Zhan, B. Gu, C. Xie, J. Li, Y. Liu, and W. Lu, "Cyclic RGD conjugated poly(ethylene glycol)-co-poly(lactic acid) micelle enhances paclitaxel anti-glioblastoma effect," *Journal of Controlled Release*, vol. 143, no. 1, pp. 136–142, Apr. 2010, doi: 10.1016/j.jconrel.2009.12.020.
- [45] S. L. Hayward, C. L. Wilson, and S. Kidambi, "Hyaluronic acid-conjugated liposome nanoparticles for targeted delivery to CD44 overexpressing glioblastoma cells," *Oncotarget*, vol. 7, no. 23, pp. 34158–34171, Jun. 2016, doi: 10.18632/oncotarget.8926.
- [46] T. A. Taton, "Nanostructures as tailored biological probes," *Trends Biotechnol*, vol. 20, no. 7, pp. 277–279, Jul. 2002, doi: 10.1016/S0167-7799(02)01973-X.
- [47] A. Z. Wilczewska, K. Niemirowicz, K. H. Markiewicz, and H. Car, "Nanoparticles as drug delivery systems," *Pharmacological Reports*, vol. 64, no. 5, pp. 1020–1037, Sep. 2012, doi: 10.1016/S1734-1140(12)70901-5.
- [48] L. Jena, E. McErlean, and H. McCarthy, "Delivery across the blood-brain barrier: nanomedicine for glioblastoma multiforme," *Drug Deliv Transl Res*, vol. 10, no. 2, pp. 304–318, Apr. 2020, doi: 10.1007/s13346-019-00679-2.
- [49] B. S. Mahmoud, A. H. AlAmri, and C. McConville, "Polymeric Nanoparticles for the Treatment of Malignant Gliomas," *Cancers (Basel)*, vol. 12, no. 1, p. 175, Jan. 2020, doi: 10.3390/cancers12010175.
- [50] H. Maleki *et al.*, "Effect of Paclitaxel/etoposide co-loaded polymeric nanoparticles on tumor size and survival rate in a rat model of glioblastoma," *Int J Pharm*, vol. 604, p. 120722, Jul. 2021, doi: 10.1016/j.ijpharm.2021.120722.

- [51] P. Kumar, L. Wasim, M. Chopra, and A. Chhikara, "Co-delivery of Vorinostat and Etoposide Via Disulfide Cross-Linked Biodegradable Polymeric Nanogels: Synthesis, Characterization, Biodegradation, and Anticancer Activity," *AAPS PharmSciTech*, vol. 19, no. 2, pp. 634–647, Feb. 2018, doi: 10.1208/s12249-017-0863-5.
- [52] L. Taiarol, B. Formicola, R. D. Magro, S. Sesana, and F. Re, "An update of nanoparticle-based approaches for glioblastoma multiforme immunotherapy," *Nanomedicine*, vol. 15, no. 19, pp. 1861–1871, Aug. 2020, doi: 10.2217/nnm-2020-0132.
- [53] H. Hosseinalizadeh, M. Mahmoodpour, Z. Razaghi Bahabadi, M. R. Hamblin, and H. Mirzaei, "Neutrophil mediated drug delivery for targeted glioblastoma therapy: A comprehensive review," *Biomedicine & Pharmacotherapy*, vol. 156, p. 113841, Dec. 2022, doi: 10.1016/j.biopha.2022.113841.
- [54] G. Brachi *et al.*, "Intratumoral injection of hydrogel-embedded nanoparticles enhances retention in glioblastoma," *Nanoscale*, vol. 12, no. 46, pp. 23838–23850, Dec. 2020, doi: 10.1039/d0nr05053a.
- [55] E. H. Wilson, W. Weninger, and C. A. Hunter, "Trafficking of immune cells in the central nervous system," *Journal of Clinical Investigation*, vol. 120, no. 5, pp. 1368–1379, May 2010, doi: 10.1172/JCI41911.
- [56] Y. J. Li *et al.*, "From blood to brain: blood cell-based biomimetic drug delivery systems," *Drug Deliv*, vol. 28, no. 1, pp. 1214–1225, 2021, doi: 10.1080/10717544.2021.1937384.
- [57] J. Xue *et al.*, "Neutrophil-mediated anticancer drug delivery for suppression of postoperative malignant glioma recurrence," *Nat Nanotechnol*, vol. 12, no. 7, pp. 692–700, Jul. 2017, doi: 10.1038/nnano.2017.54.
- [58] Z.-P.-P. Ye, X.-L. Ai, A. M. Faramand, and F. Fang, "Macrophages as Nanocarriers for Drug Delivery: Novel Therapeutics for Central Nervous System Diseases," *J Nanosci Nanotechnol*, vol. 18, no. 1, pp. 471–485, Sep. 2017, doi: 10.1166/jnn.2018.15218.
- [59] Y. Du *et al.*, "Engineered Microglia Potentiate the Action of Drugs against Glioma Through Extracellular Vesicles and Tunneling Nanotubes," *Adv Healthc Mater*, vol. 10, no. 9, May 2021, doi: 10.1002/adhm.202002200.

- [60] B. T. Luk and L. Zhang, "Cell membrane-camouflaged nanoparticles for drug delivery," *Journal of Controlled Release*, vol. 220, pp. 600–607, Dec. 2015, doi: 10.1016/j.jconrel.2015.07.019.
- [61] S. Qiao *et al.*, "Chemoattractants driven and microglia based biomimetic nanoparticle treating TMZ-resistant glioblastoma multiforme," *Journal of Controlled Release*, vol. 336, pp. 54–70, Aug. 2021, doi: 10.1016/j.jconrel.2021.06.015.
- [62] P. Sandin, L. W. Fitzpatrick, J. C. Simpson, and K. A. Dawson, "High-speed imaging of rab family small GTPases reveals rare events in nanoparticle trafficking in living cells," *ACS Nano*, vol. 6, no. 2, pp. 1513–1521, Feb. 2012, doi: 10.1021/nn204448x.
- [63] C. Battistella and H. Klok, "Controlling and Monitoring Intracellular Delivery of Anticancer Polymer Nanomedicines," *Macromol Biosci*, vol. 17, no. 10, Oct. 2017, doi: 10.1002/mabi.201700022.
- [64] P. Paramasivam *et al.*, "Endosomal escape of delivered mRNA from endosomal recycling tubules visualized at the nanoscale," *Journal of Cell Biology*, vol. 221, no. 2, Feb. 2022, doi: 10.1083/jcb.202110137.
- [65] T. Hideshima *et al.*, "The proteasome inhibitor PS-341 inhibits growth, induces apoptosis, and overcomes drug resistance in human multiple myeloma cells.," *Cancer Res*, vol. 61, no. 7, pp. 3071–6, Apr. 2001.
- [66] A. P. Vidisheva *et al.*, "Safety of BTZ retreatment for patients with low-grade peripheral neuropathy during the initial treatment," *Supportive Care in Cancer*, vol. 25, no. 10, pp. 3217–3224, Oct. 2017, doi: 10.1007/s00520-017-3732-6.
- [67] S. Ruan, Y. Zhou, X. Jiang, and H. Gao, "Rethinking CRITID Procedure of Brain Targeting Drug Delivery: Circulation, Blood Brain Barrier Recognition, Intracellular Transport, Diseased Cell Targeting, Internalization, and Drug Release," *Advanced Science*, vol. 8, no. 9, May 2021, doi: 10.1002/advs.202004025.
- [68] C. Mattu *et al.*, "Alternating block copolymer-based nanoparticles as tools to modulate the loading of multiple chemotherapeutics and imaging probes," *Acta Biomater*, vol. 80, pp. 341–351, Oct. 2018, doi: 10.1016/j.actbio.2018.09.021.
- [69] R. Zhang *et al.*, "Construction of nanoparticles based on amphiphilic PEI–PA polymers for bortezomib and paclitaxel co-delivery," *RSC Adv*, vol. 5, no. 20, pp. 15453–15460, 2015, doi: 10.1039/C4RA16544F.

- [70] Z. C. Soe *et al.*, “Folate-targeted nanostructured chitosan/chondroitin sulfate complex carriers for enhanced delivery of bortezomib to colorectal cancer cells,” *Asian J Pharm Sci*, vol. 14, no. 1, pp. 40–51, Jan. 2019, doi: 10.1016/j.ajps.2018.09.004.
- [71] S. J. Sundar, J. K. Hsieh, S. Manjila, J. D. Lathia, and A. Sloan, “The role of cancer stem cells in glioblastoma,” *Neurosurg Focus*, vol. 37, no. 6, p. E6, Dec. 2014, doi: 10.3171/2014.9.FOCUS14494.
- [72] J. Nie *et al.*, “Co-delivery of docetaxel and bortezomib based on a targeting nanoplatform for enhancing cancer chemotherapy effects,” *Drug Deliv*, vol. 24, no. 1, pp. 1124–1138, Jan. 2017, doi: 10.1080/10717544.2017.1362677.
- [73] J. Zuidema, B. van Minnen, M. M. Span, C. E. Hissink, T. G. van Kooten, and R. R. M. Bos, “*In vitro* degradation of a biodegradable polyurethane foam, based on 1,4-butanediisocyanate: A three-year study at physiological and elevated temperature,” *J Biomed Mater Res A*, vol. 90A, no. 3, pp. 920–930, Sep. 2009, doi: 10.1002/jbm.a.32154.
- [74] H. Motaln, A. Koren, K. Gruden, Ž. Ramšak, C. Schichor, and T. T. Lah, “Heterogeneous glioblastoma cell cross-talk promotes phenotype alterations and enhanced drug resistance,” *Oncotarget*, vol. 6, no. 38, pp. 40998–41017, Dec. 2015, doi: 10.18632/oncotarget.5701.
- [75] S. Qi and Y. Liu, “Differences in protein expression between the u251 and u87 cell lines,” *Turk Neurosurg*, 2016, doi: 10.5137/1019-5149.JTN.17746-16.1.
- [76] S. Yu *et al.*, “Size- and charge-dependent non-specific uptake of PEGylated nanoparticles by macrophages,” *Int J Nanomedicine*, p. 799, Feb. 2012, doi: 10.2147/IJN.S28531.
- [77] S. Marino *et al.*, “The Extracellular Matrix in Glioblastomas: A Glance at Its Structural Modifications in Shaping the Tumoral Microenvironment—A Systematic Review,” *Cancers (Basel)*, vol. 15, no. 6, p. 1879, Mar. 2023, doi: 10.3390/cancers15061879.
- [78] D. J. Silver, M. Sinyuk, M. A. Vogelbaum, M. S. Ahluwalia, and J. D. Lathia, “The intersection of cancer, cancer stem cells, and the immune system: therapeutic opportunities,” *Neuro Oncol*, vol. 18, no. 2, pp. 153–159, Feb. 2016, doi: 10.1093/neuonc/nov157.
- [79] N.-F. Haruna and J. Huang, “Spheroid Invasion Assay With the Xeno-free Functional VitroGel® Hydrogel Matrix Application Note.”

- [80] S. Lively and L. C. Schlichter, "The microglial activation state regulates migration and roles of matrix-dissolving enzymes for invasion," *J Neuroinflammation*, vol. 10, no. 1, p. 843, Dec. 2013, doi: 10.1186/1742-2094-10-75.
- [81] J. Liu, Y.-Y. Liu, C.-S. Li, A. Cao, and H. Wang, "Exocytosis of Nanoparticles: A Comprehensive Review," *Nanomaterials*, vol. 13, no. 15, p. 2215, Jul. 2023, doi: 10.3390/nano13152215.
- [82] L. W. C. Ho *et al.*, "Mammalian Cells Exocytose Alkylated Gold Nanoparticles via Extracellular Vesicles," *ACS Nano*, vol. 16, no. 2, pp. 2032–2045, Feb. 2022, doi: 10.1021/acsnano.1c07418.
- [83] B. B. Manshian *et al.*, "The role of intracellular trafficking of CdSe/ZnS QDs on their consequent toxicity profile," *J Nanobiotechnology*, vol. 15, no. 1, p. 45, Dec. 2017, doi: 10.1186/s12951-017-0279-0.
- [84] R. E. Yanes *et al.*, "Involvement of Lysosomal Exocytosis in the Excretion of Mesoporous Silica Nanoparticles and Enhancement of the Drug Delivery Effect by Exocytosis Inhibition," *Small*, vol. 9, no. 5, pp. 697–704, Mar. 2013, doi: 10.1002/sml.201201811.
- [85] C. Strobel, H. Oehring, R. Herrmann, M. Förster, A. Reller, and I. Hilger, "Fate of cerium dioxide nanoparticles in endothelial cells: exocytosis," *Journal of Nanoparticle Research*, vol. 17, no. 5, p. 206, May 2015, doi: 10.1007/s11051-015-3007-4.
- [86] R. I. MacDonald, "Characteristics of self-quenching of the fluorescence of lipid-conjugated rhodamine in membranes.," *Journal of Biological Chemistry*, vol. 265, no. 23, pp. 13533–13539, Aug. 1990, doi: 10.1016/S0021-9258(18)77380-8.
- [87] M. Catalano, C. Serpe, and C. Limatola, "Microglial Extracellular Vesicles as Modulators of Brain Microenvironment in Glioma," *Int J Mol Sci*, vol. 23, no. 21, p. 13165, Oct. 2022, doi: 10.3390/ijms232113165.
- [88] L. W. C. Ho, B. Yin, G. Dai, and C. H. J. Choi, "Effect of Surface Modification with Hydrocarbyl Groups on the Exocytosis of Nanoparticles," *Biochemistry*, vol. 60, no. 13, pp. 1019–1030, Apr. 2021, doi: 10.1021/acs.biochem.0c00631.
- [89] M. Gabrielli *et al.*, "Microglial large extracellular vesicles propagate early synaptic dysfunction in Alzheimer's disease," *Brain*, vol. 145, no. 8, pp. 2849–2868, Aug. 2022, doi: 10.1093/brain/awac083.

- [90] A. Tchoryk *et al.*, "Penetration and Uptake of Nanoparticles in 3D Tumor Spheroids," *Bioconjug Chem*, vol. 30, no. 5, pp. 1371–1384, May 2019, doi: 10.1021/acs.bioconjchem.9b00136.
- [91] M.-C. Ku *et al.*, "GDNF mediates glioblastoma-induced microglia attraction but not astrogliosis," *Acta Neuropathol*, vol. 125, no. 4, pp. 609–620, Apr. 2013, doi: 10.1007/s00401-013-1079-8.
- [92] Saio, "Tumor-associated macrophage/microglia infiltration in human gliomas is correlated with MCP-3, but not MCP-1," *Int J Oncol*, vol. 34, no. 6, May 2009, doi: 10.3892/ijo_00000292.