



UNIVERSITÀ POLITECNICA DELLE MARCHE

**DIPARTIMENTO SCIENZE DELLA VITA E
DELL'AMBIENTE**

**Corso di Laurea Magistrale in
BIOLOGIA MOLECOLARE APPLICATA**

**Cellule tumorali pancreatiche sottoposte a campo magnetico statico:
variazione dell'assorbimento della doxorubicina in singole cellule**

**Pancreatic cancer cells under static magnetic field: variation of
doxorubicin uptake in single cells**

Tesi di Laurea Magistrale di:

Matteo Orlando

Relatore Chiar.mo

Prof. Francesco Piva

Correlatore:

Dott. Monia Cecati

Sessione autunnale

Anno Accademico 2021 / 2022

1. INTRODUZIONE.....	1
1.1. Tumore al pancreas.....	1
1.1.1 Cause dell'adenocarcinoma duttale pancreatico e fattori di rischio..	4
1.1.2 Mutazioni genetiche correlate al PDAC.....	10
1.1.3 Componenti immunologiche nel microambiente tumorale.....	17
1.1.4 Stroma del PDAC.....	20
1.2 Linea cellulare PANC-1.....	24
1.3 Doxorubicina.....	25
1.4 Farmacoresistenza.....	31
1.5 Microscopia a fluorescenza	39
1.6 Campo magnetico.....	45
1.6.1 I campi elettromagnetici.....	45
1.6.2 I possibili effetti sull'uomo.....	48
1.6.3 I campi magnetici statici.....	50
1.6.3.1 Effetti sulle cellule.....	51
2. SCOPO DELLA TESI.....	60
3. MATERIALI E METODI.....	61
3.1.Colture cellulari.....	61
3.1.1. Trattamento con Verapamil.....	64
3.2.Conteggio cellulare e camera di Burker.....	64

3.3. Microscopio e Software NIS Element.....	66
4. RISULTATI.....	74
4.1 Campioni sottoposti a campo magnetico statico.....	75
4.2 Campioni non sottoposti a campo magnetico statico.....	88
4.3 Valutazione dell'efflusso della doxorubicina dalle cellule.....	102
4.4 Analisi dei risultati.....	125
4.4 Trattamento con verapamil.....	130
5. DISCUSSIONE.....	133
6. BIBLIOGRAFIA.....	139
7. RINGRAZIAMENTI.....	146

1. INTRODUZIONE

1.1. Tumore al pancreas

L'adenocarcinoma pancreatico è attualmente la terza causa di morte tra le neoplasie nei soggetti di sesso maschile di età compresa tra 35 e 54 anni, con tassi di sopravvivenza a 5 anni che rimangono costanti al 6%. A causa di un aumento dell'incidenza di patologie quali obesità e sindrome metabolica, l'adenocarcinoma duttale pancreatico (PDAC) si appresta a diventare la seconda causa più comune di morte per cancro entro il 2030. L'alto tasso di mortalità del PDAC deriva principalmente dalla mancanza di diagnosi precoce, all'elevata incidenza di recidive e dal trattamento inefficace per il tumore in stato avanzato (Ying et al 2016). Inoltre, la mancanza di marcatori prognostici e di screening programmati non agevolano la diagnosi precoce del PDAC, per cui essa viene formulata solo quando il tumore è già in uno stadio avanzato e si è diffuso in altre parti del corpo.

Sebbene possa presentarsi attraverso varie forme, il cancro del pancreas viene classificato come:

- adenocarcinoma pancreatico, che è il più comune (85% dei casi) ed insorge nelle ghiandole esocrine del pancreas

- il tumore neuroendocrino pancreatico (PanNET), che è meno comune (meno del 5%) e si verifica nel tessuto endocrino del pancreas.

Nonostante le cellule duttali rappresentino solo il 20-30% del normale parenchima pancreatico, l'adenocarcinoma duttale pancreatico (PDAC) costituisce il più comune tumore del pancreas. Nel contesto della neoplasia del pancreas parlare di tumore pancreatico significa, nella maggioranza dei casi, riferirsi all'adenocarcinoma duttale.

L'età media al momento della diagnosi del PDAC è di 71 anni, con il 75% dei casi diagnosticati tra i 55 e gli 84 anni ed è più comune negli uomini che nelle donne con un rapporto di 1,5:1, ma per entrambi i sessi il tasso di incidenza aumenta con l'età. Dati statistici, inoltre, mostrano che il tasso di incidenza varia non solo tra i sessi ma anche tra le diverse aree geografiche: Europa e Nord America riportano rispettivamente un'incidenza di 7,7 e 7,6 individui colpiti ogni 100.000 abitanti, mentre in Africa è stata registrata una minor frequenza di casi con 2,2 individui colpiti ogni 100.000 abitanti. I motivi di tali differenze non sono ancora stati chiariti; tuttavia, è plausibile che l'ambiente e/o l'esposizione a determinati fattori di rischio spieghino le variazioni di frequenza osservate.

In Italia si sono avuti 13500 nuove diagnosi di carcinoma pancreatico, il 3% di tutti i tumori secondo le ultime stime di AIRTUM (associazione italiana dei registri tumori) (AIOM 2020). Per quanto concerne la mortalità, il carcinoma pancreatico rappresenta la quarta causa di morte nel sesso femminile (7%) e la sesta nel sesso maschile (5%). L'adenocarcinoma pancreatico ha una prognosi molto sfavorevole, in genere dopo la diagnosi, solo il 24% delle persone sopravvive 1 anno, il 9% dopo 5 anni e al 3% dopo 10 anni. (Rawla P. et al. 2019).

In base allo stadio clinico del tumore, il carcinoma pancreatico è classificato in quattro tipi:

- I (non diffuso o resecabile), il tumore è limitato al pancreas ed è grande tra i 2 cm e i 4 cm ;
- II (diffusione locale o borderline resecabile), le dimensioni del tumore sono maggiori di 4 cm e la sua localizzazione è limitata al pancreas, oppure è diffuso localmente ai linfonodi vicini;
- III (più ampia o non resecabile), il cancro può essersi espanso ai vasi sanguigni o ai nervi vicini, ma non è metastatizzato in siti distanti;
- IV (metastatico), il cancro si è diffuso ad organi distanti.

1.1.1 Cause dell'adenocarcinoma duttale pancreatico e fattori di rischio

Ad oggi, le cause del carcinoma pancreatico sono ancora poco conosciute, anche se sono stati identificati alcuni fattori di rischio, come il fumo di tabacco, il diabete mellito, l'obesità, abitudini alimentari (ad es.: l'elevato consumo di carni rosse, carni trasformate e di cibi fritti, l'abuso di alcol), l'età, l'etnia, la storia familiare e fattori genetici, infezione da *Helicobacter pylori* e pancreatite cronica. Nel 5-10% dei pazienti affetti da tumore pancreatico è presente una familiarità con la patologia legata ad alterazioni della linea germinale (Landi, S. et al 2009). Si tratta di alterazioni note legate a sindromi predisponenti a diversi tipi di tumore. Queste alterazioni possono essere la causa sia di PDAC familiari che sporadici. L'associazione fra tumore pancreatico con storia familiare e rischio di svilupparlo sembrerebbe essere dovuto sia alla componente genetica che ad altri fattori di rischio che i membri della stessa famiglia condividono: i soggetti con storia familiare di tumore pancreatico hanno un rischio relativo di svilupparlo aumentato dalle 2, 6 alle 30 volte rispetto alla popolazione generale, a seconda che i parenti affetti di primo grado (genitori, fratelli e figli) siano rispettivamente uno, due o tre. (Jacobs, E. J. et al. 2010).

Esistono alcune patologie genetiche ereditarie che predispongono i soggetti allo sviluppo dell'adenocarcinoma duttale del pancreas. Alcune di queste patologie sono di seguito elencate:

- Carcinoma ereditario della mammella e dell'ovaio (HBOC); HBOC è caratterizzata dall'insorgenza precoce del tumore alla mammella e all'ovaio causato da mutazioni nella linea germinale dei geni BRCA1 o BRCA2. Sono entrambi geni oncosoppressori che codificano per proteine che riparano le rotture della doppia elica di DNA. Alcuni studi indicano un aumento del rischio di circa 2 volte nei pazienti con mutazioni BRCA1; la mutazione di BRCA2 è associata ad un aumento del rischio relativo di 3,5 volte (Becker, A. E. et al 2014).
- Sindrome di Peutz-jeghers (PJS); PJS è caratterizzata da poliposi gastrointestinale e pigmentazioni muco-cutanee in prossimità delle labbra e della regione periorale. È associata alla mutazione del gene oncosoppressore STK11/LKB1 che codifica per una chinasi localizzata sia nel nucleo che nel citoplasma delle cellule di tutti i tessuti umani. L'esatto meccanismo con cui LKB1 agisce come soppressore tumorale è sconosciuto. I pazienti affetti da questa sindrome presentano un rischio 132 volte maggiore di sviluppare PDAC.

- Pancreatite ereditaria (HP); è caratterizzata da ricorrenti attacchi di pancreatite acuta a partire dall'infanzia. L'80% dei soggetti affetti da HP hanno una mutazione del gene PRSS1, che codifica per il tripsinogeno cationico, precursore della tripsina. Mutazioni autosomiche dominanti di questo gene provocano una maggiore attività della tripsina all'interno del parenchima pancreatico, portando all'irritazione e all'autodigestione degli stessi dotti. Attualmente l'incidenza dell'adenocarcinoma pancreatico nei pazienti affetti da pancreatite ereditaria è aumentata di 53 volte rispetto alla popolazione generale (Weiss, F. U et al 2014).

Oltre ai fattori genetici prima descritti, esistono altri fattori di rischio predisponenti allo sviluppo del tumore in sede pancreatica. Secondo uno studio del gruppo di Maisonneuve che ha riassunto la numerosa letteratura (86 meta analisi e 31 analisi di dati aggregati) del 2014 è stato stimato il rischio relativo a ciascun fattore (Maisonneuve, P. & Lowenfels, A. B et al 2014). Di seguito ne sono riportati alcuni:

- Il tabacco conferma avere un ruolo causativo per il tumore al pancreas; i fumatori hanno un rischio aumentato da 1,5 a 2,2 volte rispetto ai non fumatori. Tale rischio aumenta con un consumo maggiore e prolungato.

- In passato il consumo di alcool non era stato considerato un fattore di rischio. Tuttavia, dalla revisione della letteratura è emerso che un consumo pari o superiore a 30g/die (corrispondenti a 3 bicchieri di qualsiasi alcolico) è associato ad un aumento del rischio fino al 20% rispetto alla popolazione generale.
- Numerosi studi indicano che alcuni aspetti nutrizionali e dietetici possono rappresentare un fattore di rischio per lo sviluppo di neoplasie al pancreas e per il cancro in generale; un aumento del rischio è stato rilevato per l'apporto di carne, prodotti caseari, uova, latte, fritti, uno scarso consumo di frutta fresca, verdura fresca e fibre;
- Altri fattori, come la pancreatite, la colecistectomia, l'infezione da H. pylori e l'infezione da virus dell'epatite sono noti essere coinvolti nei meccanismi di infiammazione cronica, una via di sostentamento della carcinogenesi

La trasformazione della cellula carcinomatosa è il risultato di una graduale progressione nella quale sono coinvolte alterazioni molecolari multiple come l'attivazione di oncogeni, l'inattivazione di geni oncosoppressori, mutazioni di geni preposti alla conservazione del genoma e complessi fattori di crescita e loro recettori (Ryan, D. P. et al 2014, Fokas, E. et al. 2015).

La progressione che permette la trasformazione di un tessuto pancreatico normale in un adenocarcinoma pancreatico consiste in una sequenza ben descritta di eventi istopatologici e biologici. Sono state istologicamente definite distinte lesioni iniziali (pre-neoplastiche) nel tumore del pancreas; queste lesioni comprendono le neoplasie intraepiteliali pancreatiche (PanIN), la neoplasia intraduttale papillare mucinosa (IPMN) e la neoplasia cistica mucinosa (MCN).

La maggioranza dei PDAC origina dalle lesioni PanIN, mentre sporadicamente dalle lesioni IPMN e MCN. Le PanIN sono lesioni microscopiche (inferiori a 5 mm) dei dotti pancreatici più piccoli; possono essere papillari o piane e sono composte da cellule cuboidali o colonnari con varie quantità di mucina. Le lesioni PanIN sono sottoclassificate in PanIN-1, PanIN-2 e PanIN-3 in base al grado di atipia architetturale e citologica. Queste lesioni sono spesso presenti nel parenchima pancreatico adiacente all'adenocarcinoma infiltrante e numerosi case-reports hanno documentato pazienti che da una lesione PanIN hanno successivamente sviluppato un carcinoma pancreatico infiltrante (Hruban, R. H. et al. 2000) (Fig.1).

Più recentemente, questa classificazione a tre livelli è stata sostituita da una classificazione a due livelli, a basso grado (PanIN-1 e PanIN-2) e ad alto grado (PanIN-3), che riconosce che il maggior potenziale biologico di

progressione si trova in queste ultime lesioni e che queste dovrebbero essere oggetto di sforzi di diagnosi precoce (Basturk et al. 2015). L'evidenza che le lesioni PanIN possiedono un potenziale maligno deriva da osservazioni di un aumento della prevalenza di PanIN con l'età e l'aumento dell'incidenza del cancro, la loro prossimità fisica al cancro invasivo in campioni resecati, la loro pervasività nel pancreas di individui con una forte storia familiare di cancro al pancreas, e uno spettro completo di PanINs osservato prima della tumorigenesi in modelli di topi geneticamente modificati.

Mentre le lesioni di basso grado sono frequentemente osservate nel pancreas adulto normale o in pazienti con pancreatite cronica e sono associate con un basso rischio di sviluppare PDAC, le lesioni di alto grado PanIN-3 si trovano quasi esclusivamente in pazienti con PDAC invasivo (Sipos et al. 2009).

Studi genetici, inoltre, hanno rilevato che la progressione dal basso grado di displasia (PanIN-1A e PanIN-1B) all'alto grado di displasia (PanIN-2, PanIN-3) fino al carcinoma invasivo, avviene parallelamente all'accumulo progressivo di mutazioni genetiche. Il carcinoma del pancreas, infatti, può essere definito come una malattia genetica caratterizzata da una media di 63 geni mutati e diversi pathway alterati.

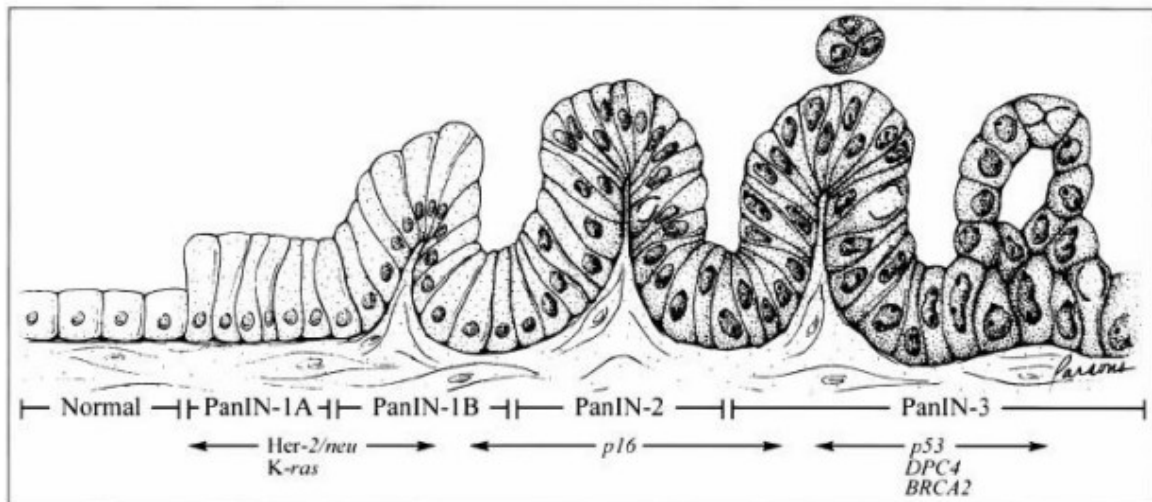


Fig. 1. Modello di progressione del tumore pancreatico (Hruban, R. H. et al. 2000)

1.1.2 Mutazioni genetiche correlate al PDAC

Negli ultimi anni molti studi si sono concentrati nell'identificare gli eventi molecolari che caratterizzano lo sviluppo dell'adenocarcinoma pancreatico. Le mutazioni genetiche più comunemente riscontrate sono a livello degli oncogeni e dei geni soppressori del tumore; di seguito analizzeremo le mutazioni di principale interesse.

La mutazione oncogena di K-RAS è l'evento genetico che caratterizza la progressione e la crescita del PDAC. Circa il 95% dei PDAC possiede una mutazione K-RAS attiva, ma fino ad oggi nessun trattamento efficace contro questa proteina mutante ha raggiunto la sperimentazione clinica. Una serie di studi ha dimostrato che K-RAS oncogeno è sempre presente nelle lesioni PanIN e gioca un ruolo centrale nel controllo del metabolismo tumorale

orchestrando molteplici cambiamenti metabolici, tra cui la stimolazione dell'assorbimento del glucosio, il metabolismo della glutammina e l'aumentata autofagia.

K-ras (oncogene del virus del sarcoma di Kirsten Rat) è uno dei 3 protooncogeni appartenenti alla famiglia RAS (H-RAS, N-RAS, K-RAS) che codifica per 2 diverse GTPasi ottenute in seguito a splicing alternativo a livello dell'esone 4: KRAS4A e KRAS4B (L. Bryant et al. 2014).

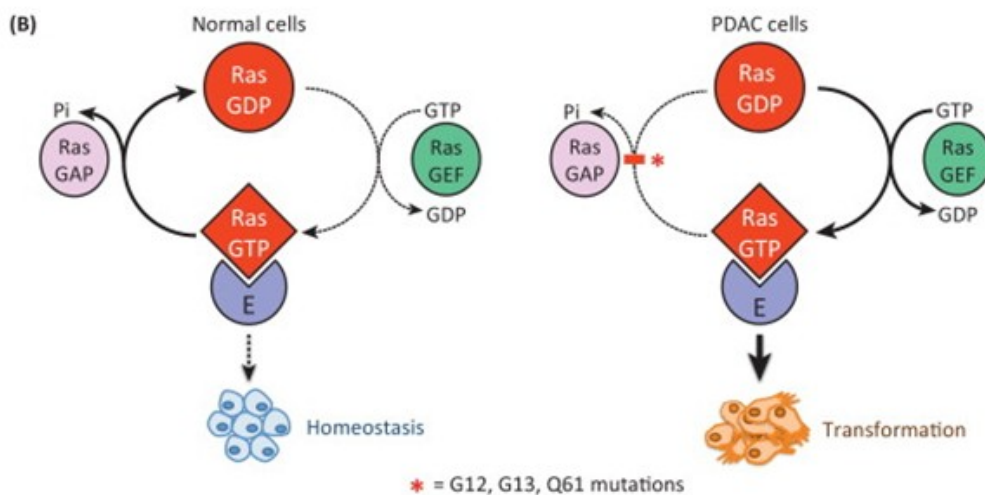


Fig. 2. Meccanismo di attivazione di K-Ras (L. Bryant et al. 2014).

Normalmente, le singole proteine RAS si trovano nello stato inattivo quando sono legate al GDP, e attivo quando sono legate al GTP. Il ciclo RAS-GDP-GTP è regolato da fattori di scambio guaninici (GEF) che promuovono l'attivazione di RAS consentendo lo scambio del GDP con GTP, e da proteine

attivanti le GTPasi (GAP) che guidano l'idrolisi del GTP mediata da RAS, la quale ritorna così nello stato inattivo (Fig.2).

L'attivazione della proteina Ras da parte dei fattori di scambio guaninici si ha quando un ligando extracellulare (in genere un fattore di crescita) si lega ad un recettore tirosin chinasi (RTK) posto sulla membrana plasmatica. Questo legame causa l'autofosforilazione delle tirosine localizzate nella porzione intracellulare del recettore. L'auto-fosforilazione promuove l'interazione del recettore con i fattori di scambio guaninici (GEF) che a questo punto potranno interagire con la proteina Ras e sostituire il GDP con il GTP. Una volta attivata, RAS-GTP, interagendo con numerosi effettori a valle, gioca un ruolo essenziale nel controllo dell'omeostasi cellulare, regolando i processi di proliferazione, crescita e sopravvivenza cellulare (Fig. 3).

K-Ras mutata diventa insensibile alla stimolazione mediata da GAP, restando così in uno stato sempre attivo. Gli effetti di K-Ras a livello cellulare dipendono da quanto è attivo nella cellula. Livelli molto elevati di proteine Ras attive, in genere, portano all'arresto del ciclo cellulare e alla senescenza. Tuttavia, se i meccanismi di senescenza sono compromessi, alti livelli di proteine Ras attive portano alla trasformazione neoplastica.

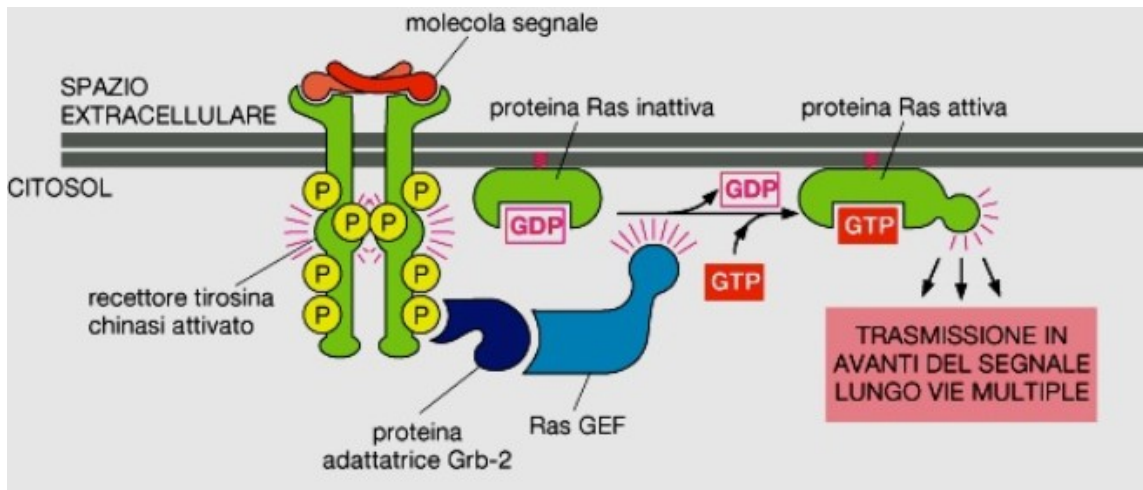


Fig. 3. Meccanismo di attivazione della proteina Ras.

Il gene CDKN2A, noto anche come p16INK4A, si trova sul braccio corto del cromosoma 9 (9p); le mutazioni somatiche ad esso associate sono presenti nel 95% dei tumori pancreatici. Il gene CDKN2A codifica per la proteina p16, la quale appartiene alla famiglia degli inibitori delle chinasi ciclino-dipendenti (CDK). Questa proteina svolge un ruolo importante nella regolazione del ciclo cellulare, in quanto normalmente blocca la crescita e la proliferazione anormale delle cellule legandosi ai complessi ciclina D-Cdk4 e ciclina D-Cdk6. Tale legame non permette più alle chinasi di fosforilare Rb e liberare E2F1, per cui il ciclo cellulare si arresta in fase G1. La perdita di p16INK4A/CDKN2A provoca una maggiore fosforilazione di Rb, facilitando così la progressione del ciclo cellulare dalla fase G1 a S e contribuendo quindi alla trasformazione tumorale.

La proteina Rb, infatti, limita la proliferazione cellulare bloccando l'attività del fattore di trascrizione E2F, che attiva la trascrizione dei geni necessari per la replicazione del DNA. Quando Rb è fosforilato dalla ciclina D e dalle chinasi E-dipendenti durante la fase G1 del ciclo cellulare, Rb non può bloccare la trascrizione E2F-dipendente e la cellula può progredire alla fase sintetica del DNA (fase S).

L'altra proteina codificata dal locus CDKN2A, p14ARF, ha effetti negativi sulla crescita in quanto serve a stabilizzare p53. Quando p53 è attivata, interagisce con vari bersagli a valle che possono arrestare le chinasi ciclina-dipendenti in fase G1 e G2 e avviare l'apoptosi. Sia p16 che p14 sembrano essere coinvolti nella prevenzione della trasformazione neoplastica.

Una delle funzioni della proteina p14ARF è quella di sopprimere la proliferazione cellulare in risposta a insulti oncogeni attivando il fattore di trascrizione p53 che, a sua volta, innesca l'espressione di molti induttori apoptotici e geni inibitori del ciclo cellulare. In presenza di stimoli oncogeni p14ARF lega la E3 ubiquitina ligasi p53-specifica (Mdm2) e la mantiene nel nucleolo. Questo evento impedisce l'interazione tra Mdm2 e p53 bloccando il trasporto nel citoplasma di p53 e la sua degradazione da parte del proteasoma.

(D. Cilluffo et al. 2020)

La proteina p53, codificata dal gene p53 localizzato sul cromosoma 17, svolge un ruolo centrale nel modulare le risposte cellulari allo stress citotossico contribuendo sia all'arresto del ciclo cellulare sia alla morte cellulare programmata. Nel carcinoma pancreatico, il gene soppressore del tumore p53 viene inattivato nel 50-75% dei casi e si manifesta principalmente attraverso una singola perdita allelica accoppiata a una mutazione intragenica del secondo allele. La perdita di funzione del gene p53 si traduce quindi in una crescita cellulare inappropriata e in un aumento della sopravvivenza cellulare (JB. Koorstra et al. 2008).

Il gene SMAD4, noto anche come DPC4 (deleted in pancreatic carcinoma, locus 4) si trova sul cromosoma 18q21 ed è inattivato in circa il 50-60% dei PDAC. Il prodotto proteico del gene SMAD4 è implicato nella regolazione trascrizionale e si localizza nel nucleo in seguito all'attivazione della cascata di segnalazione intracellulare mediata da TGF- β . Una volta che Smad4 è nel nucleo, controlla la crescita cellulare regolando l'espressione di specifici bersagli genici (A. Maitra et al. 2006).

La perdita di SMAD4 interferisce con le cascate di segnalazione intracellulare a valle del TGF- β , con conseguente diminuzione dell'inibizione della crescita attraverso la perdita della segnalazione pro-apoptotica o attraverso una

transizione G1/S inappropriata (JB. Koorstra et al. 2008). Anche se si presume che l'inibizione della crescita di TGF- β sia importante per l'attività di soppressione tumorale di SMAD4, i dati hanno anche suggerito un'indipendenza di SMAD4 da TGF- β . Questa include una diminuzione nell'espressione pro-angiogenica del VEGF e un aumento dell'inibitore dell'angiogenesi TSP-1 (G. Schneider e R. Schmid, 2003). Quindi, SMAD4 svolge un ruolo di soppressore tumorale anche tramite la regolazione del meccanismo angiogenico.

BRCA2 appartiene alla famiglia dei geni oncosoppressori e il suo prodotto genico è coinvolto nella riparazione dei tratti cromosomici danneggiati, con un ruolo importante nella riparazione degli errori e delle rotture nel doppio filamento di DNA. Solitamente le mutazioni di questo gene consistono nella codifica di una proteina che non funziona correttamente. Nel carcinoma pancreatico BRCA2 è inattivato nel 7-10% e recentemente è stata dimostrata l'inattivazione biallelica in una lesione del dotto di alto grado, per cui si presume che la mutazione di BRCA2 si verifica nella fase avanzata della progressione neoplastica nel pancreas (M.Goggins et al. 2000)

1.1.3 Componenti immunologici nel microambiente tumorale

L'infiammazione gioca un ruolo fondamentale nell'inizio, nella progressione, nell'invasione e nelle metastasi del cancro (Greer e Whitcomb 2009; Solinas et al. 2010). Nella ricerca sul PDAC, i dati derivati da modelli murini, studi genetici umani e indagini clinici ed epidemiologici hanno stabilito un modesto legame tra la pancreatite e un aumento del rischio di sviluppo del cancro al pancreas (cioè, il 5% dei pazienti svilupperà PDAC in un periodo di 20 anni dopo la pancreatite) (Guerra et al. 2007).

I linfociti T costituiscono la componente principale cellulare del sistema immunitario adattativo e servono a modulare la difesa immunitaria dopo l'individuazione degli antigeni non self da parte delle cellule presentanti l'antigene (APC). Dopo l'attivazione da parte delle APC, le cellule T proliferano e migrano verso il sito dove sono presenti gli antigeni ed eseguono funzioni distinte come la citotossicità cellulo-mediata da parte dei linfociti T citotossici CD8⁺ o la produzione di citochine da parte dei linfociti T-helper CD4⁺. La presenza di cellule T effettrici CD8⁺ (anche note come linfociti infiltranti il tumore [TILs]) è correlata ad una migliore prognosi in molti tipi di cancro, tra cui melanoma e tumori della testa e del collo, della prostata, polmone, colon, seno, vescica e ovaio.

Nel PDAC umano, il numero di TIL è piuttosto variabile e probabilmente è influenzato dal carico di mutazioni nel singolo tumore. L'inibizione dell'attivazione delle cellule TIL è dovuta alla presenza di cellule T-reg e citochine immunosoppressive, che dominano il microambiente tumorale. I modelli murini PDAC mostrano poche TIL e una scarsa risposta immunitaria anti-tumorale (Feig et al. 2013). Una spiegazione per la scarsa infiltrazione di cellule T CD8+ può essere la generale mancanza di neoantigeni nel PDAC. In contrasto con l'abbondanza di neoantigeni indotti dalla mutazione in altri importanti tumori KRAS-dipendenti come i tumori del polmone e del colon-retto, il carico mutazionale in PDAC è meno evidente, il che rende meno probabile la presenza di neoantigeni che possono essere riconosciuti dalle cellule T (Schumacher e Schreiber 2015).

Come principale modulatore della funzione delle cellule T CD8+, la comprensione del ruolo delle cellule T CD4+ nel PDAC è complicato dalla presenza di molte varianti delle cellule T CD4+ come le cellule Th1, Th2 e Th17. La determinazione della risposta cellulare effettrice Th1 o Th2 dipende dalla presenza di determinate citochine nel sito del tumore, in quanto la presenza di IL2 e IL12 innesca una risposta Th1, mentre IL4 innesca una risposta Th2. L'importanza e la natura immunosoppressiva della dominante sottopopolazione di cellule T CD4+ in PDAC è sottolineata da osservazioni

che la deplezione delle cellule T CD4⁺ in un tessuto con PDAC blocca la formazione di PanIN in gran parte attraverso l'attivazione delle cellule T CD8⁺ (Zhang et al. 2014). Infatti, si è scoperto che le cellule di tipo Th2 risiedono nel microambiente del PDAC e sopprimono la funzione delle cellule T CD8⁺ producendo citochine come IL-4, IL-5 e IL-10 (De Monte et al. 2011).

In contrasto con l'attività protumorale delle cellule Th2, le cellule Th1 probabilmente antagonizzano la crescita tumorale attraverso la produzione di IL-2 e IFN- γ , un passo essenziale per l'induzione dell'immunità cellulare.

Oltre alle cellule Th2, un altro tipo importante di cellula T immunosoppressiva è la cellula T-reg, abbondante nel microambiente del PDAC (Zhang et al. 2014). Le cellule T-reg funzionano principalmente come soppressori dell'immunità innata e adattativa dell'ospite attraverso produzione di granzima B, che inibisce le cellule NK e le cellule B (Cao et al. 2007) ma possono anche promuovere direttamente la progressione del tumore attraverso la secrezione di fattori pro-tumoralmente come TGF β 1, TNF α , e IL-6 (Byrne et al. 2011). Il numero di cellule T-reg nel tumore si correla positivamente con l'avanzamento del grado istologico e l'aumento delle metastasi linfonodali (Jiang et al. 2014).

Il TGF β prodotto dallo stroma del PDAC può anche guidare la conversione e l'espansione delle cellule T-reg dalle cellule T CD4⁺ convenzionali nel microambiente tumorale, e questo processo può essere bloccato dall'iniezione sistemica di un anticorpo anti-TGF β (Moo-Young et al. 2009). Mentre l'esatta funzione delle cellule T-reg nello sviluppo del PDAC deve ancora essere approfondita utilizzando modelli in vivo, la deplezione delle cellule T-reg con ciclofosfamide ha dimostrato di migliorare la risposta infiammatoria indotta da un vaccino antitumorale che ha come bersaglio Kras (Keenan et al. 2014).

1.1.4 Stroma del PDAC

Lo stroma del PDAC influisce sul metabolismo cellulare regolando le interazioni chiave tra le cellule tumorali e i fibroblasti stromali, che donano i combustibili necessari (come L-lattato, chetoni, glutammina, altri amminoacidi e acidi grassi) alle cellule tumorali anaboliche, che li metabolizzano attraverso il loro ciclo TCA e la fosforilazione ossidativa (Lisanti et al. 2013). Le interazioni metaboliche nel microambiente possono anche consentire la progressione del tumore attraverso la soppressione delle risposte immunitarie. In particolare, la competizione per molecole come il glucosio sembra limitare la disponibilità di fonti di energia necessarie all'attivazione delle cellule T effettrici, con conseguente soppressione

immunitaria nel microambiente tumorale, come dimostrato da studi in vitro (Chang et al. 2015). Inoltre, il lattato escreto dalle cellule tumorali ha dimostrato di sopprimere l'immunità antitumorale inibendo le cellule natural killer (NK) (Husain et al. 2013). La mancanza di infiltrazione e attivazione delle cellule T effettrici è un segno distintivo del microambiente del PDAC (Feig et al. 2013), anche se la base della soppressione immunitaria nel PDAC non è completamente compresa.

Il tessuto stromale del PDAC è costituito da componenti cellulari e acellulari, come fibroblasti associati al cancro (CAF), miofibroblasti, cellule immunitarie, vasi sanguigni, matrice extracellulare e proteine solubili come citochine e fattori di crescita. Il microambiente tumorale favorisce la crescita, la proliferazione e la progressione delle cellule tumorali del pancreas che varia per composizione e dimensioni durante la sua progressione (Fig.4); la massa tumorale è altamente dinamica e la sua composizione e le sue dimensioni variano durante la progressione del tumore (A. Bulle et al. 2017).

Le cellule stellate pancreatiche (PSC) sono i fibroblasti predominanti presenti nello stroma del PDAC. Nel pancreas sano, le PSC sono cellule residenti che immagazzinano lipidi e che secernono metalloproteinasi di matrice (MMPs) come MMP2, MMP9 e MMP13 e svolgono un ruolo importante nel turnover della matrice extracellulare (ECM); (Phillips et al. 2003).

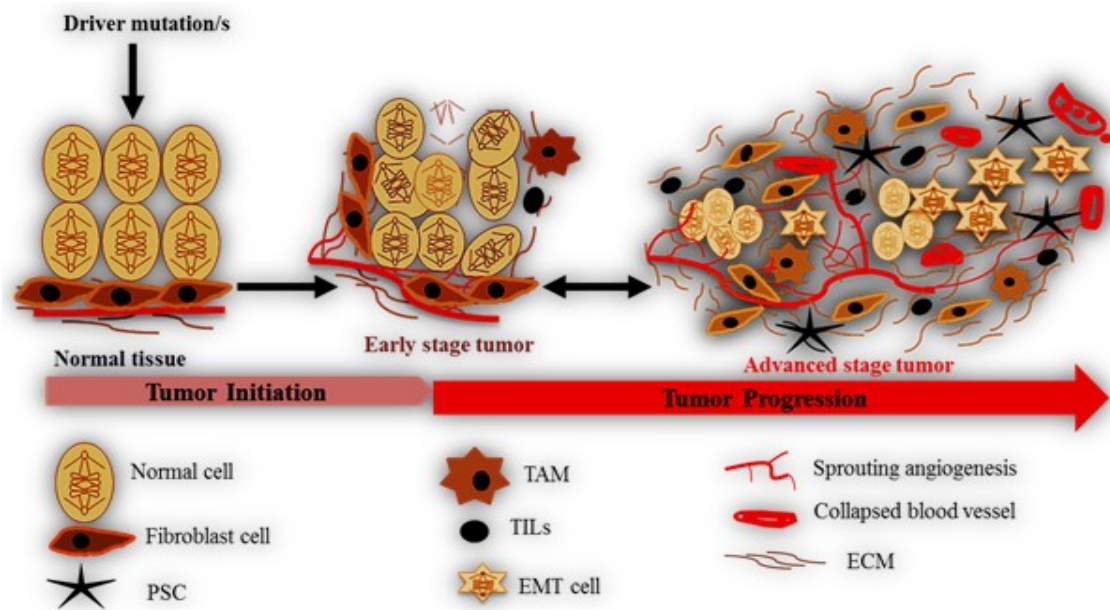


Fig. 4. Il microambiente tumorale del PDAC. (A.Bulle et al. 2017).

Nello stato quiescente, le PSC producono una minore quantità di ECM (V. Apte et al. 2012). Invece, al momento della lesione pancreatica, come in una pancreatite cronica e/o a causa dello sviluppo del PDAC, le PSC aumentano la produzione di ECM e acquisiscono un fenotipo simile a quello dei miofibroblasti. Durante la carcinogenesi, quindi, vengono attivate dalla stimolazione derivante dai fattori rilasciati dalle cellule tumorali (aPSC).

Queste PSC attivate (chiamate anche CAF) secernono quantità eccessive di ECM, portando alla classica patologia di fibrosi osservata nella PDAC (V. Apte e S. Wilson 2012). Le PSC quiescenti possono diventare “attive” attraverso diversi meccanismi; in particolare, si è visto che le cellule

pancreatiche tumorali rilasciano nel microambiente interleuchine (IL-1, IL-6) e fattori di crescita come quello trasformante β (TGF- β), e il fattore di crescita dei fibroblasti (FGF), in grado di stimolare l'attivazione dei CAF (Q. Sun et al. 2018).

Numerosi studi hanno evidenziato il profondo legame presente tra il microambiente tumorale e i fibroblasti associati al cancro (CAF) che permette di promuovere la proliferazione e la crescita del tumore, accelerare l'invasione e la metastasi, indurre angiogenesi, promuovere l'infiammazione e l'immunosoppressione, regolare il metabolismo del tumore e indurre chemioresistenza (Fig. 5).

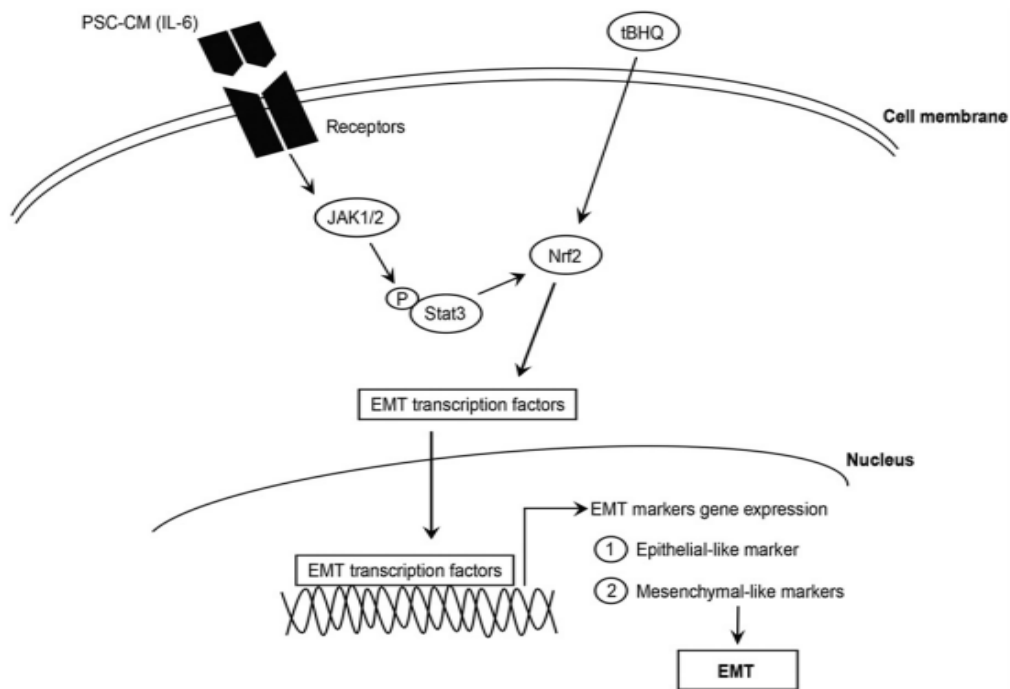


Fig. 5. Ruolo dell'IL-6 secreta dalle PSC nell'induzione di EMT tramite la via di segnalazione Stat3 / Nrf2. (Y.S. Wu et al. 2017).

1.2 Linea cellulare PANC-1

PANC-1 è una linea cellulare umana epitelioide di cancro al pancreas, isolata da un carcinoma pancreatico di origine duttale.

La linea cellulare PANC-1 deriva dal tessuto di un uomo di 56 anni. La natura maligna di questa linea cellulare è stata verificata tramite osservazione di crescita delle cellule PANC-1 in agar e su un monostrato di fibroblasti e dalla formazione di un carcinoma anaplastico dopo iniezione di cellule PANC-1 in un topo privo di timo (www.atcc.org). Le cellule sono generalmente grandi, con molte cellule giganti multinucleate presenti.

La linea cellulare PANC-1 cresce con tipica morfologia epitelioide su superfici plastiche.

Le cellule PANC-1 presentano una mutazione missenso eterozigote nel codone 12 di KRAS (p.G12D; GGT > GAT), una delezione omozigote degli esoni 1, 2 e 3 del gene CDKN2A/p16 INK4A e due varianti missenso nel gene TP53, una nell'esone 4 (p.P72R; CCC > CGC) e un altro nell'esone 8 (p.R273H; CGT > CAT).

Le cellule PANC-1 esprimono i marcatori epiteliali CK5.6 e AE1/AE3 e il marcatore mesenchimale vimentina, consentendo loro di essere caratterizzati come cellule epiteliali-mesenchimali. L'attivazione di un programma EMT è il meccanismo essenziale per l'acquisizione di un fenotipo maligno da parte

delle cellule tumorali epiteliali e il segno distintivo dell'EMT è la perdita della molecola di adesione epiteliale E-caderina e il guadagno del marcatore mesenchimale vimentina (Kalluri et al. 2009). È stato dimostrato che l'EMT contribuisce alla resistenza ai farmaci nel cancro del pancreas e che una maggiore espressione di E-caderina è associata a una migliore sopravvivenza in diversi tipi di tumore (Arumugam T. et al. 2009).

1.3 Doxorubicina

Le antracicline sono una tra le classi di farmaci più ampiamente utilizzate nella lotta al cancro. Considerate un pilastro della terapia per diversi decenni, i regimi chemioterapici contenenti antracicline hanno dimostrato benefici in termini di tasso di risposta, tempo di progressione della malattia e sopravvivenza globale (Winer et al 2001).

Le prime due antracicline sono state isolate dallo *Streptomyces peucetius*, all'inizio degli anni '60 e furono chiamate doxorubicina (DOX) e daunorubicina (DNR). Entrambe le molecole possiedono gruppi agliconici e gruppi zuccherini. La parte non zuccherina consiste in un anello tetraciclico che si lega allo zucchero, chiamato daunosamina, tramite un legame glicosidico. L'unica differenza tra queste due molecole è il fatto che la catena

laterale della DOX termina con un alcool primario, mentre quella della DNR termina con un gruppo metile.

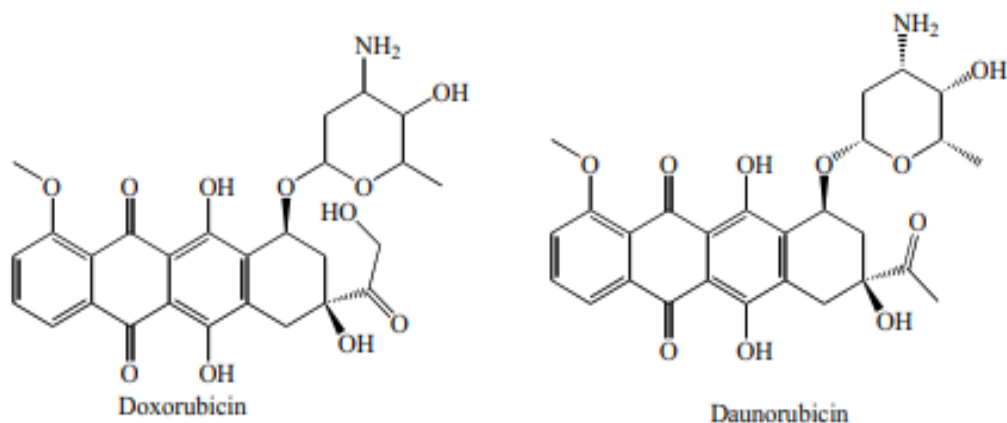


Fig. 6. Struttura chimica (Carvalho et al. 2009)

La DOX è ampiamente utilizzata in chemioterapia nel trattamento dei tumori solidi e dei tumori maligni ematologici, tra cui il seno, prostata, utero, ovaie, stomaco, fegato, sarcomi ed osteosarcomi (Danesi R. et al, 2002).

Molti studi hanno attribuito l'attività antitumorale della DOX alla sua capacità di intercalarsi nell'elica del DNA e/o legarsi covalentemente alle proteine coinvolte nella sua replicazione e trascrizione (Box et al, 2007). Tali interazioni provocano l'inibizione della sintesi del DNA, dell'RNA e delle proteine, portando infine alla morte cellulare (Cutts et al, 1996).

Diversi studi hanno classificato la DOX come un inibitore della topoisomerasi II. La famiglia di quest'enzima modifica la topologia del DNA senza alterarne la struttura e la sequenza, favorendo lo svolgimento della doppia elica di

DNA per la trascrizione e la replicazione e portando alla formazione di un complesso intermedio, chiamato "complesso scindibile" (Swift et al 2006).

La DOX blocca questo complesso, inibendo la ri-legatura del duplex scisso, provocando una rottura del doppio filamento di DNA (DSB) (Tewey et al, 1984). La mancata riparazione del DSB del DNA provoca una risposta apoptotica.

Negli ultimi anni è stato suggerito che il proteasoma modula l'attività delle antracicline. È stato dimostrato che la DOX entra nelle cellule tumorali per semplice diffusione e si lega con alta affinità al proteasoma nel citoplasma. La DOX si lega quindi alla subunità proteasomica, formando un complesso DOX - proteasoma che penetra nel nucleo attraverso i pori nucleari in un processo ATP-dipendente. Infine, la DOX si dissocia dal proteasoma e si lega al DNA grazie alla sua maggiore affinità per il DNA che per il proteasoma (Kiyomiya et al 2001).

La DOX, come molti altri agenti genotossici, attiva il fattore p53, tramite un processo mediato dall'attivazione del fattore nucleare-kB (NF-kB) (Ashikawa et al 2004). NF-kB è infatti un fattore di trascrizione che regola i geni associati alla risposta allo stress come l'infiammazione, lo stress ossidativo e l'apoptosi (Bien et al 2004). È stato riportato che p53 induce la morte cellulare

tramite apoptosi, mediante l'attivazione della cascata delle caspasi attraverso due vie:

1) p53, attivato dalla produzione di ROS causata dalla DOX (Polyak et al 1999), media la downregolazione di Bcl2 (un fattore anti apoptotico) (Henkels et al 1999);

2) l'accumulo di p53 induce l'espressione di un recettore appartenente alla famiglia dei fattori di necrosi tumorale (TNF) (Bennett et al 1998), provocando l'innescamento di un potente segnale apoptotico che attiva la cascata delle caspasi che culmina nella morte cellulare.

Nei primi anni di utilizzo a livello clinico della DOX, sono stati fatti diversi studi clinici di fase II e III utili a valutare i suoi benefici rispetto agli effetti collaterali. Gli effetti collaterali più comuni riscontrati dopo il suo uso sono stati nausea e vomito, stomatite, calvizie (IARC 1990) disturbi neurologici (allucinazioni, vertigini, capogiri) (Liu et al 2006), cardiotoxicità cumulativa (Hortobagyi et al 1997) e aplasia midollare (IARC 1990). Gli effetti depressivi del midollo osseo di DOX possono comportare un'aumentata incidenza di infezioni microbiche e sanguinamento gengivale (IARC 1990). A questo proposito, uno dei principali effetti collaterali che limitano la dose è la mielosoppressione con leucopenia (principalmente granulocitopenia), trombocitopenia (Julka et al 2008) e anemia (Mancuso et al 2006) ma la

gravità dei sintomi dipende dalle dosi del farmaco e dalla capacità rigenerativa del midollo osseo. Inoltre, lo stravasamento di DOX può produrre grave necrosi al tessuto locale, così come sono possibili cellulite, tromboflebite e limitazioni della mobilità delle articolazioni adiacenti (McEvoy et al 1995).

La cardiotoxicità indotta dalla DOX ha ricevuto una crescente attenzione dalla scoperta della DOX nel 1969 e dall'inizio del suo uso clinico nei primi anni '70 (Arcamone et al 1969). Sebbene la DOX sia riconosciuta come un potente agente antineoplastico, i suoi effetti cardi tossici sono la ragione principale per cui si vengono somministrate dosi limitate. Manifestazioni cliniche di cardiotoxicità indotta da DOX possono essere acute e croniche. Tuttavia, c'è un'ampia variabilità nella frequenza delle manifestazioni cliniche indotte dalla DOX.

Lefrak e collaboratori (Lefrak et al 1973) hanno riferito che gli effetti acuti nel cuore possono essere clinicamente controllati e spesso reversibili, verificandosi in ~11% dei pazienti entro un breve periodo di tempo dall'inizio della terapia. Gli effetti acuti includono aritmie, ipotensione e diverse alterazioni elettrocardiografiche (van Acker et al 1996) che scompaiono una volta cessato il trattamento.

Von Hoff e collaboratori (von Hoff et al 1979) hanno riferito che gli effetti cronici della DOX si verificano solo nell'1,7% dei pazienti in terapia con DOX e l'indice di mortalità è del 50%. Gli effetti cardiotossici cronici indotti dal DOX sono dose-dipendenti e culminano in insufficienza cardiaca congestizia (CHF) nel 4% dei pazienti che ricevono dosi cumulative di 500-550 mg/m², nel 18% dei pazienti che ricevono dosi cumulative di 551-600 mg/m² e nel 36% dei pazienti che hanno ricevuto dosi superiori a 601 mg/m² (Singal et al 1997).

Sono vari i motivi che rendono il cuore un organo particolarmente suscettibile alla tossicità indotta dalla DOX; il motivo principale è la DOX si complessa con la cardiolipina, un componente importante della membrana interna mitocondriale (Goormaghtigh et al 1990) e le cellule cardiache hanno un'elevata densità di mitocondri per unità di volume rispetto alla maggior parte degli altri tessuti (Berthiaume et al. 2007)

Inoltre il metabolismo della DOX porta alla formazione di ROS (Nohl et al 1987), associato ai bassi livelli di difese antiossidanti presenti nel cuore, se paragonati ad altri tessuti (Childs et al 2002), contribuisce all'alta suscettibilità del cuore stesso alla tossicità indotta dal DOX. Inoltre, il recupero del cuore dopo un danno indotto dalla DOX è molto difficile, poiché i cardiomiociti sono cellule post-mitotiche (Lebrecht et al 2003).

Si è osservato che i livelli di vari antiossidanti sono aumentati significativamente dopo il trattamento con DOX nei giovani ratti ma non in quelli vecchi dello stesso ceppo, suggerendo un aumento del danno ossidativo indotto dalla DOX con l'età (Pritsos et al 2000).

1.4 Farmacoresistenza

L'instaurarsi della farmaco-resistenza ai trattamenti chemioterapici continua ad essere un ostacolo assai problematico nella lotta al cancro. La sovraespressione di un ampio spettro di pompe di efflusso ATP-dipendenti, e in particolare di ABCB1 (P-glicoproteina o MDR1) è uno dei principali meccanismi di resistenza per una vasta gamma di chemioterapici antitumorali, inclusi taxani e antracicline (Genovese, I. et al 2017).

La farmacoresistenza intrinseca o acquisita delle cellule tumorali è la principale causa responsabile dell'insuccesso terapeutico all'inizio del trattamento o dopo una iniziale risposta alla chemioterapia. La resistenza cellulare è una tipica caratteristica della maggior parte dei tumori, soprattutto dei tumori solidi, e riflette la capacità della cellula tumorale di sopravvivere e proliferare in condizioni di stress.

L'espressione dei fattori di resistenza è piuttosto eterogenea anche nell'ambito dei vari tumori dello stesso istotipo e talora nella popolazione cellulare dello stesso tumore. Questo comportamento è più evidente nello stadio avanzato della malattia e presumibilmente riflette la progressione tumorale (ISS, 2005). A livello del sito tumorale, diversi meccanismi consolidati conferiscono resistenza a uno o più agenti chemioterapici tra cui un ridotto assorbimento del farmaco dovuto alla ridotta espressione e/o perdita dei trasportatori di afflusso di farmaco, aumento dell'efflusso di farmaco, inibizione dell'apoptosi, alterazioni del ciclo cellulare e/o del checkpoint, compartimentazione del farmaco lontano dal target del farmaco (Bram et al., 2009; Debatin e Krammer, 2004; Ifergan et al. 2005).

Alcuni di questi meccanismi conferiscono resistenza a singole classi di chemioterapici, consentendo così un possibile trattamento efficace con farmaci antitumorali alternativi, mentre altri conferiscono resistenza a più farmaci chemioterapici strutturalmente non correlati (es. multidrug Resistance, MDR), rendendo così il tumore refrattario al trattamento farmacologico.

I meccanismi che contribuiscono allo stato di resistenza comprendono:

– fattori di difesa cellulare. Questi meccanismi hanno la funzione di limitare la concentrazione intracellulare del farmaco e la sua interazione con il

primario bersaglio intracellulare. Questo fenomeno è alla base del fenotipo MDR (multidrug resistance) ed è attribuito alla iperespressione di sistemi di trasporto (glicoproteina P, MRP, BCRP), che sono proteine transmembrana appartenenti alla superfamiglia ABC (ATP-binding cassette). Molti agenti chemioterapici convenzionali (antracicline, tassani, alcaloidi della vinca, intercalanti sintetici) sono potenziali substrati per questi trasportatori, che funzionano quali pompe di efflusso mirate a rimuovere dalla cellula tossine esogene o metaboliti tossici. I trasportatori sono anche implicati in meccanismi di sequestro subcellulare del farmaco. È importante sottolineare che questi trasportatori hanno un rilevante ruolo fisiologico (barriera ematoencefalica, assorbimento intestinale, ecc.) e pertanto condizionano il comportamento farmacologico in vivo;

– alterazioni quantitative o qualitative del bersaglio intracellulare. Una sostanziale modificazione dell'espressione della proteina bersaglio o una sua mutazione, che causa una ridotta interazione con il farmaco, possono essere responsabili di insensibilità a farmaci bersaglio-specifici;

– alterazioni nella risposta al danno citotossico. Il tipo della lesione citotossica e l'entità del danno condizionano in maniera critica la risposta cellulare al trattamento farmacologico. Tuttavia anche quando il farmaco raggiunge il bersaglio intracellulare, il risultato terapeutico può dipendere dalla efficienza

di riparazione del danno e/o dalla capacità di tollerare condizioni di stress. L'insensibilità a stimoli proapoptotici (quali il danno genetossico) può essere dovuta a specifiche alterazioni (quali, mutazioni del gene oncosoppressore p53) o ad aumentata espressione di fattori antiapoptotici. Inoltre, in presenza di danno citotossico, la cellula tumorale attiva segnali di stress che possono avere funzioni proapoptotiche o funzioni protettive rivolte alla riparazione del danno e alla sopravvivenza. Pertanto, vari difetti nei meccanismi che controllano il processo di morte cellulare riducono la suscettibilità cellulare all'apoptosi e rappresentano presumibilmente la base cellulare della resistenza intrinseca di molti tipi tumorali.

La "glicoproteina di permeabilità" o glicoproteina P (P-gp o ABCB1) è stata scoperta nel 1976 in cellule di roditori note per mostrare una ridotta sensibilità ai farmaci antitumorali (Juliano e Ling, 1976). È stato presto dimostrato che numerose linee cellulari tumorali sottoposte a ripetuti trattamenti con farmaci chemioterapici sviluppava un fenotipo coerente con la presenza di P-gp. Inoltre, queste linee cellulari resistenti ai farmaci hanno mostrato resistenza a un gran numero di farmaci chimicamente, strutturalmente e funzionalmente non correlati; da qui il nome di "resistenza multifarmaco" (MDR).

Sia i meccanismi genetici che quelli non genetici contribuiscono alla generazione di diverse sottopopolazioni di cellule neoplastiche all'interno dei singoli tumori e la selezione clonale al momento del trattamento può spiegare la selezione positiva delle popolazioni tumorali resistenti ai farmaci.

In particolare, la presenza di cellule staminali tumorali (CSC) nel tumore è un fattore critico per l'acquisizione della chemioresistenza. Esse costituiscono una sottopopolazione di cellule intrinsecamente resistenti ai farmaci chemioterapici, a causa di meccanismi epigenetici che determinano una maggiore espressione di proteine anti-apoptotiche e di trasportatori ATP-binding cassette (ABC), che mediano l'efflusso di più farmaci, permettendo la loro intrinseca resistenza (Shibue and Weinberg et al. 2017). Poiché il trattamento farmacologico colpisce solo la popolazione sensibile, la sottopopolazione cellulare resistente ai farmaci sopravvive e alla fine si diffonde, rendendo inefficace il trattamento del cancro.

Tra i meccanismi di resistenza ai farmaci, quello predominante nelle cellule tumorali e tra i più studiati è l'efflusso del farmaco da parte di proteine di una grande superfamiglia di pompe di efflusso ATP-dipendenti, ovvero i trasportatori ATP-binding cassette (ABC) (Li et al, 2016b). Questa superfamiglia è composta da 48 geni e 3 pseudogeni, appartenenti a 7 sottofamiglie (da ABCA a ABCG), per lo più trasportatori ATP-dipendenti di

metaboliti, xenobiotici e molecole di segnalazione attraverso le membrane cellulari, contro i loro gradienti di concentrazione (Fletcher et al, 2016).

La glicoproteina P è ubiquitaria ed è stata osservata in tessuti non tumorali, a livello di fegato, reni, intestino e cervello. Questa distribuzione suggerisce che la P-gp1 svolge un ruolo significativo nel normale assorbimento tissutale e nella secrezione di xenobiotici o metaboliti tossici; alcuni studi clinici con agenti in grado di inibire la glicoproteina P hanno portato ad un aumento significativo della tossicità a livello ematologico, neuronale ed epatico, senza un aumento significativo dell'indice terapeutico degli antitumorali (Lalor et al. 2009).

Per caratterizzare la funzione di ABCB1, sono stati generati topi knockout che portavano una interruzione del gene ABCB1, (Schinkel et al., 1997). Questi topi erano sani e fertili, senza anomalie nell'anatomia, nella durata della vita e in molti altri parametri, rispetto ai topi wild type in condizioni normali; tuttavia, hanno mostrato drastiche differenze farmacocinetiche alla somministrazione di farmaci, con una marcata riduzione dell'escrezione intestinale, epatobiliare e urinaria dei farmaci. In questi topi è stata dimostrata un'alterazione della farmacocinetica e un aumento dell'accumulo di paclitaxel, doxorubicina e vinblastina, cioè alcuni dei più importanti farmaci chemioterapici, somministrati contro diversi tipi di cancro (van Asperen et al.,

1999). Inoltre, doxorubicina, digossina, vinblastina, paclitaxel, eritromicina e molti altri farmaci, che nei topi wild type (e negli umani) non si accumulano nel cervello e non sono neurotossici, sono penetrati nella barriera emato-encefalica, con conseguenti gravi effetti neurotossici nel SNC dei topi mutati. Altri gruppi di lavoro hanno dimostrato l'induzione acuta dell'espressione del gene MDR1 in un tumore solido umano in funzione del tempo in risposta all'esposizione in vivo alla chemioterapia (Abolhoda et al 1999).

Come accennato in precedenza, vari studi mostrano come la somministrazione di doxorubicina su cellule tumorali in coltura evidenzi la presenza di gruppi di cellule chemio-resistenti. Si è visto che la glicoproteina P, nota anche come ABCB1, è tra i trasportatori ABC maggiormente espressi. Laddove ABCB1 viene espressa, la doxorubicina si va a localizzare esclusivamente nel citoplasma delle cellule resistenti, non raggiungendo il nucleo a causa dell'attività esportatrice svolta dalla glicoproteina P. Quest'ultima si pensi operi espellendo i composti non polari dal bilayer della membrana cellulare, verso l'esterno. (Bao et al. 2011)

È interessante notare che nel processo di acquisizione della resistenza, le cellule MDR diventano sensibili agli agenti attivi di membrana, come i calcio-antagonisti; il trattamento con questi ultimi induce preferenzialmente

l'apoptosi nelle cellule MDR rispetto alle cellule normalmente sensibili ai farmaci (Karwatsky et al. 2003).

In questa tesi abbiamo scelto uno dei maggiori calcio antagonisti studiati per abbattere la farmaco-resistenza, il verapamil; è un agente che inibisce il flusso transmembrana di ioni calcio ed è utilizzato clinicamente nella gestione delle aritmie cardiache. Il gruppo di Martin Laberge ha dimostrato che dopo l'uso del verapamil, si è evidenziata una correlazione tra l'ipersensibilità delle cellule resistenti ai farmaci e l'attività della P-gp 1 ATPasi. Inoltre, l'inibizione dell'attività della P-gp 1 ATPasi riduce la sensibilità indotta dal verapamil. Si è inoltre visto che, utilizzando un approccio di interferenza ad RNA, la sensibilità al verapamil può essere invertita quando l'espressione di P-gp 1 viene ridotta (Laberge et al. 2009).

1.5 Microscopia a fluorescenza

L'introduzione della microscopia a fluorescenza, utilizzando una varietà di indicatori fluorescenti o fluorocromi, i quali possono essere adattati in termini di specificità per bersagli come proteine o lipidi (Giepmans et al. 2006), è stato forse il passo più importante per consentirci di osservare la fisiologia cellulare. Costituisce infatti uno dei principali mezzi di indagine nel settore biomedico, permette di acquisire immagini di microrganismi, cellule e organelli citoplasmatici; è inoltre una tecnica poco invasiva, permettendo di preservare la citoarchitettura e l'integrità dei campioni.

Tuttavia, anche la microscopia a fluorescenza è soggetta a limitazioni fisiche pratiche, la più importante delle quali è la risoluzione (Hell 2003). Di conseguenza, la maggior parte dei recenti progressi con la microscopia a fluorescenza ha cercato di migliorare la qualità dell'immagine affrontando il problema fondamentale della sua risoluzione. Il limite di risoluzione è la distanza minima alla quale due punti sono visibili come distinti. Per la luce visibile il fattore limitante è dovuto al fenomeno di diffrazione (Criterio di Rayleigh). Il criterio di Rayleigh permette di conoscere la minima distanza oltre la quale avviene la risoluzione conoscendo la lunghezza d'onda della luce osservata e il diametro del foro di osservazione (detto anche pupilla).

La risoluzione di un microscopio ottico, secondo la legge di Rayleigh, non potrà superare gli 0.2 μm , limite fisico dovuto alla lunghezza d'onda impiegata (centinaia di nanometri), mentre il potere di risoluzione di un microscopio elettronico è nell'ordine dei nanometri (variabili in funzione del tipo di sorgente e del voltaggio applicato).

La fluorescenza è un fenomeno fisico che consiste nell'emissione di luce da parte di una sostanza (indicatore) sottoposta ad irraggiamento. Gli elettroni degli atomi di una sostanza fluorescente assorbono l'energia della radiazione che li colpisce e "saltano" ad un livello energetico superiore. Dopo un brevissimo intervallo di tempo, dell'ordine di pochi secondi, tali elettroni tornano al livello energetico iniziale, restituendo buona parte dell'energia precedentemente assorbita sotto forma di fotoni, cioè di luce.

Vengono utilizzate molecole (fluorocromi) che hanno la caratteristica di assorbire luce ad una determinata lunghezza d'onda (eccitazione) ed emettere fotoni di una lunghezza d'onda maggiore (emissione).

L'uso di fluorocromi, anche più di uno contemporaneamente, permette di identificare cellule e componenti sub-cellulari distinguendoli facilmente dal resto degli elementi non fluorescenti.

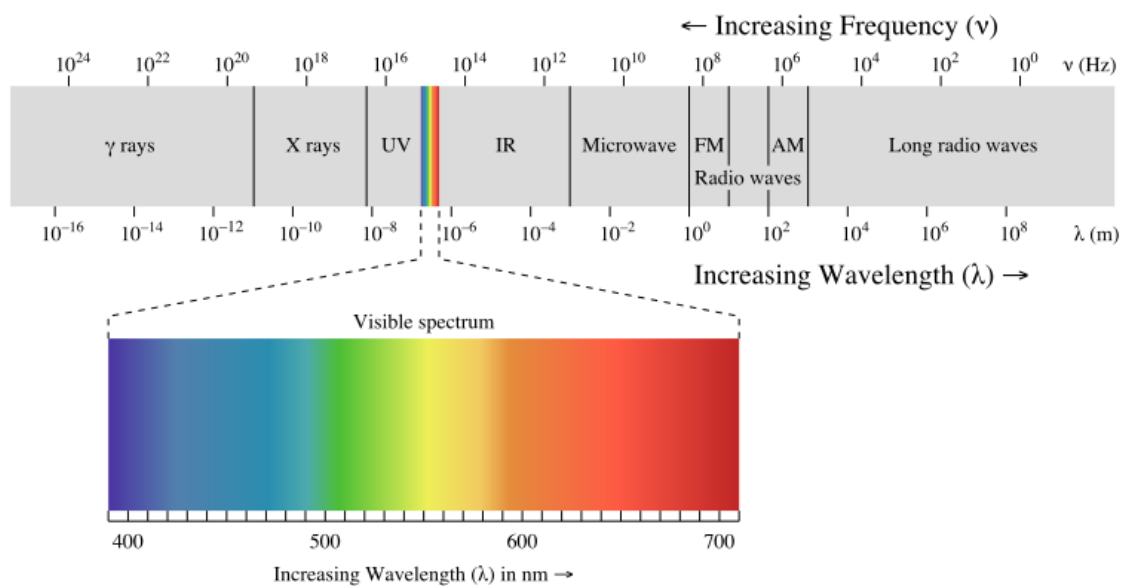


Fig. 7. (<https://www.nikonschool.it>)

Il fenomeno della fluorescenza si può applicare all'assorbimento di singoli o più fotoni contemporaneamente; ogni fotone assorbito provoca il rilascio di un fotone di energia inferiore. Tuttavia, è anche possibile che un indicatore assorba simultaneamente l'energia da più fotoni ma emetta solo un tipo di fotone. È importante sottolineare che l'energia di ciascuno dei due fotoni assorbiti è inferiore all'energia del fotone emesso. Pertanto, la luce rossa può essere utilizzata per generare luce verde.

Questo principio è alla base della microscopia a "due fotoni" o "multifotoni" (Zinselmeyer et al. 2009). Questo processo può essere ottenuto solo avendo una densità spaziale e temporale di fotoni molto elevata, perché i due fotoni assorbiti devono arrivare contemporaneamente, il che richiede un laser

specializzato, ad alta potenza. Ci sono notevoli vantaggi nell'usare la luce rossa invece della luce blu come fonte di eccitazione. In particolare, la luce a lunghezza d'onda più lunga può penetrare più in profondità nei tessuti meglio della luce a lunghezza d'onda più corta perché è meno diffusa (Helmchen e Denk 2005). L'assorbimento di luce blu ad alta energia ha anche lo svantaggio di danneggiare con più facilità le cellule in esame.

L'obiettivo del microscopio a fluorescenza è separare la luce emessa dalla luce di eccitazione (luminosa) (Fig. 8); i fluorocromi con grandi spostamenti di Stokes sono vantaggiosi per questo.

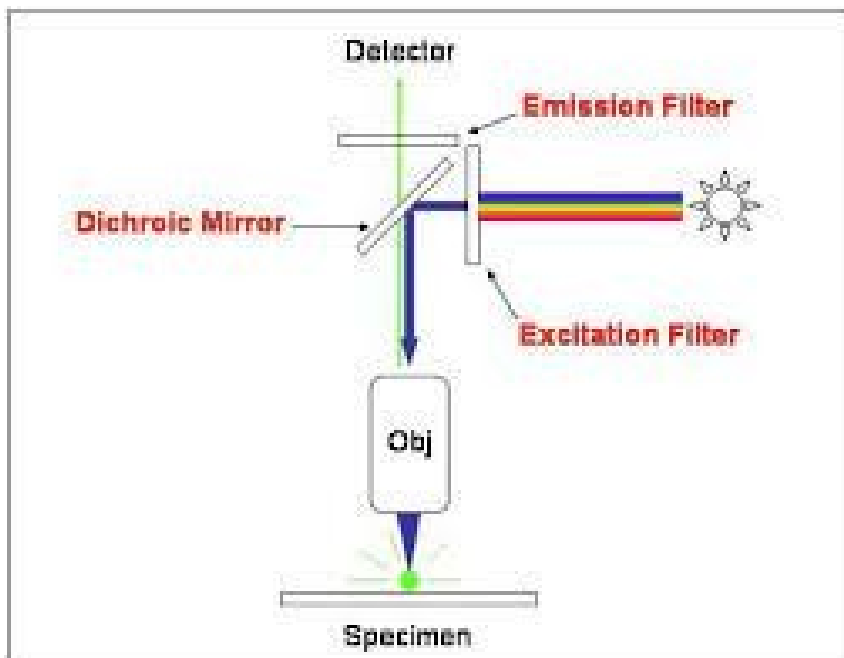


Figura 8 I percorsi della luce di base di un microscopio a fluorescenza; Un cubo di eccitazione contenente uno specchio dicroico (DM) dirige la luce di eccitazione

(proveniente da una lampadina o un laser e filtrata con un filtro di eccitazione) al campione (specimen). La fluorescenza emessa dal campione viene analizzata da un detector.

Sebbene sia spesso riportato che un particolare fluorocromo ha una singola lunghezza d'onda di assorbimento ed emissione (un valore di picco massimo è spesso citato nelle specifiche del fluorocromo), in realtà i fluorocromi, in particolare le proteine fluorescenti codificate geneticamente, hanno un ampio spettro di lunghezze d'onda di eccitazione e di emissione.

Inoltre, gli spettri di eccitazione ed emissione di diversi indicatori spesso si sovrappongono, aumentando così l'importanza di considerare le lunghezze d'onda di eccitazione e di emissione appropriate durante l'osservazione.

In molti microscopi a fluorescenza, il cubo di eccitazione è l'elemento convenzionale utilizzato per allineare i filtri nel percorso della luce di eccitazione ed emissione (Fig. 8). Il tradizionale cubo porta tipicamente un filtro di eccitazione (EX), uno specchio dicroico a 45° (DM) e un filtro barriera/emissione; il cubo dirige la luce dalla sorgente di eccitazione al campione e dal campione al rivelatore. (Sanderson et al 2014).

Lo specchio dicroico funge da elemento ottico primario che separa la luce di eccitazione ed emissione. La modalità di funzionamento permette alla luce

con una lunghezza d'onda di eccitazione più piccola di essere riflessa verso il campione mentre la luce di emissione, con una lunghezza d'onda più lunga, viene trasmessa dallo specchio diecrico verso i rivelatori.

Per migliorare la selezione di lunghezze d'onda di eccitazione/emissione appropriate oltre al filtro messo in atto dallo specchio diecrico, è comune aggiungere filtri di eccitazione ed emissione (Fig. 8). Il filtro di eccitazione garantisce che vengano trasmesse solo le lunghezze d'onda richieste. Tuttavia, è di fondamentale importanza ottenere luce sufficiente per creare un'immagine utile; il passaggio della luce attraverso i filtri provoca sempre una perdita di intensità. A seconda della gamma spettrale che passerà attraverso il filtro e della percentuale di luce trasmessa dal filtro stesso, dipenderà la luminosità dell'immagine. Quando si utilizza un singolo fluorocromo, esiste una sola fonte di fluorescenza. Pertanto, il filtro di emissione deve bloccare qualsiasi luce di eccitazione diversa da quella di interesse.

1.6 Campo magnetico

1.6.1 I campi elettromagnetici

Ovunque nell'ambiente possono essere presenti campi elettromagnetici (EMF), sia prodotti da sorgenti naturali che antropiche. Le prime sono rappresentate da un accumulo locale di cariche elettriche in occasione di temporali e dal campo magnetico terrestre, il quale permette all'ago della bussola di orientarsi lungo la direzione nord-sud e viene utilizzato da uccelli e pesci nella navigazione.

Gli EMF generati da sorgenti artificiali sono largamente utilizzati dalla società contemporanea nel settore sanitario, tramite raggi X e nell'elettricità fornita da qualsiasi presa di corrente, la quale implica emissione di EMF a bassa frequenza. Di fondamentale importanza risultano le antenne televisive, gli impianti radiofonici o le stazioni radio base per telefonia mobile, quali utilizzano diversi tipi di radioonde ad alta frequenza per la trasmissione di informazioni.

Secondo la teoria di Maxwell, le onde elettromagnetiche sono fenomeni oscillatori, solitamente di tipo sinusoidale e sono costituite normalmente da due grandezze che variano periodicamente nel tempo: il campo elettrico ed il campo magnetico.

Il campo elettrico (E) viene definito come una proprietà o una perturbazione dello spazio, prodotta dalla presenza di cariche elettriche, positive o negative. Le cariche elettriche si misurano in Coulomb, quelle di segno uguale si respingono e quelle di segno opposto si attraggono.

Consideriamo due corpi piccolissimi (oggetti puntiformi), separati dalla distanza r e dotati di cariche q e Q . Su ognuno dei due corpi agisce una forza, diretta secondo la congiungente i due punti e con un'intensità data dalla legge di Coulomb, nella quale ϵ_0 è la costante dielettrica del vuoto ($8.854 \cdot 10^{-12}$ F/m) e $\pi = 3,1415$. Ne deriva che la forza è tanto più intensa quanto più elevato è il valore di q e Q , e diminuisce con la loro distanza (inversamente proporzionale a r^2).

$$F = k \frac{|q_1||q_2|}{r^2}$$

Le cariche elettriche producono un campo elettrico nello spazio circostante. Nel momento in cui le cariche presenti si mettono in movimento, e quindi si crea corrente, esse danno origine anche ad un campo magnetico (H). Le cariche elettriche sono dunque le sorgenti sia del campo elettrico che del campo magnetico, ed è possibile affermare che le cariche elettriche immobili danno origine al solo campo elettrico, mentre le cariche in movimento creano anche un campo magnetico.

Mentre i campi elettrici sono associati alla presenza di cariche elettriche, i campi magnetici derivano dal movimento fisico delle cariche elettriche (corrente elettrica).

H può essere definito come una proprietà o perturbazione dello spazio prodotta dal movimento di cariche elettriche o per mezzo di magneti (calamite). Questo fenomeno si può verificare constatando che ponendo un corpo magnetizzato nella regione perturbata questo risulta soggetto ad una forza. L'effetto del campo magnetico è diverso a seconda del materiale che si desidera magnetizzare. Un campo magnetico è tanto più intenso quanto più elevato il vettore induzione magnetica, la cui intensità nel sistema S.I. si misura in Tesla.

Il campo magnetico nel S.I. si misura invece in Ampere al metro [A/m] ed è legato all'induzione magnetica dall'equazione: $B = \mu * H$

μ è la permeabilità magnetica del mezzo; da questo si deduce che i vari materiali anche se sottoposti allo stesso campo magnetico, generano un'induzione con valore diverso.

1.6.2 Possibili effetti sull'uomo

E' stata esaminata la plausibilità di diversi meccanismi atti ad agire in maniera diretta e indiretta dei campi elettrici e magnetici ELF. In particolare ci si è chiesto se un "segnale" generato in un processo biologico dall'esposizione a un campo esterno possa essere distinto da un rumore casuale intrinseco e se tale meccanismo non contravvenga ai principi scientifici ed alle attuali conoscenze. Molti processi divengono plausibili solo per campi superiori ad una certa intensità. La mancanza di evidenti meccanismi non esclude però la possibilità di effetti sul corpo anche a livelli di campo molto bassi, purché siano rispettati i principi scientifici fondamentali.

Tra i numerosi meccanismi d'interazione diretta dei campi con il corpo umano che sono stati suggeriti, tre si distinguono come potenzialmente operativi a livelli di campo inferiori agli altri: induzione di campi elettrici nelle reti neurali, coppie di radicali e magnetite (ILO – ICNIRP – WHO Environmental Health Criteria 232).

I campi elettrici indotti nei tessuti dall'esposizione a campi elettrici e magnetici ELF stimolano direttamente le singole fibre nervose rivestite di mielina, in modo biofisicamente plausibile, quando l'intensità del campo interno supera pochi volt al metro. Campi molto più deboli possono

influenzare la trasmissione sinaptica della rete neurale, e non di singole cellule. Questa elaborazione di segnali da parte dei sistemi nervosi è comunemente utilizzata da organismi pluricellulari per rivelare deboli segnali ambientali. E' stato suggerito un limite inferiore di 1 mV m^{-1} per la discriminazione della rete neurale, ma sulla base dei dati attuali sembrano più verosimili valori di soglia attorno a $10\text{-}100 \text{ mV m}^{-1}$. (ILO – ICNIRP – WHO Environmental Health Criteria 232).

Quello delle coppie di radicali rappresenta un meccanismo accettato attraverso il quale i campi magnetici possono avere effetto su tipi specifici di reazioni chimiche, di solito con un aumento della concentrazione di radicali liberi reattivi in campi di bassa intensità e un suo abbassamento in campi di alta intensità. Tali aumenti sono stati osservati in campi magnetici di intensità inferiore a 1 mT . Ci sono alcuni dati che collegano questo meccanismo alla navigazione degli uccelli durante la migrazione. Sia su base teorica, sia perché le variazioni prodotte da campi magnetici ELF e da campi statici sono simili, è stato suggerito che campi a frequenza industriale di gran lunga inferiori al valore del campo geomagnetico, pari a circa $50 \text{ } \mu\text{T}$, non abbiano verosimilmente molta importanza dal punto di vista biologico.

Non si ritiene che altre interazioni biofisiche dirette dei campi, come rottura di legami chimici, forze applicate a particelle cariche e vari meccanismi di

“risonanza” a banda stretta possano fornire spiegazioni plausibili per le interazioni, ai livelli di campo che si incontrano in ambito residenziale e professionale (ILO – ICNIRP – WHO Environmental Health Criteria 232).

1.6.3 Campi magnetici statici

Negli ultimi decenni è aumentato l'interesse verso i possibili effetti negativi derivanti dall'esposizione a campi magnetici statici. Questa preoccupazione è dovuta principalmente alle sempre più frequenti applicazioni di tali campi nell'industria e nella pratica clinica; tra questi, le strutture per la risonanza magnetica (MRI) sono le principali fonti di esposizione ai campi magnetici statici sia per il pubblico (pazienti) che per i lavoratori.

Il campo magnetico statico (SMF) è un campo vettoriale costante e immutabile che descrive l'influenza magnetica delle correnti elettriche e dei materiali magnetizzati sulla materia vivente e inanimata. L'SMF è classificato come campo debole (<1 mT), moderato (da 1 mT a 1 T), forte (da 1 T a 5 T) e ultraforte (>5 T). Questa classificazione, che è stata accettata dalla comunità scientifica, è stata proposta per creare intervalli di SMF chiari per consentire una ricerca coerente e chiarire il suo potenziale biologico e terapeutico. A differenza di altri campi magnetici (compresi quelli elettromagnetici e non

ionizzanti), l'SMF è più conveniente da applicare in terapia, perché per generarlo vengono utilizzati solo semplici dischi magnetici sia in vitro che in vivo (Marycz et al 2018).

In recenti indagini, è stato dimostrato che l'esposizione a campi magnetici statici in diversi modelli cellulari, provocano modifiche permanenti e transitorie di endpoint cellulari critici per il processo di carcinogenesi. L'Organizzazione Mondiale della Sanità ha quindi raccomandato studi in vitro, da condurre in condizioni di esposizione strettamente controllate.

1.6.3.1 Effetti sulle cellule

E' stato verificato che l'assenza di effetti sui principali parametri cellulari chiave su fibroblasti MRC-5 esposti a 370mT attraverso un campo magnetico statico (Romeo et al, 2016). Le esposizioni sono state eseguite utilizzando un'apparecchiatura sperimentale progettata e realizzata per operare con il campo magnetico statico generato da magneti permanenti.

Molto presto, l'attenzione di molti gruppi di ricerca in questo campo si è concentrata sull'influenza dei campi elettromagnetici deboli e delle e delle radiazioni EM sul metabolismo del Ca^{2+} delle cellule viventi.

Il Ca^{2+} ha molti ruoli importanti in tutti gli organismi viventi. A parte il suo ruolo strutturale, ad esempio nella matrice ossea, nelle pareti cellulari delle piante e nella stabilizzazione delle membrane, svolge un ruolo essenziale nell'omeostasi cellulare, in particolare come messaggero intracellulare.

Gli aumenti localizzati e temporanei della concentrazione di Ca^{2+} libero citosolico, sono coinvolti nella regolazione, ad esempio, delle prime fasi della riproduzione, della crescita e dello sviluppo dell'organismo, nonché nell'apoptosi.

La bassa concentrazione di Ca^{2+} citosolico è mantenuta da una serie di trasportatori attivi; la pompa del Ca^{2+} della membrana plasmatica (Ca^{2+} -ATPasi) svolge un ruolo importante. Nella maggior parte delle cellule, rappresenta il meccanismo principale per pompare il Ca^{2+} fuori dalla cellula, mentre le pompe del Ca^{2+} situate nei depositi intracellulari di Ca^{2+} sono importanti per il controllo a breve termine.

Al contrario, il movimento del Ca^{2+} nel citosol dal mezzo extracellulare o dai depositi intracellulari di Ca^{2+} è passivo e può essere ottenuto attraverso l'apertura di vari canali permeabili al Ca^{2+} (Koch et al, 2003). Sono stati condotti diversi studi sugli effetti dell'esposizione a campi EM a frequenza estremamente bassa (ELF) sull'efflusso di calcio in vari sistemi biologici. Uno degli esperimenti più noti è l'efflusso di Ca^{2+} dipendente dalla frequenza da

preparazioni di cervello di pollo con campi EM a radiofrequenza modulati in ampiezza (Bawin et al., 1975).

È stato osservato che l'SMF può influenzare la decisione sul destino delle cellule staminali in molti modi. È stato dimostrato che il campo magnetico può influenzare la concentrazione di ioni all'interno del citoplasma, compreso il Ca^{2+} . Uno studio condotto da Koch et al. ha evidenziato che i campi magnetici a frequenza estremamente bassa (ELF), compresi tra 27 e 37 mT, possono regolare il trasporto del Ca^{2+} interagendo con i canali del Ca^{2+} nella membrana cellulare. L'esposizione a campi elettromagnetici (50 Hz, 20 mT) ha portato negli MCS all'attivazione dei canali Na^+/K^+ , con conseguente aumento della concentrazione di Na^+/K^+ (Koch et al, 2003). CITARE

La modulazione delle distribuzioni di ioni chiave influenza la funzione, la proliferazione e il differenziamento delle cellule staminali. L'aumento dei livelli di ioni calcio nel citoplasma può, di conseguenza, innescare cambiamenti nel microdominio e nella distribuzione dell'actina, influenzando così la forma e la geometria delle cellule. L'SMF influenza la dimensione cellulare, la forma, la superficie della membrana e la distribuzione degli organelli cellulari modulando la concentrazione di Ca^{2+} e la distribuzione dei filamenti di actina. Un fenomeno simile è stato osservato nelle ASC umane esposte a SMF, dove gli organelli sono stati traslocati in un polo specifico,

portando al ripristino della polarità cellulare. Nucleo e altri organelli erano concentrati in uno dei poli. I riarrangiamenti citoscheletrici interessano diversi tipi di meccanoettori, comprese le integrine. Le cellule utilizzano i recettori dell'integrina per aderire alle proteine che formano la matrice extracellulare e trasdurre segnali meccanici dentro e fuori il corpo cellulare. È stato dimostrato che l'SMF può influenzare la proliferazione, la migrazione e l'adesione delle cellule muscolari lisce vascolari umane inibendo il raggruppamento dell'integrina β_1 (Yan Li et al, 2012).

Inoltre, l'SMF generato da magneti al neodimio e magneti in ferrite, che generano un basso campo magnetico statico, è considerato sicuro dal Centro Nazionale di Medicina Complementare e Alternativa (NCCAM), che di conseguenza incoraggia la comunità scientifica a testarne l'applicazione clinica. È stato dimostrato l'effetto clinico benefico di SMF di diversa intensità, inclusi bassa, moderata e alta. L'SMF debole, fino a 70 μ T, è stata classificata da Heisenberg come un'energia elementare, da cui dipende la vita dell'organismo e che è diventata una parte indispensabile della vita umana, perché ci circonda costantemente.

È stato dimostrato che la mancanza del debole SMF naturale provoca insonnia, affaticamento e depressione nell'uomo e aumenta il rischio di osteoporosi. Come spiegato, l'SMF stimola il movimento degli ioni cellulari,

aumenta l'uso di ossigeno da parte della cellula e attiva le integrine, e quindi influenza il destino cellulare modulando il metabolismo cellulare, il ciclo cellulare, la proliferazione e l'apoptosi. È stato dimostrato che l'SMF esercita le sue proprietà antinfiammatorie aumentando la secrezione di IL-10, controllando la secrezione di citochine pro-infiammatorie, come IL-6, IL-8 o TNF- α . Tuttavia, l'applicazione più frequente di SMF interessa il campo dei disturbi del sistema muscolo-scheletrico sia negli animali che nella medicina rigenerativa nell'uomo (Marycz et al. 2018)

Altre indagini sono state effettuate sull'interazione tra campi elettrici e membrana cellulare; questi ultimi potrebbero, in primo luogo, agire sulla membrana cellulare a causa della sua alta resistenza e, conseguentemente, produrre cambiamenti sulla struttura e sulla funzione delle membrane e delle sue proteine come pure sulla permeabilità e sul potenziale di membrana influenzando tutte le corrispondenti reazioni fisiologiche o biochimiche (McLeod et al., 1987; Goodman & Henderson 1988). Gli studi forse più dettagliati sugli effetti dei campi elettromagnetici sono quelli sull'attività della pompa Na,K-ATPasi (Serpersu & Tsong 1984; Blank & Soo, 1997). Basse frequenze di campi elettrici sembrano inibire l'attività della pompa mentre campi magnetici a bassa frequenza sembrano avere un effetto di attivazione. Sebbene gli effetti siano opposti la frequenza alla quale i due

campi interagiscono con questa struttura è molto simile. Più precisamente gli effetti osservati potrebbero essere dovuti all'interazione del campo elettrico o magnetico con cariche in movimento (che si muovono attraverso l'enzima) previste nei normali processi metabolici della cellula (Blank & Soo 1997). È stata valutata anche un'eventuale influenza dei campi magnetici sullo ione calcio (Ca^{2+}). In diversi esperimenti si è notato che l'azione di campi magnetici ed elettrici ha portato ad un aumento dell'afflusso di calcio attraverso le membrane (Lindstrom et al., 1995; Lopucki et al., 2004), mentre in altri casi i risultati precedenti sono stati smentiti, non essendo risultato alcun effetto dei campi sulla concentrazione di questo ione (Wey et al., 2000) e di conseguenza sulle attività che esso influenza, come ad esempio la fosforilazione, calcio-calmodulina dipendente, della catena leggera della miosina (Coulton et al., 2000).

Ulteriori studi in vitro sono stati effettuati su differenti livelli di organizzazione biologica, dai sistemi più semplici (membrane isolate, enzimi) a vari modelli cellulari (sia batteri che cellule di mammifero). I target biologici studiati comprendono la crescita e la morfologia cellulare, varie attività metaboliche cellulari, la fisiologia della membrana plasmatica, l'espressione genica e l'apoptosi (morte cellulare programmata). Sono stati rilevati effetti sia positivi sia negativi rispetto a tutti i target considerati, ed in

molti casi gli effetti sono difficilmente paragonabili, perché associati a differenti condizioni di esposizione (livelli di induzione magnetica fino a 8 T, durata dell'esposizione variabile da pochi minuti a qualche ora, fino ad alcuni giorni). La review effettuata da Dini e Abbro evidenzia come l'esposizione a campi di induzione magnetica moderati (1 mT - 1 T) alteri alcune funzionalità cellulari (Dini et al. 2005).

Gli effetti sono stati attribuiti ad una alterazione delle strutture eccitabili in relazione all'azione di campi magnetici esterni, in particolare la variazione è da attribuirsi all'azione che il campo esercita su alcuni canali ionici (in particolare è stata osservata una variazione sostanziale nella diffusione degli ioni Ca^{2+}).

Precedenti studi hanno riportato che i campi magnetici statici (SMF) e i campi magnetici a bassa frequenza (LF-MF, frequenza inferiore a 300 Hz) esercitano una funzione antitumorale, indipendentemente dagli effetti termici. I campi magnetici (MF) potrebbero inibire la crescita e la proliferazione cellulare; indurre l'arresto del ciclo cellulare, l'apoptosi, l'autofagia e la differenziazione; regolare il sistema immunitario; e sopprimere l'angiogenesi e le metastasi attraverso varie vie di segnalazione. Inoltre, sono efficaci nelle terapie combinate: gli MF non solo promuovono l'assorbimento dei farmaci chemioterapici producendo piccoli

fori sulla superficie della membrana cellulare, ma potenziano anche gli effetti inibitori regolando l'apoptosi e le proteine correlate al ciclo cellulare (Aoshu Xu et al., 2011); un altro studio sembra confermare questa tesi: secondo il gruppo di ricerca di Ying Liu vengono osservati fori nelle cellule esposte a SMF ma non nei gruppi di controllo, permettendo dunque un aumento del flusso dei farmaci antitumorali (Ying et al., 2011).

In un altro studio si è valutato se i campi magnetici statici modificassero le risposte all'agente chemioterapico doxorubicina in cellule di cancro al seno MCF-7 umane. A tal fine, le cellule sono state esposte a MF statici o a 50 Hz a 100 μ T con o senza doxorubicina per 3 ore. Dopo le esposizioni, sono stati valutati i livelli di superossido citosolico e mitocondriale, i livelli di danno al DNA e la sopravvivenza delle cellule. È stato riscontrato che gli MF statici hanno ridotto il livello di danno al DNA indotto dal trattamento con doxorubicina ($p = 0,023$), ma non sono stati osservati effetti né per i livelli di superossido citosolico e mitocondriale né per la sopravvivenza delle cellule (Nieminen et al., 2022)

Il gruppo di ricerca guidato da H Aoki ha cercato di chiarire gli effetti dei campi magnetici sulla permeabilità della membrana plasmatica, misurando l'accumulo e l'efflusso di adriamicina (ADR) in una linea cellulare, TALL-1, tramite tecniche di citometria a flusso. La quantità di ADR accumulata nelle

celle per 15 minuti sotto un campo magnetico statico (0,4 Tesla(T), 1T = 10000 gauss) è stata inferiore al 5-10% rispetto alle cellule di controllo senza campi magnetici (Aoki H et al, 1990).

Nelle analisi svolte da JR Grey, si è valutata la capacità dei campi magnetici statici di migliorare l'azione in vivo di un agente chemioterapico, l'adriamicina, contro i tumori mammari trapiantati nei topi. Topi femmine B6C3F1 con adenocarcinoma mammario trapiantato sono stati divisi in quattro gruppi randomizzati e iniettati con 10 mg/kg di adriamicina il giorno 7 dello studio. Tre dei gruppi sono stati quindi esposti a campi magnetici statici non uniformi. La regressione del tumore risultante in ciascun gruppo è stata misurata quattro volte durante i restanti 13 giorni dello studio di 20 giorni. I test statistici hanno rivelato che tutti i gruppi esposti al campo statico hanno ottenuto una regressione del tumore significativamente maggiore ($P \leq .05$) rispetto al gruppo trattato solo con adriamicina (Gray R et al, 2000).

2. SCOPO DELLA TESI

Essendo ben noti sia i gravi effetti cardiotossici dovuti all'utilizzo di dosi massicce del chemioterapico doxorubicina in clinica, sia la bassa sopravvivenza a 5 anni riscontrabile nei malati di PDAC, molti gruppi di ricerca hanno provato a studiare metodi e strategie per colpire con maggior efficienza il tumore al pancreas.

Lo scopo di questo lavoro è stato valutare l'andamento dell'ingresso della doxorubicina all'interno di cellule in coltura, sottoposte all'influenza di un campo magnetico statico; le analisi sono state effettuate tramite l'uso di un microscopio a fluorescenza poichè la doxorubicina è un fluoroforo naturale.

MATERIALI E METODI

3.1 Colture cellulari

In questo studio è stata utilizzata la linea cellulare PANC-1, una linea cellulare umana di cancro al pancreas, isolata da un carcinoma pancreatico di origine duttale, derivante dal tessuto di un uomo di 56 anni.

Per il mantenimento in coltura delle Panc-1, è stato utilizzato il terreno di coltura Dulbecco's Modified Eagle's Medium High Glucose (DMEM/ HIGH) complementato con il 10% v/v di siero fetale bovino (FBS) inattivato per riscaldamento a 56°C, l'1% v/v degli antibiotici streptomicina e penicillina e l'1% v/v dell'amminoacido L-Glutamina.

Le cellule vengono tenute in incubatore alla temperatura di 37°C con il 5% di CO₂ e il 95% di umidità, in fiaschette T25 propilene da 25 ml.

Al raggiungimento di un livello di confluenza pari a circa l'80%, il terreno viene rimosso e le cellule vengono lavate con 3 ml di PBS sterile al 1% (Phosphate Buffered Saline). Successivamente le cellule vengono staccate dalla superficie della fiasca con 1 ml di Tripsina-EDTA e tenute in incubatore per 5 minuti; la tripsina è un'idrolasi e andrà a digerire le proteine; la presenza di EDTA, agente chelante degli ioni Ca e Mg, aumenta l'attività della tripsina. Questi ioni solitamente mascherano i legami su cui la tripsina agisce e aumentano l'adesione cellulare.

Successivamente, dopo aver verificato visivamente l'avvenuto distacco delle cellule, si aggiungono di 3 ml di terreno per inattivare la tripsina (necessaria la presenza di una concentrazione minima di FBS del 10%) e si raccoglie il contenuto della fiaschetta in una falcon da 15 ml. Le cellule vengono centrifugate a 2100 rpm per 5 minuti.

Per eseguire la conta cellulare si preleva un'aliquota di 30 μ l di cellule, successivamente si diluiscono prima 1:4 con PBS poi 1:2 con il colorante Trypan Blue, poi vengono analizzate attraverso la camera di Burker.

Al seguito della somministrazione del colorante, aspettando che quest'ultimo sia penetrato all'interno delle cellule morte, è stata estratta la quantità standardizzata per la valutazione in camera di Burker (20 μ l) al fine di riempirla totalmente ed avere valori attendibili di conteggio. Il procedimento precedentemente esposto è stato eseguito per la preparazione di ciascun campione.

Per il conteggio al microscopio si è scelto di utilizzare tre quadranti della camera di Burker: due posti ai vertici e quello centrale, che li unisce. Questa scelta è stata praticata in sede sperimentale, notando valori di conteggio sufficienti per ogni campione.

Come riportato nel data sheet dello strumento, si potrà stimare una concentrazione cellulare attraverso la relazione:

$$\frac{N_{cell}}{ml} = \frac{cellule\ conteggiate}{3} * 10^3 * \text{fattore di diluizione}$$

In ognuno degli esperimenti allestiti per questo lavoro di tesi, sono state seminate 5000 cellule Panc-1, conteggiate come sopra descritto, e seminate su di un vetrino IBIDI con un diametro di 35 mm specifico per la microscopia a fluorescenza, scelto per via della sua autofluorescenza molto bassa (Glass Bottom Dish 35 mm: codice 81218-200)

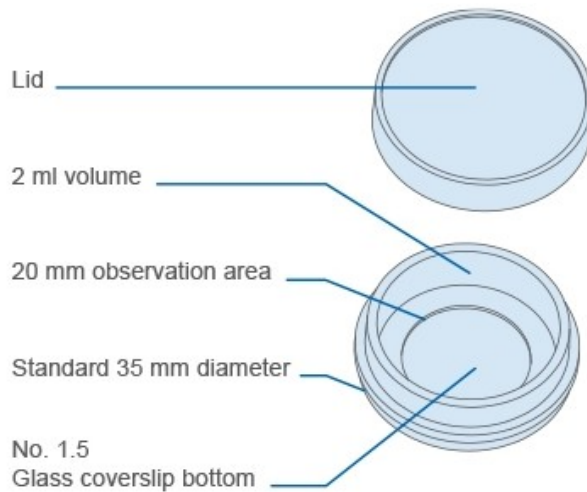


Fig. 9. Vetrino ibidi (<https://ibidi.com>)

Le cellule, una volta raggiunta una confluenza di circa il 50%, sono state esposte alla doxorubicina (10 μ M) e osservate al microscopio.

Il terreno usato è privo di rosso fenolo, per evitare problemi di interferenza con la fluorescenza (Lonza Bioscience, codice: BE12-917F).

Per sottoporre i campioni cellulari ad un campo magnetico statico, si è utilizzata una calamita al neodimio, posta sopra al vetrino a circa 1 cm di

distanza dal campione in esame; la forza del campo magnetico generata dalla calamita è di circa 0,4 T.

3.1.1 Trattamento con verapamil

Le cellule sono state prima trattate con doxorubicina come precedentemente descritto e poi, dopo un'ora, è stato eliminato il farmaco dal terreno ed effettuati i lavaggi; le cellule sono state trattate due ore con verapamil con concentrazione 20 micromolare: scadute le due ore il composto è stato lavato via per iniziare nuovamente il trattamento con doxorubicina, per altri 120 minuti.

3.2 Conteggio cellulare e camera di Burker

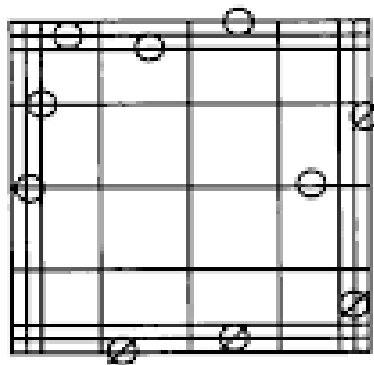
La camera di Burker è un particolare emocitometro, molto utilizzato negli studi biologici. Consiste in un vetrino modificato dove è presente una griglia incisa sulla superficie per conteggiare le cellule. Tale griglia è descritta da caratteristiche standardizzate e note allo sperimentatore. Con un procedimento sperimentale accurato, è possibile operare sempre con lo stesso volume di campione liquido sulla griglia.

Attraverso le caratteristiche geometriche del reticolo dell'emocitometro e grazie al volume noto in cui si opera, è facilmente ottenibile il calcolo della densità cellulare nel campione.

La camera di Burker presenta due celle che hanno una profondità di 1/10 di mm; in particolare, il piano di ogni cella risulta diviso in 9 quadrati di 1 mm di lato. Ciascuno dei nove quadrati comprende: 16 quadrati della superficie di 1/25 di mm².

A suddividere il reticolato più grande sono poste serie di tre righe parallele.

**DIAGRAM II
CORNER SQUARE (ENLARGEMENT)**



Count cells on top and left touching middle line (C). Do not count cells touching middle line at bottom and right (X).

Fig. 10 Camera di burker.

Per ognuno dei 3 campi presi in considerazione, si tiene conto delle cellule situate sulle righe appartenenti a due lati su quattro.

Per valutare la vitalità cellulare, è necessario utilizzare un metodo di discriminazione per l'individuazione di cellule morte. I metodi più comunemente utilizzati riguardano l'impiego di coloranti.

Ponendo il focus sui corretti comportamenti di membrana, è possibile sfruttarli per discriminare le cellule tra vive e morte. Coloranti quali il trypan blue, sono in grado di penetrare solo una membrana cellulare danneggiata. Il trypan blue è carico negativamente e non riesce a penetrare la membrana cellulare se non quando il danno cellulare è tale da renderla permeabile a molecole cariche e di grandi dimensioni. Membrane cellulari integre, invece, non consentono il passaggio di colorante, facendo risultare le cellule otticamente chiare, mentre in caso di danno importante alla membrana e quindi morte cellulare, queste risulteranno colorate.

3.3 Microscopio e Software NIS Element

Il microscopio scelto per lo studio è un Nikon Ti2-E, dotato del software ad esso associato (Programma NIS Element), utilizzato per l'analisi delle immagini prodotte. Per la valutazione del conteggio, infatti, sono state sfruttate le immagini dei campioni ottenute e analizzate dal software. Così facendo ogni dato sperimentale è stato salvato e reso disponibile per ulteriori

studi. Lo stesso programma permette, inoltre, un utilizzo di apposite applicazioni per uno studio quantitativo approfondito delle immagini generate.

Per l'osservazione delle cellule, sia in campo chiaro o in contrasto di fase, sia in quello fluorescente, è stato utilizzato un Nikon Ti2-E, disponibile presso il Dipartimento di Scienze Cliniche Specialistiche e Odontostomatologiche dell'Università Politecnica delle Marche; esso è un microscopio invertito a fluorescenza, con la sorgente di luce ed il condensatore posti in alto, al di sopra del tavolino portaoggetti, mentre gli obiettivi e la torretta si trovano al di sotto del tavolino portaoggetti; dotato di componenti motorizzati e intelligenti per applicazioni di imaging avanzate ad alta velocità e alta sensibilità, possiede delle caratteristiche innovative che consentono di ritenerlo uno strumento all'avanguardia in campo di ricerca, che permettono di effettuare misurazioni in time lapse (in dinamica) anche per numerose ore. Con esso, infatti, viene fornito un apposito incubatore, in grado di mantenere la vitalità del campione biologico durante le misurazioni. Tutto ciò permette di effettuare analisi del campione in vivo, andando così a considerare aspetti del sistema altrimenti difficilmente indagabili.

Il microscopio Nikon ECLIPSE Ti2 è gestito mediante il software NIS Element. Tale programma permette un utilizzo efficiente del microscopio, direttamente dal pannello di controllo ad esso associato. La manovrabilità del microscopio viene, quindi, mantenuta tramite il programma installato su un PC collegato al microscopio stesso; quest'ultimo permette la regolazione e la programmazione per la raccolta dati e la loro successiva elaborazione. Il tutto è reso di facile utilizzo mediante un pannello di controllo presente nel software, il quale fornisce la possibilità di controllo di vari parametri come la luce (per l'acquisizione di immagini sia in contrasto di fase che in fluorescenza) e la gestione degli ingrandimenti, potendo scegliere tra vari obiettivi in ingrandimento crescente.

Le potenzialità di utilizzo del software sono innumerevoli, sia per quanto riguarda la raccolta delle immagini del campione, che per la loro successiva elaborazione, grazie, soprattutto, alla possibilità di misurazioni sia in modalità live che su dati salvati in precedenza. Attraverso tale possibilità, si sono potuti applicare i metodi di conteggio anche dopo l'effettivo campionamento, nonché mantenere copia dei dati-immagine per ulteriori e future elaborazioni ed indagini.

La programmabilità del microscopio comporta anche la possibilità di creare configurazioni d'utilizzo scelte e mirate alla ricerca che si vuole eseguire.

Tutto ciò continua a valere sia per la microscopia in campo chiaro che per quella in fluorescenza, campo nel quale abbiamo maggiormente sfruttato questa possibilità. Per ogni configurazione predisposta sono mantenuti i parametri impostati e salvati in precedenza, attraverso il pannello di controllo, oltre che le coordinate spaziali relative all'eventuale incubatore. In questo modo, eseguendo misurazioni nel tempo, si è in grado di ottenere dati relativi sempre alla stessa porzione di campione, constatando il mutamento effettivo dei singoli elementi. È possibile inoltre salvare più posizioni contemporaneamente e seguire, per il tempo necessario, eventuali modifiche del nostro campione.

L'utilizzo del programma per l'analisi delle immagini coinvolge numerosi parametri d'indagine, i quali possono essere applicati manualmente o in modo predefinito, usufruibili anche per elaborazioni successive e/o ripetute. È possibile effettuare numerose misurazioni sull'immagine, sia a livello geometrico, comprendendo calcoli di distanze, aree o perimetri, sia una vasta gamma di operazioni di elaborazione, andando a variare parametri di luminosità e contrasto (LUT) e misurando l'effettiva intensità di fluorescenza dentro determinate aree di interesse (ROI); queste ultime possono essere selezionate tramite un algoritmo che rileva zone uniformi di intensità oppure manualmente, laddove l'immagine ottenuta non si presta bene alla rilevazione

automatica; il tutto può avvenire sia su immagini singole, sia su immagini scattate a determinata distanza di tempo l'una dalle altre, sullo stesso campo, andando così ad indagare le variazioni morfologiche o di fluorescenza all'interno del campione. Le impostazioni vengono modificate in precedenza, per poi far partire l'esperimento per la durata di interesse.

I valori delle ROI sono stati calcolati grazie al software e poi trasferiti su Grafici Excel; sono state inoltre calcolate le intensità medie di fluorescenza (\pm dev. standard) di tutte le cellule prese in esame nei vari campi. In seguito è stato calcolato il T-Test, per verificare se due gruppi di campioni hanno differito l'uno dall'altro (test t a due campioni indipendenti). Nel dettaglio per avere un T-test più affidabile, esso non è stato calcolato sui valori delle medie ottenute, ovvero valori di curve partite da punti diversi a tempo zero; bensì è stato calcolato facendo in modo che le curve partissero a tempo zero il più vicino possibile, andando a sottrarre al valore della curva più alta, la differenza tra le medie della curva più alta e quella più bassa.

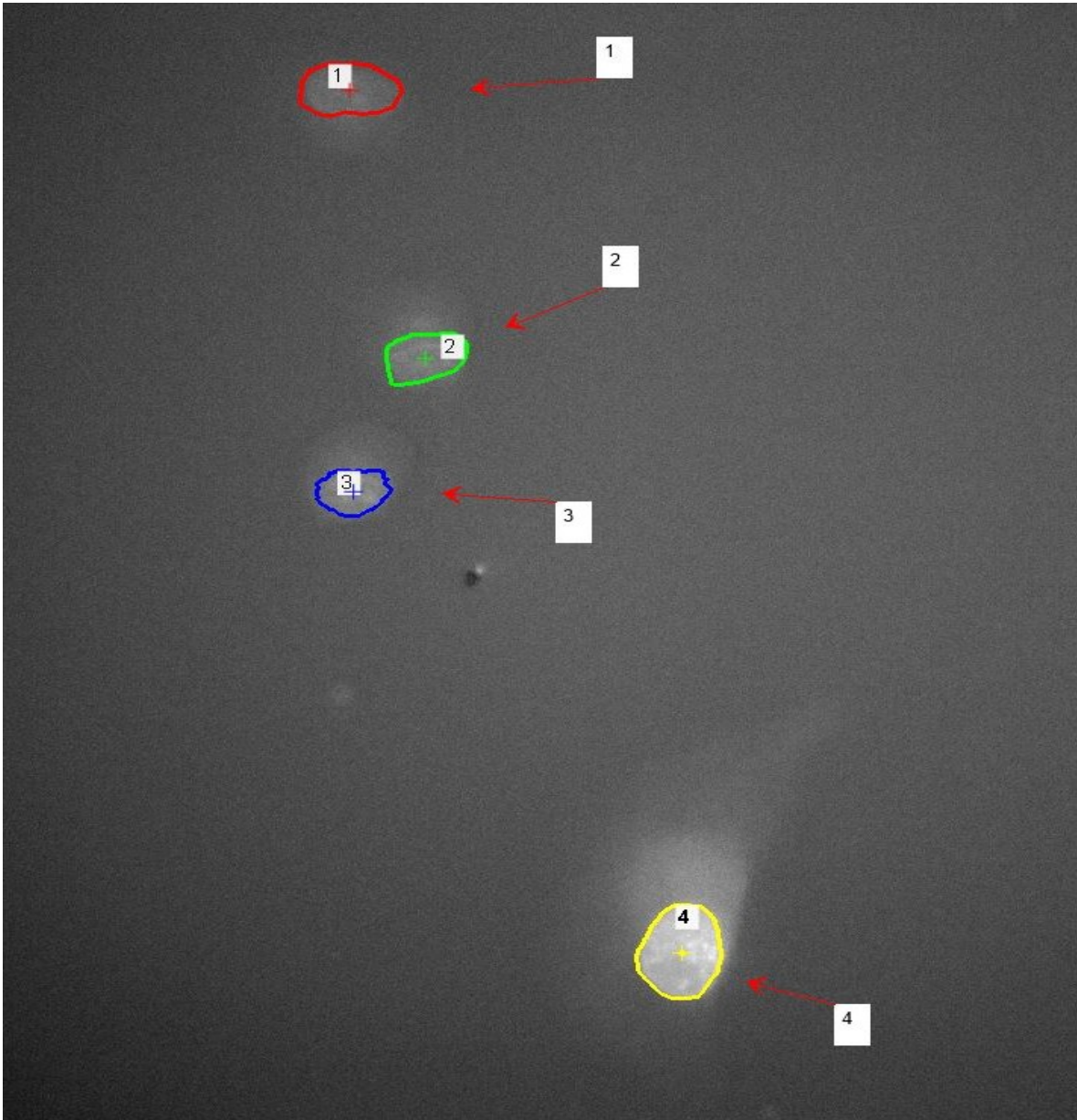


Fig.11A. Fotogramma analizzato in microscopia a fluorescenza. Analisi dell'intensità di fluorescenza all'interno delle ROI generate dal software; il valore ottenuto è la differenza tra i valori di ROI delle cellule e i valori delle ROI dell'ambiente circostante (background).

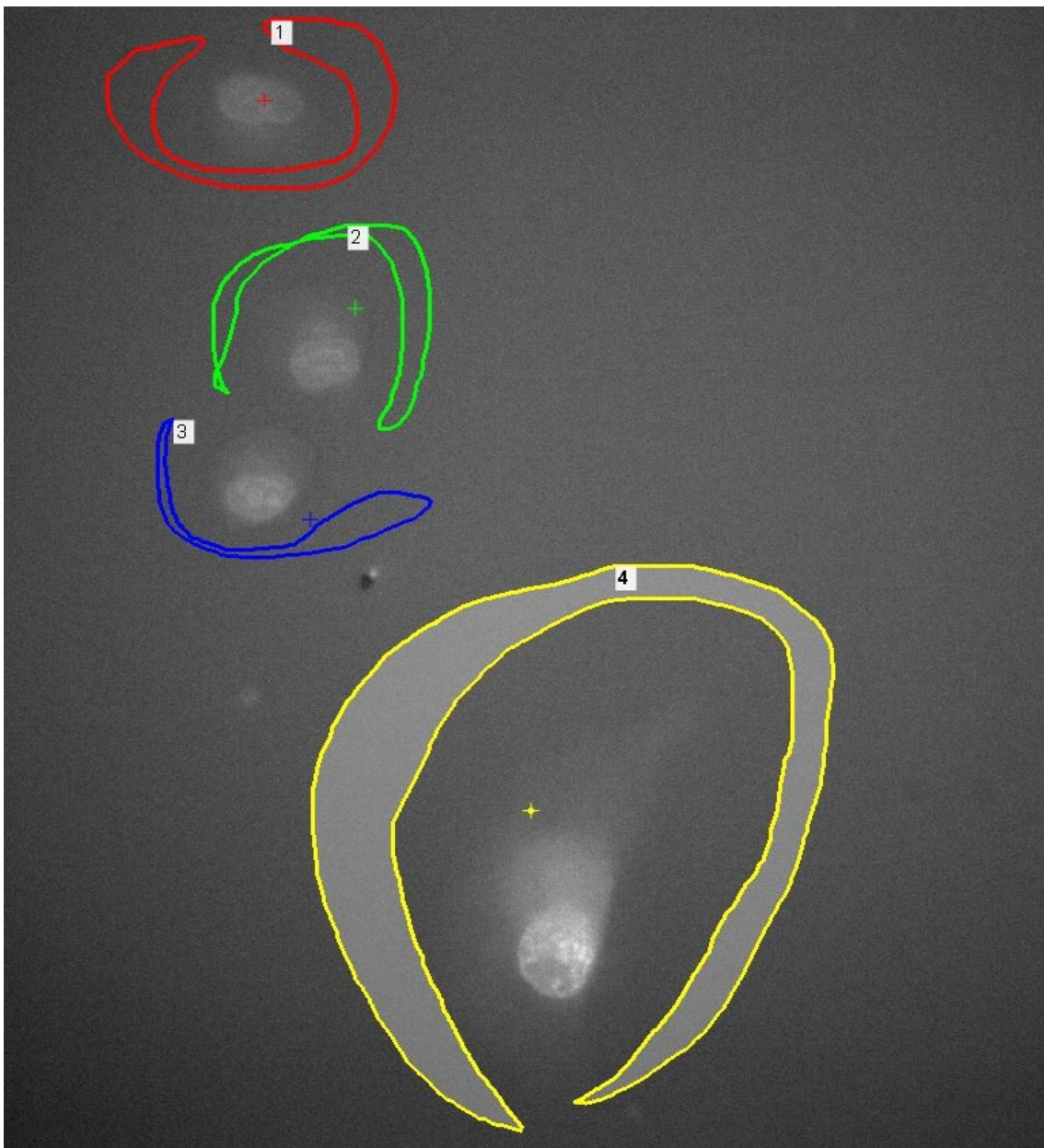


Fig.11B. Fotogramma analizzato in microscopia a fluorescenza. Analisi dell'intensità di fluorescenza all'interno delle ROI generate dal software; il valore ottenuto è la differenza tra i valori di ROI delle cellule e i valori delle ROI dell'ambiente circostante (background).

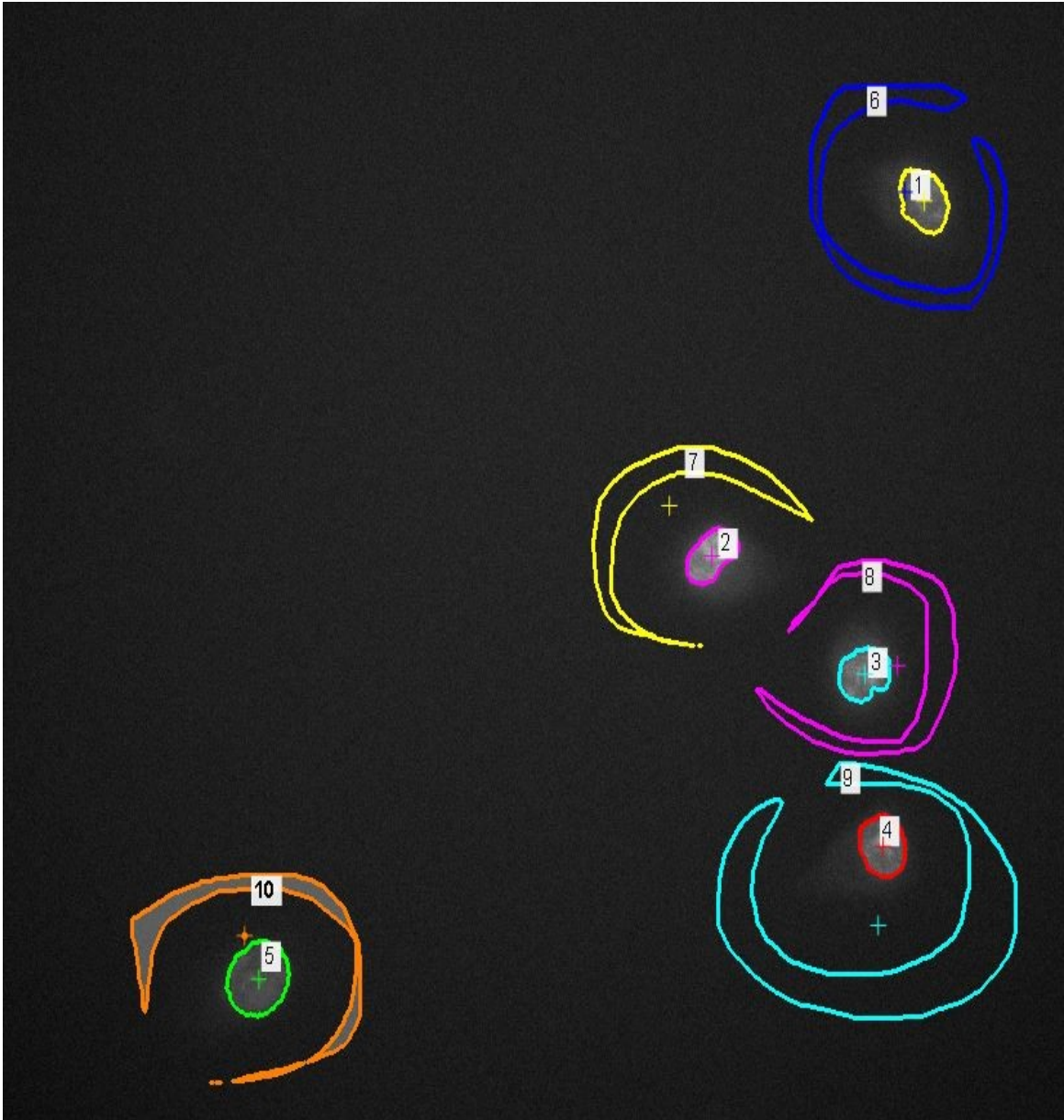


Fig.11C. Fotogramma analizzato in microscopia a fluorescenza. Analisi dell'intensità di fluorescenza all'interno delle ROI generate dal software; il valore ottenuto è la differenza tra i valori di ROI delle cellule e i valori delle ROI dell'ambiente circostante (background).

4. RISULTATI

Mediante una serie di esperimenti su cellule PANC-1, è stato valutato l'aumento della concentrazione intracellulare della doxorubicina nel tempo; gli esperimenti sono stati effettuati utilizzando un protocollo standardizzato, facilmente riproducibile, in cui vengono seminate uno stesso numero di cellule, sottoposte ad un trattamento con concentrazione di farmaco sempre uguale. Il trattamento è avvenuto sia su campioni di cellule sotto l'influenza di un campo magnetico statico mediante una calamita al neodimio, sia su campioni di cellule su cui non è stato applicato alcun campo magnetico. Una volta concluso l'esperimento, si è eliminato il farmaco dal terreno, andando ad analizzare sugli stessi campioni la variazione nel tempo della concentrazione di doxorubicina intracellulare.

In modo randomizzato in ogni esperimento sono stati presi vari campi, contenenti un numero variabile di cellule, cercando di comprendere nell'analisi zone diverse sul pozzetto; su ogni cellula è stata creata, mediante software, un'area all'interno della quale il software ha calcolato l'intensità di fluorescenza; a questo valore è stato sottratto il background, considerato come rumore di fondo, e rappresentato dall'area immediatamente attorno alla cellula in esame.

In particolare gli esperimenti effettuati possono essere raggruppati in 4 categorie:

- Campioni trattati con doxorubicina e sottoposti a campo magnetico statico (cap. 4.1);
- Campioni trattati con doxorubicina e non sottoposti a campo magnetico statico (cap. 4.2);

Nelle altre due categorie sono presenti gli stessi campioni cellulari degli esperimenti precedenti, ma in cui la doxorubicina è stata tolta e ne è stata valutata nel tempo la diminuzione di concentrazione in presenza o in assenza di campo magnetico (cap. 4.3).

4.1 Campioni sottoposti a campo magnetico statico

La prima categoria presa in esame sono i campioni trattati con doxorubicina e sottoposti a campo magnetico statico. Di seguito si riportano i grafici che mostrano le variazioni di concentrazione di doxorubicina nel tempo nei 4 esperimenti effettuati (Fig. 12). Si riportano anche i grafici relativi alle intensità medie delle cellule nei singoli campi osservati in ogni esperimento (Figure 13, 16, 19, 22). Negli altri grafici, si riportano le intensità di fluorescenza di ogni singola cellula di ogni campo considerato.

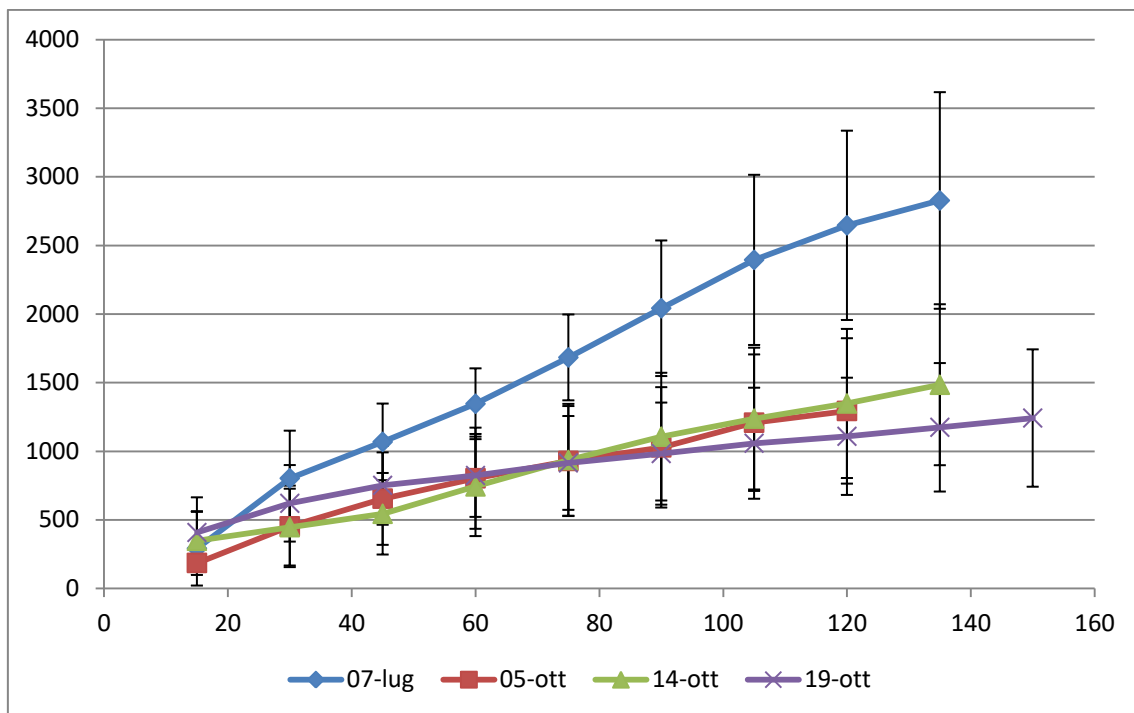


Fig. 12. Analisi di cellule sottoposte a trattamento con doxorubicina e campo magnetico statico. Sull'asse delle ascisse sono presenti i minuti, sull'asse delle ordinate il valore dell'intensità.

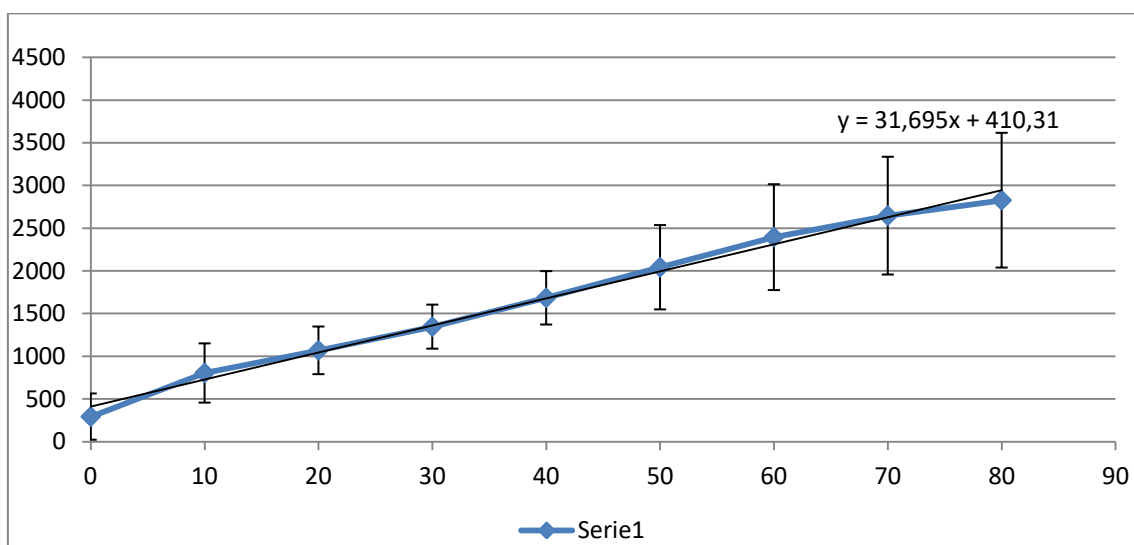


Fig.13. 7 Luglio: Grafico dell'intensità media di fluorescenza (\pm dev. standard) di tutte le cellule prese in esame in tutti i campi. Sull'asse delle ascisse sono presenti i minuti, sull'asse delle ordinate il valore dell'intensità di fluorescenza.

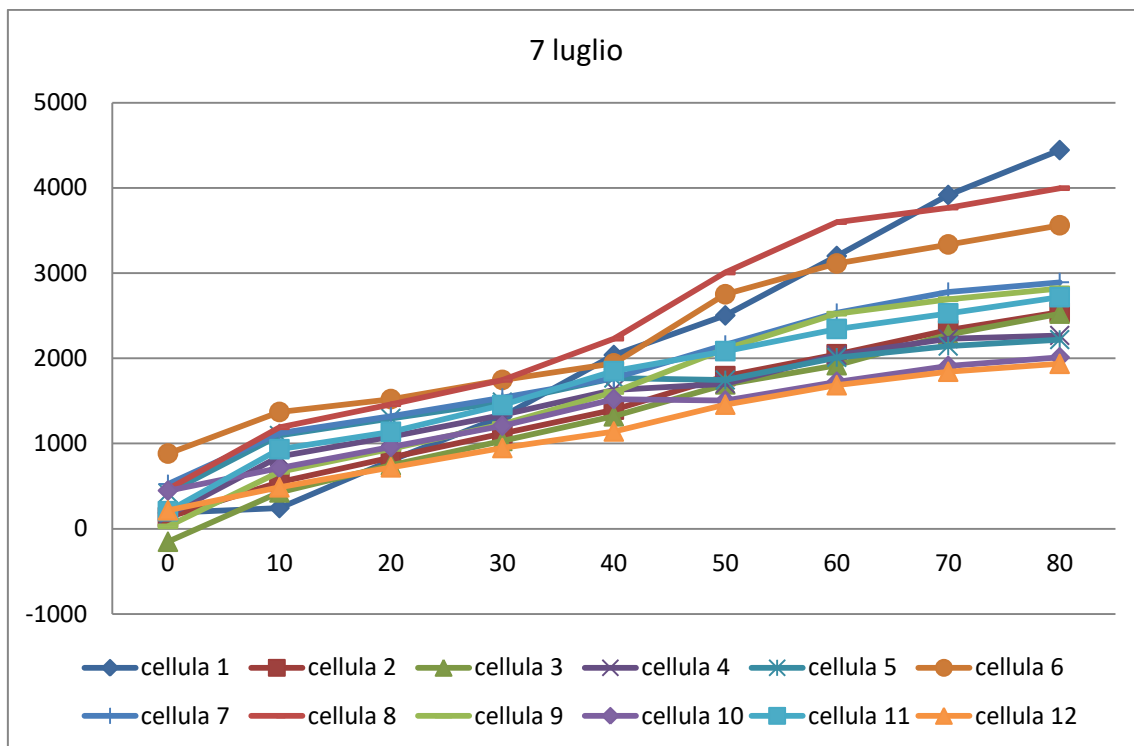


Fig. 14. Grafico dell'intensità di fluorescenza delle cellule nel campo preso in esame; in particolare le analisi sono state eseguite su foto scattate ogni 10 minuti, per 80 minuti complessivi.

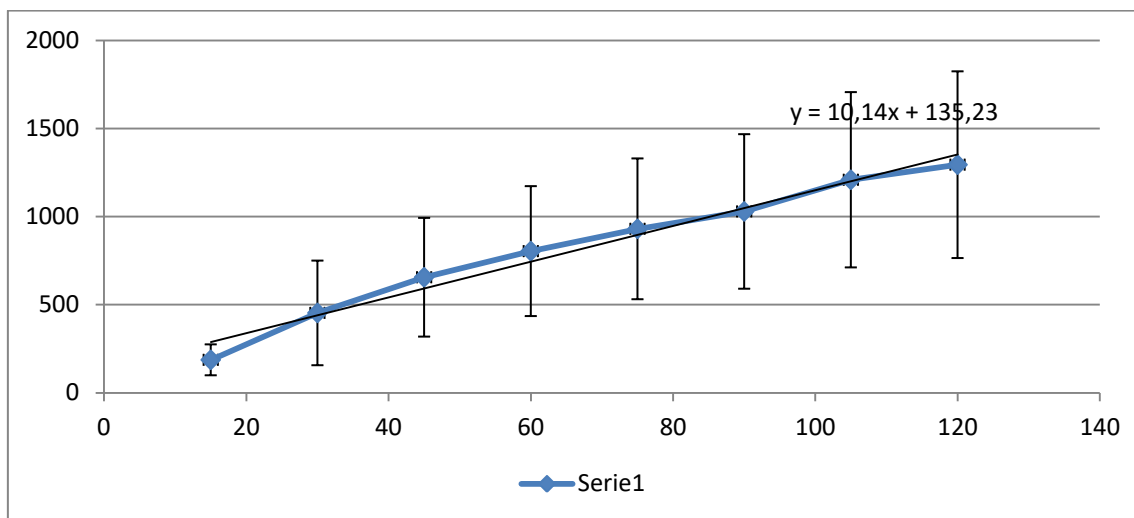


Fig. 15. 5 ottobre: Grafico dell'intensità media di fluorescenza (\pm dev. standard) di tutte le cellule prese in esame in tutti i campi. Foto scattate ogni 15 minuti, per 120 minuti complessivi. Sull'asse delle ascisse sono presenti i minuti, sull'asse delle ordinate il valore dell'intensità di fluorescenza.

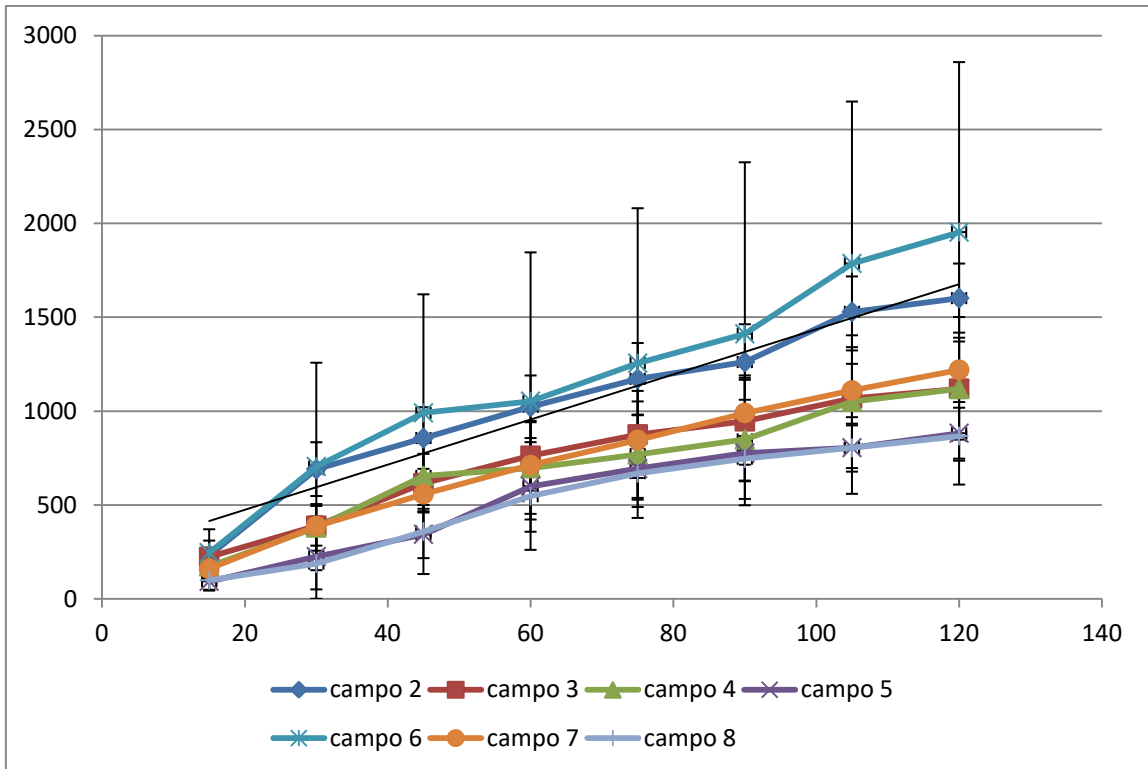
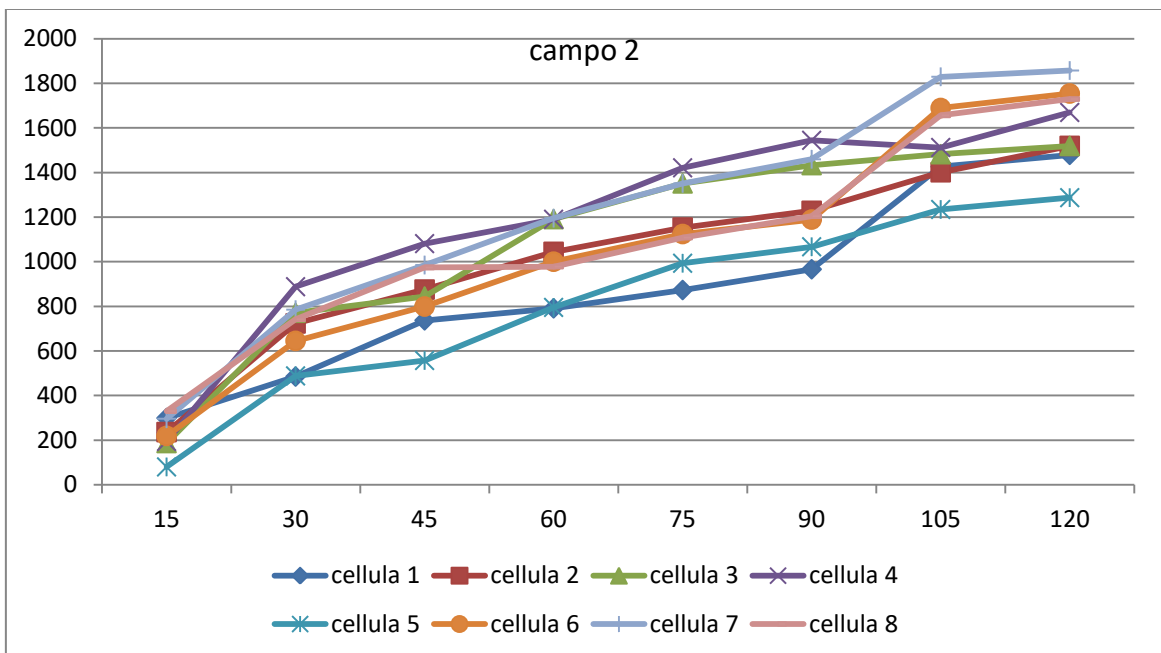
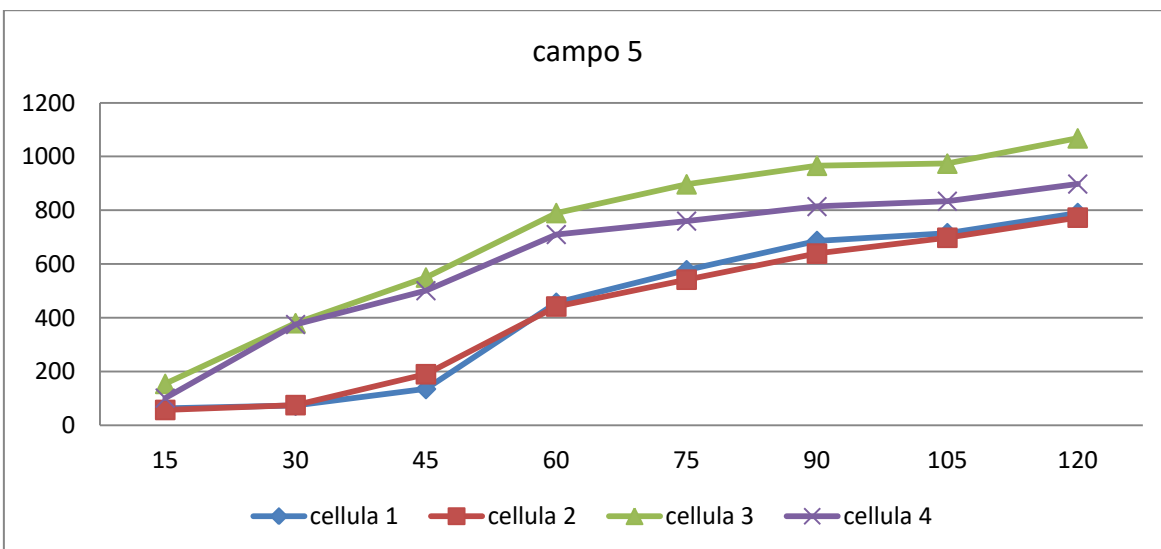
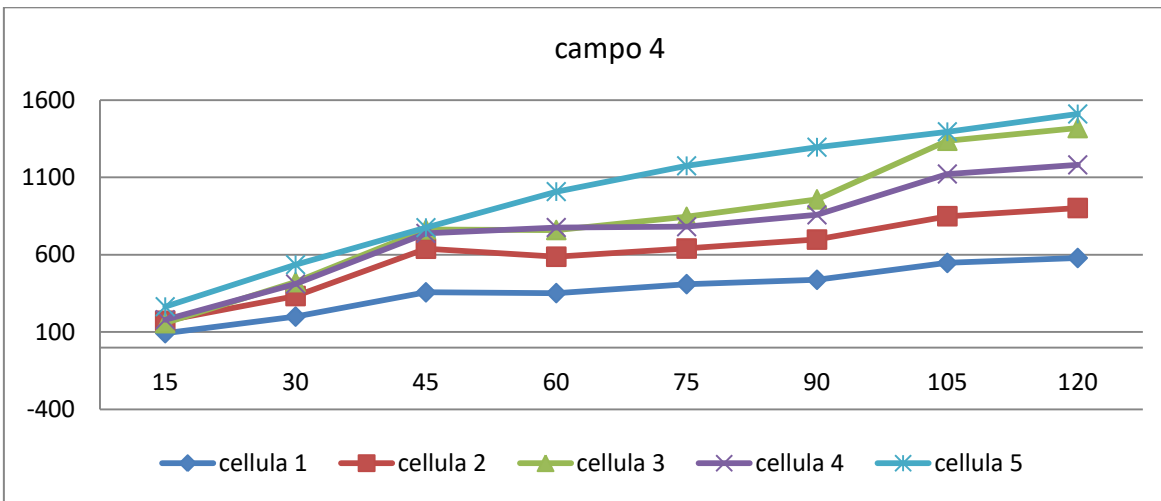
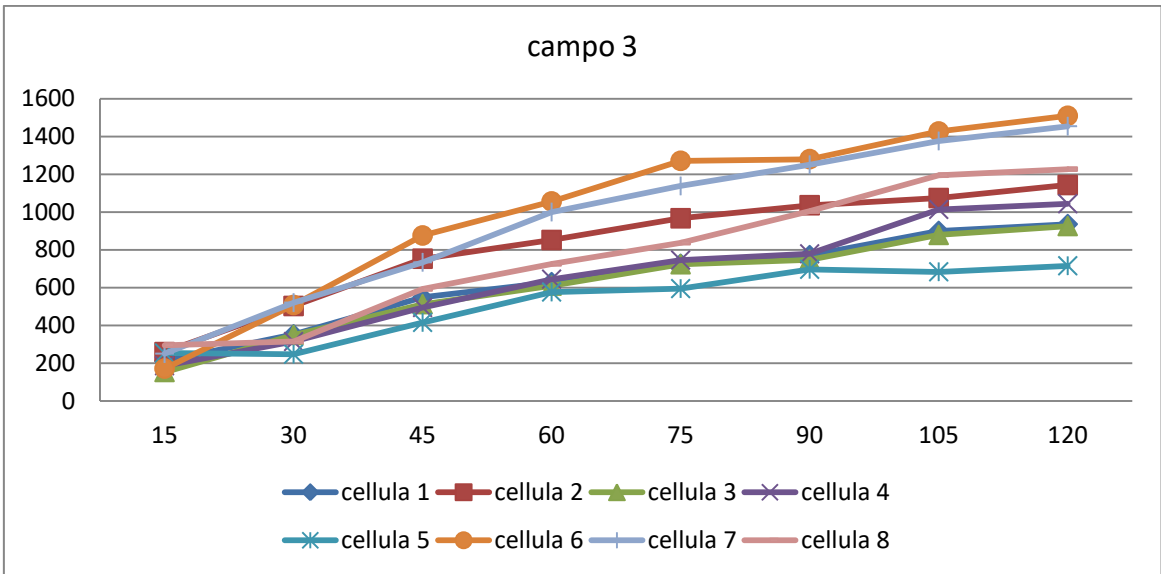


Fig.16. 5 ottobre: Grafico dell'intensità media di fluorescenza (\pm dev. standard) di tutte le cellule di un determinato campo.





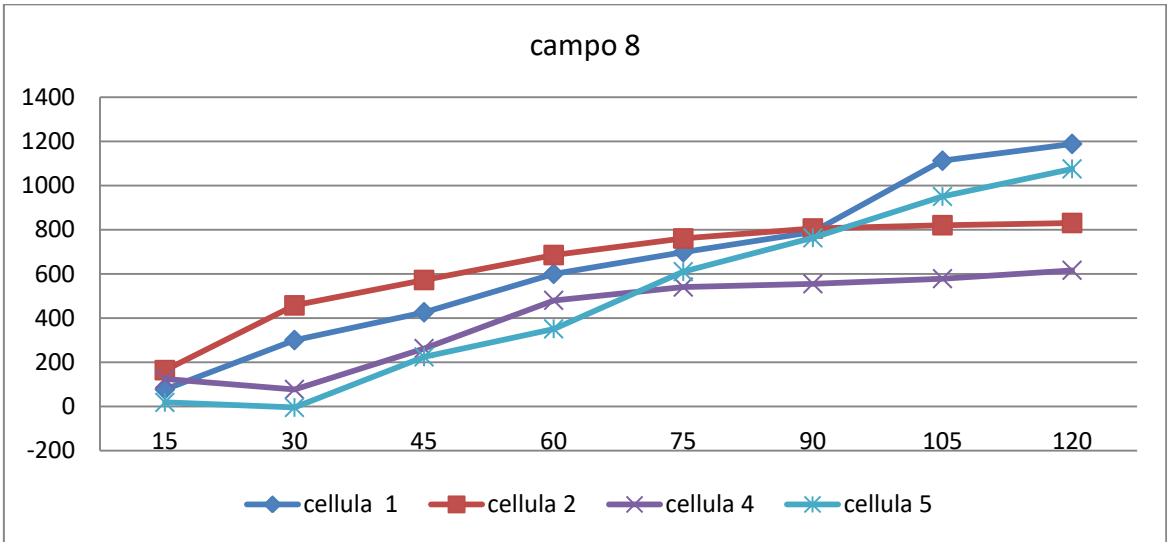
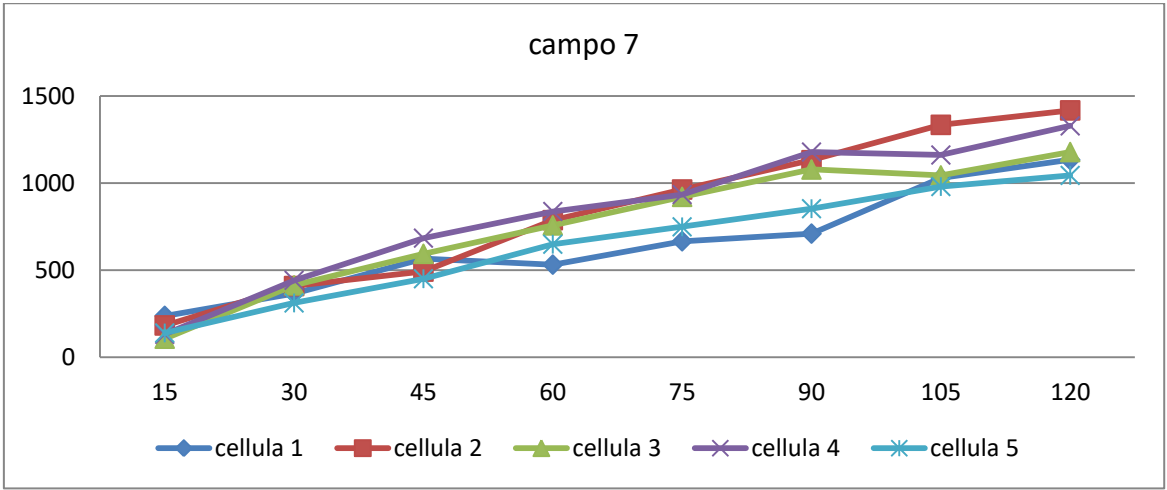
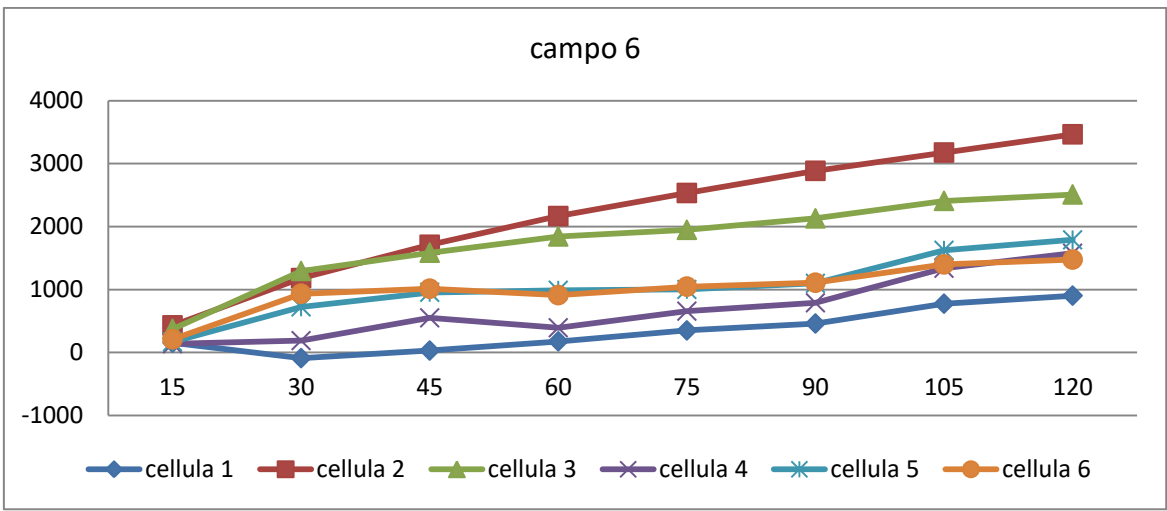


Fig.17. 5 ottobre: Grafico dell'intensità di fluorescenza delle cellule, in ogni campo preso in esame.

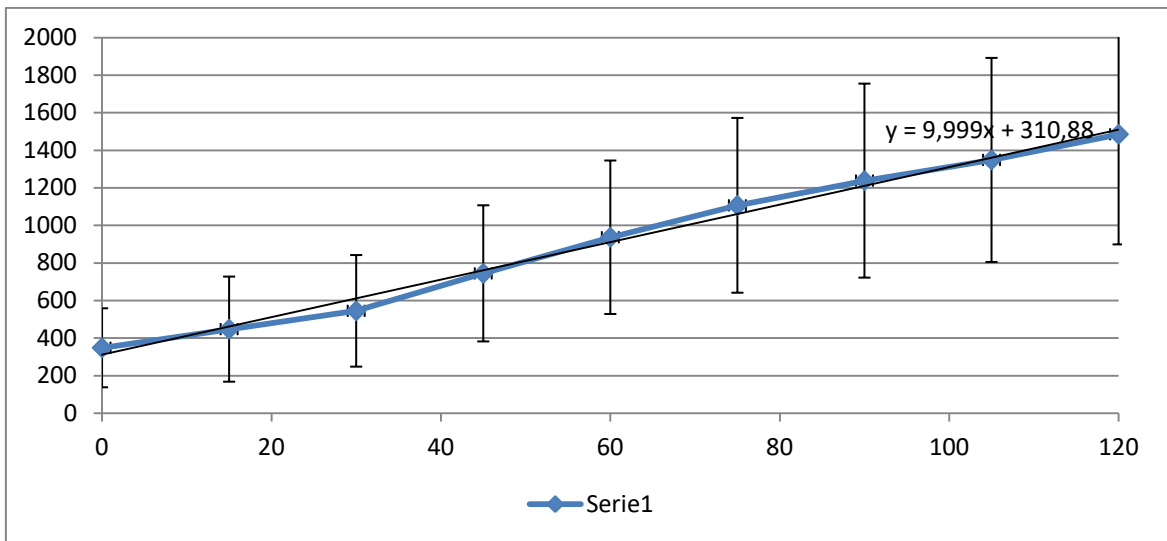


Fig.18. 14 ottobre: Grafico dell'intensità media di fluorescenza (\pm dev. standard) di tutte le cellule prese in esame in tutti i campi. Foto scattate ogni 15 minuti, per 120 minuti complessivi. Sull'asse delle ascisse sono presenti i minuti, sull'asse delle ordinate il valore dell'intensità di fluorescenza.

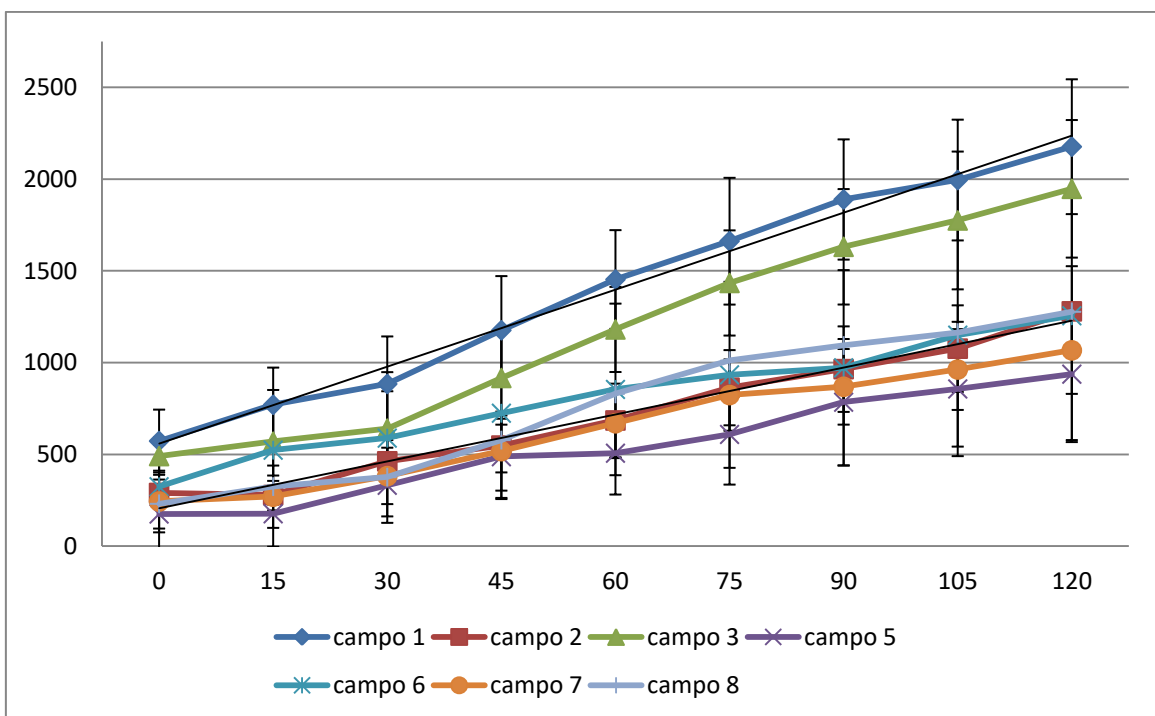
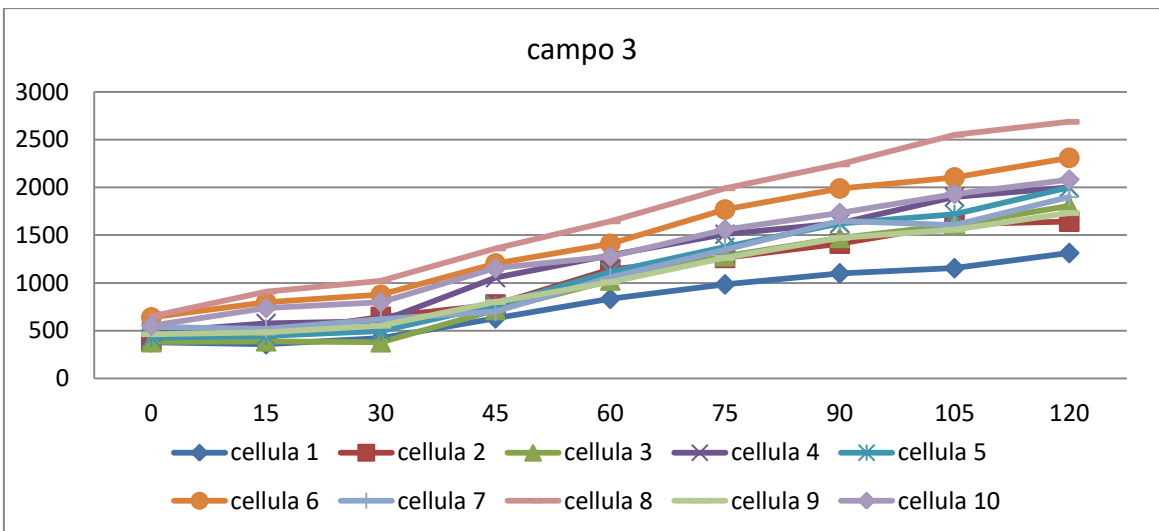
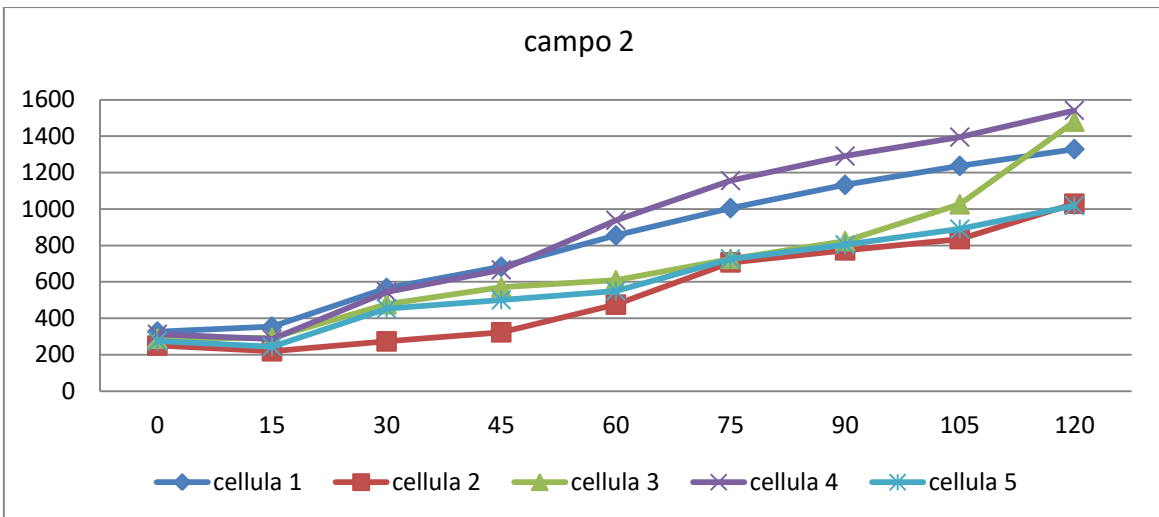
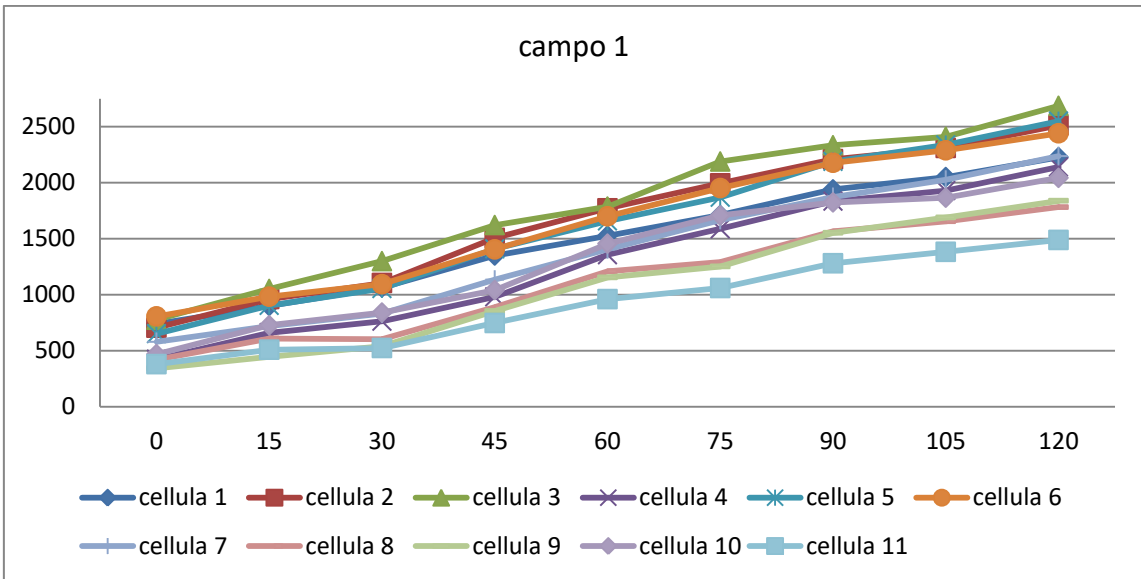
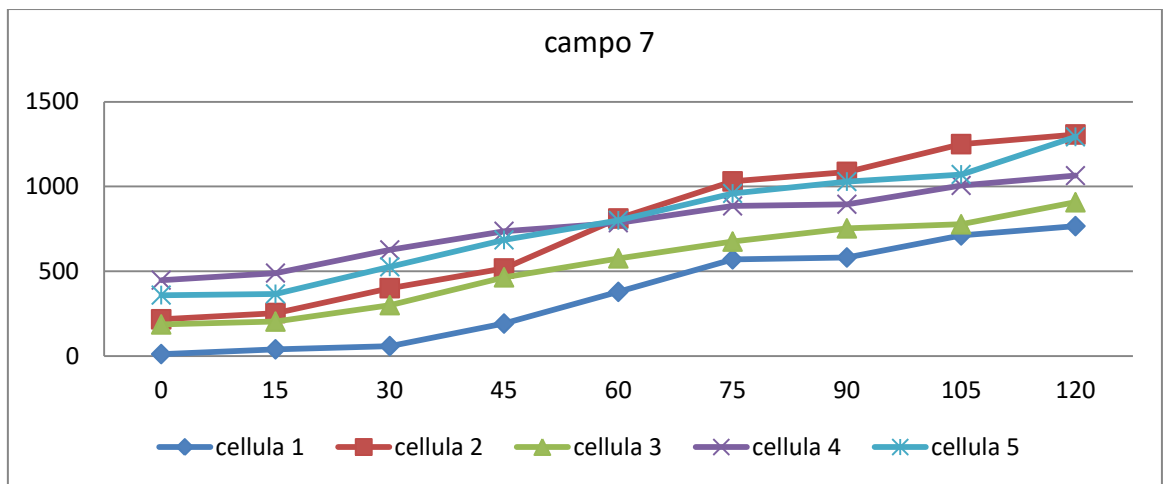
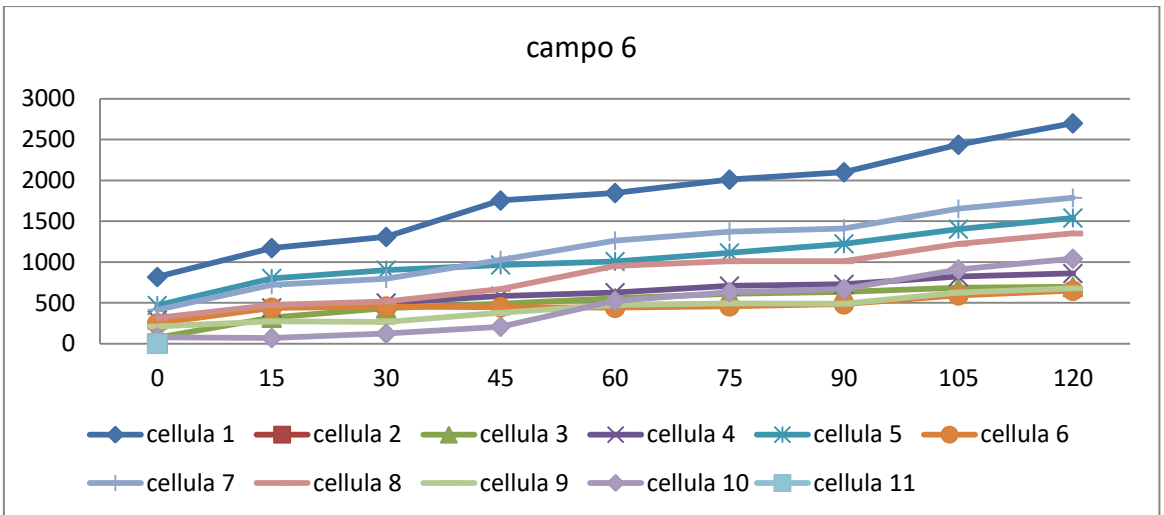
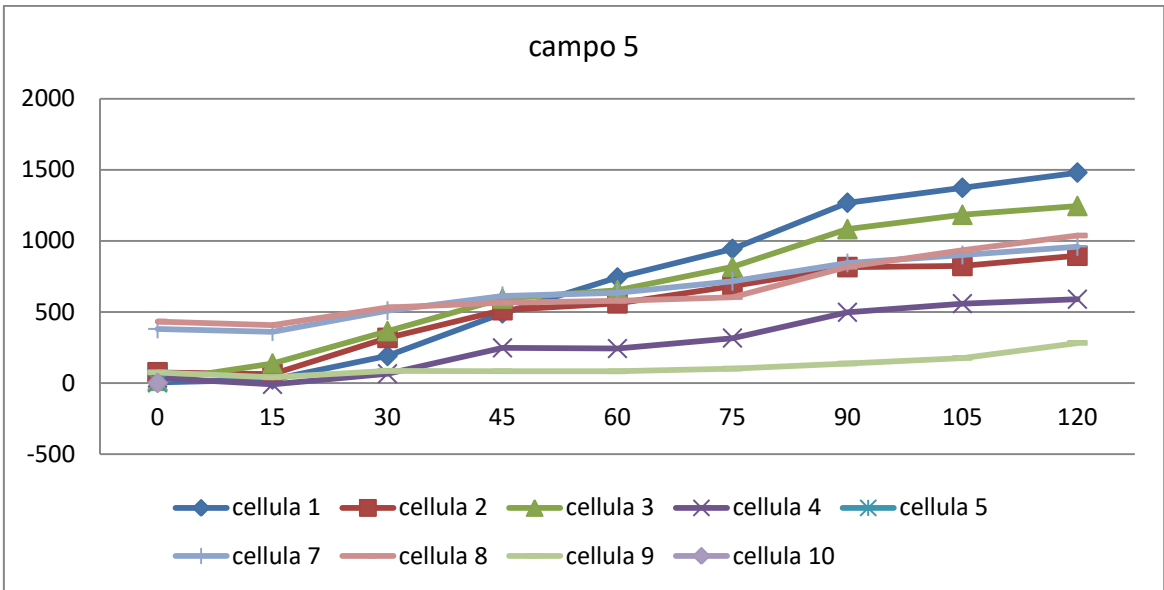


Fig.19. 14 ottobre: Grafico dell'intensità media di fluorescenza (\pm dev. standard) di tutte le cellule di un determinato campo.





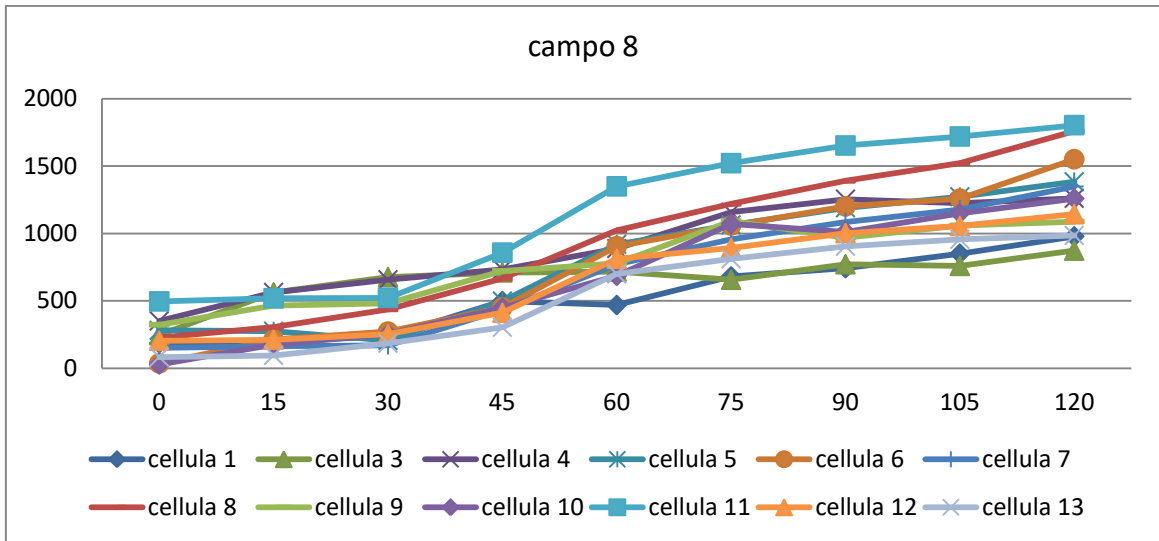


Fig.20. 14 ottobre: Grafico dell'intensità di fluorescenza delle cellule, in ogni campo preso in esame.

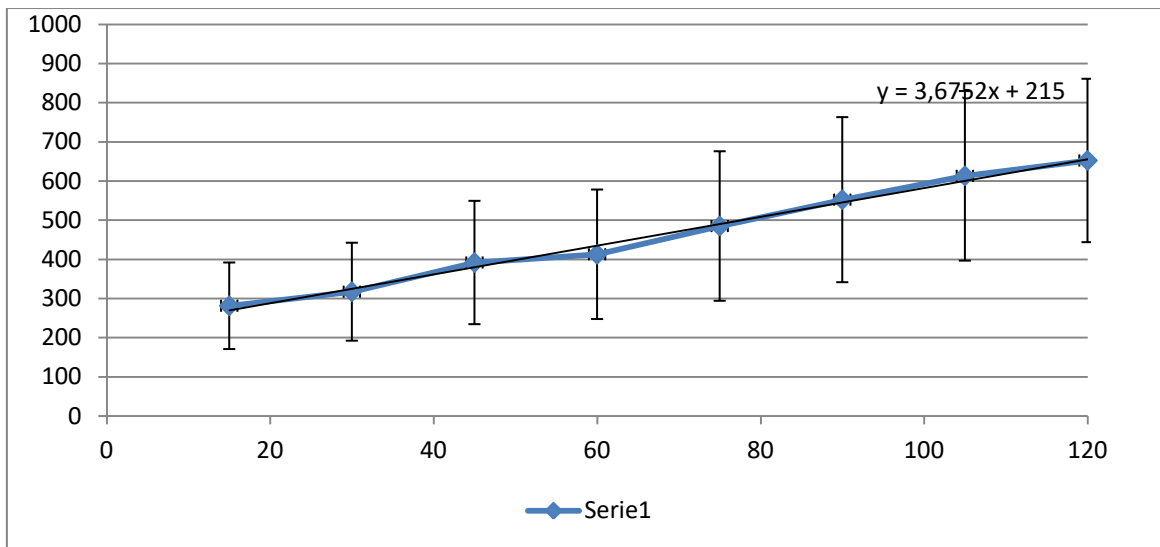


Fig.21. 19 ottobre: Grafico dell'intensità media di fluorescenza (\pm dev. standard) di tutte le cellule prese in esame in tutti i campi. Foto scattate ogni 15 minuti per 120 minuti complessivi. Sull'asse delle ascisse sono presenti i minuti, sull'asse delle ordinate il valore dell'intensità di fluorescenza.

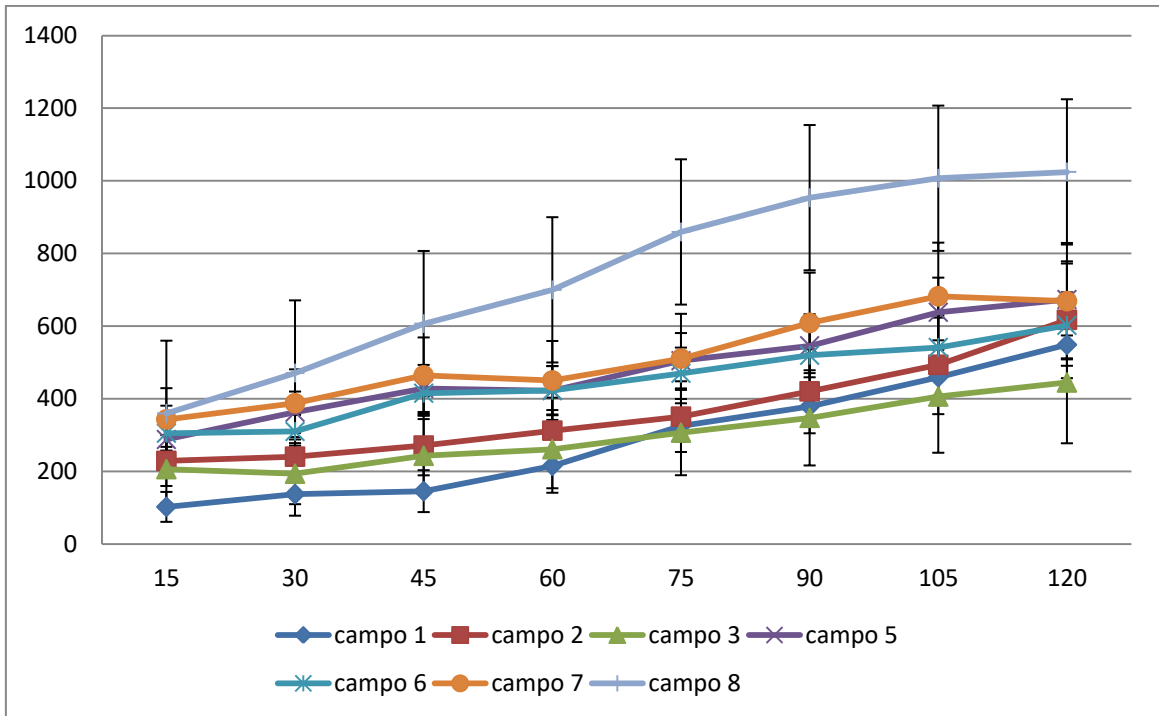
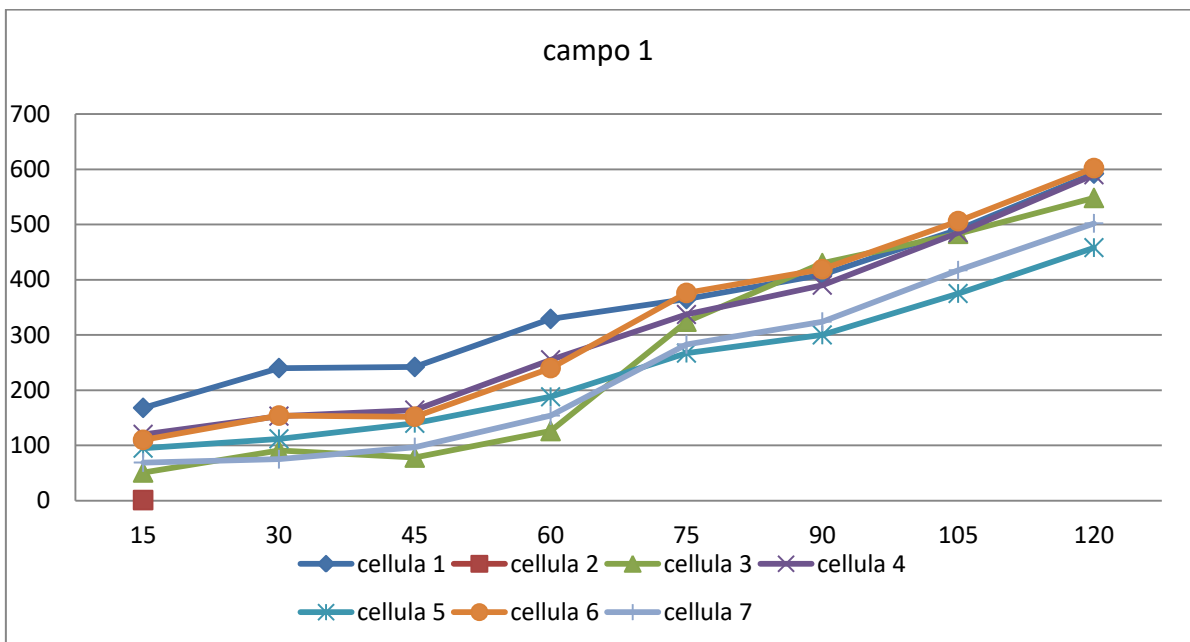
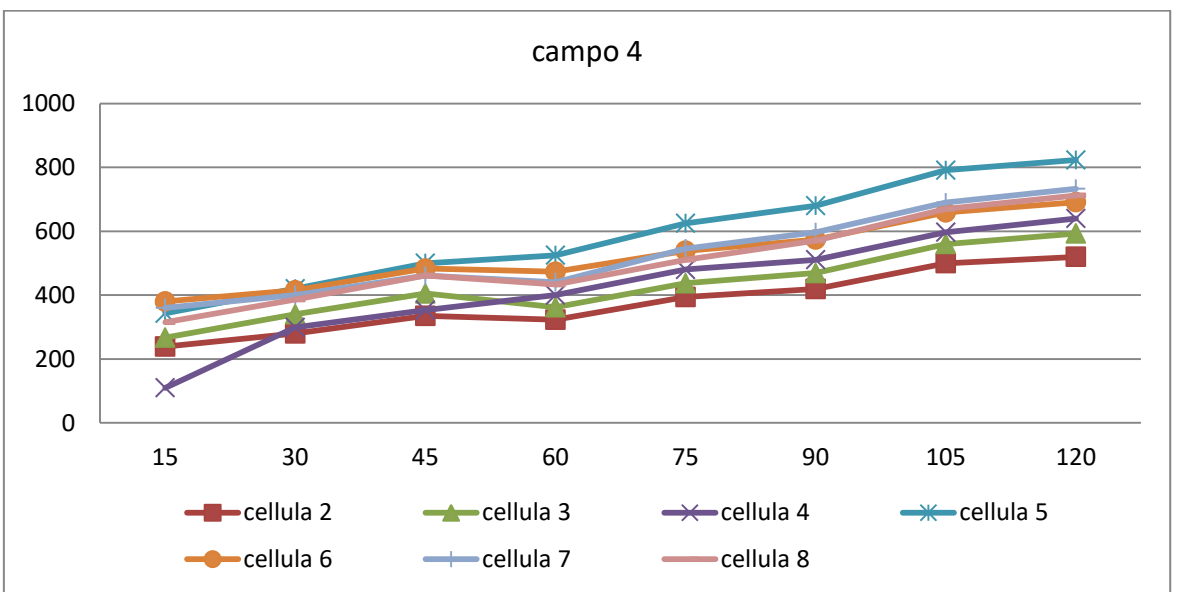
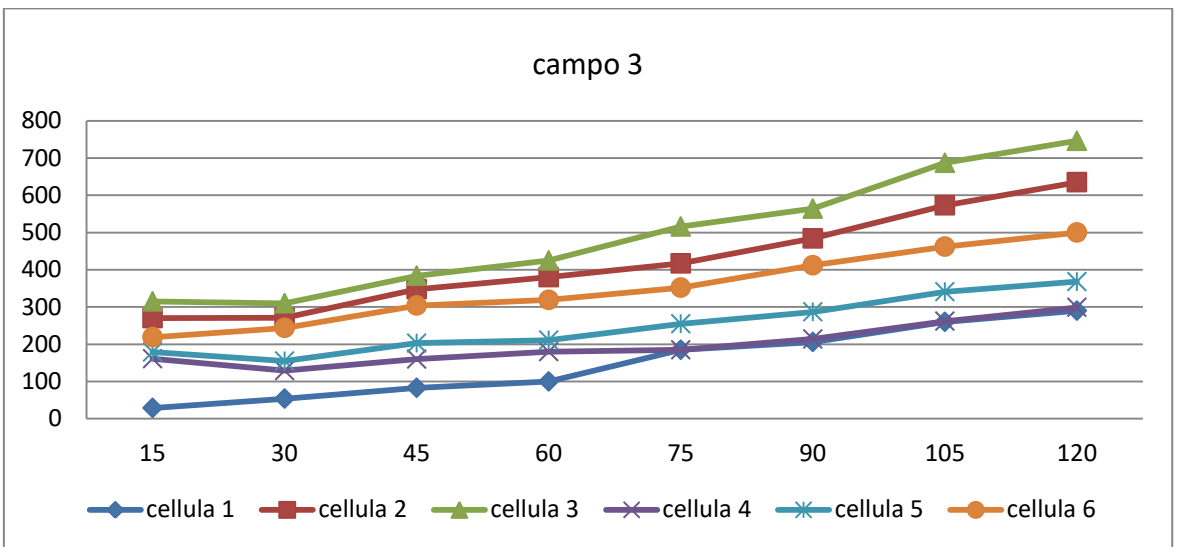
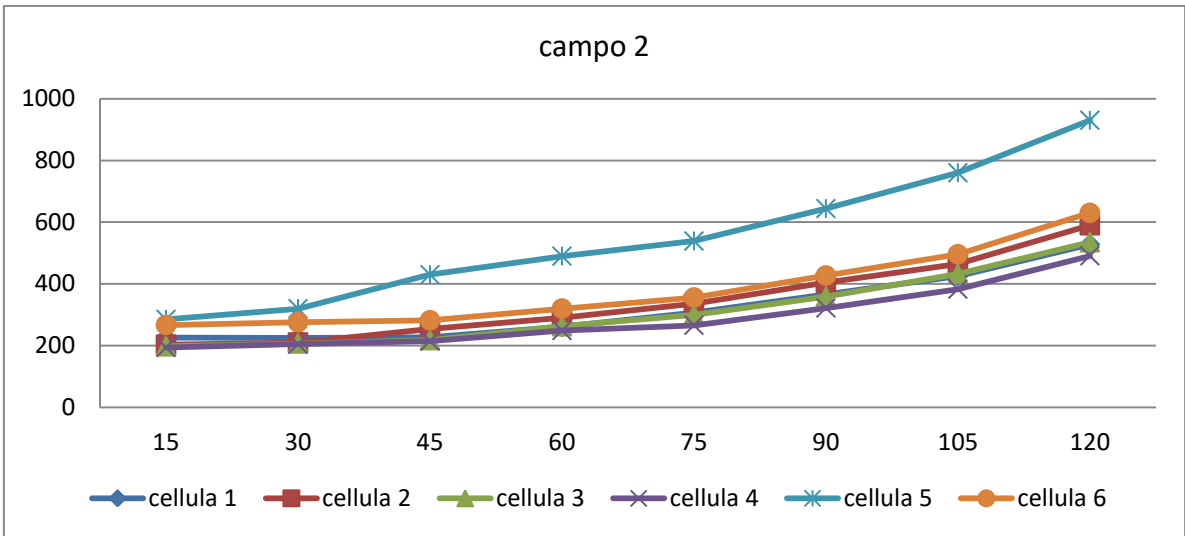
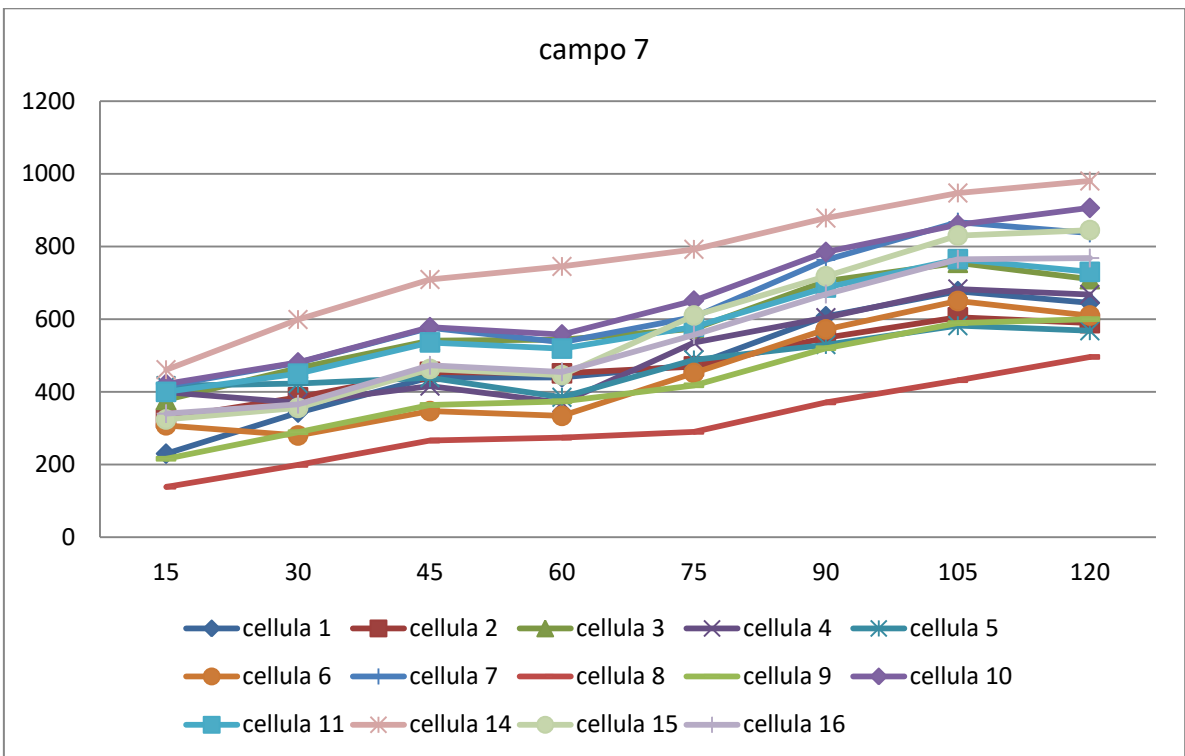
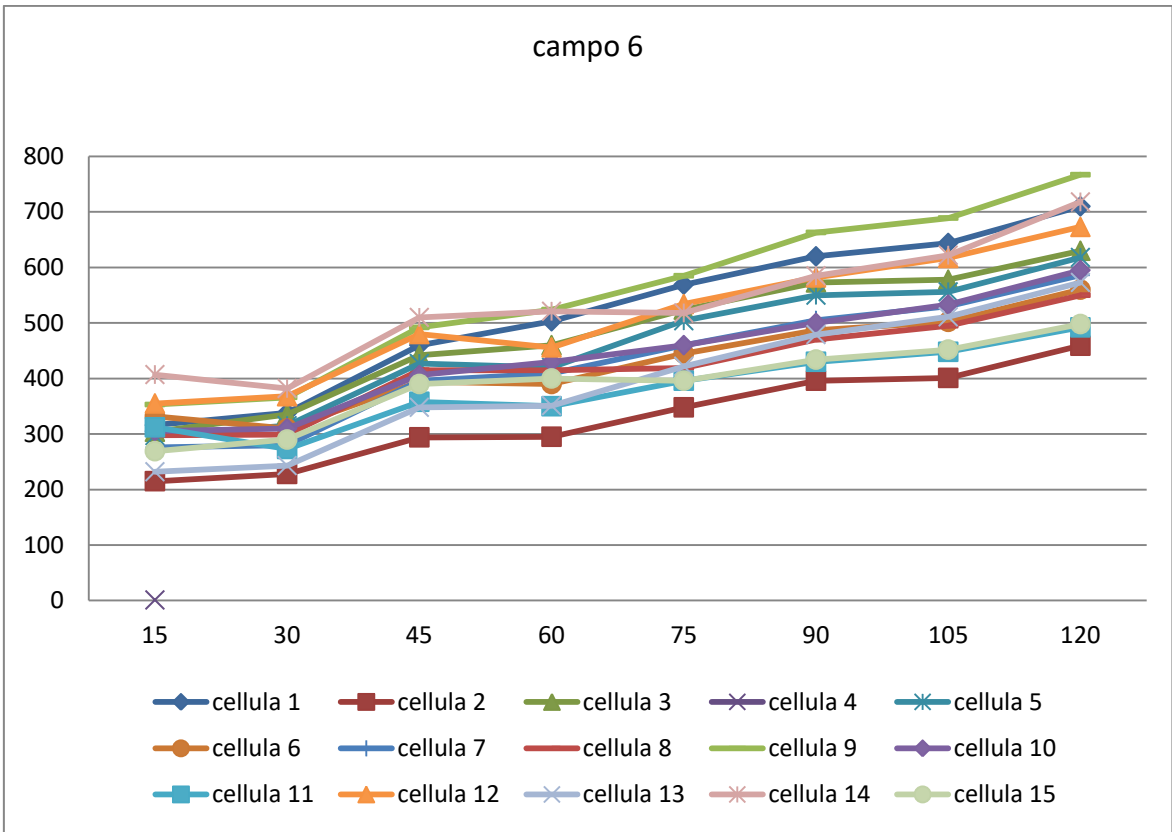


Fig.22. 19 ottobre: Grafico dell'intensità media di fluorescenza (\pm dev. standard) di tutte le cellule di un determinato campo.







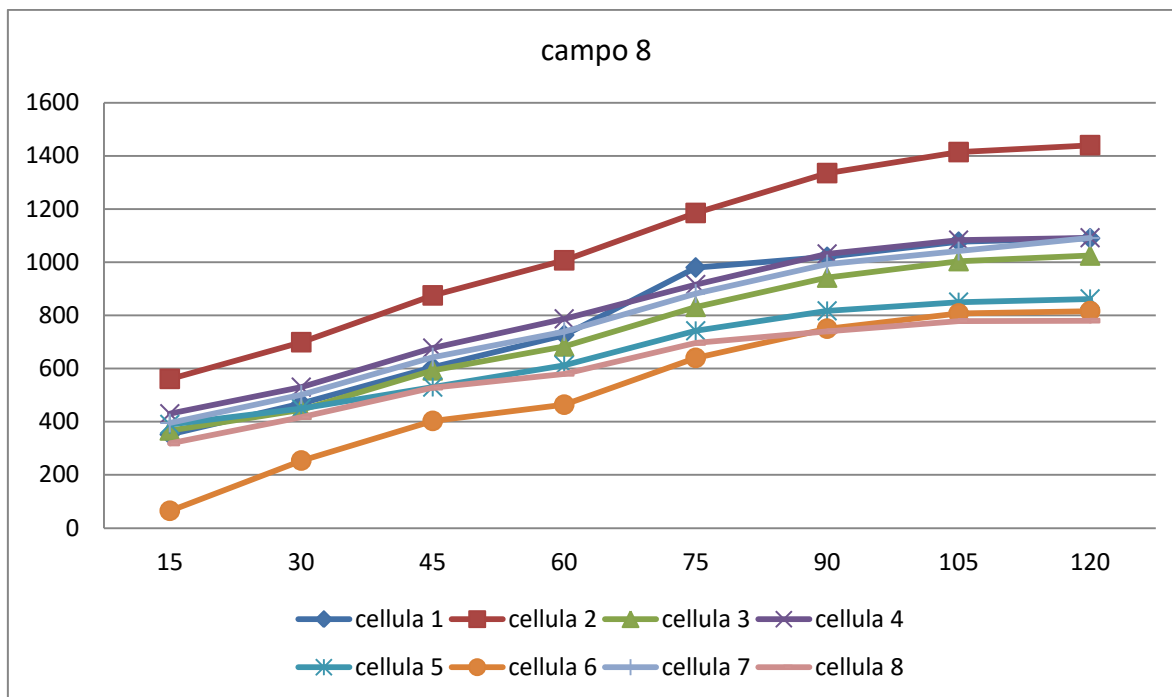


Fig.23. 19 ottobre: Grafico dell'intensità di fluorescenza delle cellule, in ogni campo preso in esame.

4.2 Campioni non sottoposti a campo magnetico statico

La seconda categoria presa in esame sono i campioni trattati con doxorubicina ma non sottoposti a campo magnetico statico. Di seguito si riportano i grafici che mostrano le variazioni di concentrazione di doxorubicina nel tempo nei 4 esperimenti effettuati (Fig. 24). Si riportano anche i grafici relativi alle intensità medie delle cellule nei singoli campi osservati in ogni esperimento (Figure 25, 28, 31, 34). Negli altri grafici, si riportano le intensità di fluorescenza di ogni singola cellula di ogni campo considerato.

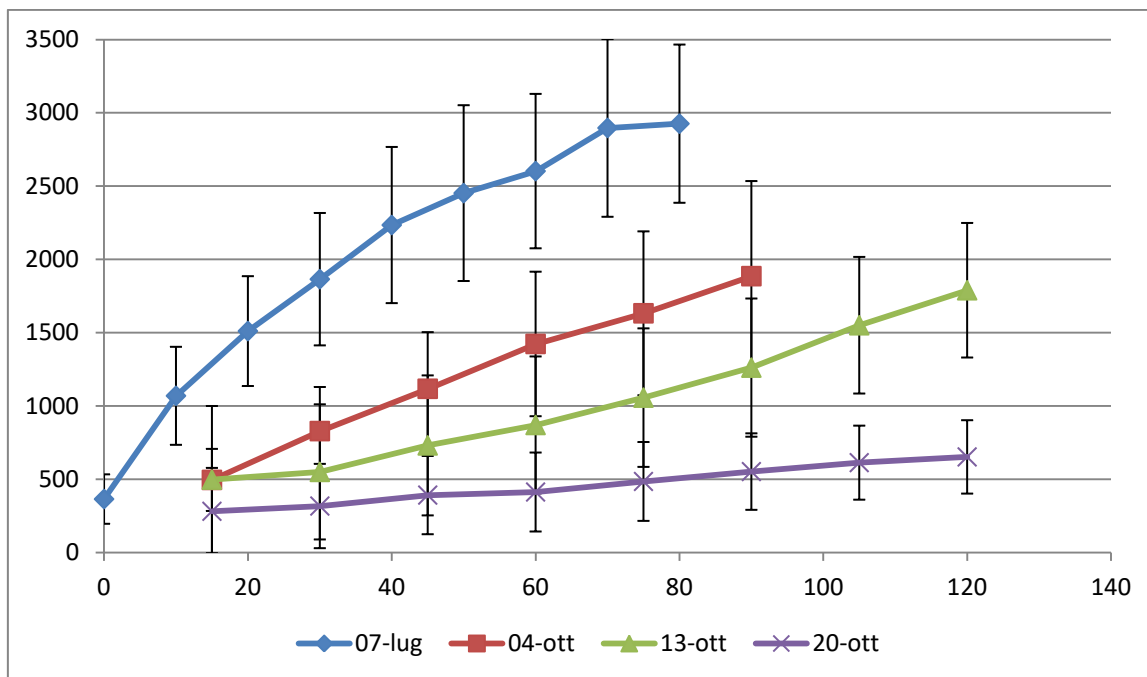


Fig.24. Grafico dell'intensità media di fluorescenza (\pm dev. standard) di tutte le cellule prese in esame in tutti i campi; il campione è trattato con doxorubicina ma non è sottoposto all'azione di un campo magnetico statico. Sull'asse delle ascisse sono presenti i minuti, sull'asse delle ordinate il valore dell'intensità di fluorescenza.

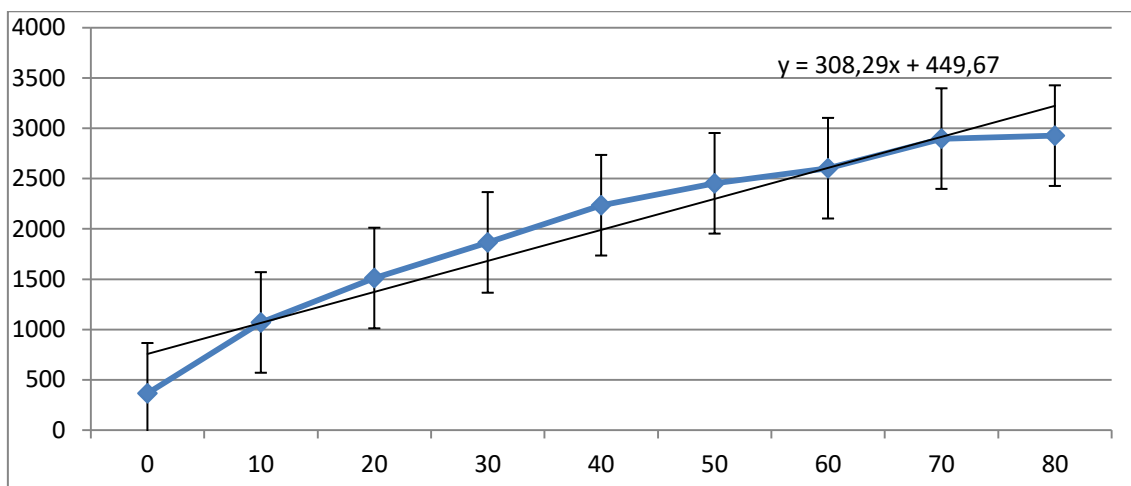


Fig.25. 7 luglio: Grafico dell'intensità media di fluorescenza (\pm dev. standard) di tutte le cellule prese in esame in tutti i campi. Foto scattate ad intervalli di 10 minuti, per una durata complessiva di 80 minuti. Sull'asse delle ascisse sono presenti i minuti, sull'asse delle ordinate il valore dell'intensità di fluorescenza.

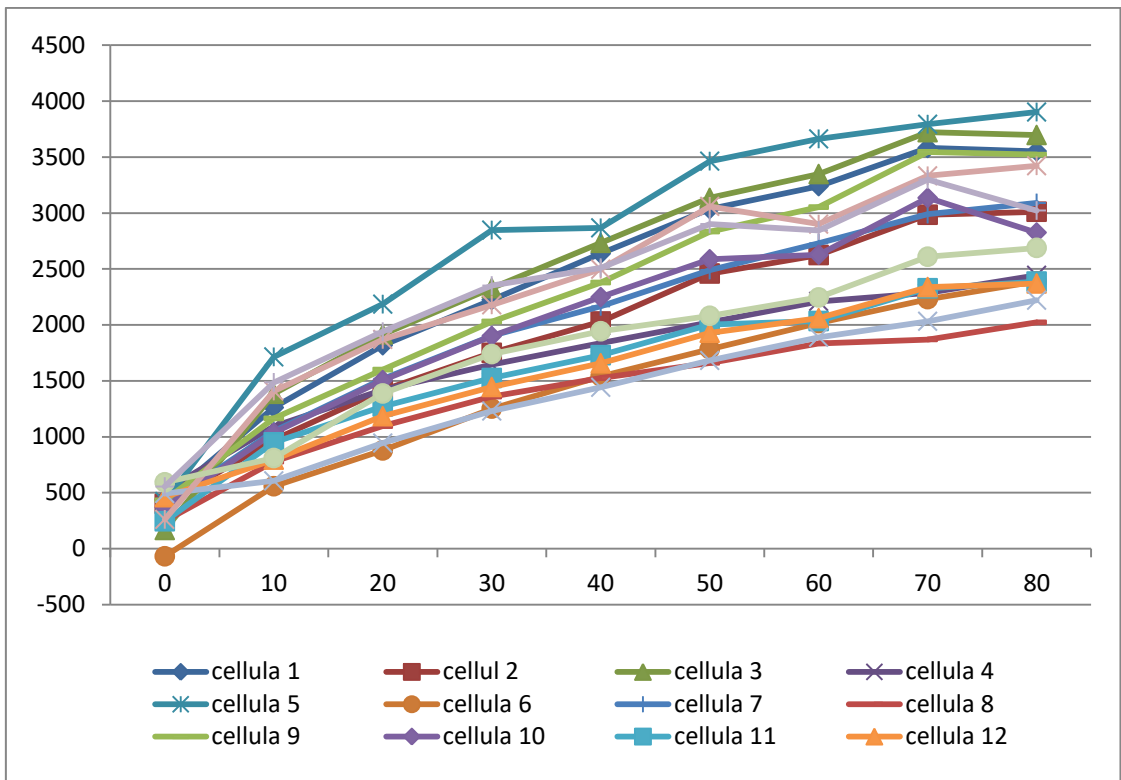


Fig.26 . 7 luglio: Grafico dell'intensità di fluorescenza delle cellule prese in esame.

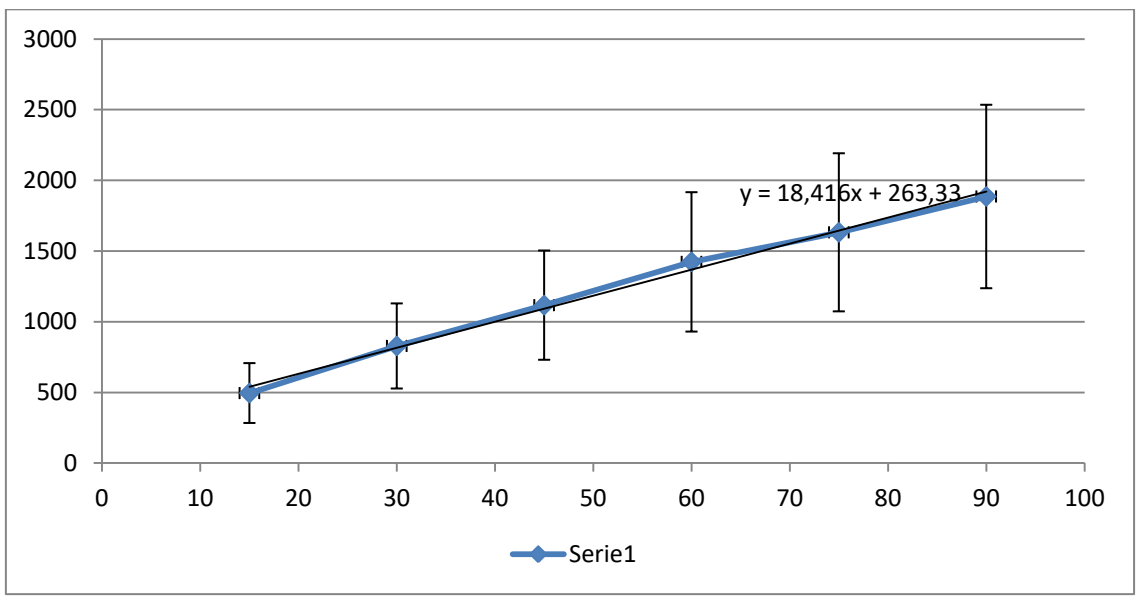


Fig.27. 4 ottobre: Grafico dell'intensità media di fluorescenza(± dev. standard) di tutte le cellule prese in esame in tutti i campi.

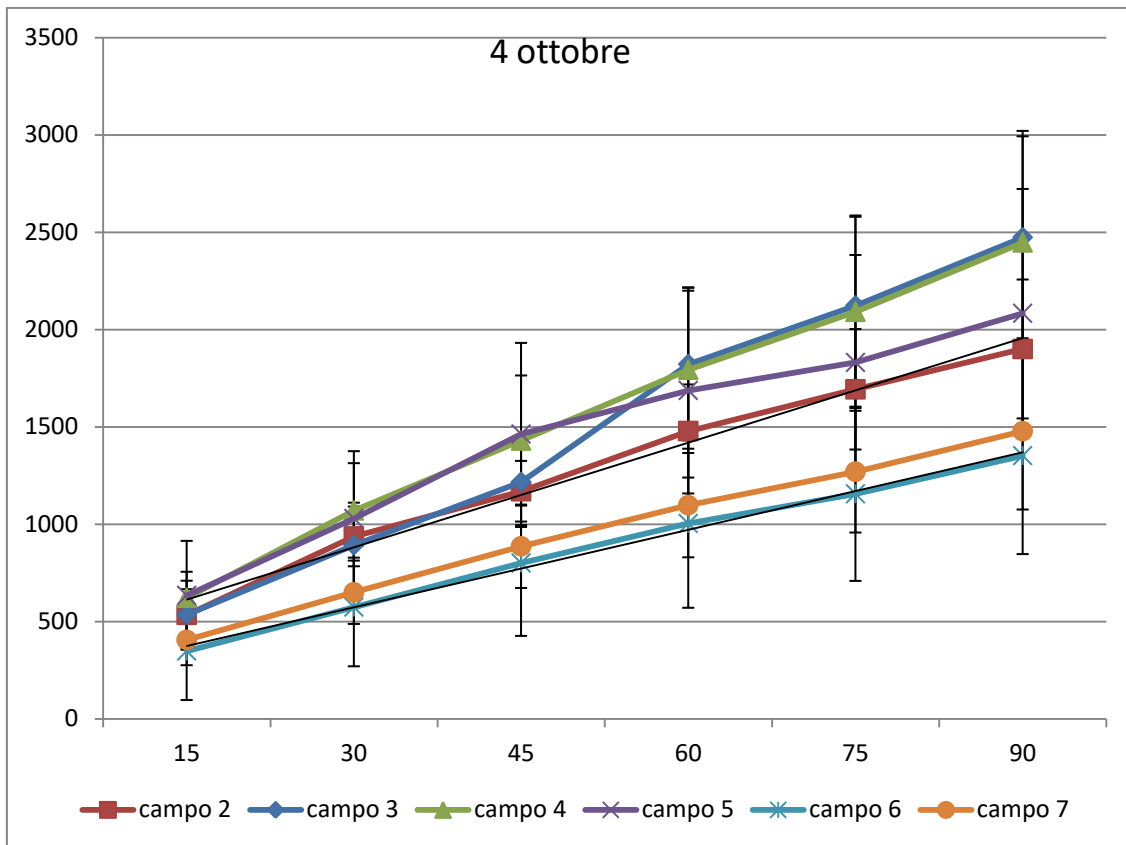
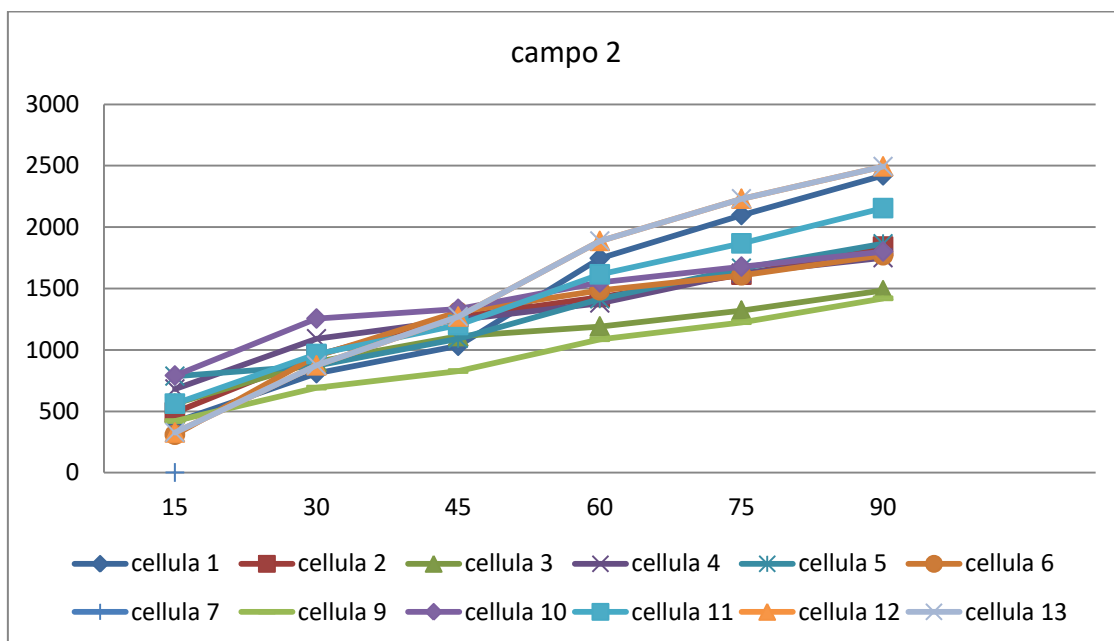
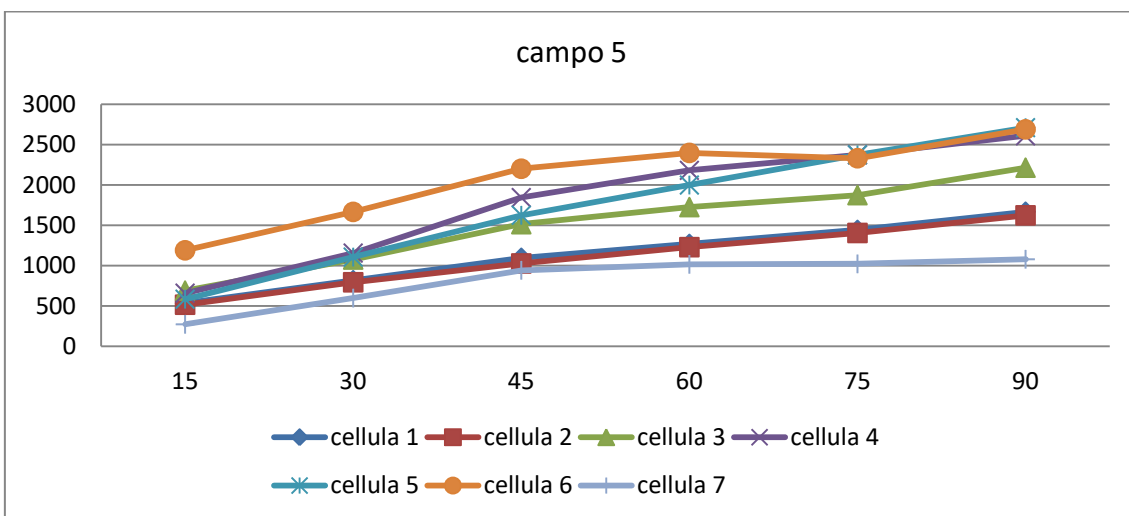
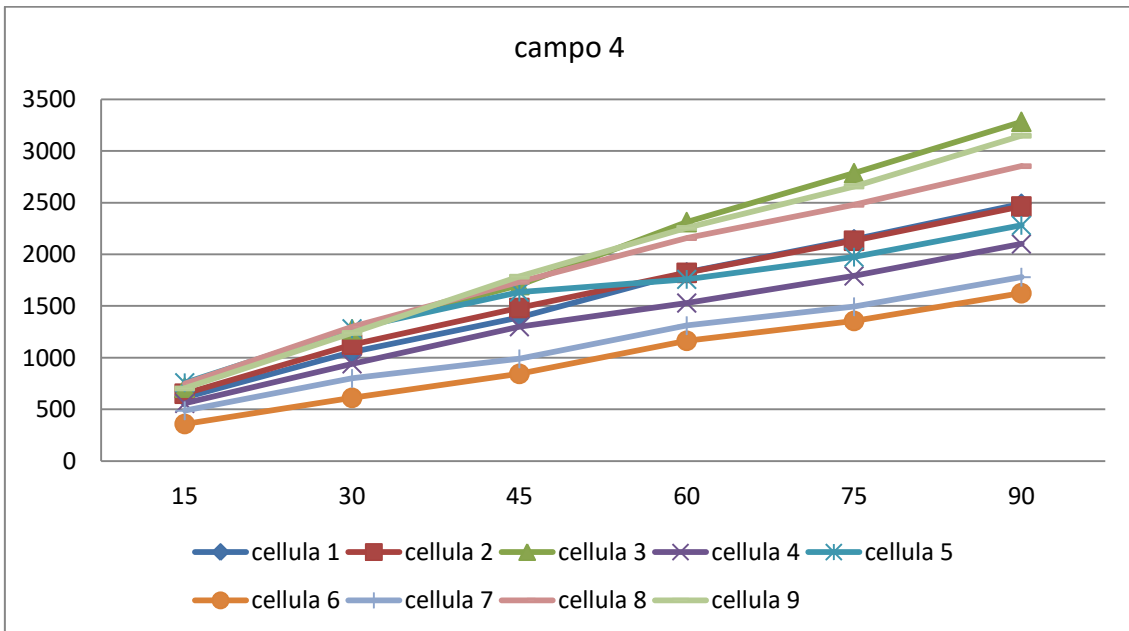
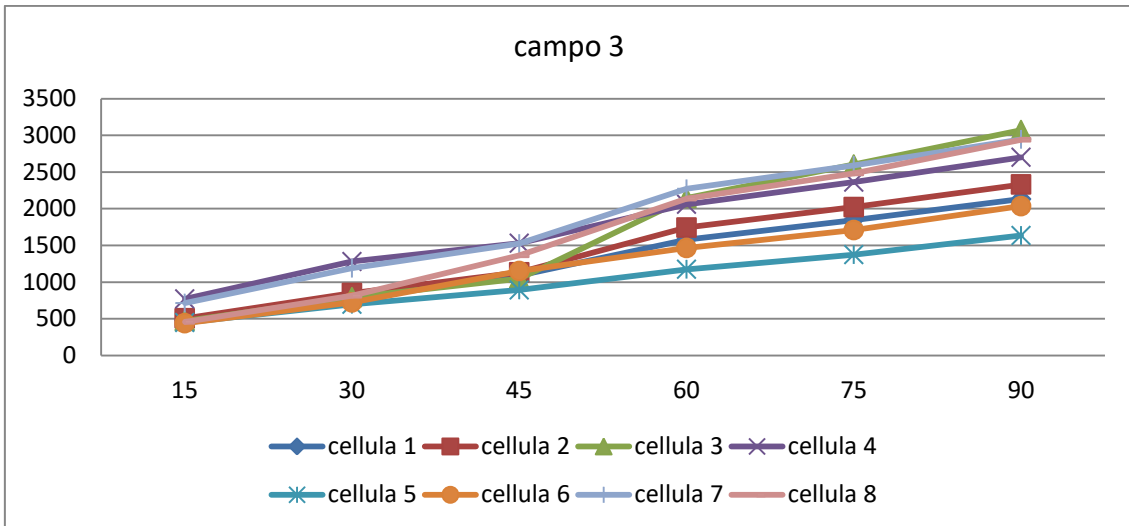


Fig.28. 4 ottobre: Grafico dell'intensità media di fluorescenza (\pm dev. standard) di tutte le cellule di un determinato campo.





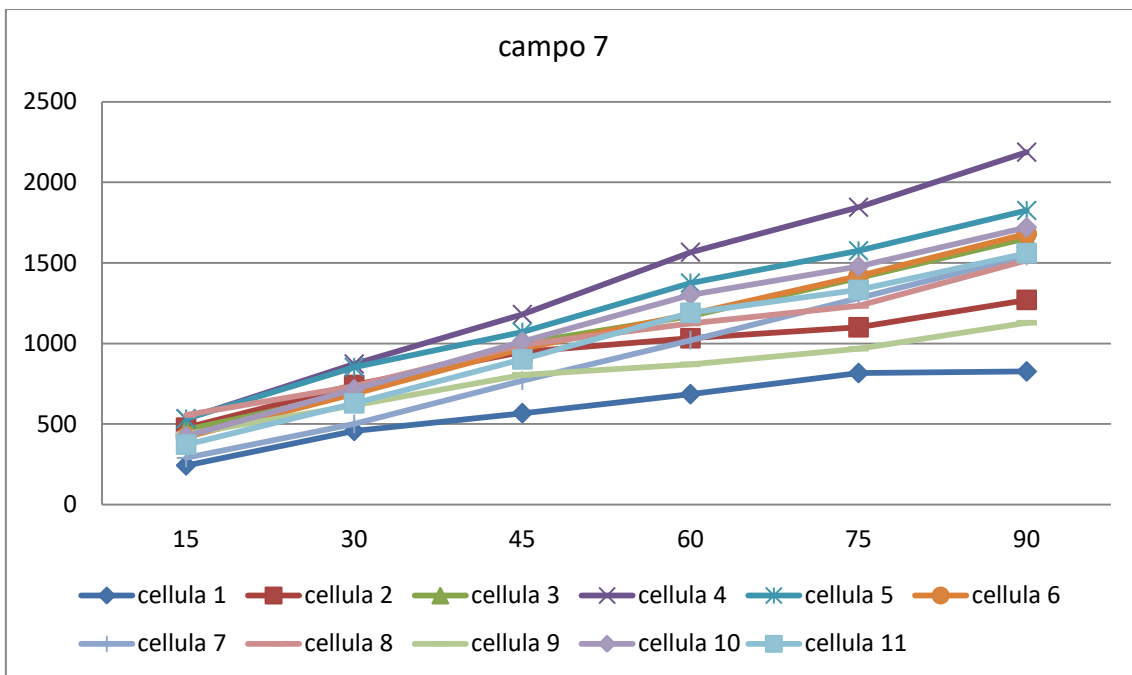
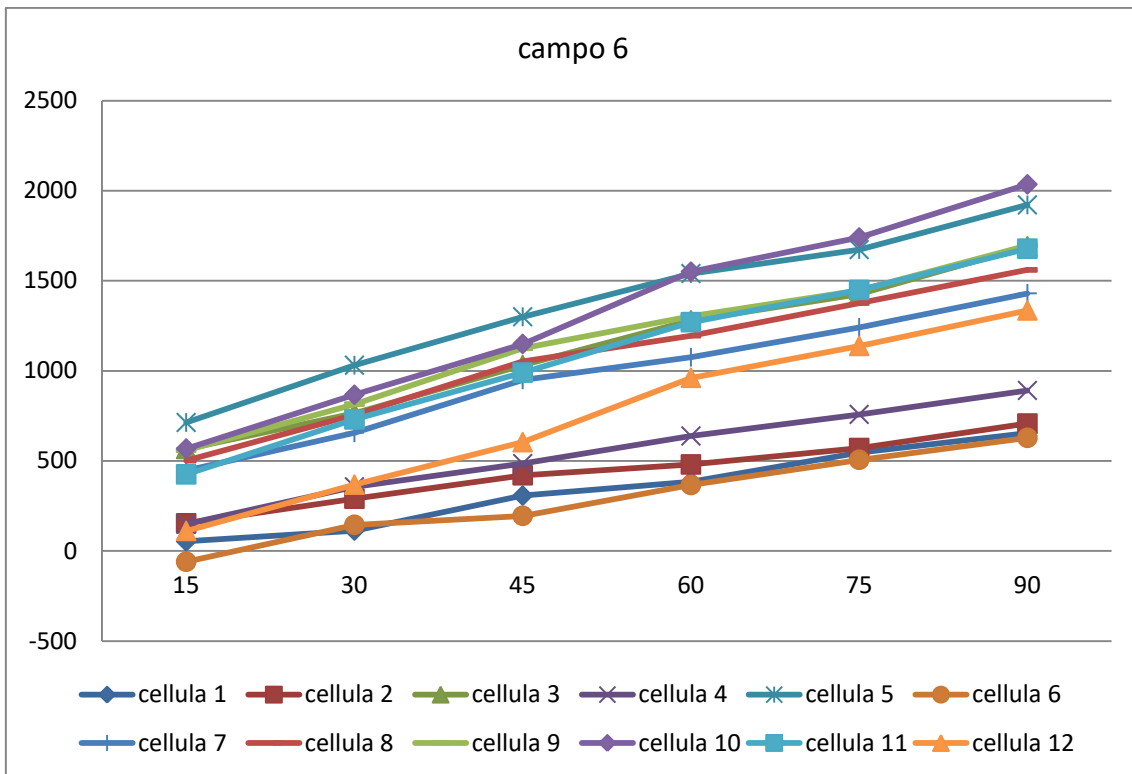


Fig.29. 4 ottobre: Grafico dell'intensità di fluorescenza delle cellule, in ogni campo preso in esame.

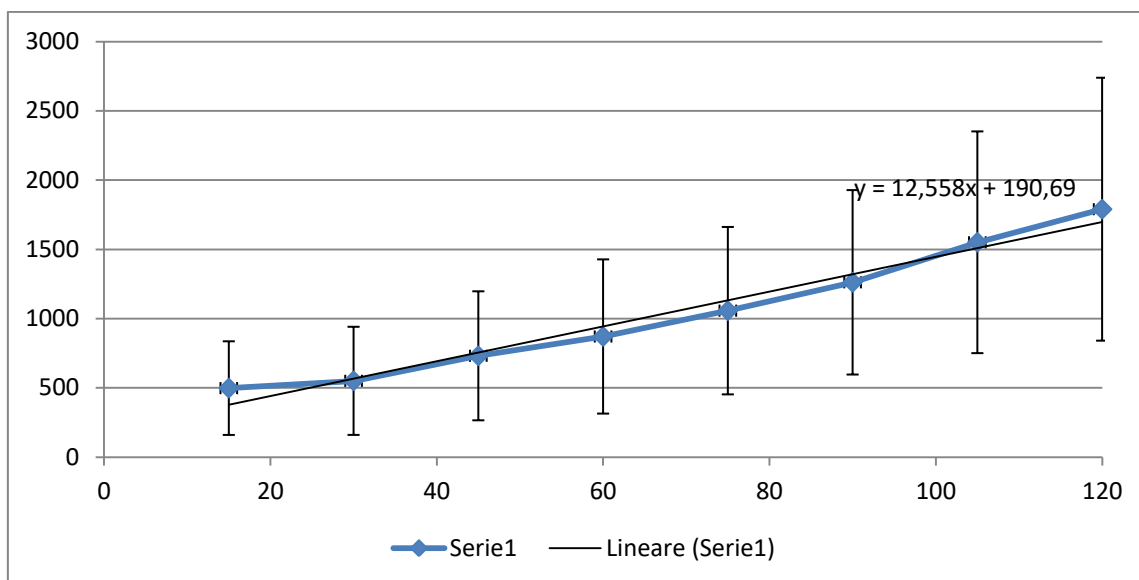


Fig.30. 13 ottobre: Grafico dell'intensità media di fluorescenza (\pm dev. standard) di tutte le cellule prese in esame in tutti i campi. Foto scattate ogni 15 minuti per 120 minuti complessivi. Sull'asse delle ascisse sono presenti i minuti, sull'asse delle ordinate il valore dell'intensità di fluorescenza.

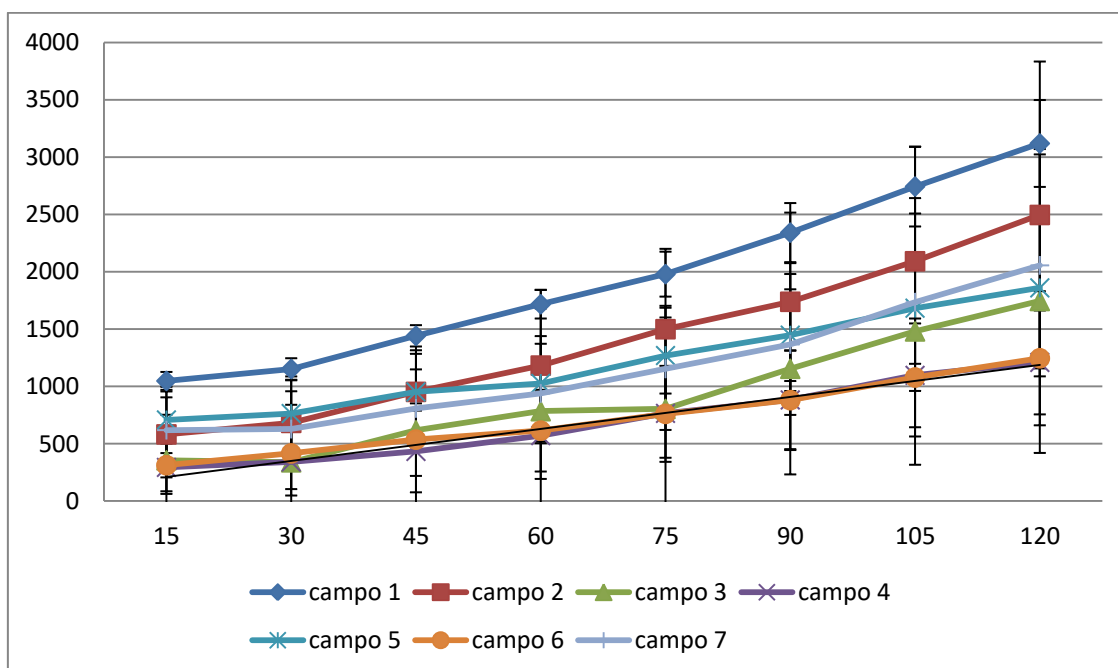
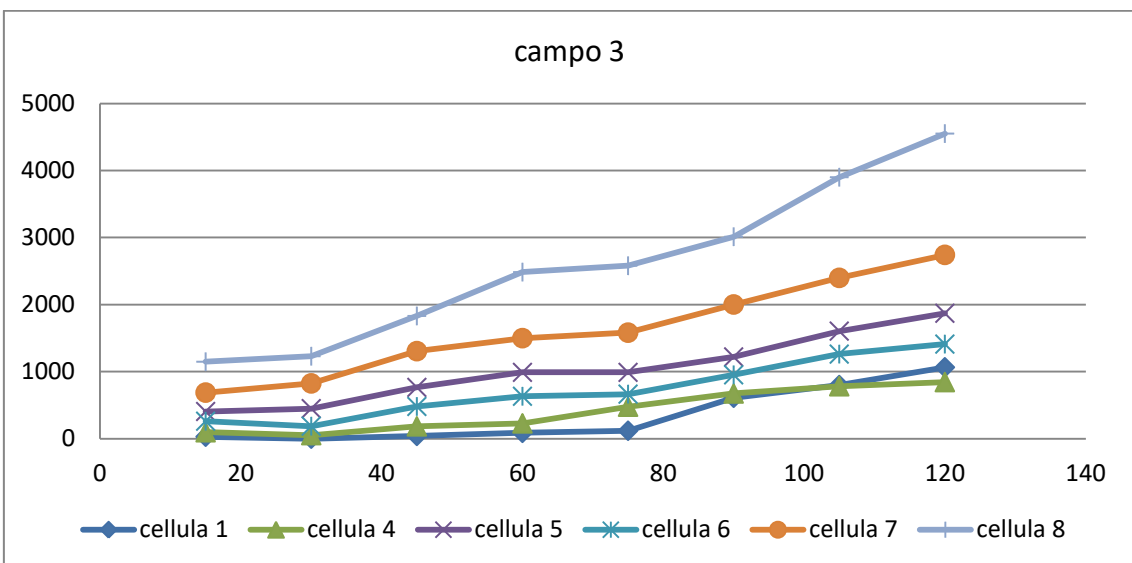
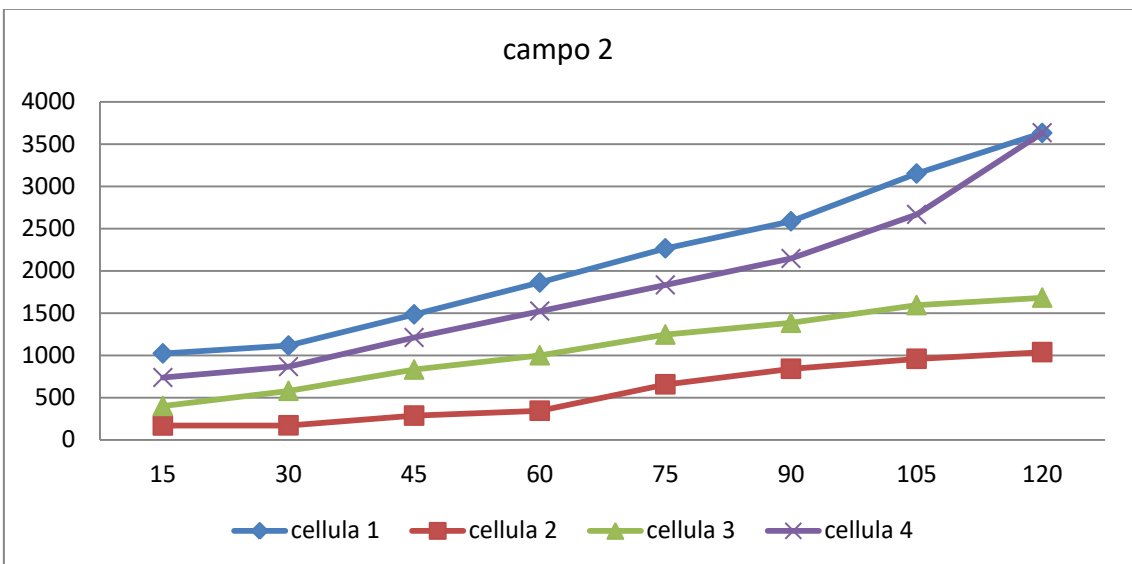
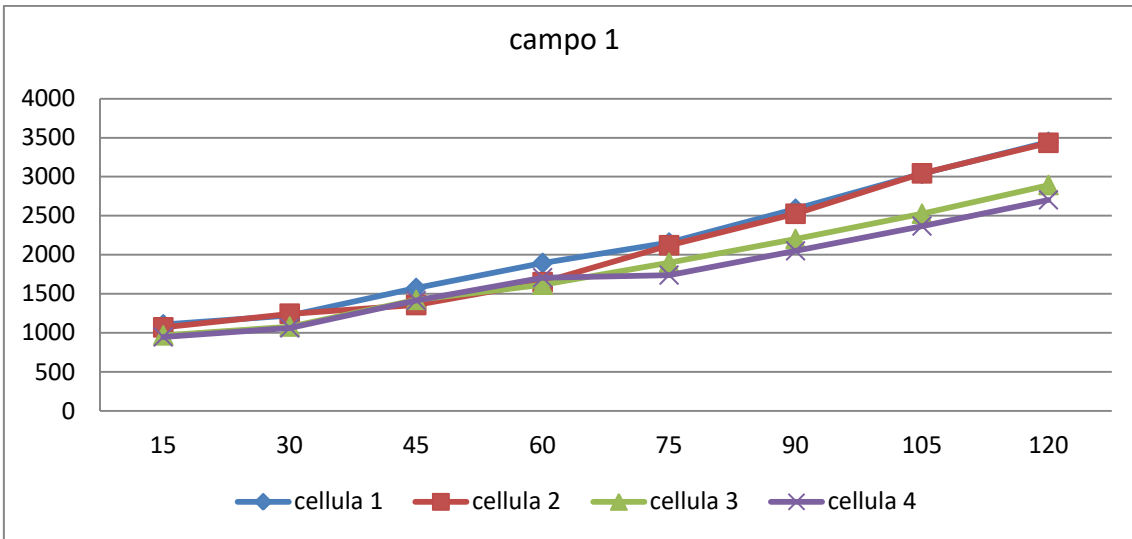
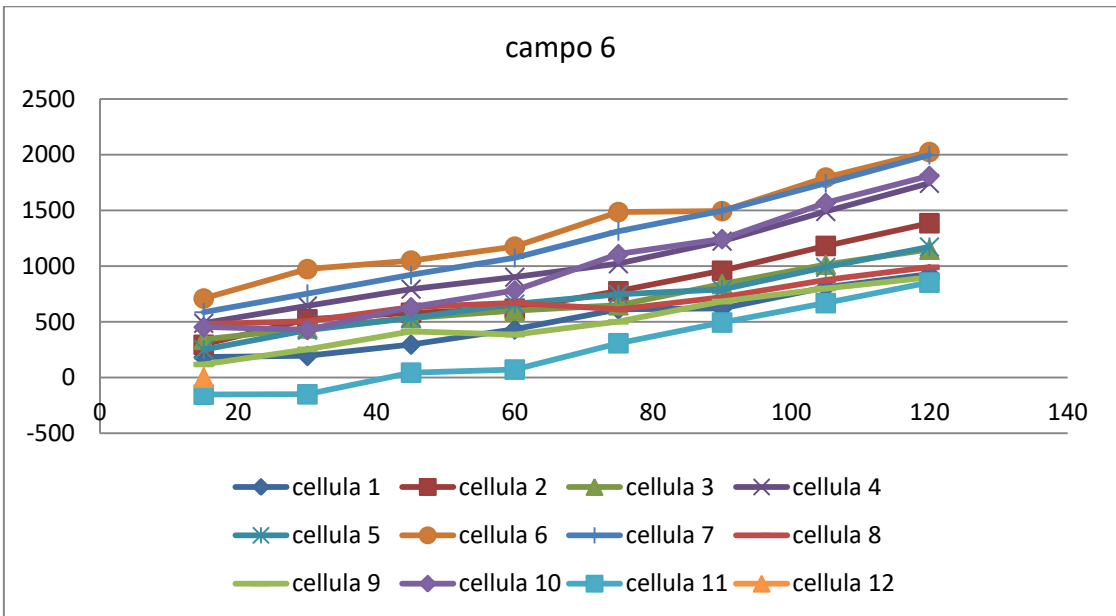
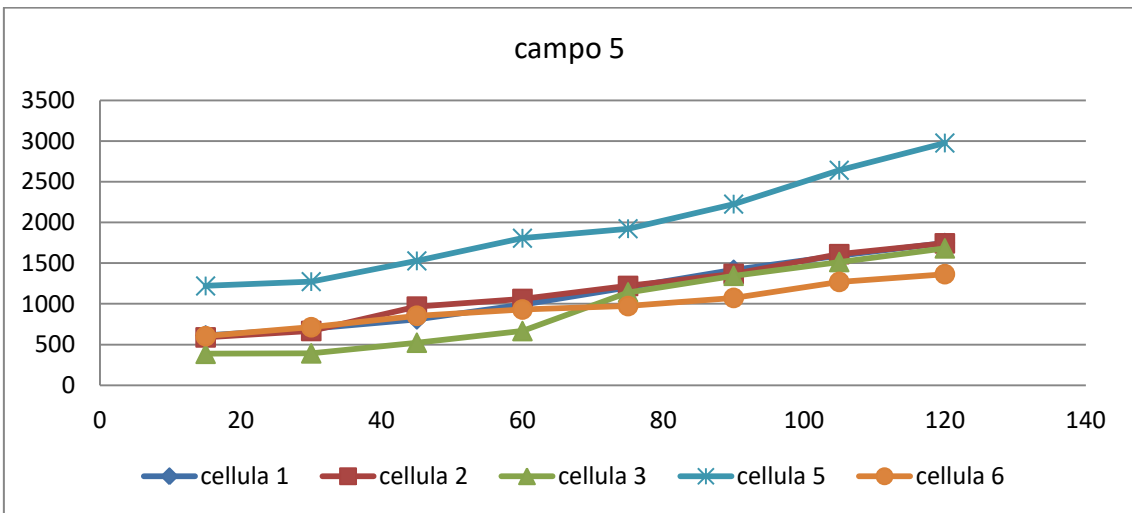
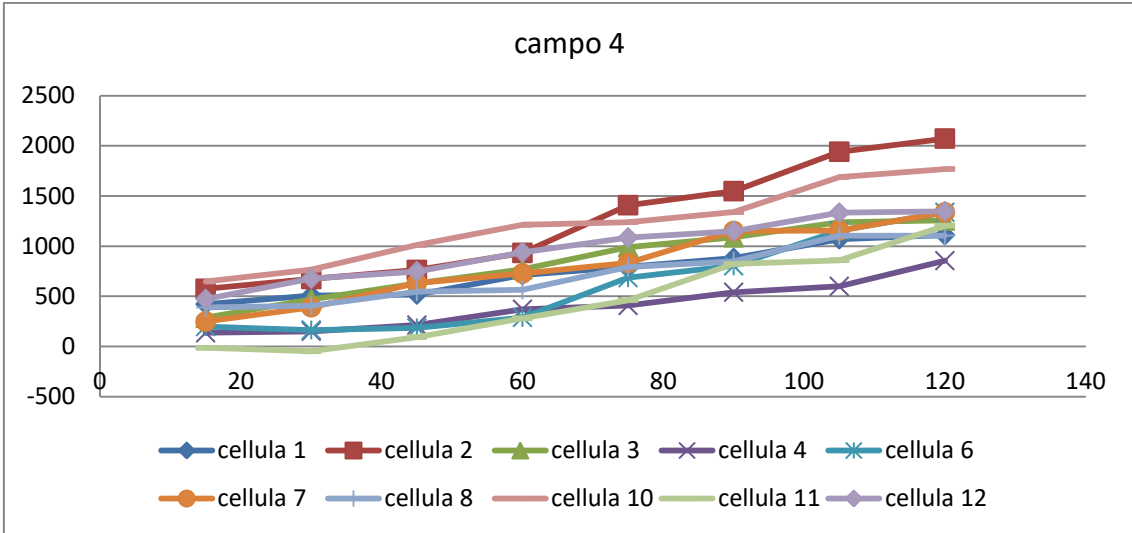


Fig.31. 13 ottobre: Grafico dell'intensità media di fluorescenza (\pm dev. standard) di tutte le cellule di un determinato campo.





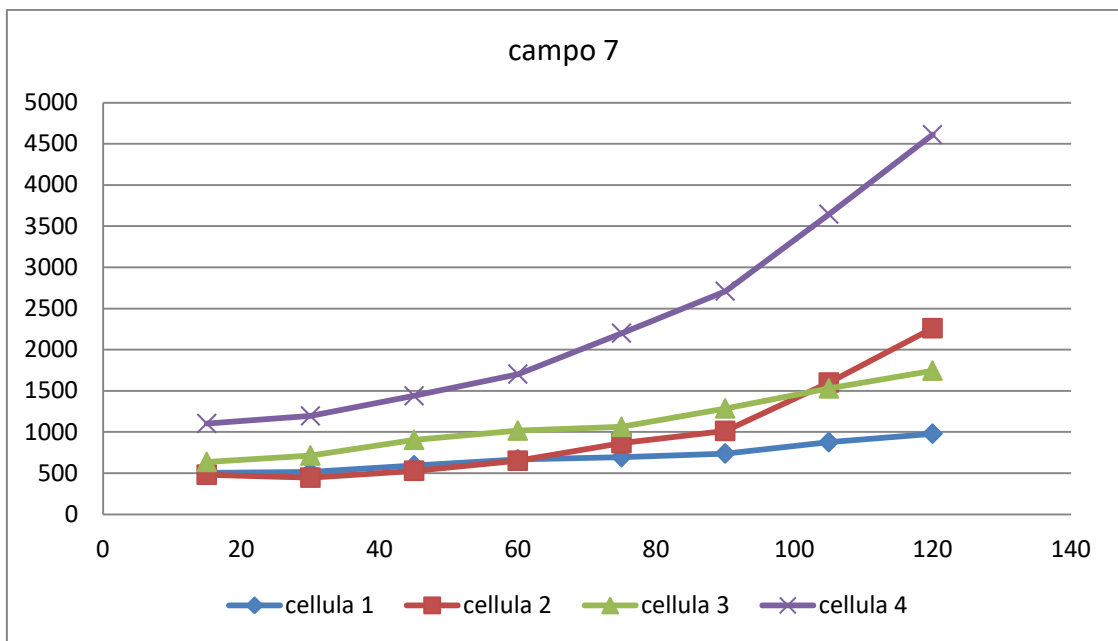


Fig.32. 13 ottobre: Grafico dell'intensità di fluorescenza delle cellule, in ogni campo preso in esame.

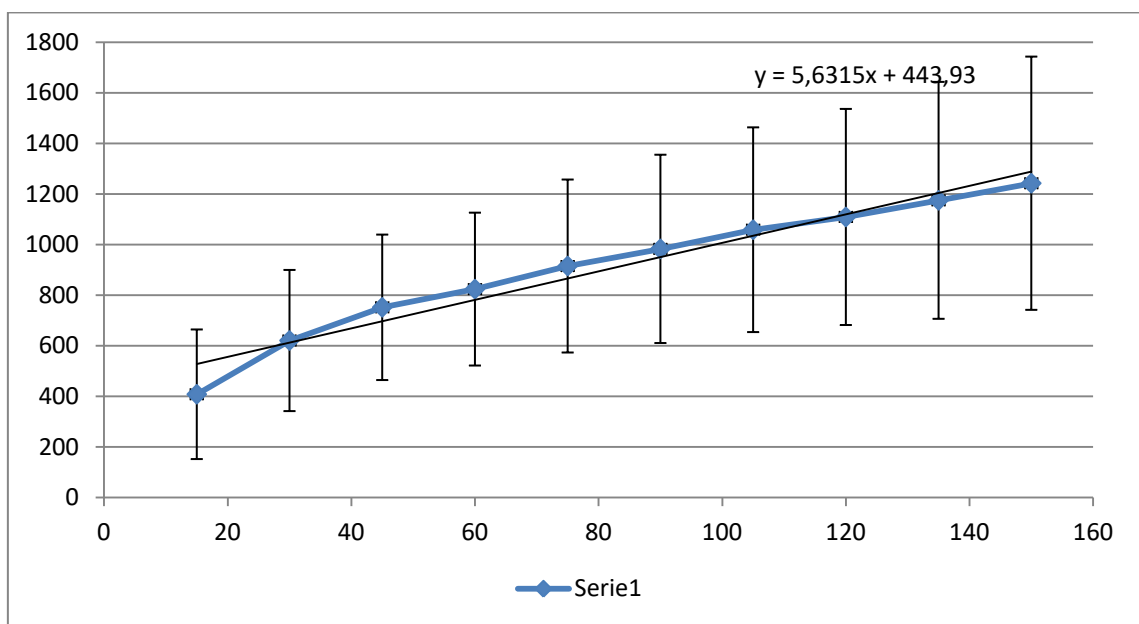


Fig.33. 20 ottobre: Grafico dell'intensità media di fluorescenza (\pm dev. standard) di tutte le cellule prese in esame in tutti i campi. Foto ogni 15 minuti, per un totale di 150 minuti. Sull'asse delle ascisse sono presenti i minuti, sull'asse delle ordinate il valore dell'intensità di fluorescenza.

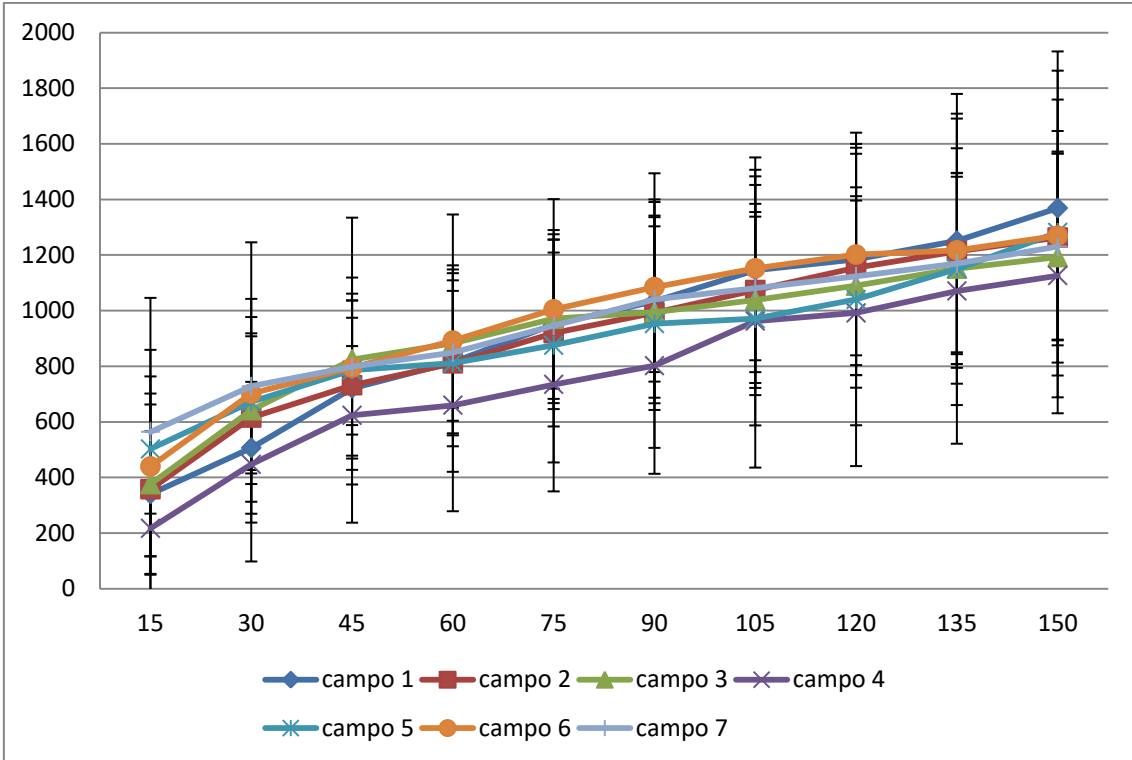
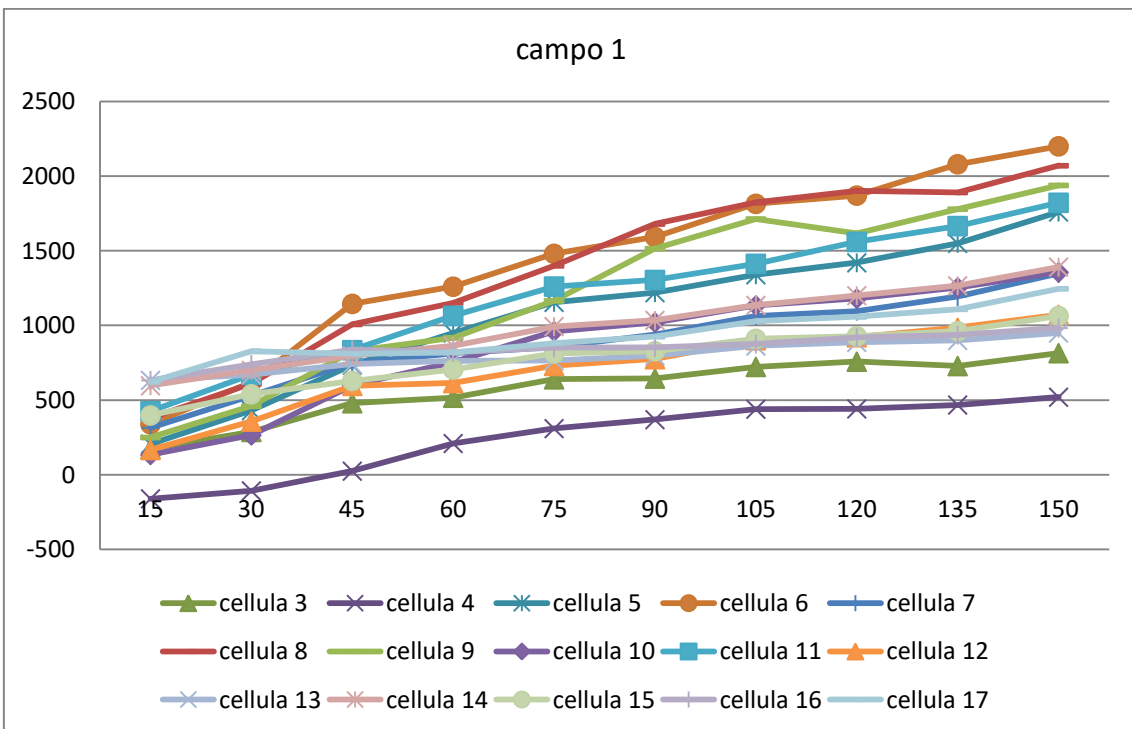
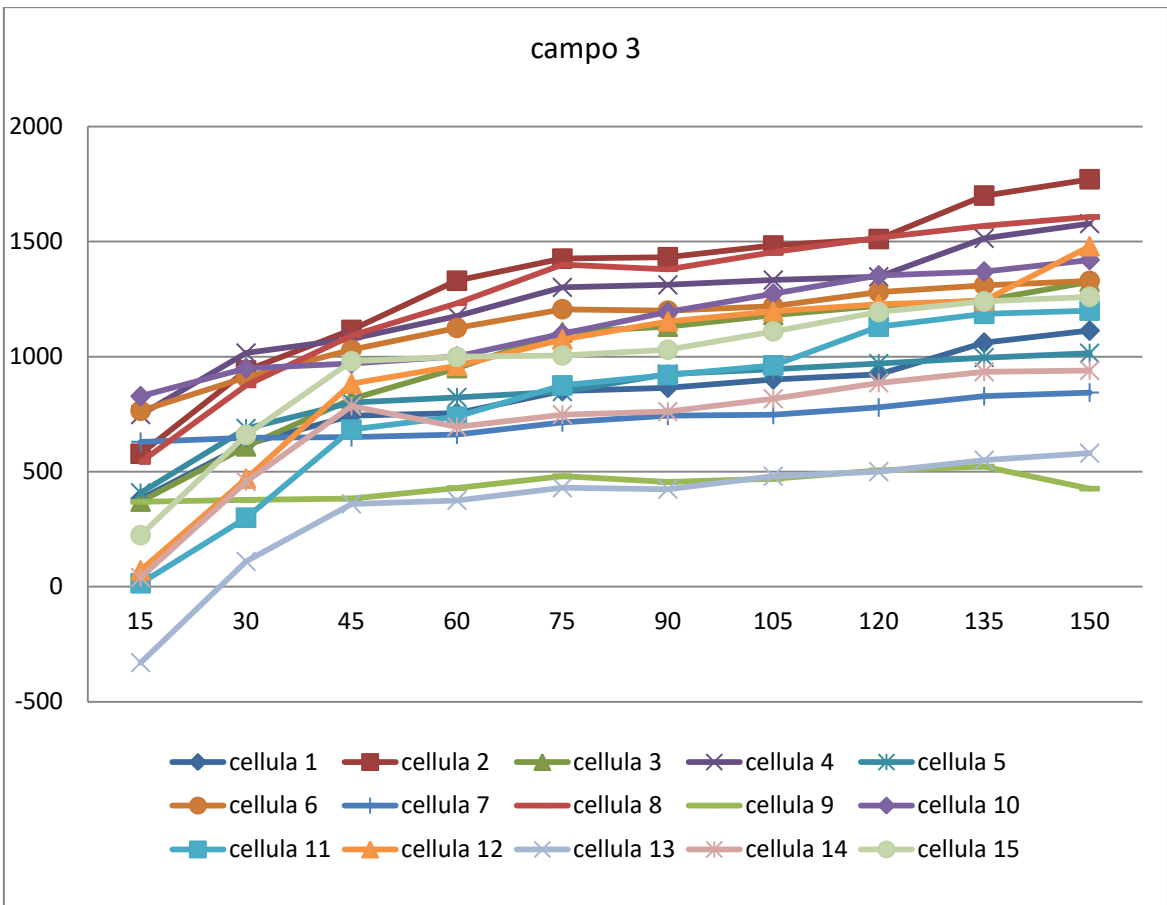
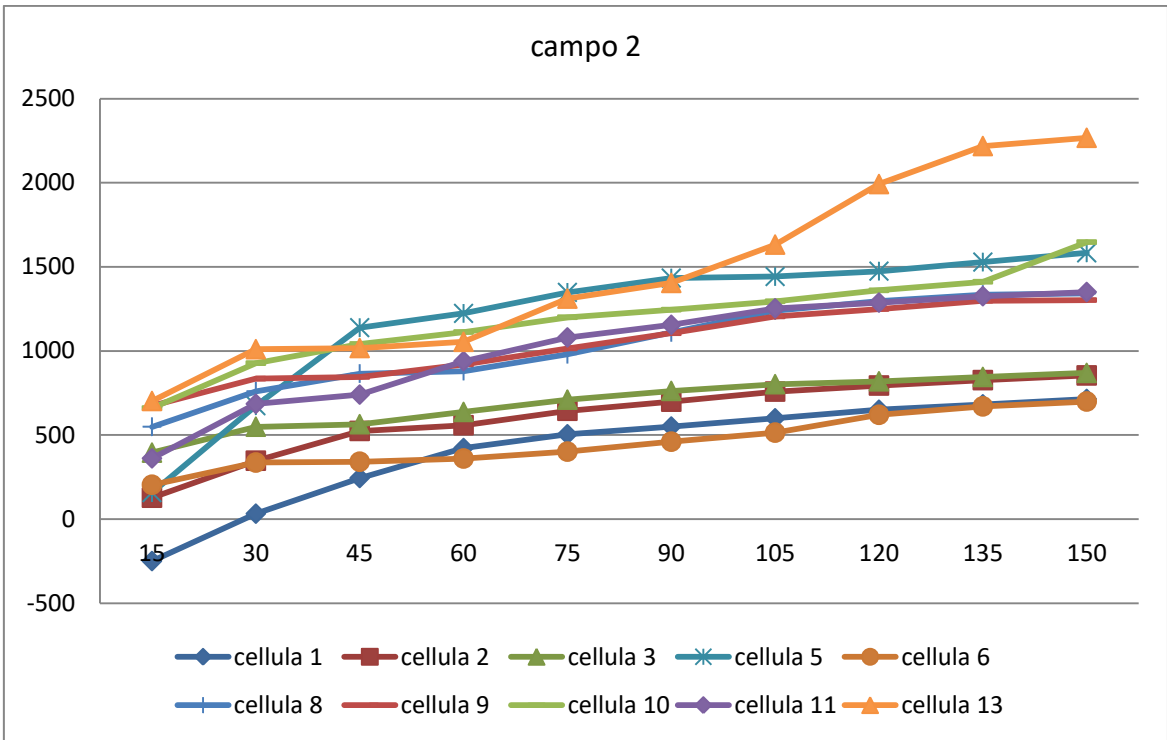
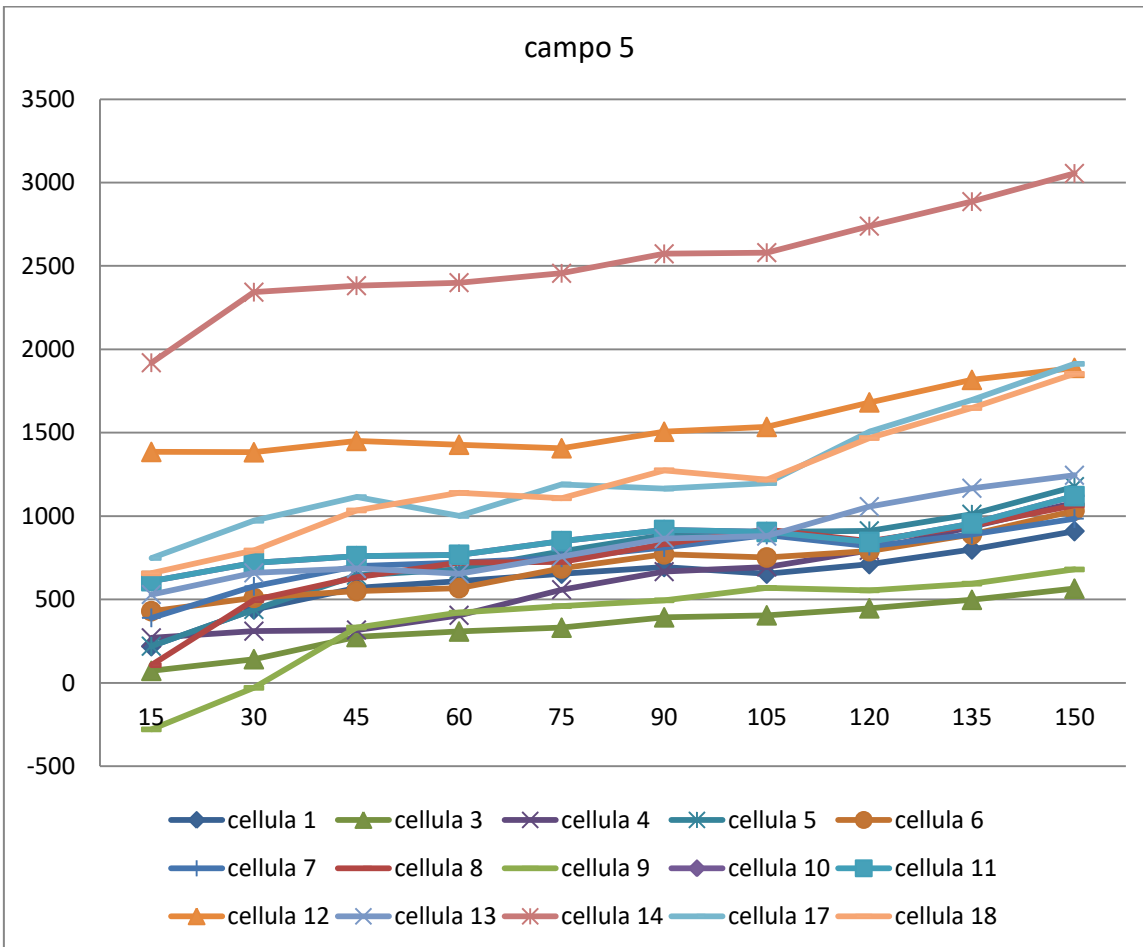
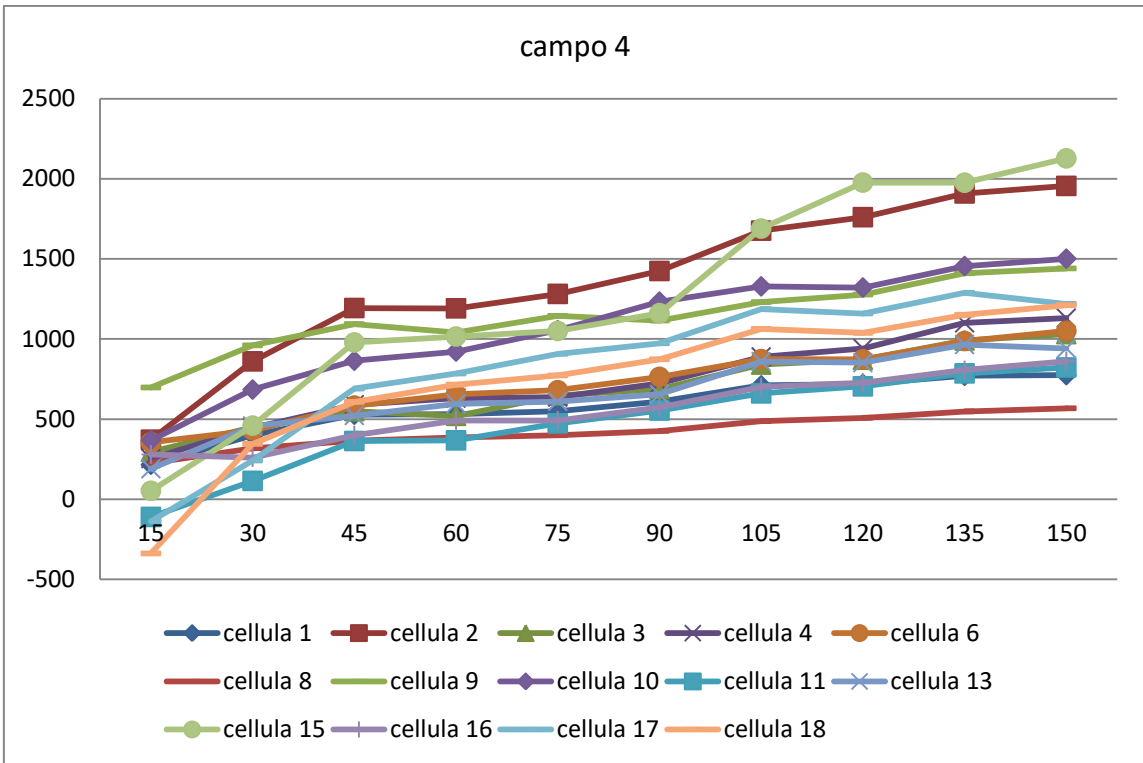


Fig.34. 20 ottobre: Grafico dell'intensità media di fluorescenza (\pm dev. standard) di tutte le cellule di un determinato campo.







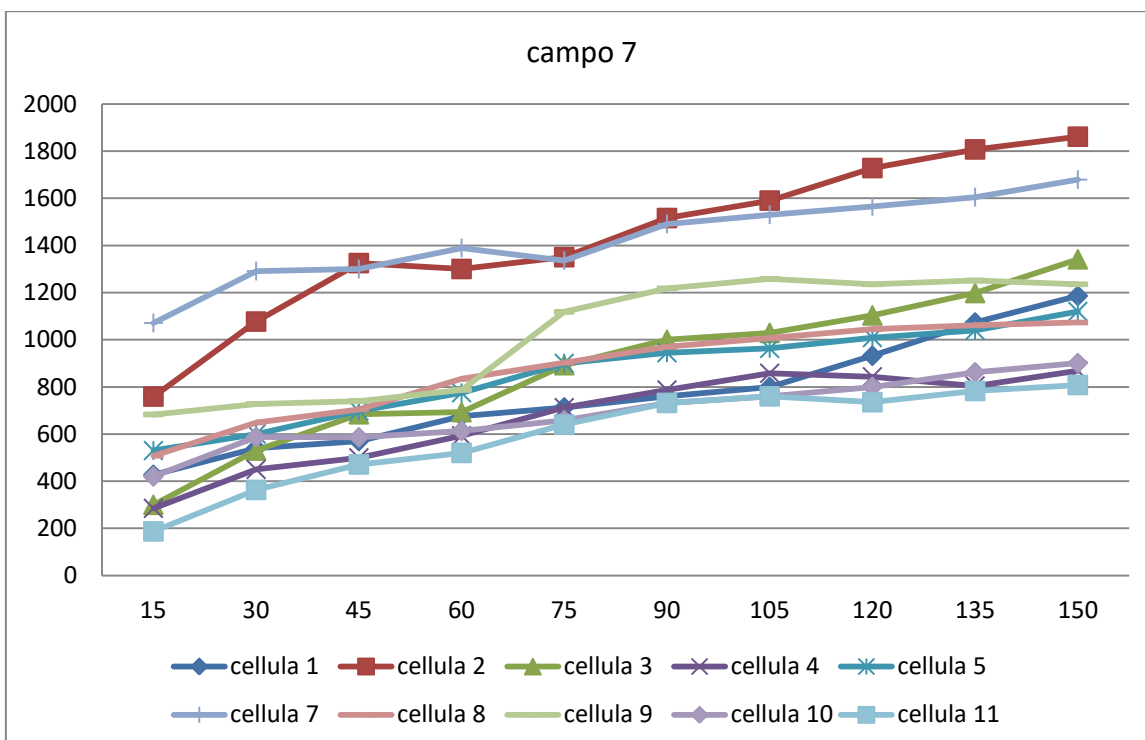
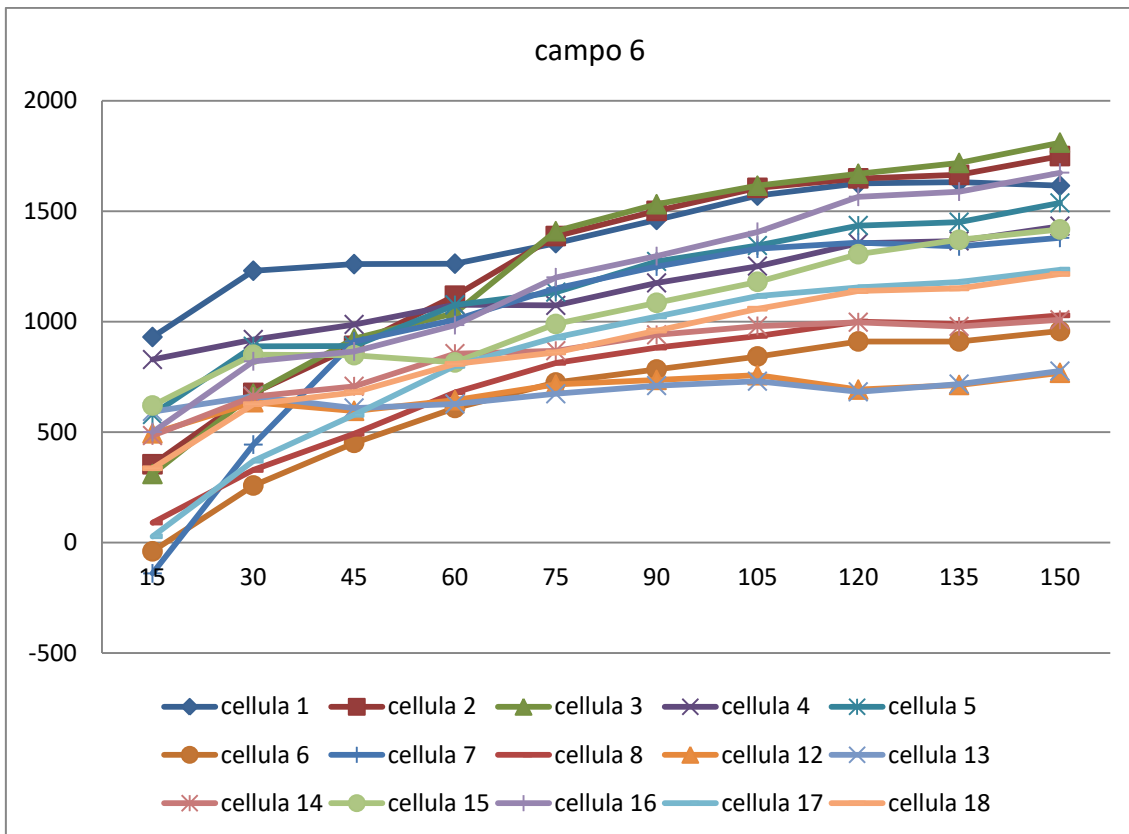


Fig.35. 20 ottobre: Grafico dell'intensità di fluorescenza delle cellule, in ogni campo preso in esame.

4.3 Valutazione dell'efflusso della doxorubicina dalle cellule

In questi esperimenti, la doxorubicina è stata tolta dal terreno di coltura degli stessi campioni analizzati precedentemente nella stessa giornata per valutare l'ingresso di doxorubicina.

Di seguito si riportano i grafici che mostrano le variazioni di concentrazione di doxorubicina nel tempo negli esperimenti effettuati senza campo magnetico (Fig. 36) e con campo magnetico (Fig. 43). Si riportano anche i grafici relativi alle intensità medie delle cellule nei singoli campi osservati in ogni esperimento. Si riportano anche le intensità di fluorescenza di ogni singola cellula di ogni campo considerato.

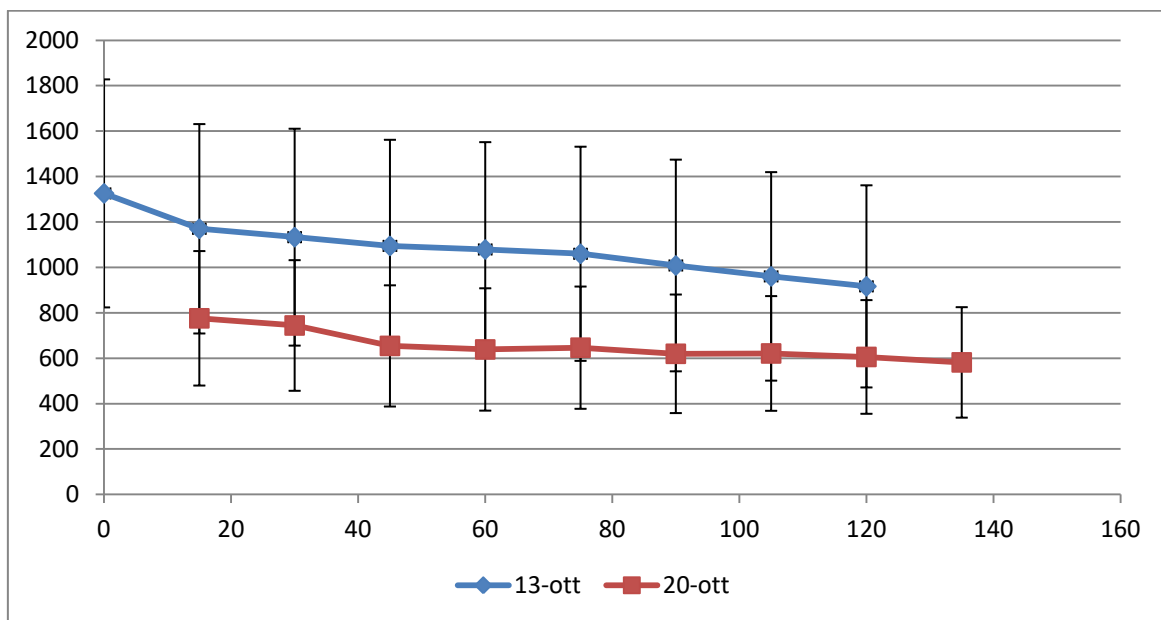


Fig. 36. Cellule Panc-1 senza doxo e senza campo magnetico. Sull'asse delle ascisse sono presenti i minuti, sull'asse delle ordinate il valore dell'intensità di fluorescenza.

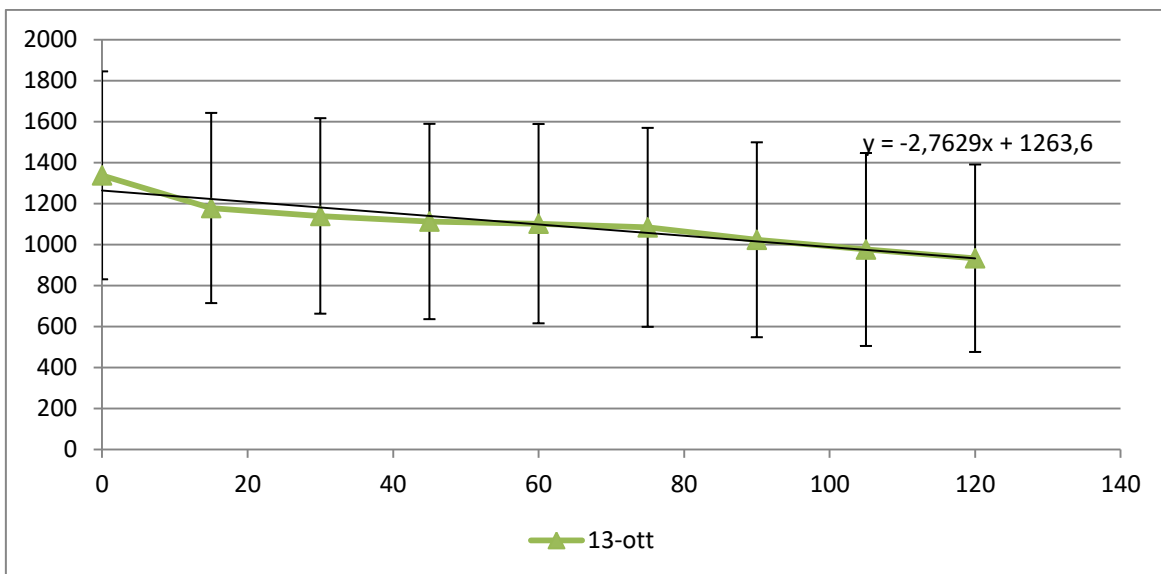


Fig.37. 13 ottobre: Grafico dell'intensità media di fluorescenza (\pm dev. standard) di tutte le cellule prese in esame in tutti i campi. Foto scattate ogni 15 minuti, per un totale di 120 minuti. Sull'asse delle ascisse sono presenti i minuti, sull'asse delle ordinate il valore dell'intensità di fluorescenza.

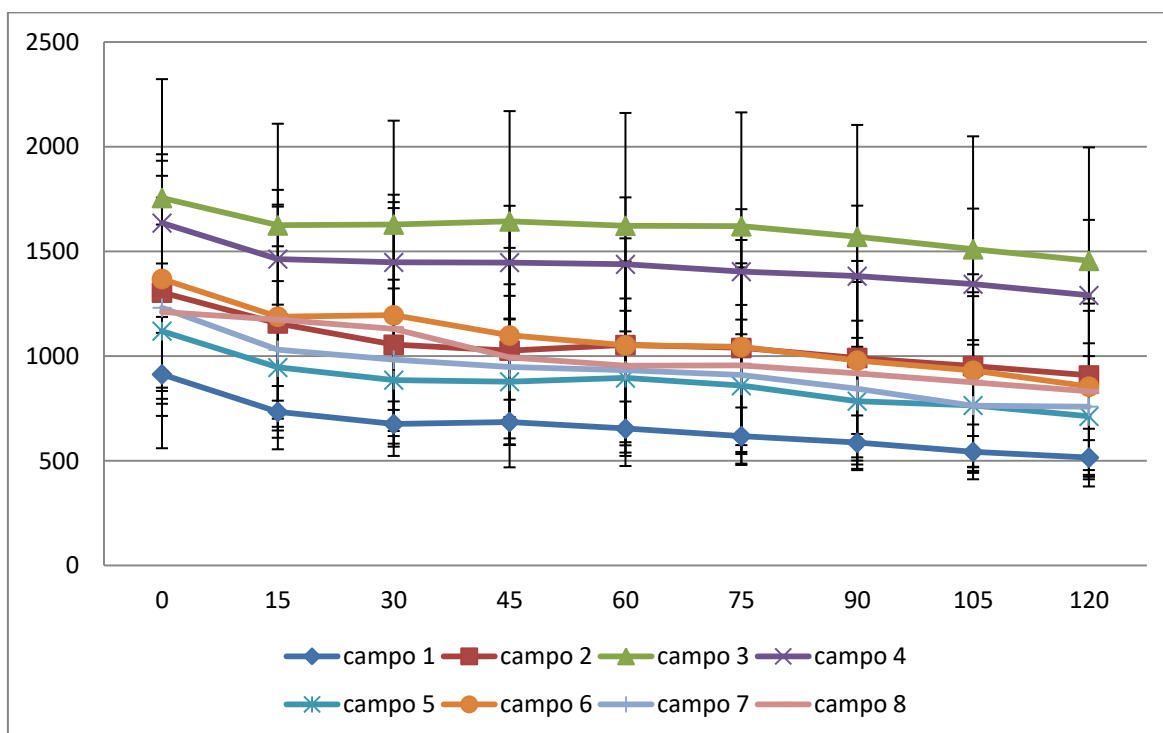
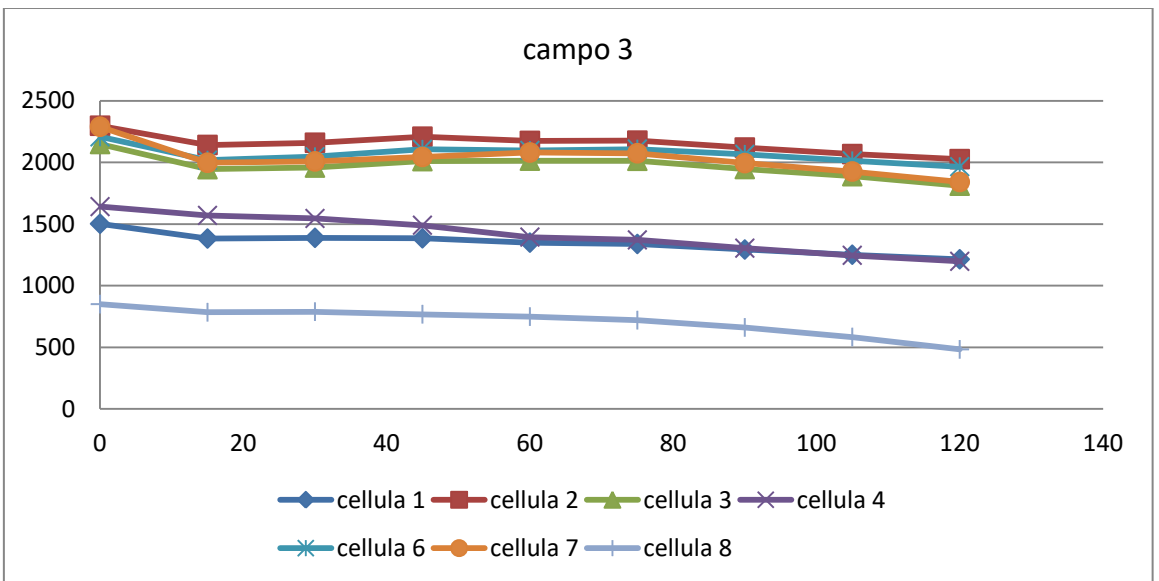
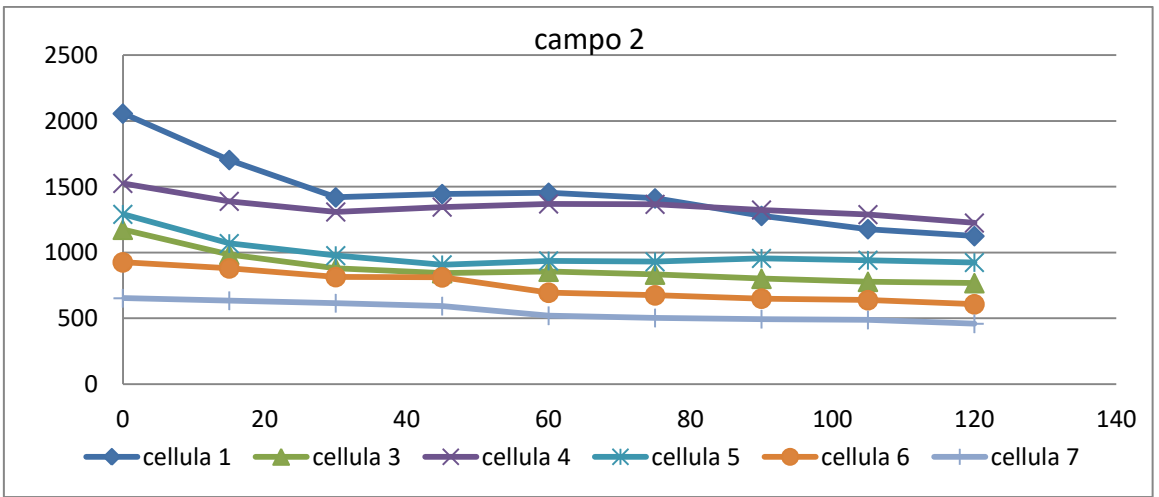
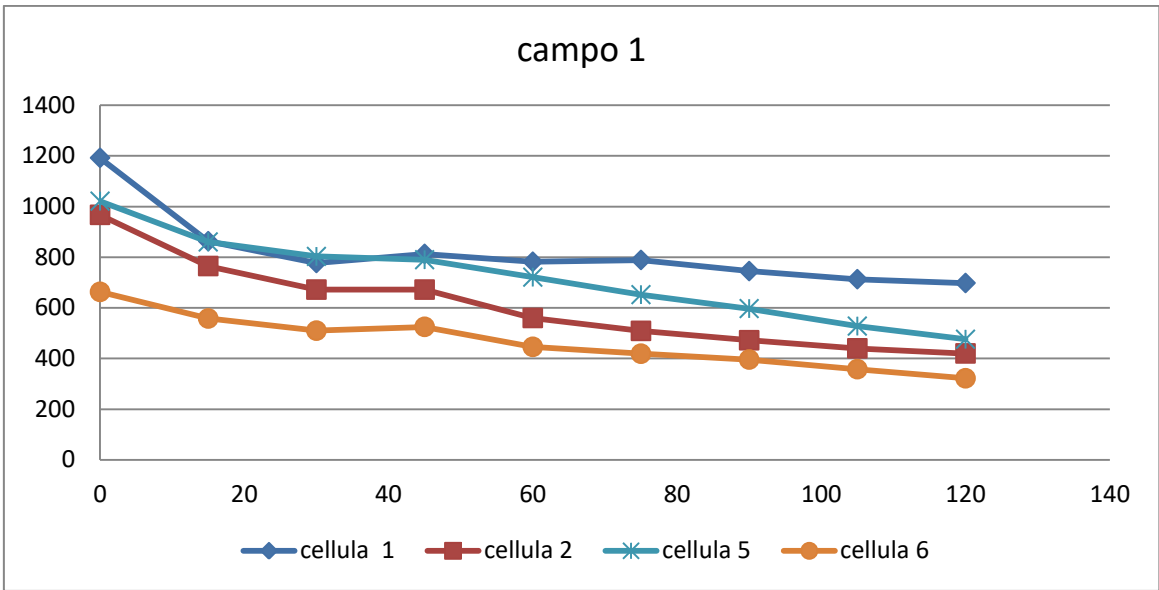
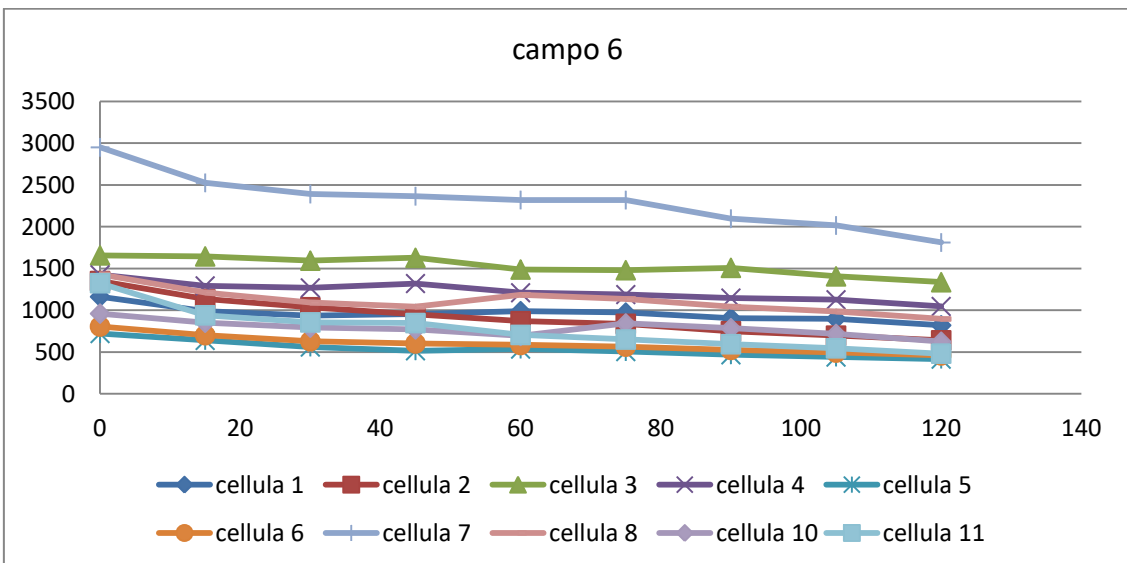
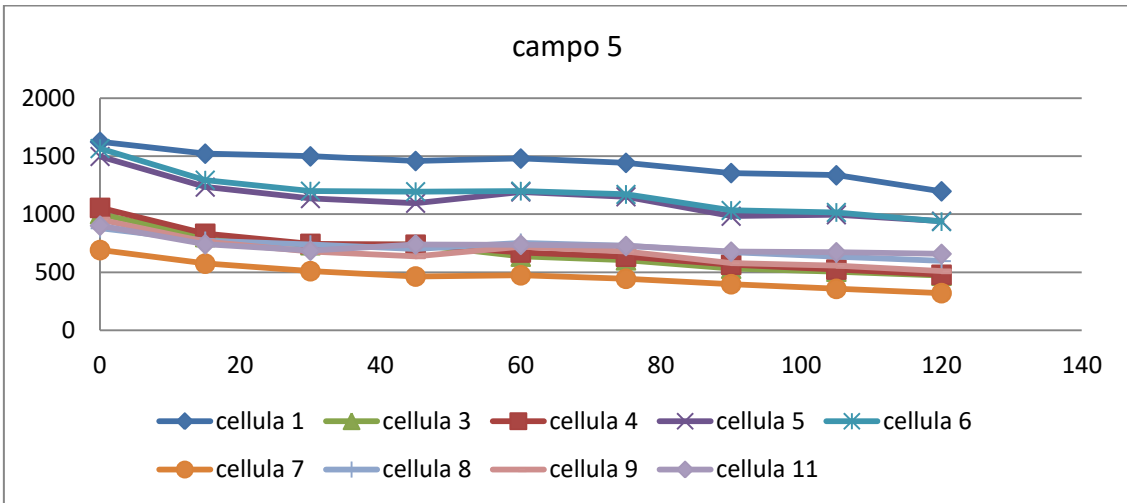
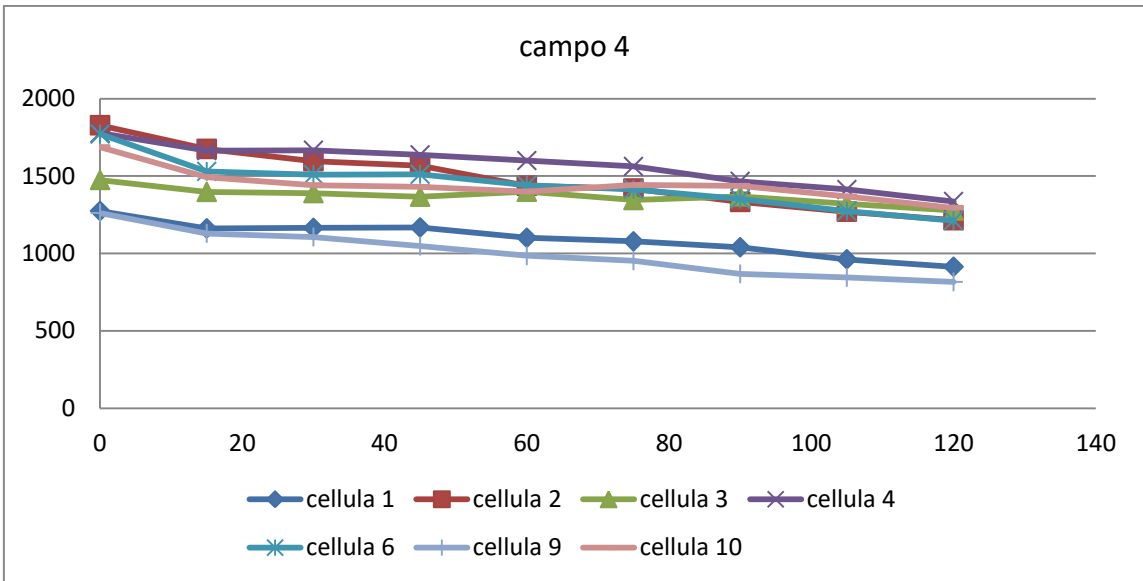


Fig.38. 13 ottobre: Grafico dell'intensità media di fluorescenza (\pm dev. standard) di tutte le cellule di un determinato campo.





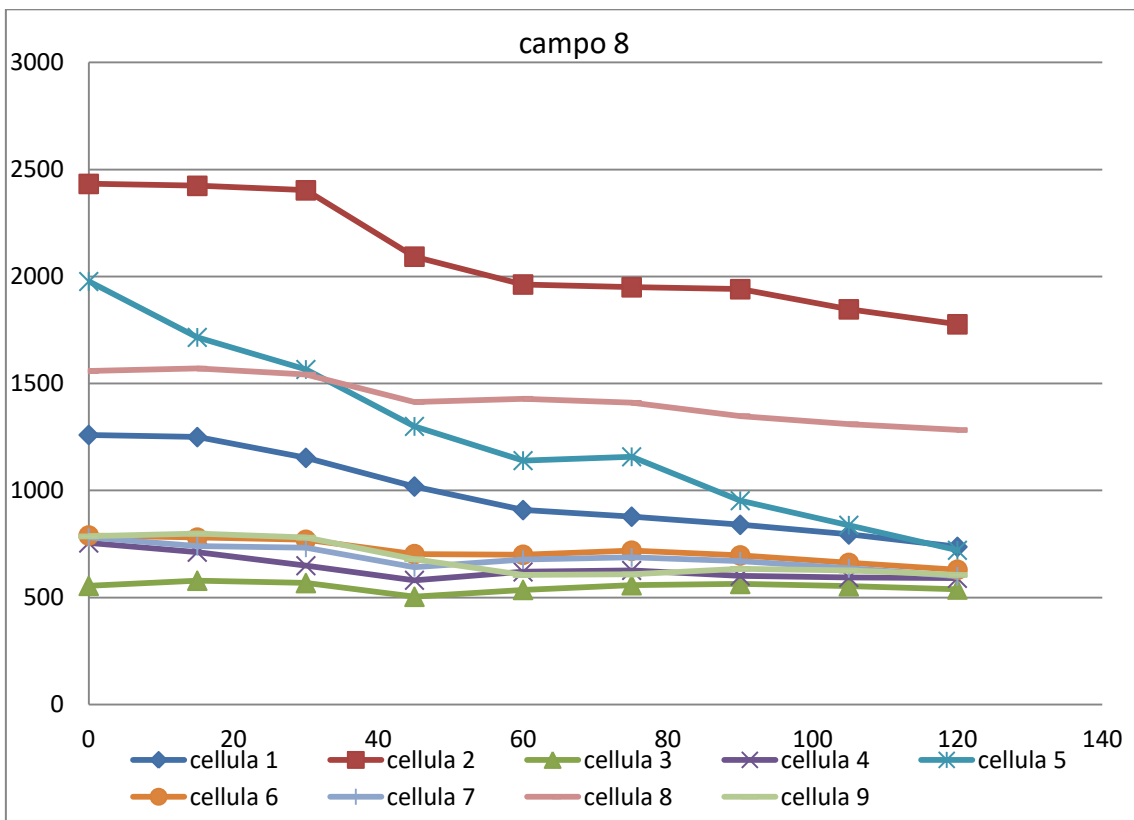
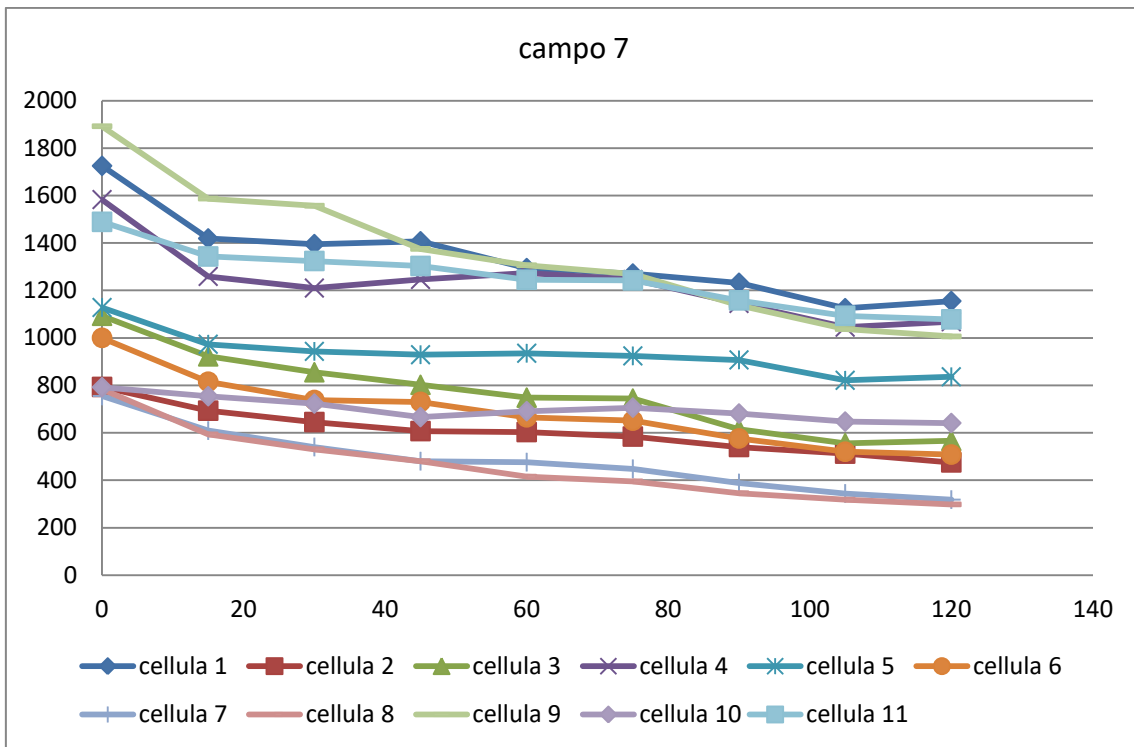


Fig.39. 13 ottobre: Grafico dell'intensità di fluorescenza delle cellule, in ogni campo preso in esame.

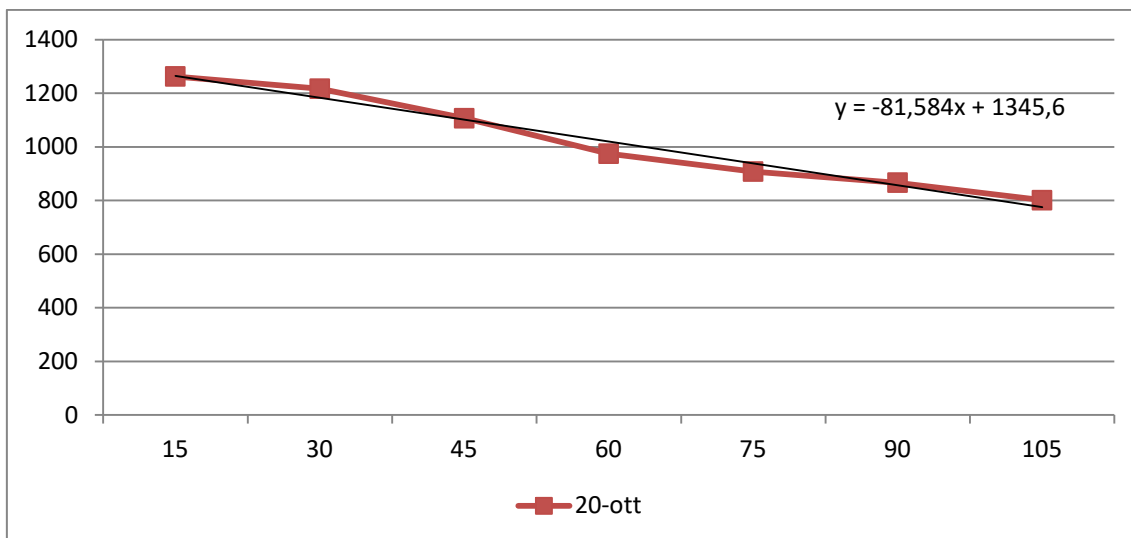


Fig.40. 20 ottobre: Grafico dell'intensità media di fluorescenza (\pm dev. standard) di tutte le cellule prese in esame in tutti i campi. Foto scattate ogni 15 minuti, per un totale di 105 minuti. Sull'asse delle ascisse sono presenti i minuti, sull'asse delle ordinate il valore dell'intensità di fluorescenza.

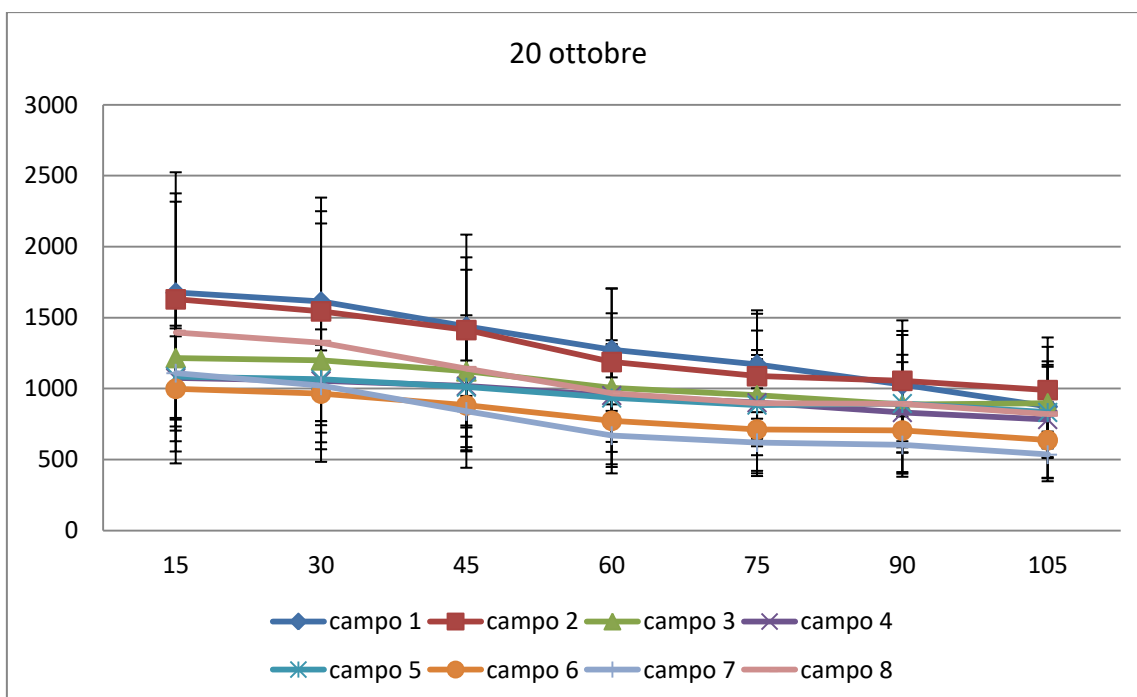
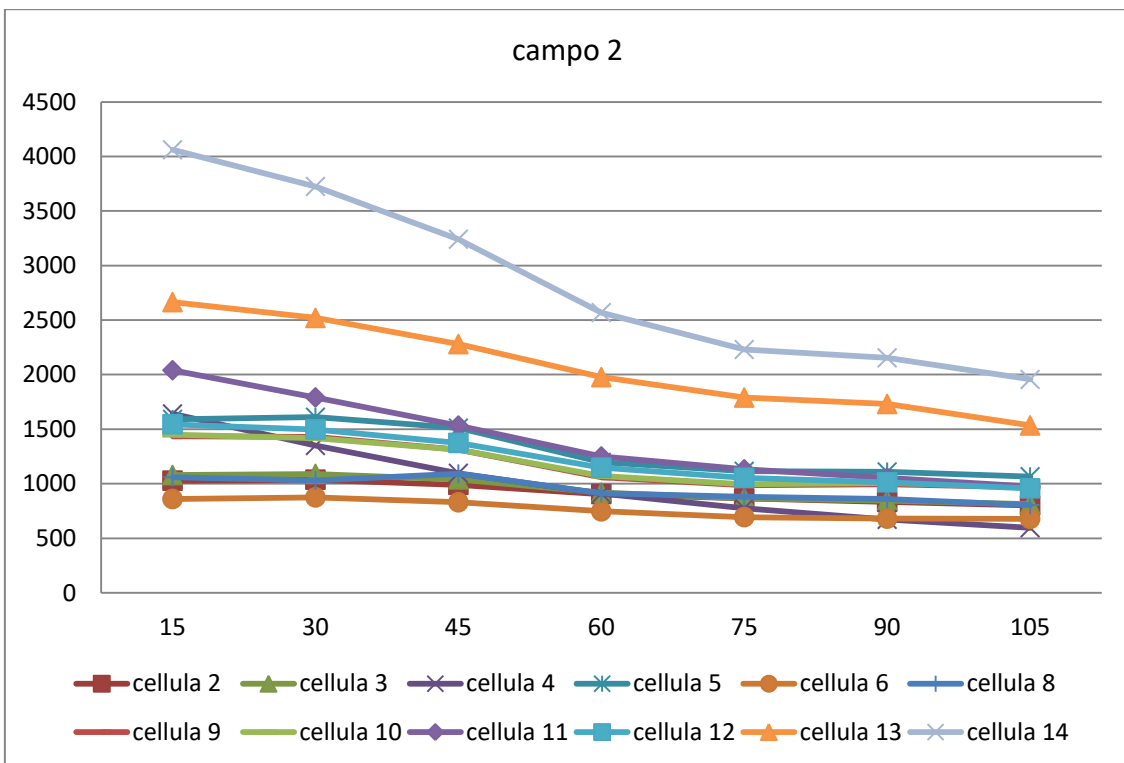
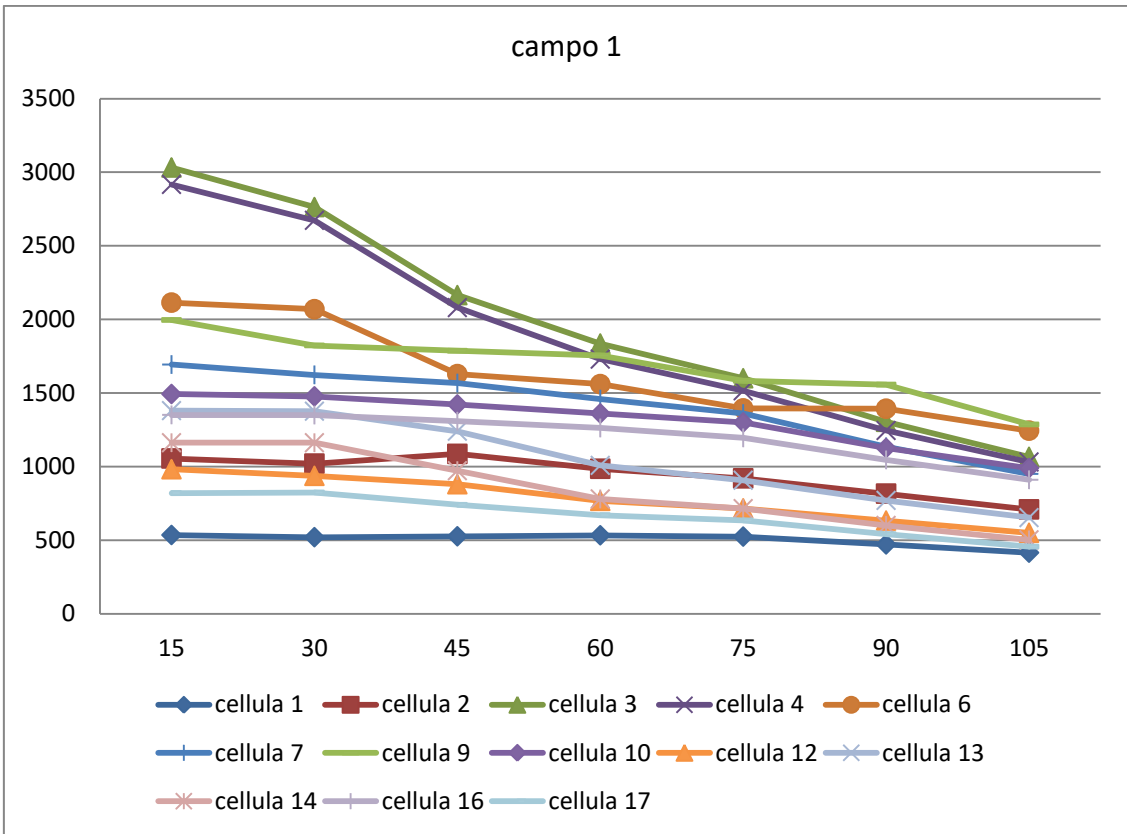
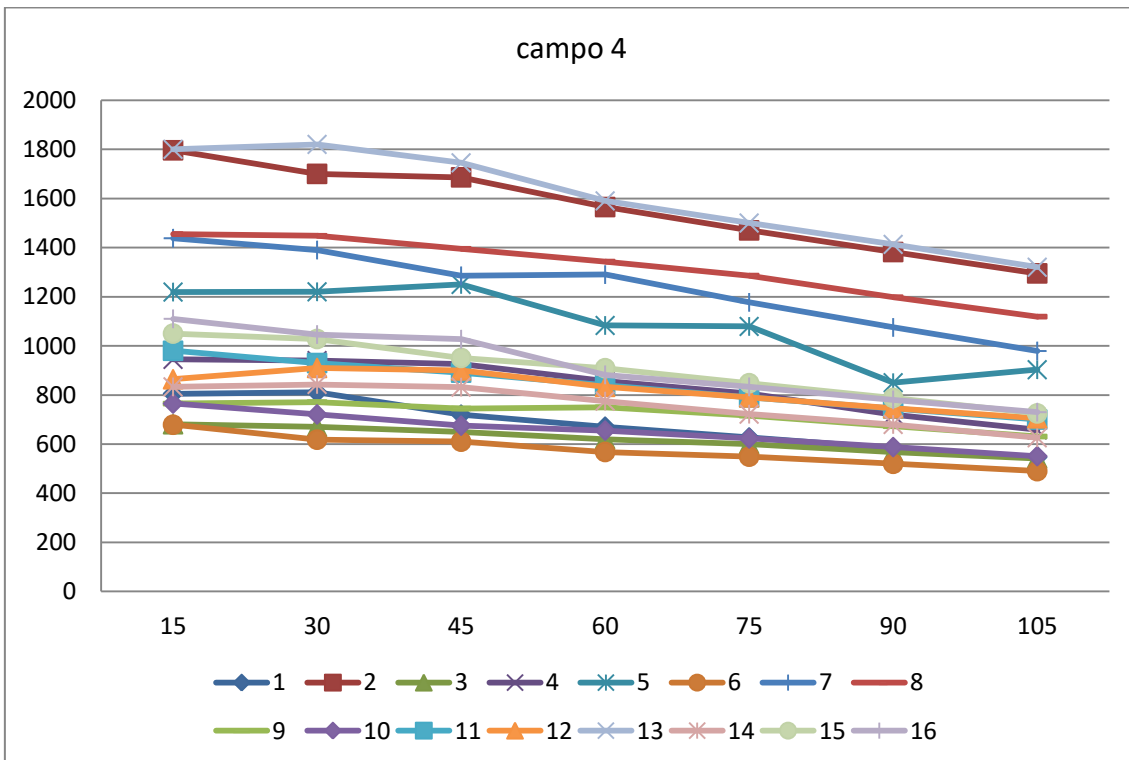
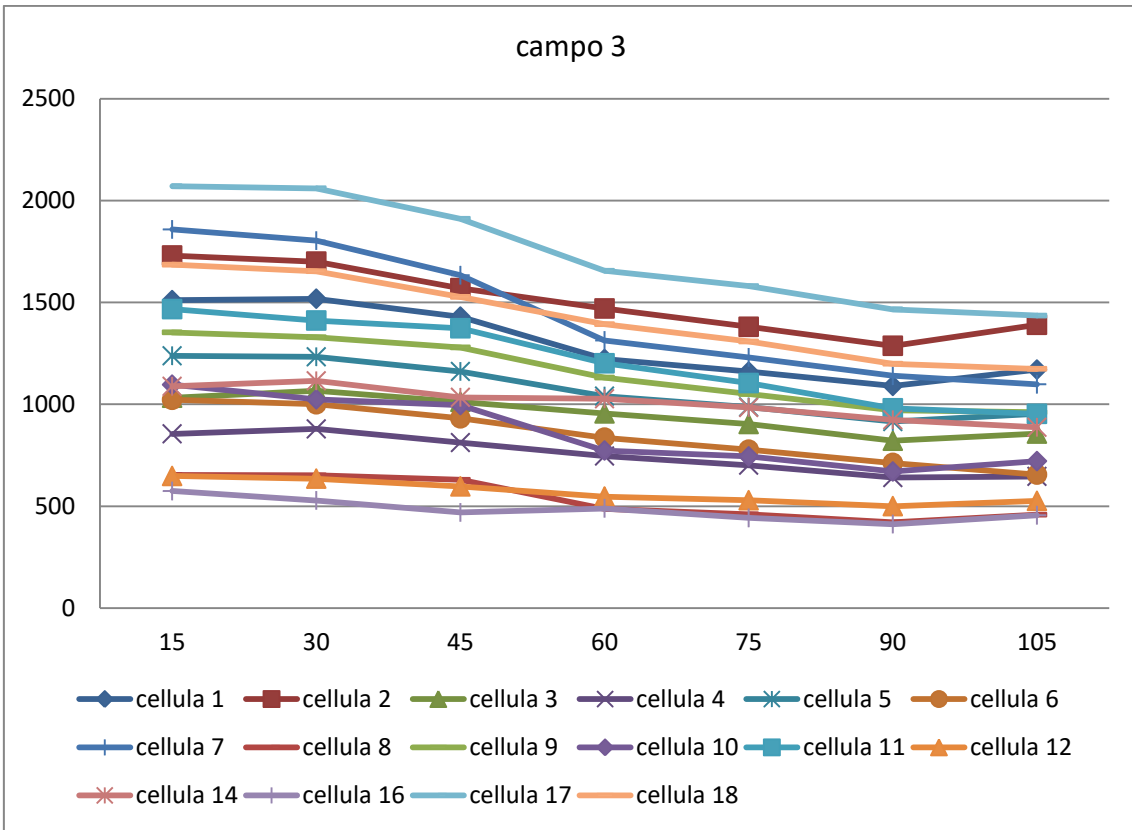
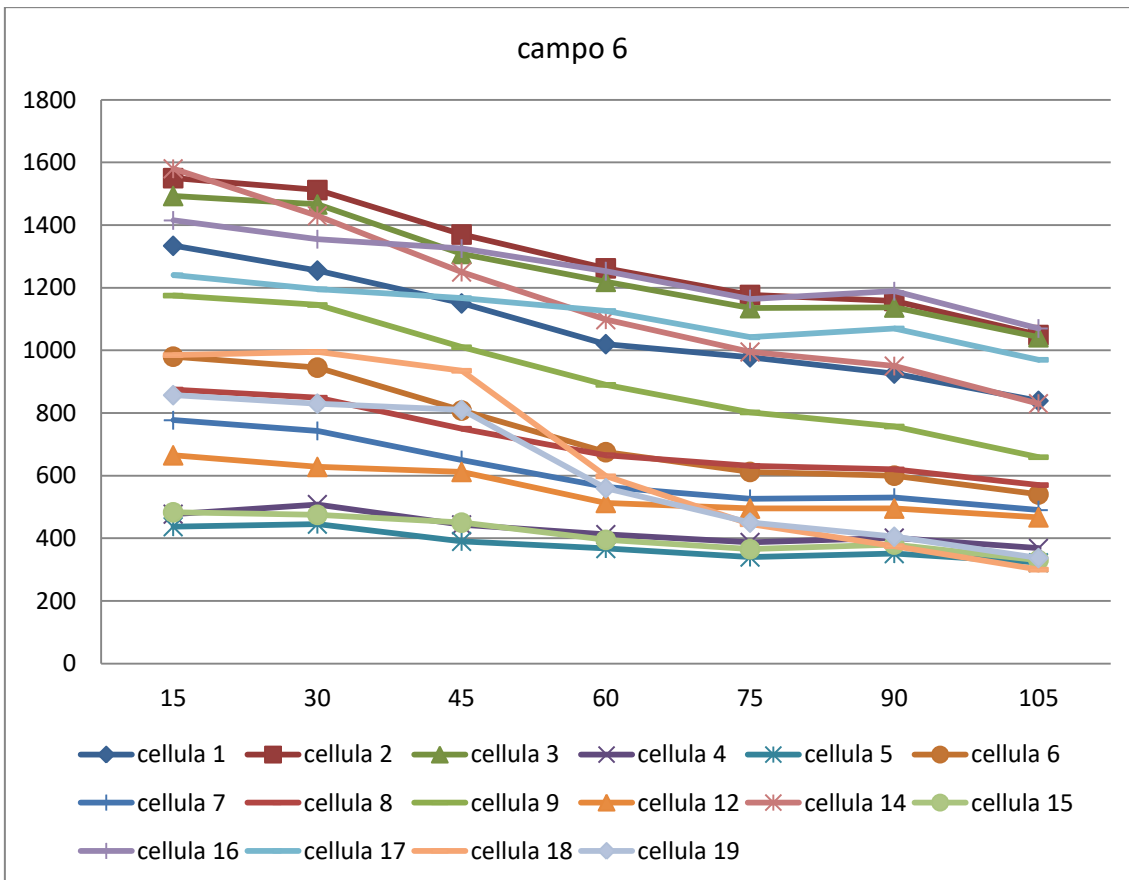
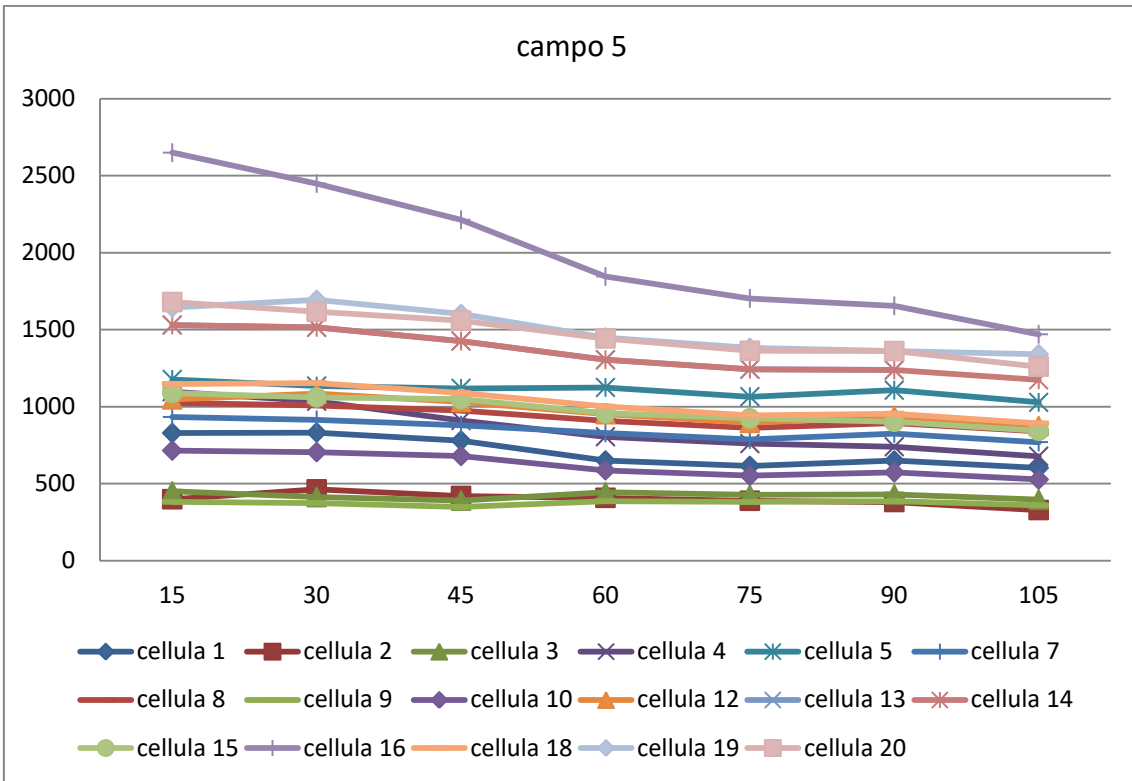


Fig.41. 20 ottobre: Grafico dell'intensità media di fluorescenza (\pm dev. standard) di tutte le cellule di un determinato campo.







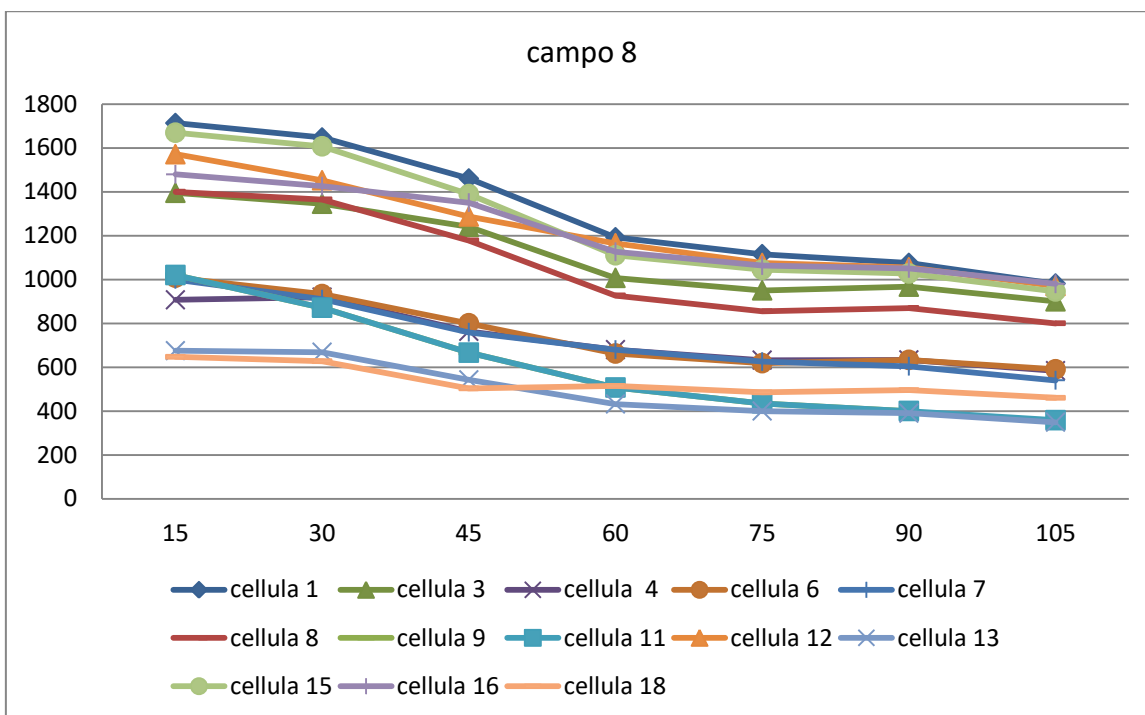
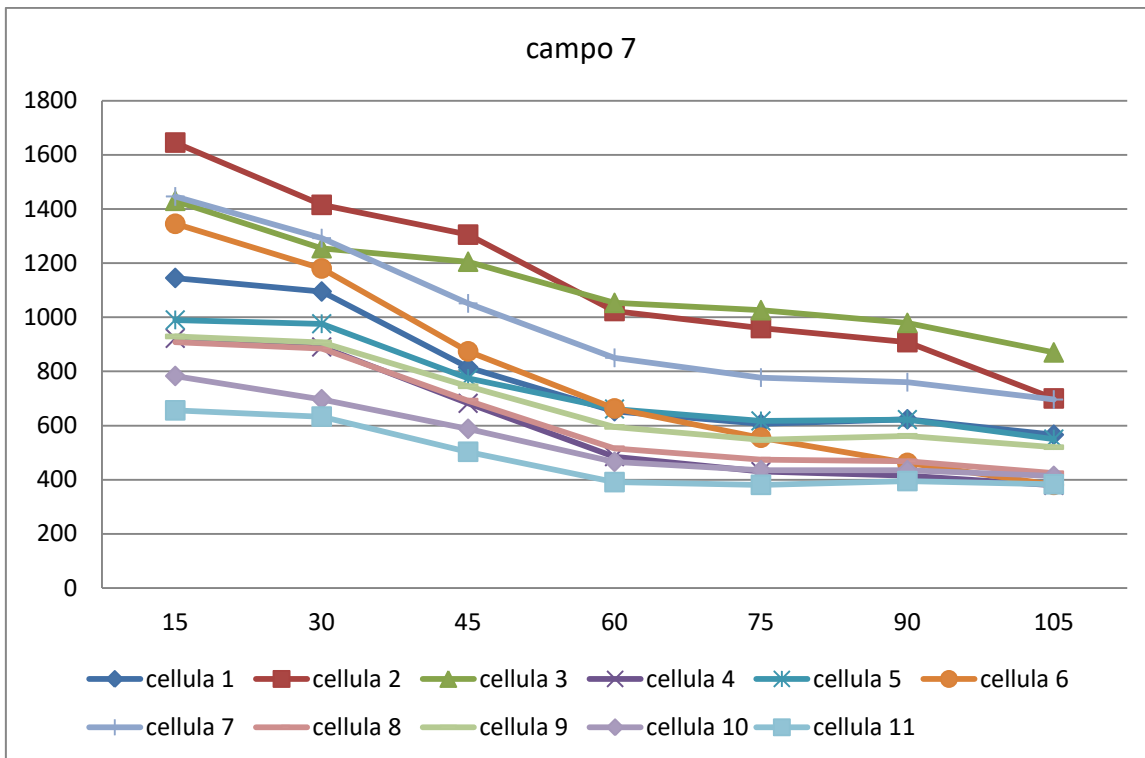


Fig.42. 20 ottobre: Grafico dell'intensità di fluorescenza delle cellule, in ogni campo preso in esame.

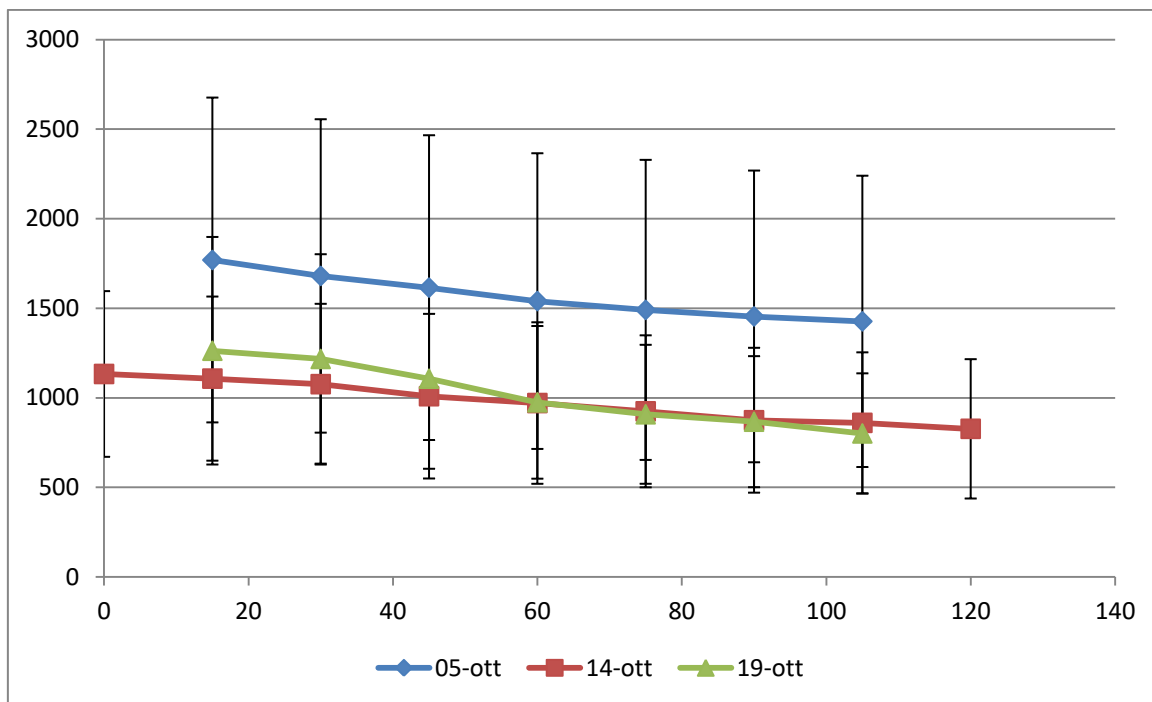


Fig.43. Cellule Panc-1 con il terreno privato della doxo e con campo magnetico statico. Sull'asse delle ascisse sono presenti i minuti, sull'asse delle ordinate il valore dell'intensità di fluorescenza.

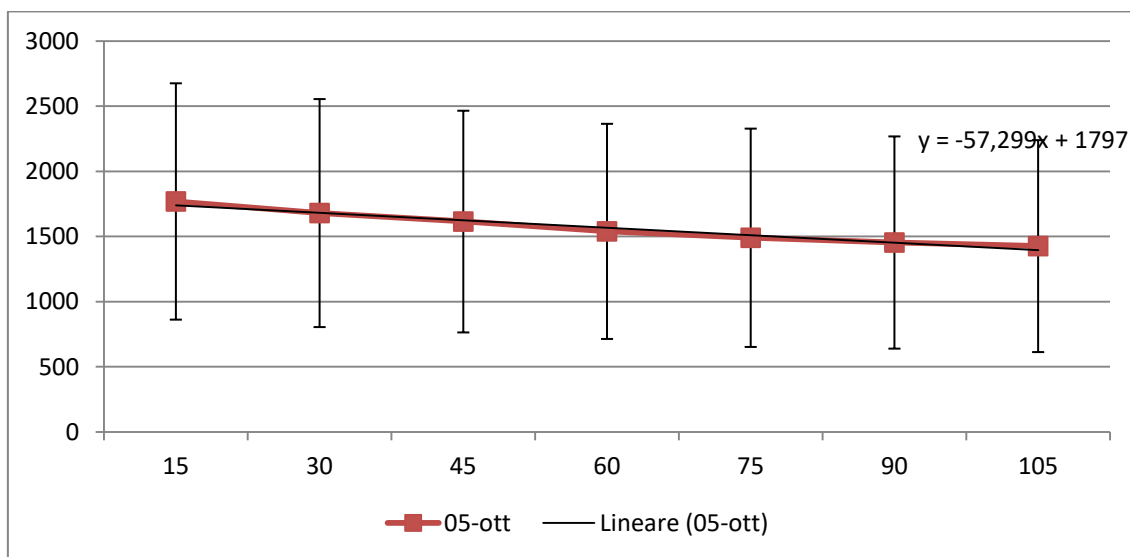


Fig.44. 5 ottobre: Grafico dell'intensità media di fluorescenza (\pm dev. standard) di tutte le cellule prese in esame in tutti i campi. Sull'asse delle ascisse sono presenti i minuti, sull'asse delle ordinate il valore dell'intensità di fluorescenza.

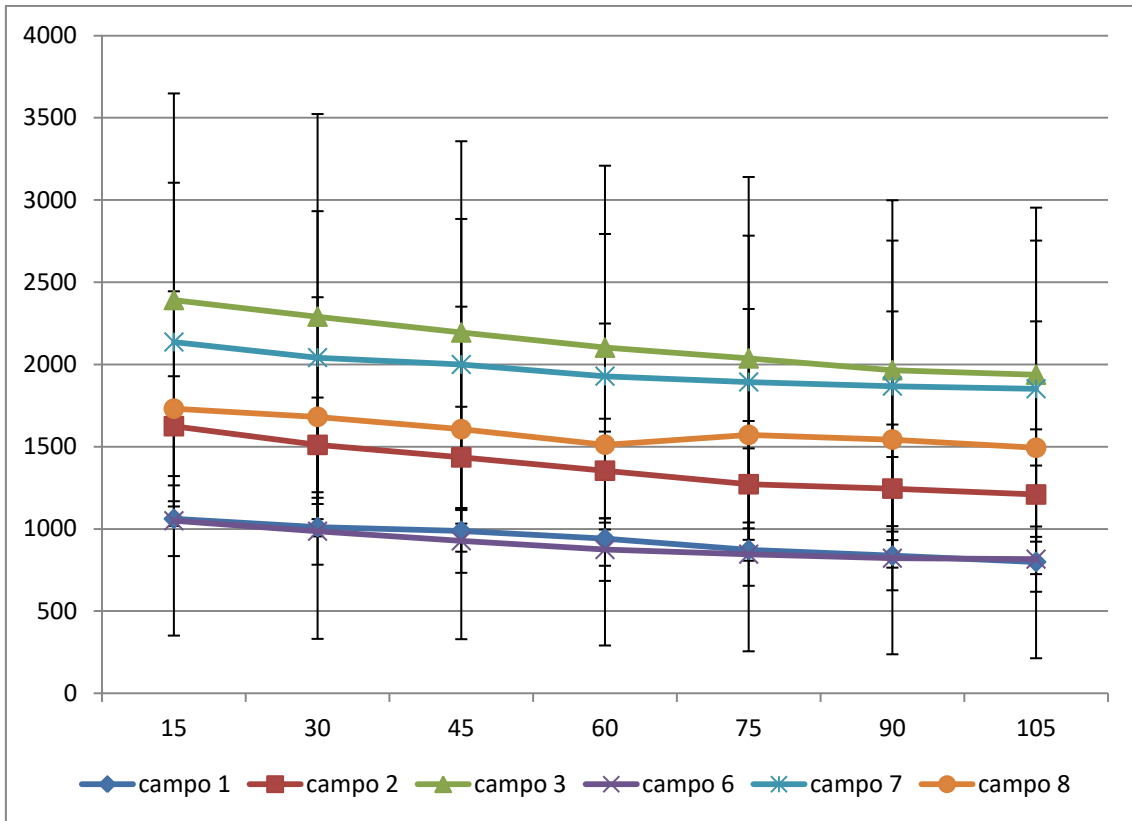
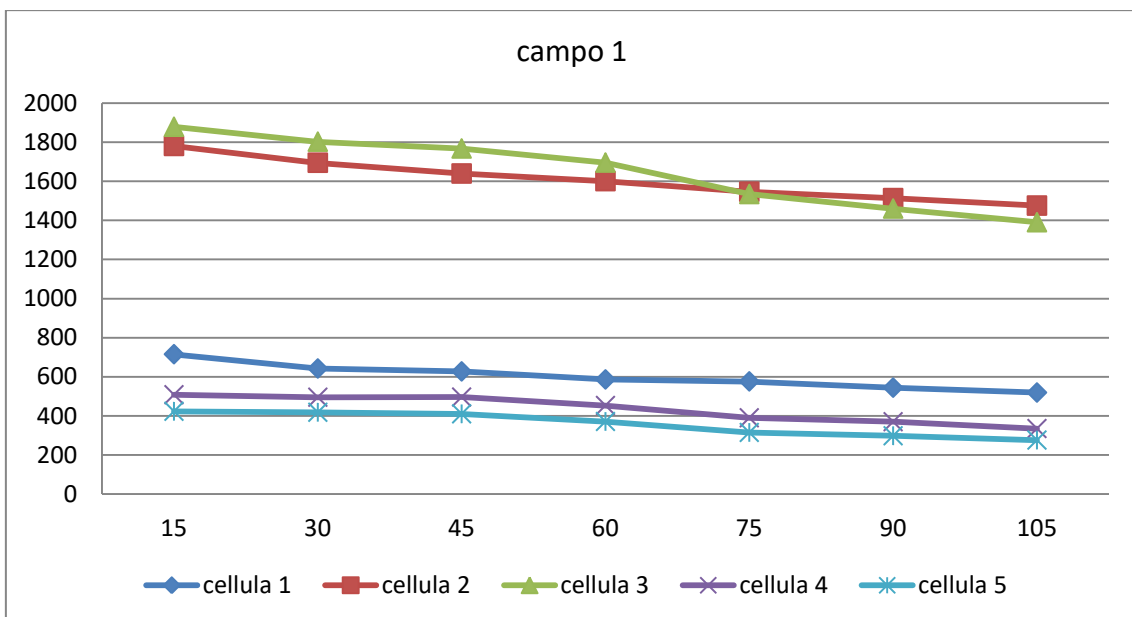
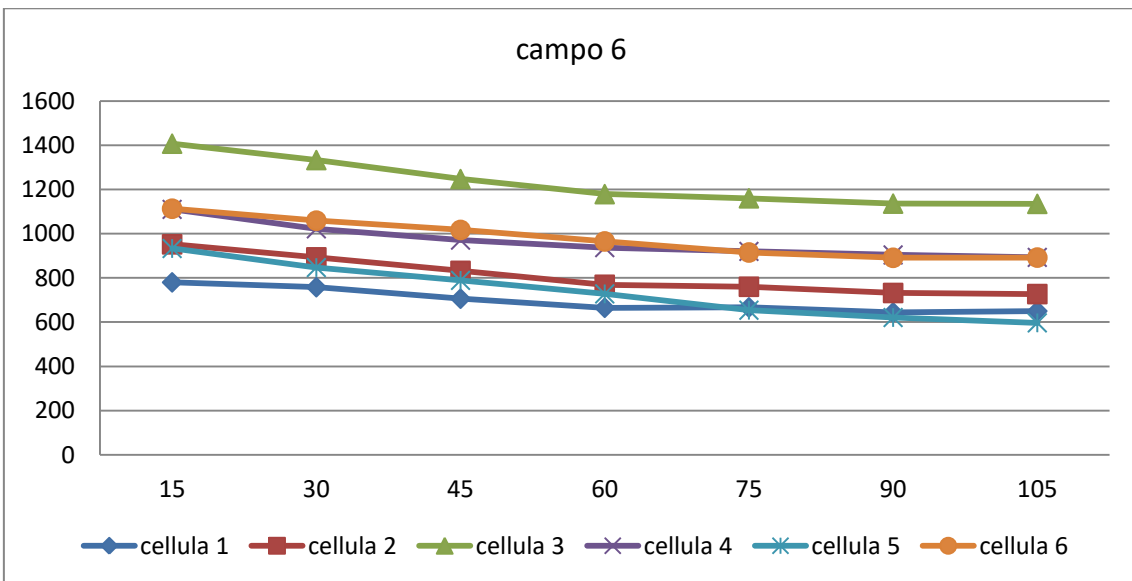
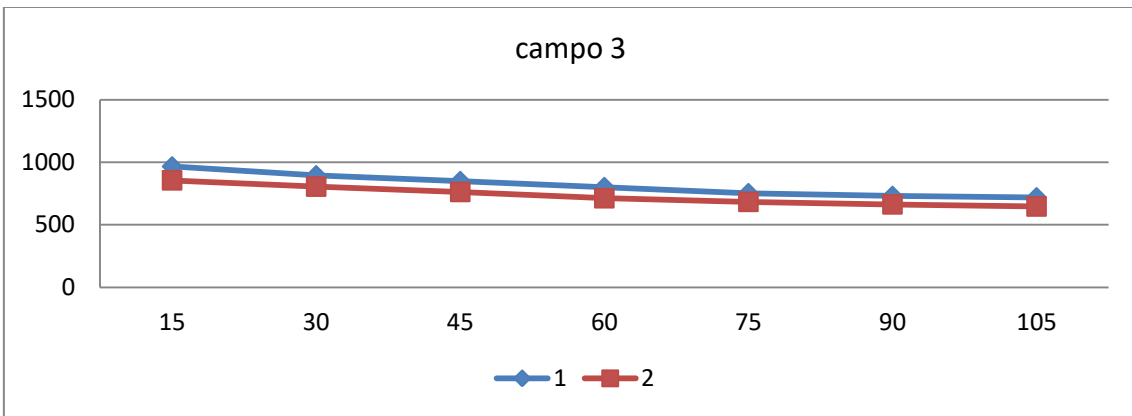
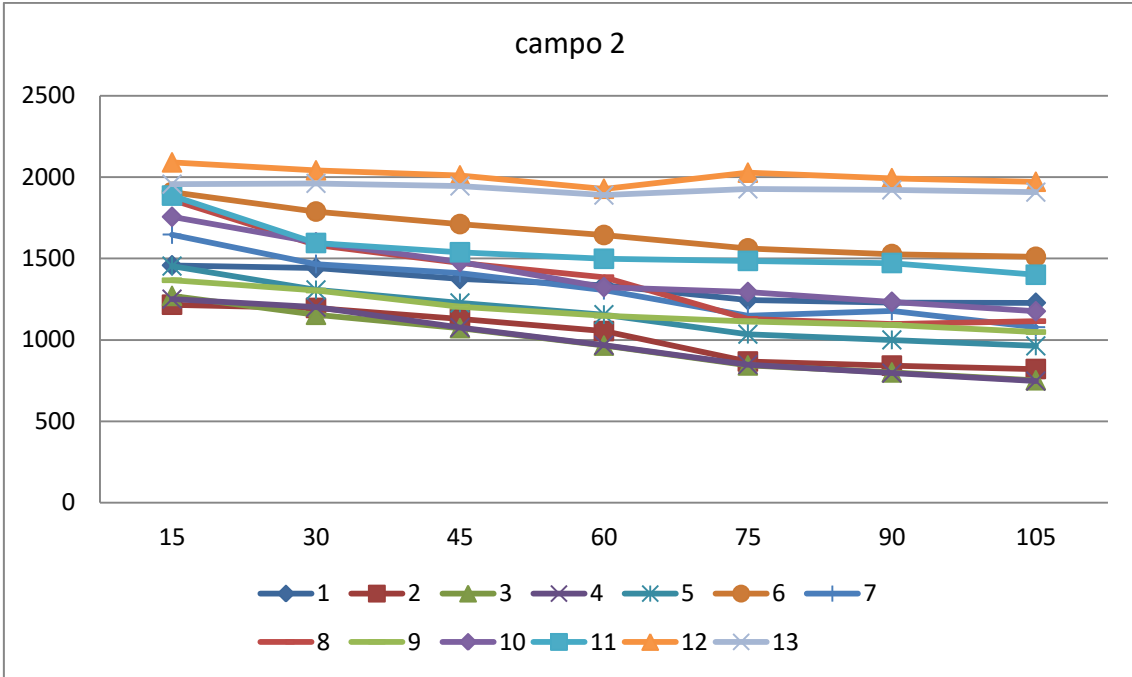


Fig.45. 5 ottobre: Grafico dell'intensità media di fluorescenza (\pm dev. standard) di tutte le cellule di un determinato campo.





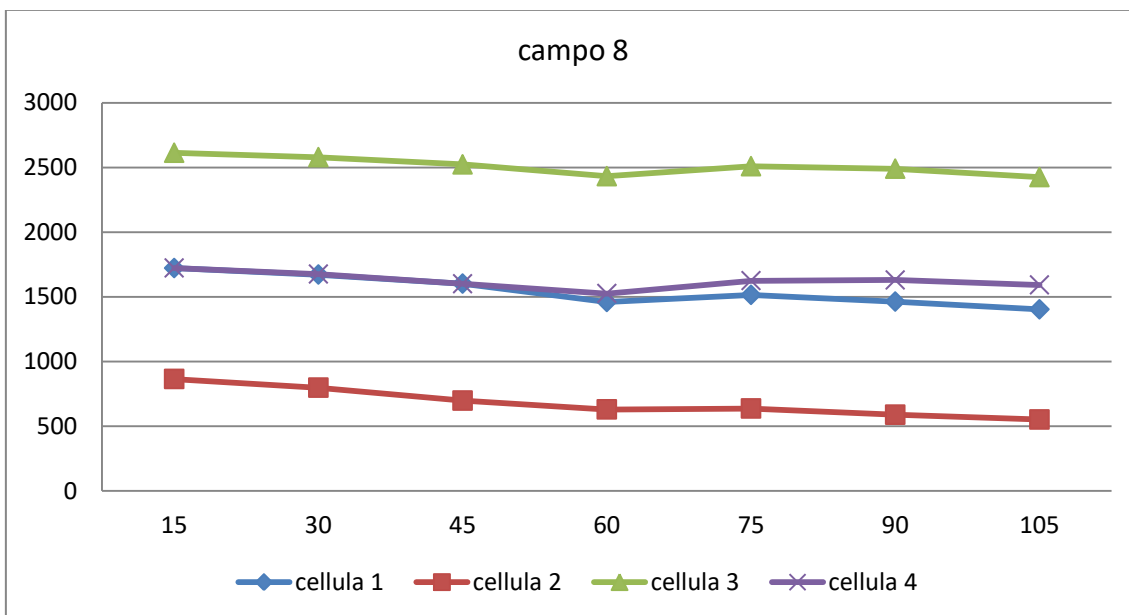
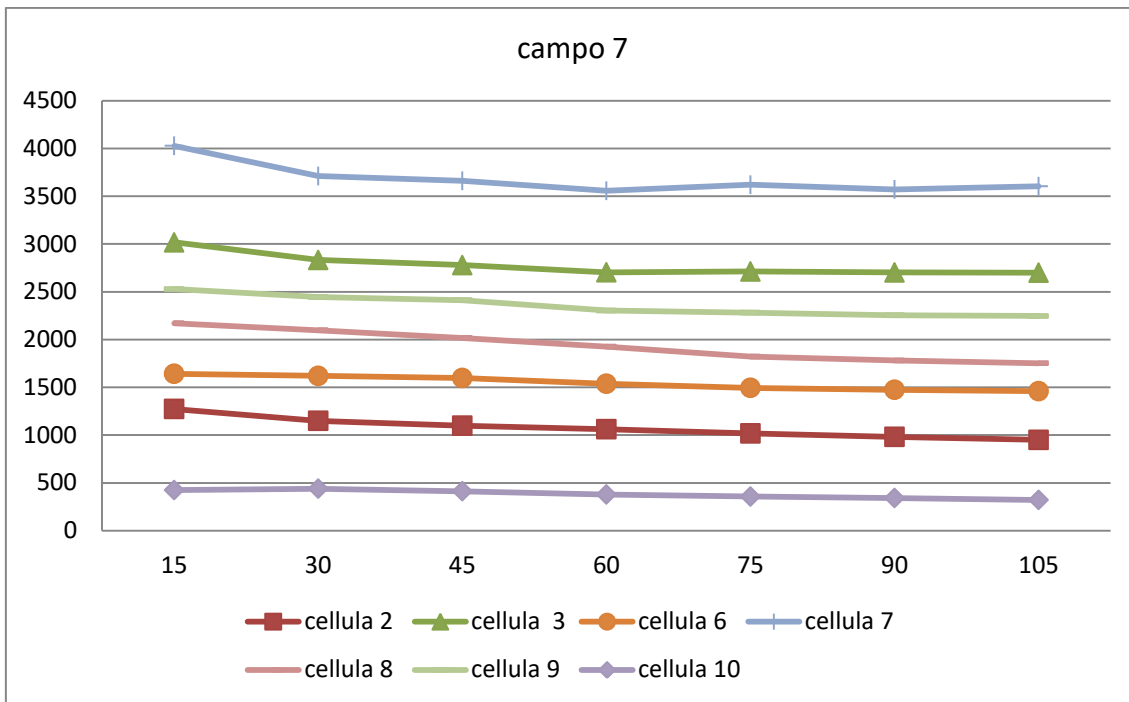


Fig.46. 5 ottobre: Grafico dell'intensità di fluorescenza delle cellule, in ogni campo preso in esame.

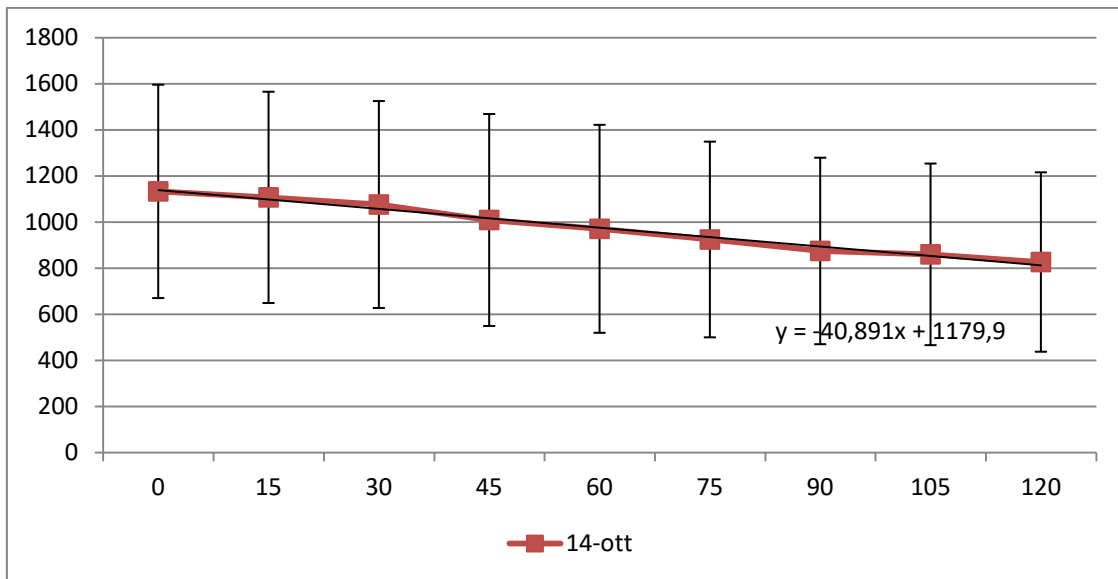


Fig.47. 14 ottobre: Grafico dell'intensità media di fluorescenza(\pm dev. standard) di tutte le cellule prese in esame in tutti i campi. Foto scattate ogni 15 minuti, per un totale di 120 minuti. Sull'asse delle ascisse sono presenti i minuti, sull'asse delle ordinate il valore dell'intensità di fluorescenza.

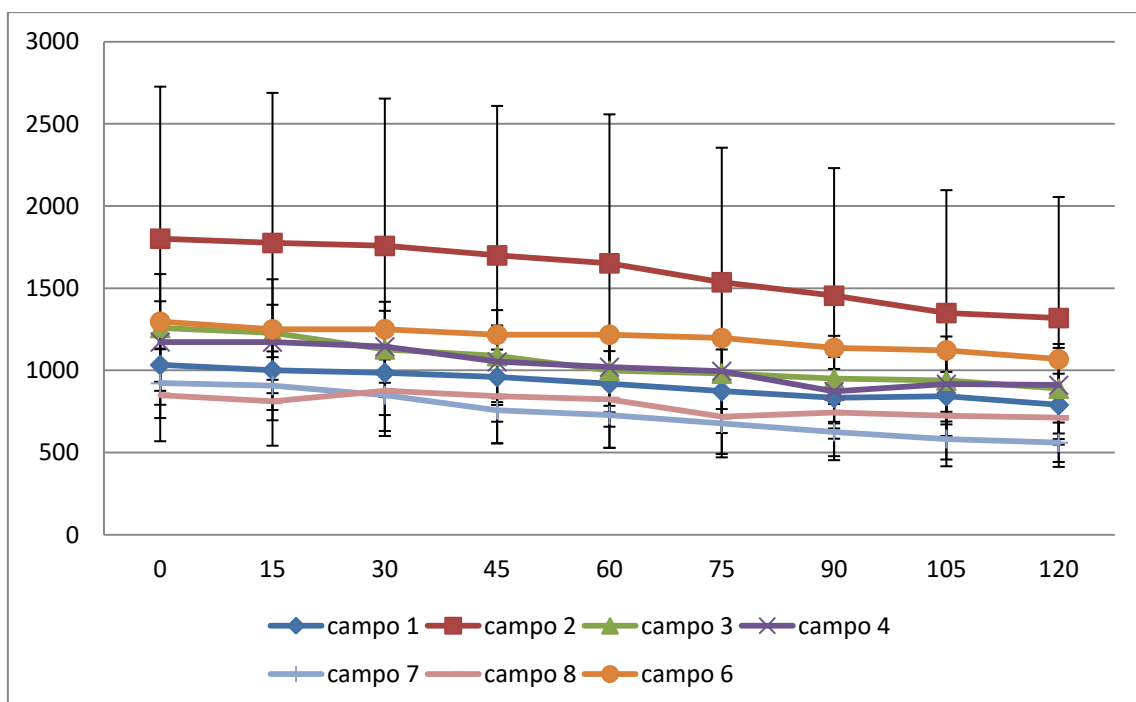
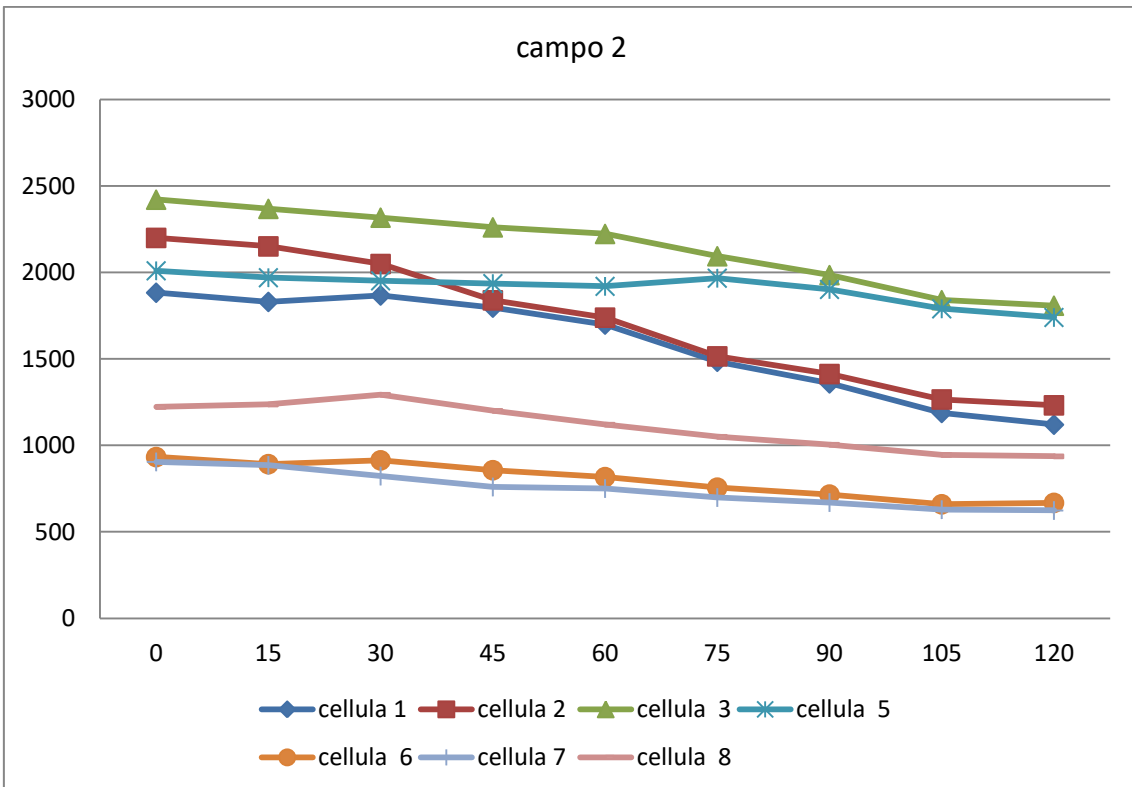
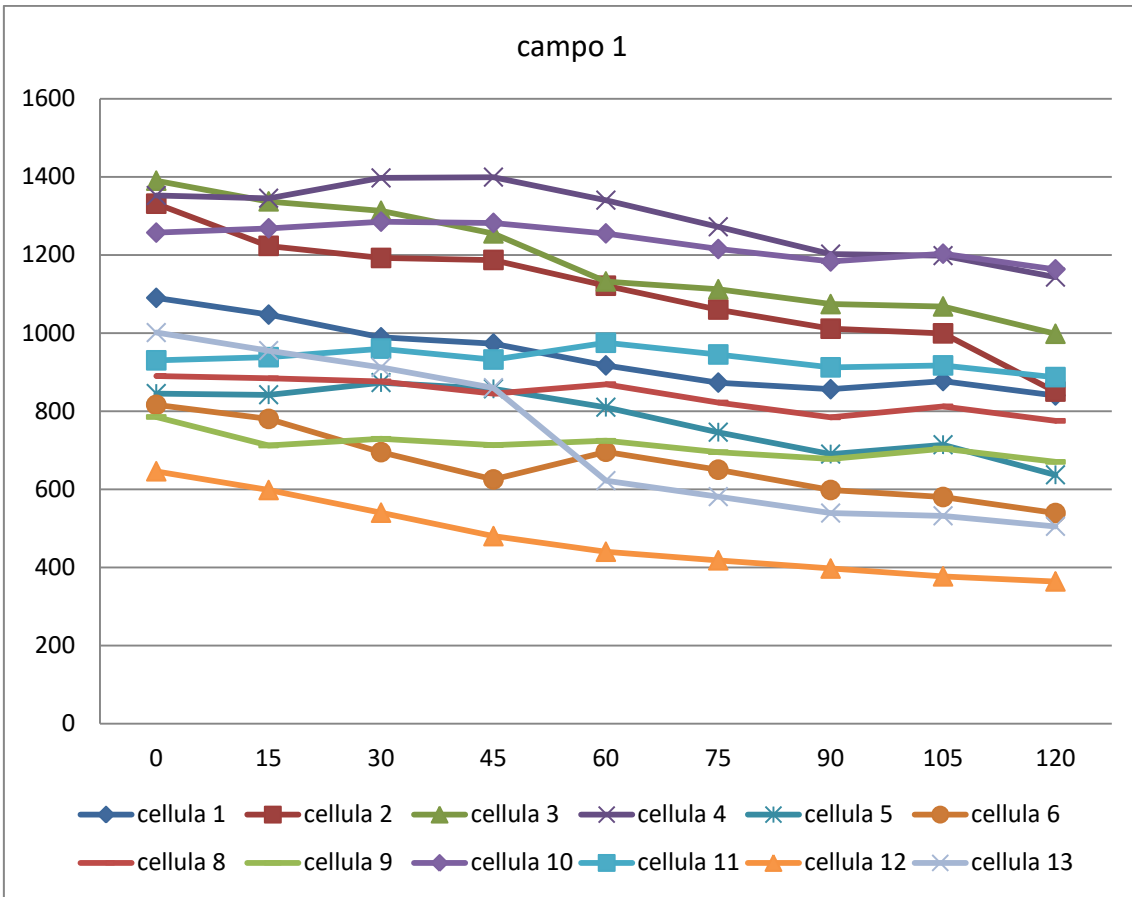
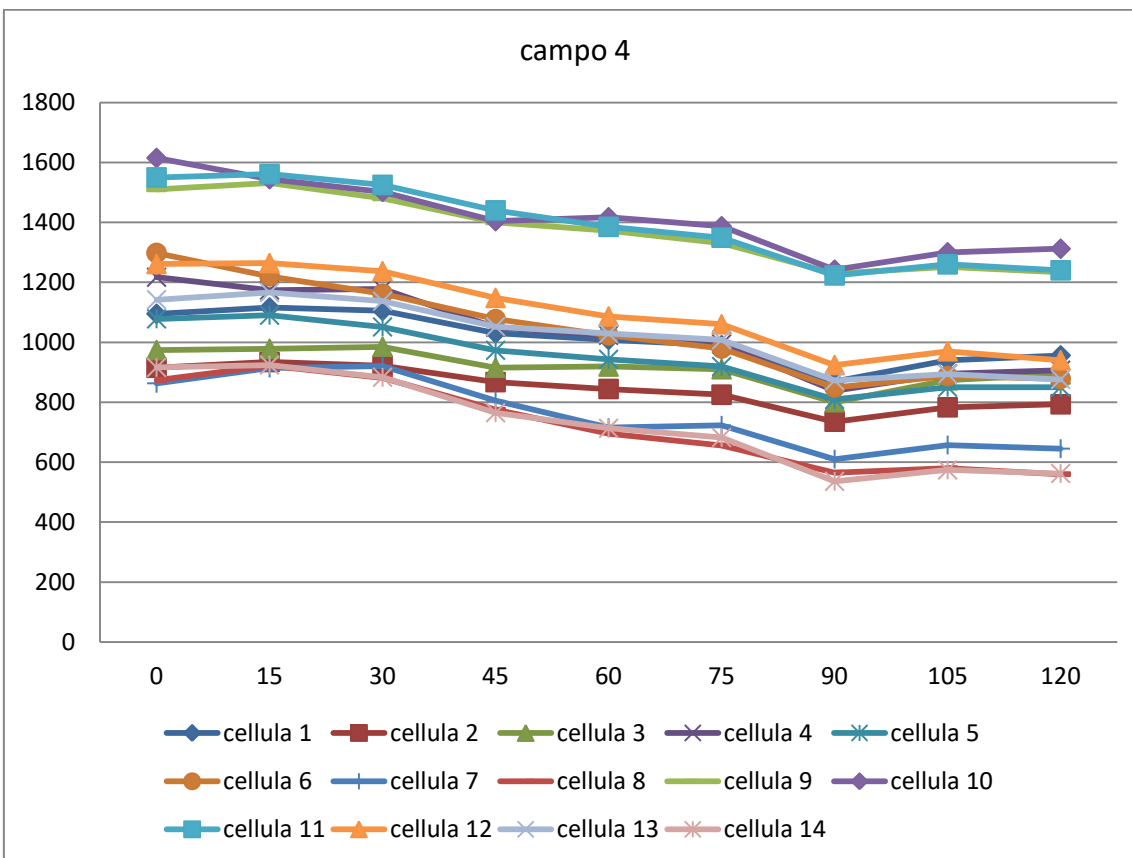
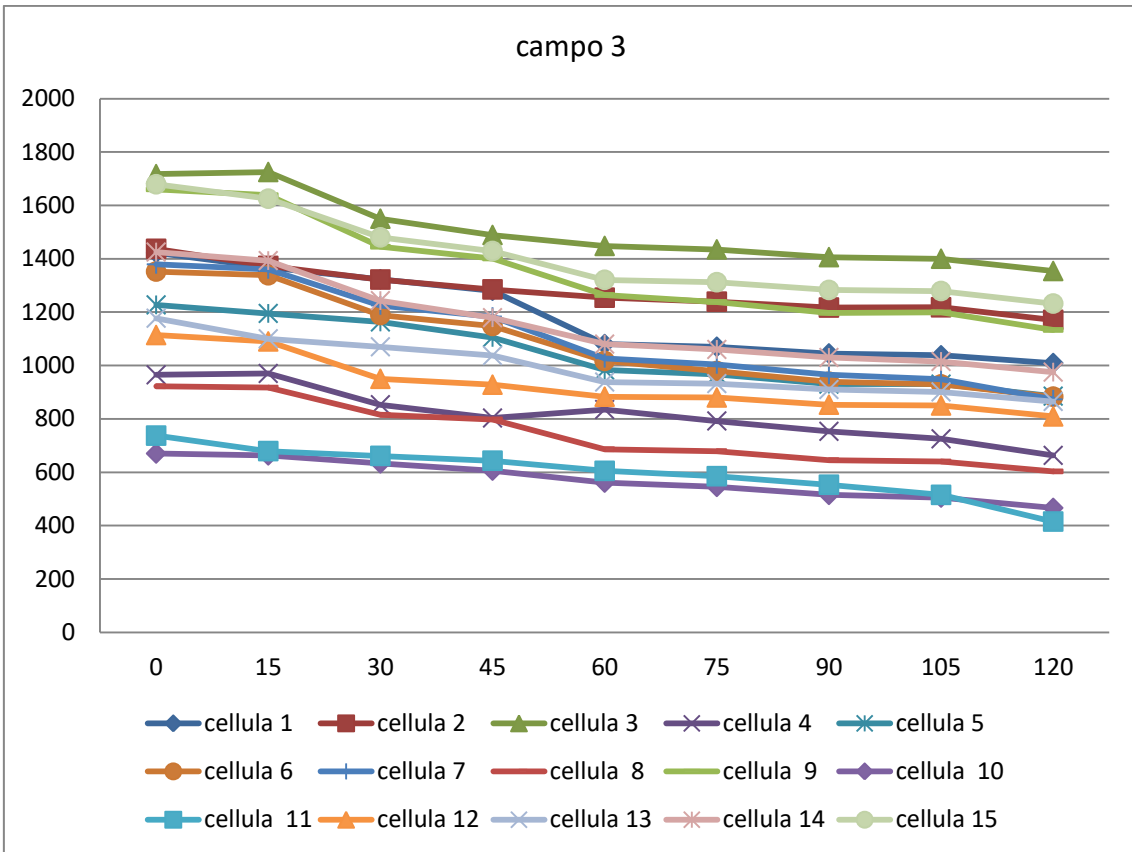
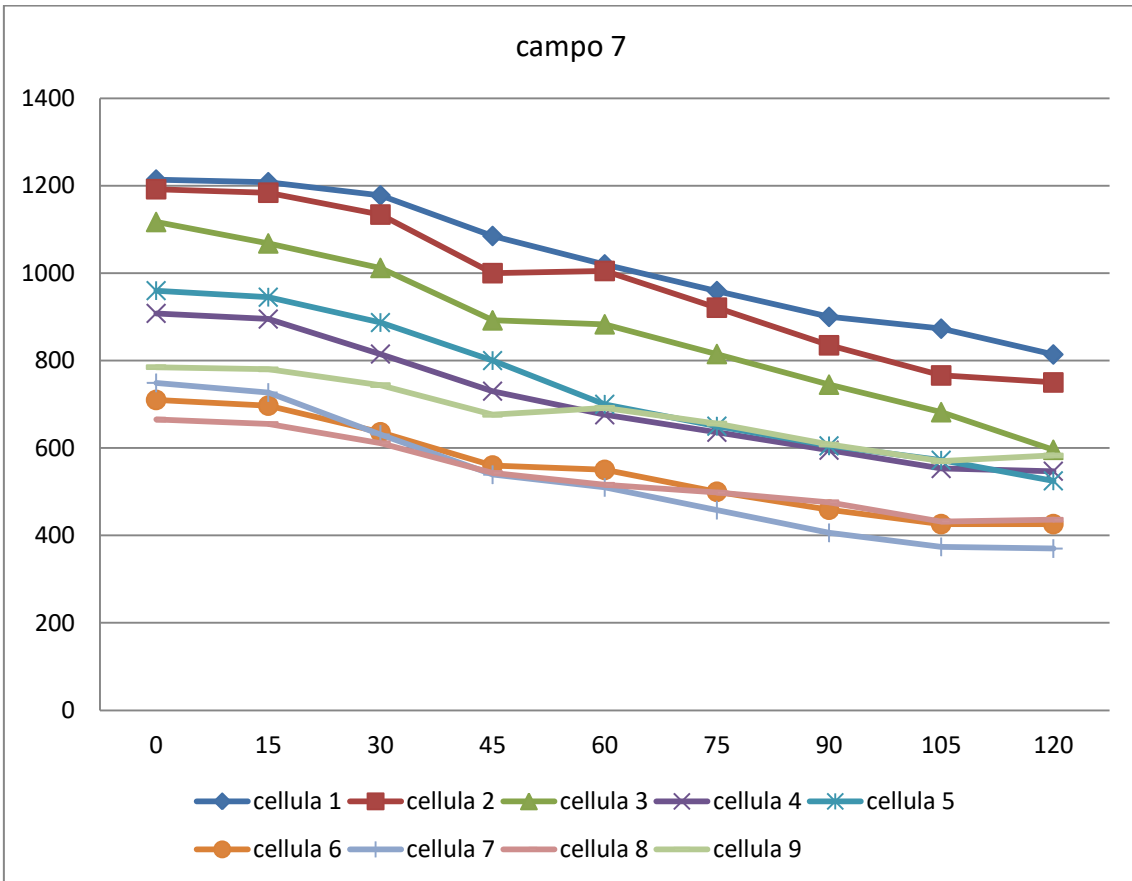
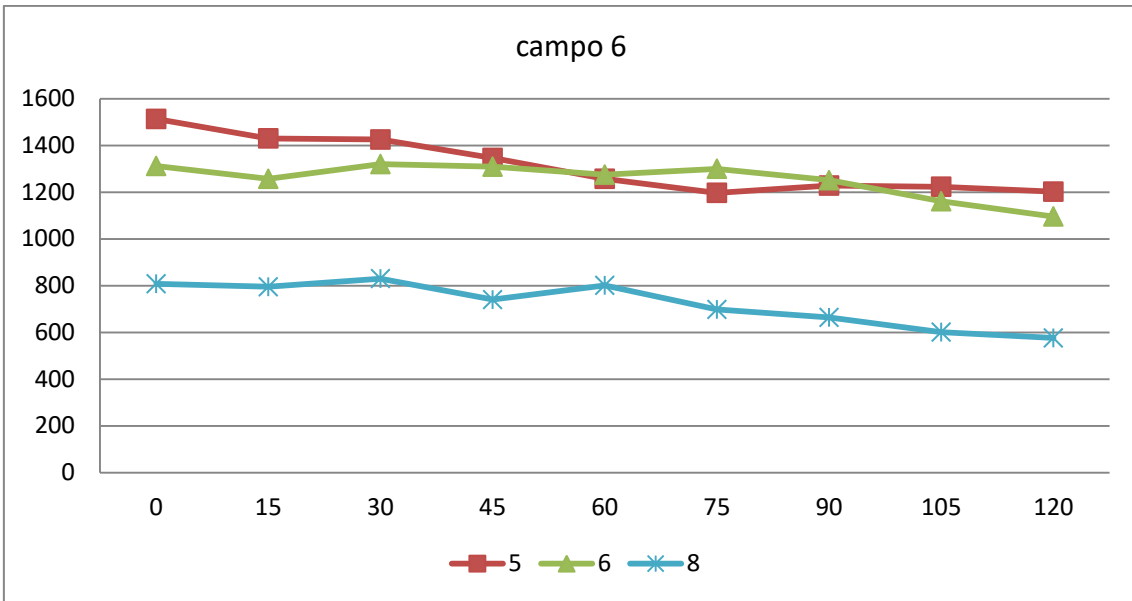


Fig.48. 14 ottobre: Grafico dell'intensità media di fluorescenza (\pm dev. standard) di tutte le cellule di un determinato campo.







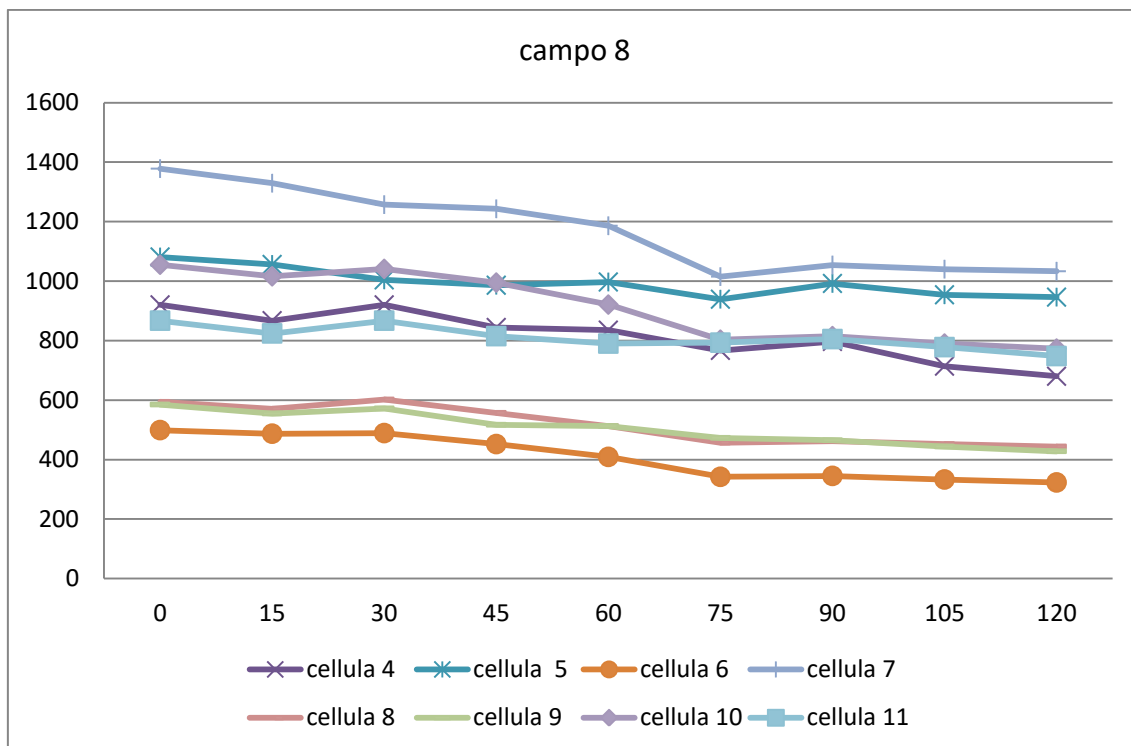


Fig.49. 14 ottobre: Grafico dell'intensità di fluorescenza delle cellule, in ogni campo preso in esame.

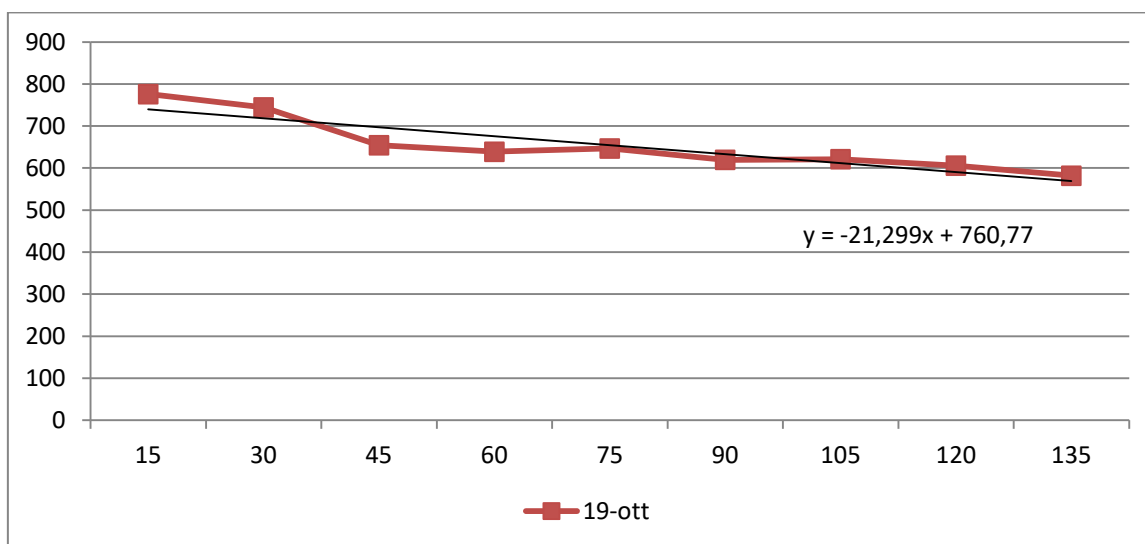


Fig.50. 19 ottobre: Grafico dell'intensità media di fluorescenza(\pm dev. standard) di tutte le cellule prese in esame in tutti i campi. Foto scattate ogni 15 minuti, per 135 minuti complessivi. Sull'asse delle ascisse sono presenti i minuti, sull'asse delle ordinate il valore dell'intensità di fluorescenza.

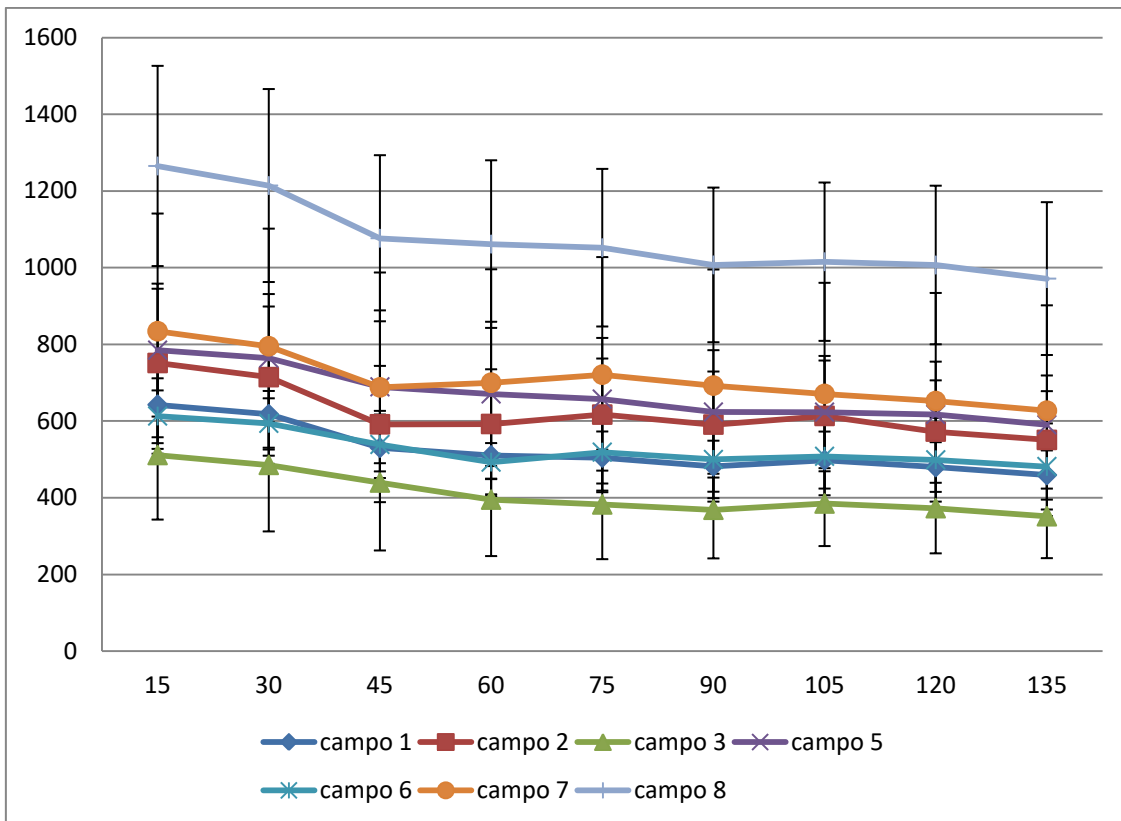
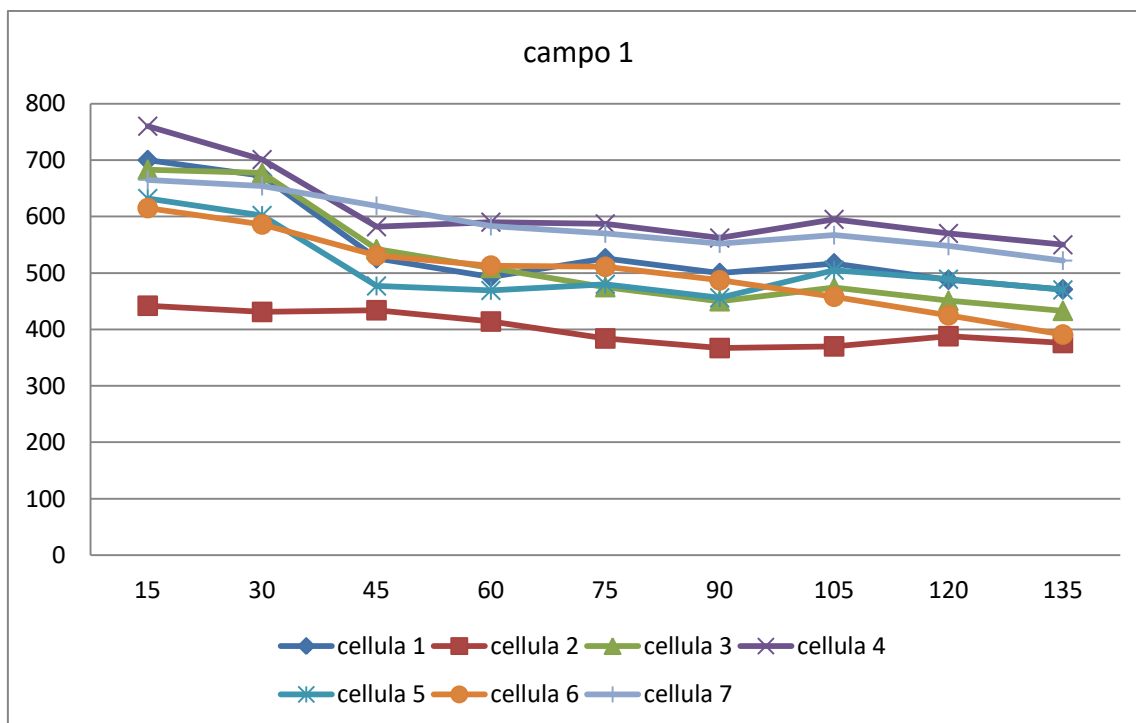
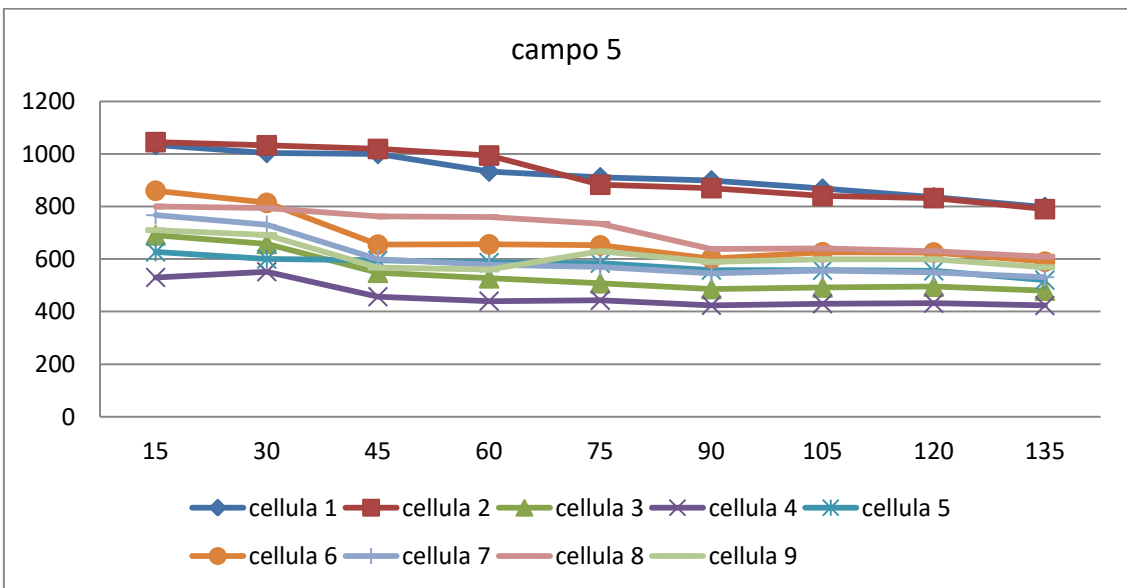
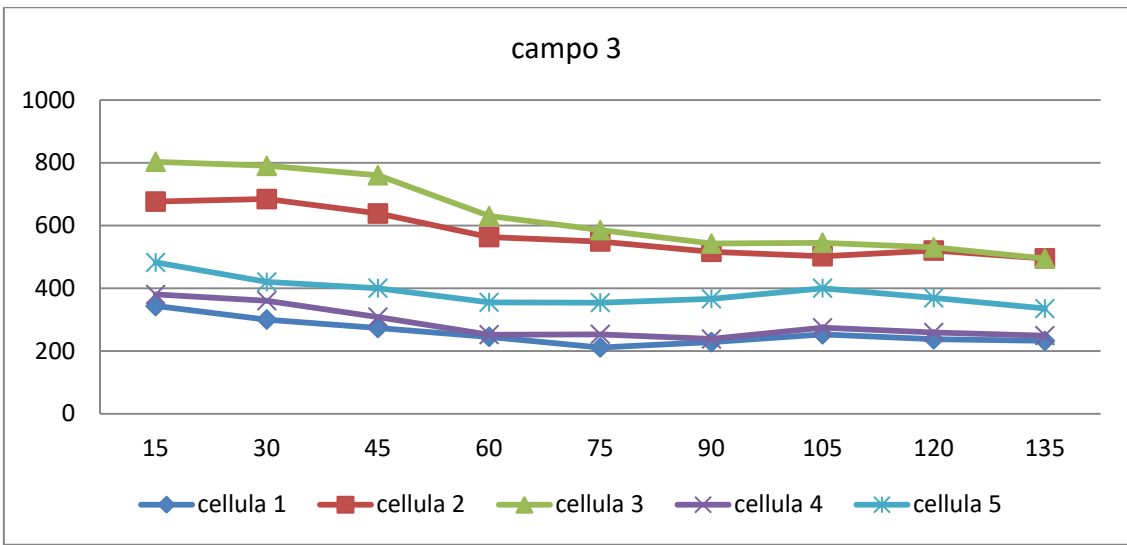
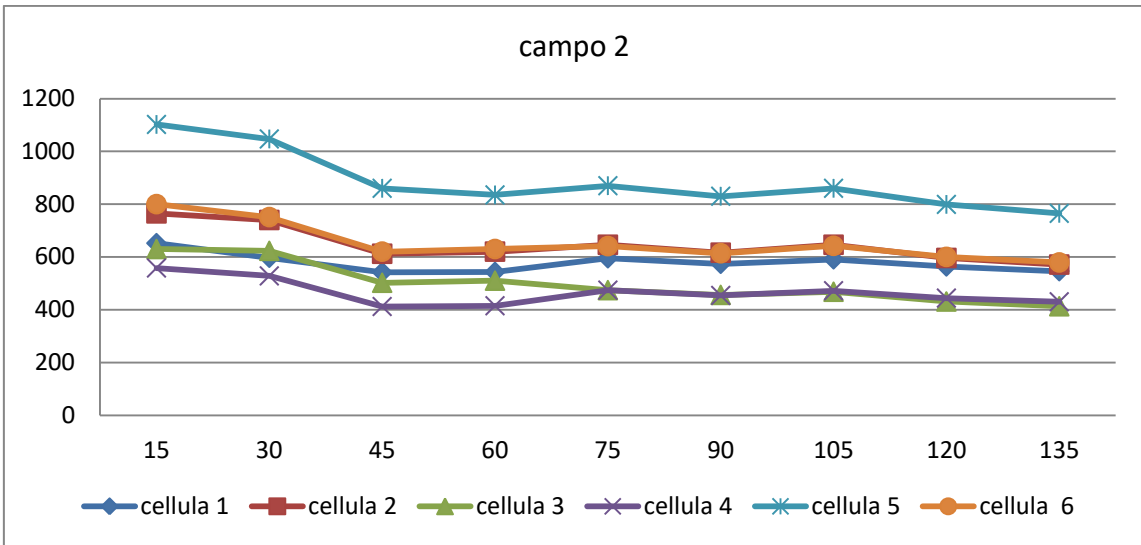
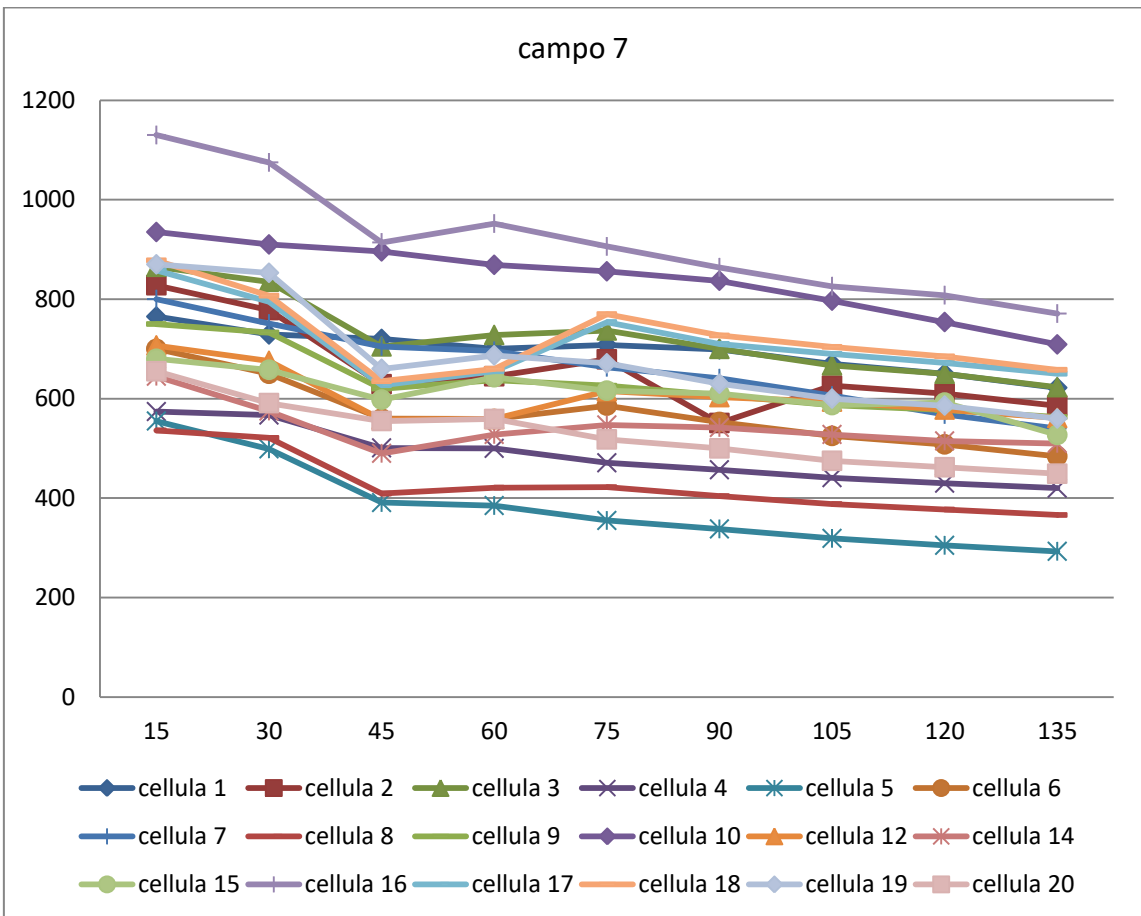
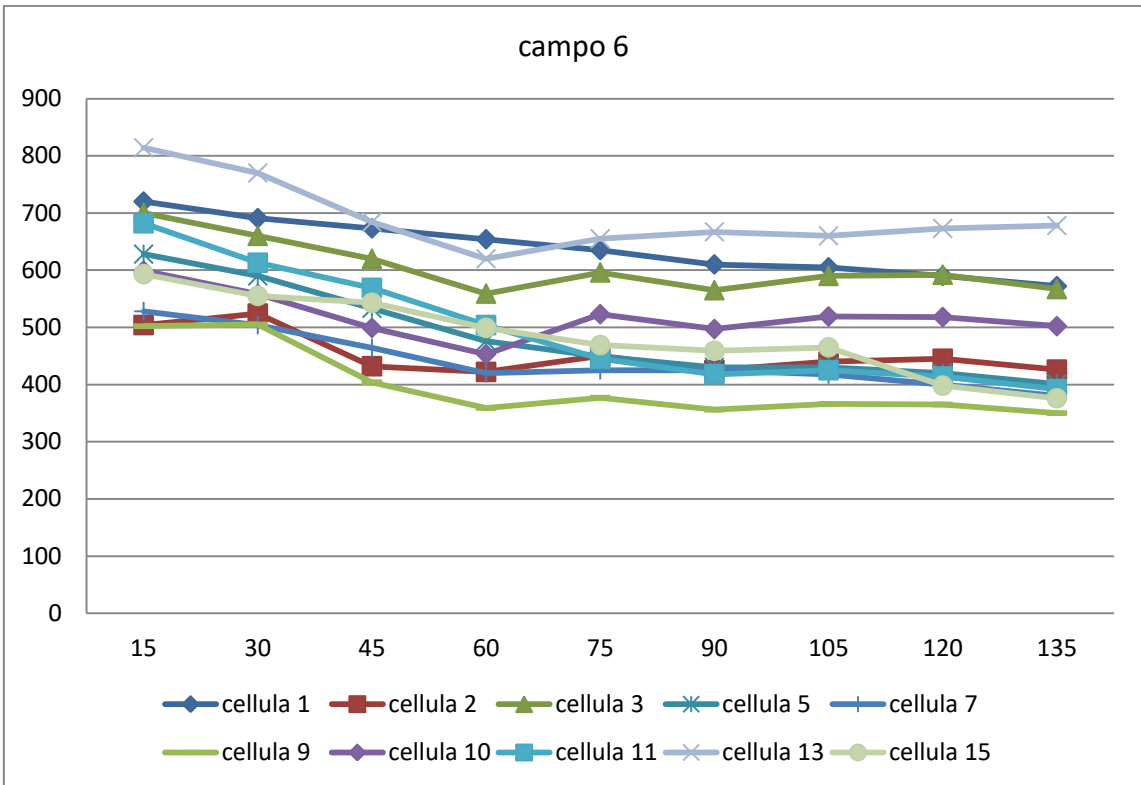


Fig.51. 19 ottobre: Grafico dell'intensità media di fluorescenza (\pm dev. standard) di tutte le cellule di un determinato campo.







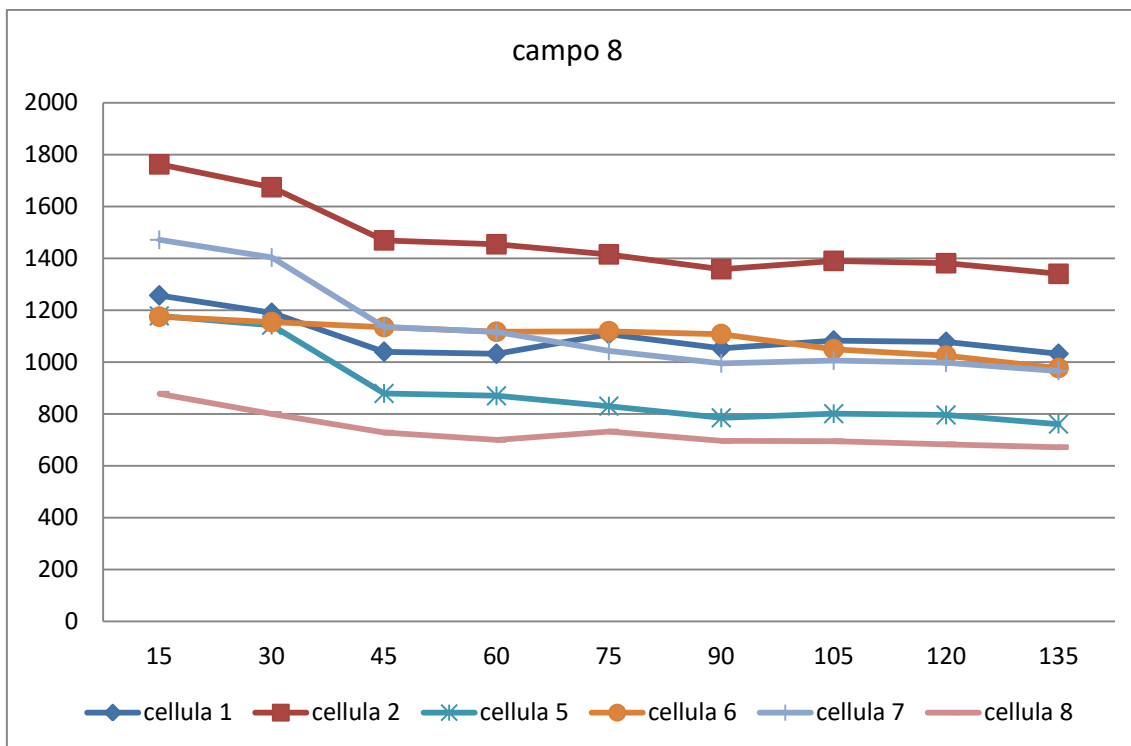


Fig.52. 19 ottobre: Grafico dell'intensità di fluorescenza delle cellule, in ogni campo preso in esame.

4.4 Analisi dei risultati

Durante lo svolgimento degli esperimenti, sono stati provati vari protocolli, con l'obiettivo di rendere migliori le foto dei campioni ottenute; nelle analisi effettuate il 7 luglio, il 4 e il 5 ottobre la messa a fuoco deriva dal lavoro del solo microscopio, mentre nei lavori del 13, 14, 19 e 20 ottobre la messa a fuoco, tra un intervallo di tempo e l'altro, è stata effettuata da un operatore.

Inoltre, varia il tempo di pre-illuminazione del campione, ovvero il tempo stabilito dall'operatore con cui il microscopio illumina il campione prima dello scatto effettivo; in particolare maggiore è questo tempo e migliore è la messa a fuoco; tuttavia, il grado di degradazione chimica del farmaco aumenta se il tempo di pre-illuminazione è maggiore. La pre-illuminazione del campione è stata di un secondo il 7 luglio e il 13 e il 14 ottobre, mentre è stata di 2 secondi il 4 e 5 ottobre, e di ben 3 secondi il 19 e il 20 ottobre.

Si è notata una diminuzione del segnale di fluorescenza rilevata nelle analisi in cui la messa a fuoco era effettuata dal microscopista e il tempo di pre-illuminazione maggiore.

Confrontando gli esperimenti effettuati con le stesse condizioni sperimentali (7 luglio vs 7 luglio, Fig. 53; 4 vs 5 ottobre, Fig. 54; 13 vs 14 ottobre, Fig. 55; 19 vs 20 ottobre, Fig. 56) è possibile osservare l'effetto del campo magnetico

statico sull'ingresso della doxorubicina. Nelle figure 57 e 58 si mostrano invece gli effetti del campo magnetico sull'efflusso del farmaco dalle cellule. L'analisi statistica effettuata mostra che il campo magnetico statico riduce l'ingresso di farmaco nel tempo e ne accelera l'uscita. In particolare, ciò è maggiormente evidente in Fig. 53, 54, 56, 58. Non risultano differenze statisticamente significative in Fig. 55 e 57.

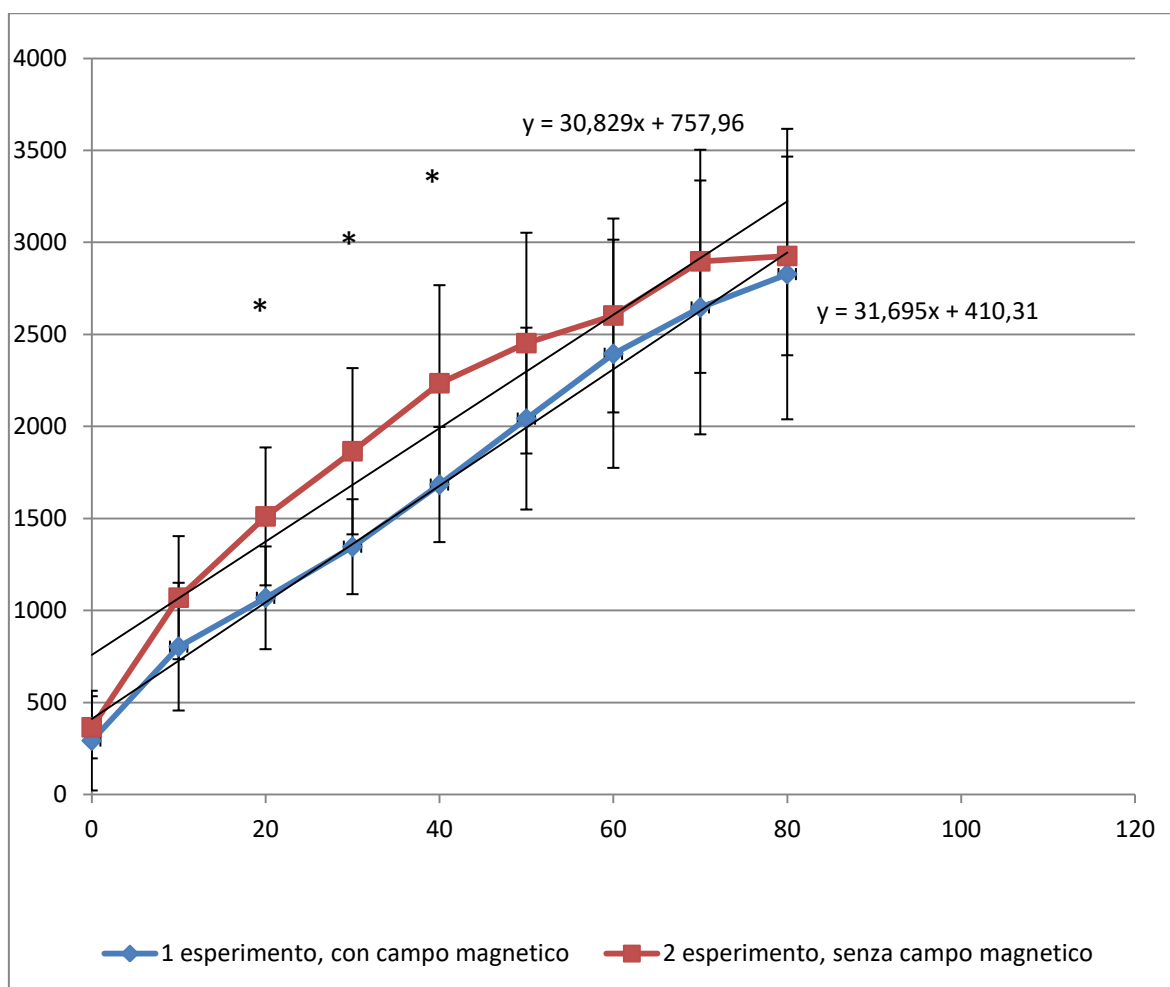


Fig. 53. 7 luglio: confronto tra le intensità medie di fluorescenza (\pm dev. standard) di tutte le cellule prese in esame in due esperimenti distinti. Sull'asse delle ascisse sono presenti i minuti, sull'asse delle ordinate il valore dell'intensità di fluorescenza.

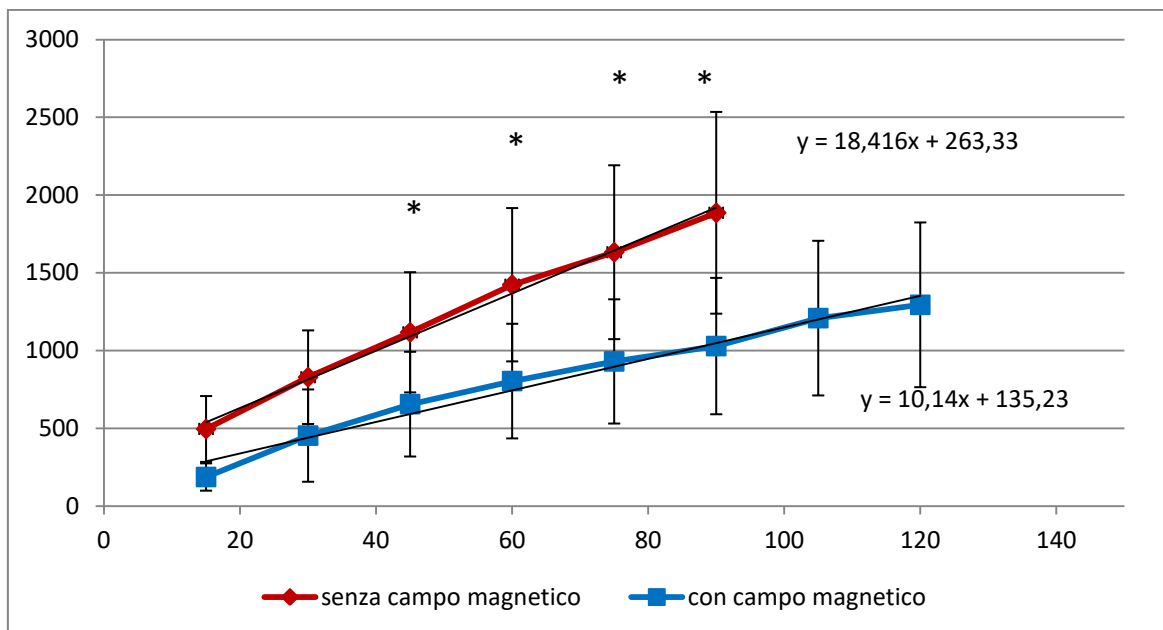


Fig.54. 4 ottobre e 5 ottobre: confronto tra le intensità medie di fluorescenza (\pm dev. standard) di tutte le cellule prese in esame in due esperimenti distinti. Nel 5 ottobre cellule sottoposte ad un campo magnetico, mentre nella prova del 4 ottobre no. Sull'asse delle ascisse sono presenti i minuti, sull'asse delle ordinate il valore dell'intensità di fluorescenza.

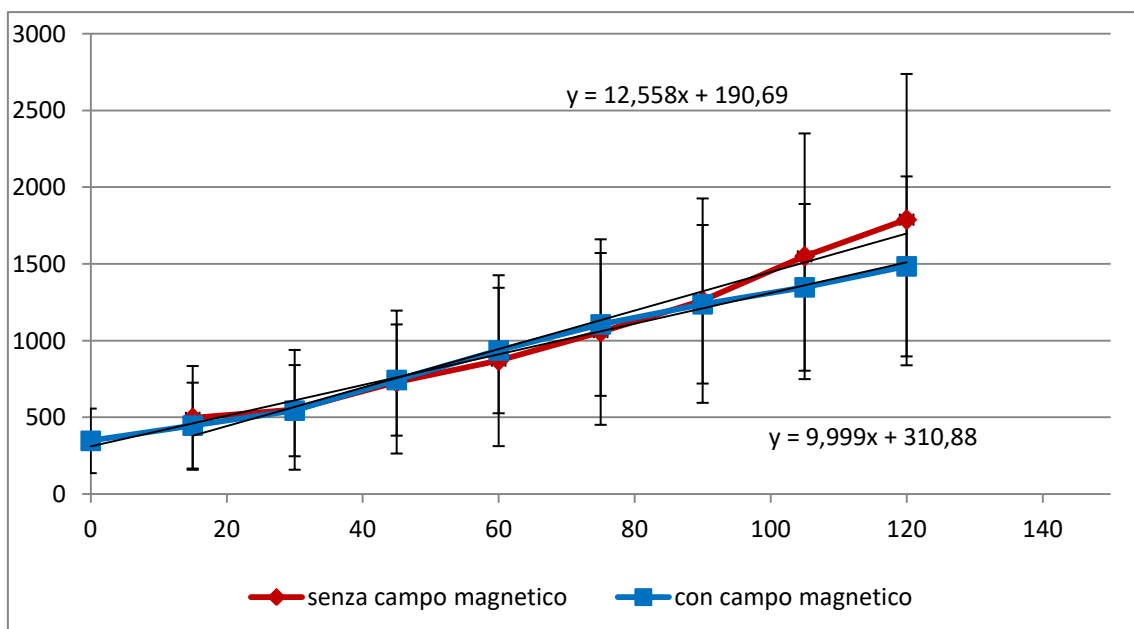


Fig.55 13 ottobre, cellule non sottoposte ad un campo magnetico, 14 ottobre cellule sottoposte a campo magnetico.

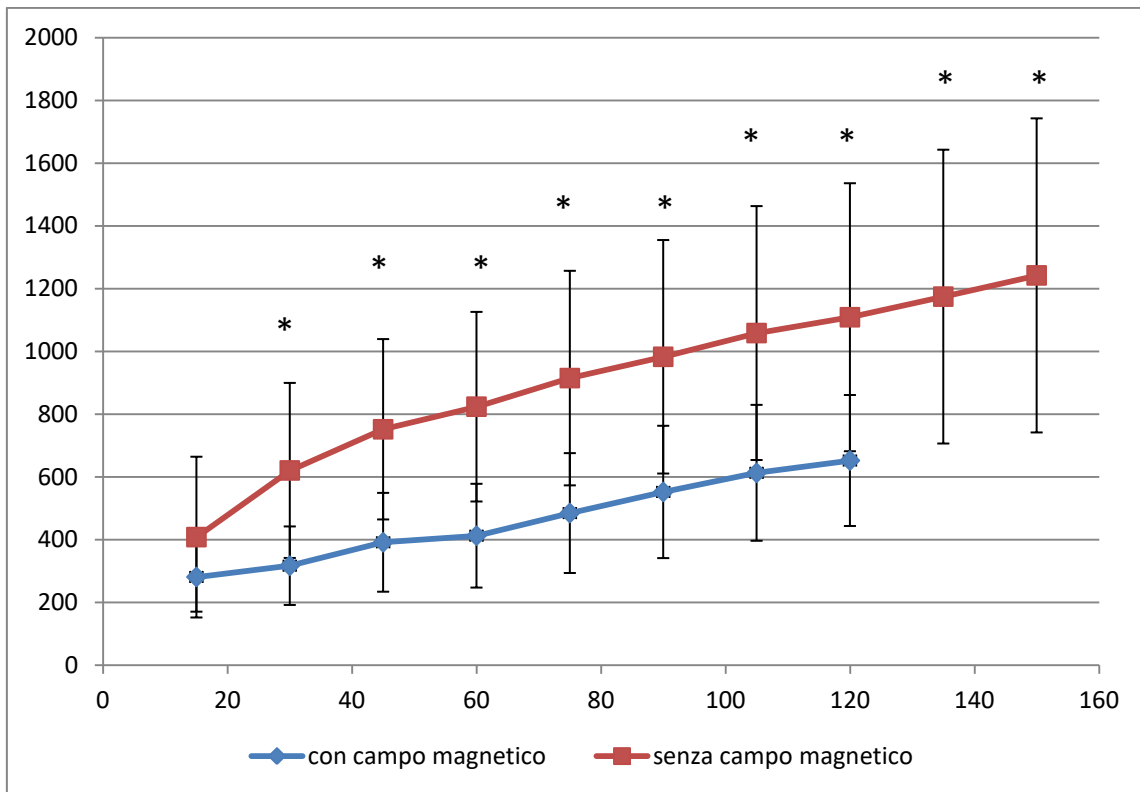


Fig.56. 19 ottobre: cellule sottoposte a campo magnetico, mentre nelle prove del 20 le cellule non sono state sottoposte all'azione di un campo magnetico. In questi grafici si osserva l'andamento della fuoriuscita di doxorubicina dalle cellule; il campione utilizzato è lo stesso delle analisi fatte per valutare l'ingresso della doxorubicina all'interno delle cellule, a cui poi è stato tolto mediante lavaggio, il farmaco dal terreno di coltura.

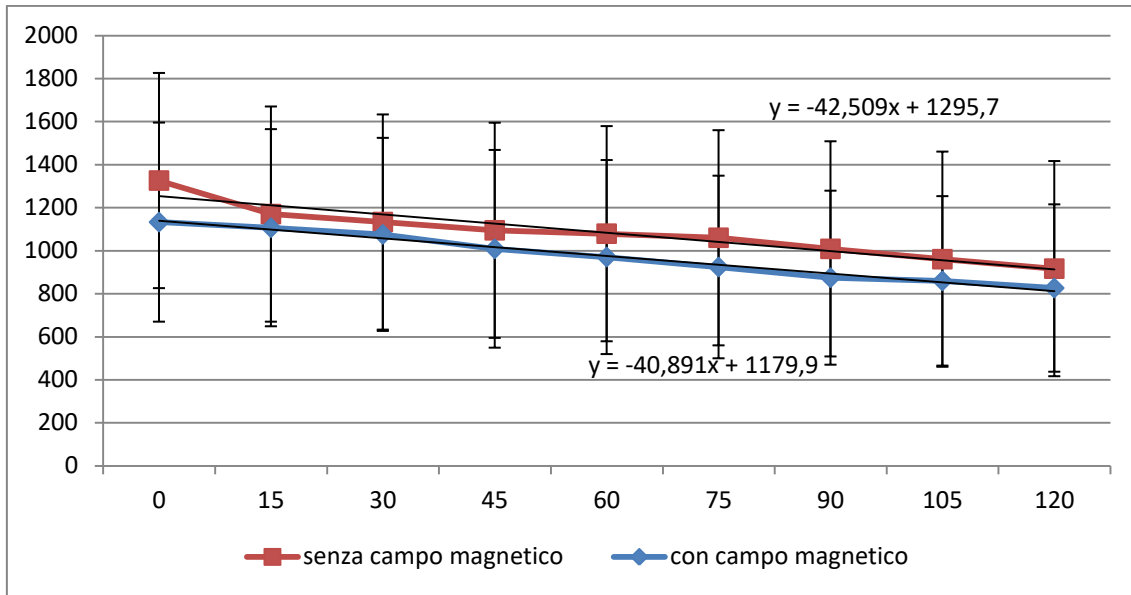


Fig.57. Grafico dell'intensità media di fluorescenza(\pm dev. standard) di tutte le cellule prese in esame in tutti i campi. 13 ottobre cellule senza campo magnetico, 14 ottobre: cellule sottoposte all'influenza di un campo magnetico

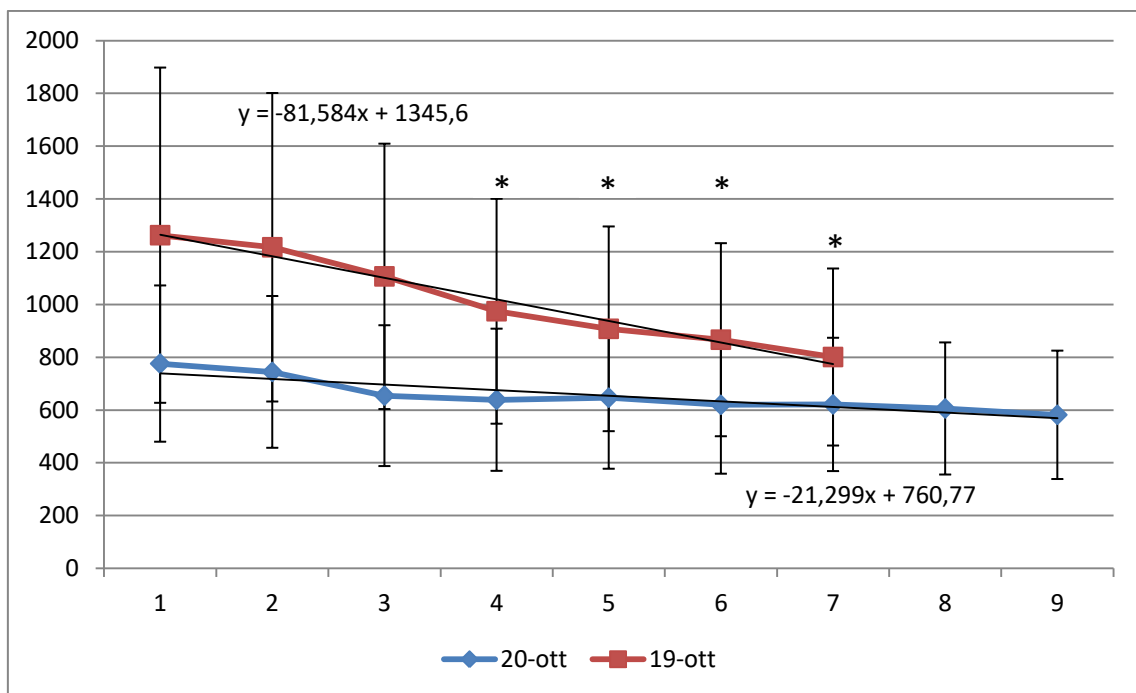


Fig.58. Grafico dell'intensità media di fluorescenza(\pm dev. standard) di tutte le cellule prese in esame in tutti i campi. Cellule senza campo nel 20 ottobre, con campo magnetico nel 19 ottobre.

4.4 Trattamento con verapamil

Il verapamil è un inibitore della più importante pompa di efflusso (P-gp), responsabile della chemioresistenza delle cellule tumorali. Si è voluto verificare che nel nostro campione ci fosse una sottopopolazione di cellule resistenti alla doxorubicina. Le cellule hanno subito un trattamento iniziale breve con doxorubicina, il farmaco è stato poi tolto dal terreno di coltura, dove invece è stato aggiunto il verapamil, con un'incubazione per 2 ore.

Dopo aver tolto il verapamil e aver aggiunto la doxorubicina, si osserva nel grafico un netto aumento dell'intensità di una cellula rispetto ad un'altra: questo aumento è dovuto sicuramente al blocco della P-gp (Fig. 59).

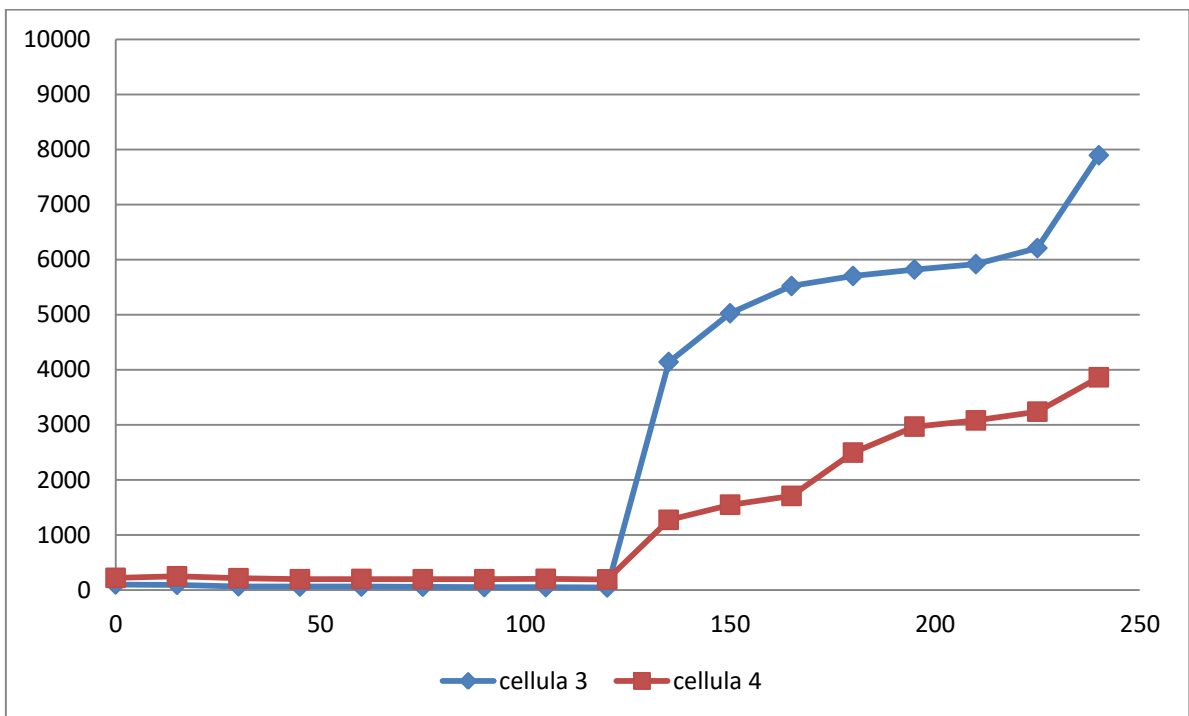
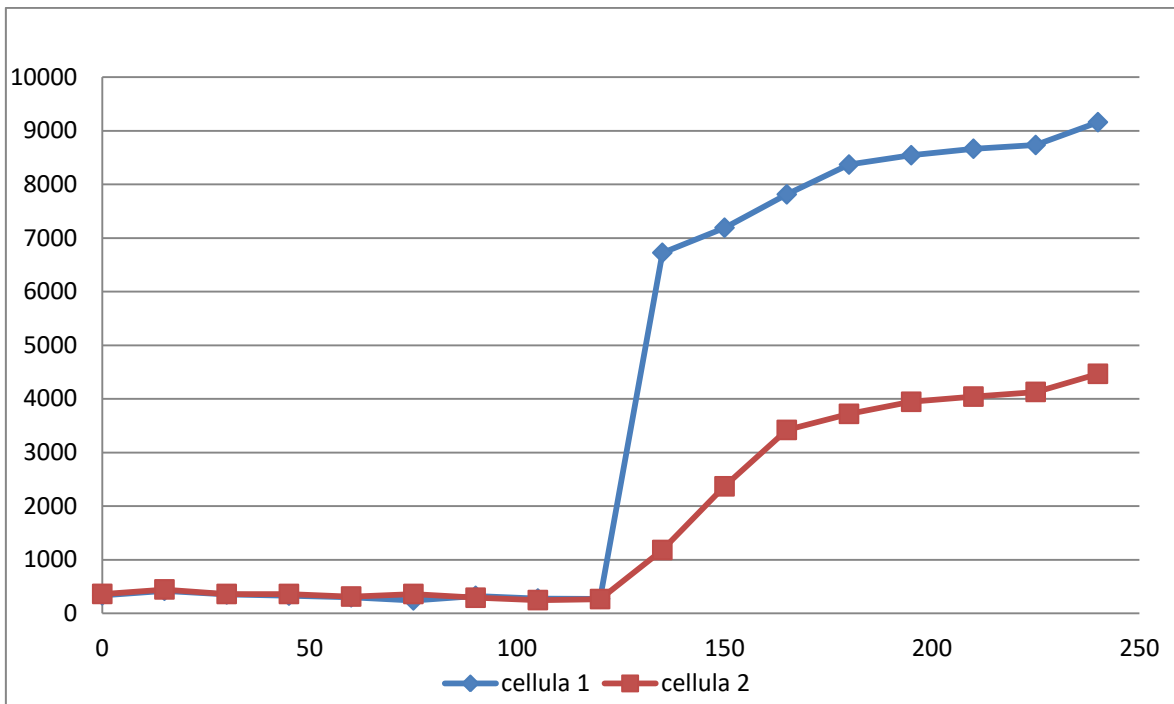


Fig.59. Analisi della concentrazione di doxorubicina in una coppia di cellule; a 120 minuti è stata messa somministrata nel terreno di coltura cellulare la doxorubicina. Sull'asse delle ascisse sono presenti i minuti, sull'asse delle ordinate il valore dell'intensità di fluorescenza.

5. DISCUSSIONE

Nel dimostrare che un campo magnetico statico applicato ad una coltura cellulare influenzi in modo negativo l'ingresso di Doxorubicina nelle cellule, si è proceduto eseguendo rilevazioni che fossero il più possibile riproducibili e significative dal punto di vista qualitativo. Prima dell'acquisizione dei dati è necessario stabilire un protocollo standardizzato; si è proceduto quindi, eseguendo vari tentativi.

Pur avendo come obiettivo l'analisi dell'ingresso del farmaco nelle cellule in un lasso di tempo prolungato, si è iniziato con l'acquisizione di singoli fotogrammi. La quantità di luce fluorescente che colpisce il campione viene ridotta da un particolare filtro di blocco; l'amplificazione del segnale è il principale fattore che l'operatore può variare per ottenere una buona immagine. L'eccessiva amplificazione del segnale crea immagini con un rumore di fondo in grado di alterare le acquisizioni. Si è così proceduto a modificare il setting delle impostazioni, al fine di trovare il giusto grado di amplificazione.

A quel punto si è proceduto con l'esecuzione di analisi prolungate nel tempo. Prima di iniziare le acquisizioni sono state impostate: durata totale della rilevazione e intervalli di tempo tra un'acquisizione e la successiva, numero di campi, grado di amplificazione del segnale. Il numero di campi, ovvero

regioni diverse del pozzetto, sono state selezionate in campo chiaro e scelte per avere rilevazioni il più possibile variegata in termini di morfologia della cellula e posizione all'interno del pozzetto. Per poter effettuare l'esperimento si è proceduto con la messa a fuoco al tempo zero su tutte le cellule dei campi selezionati; una volta avviato l'esperimento, il microscopio ha rilevato in maniera automatica i campi precedentemente salvati, permettendo alla cameretta porta campione di muoversi, per scattare foto a intervalli precisi e ripetuti. In questo modo si è ottenuto un maggior numero di cellule da analizzare; il movimento della piastra non ha provocato molti problemi di stabilità in quanto non è la traslazione XY a provocare problemi di messa a fuoco.

Si è proceduto ad analizzare tutte le possibili variabili che potessero incidere sulla messa a fuoco del campione andando a correggerle. Procedendo per ipotesi tra i fattori si è analizzato:

- La temperatura: variazioni della temperatura sul microscopio appena acceso potrebbero provocare minime dilatazioni sull'asse verticale, causando una perdita del fuoco; per questo motivo il microscopio veniva acceso un paio di ore prima e la temperatura della stanza veniva stabilizzata tramite l'uso di aria condizionata. Nikon conosce le problematiche relative al mantenimento della messa a fuoco; infatti in

commercio è possibile acquistare un sistema chiamato Perfect Focus System (PFS), in grado di mantenere costante il fuoco; questo sistema non è al momento presente sul microscopio.

- Intervallo di tempo tra le acquisizioni: osservando che la perdita del fuoco aumentava man mano nel tempo, si è cercato di ridurre il tempo totale dell'esperimento.
- Metodo di preparazione del campione: tra le nuove ipotesi fatte c'è stata quella di mancata fissazione delle cellule. Infatti utilizzando cellule non fissate, queste posseggono un diverso spessore tra loro. Difficilmente si riusciva a tenere a fuoco tutte le cellule in un determinato campo allo stesso tempo; era compito dell'operatore selezionare un fuoco che fosse il più possibile utile alle rilevazioni. Utilizzando il fissaggio, invece, le cellule vanno incontro a morte ma si va ad uniformare il loro spessore. Questo permette da un lato all'operatore di mettere a fuoco correttamente, mentre dall'altro determina una possibile alterazione della cinetica di ingresso del farmaco.
- Supporto del campione: la selezione dei campi può avvenire in campo in chiaro o in fluorescenza. Poiché la Doxorubicina è un fluorocromo molto labile, non permette l'utilizzo della fluorescenza per la selezione

dei campi a meno di compromettere il farmaco. I campi sono stati scelti in campo chiaro; per aggiungere la doxorubicina si doveva alzare il coperchio del pozzetto, ma così facendo la posizione dei campi si perdeva: per questo è stato necessario l'aggiunta del farmaco dopo la scelta dei campi fatta in campo chiaro, aggiungendolo nel terreno di coltura del campione all'interno della cameretta; per tener fermo il pozzetto, si è utilizzata la colla a caldo; il coperchio restava fisso sul vetrino perché per aggiungere la doxorubicina si è praticato un piccolo forellino su quest'ultimo.

- Intervento manuale dell'operatore: osservata la perdita della messa a fuoco nel tempo, e in mancanza del sistema PFS, si è quindi deciso di aggiustare il fuoco in modo manuale anche tra un intervallo e l'altro, durante l'acquisizione. L'intervento del microscopista in corso di esperimento ha portato all'uso di un fascio di luce fluorescente, aumentando la degradazione chimica del farmaco. Questo risultato è confermato dai dati: negli esperimenti in cui la messa a fuoco è stata fatta anche tra un intervallo e l'altro dall'operatore, i livelli di entrata di Doxorubicina all'interno delle cellule sono stati mediamente più bassi. Dall'altro lato la messa a fuoco manuale ha aumentato molto la

nitidezza delle acquisizioni al punto da divenire una variabile standardizzata e ripetuta negli esperimenti.

Osservando quindi i risultati ottenuti, possiamo affermare che il campo magnetico statico, generato da una calamita al neodimio applicata al vetrino, può influenzare in modo negativo l'entrata della doxorubicina all'interno delle cellule. Nelle prove eseguite il campo magnetico sembra ridurre mediamente l'ingresso della doxorubicina di un 15% / 20% rispetto al campione non trattato; sebbene in letteratura ci siano dati contrastanti circa l'influenza del campo magnetico statico, sembra appurato che quest'ultimo vada a modificare nelle cellule la struttura dei fosfolipidi di membrana e i canali del sodio e del calcio, portando ad un cambiamento dei meccanismi di diffusione passiva e attiva della doxorubicina in un campione di cellule in coltura.

Nelle prove effettuate per valutare nei nostri campioni la presenza di cellule farmaco-resistenti, abbiamo trovato che una cellula su dieci è resistente grazie all'espressione della glicoproteina P; abbiamo dimostrato la sua espressione in alcune cellule utilizzando un suo inibitore, il verapamil, in grado di bloccare la pompa di efflusso del farmaco; infatti nelle cellule sensibili, si è visto un aumento netto dell'ingresso del chemioterapico rispetto alle cellule non sensibili all'inibitore.

Inoltre analizzando in termini assoluti l'intensità di fluorescenza, si osservano negli esperimenti dove il tempo di pre-illuminazione è maggiore ed è presente la messa a fuoco manuale tra un intervallo di tempo e l'altro, dei valori di intensità inferiori, anche del 50%, rispetto ad esperimenti in cui la messa a fuoco manuale non è presente e i tempi di pre-illuminazione ridotti.

Altre osservazioni che sono state fatte osservando i dati ottenuti sono:

- 1) All'interno dello stesso campo preso in considerazione, studiando l'intensità della fluorescenza dovuta all'ingresso della doxorubicina nel nucleo, si riscontra un'ampia variabilità intercellulare;
- 2) Osservando le immagini a nostra disposizione, si può osservare una mancanza di correlazione tra le caratteristiche cellulari, aggregazioni con altre cellule e questa variabilità intercellulare;
- 3) L'ampia variabilità riscontrata tra le varie cellule potrebbe essere dovuta ad una eterogeneità tumorale a livello genetico
- 4) la doxorubicina sembra entrare in modo lineare all'interno del nucleo cellulare e la sua concentrazione aumenta in modo lineare e non esponenziale;
- 5) la doxorubicina è un farmaco utile alla ricerca oncologica, in quanto dotato di naturale fluorescenza, e può essere studiata anche tramite la

microscopia a fluorescenza; tuttavia sembra un fluorocromo piuttosto delicato poiché durante l'osservazione del campione si riscontra il problema del fotobleaching (o photobleaching), con cui si intende la diminuzione della fluorescenza di un campione dovuta alla degradazione fotochimica del fluoroforo.

- 6) I tempi di esposizione utilizzati possono variare tra un esperimento e l'altro; con tempo di esposizione si intende la quantità di tempo in secondi che illuminano il campione prima dello scatto; quantità di tempi di esposizione diversi possono influenzare i valori di intensità rilevati, poiché una maggior irraggiamento del campione porta ad una maggiore degradazione del fluorocromo stesso.

In conclusione, questo studio, seppur preliminare, ha permesso la creazione di un protocollo facilmente riproducibile, utile ad effettuare prove valide nel futuro prossimo.

Ha inoltre evidenziato che un campo magnetico statico influenza in modo negativo l'ingresso della doxorubicina nelle cellule in coltura; maggiori sforzi inoltre dovranno essere svolti per abbattere la chemioresistenza, dimostrata nelle nostre analisi, grazie all'utilizzo del verapamil.

6. BIBLIOGRAFIA

- Abolhoda A.** et al. Rapid activation of MDR1 gene expression in human metastatic sarcoma after in vivo exposure to doxorubicin. *Clin Cancer Res*; 5(11):3352-6 (1999)
- Aoki H** et al. Effects of static magnetic fields on membrane permeability of a cultured cell line *Res Commun Chem Pathol Pharmacol* 1990 Jul;69(1):103-6.
- Ashikawa K.** et al. Evidence that activation of nuclear factor-kB is essential for the cytotoxic effects of doxorubicin and its analogues. *Biochem Pharmacol*; 67(2):353-64 (2004)
- Bao L.** et al. Increased expression of P-glycoprotein is associated with doxorubicin chemoresistance in the metastatic 4T1 breast cancer model. *Am J Pathol*; 178(2):838-52 (2011)
- Basturk O.** et al. A revised classification system and recommendations from the Baltimore consensus meeting for neoplastic precursor lesions in the pancreas. *Am J Surg Pathol* 39: 1730–1741 (2015)
- Bawin, S.** et al R. Effects of modulated VHF fields on the central nervous system. *Ann. NY Acad. Sci.*; 274:74–81; 1975.
- Becker, AE.** Pancreatic ductal adenocarcinoma: Risk factors, screening, and early detection. *World J Gastroenterol* 20, 11182-11198 (2014).
- Berthiaume JM.** et al. Adriamycin-induced oxidative mitochondrial cardiotoxicity. *Cell Biol Toxicol* (2007)
- Bien S.** et al. Nuclear factor-kB mediates up-regulation of cathepsin B by doxorubicin in tumor cells. *Mol. Pharmacol.* (2004)
- Blank M. & Soo L.** (1997) Frequency dependence of Na,K-ATPase function in magnetic fields. *Bioelectrochemistry and Bioenergetics* 42, 231-234
- Box V.** The intercalation of DNA double helices with doxorubicin and nagalomycin. *J Mol Graph Model*; 26(1):14-9 (2007)
- Bram, EE.** et al Chemotherapeutic drug-induced ABCG2 promoter demethylation as a novel mechanism of acquired multidrug resistance. *Neoplasia*;11(12):1359-70 (2009)
- Bryant KL.** et al. KRAS. Feeding pancreatic cancer proliferation. *Trends Biochem Sci.* 39(2):91–100 (2014).

- Bulle A.** et al. Relevance of the stroma in pancreatic ductal adenocarcinoma and its challenges for translational research. *J Cancer Treatment Diagn.* (2017)
- Carvalho C.** et al. Doxorubicin: The Good, the Bad and the Ugly Effect. *Curr Med Chem*;16(25):3267-85 (2009)
- Childs AC.** et al. Doxorubicin treatment in vivo causes cytochrome C release and cardiomyocyte apoptosis, as well as increased mitochondrial efficiency, superoxide dismutase activity, and Bcl-2:Bax ratio. *Cancer Res*; 62(16):4592-8 (2002)
- Cilluffo D.** et al. P14ARF: The Absence that Makes the Difference. *Genes* 11(7):824 (2020)
- Clapham D** Intracellular calcium. Replenishing the stores. *Nature*; 375(6533):634-5 (1995)
- Coulton LA** et al. The effect of static magnetic fields on the rate of calcium/calmodulin-dependent phosphorylation of myosin light chain. *Bioelectromagnetics* 21, 189-196 (2000)
- Cutts S.** et al. Adriamycin-induced DNA adducts inhibit the DNA interactions of transcription factors and RNA polymerase. *J Biol Chem*, (1996)
- Danesi R.** et al. Pharmacokinetic pharmacodynamic relationships of the anthracycline anticancer drugs. *Clin Pharmacokinet*;41(6):431-44 (2002)
- De Monte L.** et al. Intratumor T helper type 2 cell infiltrate correlates with cancer-associated fibroblast thymic stromal lymphopoietin production and reduced survival in pancreatic cancer. *J Exp Med*;208(3):469-78 (2011)
- Debatin KM.** et al. Death receptors in chemotherapy and cancer *Oncogene*, 23 (2004).
- Deer EL.** et al. Phenotype and genotype of pancreatic cancer cell lines. *Pancreas*; 39(4):425-35 (2010)
- Dini L.** et al. Bioeffects of moderate-intensity static magnetic fields on cell cultures. *Micron*;36(3):195-217 (2005)
- Fletcher JI.** et al. ABC transporters as mediators of drug resistance and contributors to cancer cell biology. *Drug Resist Updat*; 26:1-9 (2016)
- Fokas E.** et al. Pancreatic ductal adenocarcinoma: From genetics to biology to radiobiology to oncoimmunology and all the way back to the clinic. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Cancer* 1855, 61-82 (2015).

- Genovese I.** et al. Not only P-glycoprotein: Amplification of the ABCB1-containing chromosome region 7q21 confers multidrug resistance upon cancer cells by coordinated overexpression of an assortment of resistance-related proteins. *Drug Resist Updat.*; 32:23-46 (2017)
- Goggins M.** et al. BRCA2 Is Inactivated Late in the Development of Pancreatic Intraepithelial Neoplasia: evidence and implications. *Am J Pathol*;156(5):1767-71 (2000)
- Goormaghtigh E.** et al. Structure of the adriamycin-cardiolipin complex: role in mitochondrial toxicity. *Biophys. Chem.* (1990)
- Gray R** et al In vivo enhancement of chemotherapy with static electric or magnetic fields *Bioelectromagnetics* 2000 Dec;21(8):575-83.
- Greer JB** et al. Inflammation and pancreatic cancer: an evidence-based review. *Curr Opin Pharmacol* Aug;9(4):411-8. (2009)
- Helmchen F.** et al. Deep tissue two-photon microscopy. *Nat Methods*; 2(12):932-40 (2005)
- Henkels K.** et al. Cisplatin-induced apoptosis proceeds by caspase-3-dependent and -independent pathways in cisplatin-resistant and -sensitive human ovarian cancer cell lines. *Cancer Res*; 59(13):3077-8 (1999)
- Hortobagyi G.** Anthracyclines in the treatment of cancer: an overview. *Drugs*; 54 Suppl 4:1-7. (1997)
- Hruban RH.** et al. Progression Model for Pancreatic Cancer. *Clinical Cancer Research* 6, 2969-2972 (2000)
- Husain Z.** et al. Tumor-derived lactate modifies antitumor immune response: effect on myeloid-derived suppressor cells and NK cells. *J Immunol*; 191(3):1486-95 (2013)
- Ifergan I.** et al. Novel extracellular vesicles mediate an ABCG2-dependent anticancer drug sequestration and resistance. *Cancer Res.*; 65(23):10952-8 (2005)
- Jacobs, EJ.** et al. Family history of cancer and risk of Pancreatic Cancer: A Pooled Analysis from the Pancreatic Cancer Cohort Consortium (PanScan). *International journal of cancer. Journal international du cancer* 127, 1421-1428 (2010).
- Jiang Y.** et al. FOXP3+ Lymphocyte Density in Pancreatic Cancer Correlates with Lymph Node Metastasis. *PLoS One*;9(9):e106741 (2014)

- Julka P.** et al. A phase II study of sequential neoadjuvant gemcitabine plus doxorubicin followed by gemcitabine plus cisplatin in patients with operable breast cancer: prediction of response using molecular profiling. *Br J Cancer*; 98(8):1327-35. (2008)
- Karwatsky J.** et al. A mechanism for P-glycoprotein-mediated apoptosis as revealed by verapamil hypersensitivity. *Biochemistry*; 42(42):12163-73 (2003)
- Kiyomiya K.** et al. Mechanism of specific nuclear transport of adriamycin: the mode of nuclear translocation of adriamycin-proteasome complex. *Cancer Res.*, (2001)
- Koch B** Interaction Between Weak Low Frequency Magnetic Fields and Cell Membranes *Bioelectromagnetics* 24:395-402 (2003)
- Koorstra JBM.** et al, Pancreatic Carcinogenesis. *Pancreatology*; 8(2):110-25 (2008)
- Laberge RM.** et al. P-glycoprotein (ABCB1) modulates collateral sensitivity of a multidrug resistant cell line to verapamil. *Arch Biochem Biophys*; 491(1-2):53-60 (2009)
- Landi, S.** Genetic predisposition and environmental risk factors to pancreatic cancer: A review of the literature. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research* 681, 299-307 (2009).
- LaRusch J.** et al. Genetics of pancreatitis. *Current Opinion in Gastroenterology* 27, 467-474 (2011)
- Lefrak EA.** et al. A clinicopathologic analysis of adriamycin cardiotoxicity. *Cancer*; 32(2):302-14 (1973)
- Li W.** et al. Overcoming ABC transporter-mediated multidrug resistance: Molecular mechanisms and novel therapeutic drug strategies. *Drug Resist Updat*; 27:14-29 (2016)
- Lim, W** et al. Relative frequency and morphology of cancers in STK11 mutation carriers. *Gastroenterology* 126, 1788-1794 (2004).
- Lisanti MP.** et al. Oncogenes induce the cancer-associated fibroblast phenotype. *Cell Cycle*; 12(17):2723-32 (2013)
- Lindstrom E.** et al Intracellular Calcium oscillations in a Tcell line after exposure to extremely-low-frequency magnetic fields with variable frequencies and flux densities. *Bioelectromagnetics* 16, 41-47 (1995)
- Liu J.** et al. Quality of life analyses in a clinical trial of DPPE (tesmilifene) plus doxorubicin versus doxorubicin in patients with advanced or metastatic breast cancer: NCIC CTG Trial MA.19. *Breast Cancer Res Treat*;100(3):263-71 (2006)

- Lopucki M.** et al. The effect of oscillating low intensity magnetic field on the Na⁺ , K⁺ , Ca⁺⁺, and Mg⁺⁺ concentrations in the maternal and fetal circulation of the dually perfused human placental cotyledon. *Bioelectromagnetics* 25, 329-337 (2004)
- Maisonneuve P.** et al. Risk factors for pancreatic cancer: a summary review of meta-analytical studies. *International Journal of Epidemiology* (2014)
- Maitra A.** et al. Molecular pathogenesis of pancreatic cancer. *Best Pract. Res. Clin. Gastroenterol.* 20, 211–226 (2006)
- Maitra A.** et al. Pancreatic Cancer. *Annu Rev Pathol*; 3:157-88 (2008)
- Mancuso A.** et al. Correlation between anemia and functional/cognitive capacity in elderly lung cancer patients treated with chemotherapy. *Ann Oncol*;17(1):146-50 (2006)
- Marycz K** et al Static Magnetic Field (SMF) as a Regulator of Stem Cell Fate – New Perspectives in Regenerative Medicine Arising from an Underestimated Tool *Stem Cell Rev.* 2018; 14(6): 785–792.
- McEvoy, G.K.** Ed. American Hospital Formulary Service - Drug Information 95. Inc., Bethesda, MD: Americ. Soc. of Hosp. Pharmac., 1995
- Nieminen V.** et al Static or 50 Hz magnetic fields at 100 μ T do not modify the clonogenic survival of doxorubicin-treated MCF-7 cancer cells. *Bioelectrochemistry* 2022 Oct;147:108196
- Nohl H.** A novel superoxide radical generator in heart mitochondria. *FEBS Lett.*, (1987)
- Polyak K.** et al. A model for p53-induced apoptosis. *Nature*; 389(6648):300-5 (1997)
- Quazi F.** et al. ABCA4 is an N-retinylidene-phosphatidylethanolamine and phosphatidylethanolamine importer. *Nat Commun*; 3:925 (2012)
- Romeo S.** et al. Lack of effects on key cellular parameters of MRC-5 human lung fibroblasts exposed to 370 mT static magnetic field. *Sci Rep*;6:19398 (2016)
- Ryan DP** et al. Pancreatic Adenocarcinoma. *New England Journal of Medicine* 371, 1039-1049 (2014).
- Schinkel A.** et al. Disruption of the mouse *mdr1a* P-glycoprotein gene leads to a deficiency in the blood-brain barrier and to increased sensitivity to drugs. *Cell*; 77(4):491-502 (1997)
- Schneider G.** et al. Genetic alterations in pancreatic carcinoma. *Mol Cancer.* 2:15 (2003)
- Serpensu EH.** & **Tsong TY.** (1984) Activation of electrogenic Rb⁺ transport of (Na,k)-ATPase by an electric field. *Journal of Biology and Chemistry* 259, 7155-7162

- Shibue T.** et al. EMT, CSCs, and drug resistance: the mechanistic link and clinical implications. *Nat Rev Clin Oncol*;14(10):611-629 (2017)
- Singal PK.** et al. Adriamycin cardiomyopathy: pathophysiology and prevention. *FASEB J*;11(12):931-6 (1997)
- Sipos B.** et al. Pancreatic intraepithelial neoplasia revisited and updated. *Pancreatology* 9: 45–54. (2009)
- Sun Q.** et al. The impact of cancer-associated fibroblasts on major hallmarks of pancreatic cancer. *Theranostics* 8(18):5072-5087 (2018)
- Swift L.** et al. Doxorubicin-DNA adducts induce a non-topoisomerase II mediated form of cell death. *Cancer Res*; 66(9):4863-71 (2006)
- Tewey K.** et al. Adriamycin-induced DNA damage mediated by mammalian DNA topoisomerase II. *Science*; 226(4673):466-8 (1984)
- van Acker SA.** et al. Doxorubicin-induced cardiotoxicity monitored by ECG in freely moving mice. A new model to test potential protectors. *Cancer Chemother Pharmacol*; 38(1):95-101 (1996)
- van Asperen J.** et al. Comparative Pharmacokinetics of Vinblastine after a 96-Hour Continuous Infusion in Wild-Type Mice and Mice Lacking *mdr1a* P-Glycoprotein. *J Pharmacol Exp Ther*; 289(1):329-33 (1999)
- von Hoff DD.** et al. Risk factors for doxorubicin-induced congestive heart failure. *Ann Intern Med*; 91(5):710-7 (1979)
- Xu A** et al Progressive Study on the Non-thermal Effects of Magnetic Field Therapy in Oncology 2011
- Weiss FU.** Pancreatic cancer risk in hereditary pancreatitis. *Frontiers in Physiology* 5 (2014).
- Wey HE.** et al 50 Hertz mmagnetic field and calcium transients in Jurkat cells: results of a research and public information dissemination (RAPID) program study. *Environmental Health Perspectives* 108, 135-140 (2000)
- Winer E** et al. Malignant tumors of the breast. *Cancer Princ Pract Oncol* (2001)
- Wu YS.** et al. Paracrine IL-6 signaling mediates the effects of pancreatic stellate cells on epithelial-mesenchymal transition via Stat3/Nrf2 pathway in pancreatic cancer cells. *Biochimica et Biophysica Acta* (2017)

- Yan** Li et al Low strength static magnetic field inhibits the proliferation, migration, and adhesion of human vascular smooth muscle cells in a restenosis model through mediating integrins β 1-FAK, Ca^{2+} signaling pathway Ann Biomed Eng. 2012 Dec;40(12):2611-8.
- Ying** H, et al. Genetics and biology of pancreatic ductal adenocarcinoma. Genes & Development. Feb 15;30(4):355-85. (2016)
- Ying** Liu et al. An investigation into the combined effect of static magnetic fields and different anticancer drugs on K562 cell membranes 2011 May-Jun;97(3):386-92.
- Zhang** Y et al. CD4+ T Lymphocyte Ablation Prevents Pancreatic Carcinogenesis in Mice. Cancer Immunol Res;2(5):423-35 (2014)
- Zinselmeyer** BD et al. Two-photon microscopy and multidimensional analysis of cell dynamics. Methods Enzymol; 461:349-78 (2009)

7. RINGRAZIAMENTI

Giunto al termine di questo lungo percorso, mi sento in dovere di ringraziare innanzitutto i miei genitori, che mi hanno sempre supportato e spronato a dare il massimo, in ogni situazione.

Ringrazio inoltre la mia fidanzata, Isabella, perché è stata sempre al mio fianco, perché non mi ha mai permesso di mollare, perché è stata la mia forza in ogni momento; grazie, perché ogni giorno mi sproni ad essere una persona migliore e sei sempre pronta a risollevarmi il morale; sono fortunato ad averti con me, perché sei la persona più bella che conosco, non dimenticarlo mai.

Ringrazio inoltre il Professor Piva, che mi ha concesso il privilegio di lavorare con Lui e col suo gruppo di lavoro, grazie per avermi mostrato la passione con cui ogni giorno si dedica al suo lavoro di ricerca, è stato molto bello esserne testimone; un grazie speciale va inoltre alla Dottoressa Monia Cecati e al Dottor Matteo Giulietti, fonti di insegnamenti e fondamentali per il mio percorso di crescita; è stato davvero un piacere lavorare con voi, mi avete accolto subito con la vostra simpatia e con la vostra gentilezza.

Ringrazio infine tutti i miei amici, perché mi avete fatto sentire meno solo; in tanti momenti sia belli sia da dimenticare, ho sempre potuto contare su di voi; il legame che ci lega è qualcosa che so non sarà facile spezzare nel tempo.

