UNIVERSITÀ POLITECNICA DELLE MARCHE

DIPARTIMENTO SCIENZE DELLA VITA E DELL'AMBIENTE

Corso di Laurea Magistrale in Biologia Molecolare e Applicata

Valutazione mediante Microspettroscopia FTIR della efficacia del cisplatino sulla linea cellulare MDA-MB-231 dopo il silenziamento del gene PON2: nuove prospettive per il trattamento del carcinoma mammario triplo negativo

Cisplatin sensitivity on MDA-MB-231 cell line after PON2 silencing: new evidence on triple negative breast cancer therapy by FTIR Microspectroscopy

Tesi di Laurea Magistrale di:

Giuseppina Barrasso

Relatore Chiar.ma Prof.ssa:

Elisabetta Giorgini

Correlatore:

Dott. **Roberto Campagna**

Sessione Autunnale

Anno Accademico 2023/2024

INDICE

1. Introduzione

1.1 Lesioni neoplastiche della mammella……..…….....1

1.1.1 Patogenesi.....…….……...…….....3

1.1.2 Stadiazione……..6

1.1.3 Epidemiologia e fattori di rischio.……...9

1.1.4 Classificazione istologica del carcinoma della mammella.…...11

1.1.5 Classificazione molecolare del carcinoma della mammella.….12

1.2 Carcinoma della mammella triplo negativo (TNBC)…….....13

1.2.1 Epidemiologia ……..13

1.2.2 Problematiche associate al TNBC……...…….14

1.1.1 Classificazione dei TNBC.……...15

1.2 Trattamento terapeutico……...……..16

1.2.1 Cisplatino…….19

1.3 Il ruolo della Paraoxonasi-2 (PON2) e chemioresistenza…...….....22

1.3.1 Silenziamento del gene PON2…….....25

1.4 Interazione fra la materia e la radiazione elettromagnetica: potenzialità e applicazioni ……...…….28

1.4.1 Radiazione elettromagnetica ……28

1.4.2 Spettroscopia Infrarossa……31

1.4.3 Strumentazione e acquisizione di uno spettro IR……..35

1.4.4 Interpretazione dello spettro IR di sistemi biologici…….……38

1.4.5 Analisi FTIR Imaging di campioni biologici……40

2. Scopo della tesi…….48

3. Materiali e metodi

3.1 Preparazione delle colture cellulari e trattamento con cisplatino…...50

3.2 MTT assay…….....51

3.3 Preparazione dei campioni cellulari per analisi FTIRM…...….....52

3.4 Acquisizione spettri IR e trattamento dati……...….....54

3.5 Analisi multivariata dei dati spettrali…….56

3.6 Analisi univariata dei dati spettrali……...…….57

3.7 Analisi statistica dei dati spettrali …….60

4. Risultati

4.1 Analisi dell'MTT assay …….....61

4.2 Analisi del profilo spettrale delle cellule del gruppo di controllo: identificazione dei principali picchi IR ……...….....63

4.3 Analisi multivariata delle diverse popolazioni cellulari: valutazione delle modificazioni spettrali a seguito del silenziamento e del trattamento chemioterapico…….....68

4.4 Analisi univariata dei dati spettrali: valutazione delle modificazioni nella composizione macromolecolare…….....75

5. Discussione……....82

6. Conclusioni…….....90

7. Bibliografia …….....92

8. Ringraziamenti ……....103

1. INTRODUZIONE

1.1 Lesioni neoplastiche della mammella

Il carcinoma della mammella è una neoplasia maligna che scaturisce dalla proliferazione incontrollata delle cellule epiteliali della mammella.

Il carcinoma della mammella è definito come una malattia eterogenea con specifiche e variegate caratteristiche istologiche e biologiche dovute a diverse mutazioni genetiche, epigenetiche e trascrittomiche, che si riflettono sulla variabilità dei risultati clinici e influenzano la diagnosi, il trattamento terapeutico e la prognosi stessa (Eliyatkin et al., 2015).

Per comprendere meglio le principali caratteristiche clinico-patologiche del carcinoma mammario, è necessario approfondire alcuni aspetti relativi all'anatomia della mammella (Fig. 1.1).

Il seno è lo spazio della parete toracica anteriore nella regione pettorale, tra la terza e la sesta costola in senso verticale e tra la linea parasternale e l'ascella anteriore in senso orizzontale che ospita, nella tela sottocutanea, due ghiandole tubulo-alveolari composte, dette ghiandole mammarie.

Le ghiandole mammarie sono ghiandole esocrine formate da 15-18 lobi che si dividono in lobuli e che sono raggruppati a grappoli come acini di uva.

Ogni lobo sfocia verso il capezzolo mediante un dotto (dotto galattoforo).

Le ghiandole sono inserite ed immerse in una componente adiposa; a questo livello è anche presente una componente fibrosa di sostegno. La struttura così costituita prende il nome di mammella femminile.

Presso l'apice della mammella si trova il capezzolo che è una sporgenza esterna a forma conica e che nella regione apicale presenta dei pori (pori lattiferi) che costituiscono lo sbocco dei dotti galattofori.

Il capezzolo è circondato dall'areola, una regione pigmentata che presenta piccole sporgenze (tubercoli di Montgomery), dovute alla presenza sottostante di ghiandole sebacee.

Il capezzolo e l'areola sono dotati di fibre muscolari lisce che si organizzano a formare i muscoli areolari le cui contrazioni generano l'erezione del capezzolo nonché la contrazione dei dotti galattofori. Questo permette al neonato di nutrirsi nel periodo dell'allattamento (Atlas of Breast Surgery).

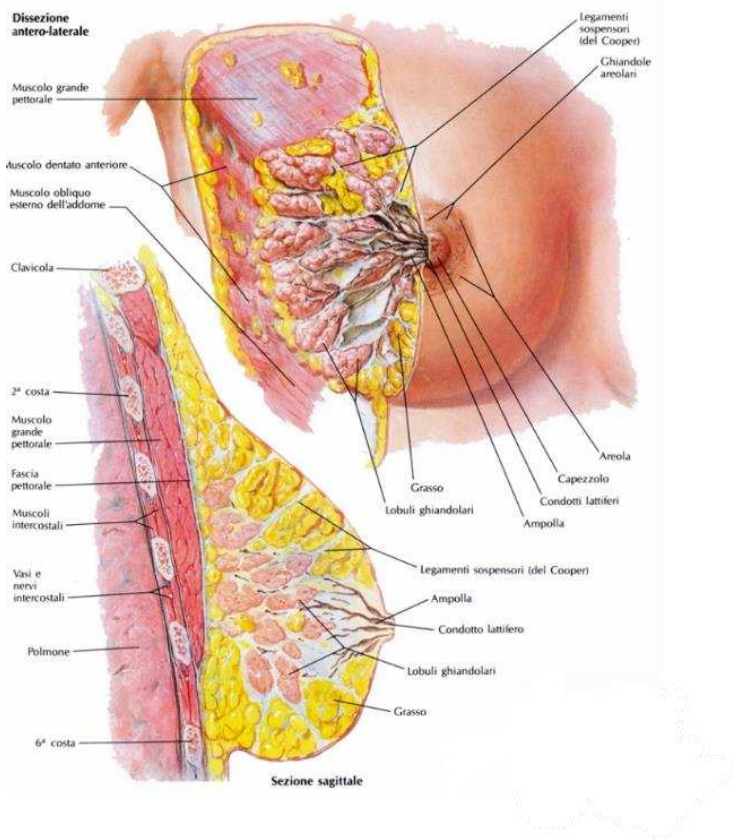


Figura 1.1: Anatomia della mammella. (https://medicinaonline.co/2017/11/02/mammella-anatomia-e-funzioni-del-seno-e-delle-ghiandole-mammarie/).

1.1.1 Patogenesi

Il carcinoma mammario solitamente inizia con iperproliferazione duttale che porta allo sviluppo di tumori benigni o di carcinomi metastatici con costante stimolazione di fattori cancerogeni. Lo stroma ed i macrofagi svolgono un ruolo vitale nell'inizio e nella progressione del carcinoma mammario. Infatti, è stato dimostrato che la sola esposizione dello stroma ad agenti cancerogeni è potenzialmente in grado di indurre la formazione di neoplasie (Yi-Sheng Sun et al., 2017).

I macrofagi possono generare un microambiente infiammatorio che favorisce le mutazioni e che può promuovere l'angiogenesi e permettere alle cellule tumorali di sfuggire all'azione del Sistema Immunitario. Sono stati poi osservati anche diversi modelli di metilazione tra il microambiente normale e quello associato al tumore, indicando che modificazioni epigenetiche possono promuovere la cancerogenesi.

Ad oggi, le teorie maggiormente accreditate riguardanti la tumorigenesi sono due: la teoria stocastica e la teoria delle cellule staminali tumorali (Figura 1.2). Secondo il modello stocastico ogni popolazione cellulare tumorale ha la stessa, seppur bassa, probabilità di rigenerare il tumore in seguito all'accumulo progressivo di mutazioni. Secondo la teoria delle cellule staminali tumorali, solamente una piccola sottopopolazione di cellule staminali tumorali adulte (CST) è in grado di innescare e sostenere la crescita della neoplasia. Le CST possiedono la capacità di ricreare l'eterogeneità tumorale, grazie alla loro elevata plasticità che gli consente di dare origine a tutte le differenti popolazioni cellulari del tumore (Yi-Sheng Sun, 2017). Sebbene queste due teorie siano supportate da numerosi dati, nessuna delle due è confermata (Yi-Sheng Sun, 2017).

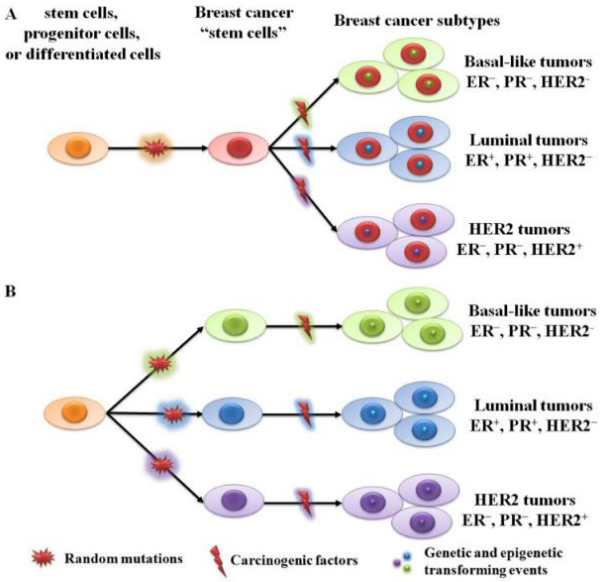


Figura 1.2: Teorie sulla patogenesi del cancro; (A) teoria delle cellule staminali tumorali (B) teoria stocastica (Yi-Sheng Sun, 2017).

Studi genetici hanno mostrato che le mutazioni di alcuni geni sono responsabili dell'insorgenza del carcinoma della mammella. Ad esempio, i geni BRCA1 e BRCA2 sono due oncosoppressori che codificano per proteine che intervengono nel controllo del ciclo cellulare e sono coinvolti nella riparazione del DNA. Mutazioni a carico dei geni BRCA1\BRCA2 determinano la perdita del controllo del ciclo cellulare, e pertanto predispongono all'insorgenza del carcinoma della mammella. In particolare, le donne che portano una mutazione del gene BRCA1 presentano un rischio di ammalarsi di carcinoma della mammella pari al 65% mentre, le donne portatrici della mutazione del gene BRCA2, pari al 40% (Yi-Sheng Sun, 2017).

HER2, il recettore del fattore di crescita epidermico umano (EGFR), è un oncogene importante nel carcinoma della mammella. La overespressione di

HER2, rilevata in circa il 20% dei casi di carcinoma della mammella, aumenta il numero di cellule staminali tumorali (Freudenberg et al., 2009). L'overespressione dell'EGFR, il fattore di crescita epidermico, è stata riportata in oltre il 30% dei casi di carcinoma infiammatorio della mammella; i pazienti con EGFR+ hanno prognosi peggiore rispetto ai pazienti EGFR-. Più della metà dei casi di TNBC, carcinoma della mammella triplo negativo, è caratterizzato da una overespressione dell'EGFR (Ali et al., 2017).

1.1.2 Stadiazione

La stadiazione del carcinoma della mammella è un sistema utilizzato dai medici per valutare l'estensione del tumore e la sua eventuale diffusione ai linfonodi e la presenza di metastasi a distanza.

La stadiazione del carcinoma della mammella è determinata sia clinicamente che istologicamente valutando diversi parametri.

Il carcinoma della mammella è classificato mediante il sistema di classificazione TNM della American Joint Committee on Cancer, che raggruppa i pazienti in 5 categorie, descritti in ordine di grandezza come stadio 0, I, II, III, IV (tabella 1), in base alla dimensione del tumore primario, allo stato dei linfonodi della regione coinvolta e alla presenza di metastasi a distanza (Manon et al., 2024).

- Stadio 0: la malattia risulta presente solo nei dotti o nei lobuli del seno, non risulta diffusa ai tessuti circostanti e prende il nome di cancro non invasivo come il carcinoma duttale *in situ* e carcinoma lobulare *in situ*.
- Stadio I: è uno stadio precoce di carcinoma della mammella invasivo. Esistono due tipi cancro di stadio I: stadio IA e stadio IB. L'IA descrive un tumore piccolo con dimensione inferiore a 2 cm di diametro e non è diffuso ai linfonodi ascellari. Lo stadio IB può essere descritto come un tumore non presente nel seno o di dimensioni inferiori a 2 cm e diffuso ai linfonodi.
- Stadio II: è un carcinoma della mammella di tipo invasivo, suddiviso in due sottotipi, il IIA, in cui il tumore ha dimensioni comprese tra 2-5 cm e non si è diffuso ai linfonodi ascellari oppure è un tumore di piccole dimensioni diffuso a 1-2 linfonodi ascellari, e il IIB, dove il tumore misura da 2 a 5 cm e la malattia è diffusa a 1-3 linfonodi ascellari oppure il tumore è più grande di 5 cm ma non si è diffuso ai linfonodi ascellari.
- Stadio III: descrive anche in questo caso carcinoma della mammella invasivo. Viene suddiviso in 3 tipi: lo stadio IIIA descrive un tumore di qualsiasi dimensione che si è diffuso a 4-9 linfonodi; lo stadio IIIB indica che il tumore si è diffuso alla parete toracica ed interessa fino a 9 linfonodi;

lo stadio IIIC è un tumore di diversa dimensione e diffuso a più di 10 linfonodi.

- Stadio IV: è un tumore metastatico e indica la diffusione del cancro a diversi organi e tessuti.

Riassumendo, lo stadio 0 indica un carcinoma duttale in situ (DCIS) non invasivo; gli stadi I, IIA, IIB si riferiscono al cancro invasivo precoce mentre gli stadi IIIA, IIIB e IIIC riguardano la malattia localmente avanzata; infine, lo stadio IV indica il tumore metastatizzato (Manon et al., 2024).

Tabella 1: Stadiazione del carcinoma della mammella.	
CARCINOMA DELLA MAMMELLA LOCALMENTE DELIMITATO (FASE INIZIALE)	
STADIO I	Il tumore ha una dimensione inferiore a 2cm ed è circoscritto alla ghiandola mammaria.
STADIO IIA	Il tumore ha coinvolto da uno a tre linfonodi regionali ascellari.
CARCINOMA DELLA MAMMELLA LOCALMENTE AVANZATO (FASE INIZIALE)	
STADIO IIB	Il tumore ha una dimensione compresa tra i 2cm ed i 5cm e spesso presenta già un coinvolgimento dei linfonodi
STADIO III	Coinvolgimento dei linfonodi ma non ci sono metastasi a distanza in altri organi.
CARCINOMA DELLA MAMMELLA METASTATICO (FASE AVANZATA)	
STADIO IV	Il tumore si è diffuso ad altri organi.

1.1.3 Epidemiologia e fattori di rischio

Nel mondo, il carcinoma della mammella è la neoplasia più diagnosticata tra le donne. Con cadenza annuale, l'American Cancer Society fa una stima dei nuovi casi di cancro e di morte per cancro all'anno negli Stati Uniti. Nel 2024 si stima l'insorgenza di 313510 nuovi casi, di cui 2790 nell'uomo e 310720 nella donna con un'incidenza di morte pari a 427780 persone di cui 530 uomini e 42250 donne (Siegel et al., 2024). Per quanto riguarda l'Europa si stimano circa 464000 nuovi casi, di cui 56000 si registrano in Italia.

Sono stati identificati alcuni fattori di rischio per l'insorgenza del carcinoma della mammella: età, storia familiare, fattori riproduttivi, estrogeni e stile di vita. L'incidenza del carcinoma della mammella è fortemente correlata all'avanzamento dell'età; è necessario, per questa ragione, sottoporsi a screening mammografico nelle donne di età pari o superiore a 40 anni.

Circa un quarto di tutti i casi di carcinoma della mammella è legato alla storia familiare: donne le cui mamme, ad esempio, hanno avuto una diagnosi di carcinoma della mammella sono geneticamente predisposte a questa malattia.

Nell'insorgenza del carcinoma della mammella influiscono anche i fattori riproduttivi come il menarca precoce, la menopausa tardiva o l'età avanzata alla prima gravidanza. Ogni ritardo di un anno nella menopausa aumenta il rischio di carcinoma della mammella del 3%; ogni ritardo di un anno nel

menarca o ogni parto aggiuntivo diminuisce il rischio di neoplasia rispettivamente del 5-10%. Sia gli estrogeni endogeni che quelli esogeni sono associati al rischio di sviluppare un carcinoma della mammella (Fig 1.3).

Il consumo di alcol, fumo ed una dieta ricca di grassi sono anch'essi fattori di rischio per lo sviluppo del carcinoma della mammella. Studi epidemiologici indicano che un'assunzione di 35-44 grammi di alcol al giorno può aumentare il rischio di carcinoma della mammella del 32%. L'assunzione eccessiva di grassi, soprattutto quelli saturi è associata a mortalità e prognosi sfavorevole nelle pazienti affette da carcinoma della mammella.



Fig 1.3: Fattori di rischio per il carcinoma della mammella. (https://stock.adobe.com/images/sintomi-e-fattori-di-rischio-del-cancro-al-seno/65098410).

1.1.4 Classificazione istologica del carcinoma della mammella

Tradizionalmente il carcinoma della mammella viene suddiviso in carcinoma duttale invasivo aspecifico che corrisponde a circa il 60-75% di tutte le neoplasie, e carcinoma duttale invasivo specifico il quale corrisponde al 20-25% dei casi. I più comuni tra i carcinomi specifici sono il carcinoma lobulare, quello cribroso, quello tubulare, quello papillare e quello mucinoso. Questa classificazione istologica è largamente accettata in ambito clinico e si riferisce all'osservazione del grado di differenziazione del tumore, quindi alla formazione di lobuli, al pleomorfismo, al grado nucleare ed alla proliferazione cellulare intesa come tasso di mitosi. La valutazione istologica è una valutazione di tipo semiquantitativo (Figura 1.4) (Eliyatkin et al.,2015).

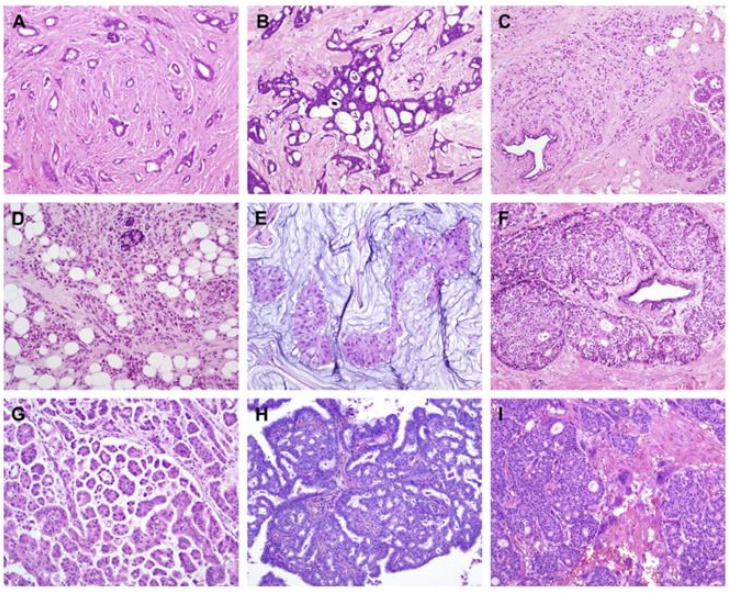


Figura 1.4: Tipi istologici di carcinoma della mammella: (A) carcinoma tubulare, (B) carcinoma cribriforme, (C) carcinoma lobulare invasivo classico, (D) carcinoma lobulare invasivo pleomorfo, (E) carcinoma mucinoso, (F) carcinoma neuroendocrino, (G) carcinoma micropapillare, (H) carcinoma papillare, (I) carcinoma duttale invasivo (Weigelt et al., 2010).

1.1.5 Classificazione molecolare del carcinoma della mammella

In uno studio di Perou (Perou et al., 2000), gli autori hanno eseguito analisi microarray di cDNA di 38 campioni di carcinoma della mammella invasivo identificando un elenco di geni "intrinseci".

L'analisi gerarchica dei cluster a partire dall'analisi dei geni intrinseci ha permesso di classificare i carcinomi della mammella in:

- positivi al recettore degli estrogeni (ER-positivi),
- negativi al recettore degli estrogeni (ER-negativi).

Lo studio ha messo in evidenza l'esistenza di quattro sottotipi molecolari di carcinoma della mammella, definiti in base allo stato del loro recettore ormonale (HR) e all'espressione del gene HER2:

- Luminal A (HR^+ / HER2),
- Luminal B (HR^+ / $HER2^+$),
- HER2-arricchito (HR^- / $HER2^+$)
- Triplo negativo (HR^- / $HER2^-$).

I diversi sottotipi molecolari sono risultati associati a esiti clinici distinti (Weigelt et al., 2010).

1.2 Carcinoma della mammella triplo negativo (TNBC)

Il TNBC è un sottotipo di carcinoma della mammella che, in base all'analisi immunoistochimica, risulta essere negativo per il recettore degli estrogeni (ER), per il recettore del progesterone (PR) e per il recettore del fattore di crescita epidermico umano 2 (HER2). A causa della mancanza di terapie adeguate, il TNBC è caratterizzato da una elevata aggressività, associata ad un pathway molecolare molto particolare e a distinti schemi metastatici.

1.2.1 Epidemiologia

Si stima che, tra i casi di carcinoma della mammella in tutto il mondo, circa 170.000 appartengano al sottotipo molecolare triplo negativo (TNBC) (Zagami et al., 2022). Studi su larga scala hanno mostrato che il TNBC ha più probabilità di verificarsi nelle donne in pre-menopausa di origine afroamericana (Aysola et al., 2013).

Il "Carolina Breast Cancer Study" ha evidenziato che rispetto ai tumori del tipo Luminal A, i tumori del tipo basale hanno una probabilità statisticamente più elevata di svilupparsi nelle donne con menarca precoce, gravidanza in età giovane, durata breve dell'allattamento al seno ed indice di massa corporea maggiore.

Un altro studio condotto da Bauer et al. ha riscontrato che le donne più giovani, non di colore ed ispaniche, con diagnosi di TNBC avevano tumori più aggressivi e sopravvivenza più scarsa indipendentemente dallo stadio del tumore. Inoltre, le donne bianche con TNBC in stadio avanzato avevano sopravvivenza più scarsa di tutti i gruppi considerati (Aysola et al., 2013)

1.2.2 Problematiche associate al TNBC

Studi di popolazione hanno evidenziato che le donne che hanno superato la malattia, hanno maggiore probabilità di recidive a distanza e maggiore probabilità di morte rispetto alle donne affette da un carcinoma della mammella non triplo negativo. Le recidive più aggressive interesserebbero i visceri e i tessuti molli e sono anche le più comuni a differenza delle recidive a livello osseo che risultano essere più rare. In una serie di oltre 3.000 pazienti con metastasi celebrali derivanti dal cancro al seno trattati dal 1989 al 2006, l'analisi multivariata ha mostrato che lo status di triplo negativo era il più forte fattore di rischio per lo sviluppo di metastasi celebrali (superiore a quello dello status di $HER2^{+}$).

1.2.3 Classificazione dei TNBC

Due studi recenti hanno classificato i carcinomi del tipo triplo negativo in base al raggruppamento di geni che sono up e down-regolati.

Lehmann et al. hanno descritto e testato la risposta chemioterapica in sei sottotipi di TNBC (Lehmann et al., 2011).

I sottotipi di TNBC sono:

- 2 tipi di basal-like: basal 1 (BL1) e basal 2 (BL2);
- immunomodulatorio (IM);
- mesenchimale (M);
- mesenchimale staminale (MSL);
- recettore androgeno luminare (LAR), ovvero con recettore per androgeni.

I diversi sottotipi di TNBC sono caratterizzati da patterns di espressione diversi. Il BL1 mostra sovraespressione di geni coinvolti nel ciclo cellulare, nella divisione e nel processo di riparazione del DNA. Il BL2 ha un profilo di espressione peculiare coinvolgendo fattori di crescita, marker per la glicolisi e la gluconeogenesi. Il sottotipo mesenchimale mostra aumento dell'espressione dei geni coinvolti nella motilità cellulare (Hill et al., 2019).

Il sottotipo LAR è molto simile al Luminal ed è influenzato dagli androgeni per l'elevata presenza di recettori molecolari per questi ultimi. I restanti sottotipi

sono in via di studio in quanto mostrano patterns di espressione dubbi (Hill et al., 2019).

1.3 Trattamento terapeutico

Nella lotta contro il cancro gli strumenti utilizzati in medicina sono molteplici e spesso è richiesto un approccio integrato. La chirurgia, con eliminazione della massa tumorale e dei suoi bordi, è l'opzione principale per la maggior parte dei tumori solidi e può essere associata a trattamento radioterapico o chemioterapico neoadiuvante utile per ridurre le dimensioni del tumore da asportare. La radioterapia utilizza radiazioni ionizzanti (in genere raggi X) per distruggere le cellule cancerose, viene concentrata nell'area colpita dalla malattia in modo da non danneggiare le cellule sane. La chemioterapia utilizza farmaci citotossici, ovvero tossici per le cellule, in quanto riescono a bloccare la divisione cellulare in attiva replicazione, senza distinguere cellule sane da cellule malate. Possono essere utilizzati nel trattamento del carcinoma della mammella anche la terapia ormonale e l'immunoterapia che stimola l'attivazione del Sistema Immunitario contro le cellule cancerose. La chemioterapia prevede che al paziente venga somministrato il farmaco o per via orale o infusionale per un certo periodo a cui segue un periodo in cui la somministrazione viene interrotta. Questo garantisce migliore efficacia perché

non tutte le cellule sono contemporaneamente in divisione e quindi sensibili al chemioterapico ed inoltre permette al paziente una ripresa migliore dagli effetti collaterali dovuti alla terapia. Può essere eseguita pre o post-intervento o anche come unica soluzione.

Non esistono trattamenti mirati per il TNBC. Il trattamento standard per i pazienti con TNBC comprende chirurgia e chemioterapia ma una grande percentuale di pazienti diventa rapidamente refrattaria al trattamento. Recenti strategie per il trattamento del TNBC, definiscono approcci diversi in base allo stato del gene BRCA e dello stato di espressione di CD274 (Salgia et al., 2018). In generale le opzioni terapeutiche per il trattamento del TNBC comprendono:

- Rimozione chirurgica: si procede con una mastectomia totale (rimozione totale della mammella) oppure una lumpectomia ovvero la rimozione del tumore e dei suoi bordi. Dopo la chirurgia, il tasso di recidiva locale è basso. La chirurgia viene considerata come il trattamento di elezione (Wahba et al., 2015)
- Radioterapia: viene eseguita in seguito alla mastectomia. Tuttavia, in uno studio di Abdulkarim et al., è stato rilevato che donne con TNBC recanti la mutazione a carico del gene BRCA1 non hanno la capacità di riparare i danni al DNA e quindi sono potenzialmente radiosensibili.

- Terapia ormonale: una terapia con anti-estrogeni o inibitori dell'aromatasi è indicata in tutti i pazienti con recettori ormonali positivi.
- Chemioterapia: è sempre raccomandata nel trattamento del TNBC.

I principali farmaci chemioterapici utilizzati per il trattamento del carcinoma mammario includono i taxani, i derivati del platino come il cisplatino (CDDP), gli antimetaboliti come il 5-Fluorouracile (5-FU) e le antracicline come la doxorubicina (Campagna et al., 2023).

I chemioterapici restano il trattamento più raccomandato dai medici per il trattamento del TNBC anche nella malattia metastatica, sebbene i benefici di questa strategia terapeutica siano limitati nelle fasi avanzate della malattia.

Dati statistici dimostrano che il 40% delle donne trattate con doxorubicina e docetaxel hanno avuto una risposta abbastanza positiva (Wahba et al., 2015).

La doxorubicina è un agente intercalante del DNA che inibisce i meccanismi di riparazione di quest'ultimo effettuati dalla Topoisomerasi II e genera radicali liberi. Essendo un farmaco cardiotossico il suo uso è limitato, nonostante sia stata dimostrata la sua efficacia (Thorn et al., 2011).

Il cisplatino interagisce con i meccanismi di riparazione del DNA mediante formazione di addotti che ostacolano questo processo e portano all'arresto del ciclo cellulare con conseguente morte cellulare. Questo farmaco è in grado di dissociare due fattori di trascrizione che sono espressi solo nel sottotipo triplo

negativo, p63 e p73, che si associano al fine di impedire il processo di morte cellulare, il cisplatino quindi è il più utilizzato e promettente (Koh et al., 2021). Il 5-fluoruracile ha struttura simile alle pirimidine degli acidi nucleici e quindi grazie a questo interferisce nel metabolismo nucleotidico e sostituendosi alle pirimidine degli acidi nucleici causa citotossicità e apoptosi (Zhang et al., 2021).

1.3.1 Cisplatino

Il Cisplatino è una piccola molecola planare che contiene un atomo di platino legato a due atomi di cloro e a due gruppi amminici, posti dallo stesso lato e per questo il nome porta il prefisso “cis” (Fig 1.5 A e B).

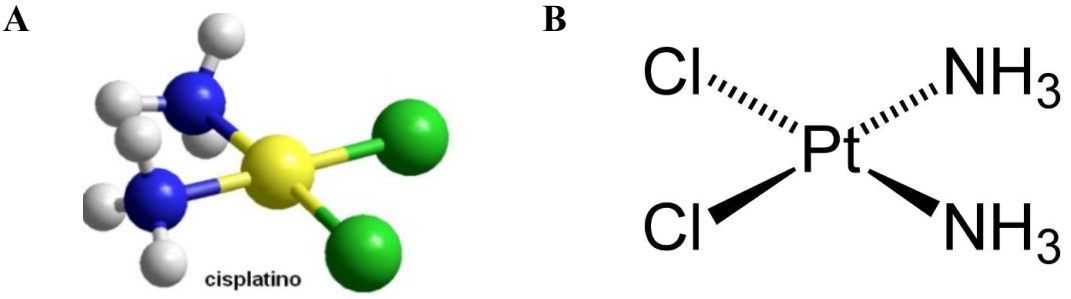


Figura 1.5: (A) Struttura 3D del Cisplatino in cui i gruppi amminici sono di colore blu e gli atomi di cloro in verde (https://www.pianetachimica.it/mol_mese/mol_mese_2021/03_Cisplatino_e_DNA/Cisplatino_e_DNA.htm); (B) struttura chimica del Cisplatino (https://it.wikipedia.org/wiki/Cisplatino).

Il cisplatino crea un legame crociato nel DNA legando due atomi di azoto di due basi di guanina consecutive invece di due atomi di cloro. Questo legame crociato causa il ripiegamento del DNA ostacolandone il normale funzionamento e danneggiando in questo modo la cellula.

Il cisplatino è un farmaco chemioterapico usato da circa 40 anni per il trattamento di diversi tipi di cancro. Sebbene attualmente non sia considerato come lo standard di cura per il TNBC, vi è un rinnovato interesse nell'uso del cisplatino per il trattamento di questo tipo di cancro. Circa 20 studi clinici stanno esplorando l'utilizzo del cisplatino come agente singolo o in combinazione con altre terapie per trattare il TNBC.

Il cisplatino danneggia la cellula cambiando la conformazione del DNA e quindi cambiando il modo in cui questo interagisce con le proteine. Come mostrato in figura 1.6, il normale DNA è diritto, mentre il DNA legato al cisplatino è piegato nel punto in cui il cisplatino lo ha modificato chimicamente. Le proteine HMG (High Mobility Group) legano il DNA piegato preferenzialmente, quindi il DNA piegato dal cisplatino. Queste proteine impediscono al DNA danneggiato dal farmaco di interagire con le proteine coinvolte nella replicazione, nella trascrizione e nella riparazione del DNA. Questa inaccessibilità del DNA attiva i meccanismi di apoptosi.

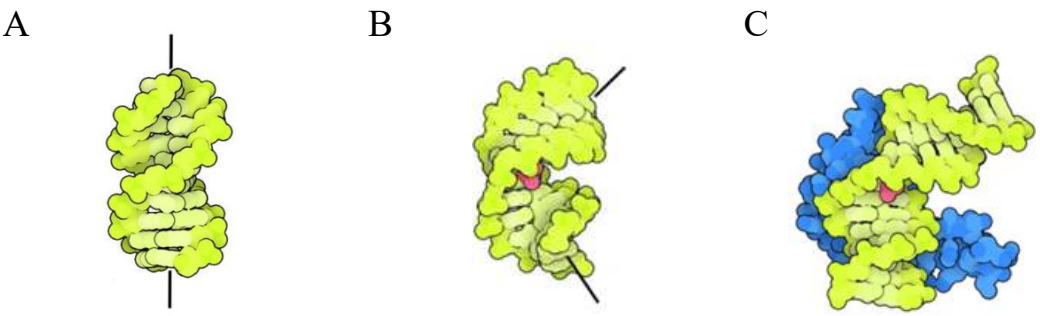


Figura 1.6: (A) **s**truttura del DNA senza il legame con il cisplatino; (B) struttura DNA in seguito al legame con il cisplatino; (C) struttura del DNA legato al cisplatino e alle proteine HMG (https://www.pianetachimica.it/mol_mese/mol_mese_2021/03_Cisplatino_e_DNA/Cisplatino_e_DNA.htm).

Le cellule possono diventare resistenti al cisplatino attraverso diversi meccanismi, tra cui il cambiamento nell'accumulo del farmaco nelle cellule mediante l'inibizione dell'assorbimento o l'aumento dell'efflusso, la detossificazione del farmaco mediante meccanismi redox, la riparazione del DNA mediante meccanismi di riparazione per escissione o la regolazione negativa dei meccanismi apoptotici.

Uno studio di Hill et al., ha dimostrato che i geni associati al cisplatino e coinvolti nella morte cellulare sono associati in modo differenziale in tutti i sottotipi di TNBC. Nel sottotipo LAR, ad esempio, alcuni geni associati al Cisplatino sono: ABCC2, AKT1, BCL2L1, CASP8, CLU, GSR, NQO1 sono sovra regolati mentre il gene MSH2 è sotto regolato (Hill et al., 2019).

Per quanto riguarda i geni ABCC2 e GSR, sono due geni che codificano rispettivamente per un enzima trasportatore ed un enzima metabolico del

glutatione che sono coinvolti nella disintossicazione della cellula e nel trasporto all'esterno del farmaco. Un aumento di questi geni e la loro azione a monte di geni apoptotici rappresenta un meccanismo di resistenza aggiuntivo posseduto dal sottotipo LAR (Hill et al., 2019).

Altri geni come AKT1, CLU e NQO1 codificano per proteine che rispondono allo stress ossidativo e quindi di conseguenza contrasterebbero l'azione del cisplatino che, come detto prima, portando anche all'aumento dei ROS. BCL2L1 e CASP8 sono delle proteine coinvolte nel processo di morte cellulare programmata, in particolare BCL2L1 è un inibitore dell'apoptosi e quindi se overespresso contribuisce al meccanismo di resistenza al farmaco.

L'unico gene che è down-regolato è MSH2 che codifica per una proteina riparatrice del DNA (Hill et al., 2019).

1.4 Ruolo del gene paraoxonasi-2 (PON2) e chemioresistenza

Il gene PON2 che codifica per la paraoxonasi-2 è risultato essere overespresso in diversi tumori contribuendone all'aggressività e alla chemioresistenza. Il gene PON2 appartiene alla famiglia dei geni della paraoxonasi umana, che include anche PON1 e PON3 che sono presenti principalmente nel siero a differenza di PON2 che è espresso in vari tessuti.

Il trascritto maturo del gene PON2 è costituito da 1062 nucleotidi, i quali vengono tradotti in una proteina composta da 355 aminoacidi. Esistono due isoforme di questa proteina, una glicosilata di 43 kDa e una non glicosilata di 40 kDa.

La paraoxonasi-2 è una proteina di membrana di tipo II, ovvero posizionata con la porzione amino-terminale verso il citosol, codificata dal gene PON2 e formata da un dominio transmembrana all'N-terminale e un dominio catalitico extracellulare al C-terminale; essa è localizzata a livello intracellulare dopo la traduzione ed è principalmente associata all'involucro nucleare, al reticolo endoplasmatico, ai mitocondri e alla membrana plasmatica.

Sono note diverse molecole in grado di modulare l'espressione del gene PON2 come ormoni, modifiche post-traduzionali, fattori di trascrizione ed alcuni farmaci antinfiammatori. La paraoxonasi-2 ha specificità per substrati quali gli organofosfati, gli esteri arilici e i lattoni.

La PON2 è up regolata in risposta allo stress ossidativo in diversi tipi cellulari. Il ruolo di questi enzimi è quello di protezione nei confronti del danno ossidativo e della perossidazione lipidica. Da quanto detto si deduce che PON2 ha un ruolo cruciale nel contrastare l'insorgenza di malattie neurodegenerative, malattie cardiovascolari ed altre patologie dipendenti dalla produzione di radicali liberi (ROS).

Un elevato stress ossidativo è associato all'infiammazione cronica e rappresenta un fattore di rischio per l'insorgenza del cancro correlato a una risposta da parte del sistema immunitario che consiste nel rilascio di citochine che aumentano la produzione di ROS nei tessuti tumorali. Le cellule tumorali sono dotate di sistemi antiossidanti efficienti che le proteggono dai ROS; per questa ragione, sono in grado di sopravvivere e proliferare a discapito delle cellule sane. Quindi PON2 potrebbe servire per disinnescare questo evento associato allo stress ossidativo e conseguente produzione di specie reattive all'ossigeno. L'espressione di PON2 è stata valutata in campioni di TNBC, utilizzando il tessuto sano circostante come controllo, mediante tecniche di immunoistochimica: non è stata riscontrata una relazione statisticamente significativa tra l'espressione della proteina e l'età o lo stadio della malattia. L'analisi immunoistochimica ha però rilevato che l'espressione della proteina era molto più alta nei tessuti tumorali rispetto al livello rilevato nei margini dei tessuti sani. Il p53 reprime la trascrizione di PON2 e quindi mutazioni di questo portano ad una over-espressione di PON2 che risulterà appunto, molto espresso in condizioni patologiche.

Altri studi hanno dimostrato che PON2 aumenta l'espressione di GLUT1, trasportatore del glucosio. In condizioni patologiche quindi, GLUT1 causerà

un aumento della concentrazione di glucosio contribuendo così al fabbisogno delle cellule tumorali e quindi al loro metabolismo.

1.4.1 Silenziamento del gene PON2

Quanto detto porta ad una serie di alterazioni che contribuiscono allo sviluppo del cancro come instabilità genetica, modificazioni epigenetiche, chemioresistenza, radioresistenza. Data la correlazione tra l'espressione di questo gene e la resistenza alla chemioterapia, gli studiosi hanno deciso di silenziare il gene PON2 e di valutarne i conseguenti effetti.

Lo studio di Campagna et al., del 2023 aveva come scopo il silenziamento genico della Paraoxonasi-2 in linee cellulari di carcinoma della mammella MDA-MB-231, MCF-7 e SKBR-3 attraverso l'RNA interference. L'RNA interference agisce a livello post-trascrizionale utilizzando delle molecole dsRNA che legano l'mRNA in modo sequenza-specifico. In particolare, queste linee cellulari sono state transfettate con plasmidi codificanti per shRNA contro PON2. Il plasmide una volta internalizzato, viene riconosciuto dall'RNA polimerasi III che trascrive shRNA con un filamento senso e un filamento antisenso. I filamenti si assemblano a formare un hairpin che viene riconosciuto dai sistemi di taglio del filamento senso. Il filamento anti si legherà alla sua

sequenza complementare sul messaggero, determinandone la degradazione. In questo modo si ottiene il silenziamento del gene PON2 (Figura 1.7).

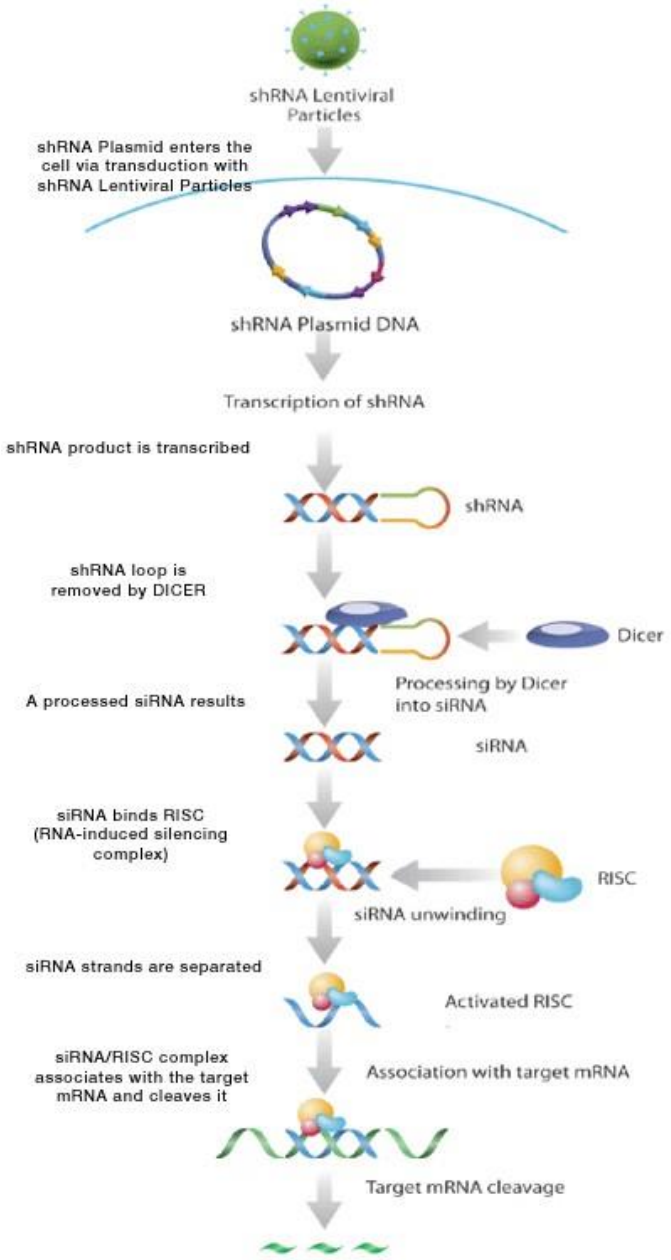


Figura 1.7: silenziamento genico (https://www.scbt.com/it/whats-new/gene-silencers).

Per valutare l'efficienza del silenziamento della PON2 sono stati misurati i livelli di mRNA e della proteina matura mediante RT-PCR e Western Blot. Valutato il corretto silenziamento di PON2, gli studiosi allora, hanno deciso di valutare gli effetti del silenziamento del gene e come questo influisse sul trattamento chemioterapico. La linea cellulare MDA-MB-231 (Figura 1.8) è stata trattata separatamente con la Doxorubicina, il 5-Fluorouracile e il Cisplatino. In seguito al trattamento con questi chemioterapici è stata misurata la vitalità a diversi tempi e a concentrazioni di farmaco crescenti. Nel caso della doxorubicina, la mortalità cellulare è risultata aumentata dopo il silenziamento di PON2 rispetto al controllo. Per quanto riguarda il Cisplatino, la concentrazione pari a 1μM è stata in grado di indurre una diminuzione della vitalità cellulare nelle cellule MDA-MB-231 con silenziamento di PON2. Altre concentrazioni di cisplatino non hanno mostrato grosse differenze (Campagna et al., 2023).

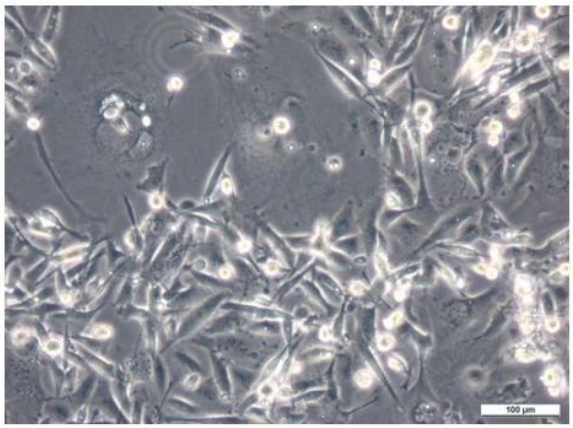


Figura 1.8: linea cellulare MDA-MB-231 (https://www.sigmaaldrich.com/IT/it/product/sigma/cb_92020424).

1.5 Interazione fra la materia e la radiazione elettromagnetica: potenzialità e applicazioni

Quando si parla di spettroscopia, si intende l'utilizzo di radiazioni elettromagnetiche per lo studio strutturale della "materia".

1.5.1 Radiazione elettromagnetica

Una radiazione elettromagnetica è una forma di energia che mostra un comportamento dualistico onda/particella definita da due teorie differenti che sono la teoria ondulatoria e teoria corpuscolare. Secondo la teoria ondulatoria, l'onda elettromagnetica è il risultato della propagazione contemporanea di un campo elettrico e di un campo magnetico oscillanti in fase e perpendicolari tra di loro (Figura 1.9).

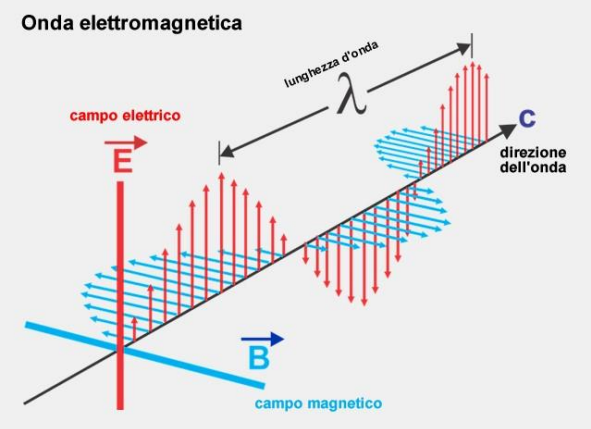


Figura 1.9: comportamento ondulatorio di una radiazione elettromagnetica (https://www.andreaminini.org/fisica/elettromagnetismo/teoria-dell-elettromagnetismo).

La radiazione elettromagnetica viaggia alla velocità della luce e viene definita mediante lunghezza d'onda e frequenza. La lunghezza d'onda si riferisce alla distanza fra due massimi consecutivi. La frequenza corrisponde al numero di oscillazioni al secondo. La relazione che correla le due grandezze è:

$$\nu = \frac{c}{\lambda}$$

L'inverso della lunghezza d'onda, definisce il numero d'onda, ovvero il numero di oscillazioni nell'unità di lunghezza:

$$\overline{\nu} = \frac{\nu}{c}$$

L'insieme di tutte le frequenze definisce lo spettro elettromagnetico (Figura 1.10):

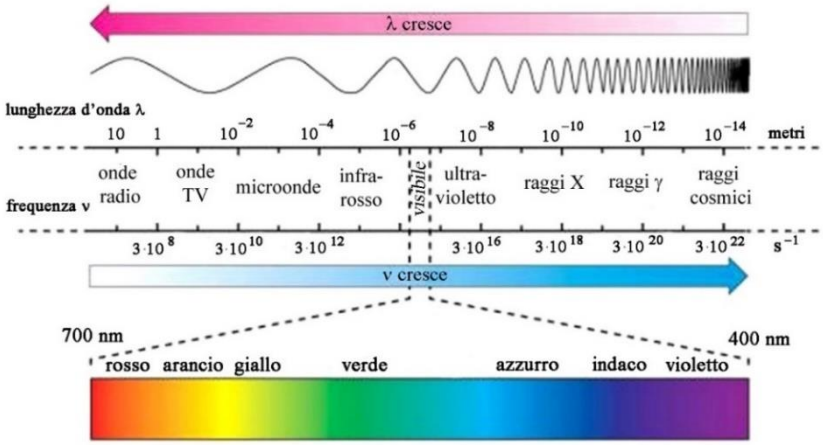


Figura 1.10: spettro elettromagnetico (https://anniluce.wordpress.com/2012/01/13/viaggio-attraverso-lo-spettro-elettromagnetico/).

La seconda teoria sopra citata è la teoria corpuscolare secondo cui, la radiazione elettromagnetica è costituita da un fascio di particelle definite fotoni che si

propagano in modo allineato con moto sinusoidale di frequenza *v* e ogni fotone possiede un'energia E. Il valore dell'energia è associato alla frequenza della radiazione secondo l'equazione di Planck:

$$E = hv = h\frac{c}{\lambda}$$

dove h è la costante di Planck ed ha un valore di 6.6261 x 10^{-34}Js.

Dall'equazione possiamo dedurre che E è direttamente proporzionale alla frequenza ed inversamente proporzionale alla lunghezza d'onda.

Nello spettro elettromagnetico abbiamo nove diverse categorie d'onda; in ordine di frequenza crescente troviamo: onde radio, onde TV, microonde, infrarosso, visibile, ultravioletto, raggi X, raggi γ e raggi cosmici.

Dalle osservazioni fatte prima, essendo l'energia inversamente proporzionale a λ, si deduce che le radiazioni dotate di lunghezza d'onda maggiore, come l'infrarosso avranno scarsa E, mentre quelle che hanno lunghezza d'onda minore, come l'ultravioletto o i raggi X, hanno elevata E.

La radiazione elettromagnetica rappresenta il mezzo più efficace per trasferire una quantità discreta di energia alla materia (Chiappe et al., 2011).

Quando il fotone interagisce con la materia, trasferisce la sua energia a quest'ultima e la molecola passa dallo stato fondamentale ed a più bassa energia ad uno eccitato. Questa transazione si verifica solo se l'energia assorbita è pari

alla differenza di energia tra i livelli energetici della molecola, secondo la seguente formula:

$$\Delta E = E_{S1} - E_G = hc/\lambda$$

dove ΔE è la variazione di energia tra lo stato eccitato e lo stato fondamentale. Lo stato eccitato è indicato con la sigla S1 e lo stato fondamentatale con G.

Essendo i livelli energetici quantizzati, solo specifiche radiazioni possono causare la transizione tra i due stati energetici e di conseguenza l'assorbimento di energia.

1.5.2. Spettroscopia Infrarossa

Le spettroscopie sono suddivise in tre tipi:

- spettroscopie di assorbimento, come la Spettroscopia UV-visibile e Infrarossa;
- spettroscopie di emissione, come Fluorescenza e Fosforescenza;
- spettroscopie di scattering, come la Spettroscopia Raman.

La spettroscopia Infrarossa è una tecnica analitica molto utilizzata per comprendere e studiare la composizione chimica dei campioni di interesse. La tecnica si basa sulla interazione fra i legami chimici e la radiazione IR.

Gli spettri IR sono definiti spettri roto-vibrazionali questo perché le radiazioni infrarosse determinano transizioni tra livelli energetici sia vibrazionali che rotazionali. La radiazione infrarossa si riferisce a quella parte dello spettro

elettromagnetico che si trova tra le regioni del visibile e delle microonde. Questa zona è divisa in:

- IR vicino (NIR) tra 13000-4000 cm^{-1}
- IR medio (MIR) tra 4000-200 cm^{-1}
- IR lontano (FIR) tra 200-10 cm^{-1}

L'intervallo di lunghezza d'onda più interessante per la caratterizzazione della composizione chimica di un materiale/composto è quello del medio infrarosso, tra 4000 e 400 cm^{-1}.

Quando la radiazione colpisce il materiale, l'energia viene immagazzinata nei legami chimici e convertita in energia vibrazionale che provoca delle variazioni tra livelli energetici che possono essere registrate. L'assorbimento di determinate frequenze, dipende dalla chimica del campione. L'insieme dei numeri d'onda assorbiti definisce lo spettro IR. L'analisi dello spettro permette di identificare i gruppi funzionali presenti nel campione esaminato infatti i picchi di ciascun gruppo funzionale ricadono sempre nella medesima frequenza indipendentemente dal contorno molecolare.

Essendo la Spettroscopia IR una spettroscopia di assorbimento, segue la legge di Lambert Beer. L'intensità della radiazione assorbita può essere espressa in termini di Assorbanza o Trasmittanza. La valutazione quantitativa

dell'assorbimento della luce può essere eseguita sfruttando la legge di Lambert Beer, secondo cui:

$$A = \varepsilon\, C\, l$$

Un'altra grandezza da tenere in considerazione è la Trasmittanza, ovvero la capacità di un campione di lasciarsi attraversare da un raggio di luce incidente senza assorbirlo. Essendo uguale al rapporto tra intensità del flusso radiale trasmesso e intensità del flusso radiale incidente, è una grandezza adimensionale:

$$T = I/I_0$$

La radiazione assorbita e la radiazione trasmessa sono correlate dalla seguente relazione, che associa Assorbanza e Trasmittanza:

$$A = -\log T = \log I_0\, /I$$

Consideriamo il classico modello della meccanica classica in cui gli atomi sono paragonati a masse puntiformi, $m_1\ e\ m_2$, connesse da una molla perfettamente elastica che rappresenta il legame chimico. È possibile quindi applicare la legge di Hooke:

$$F = -K\, x$$

dove *K* rappresenta la costante elastica della molla e *x* è lo spostamento.

In un modello ideale sarebbe possibile variare l'energia illimitatamente mediante accorciamenti ed allungamenti, questo invece, non è possibile per un

legame chimico. In un legame chimico l'energia vibrazionale è quantizzata e viene influenzata anche da altre forze di attrazione e repulsione che si esercitano tra gli atomi.

In una situazione di equilibrio le forze risulteranno bilanciate, e gli atomi si trovano ad una distanza che equivale alla lunghezza di legame che corrisponde al minimo di energia potenziale.

Il legame oscilla continuamente attorno a questa posizione di equilibrio, mediante moti vibrazionali (Figura 1.11):

- vibrazione di *stretching* dovuto ad uno stiramento ritmico lungo l'asse di legame. La vibrazione determina esclusivamente un allungamento o un accorciamento del legame stesso. Questi movimenti possono essere simmetrici, quando i due atomi si allontanano e si avvicinano simultaneamente, oppure asimmetrici in caso contrario.

- vibrazione di *bending* (piegamento) dovuto alla variazione dell'angolo di legame. Questi movimenti possono avvenire sul piano, in questo caso parliamo di scissoring e rocking, o fuori dal piano e parliamo di wagging e twisting.

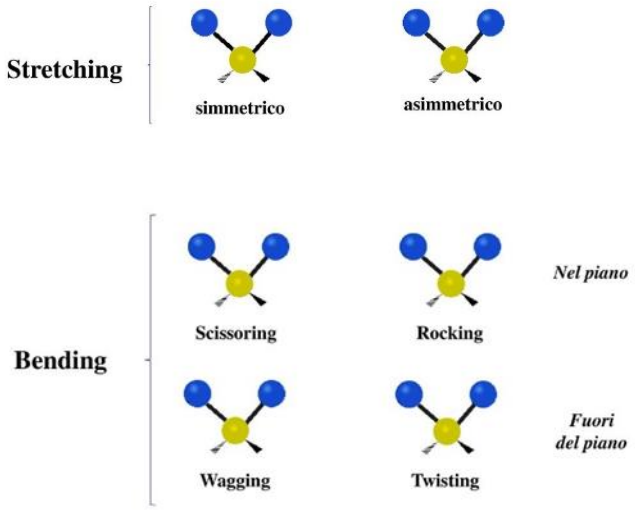


Figura 1.11: tipologie di vibrazioni dei legami molecolari (https://slideplayer.it/slide/11848857/66/images/87/Stretching+Bending+simmetrico+asimmetrico+Nel+piano+Scissoring+Rocking.jpg).

1.5.3 Strumentazione e acquisizione di uno spettro IR

Uno spettrofotometro a Trasformata di Fourier è dotato di una sorgente luminosa, un interferometro di Michelson, e di un detector. L'interferometro di Michelson è un sistema di specchi, mobili e fissi, che suddivide i raggi di luce in due raggi distinti che, dopo aver percorso cammini ottici differenti si ricombinano generando fenomeni di interferenza costruttiva o distruttiva. Permette di registrare lo spettro del campione in modo simultaneo rispetto a

tutte le frequenze contenute nel range spettrale IR. (Figura 1.12 A). La radiazione interferente viene rilevata da un detector e viene generato l'interferogramma, che viene quindi convertito in uno spettro di assorbimento IR mediante l'utilizzo del modello matematico basato sulla Trasformata di Fourier. Questa conversione dell'interferogramma in spettro IR si esegue in modo tale che quest'ultimo risulti più semplice da interpretare. Nello spettro IR ogni picco corrisponde ad un assorbimento nell'infrarosso da parte del campione in esame (Figura1.12B).

A

B

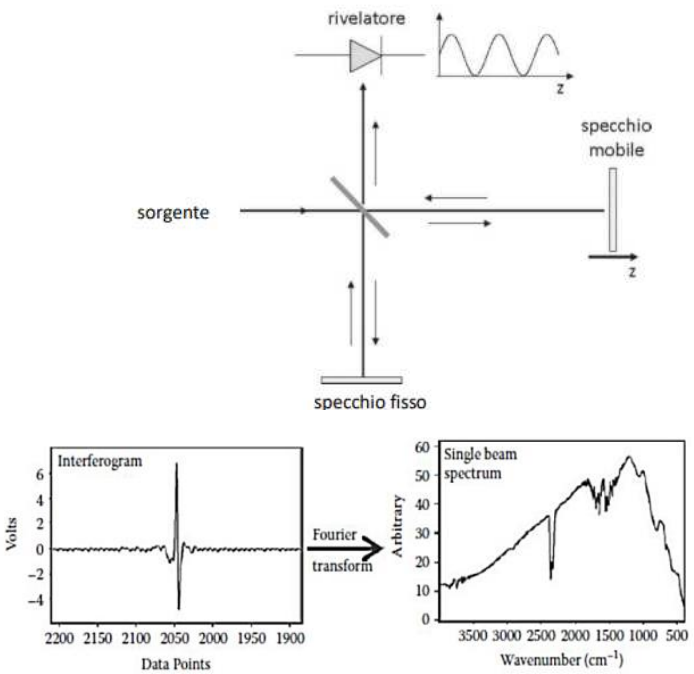


Figura 1.12: (A) interferometro di Michelson; (B) interferogramma e spettro IR. (https://www.researchgate.net/figure/Interferometro-di-Michelson_fig2_300575206).

Lo spettro IR che otteniamo riporta sull'asse delle ascisse il numero d'onda e sulle ordinate l'assorbanza o la trasmittanza. Lo spettro IR può essere suddiviso in tre zone:

- Zona ad alta frequenza, compresa tra 4000-1300 cm^{-1}, detta anche regione dei gruppi funzionali.
- Zona delle medie frequenze, compresa tra 1300-900 cm^{-1}, detta anche regione delle impronte digitali in quanto in questa regione vediamo le bande dovute alle vibrazioni molecolari tipiche del composto in esame.
- Zona delle basse frequenze, tra 900-600 cm^{-1}, detta regione di bending dei legami C-H fuori dal piano.

I parametri che caratterizzano le bande dello spettro sono: la posizione, l'intensità e la forma. La posizione della banda dipende da quanto è rigido il legame, tanto più rigido è il legame tanto maggiore dovrà essere l'energia necessaria per la vibrazione. L'intensità della banda si riferisce all'altezza della banda in esame ed esprime la probabilità che avvenga la transizione energetica da parte del gruppo funzionale dallo stato fondamentale a quello eccitato. Per quanto riguarda la forma della banda, questa può essere stretta o larga.

1.5.4 Interpretazione dello spettro IR di sistemi biologici

La tecnica FTIR in ambito biologico è molto utilizzata e consente di analizzare campioni sia solidi che liquidi. Infatti, ogni macromoleola presenta assorbimenti in regioni specifiche che possono essere individuati all'interno dello spettro IR (Figura 1.13).

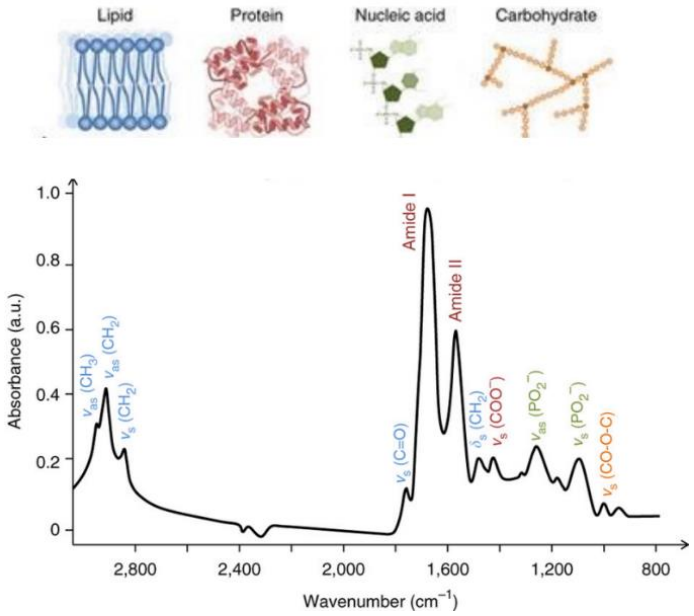


Figura 1.13: Spettro IR biologico. (https://www.nature.com/articles/nprot.2014.110).

Per quanto riguarda i **lipidi** a questi corrispondono una serie di bande.

- Tra 3050 cm^{-1} e 2800 cm^{-1} troviamo le vibrazioni di stretching delle catene lipidiche alchiliche sature e insature. In particolare, il picco a ~3010 cm^{-1} è dovuto allo stretching del legame =CH. Altri due picchi caratteristici sono quello a ~2852 cm^{-1} e ~2870 cm^{-1}che sono dovuti allo stretching

simmetrico dei gruppi CH_2 e CH_3 quelli a ~2927 cm^{-1} e ~2956 cm^{-1} attribuiti allo stretching asimmetrico di questi gruppi.

- La banda a ~1740 cm^{-1} fa riferimento a acidi grassi e trigliceridi. Questa banda è generata dallo stretching del legame C=O estereo presente in queste molecole.
- Le bande a ~1450 cm^{-1} e ~1400 cm^{-1}, corrispondono al bending delle catene alchiliche dei gruppi CH_2 e CH_3 lipidi lineari e ramificati;

Le bande che ci descrivono le **proteine** sono le seguenti:

- ~1650 cm^{-1} e ~1550 cm^{-1} (rispettivamente ammide I e ammide II); la banda ammide I è generata dallo stretching del legame C-N e C=O e dal bending del legame N-H; la banda ammide II è data dal bending del legame N-H e dallo stretching del legame C-N. Sia l'ammide I che l'ammide due sono bande convolute, ovvero sono formate da altre sottobande le quali sono rappresentative della struttura secondaria delle proteine.

La banda dell'ammide III è costituita da una serie di picchi fra ~1350 cm^{-1} e ~1200 cm^{-1} ed è spesso riferita al collagene.

Per i **carboidrati** osserviamo le bande a ~1150 cm^{-1} e ~1050 cm^{-1} generate rispettivamente dallo stretching del legame C-OH e del legame C-O accoppiato al bending del legame C-OH.

Per gli **acidi nucleici** si fa riferimento alle bande a ~999 cm^{-1} e ~970 cm^{-1} che corrispondono rispettivamente all'RNA e DNA, e alle bande a ~1240 cm^{-1} e 1080 cm^{-1}, dovute allo stretching simmetrico e asimmetrico dei gruppi fosfato.

1.5.5 Analisi FTIR Imaging di campioni biologici

La spettroscopia FTIR viene spesso utilizzata per diversi scopi, come ad esempio per la caratterizzazione, differenziazione cellulare e drug-cell interaction; è inoltre possibile eseguire un'analisi FTIR Imaging su campioni di tessuto con diverse patologie anche di natura tumorale, o su animali modello come lo Zebrafish, per studiare gli effetti sui vari organi e molecole biologicamente attive, diete ed inquinanti.

Gli utilizzi sono molteplici come elencato e per ottenere un'analisi FTIR Imaging di campioni di tessuti o cellule tumorali, all'interferometro e microscopio si sono aggiunti diversi detector con uno specifico scopo, ovvero quello di acquisire immagini in grado di correlare la composizione macromolecolare del campione con le sue caratteristiche morfologiche, ottenendo un'analisi completa del campione stesso.

I detector vengono distinti in:

- Detector termici (termocoppie) rilevano il calore prodotto dalla radiazione Infrarossa. Non richiedono di essere raffreddati ma hanno un tempo di risposta elevato e un intervallo spettrale piccolo.
- Detector quantici offrono maggiori prestazioni, hanno un'elevata capacità di risposta e più ampio intervallo spettrale. Devono essere raffreddati con azoto liquido.

I detector più utilizzati sono l'FPA e MCT. Il detector FPA, Focal Plane Array, è un multipoint detector e permette di acquisire contemporaneamente un elevato numero di spettri su un'area (64x64 spettri, per un totale di 4096 spettri su un'area di 164x164 μm^2, con una risoluzione spaziale di 2.56μm al di sotto del limite della diffrazione. Viene raffreddato ad azoto liquido ed opera ad una temperatura di 77K. I detector FPA sono costituiti da una serie di rilevatori IR così da catturare migliaia di spettri in un unico scatto, come se fosse una fotocamera digitale. (Figura 1.14).

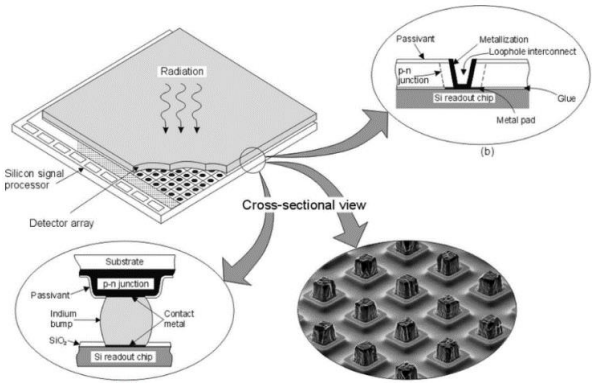


Figura 1.14: schema di funzionamento del detector FPA (https://www.researchgate.net/figure/Hybrid-IR-FPA-with-independently-optimized-signal-detection-and-readout-a-indium-bump_fig20_259659809).

Il detector MCT, Mercury-Cadmium-Telluride (HgCdTe), ha un intervallo spettrale tra 700 e 4000cm^{-1} ed una risoluzione spaziale di 20µm. È definito single point detector perché è adatto ad analisi per single point di cellule singole. È raffreddato anch'esso ad azoto liquido e opera ad una temperatura di 77K (Figura 1.15).

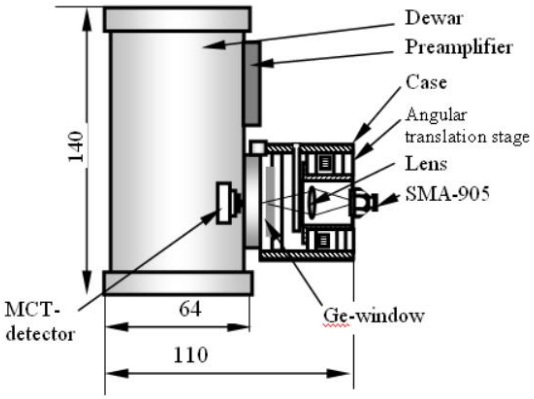


Figura 1.15: schema di funzionamento del detector MCT (https://www.eoc-inc.com/laser-diode-index/specialty-fibers-fiber-systems/accessories-for-mid-ir-fiber-spectroscopy/adjustable-coupler-for-mct-detector-in-ln-cooled-dewar/).

I due detector eseguono due acquisizioni differenti: l'MCT permette di ottenere uno spettro medio su un'area di circa 30x30μm^2, ed è adatto per l'analisi di cellule. L'FPA permette di effettuare un'analisi di Imaging ad alta risoluzione (2,56µm risoluzione spaziale) del campione di tessuto, individuando quindi aree con caratteristiche morfologiche e macromolecolari diverse.

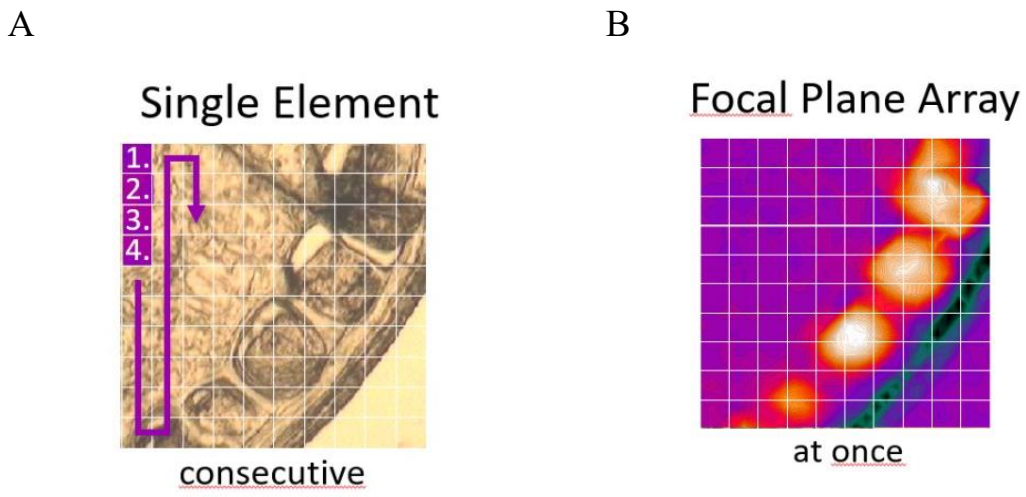


Figura 1.16: differenti modalità di acquisizione dei detector MCT (A) e (B) FPA (https://www.bruker.com/it/products-and-solutions/infrared-and-raman/ft-ir-microscopes/what-is-ft-ir-imaging.html).

I dati ottenuti, essendo molto numerosi, devono essere sottoposti a specifiche analisi statistiche.

Essendo la spettroscopia IR molto versatile e permettendo di analizzare le componenti cellulari e quindi i cambiamenti nella composizione di questi, viene molto utilizzata in ambito biomedico.

In particolare, la spettroscopia FTIR Imaging, osservando i cambiamenti a livello cellulare correlabili a dati istochimici, permette di individuare marker biologici spettrali specifici per patologie, permettendo di distinguere tra tessuto sano e malato. A tal proposito in uno studio del 2018, l'analisi FTIR è stata utilizzata per caratterizzare cellule e tessuti di cancro ovarico: sono state studiate le differenze macromolecolari tra linee cellulari di carcinoma ovarico

ed una linea normale di cellule epiteliali della superficie ovarica. Le differenze spettrali erano visibili nella regione 3000-2800 cm^{-1} (regione relativa allo stretching dei gruppi CH degli acidi grassi di membrana), nella regione 1800-1700 cm^{-1} che riguarda l'allungamento del legame estereo C=O dei fosfolipidi e nella regione 1500-1300 cm^{-1} (banda corrispondente alla vibrazione di bending dei gruppi CH delle catene laterali degli aminoacidi). È stato eseguito il calcolo delle bande relative, le quali possono essere utilizzati come marker spettrali per cellule sane o cancerose (Li et al., 2018).

Sempre per quanto riguarda la distinzione tra tessuti sani e malati e la diagnosi della patologia in base alle differenze spettrali tra questi, nel 2019 la spettroscopia FTIR è stata utilizzata per analizzare campioni di cellule della granulosa luteinizzate, raccolte da entrambe le ovaie di donne affette da endometriosi ovarica unilaterale. I dati spettrali sono stati poi confrontati con i controlli, ovvero campioni di cellule della granulosa presi da donne affette da infertilità non associata ad endometriosi. Dall'analisi degli spettri si sono osservate differenze nelle regioni a 3050-2800 cm^{-1} (banda corrispondente allo stretching dei gruppi alchilici nei lipidi), 1790-1480 cm^{-1} (banda corrispondente alla modalità vibrazionale delle bande ammide I e II delle proteine) e 1350-900 cm^{-1} (banda corrispondente allo stretching di fosfati e carboidrati). Da questo quindi si comprende ci siano state modifiche biochimiche nelle cellule della

granulosa prelevate da donne affette da endometriosi quali l'alterazione del profilo proteico, l'induzione di meccanismi di stress ossidativo e la deregolamentazione del metabolismo di lipidi e carboidrati; Queste disfunzioni sono associate all'insorgenza dell'endometriosi (Notarstefano et al., 2019).

L'analisi FTIR a livello cellulare ha permesso di investigare l'interazione farmaco cellula e i meccanismi di azione dei farmaci utilizzati. A tal proposito, nel 2021 uno studio di Notarstefano et al., ha evidenziato gli effetti citotossici della 5-azacitidina sulle cellule primarie di carcinoma a cellule squamose orali provenienti da biopsie umane (definite con la sigla OSCC) e sulle cellule staminali tumorali (definite dalla sigla CSC) prelevate dagli stessi campioni. Facendo l'analisi delle componenti principali tra OSCC e CSC si è osservata una segregazione tra questi gruppi che suggeriva una differenza a livello macromolecolare tra i due sia per quanto riguarda le regioni spettrali correlate ai lipidi sia per quelle correlate agli acidi nucleici. La 5-azacitidina agisce demetilando il DNA cellulare, riattivando dei geni silenziati provocando danni. Per valutare gli effetti demetilanti del composto in esame, è stato studiato il rapporto tra l'area di banda A_{930}/A_{970}; questo rapporto rappresenta la quantità di Z -DNA rispetto al dsDNA totale. Il rapporto in questione è apparso più alto nei controlli, suggerendo un diverso stato di metilazione tra questi e i campioni trattati con 5-azacitidina. La formazione dell'addotto DNMT-DNA, che è

dovuto all'incorporazione del farmaco nella molecola di DNA, provoca un cambiamento conformazionale fino alla rottura e quindi degradazione. Per valutare questo cambiamento conformazionale si valuta il rapporto di area tra due bande: A_{1240} e A_{1221}, che rappresenta rispettivamente la quantità di DNA A e la quantità di DNA B. Nei controlli il rapporto è aumentato dopo 48 ore di trattamento indicando la possibilità di transizione in forme di DNA più disordinato in seguito all'utilizzo di farmaci antitumorali. Infine durante l'apoptosi, si ha l'accumulo di gocce lipidiche citoplasmatiche e questo può essere osservato studiando sia il rapporto tra le aree delle bande a 2925 cm^{-1} e 2960 cm^{-1} che riflettono il grado di ramificazione e l' aumento della lunghezza delle catene alifatiche lipidiche, sia il rapporto tra le aree delle bande a 3010 cm^{-1} e a 2925 cm^{-1} che riflettono l' aumento delle catene alifatiche dei lipidi insaturi risultando un marcatore dell'ossidazione lipidica. (Notarstefano et al., 2021)

Sempre studiando le cellule di carcinoma squamocellulare orale, nel 2018 la tecnica FTIR è stata sfruttata per studiare sia i cambiamenti macromolecolari in cellule tumorali rispetto alle cellule sane, trattando le cellule con Cisplatino e 5-fluorouracile. In questo modo si è potuto studiare la risposta cellulare e la conseguente alterazione della composizione cellulare a tre differenti tempi: 24, 48 e 72 ore. Dopo 48 ore dal trattamento con cisplatino, i contributi dei lipidi

cellulari e delle proteine hanno mostrato un aumento significativo; il rapporto tra lipidi e proteine in particolare è risultato statisticamente significativo solo a questo time point. Per quanto riguarda le cellule trattate con il 5-fluorouracile invece, il rapporto lipidi/proteine è statisticamente aumentato a 72 ore post trattamento. Questi cambiamenti macromolecolari ci danno un'idea riguardo l'insorgenza di effetti citotossici dipendenti dal tempo e dalla dose del farmaco. I due farmaci sembrano causare effetti differenti nella cellula; ad esempio, studiando le bande relative agli acidi nucleici, si è potuta osservare una maggiore frammentazione causata dall'utilizzo del cisplatino rispetto a quella presente nelle cellule trattate con il 5-fluorouracile. Gli studi eseguiti hanno quindi confermato la modalità d'azione di questi farmaci chemioterapici e hanno aiutato nello studio dei cambiamenti cellulari causati da questi e nella conoscenza delle alterazioni cellulari che avvengono nel processo di apoptosi (Giorgini et al., 2018).

2. SCOPO DELLA TESI

Il carcinoma mammario triplo negativo (TNBC) rappresenta un notevole problema sociale a causa della sua diffusione nella popolazione femminile anche di età relativamente giovane e della sua dubbia risposta ai trattamenti chemioterapici, che porta a esiti molto spesso negativi. A tale proposito, in letteratura sono riportati numerosi studi volti a indagare in maniera più approfondita i meccanismi di azione dei vari farmaci su tali cellule tumorali, in modo da migliorarne l'efficacia. Studi recenti hanno messo in evidenza il ruolo della Paraoxonase-2 nel contrastare l'effetto positivo del cisplatino e di altri chemioterapici su cellule tumorali di carcinoma squamocellulare del cavo orale (OSCC) e si è quindi sviluppata una linea di ricerca volta appunto a verificare se il silenziamento di tale enzima potesse migliorare l'effetto del chemioterapico in questione anche su altre linee tumorali.

La Microspettroscopia Infrarossa Trasformata di Fourier (FTIRM) rappresenta una valida tecnica analitica, che trova ampia applicazione nelle varie problematiche biomediche, per lo studio di tessuti e cellule tumorali. Nel caso particolare delle colture cellulari, è in grado di identificare le modificazioni macromolecolari che avvengono nelle cellule a seguito di trattamenti

farmacologici, contribuendo quindi a descrivere i meccanismi di azione degli stessi.

Sulla base di queste problematiche, durante il mio lavoro di tesi sperimentale, mi sono occupata dell'analisi FTIRM di linee cellulari MDA-MB-231 sottoposte a silenziamento del gene PON2, e trattate con cisplatino a diversi tempi.

Gli scopi di tale studio sono di seguito riportati:

(1) approfondire la conoscenza del meccanismo di azione del cisplatino su tale linea cellulare;

(2) verificare se il silenziamento della PON2 potesse aumentare l'efficacia del trattamento con cisplatino, producendo effetti positivi in tempi più brevi.

3. MATERIALI E METODI

3.1 Preparazione delle colture cellulari e trattamento con Cisplatino

Questa parte è stata effettuata presso il laboratorio della Prof.ssa Monica Emmanuelli (DISCO, UNIVPM). Il protocollo per la coltura della linea cellulare MDA-MB-231, la trasfezione con plasmide P0 e con P647 e il trattamento con cisplatino è di seguito riportato.

Le cellule MDA-MB-231, vengono messe in coltura per 24H, in quantità tale da avere alla fine un pellet di ca. 1 milione.

Vengono quindi divise in aliquote e seminate in piastre da 96 pozzetti (1×10^3 cellule/pozzetto). Il giorno che precede la trasfezione, le cellule devono aver raggiunto approssimativamente l'80% di confluenza; 24 ore dopo, la provetta contenente il reattivo di trasfezione contenente Fugene HD, il reattivo di trasfezione, viene messo a temperatura ambiente e vortexato brevemente fino a quando il contenuto della provetta risulta essere omogeneo. Successivamente, si aggiungono 2 μg di DNA plasmidico al terreno privo di siero (serum free medium) e si agita utilizzando un vortex; vengono aggiunti 6 μl di Fungene HD al mezzo sopra citato per ottenere un rapporto di 3:1 con il DNA plasmidico e

si agita immediatamente. Si lascia incubare il mix di trasfezione per 5-15 minuti a temperatura ambiente e poi si aggiunge in quantità pari a 2-10µl ai pozzetti contenenti le cellule da trasfettare. Le cellule si lasciano ad incubare per 24/48 ore. Trascorso il tempo di incubazione si procede con la selezione delle cellule per verificare il corretto avvenimento della trasfezione piastrando le cellule in presenza della Puromicina a cui le cellule che sono state trasfettate correttamente saranno resistenti in quanto il plasmide utilizzato per la trasfezione portava il gene di resistenza a questo antibiotico.

Le cellule selezionate sono successivamente espanse e si procede con il test di vitalità cellulare (MTT assay) a 0 ore e poi in seguito a trattamento con il chemioterapico.

3.2 MTT assay

Il saggio MTT è di tipo colorimetrico e si basa sulla misurazione dell'attività dell'enzima mitocondriale succinato deidrogenasi che è attivo solo sulle cellule vive ed è in grado di ridurre il bromuro di 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio (MTT, di colore giallo), tagliando l'anello di tetrazolio e portando quindi la formazione del formazano, un sale di colore blu. La reazione è valutata allo spettrofotometro a 570nm.

La vitalità cellulare è stata valutata su tutti i gruppi i gruppi cellulari applicando il seguente protocollo. Le cellule vengono seminate in piastre da 96 wells (10.000 cells/well) con D-MEM HG completo (siero + antibiotico) e vengono quindi portate a confluenza nelle fiasche. Dopo trattamento con Cisplatino per 24, 48 e 72 ore, le cellule vengono staccate e risospese in 1 mL di terreno diluito 1:10 con PBS. Si aggiunge quindi la soluzione con MTT (diluito 1:12; lo stock è preparato a 5mg/ml in PBS) e dopo 2 ore di incubazione a 37°C si esegue la lettura allo spettrofotometro.

3.3 Preparazione dei campioni cellulari per l'analisi FTIRM

Per l'analisi FTIRM, le cellule sono state trattate con cisplatino (10 µg/ml di Cisplatino in NaCl 1 M a 50 mg/ml di soluzione madre), rispettivamente per 24, 48 3 72 ore.

Per questa analisi è importante che le cellule vengano trattate in modo da non utilizzare sostanze che possano interferire con la lettura eseguita allo strumento. Per questa ragione le cellule sono state staccate per tripsinizzazione ai diversi time point (24, 48 e 72 ore), e raccolte in una eppendorf/vial. Si è eseguita quindi la contrifugazione (500g per 3 min), dopo aggiunta di 1 ml di PBS. Il surnatante contenente il terreno di coltura è stato eliminato e è stata aggiunta,

sotto delicata agitazione, 1 ml di soluzione fisiologica riscaldata a ca. 37°C per eliminare i residui. Si procede ad una ulteriore centrifugazione (1000g per 10 min), e quindi il pellet di cellule viene raccolto e trattato con 1 ml di PFA 4%. La sospensione è stata agitata per risospendere il pellet e lasciata in incubazione per 1 ora. Al termine dell'incubazione, si è proceduto ad una ulteriore centrifugazione (1000g per 3 min) per eliminare il surnatante contenente la PFA. Il pellet è stato quindi sottoposto a due lavaggi con 500 µl di H_2O deionizzata, risospeso in H_2O deionizzata e infine conservato a 4°C fino all'analisi IR.

Tabella 3.1: Elenco dei campioni di cellule MDA-MB-231 trattate con CDDP trasfettate con plasmide puro e con plasmide pieno.

Linea cellulare	Timepoints (ore)	pLKO.1-puro	pLKO.1-647
MDA-MB-231	**24h**	MDA-MB-231 p.puro CDDP 24h	MDA-MB-231 p. 647 CDDP 24h
	48h	MDA-MB-231 p.puro CDDP 48h	MDA-MB-231 p.647 CDDP 48h
	72h	MDA-MB-231 p.puro CDDP 72h	MDA-MB-231 p.647 CDDP 72h

3.4 Acquisizione spettri IR e trattamento dati

Tutti i campioni cellulari sono stati quindi analizzati presso il Laboratorio di Spettroscopia Vibrazionale ARI (Advanced Research Instrumentation Laboratory) del Dipartimento di Scienze della Vita e dell'Ambiente (DiSVA) dell'Università Politecnica delle Marche di Ancona. È stato utilizzato un interferometro Bruker INVENIO R, accoppiato con un microscopio Vis-IR Hyperion 3000 dotato di un detector MCT (Hg-Cd-Te, mercurio, cadmio, tellurio) raffreddato ad azoto liquido, (Bruker Optics, Ettlingen, Germania) con obiettivo 15x. L'acquisizione e la successiva elaborazione dei dati spettrali (di seguito descritta) è stata effettuata tramite il software utilizzato è OPUS 7.5 (Bruker Optix, Ettlingen, Germania). (Figura 3.4.1)



Figura 3.4.1: Spettrofotometro FTIR con interferometro INVENIO-R accoppiato ad un microscopio Hyperion 3000 Vis-IR ed equipaggiato con un detector MCT (Hg-Cd-Te, mercurio cadmio tellurio) disponibile presso Laboratorio ARI.

Prima dell'analisi FTIRM, le cellule, fissate e conservate a 4°C come descritto nel paragrafo precedente, sono state lavate due volte con una soluzione salina isotonica (0.9% NaCl) e risospese in acqua MilliQ e centrifugate a 800xg per 10 minuti. Dopodiché, da ciascun campione sono stati prelevati 10 µl di pellet cellulare e depositati su una finestra ottica di CaF_2 (13 mm di diametro e 1mm di spessore), trasparente alla radiazione infrarossa, e lasciati asciugare all'aria per 30 minuti.

Su ogni campione, tramite la telecamera, sono state scelte 80 microaree contenenti 3-4 cellule (corrispondenti a una risoluzione spaziale di ca. 30x30 μm^2) su cui è stato acquisito lo spettro IR in trasmissione nell'intervallo del medio infrarosso 4000-400 cm^{-1} (risoluzione spettrale di 4 cm^{-1}, risoluzione. Prima di ogni campione, è stato acquisito lo spettro del background su una porzione pulita del supporto utilizzando gli stessi parametri.

Gli spettri così ottenuti sono stati sottoposti al seguente trattamento tramite il software OPUS 7.5 (Bruker Optix, Ettlingen, Germania):

- Compensazione atmosferica (Atmospheric Compensation routine), per eliminare il contributo dell'anidride carbonica e del vapore acqueo;
- Normalizzazione vettoriale (Vector Normalization routine) per normalizzare l'intero intervallo spettrale e per evitare variazioni di spessore del campione.

Gli spettri pre-processati sono stati inoltre interpolati negli intervalli di interesse, sottoposti alla correzione della linea di base (Cut e Two Point Baseline Correction routines) e utilizzati per ulteriori analisi spettrali e statistiche. Per ogni gruppo sperimentale sono stati acquisti anche gli spettri medi rappresentativi (Averaging routine).

Per ogni gruppo sperimentale, è stato calcolato lo spettro medio e gli spettri Deviazione Standard nell'intervallo spettrale 3050-900 cm^{-1}, analizzati sia in Assorbanza che in Derivata Seconda, per individuare le bande principali attribuibili alle diverse macromolecole. L'assegnazione delle bande e il corrispondente significato biologico sono riportati nella sezione 4.2 - Risultati (vedi Figure 4.2-4.5 e Tabella 4.1).

3.5 Analisi multivariata dei dati spettrali

Gli spettri IR in assorbanza dei vari gruppi sperimentali, pre-processati come descritto nel paragrafo 3.4 – Materiali e Metodi, sono stati sottoposti ad Analisi delle Componenti Principali (PCA), negli intervalli 1800-900 cm^{-1}, 1800-1480 cm^{-1} e 1310-900 cm^{-1}, utilizzando il software Origin Pro 2023.

La PCA, Principal Component Analysis, anche nota come trasformata di Karhunen-Loève, è una analisi utilizzata nell'ambito della statistica multivariata per la semplificazione dei dati. La tecnica è un esempio di

riduzione della dimensionalità e permette la trasformazione di un insieme numeroso di variabili valutando solo quelle principali, e limitando il più possibile la perdita di informazioni.

3.6 Analisi univariata dei dati spettrali

Gli spettri medi rappresentativi dei vari gruppi sperimentali e i loro spettri deviazione standard sono stati sottoposti alla procedura di Peak Fitting nelle regioni spettrali 3050-2800 cm^{-1}, 1800-1480 cm^{-1}e 1310-900 cm^{-1}, rappresentative rispettivamente della componente lipidica, proteica e degli acidi nucleici e carboidrati. Tale procedura è molto utile nella analisi degli spettri IR che presentano spesso bande convolute, formate cioè da più sotto bande componenti caratterizzate da numeri d'onda simili e quindi non risolte.

In particolare, si è operato come segue. Lo spettro medio interpolato nella regione di interesse è stato sottoposto a correzione della linea di base e, quindi, tramite l'analisi dei minimi in Derivata Seconda sono stati individuati tutti i picchi presenti in quella regione. Per ogni picco, ricostruito con un metodo iterativo tramite la funzione Gaussiana, è stato possibile individuare la posizione, espressa in numeri d'onda, l'altezza e l'area. Per tale analisi è stato utilizzato il software GRAMS/AI 9.1 (Galactic Industries, Inc., Salem, New Hampshire).

Nella Figura 3.1 viene mostrato un esempio di Peak Fitting nella regione 1310-900 cm^{-1}: la curva ricostruita è colorata in blu; i singoli picchi sono mostrati in verde; infine, i minimi della Derivata Seconda (corrispondenti ai diversi picchi) sono colorati in rosso.

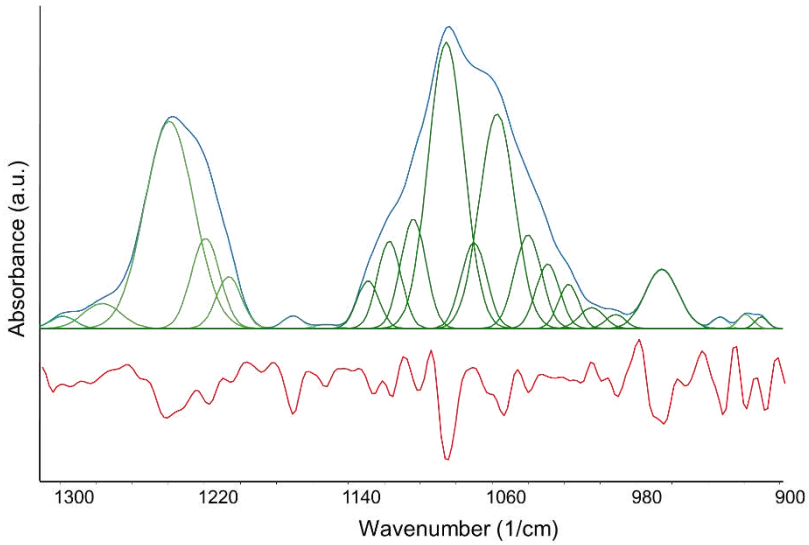


Figura 3.1: Esempio di Peak Fitting effettuato su uno spettro medio di un campione nell'intervallo 1310-900 cm^{-1}.

Le aree (indicate con la lettera A) dei singoli picchi ottenute tramite la procedura di Peak Fitting sono state utilizzate per il calcolo di specifici parametri spettrali, di seguito elencati:

- A_{2957}, area del picco a 2957 cm^{-1}, associato alla quantità relativa di gruppi CH_3 nelle catene alchiliche dei lipidi;
- A_{2921}, area del picco a 2921 cm^{-1}, associato alla quantità relativa di gruppi CH_2 nelle catene alchiliche dei lipidi;

- $A_{2921}/A_{2957,}$ rapporto fra le aree dei picchi a 2921 cm^{-1} e 2957 cm^{-1}, rappresentativo della lunghezza delle catene alchiliche dei lipidi;
- $A_{1740,}$ area del picco a 1740 cm^{-1}, associato alla quantità relativa di trigliceridi e acidi grassi;
- $A_{Ammide\ I + Ammide\ II}$, somma delle aree dei picchi a 1650 cm^{-1} e 1545 cm^{-1}, attribuibili alle proteine;
- A_{1085}, area del picco a 1085 cm^{-1}, attribuibile alla quantità relativa di gruppi fosfato;
- A_{1240}/A_{1220}, rapporto fra le aree dei picchi a 1240 cm^{-1} e 1220 cm^{-1}, associabili rispettivamente ai gruppi fosfato non H bonded e H bonded;
- A_{1170}, area del picco a 1170 cm^{-1} attribuibile ai gruppi COH non H bonded;
- A_{1020}/A_{1120}, rapporto fra le aree dei picchi a 1020 cm^{-1} e 1120 cm^{-1}, associabile alla quantità di DNA rispetto all'RNA;
- A_{991}, area del picco a 991 cm^{-1} attribuibile allo scheletro del RNA;
- A_{965}, area del picco a 965 cm^{-1} attribuibile allo scheletro del DNA;
- A_{933}, area del picco a 933 cm^{-1} attribuibile allo Z-DNA;
- A_{965}/A_{1085}, rapporto fra le aree dei picchi a 965 cm^{-1} e 1085 cm^{-1}, associabile alla quantità di DNA a doppia elica rispetto alla quantità di fosfati totali;

3.7 Analisi statistica dei dati spettrali

I parametri spettrali qui descritti sono stati validati tramite analisi statistica eseguita tramite analisi One-way ANOVA multiple comparison test (ai tre diversi time point) e Student's t-test (allo stesso time point). È stato utilizzato il software PRISM 6.0 (GraphPad software, San Diego, CA) e la significatività statistica è stata fissata a $p<0.05$ (*, $p<0.05$; **, $p<0.01$; ***, $p<0.001$, e ****, $p<0.0001$).

4. RISULTATI

Durante il mio periodo di tesi sperimentale, mi sono dedicata a studiare l'effetto del silenziamento del gene PON2 sulla efficacia del cisplatino nella linea cellulare MDA-MB-231. In particolare, ho cercato di approfondire quali fossero i meccanismi attivati dal cisplatino nelle cellule silenziate e come questo farmaco agisse per inibire la proliferazione cellulare. A tale scopo, i campioni cellulari sono stati prima sottoposti al saggio MTT per verificare la vitalità cellulare a seguito del trattamento e quindi analizzati tramite Microspettroscopia FTIR a diversi time point (24, 48 e 72 ore).

I risultati dell'analisi sono di seguito riportati.

4.1 Analisi del MTT assay

I risultati dell'MTT sono riportati in Figura 4.1. La loro analisi ci permette di fare alcune osservazioni:

(i) la linea cellulare P647 che downregola la PON2 mostra una significativa riduzione della vitalità cellulare sia rispetto alle cellule *wild type* (definite da qui in avanti con la sigla CTRL; linea verde) sia

rispetto alle cellule trasfettate con il vettore plasmidico privo di inserto (P0; linea azzurra).

(ii) le cellule della linea CTRL sottoposte a trattamento con cisplatino mostrano un contenuto decremento della vitalità cellulare a 24 e 48 ore, che aumenta a 72 ore;

(iii) le cellule della linea P0 mostrano una diminuzione della vitalità fra 24 e 72 ore comparabile alle cellule di CTRL, e con valori che risultano comunque inferiori alle P647.

(iv) le cellule P647 trasfettate con il plasmide contenente l'informazione necessaria per il silenziamento del gene PON2 (linea rossa), mostrano una riduzione statisticamente significativa della vitalità cellulare rispetto sia alle cellule di controllo (CTRL) che a quelle trasfettate con il plasmide vuoto (P0) per i timepoint 24 e 48 ore. Non si osservano variazioni statisticamente significative al timepoint 72 ore.

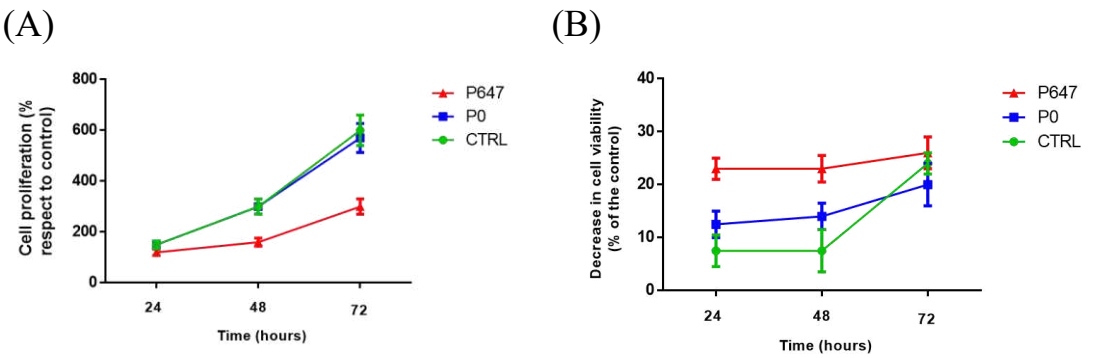


Figura 4.1 (A) Proliferazione cellulare della linea cellulare MDA-MB-231 **(B)** Decremento della vitalità cellulare della linea cellulare MDA-MB-231 sottoposta a trattamento per 24, 48 e 72 ore con cisplatino 1 µM. (CTRL, cellule *wild type*; P0, cellule trasfettate con il vettore plasmidico privo di inserto; P647, cellule trasfettate con il plasmide contenente l'informazione per il silenziamento del gene PON2).

4.2 Analisi del profilo spettrale delle cellule del gruppo di controllo: identificazione dei principali picchi IR

Il secondo step è stato analizzare il profilo spettrale della linea cellulare MDA-MB-231 e identificare i picchi IR relativi alle principali macromolecole. A tale proposito, in Figura 4.2, è riportato lo spettro IR rappresentativo di un campione di controllo (CTRL); tale spettro è mostrato nel range 3000-900 cm^{-1}, che comprende i modi vibrazionali delle principali biomolecole, quali lipidi (3000-2800 cm^{-1}), proteine (1800-1480 cm^{-1}), acidi nucleici e carboidrati (1310-900 cm^{-1}).

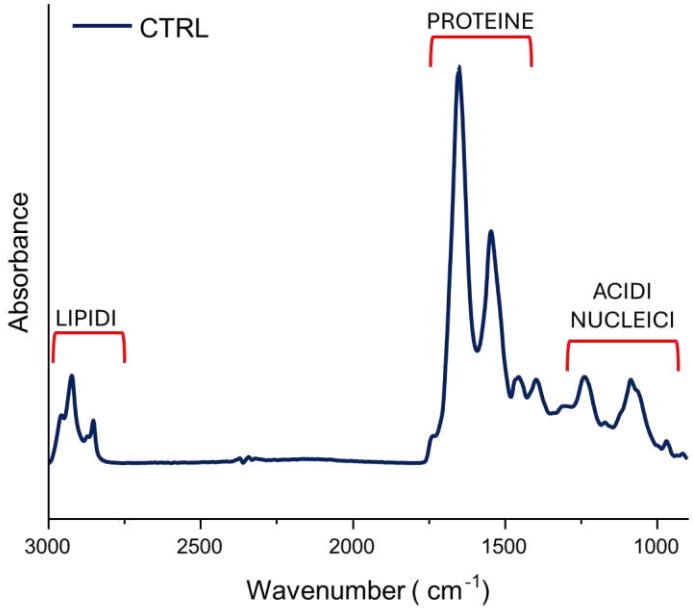


Figura 4.2. Spettro IR di un campione cellulare della linea MDA-MB-231. Lo spettro è rappresentato in Assorbanza nell'intervallo 3000-900 cm^{-1}. Le parentesi rosse indicano le regioni spettrali in cui si osservano gli assorbimenti dei lipidi (3000-2800 cm^{-1}), proteine (1800-1480 cm^{-1}) e acidi nucleici e carboidrati (1310-900 cm^{-1}).

I principali picchi IR presenti nello spettro e i corrispondenti modi vibrazionali sono elencati nella Tabella 4.1 insieme con il significato biologico.

Tabella 4.1. Principali picchi identificati nello spettro IR di un campione di controllo della linea MDA-MB-231 (CTRL), modo vibrazionale e relativa assegnazione biologica.

Numeri d'onda (cm^{-1})	**Modo vibrazionale**	**Assegnazione biologica**
~2957 e ~2871	ν_{asim} e ν_{sim} dei gruppi CH_3	Catene alchiliche dei lipidi
~2922 e ~2851	$\nu_{asim\ e}$ ν_{sim} dei gruppi CH_2	
~1740	νC=O estere	Trigliceridi e acidi grassi
~1650 e ~1545	Ammide I e Ammide II νC=O, νC-N e δN-H	Legame peptidico CONH
~1237 e ~1084	$\nu_{asim\ e}$ ν_{sim} PO_2	Fosfati e acidi nucleici
~1170	νCO-P	Marker tumorale
~1064	νC-O	Carboidrati
~998	νC-O del ribosio	RNA
~968	Backbone del DNA	DNA
~935	Elica sinistrorsa del DNA	Z DNA

Per una analisi più approfondita, lo spettro rappresentativo della linea cellulare MDA-MB-231 è stato ulteriormente studiato nelle diverse regioni di interesse (Figure 4.3 - 4.5), sia in Assorbanza (Abs) che in Derivata Seconda (DII). L'analisi degli spettri in Derivata Seconda è molto utile per una accurata valutazione del profilo spettrale, in quanto permette di identificare tutti i picchi presenti nello spettro, che vengono rappresentati come minimi. Infatti, molto spesso lo spettro IR è composto da bande convolute, generate cioè dalla sovrapposizione di picchi relativi a diverse transizioni vibrazionali caratterizzati da valori di numeri d'onda molto simili e quindi tali da risultare in parte sovrapposti.

- *Range 3050-2800 cm^{-1}, relativo ai lipidi (Figura 4.3A,B).* In questa regione, troviamo le bande principali delle catene alchiliche dei lipidi: in particolare, le bande a ~2957 cm^{-1} e ~2871 cm^{-1}, che corrispondono rispettivamente alla vibrazione di stretching asimmetrico e simmetrico dei gruppi CH_3, e le bande a ~2922 cm^{-1} e ~2852 cm^{-1}, che corrispondono rispettivamente allo stretching asimmetrico e simmetrico dei gruppi CH_2. È interessante notare l'assenza della banda a ca. 3010 cm^{-1}, attribuibile ai gruppi =CH e quindi alla presenza di insaturazione nelle catene alchiliche.

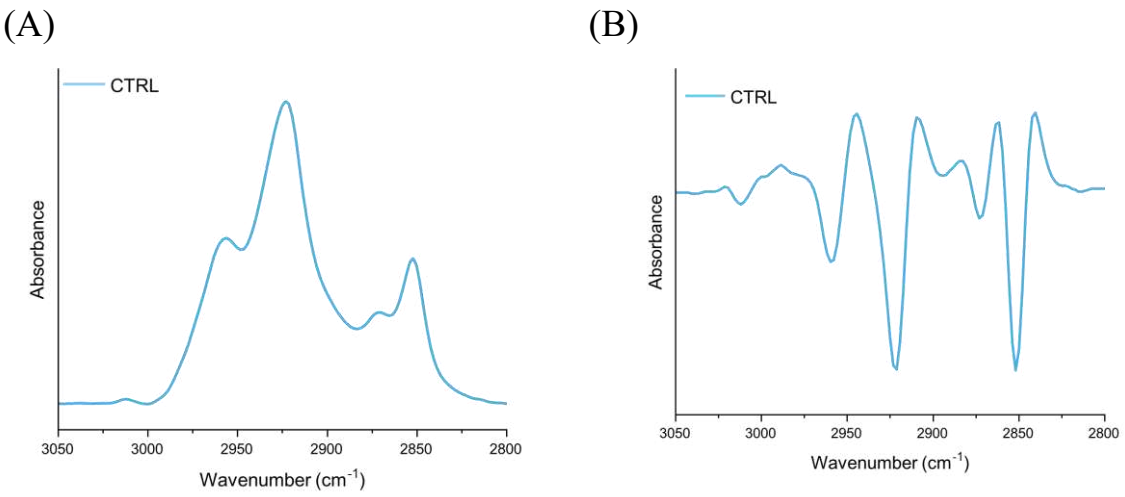


Figura 4.3: Spettro rappresentativo del gruppo di controllo (CTRL) della linea cellulare MDA-MB-231. Lo spettro è riportato nella regione 3050-2800 cm^{-1} sia in Assorbanza, Abs (A) che in Derivata Seconda, DII (B). La posizione dei principali picchi IR (individuati dai punti di minimo dello spettro DII) è riportata come numero d'onda (cm^{-1}).

- *Range 1800-1480 cm^{-1}, relativo alle proteine (Figure 4.4A, B).* In questa regione, troviamo sia le bande a ~1650 cm^{-1} e ~1545 cm^{-1} (rispettivamente Ammide I e II), attribuibili alle vibrazioni del legame peptidico e alle varie strutture secondarie delle proteine, che la banda a ~1740 cm^{-1} relativa allo stretching del legame C=O estereo degli acidi grassi e trigliceridi.

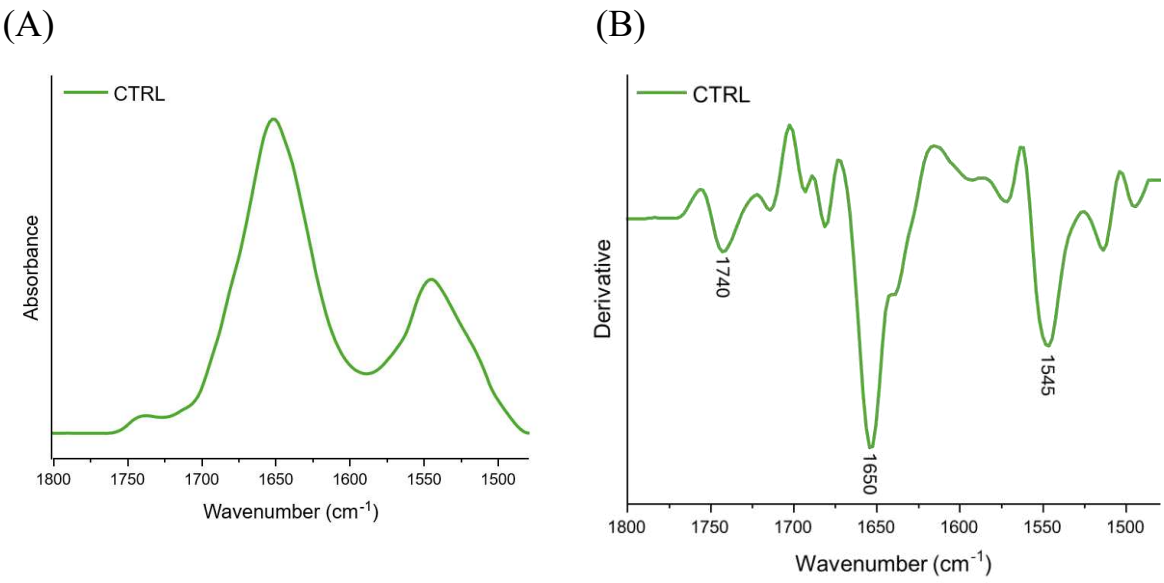


Figura 4.4: Spettro rappresentativo del gruppo di controllo (CTRL) della linea cellulare MDA-MB-231. Lo spettro è riportato nella regione 1800-1480 cm^{-1} sia in Assorbanza, Abs (A) che in Derivata Seconda, DII (B). La posizione dei principali picchi IR (individuati dai punti di minimo dello spettro DII) è riportata come numero d'onda (cm^{-1}).

- *Range 1310-900 cm^{-1}, relativo agli acidi nucleici e ai carboidrati (Figura 4.5A, B).* In questa regione, troviamo diverse bande attribuibili agli acidi nucleici: ~1237 cm^{-1} e ~1084 cm^{-1}, rispettivamente stretching asimmetrico e simmetrico dei gruppi fosfato PO_2^- degli acidi nucleici; ~998 cm^{-1}, vibrazione del ribosio del RNA; ~968 cm^{-1}, vibrazione del backbone della doppia elica di DNA, e ~935 cm^{-1}, vibrazione dell'elica sinistrorsa dello Z-DNA. Troviamo anche la banda a ~1170 cm^{-1}che indica la presenza dei gruppi C-OP che vengono utilizzati come indicatore tumorigenico, e la banda a ~1064 cm^{-1} che indica lo stretching del legame C-O dei carboidrati.

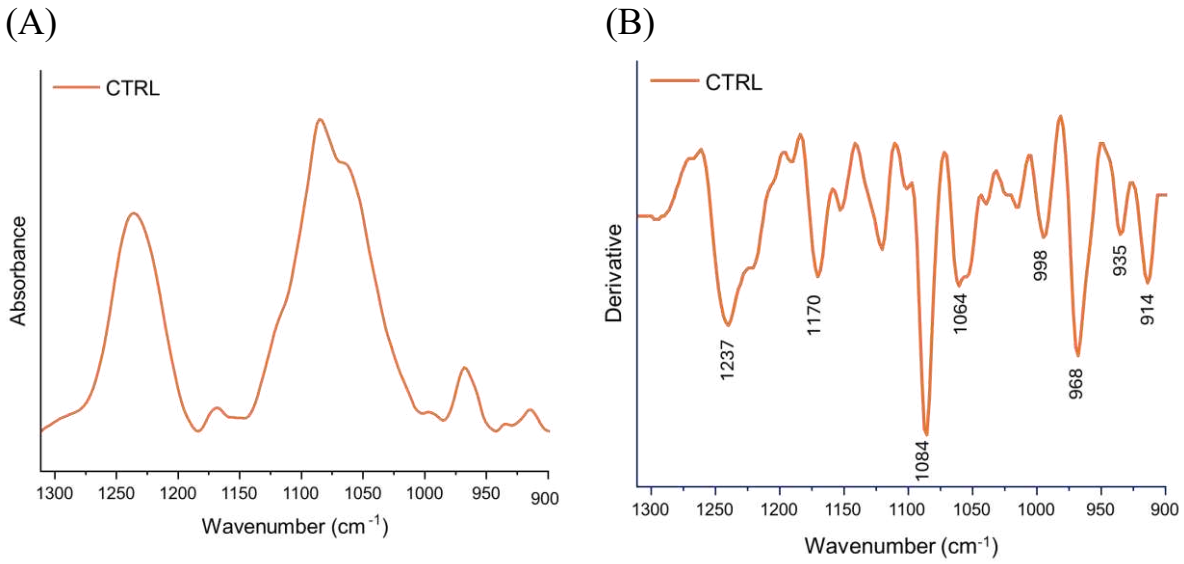


Figura 4.5: Spettro rappresentativo del gruppo di controllo (CTRL) della linea cellulare MDA-MB-231. Lo spettro è riportato nella regione 1310-900 cm^{-1} sia in Assorbanza, Abs (A) che in Derivata Seconda, DII (B). La posizione dei principali picchi IR (individuati dai punti di minimo dello spettro DII) è riportata come numero d'onda (cm^{-1}).

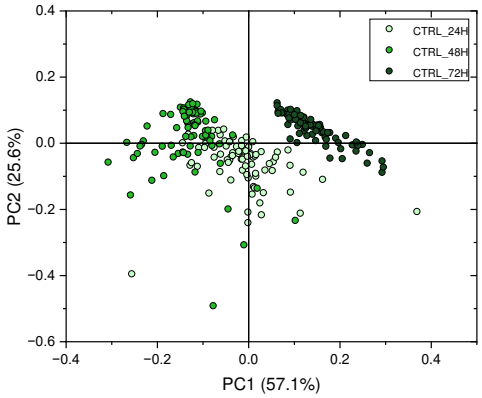
4.3 Analisi multivariata delle diverse popolazioni cellulari: valutazione delle modificazioni spettrali a seguito del silenziamento e del trattamento chemioterapico

Gli spettri IR dei vari gruppi sperimentali, opportunamente processati come descritto nella sezione 3.5 - Materiali e Metodi, sono stati quindi sottoposti ad analisi multivariata; in particolare l'Analisi delle Componenti Principali (PCA) ha permesso di verificare la presenza di eventuali modificazioni spettrali

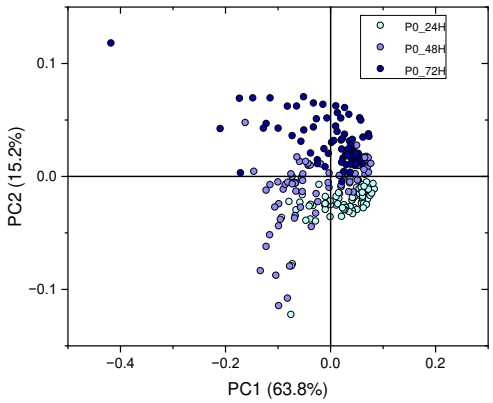
attribuibili sia al silenziamento del gene PON2 che al trattamento con cisplatino.

L'analisi è stata dapprima condotta nell'intervallo spettrale 1800-900 cm^{-1}, diagnostico per la componente proteica e per gli acidi nucleici. Prima di tutto abbiamo analizzato le cellule *wild type* ai tre tempi (CTRL-24H, CTRL-48H, e CTRL-72H). Lo scores plot riportato in Figura 4.6A, mostra una modesta separazione fra le cellule del controllo a 24 e 48 ore, che risultano invece separate rispetto alle cellule a 72 ore lungo la PC1 (varianza: 57.1%). La stessa analisi eseguita sulle cellule trasfettate con il plasmide vuoto ai tre diversi tempi (P0-24H, P0-48H, e P0-72H) ha mostrato una certa sovrapposizione fra le tre popolazioni spettrali (Figura 4.6B). Infine, per quanto riguarda le cellule trasfettate con il plasmide pieno, osservate ai tre tempi (P647-24H, P647-48H, e P647-72H), i gruppi a 24 e 48 ore sono colocalizzati mentre il gruppo a 72 ore risulta parzialmente separato lungo PC2 (varianza: 28.3%) (Figura 4.6C). In tutti e tre i casi, i risultati ottenuti dalle PCA sono in accordo con quanto osservato nell'MTT assay.

(A)



(B)



(C)

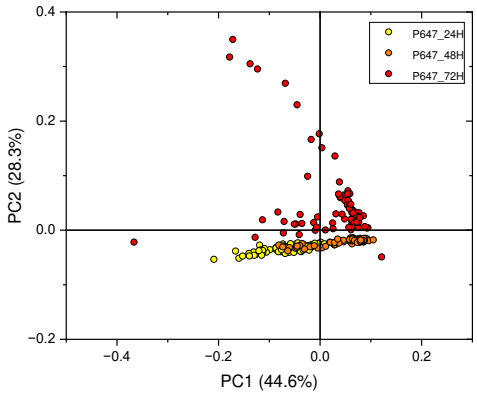
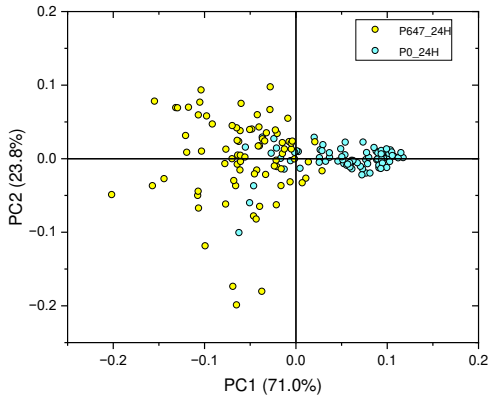


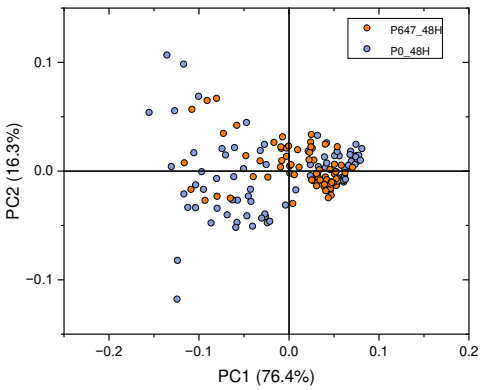
Figura 4.6: PCA scores plot relativi alle seguenti popolazioni spettrali nella regione 1800-900 cm^{-1} dopo 24, 48 e 72 ore: (A) cellule *wild type* (CTRL); (B) cellule trasfettate con il plasmide vuoto (P0), e (C) cellule trasfettate con il plasmide pieno (P647).

A questo punto, per valutare l'efficacia del silenziamento del gene PON2 sulla attività del chemioterapico, abbiamo preso in considerazione solo i gruppi sperimentali P0 e P647 trattati con cisplatino ai tre diversi tempi, e su questi abbiamo effettuato la PCA pairwise rispettivamente a 24, 48 e 72 ore. Per quanto riguarda le 24 ore (Figura 4.7A), l'analisi dello scores plot mette in evidenza una discreta separazione fra P0-24H e P647-24H lungo PC1 (varianza: 71.0%); a 48 ore la separazione è meno marcata (Figura 4.7B), fino a colocalizzazione a 72 ore (Figura 4.7C).

(A)



(B)



(C)

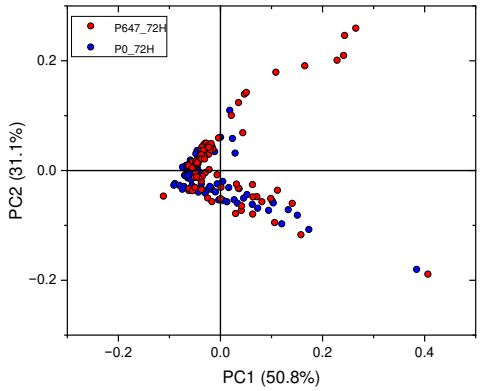


Figura 4.7: Analisi PCA pairwise. Scores plots relativi alle seguenti popolazioni spettrali: (A) P0-24H *vs* P647-24H; (B) P0-48H *vs* P647-48H, e (C) P0-72H *vs* P647-72H.

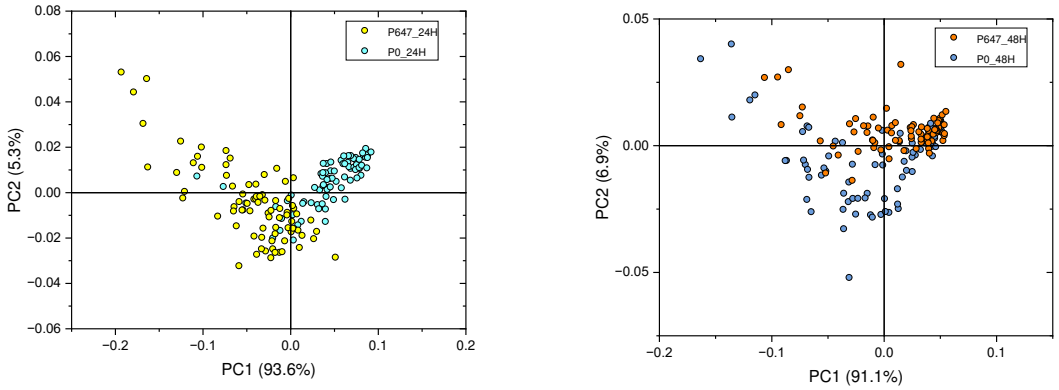
Da questa prima analisi si può affermare quanto segue: (1) l'azione del cisplatino sulle popolazioni cellulari P0 e P647 è diversa a 24 e 48 ore, come evidenziato dalla presenza di differenze spettrali fra le due popolazioni cellulari; (2) a 72 ore, la situazione spettrale e quindi macromolecolare di entrambi i gruppi P0 e P647 è la stessa. Questi risultati suggeriscono che il meccanismo di azione del chemioterapico sia lo stesso nelle cellule che hanno subito il silenziamento e in quelle non silenziate, ma con tempi diversi.

Per valutare in maniera più approfondita quali fossero le macromolecole maggiormente alterate dal silenziamento e dalla azione del cisplatino, abbiamo indagato singolarmente le regioni spettrali rappresentative delle proteine (1800-1480 cm^{-1}) e degli acidi nucleici e carboidrati (1310-900 cm^{-1}),

Per quanto riguarda la regione relativa alle proteine (1800-1480 cm^{-1}), gli scores plot mostrati in Figura 4.8, mostrano che le cellule del gruppo P0 e P647

sono maggiormente separate a 24 ore (P0-24H e P647-24H) e 48 ore (P0-48H e P647-48H) di trattamento mentre risultano parzialmente sovrapposte a 72 ore (P0-72H e P647-72H). Un analogo andamento si osserva negli scores plot relativi alla regione 1310-900 cm^{-1}, rappresentativa degli acidi nucleici e carboidrati (Figura 4.9). Anche in questo caso, le cellule del gruppo P0 e P647 sono più segregate a 24 ore (P0-24H e P647-24H) e 48 ore (P0-48H e P647-48H) di trattamento mentre risultano parzialmente sovrapposte a 72 ore (P0-72H e P647-72H)

(A) (B)



(C)

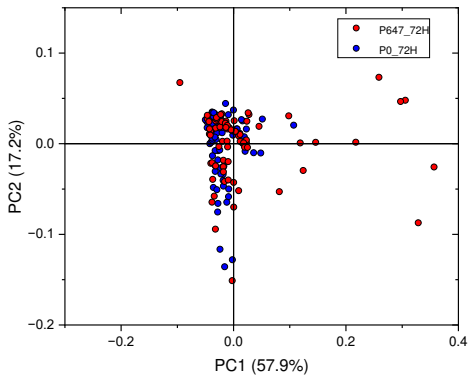
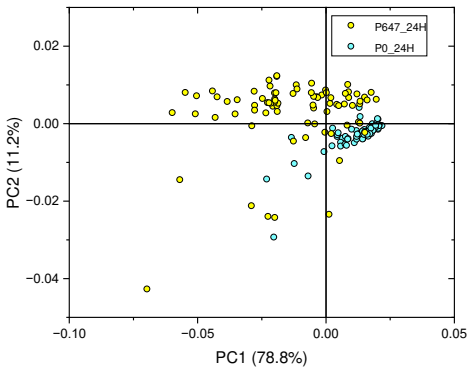
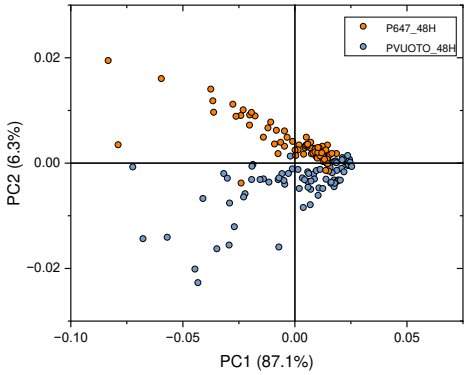


Figura 4.8: Analisi PCA pairwise. Scores plots relativi alle seguenti popolazioni spettrali nella regione spettrale 1800-1480 cm^{-1}: (A) P0-24H *vs* P647-24H; (B) P0-48H *vs* P647-48H, e (C) P0-72H *vs* P647-72H.

(A)



(B)



(C)

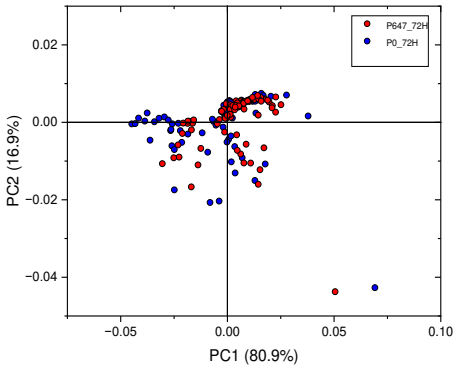


Figura 4.8: Analisi PCA pairwise. Scores plot relativi alle seguenti popolazioni spettrali nella regione spettrale 1310-900 cm^{-1}: (A) P0-24H *vs* P647-24H; (B) P0-48H *vs* P647-48H, e (C) P0-72H *vs* P647-72H.

Si può quindi affermare che l'azione del cisplatino interessi sia la componente proteica che gli acidi nucleici.

4.4 Analisi univariata dei dati spettrali: valutazione delle modificazioni nella composizione macromolecolare

Infine, per identificare quali macromolecole siano maggiormente interessate dall'azione del cisplatino e il relativo meccanismo di azione, e per valutare se il silenziamento del gene PON2 favorisca o meno l'attività del chemioterapico, abbiamo analizzato diversi parametri spettrali, calcolati come riportato nel paragrafo 3.5 - Materiali e Metodi.

La regione spettrale più importante per valutare l'attività del cisplatino sulla linea cellulare MDA-MB231 è sicuramente quella compresa fra 1310 cm^{-1} e 900 cm^{-1}, che contiene tutte le transizioni vibrazionali associabili con i gruppi funzionali presenti negli acidi nucleici (carboidrati, fosfati e scheletro dell'elica). In particolare, si è osservato, dopo il trattamento con cisplatino, un aumento statisticamente significativo: (i) dei gruppi fosfato (A_{1085}, Figura 4.9 A), maggiore in P0 che in P647, (ii) dei gruppi fosfato non H bonded rispetto a quelli H bonded (A_{1240}/A_{1220}, Figura 4.9B), maggiore in P647 che in P0, e (iii) dei gruppi COH non H bonded (A_{1170}; Fig 4.9C), utilizzato come marker tumorale, maggiore in P0 che in P647.

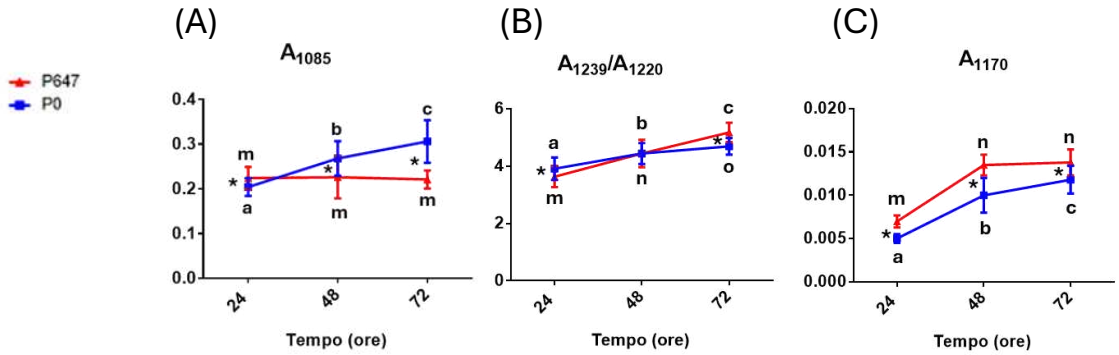


Figura 4.9: Analisi statistica dei seguenti parametri spettrali: (A) A_{1085}, (B) A_{1239}/A_{1220}, e (C) A_{1170} I valori sono riportati come media ± DS. Le differenti lettere indicano differenze statisticamente significative all'interno di ogni gruppo di campioni (P0 e P647) ai differenti time points (One way ANOVA Tukey's multiple comparisons test). Gli asterischi neri indicano differenze statisticamente significative tra P0 e P647 ad ogni time point (Student's t-test). (* $p<0.05$).

Per quanto riguarda i parametri spettrali direttamente attribuibili al DNA e all'RNA, si è osservata, in entrambi i gruppi sperimentali, una diminuzione statisticamente significativa della quantità relativa di DNA (A_{965}, Figura 4.10A), Z-DNA (A_{933}, Figura 4.10B) e RNA (A_{991}, Figura 4.10C), dopo trattamento con cisplatino.

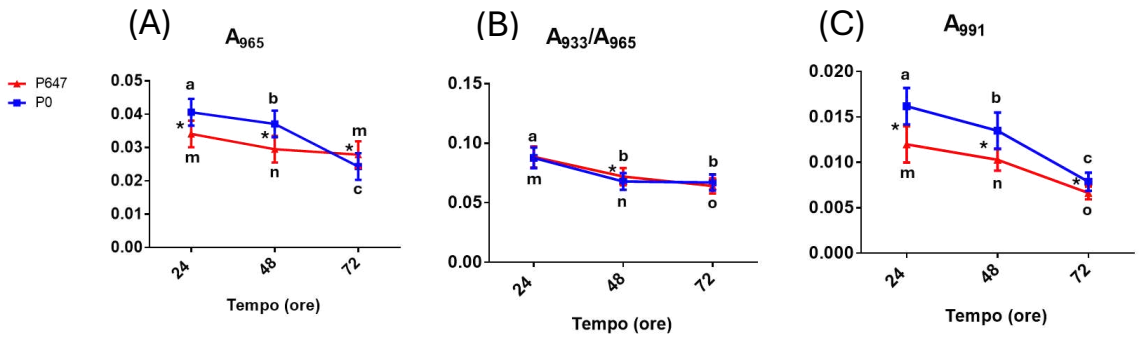


Figura 4.10: Analisi statistica dei seguenti parametri spettrali: (A) A_{965} (indicativo del contenuto del DNA), (B) A_{933}/A_{965} (indicativo del contenuto di Z DNA rispetto alla quantità di DNA totale) e (C) A_{991} (indicativo della presenza di RNA). I valori sono riportati come media ± DS. Le differenti lettere indicano differenze statisticamente significative all'interno di ogni gruppo di campioni (P0 e P647) ai differenti time points (One way ANOVA Tukey's multiple comparisons test). Gli asterischi neri indicano differenze statisticamente significative tra P0 e P647 ad ogni time point (Student's t-test). (* $p<0.05$).

Dalla Figura 4.10A si evince come le cellule P0 mostrino una maggiore concentrazione di DNA rispetto alle P647 nei primi timepoint (24 ore e 48 ore), differenza che tende ad annullarsi dopo 72 ore di trattamento. Tale dato è in accordo con quanto riportato dal MTT assay (Figura 4.1) poiché, il silenziamento genico della PON2 di per sé riduce la proliferazione cellulare e sensibilizza le cellule tumorali al trattamento chemioterapico. Pertanto, a 24 ore e 48 ore, la linea P647 mostra un ridotto contenuto di DNA rispetto P0 ascrivibile a una ridotta proliferazione cellulare derivante sia dal silenziamento genico che da una maggiore citotossicità del cisplatino. Tale differenza tende a scomparire dopo 72 ore di trattamento, probabilmente a causa di una eccessiva

tossicità del chemioterapico, anche questo dato evidenziato dal saggio MTT (Figura 4.1A). È interessante notare come le cellule P0 mostrino un contenuto in RNA maggiore rispetto alla linea P647. Tale dato è in accordo con quanto discusso in precedenza in quanto un minore contenuto in RNA è la diretta conseguenza di una ridotta vitalità cellulare (Figura 4.1A, B).

Sono stati valutati anche altri due parametri che si riferiscono alla quantità di DNA a doppia elica presente nelle cellule rispetto alla quantità di fosfati totali (A_{965}/A_{1085}, Fig 4.11A) ed alla quantità di DNA presente nelle cellule rispetto all'RNA (A_{1020}/A_{1120}, Fig 4.11B).

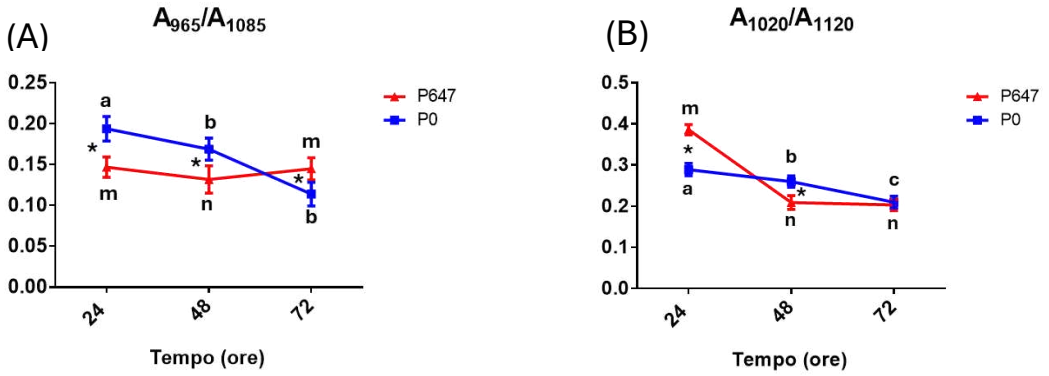


Figura 4.11: Analisi statistica dei seguenti parametri spettrali: (A) A_{965}/A_{1085} (indicativo della quantità di DNA a doppia elica presente rispetto alla quantità di fosfati totali); (B) A_{1020}/A_{1120} (indicativo del contenuto di DNA rispetto all'RNA). I valori sono riportati come media ± DS. Le differenti lettere indicano differenze statisticamente significative all'interno di ogni gruppo di campioni (P0 e P647) ai differenti time points (One way ANOVA Tukey's multiple comparisons test). Gli asterischi neri indicano differenze statisticamente significative tra P0 e P647 ad ogni time point (Student's t-test). (* $p<0.05$).

Il trattamento con il cisplatino provoca una diminuzione nel tempo della doppia elica del DNA rispetto ai fosfati totali (A_{965}/A_{1085}; Figura 4.11A) in P0, mentre

nessuna variazione si osserva in P647. Inoltre, in P0, rispetto al P647, si nota una maggiore concentrazione di doppia elica di DNA a 24 ore che conferma una maggiore attività proliferativa di tali cellule. Tuttavia, le differenze tra le due linee si annullano a 72 ore a causa dell'eccessiva tossicità del chemioterapico. Il trattamento con il chemioterapico provoca anche una diminuzione nel tempo della quantità di DNA rispetto all'RNA (A_{1020}/A_{1120}, Figura 4.11B), maggiore in P647 rispetto a P0. Tale dato è indice di una maggiore sofferenza cellulare nella linea P647 rispetto a P0 (minor percentuale di cellule che proseguono il ciclo cellulare, che viene interrotto a causa dei danni indotti dal chemioterapico).

L'analisi è stata estesa anche alla regione 3050-2800 cm^{-1}, rappresentativa della componente lipidica associabile con la membrana plasmatica. In entrambi i gruppi sperimentali si osserva: (i) un aumento nel tempo statisticamente significativo dei gruppi CH_3 (A_{2957}, Figura 4.12A); (ii) una diminuzione dei gruppi CH_2 (A_{2921}, Figura 4.12B) e (iii) una diminuzione complessiva della lunghezza delle catene alchiliche (A_{2957}/A_{2921}, Figura 4.12C). In entrambi i gruppi si nota inoltre una uguale diminuzione della quantità relativa di acidi grassi e trigliceridi (A_{1740}, Figura 4.12D), anche se è interessante notare che P647 ha un contenuto sempre doppio rispetto a P0.

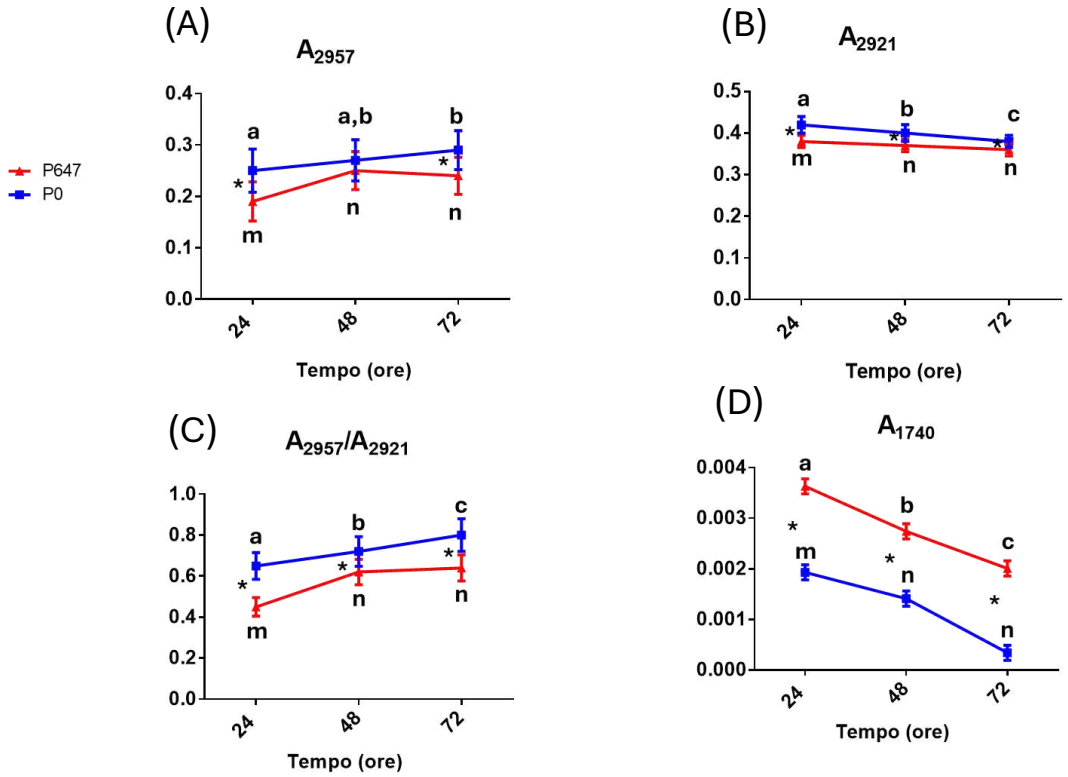


Figura 4.12. Analisi statistica dei seguenti parametri spettrali: (A) A_{2957} (associato alla quantità relativa di gruppi CH_3 nelle catene alchiliche dei lipidi); (B) A_{2921} (associato alla quantità relativa di gruppi CH_2 nelle catene alchiliche dei lipidi); (C) A_{2957}/A_{2921} (rapporto fra i gruppi CH_3 e CH_2, rappresentativo della lunghezza delle catene alchiliche dei lipidi), e (D) A_{1740} (indicativo del contenuto di trigliceridi e acidi grassi). I valori sono riportati come media ± DS. Le differenti lettere indicano differenze statisticamente significative all'interno di ogni gruppo di campioni (P0 e P647) ai differenti time points (One way ANOVA Tukey's multiple comparisons test). Gli asterischi neri indicano differenze statisticamente significative tra P0 e P647 ad ogni time point (Student's t-test). (* $p<0.05$).

Infine, si è voluto verificare se ci fossero cambiamenti a livello del contenuto proteico tramite l'analisi del parametro $A_{\text{Ammide I + Ammide II}}$ (Figura 4.13), il quale resta costante in P0, mentre mostra solo un piccolo aumento fra 24 e 48 ore in P647.

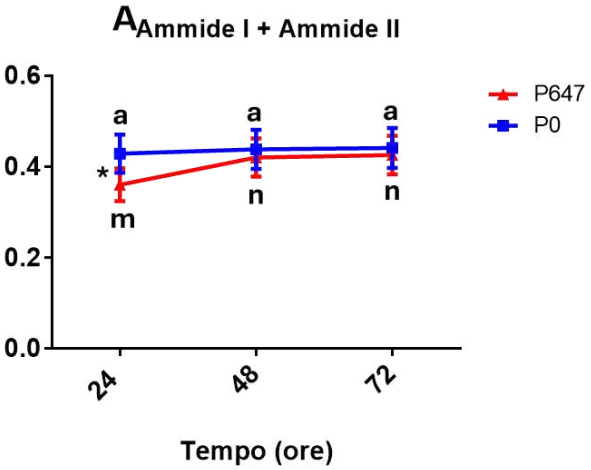


Figura 4.13. Analisi statistica del parametro spettrale $A_{Ammide\ I\ +\ Ammide\ II}$ (indicativo del contenuto proteico). I valori sono riportati come media ± DS. Le differenti lettere indicano differenze statisticamente significative all'interno di ogni gruppo di campioni (P0 e P647) ai differenti time points (One way ANOVA Tukey's multiple comparisons test). Gli asterischi neri indicano differenze statisticamente significative tra P0 e P647 ad ogni time point (Student's t-test). (* $p<0.05$).

5. DISCUSSIONE

La mia tesi sperimentale ha avuto come oggetto di studio il carcinoma mammario triplo negativo (Triple Negative Breast Cancer, TNBC), un sottotipo molecolare di carcinoma della mammella che, in base all'analisi immunoistochimica, risulta essere negativo per l'espressione dei geni del recettore degli estrogeni (ER), recettore del progesterone (PR) e recettore del fattore di crescita epidermico umano 2 (HER2).

Il carcinoma mammario deriva dalla proliferazione incontrollata delle cellule epiteliali che costituiscono i tessuti e i dotti della mammella ed è la neoplasia più frequente tra le donne sia in età fertile che in menopausa. Il carcinoma della mammella si suddivide in diversi sottotipi molecolari, ciascuno dei quali è caratterizzato da differente espressione genica, sensibilità alle terapie e prognosi.

La mancanza di positività a ER, PR e HER2 impedisce l'utilizzo di terapie mirate nel trattamento della neoplasia. Infatti, mentre le pazienti con ER^+ e/o PR^+ beneficiano di una terapia ormonale, e le pazienti $HER2^+$ beneficiano di un trattamento con anticorpo monoclonale, le pazienti affette da TNBC non hanno a disposizione trattamenti mirati che possono essere utilizzati in aggiunta

a chirurgia e chemio- o radio-terapia. Infatti, il trattamento standard del TNBC comprende la chirurgia, la radioterapia e la chemioterapia. Tuttavia, sebbene il TNBC sia un tipo di neoplasia altamente sensibile all'azione dei chemioterapici, nella maggior parte dei casi le pazienti diventano rapidamente refrattarie ai farmaci chemioterapici utilizzati. Pertanto, queste considerazioni unite ad altre caratteristiche tipiche del TNBC quali l'elevata aggressività e la spiccata tendenza a metastatizzare precocemente, concorrono a determinare una prognosi sfavorevole. Per queste ragioni, gli sforzi della comunità scientifica sono finalizzati allo studio dei meccanismi d'azione dei diversi chemioterapici al fine di rendere più efficace la terapia. Tra i chemioterapici più utilizzati c'è il cisplatino, che agisce legandosi al DNA, che viene piegato e quindi danneggiato a livello strutturale in modo irreversibile. Il DNA piegato viene infatti legato dalle proteine HMG (High Mobility Group), le quali impediscono il legame del DNA piegato con le proteine coinvolte nella replicazione, nella trascrizione e nella riparazione e quindi in questo modo inducono la morte cellulare (Dasari et al.,2014).

Recentemente è stato evidenziato il ruolo di un enzima, la Paraoxonasi-2 (PON2), il quale sembrerebbe essere capace di contrastare l'effetto citotossico del cisplatino. Questo enzima intracellulare, appartenente alla famiglia degli enzimi PON, è localizzato su diverse membrane intracellulari ed è risultato

essere espresso in vari tessuti umani. Diversi studi hanno dimostrato che la PON2 è coinvolta in alcune neoplasie, assicurando il corretto funzionamento della catena di trasporto degli elettroni, riducendo la produzione di specie dell'ossigeno e mantenendo l'omeostasi cellulare. Il gene PON2 codifica per la Paraoxonasi-2 umana ed ha attività lattonasica, contribuendo alla difesa antibatterica in particolare nei confronti di *P. aeruginosa*, ma svolge anche un ruolo di protezione dal danno ossidativo e dalla perossidazione lipidica e risulta up-regolato durante lo stress ossidativo (Altenhöfer et al.,2010).

In particolare, all'aumento dell'ossidazione segue un processo infiammatorio cronico con conseguente rilascio di citochine e produzione di ROS, che insieme rappresentano un importante fattore di rischio per l'insorgenza del cancro. Le cellule tumorali sono dotate di sistemi efficienti che le proteggono dalle specie reattive dell'ossigeno permettendo loro di proliferare a discapito delle cellule sane. Diversi studi hanno dimostrato come la PON2 eserciti una azione anti-apoptotica ed è stata osservata la sua overespressione in linee cellule tumorali. L'azione di questo enzima si scontra con l'azione del cisplatino, in quanto il cisplatino causa danno al DNA e quindi attivazione delle vie pro-apoptotiche a seguito dell'eccessivo stress ossidativo. L'azione della PON2 è in grado di detossificare i ROS, riducendo il danno a carico del DNA e inibendo pertanto

l’attivazione dell’apoptosi nella cellula tumorale permettendo la sua sopravvivenza.

Alla luce di queste considerazioni, in uno studio condotto da Campagna et al. nel 2023, è stato eseguito il silenziamento del gene PON2 nella linea di carcinoma della mammella TNBC MDA-MB-231 ed in seguito è stata valutato sia l’effetto del silenziamento genico sulla capacità proliferativa delle cellule sia l’eventuale impatto sull’efficienza del trattamento con diversi chemioterapici, incluso il cisplatino. Dallo studio è emerso che le cellule tumorali che avevano subito il processo di silenziamento genico mostravano una minore proliferazione cellulare rispetto alle cellule *wild-type* (Campagna et al., 2023). In aggiunta, il silenziamento genico della PON2 ha sensibilizzato le cellule MDA-MB-231 all’azione del cisplatino riducendo in maniera statisticamente significativa la vitalità cellulare rispetto al controllo.

La Microspettroscopia Infrarossa a Trasformata di Fourier (FTIRM) è considerata una valida tecnica per valutare i cambiamenti macromolecolari su linee cellulari di vario genere e quindi riconoscere le modificazioni dovute all’azione di un determinato farmaco. La tecnica FTIRM è stata già utilizzata con successo per valutare l’efficacia del cisplatino non solo su linee cellulari tumorali di varia origine, ma anche su cellule primarie e staminali.

(Giorgini et al., 2011; Giorgini et al., 2018; Notarstefano et al., 2020; Notarstefano et al., 2021; Campagna et al., 2023).

In questo studio di tesi, ho utilizzato la tecnica FTIRM per analizzare campioni di cellule MDA-MB-231, con caratteristiche TNBC, di tipo sia *wild-type* (CTRL) che trasfettate con plasmide vuoto (P0) e plasmide codificante per shRNA necessario per il silenziamento del gene PON2 (P647), sottoposti a trattamento per 24, 48 e 72 ore con cisplatino 1μM e verificare se il silenziamento del gene PON2 portasse benefici nel trattamento e quindi un migliore effetto terapeutico.

I risultati ottenuti con l'analisi multivariata degli spettri IR dei vari gruppi sperimentali sono in accordo con il saggio MTT: in generale, si sono osservate differenze spettrali nelle cellule trattate con plasmide vuoto (P0) e pieno (P647) riconducibili sia al tempo di trattamento con il chemioterapico che al silenziamento del gene PON2. In particolare, la maggiore differenza spettrale si è osservata a 24 ore e a 48 ore, mentre a 72 ore i profili spettrali sembrano uniformarsi. Questa osservazione fa quindi supporre che l'azione del cisplatino sia la stessa nei due gruppi P0 e P647, ma avvenga con tempistiche diverse.

L'analisi multivariata ha permesso anche di individuare negli acidi nucleici, le macromolecole maggiormente interessate dal silenziamento del gene PON2 a seguito dell'azione del cisplatino. Tale dato risulta in accordo con quanto

riportato in letteratura, da cui sappiamo che il cisplatino agisce a livello del DNA e quindi degli acidi nucleici modificando l'interazione di questo con le proteine coinvolte nella replicazione e nella riparazione dei danni al DNA stesso (Dasari et al.,2014).

Più nel dettaglio si è potuto osservare, in seguito al trattamento con il chemioterapico, un aumento dei gruppi fosfato (A_{1085}) più in P0 che in P647. Inoltre, abbiamo rilevato un leggero aumento dei gruppi fosfato non H bonded rispetto a quelli H bonded (A_{1239}/A_{1220}) in P647 rispetto a P0 a partire dalle 72 ore.

In generale, il danno a livello del nucleo è deducibile anche sia dall'aumento dei gruppi COH degli zuccheri non H bonded (A_{1170}), un parametro questo che viene utilizzato come indice tumorale nei tessuti, che dalla diminuzione del contenuto di DNA (A_{965}), Z-DNA (A_{933}) e RNA (A_{991}) sia in P0 e P647. In particolare, P647 mostra una minore quantità di DNA a 24 ore e 48 ore rispetto a P0. Tale osservazione è probabilmente il risultato del silenziamento genico che si traduce in una significativa riduzione della proliferazione cellulare; il fatto che tale differenza non sia più osservabile a 72 ore può essere attribuibile al dosaggio del farmaco che determina una elevata citotossicità, fenomeno osservato anche nel saggio MTT. Per quanto riguarda l'RNA, il suo contenuto è risultato maggiore per tutti i timepoint analizzati nella linea cellulare P0

rispetto a P647. Questo risultato è ascrivibile alla maggiore vitalità cellulare rilevata nella linea P0 rispetto a P647, che deriva da una intensa attività trascrizionale caratteristica di cellule non ancora soggette a una intensa azione citotossica del farmaco.

Un altro parametro spettrale che è stato calcolato e che conferma quanto detto sopra è la quantità di DNA a doppia elica rispetto ai fosfati liberi (A_{965}/A_{1085}), che risulta significativamente maggiore in P0 rispetto a P647 a partire dalle 24 ore fino alle 48 ore. Tale differenza tende progressivamente ad annullarsi a 72 ore a causa dell'elevata citotossicità del farmaco.

Anche il parametro spettrale che mette in relazione la quantità di DNA rispetto all'RNA (A_{1020}/A_{1120}) è in linea con i dati riportati precedentemente: si nota infatti una diminuzione del DNA rispetto all'RNA nelle P647 a 24 e 48 ore, in quanto, sebbene le P647 abbiano una quantità di DNA minore rispetto a P0, sono caratterizzate anche da un significativo ridotto livello di RNA. Tuttavia, questa differenza non è più visibile a 72 ore, quando il farmaco è in grado di indurre un massiccio effetto citotossico anche nei controlli.

Oltre alle macromolecole del nucleo, è stata presa in considerazione anche la componente lipidica della membrana plasmatica. In particolare, si è osservata una diminuzione della lunghezza delle catene alchiliche (A_{2957}/A_{2921}), correlata ad un aumento dei gruppi CH_3 (A_{2957}) e ad una diminuzione dei gruppi CH_2

(A_{2921}). Infine, anche il contenuto di acidi grassi e trigliceridi presenti nella membrana plasmatica si ridimensiona (A_{1740}). La riduzione della lunghezza delle catene alchiliche e il ridotto contenuto in acidi grassi e trigliceridi è il risultato dell'azione del chemioterapico. Infatti, l'importante stress ossidativo indotto dal cisplatino si traduce in un danneggiamento della membrana plasmatica che prelude al processo apoptotico.

6. CONCLUSIONI

In conclusione, dai risultati ottenuti da questo studio preliminare, è possibile affermare che il silenziamento *in vitro* del gene PON2 mediato dagli shRNA nella linea cellulare MDA-MB-231 può essere considerato uno strumento utile migliorare la sensibilità di queste cellule al trattamento chemioterapico con il cisplatino. L'analisi dei dati ottenuti ha infatti evidenziato un effetto positivo dovuto al silenziamento del gene PON2 entro le prime 48 ore di trattamento; le differenze al timepoint a 72 ore non sono risultate particolarmente significative, probabilmente a causa della concentrazione di cisplatino utilizzata, che si è rivelata essere eccessivamente tossica livellando i risultati.

L'approccio investigativo utilizzato, basato sull'accoppiamento fra il saggio biochimico MTT, la Microspettroscopia FTIR e l'analisi statistica uni e multivariata dei dati ottenuti, ha comunque permesso di approfondire la conoscenza del meccanismo di chemioresistenza delle cellule tumorali MDA-MB 231 verso il cisplatino e di verificare il coinvolgimento dell'enzima PON2, ponendo le basi per ulteriori studi che possano esplorare il ruolo della PON2 come potenziale target terapeutico per lo sviluppo di una terapia mirata per il trattamento del TNBC.

Come prospettiva futura, sarà utile ripetere l'analisi utilizzando dosi più basse di cisplatino e monitorando altri time point intermedi, per meglio mettere in evidenza l'efficacia di questa procedura.

7. BIBLIOGRAFIA

Abdulkarim, B. S., Cuartero, J., Hanson, J., Deschênes, J., Lesniak, D., & Sabri, S. (2011). Increased Risk of Locoregional Recurrence for Women With T1-2N0 Triple-Negative Breast Cancer Treated With Modified Radical Mastectomy Without Adjuvant Radiation Therapy Compared With Breast-Conserving Therapy. *Journal of Clinical Oncology*, *29*(21), 2852–2858. https://doi.org/10.1200/JCO.2010.33.4714

Adjustable Coupler for MCT Detector in LN Cooled Dewar. (s.d.). *Electrical Optical Components, Inc.* Recuperato 26 giugno 2024, da https://www.eoc-inc.com/laser-diode-index/specialty-fibers-fiber-systems/accessories-for-mid-ir-fiber-spectroscopy/adjustable-coupler-for-mct-detector-in-ln-cooled-dewar/

Ali, R., & Wendt, M. K. (2017). The paradoxical functions of EGFR during breast cancer progression. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, *2*(1), 1–7. https://doi.org/10.1038/sigtrans.2016.42

Altenhöfer, S., Witte, I., Teiber, J. F., Wilgenbus, P., Pautz, A., Li, H., Daiber, A., Witan, H., Clement, A. M., Förstermann, U., & Horke, S. (2010). One enzyme, two functions: PON2 prevents mitochondrial superoxide formation and apoptosis independent from its lactonase activity. *The Journal of Biological Chemistry*, *285*(32), 24398–24403. https://doi.org/10.1074/jbc.M110.118604

Atlas of Breast Surgery | SpringerLink. (s.d.). Recuperato 26 giugno 2024, da https://link.springer.com/book/10.1007/978-3-030-45951-2

Aysola, K., Desai, A., Welch, C., Xu, J., Qin, Y., Reddy, V., Matthews, R., Owens, C., Okoli, J., Beech, D. J., Piyathilake, C. J., Reddy, S. P., & Rao, V. N. (s.d.). Triple Negative Breast Cancer – An Overview. *Hereditary Genetics : Current Research*, *2013*(Suppl 2). https://doi.org/10.4172/2161-1041.S2-001

Berrada, N., Delaloge, S., & André, F. (2010). Treatment of triple-negative metastatic breast cancer: Toward individualized targeted treatments or chemosensitization? *Annals of Oncology*, *21*, vii30–vii35. https://doi.org/10.1093/annonc/mdq279

Campagna, R., Pozzi, V., Giorgini, S., Morichetti, D., Goteri, G., Sartini, D., Serritelli, E. N., & Emanuelli, M. (2023). Paraoxonase-2 is upregulated in triple negative breast cancer and contributes to tumor progression and chemoresistance. *Human Cell*, *36*(3), 1108–1119. https://doi.org/10.1007/s13577-023-00892-9

Campagna, R., Salvolini, E., Pompei, V., Pozzi, V., Salvucci, A., Molinelli, E., Brisigotti, V., Sartini, D., Campanati, A., Offidani, A., & Emanuelli, M. (2021). Nicotinamide N-methyltransferase gene silencing enhances chemosensitivity of melanoma cell lines. *Pigment Cell & Melanoma Research*, *34*(6), 1039–1048. https://doi.org/10.1111/pcmr.12993

Carcinoma mammario papillare – FertilityCenter. (s.d.). Recuperato 27 giugno 2024, da https://www.fertilitycenter.it/mammella/carcinoma-mammario-papillare

Carcinoma mammario papillare – FertilityCenter. (2023, luglio 28). https://www.fertilitycenter.it/mammella/carcinoma-mammario-papillare

Carcinoma mammario tubulare – FertilityCenter. (2020, novembre 12). https://www.fertilitycenter.it/mammella/carcinoma-mammario-tubulare

Carey, L. A., Perou, C. M., Livasy, C. A., Dressler, L. G., Cowan, D., Conway, K., Karaca, G., Troester, M. A., Tse, C. K., Edmiston, S., Deming, S. L., Geradts, J., Cheang, M. C. U., Nielsen, T. O., Moorman, P. G., Earp, H. S., & Millikan, R. C. (2006). Race, Breast Cancer Subtypes, and Survival in the Carolina Breast Cancer Study. *JAMA*, *295*(21), 2492. https://doi.org/10.1001/jama.295.21.2492

Cisplatino. (2024). In *Wikipedia*. https://it.wikipedia.org/w/index.php?title=Cisplatino&oldid=139844584

Cisplatino e DNA. (s.d.). Recuperato 25 giugno 2024, da https://www.pianetachimica.it/mol_mese/mol_mese_2021/03_Cisplatino_e_DNA/Cisplatino_e_DNA.htm

Dasari, S., & Tchounwou, P. B. (2014). Cisplatin in cancer therapy: Molecular mechanisms of action. *European Journal of Pharmacology*, *740*, 364–378. https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2014.07.025

Eliyatkın, N., Yalçın, E., Zengel, B., Aktaş, S., & Vardar, E. (2015). Molecular Classification of Breast Carcinoma: From Traditional, Old-Fashioned Way to A New Age, and A New Way. *The Journal of Breast Health*, *11*(2), 59–66. https://doi.org/10.5152/tjbh.2015.1669

FIG. 3. Hybrid IR FPA with independently optimized signal detection and... (s.d.). ResearchGate. Recuperato 26 giugno 2024, da https://www.researchgate.net/figure/Hybrid-IR-FPA-with-independently-optimized-signal-detection-and-readout-a-indium-bump_fig20_259659809

Fig. 7.3 Interferometro di Michelson. (s.d.). ResearchGate. Recuperato 25 giugno 2024, da https://www.researchgate.net/figure/Interferometro-di-Michelson_fig2_300575206

Freudenberg, J. A., Wang, Q., Katsumata, M., Drebin, J., Nagatomo, I., & Greene, M. I. (2009). The role of HER2 in early breast cancer metastasis and the origins of resistance to HER2-targeted therapies. *Experimental and molecular pathology*, *87*(1), 1–11. https://doi.org/10.1016/j.yexmp.2009.05.001

Gene Silencers | Santa Cruz Biotechnology. (s.d.). Recuperato 26 giugno 2024, da https://www.scbt.com/it/whats-new/gene-silencers

Giorgini, E., Sabbatini, S., Rocchetti, R., Notarstefano, V., Rubini, C., Conti, C., Orilisi, G., Mitri, E., Bedolla, D. E., & Vaccari, L. (2018). *In vitro* FTIR microspectroscopy analysis of primary oral squamous carcinoma cells treated with cisplatin and 5-fluorouracil: A new spectroscopic approach for studying the drug–cell interaction. *The Analyst*, *143*(14), 3317–3326. https://doi.org/10.1039/C8AN00602D

Granit, A., Mishra, K., Barasch, D., Peretz-Yablonsky, T., Eyal, S., & Kakhlon, O. (2022). Metabolomic profiling of triple negative breast cancer cells suggests that valproic acid can enhance the anticancer effect of cisplatin. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, *10*, 1014798. https://doi.org/10.3389/fcell.2022.1014798

Hill, D. P., Harper, A., Malcolm, J., McAndrews, M. S., Mockus, S. M., Patterson, S. E., Reynolds, T., Baker, E. J., Bult, C. J., Chesler, E. J., & Blake, J. A. (2019a). Cisplatin-resistant triple-negative breast cancer subtypes: Multiple mechanisms of resistance. *BMC Cancer*, *19*(1), 1039. https://doi.org/10.1186/s12885-019-6278-9

Hill, D. P., Harper, A., Malcolm, J., McAndrews, M. S., Mockus, S. M., Patterson, S. E., Reynolds, T., Baker, E. J., Bult, C. J., Chesler, E. J., & Blake, J. A. (2019b). Cisplatin-resistant triple-negative breast cancer subtypes: Multiple

mechanisms of resistance. *BMC Cancer*, *19*(1), 1039. https://doi.org/10.1186/s12885-019-6278-9

Jesinger, R. A. (2014). Breast Anatomy for the Interventionalist. *Techniques in Vascular & Interventional Radiology*, *17*(1), 3–9. https://doi.org/10.1053/j.tvir.2013.12.002

Koh, M. Z., Ho, W. Y., Yeap, S. K., Ali, N. M., Boo, L., & Alitheen, N. B. (2021). Regulation of Cellular and Cancer Stem Cell-Related Putative Gene Expression of Parental and CD44+CD24− Sorted MDA-MB-231 Cells by Cisplatin. *Pharmaceuticals*, *14*(5), Articolo 5. https://doi.org/10.3390/ph14050391

La teoria dell'elettromagnetismo. (s.d.). Recuperato 26 giugno 2024, da https://www.andreaminini.org/fisica/elettromagnetismo/teoria-dell-elettromagnetismo

Lehmann, B. D., Bauer, J. A., Chen, X., Sanders, M. E., Chakravarthy, A. B., Shyr, Y., & Pietenpol, J. A. (2011). Identification of human triple-negative breast cancer subtypes and preclinical models for selection of targeted therapies. *The Journal of Clinical Investigation*, *121*(7), 2750–2767. https://doi.org/10.1172/JCI45014

Li, L., Bi, X., Sun, H., Liu, S., Yu, M., Zhang, Y., Weng, S., Yang, L., Bao, Y., Wu, J., Xu, Y., & Shen, K. (2018). Characterization of ovarian cancer cells and

tissues by Fourier transform infrared spectroscopy. *Journal of Ovarian Research*, *11*(1), 64. https://doi.org/10.1186/s13048-018-0434-8

Manco, G., Porzio, E., & Carusone, T. M. (2021). Human Paraoxonase-2 (PON2): Protein Functions and Modulation. *Antioxidants*, *10*(2), 256. https://doi.org/10.3390/antiox10020256

Notarstefano, V., Belloni, A., Sabbatini, S., Pro, C., Orilisi, G., Monterubbianesi, R., Tosco, V., Byrne, H. J., Vaccari, L., & Giorgini, E. (2021). Cytotoxic Effects of 5-Azacytidine on Primary Tumour Cells and Cancer Stem Cells from Oral Squamous Cell Carcinoma: An In Vitro FTIRM Analysis. *Cells*, *10*(8), 2127. https://doi.org/10.3390/cells10082127

Notarstefano, V., Gioacchini, G., Byrne, H. J., Zacà, C., Sereni, E., Vaccari, L., Borini, A., Carnevali, O., & Giorgini, E. (2019). Vibrational characterization of granulosa cells from patients affected by unilateral ovarian endometriosis: New insights from infrared and Raman microspectroscopy. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, *212*, 206–214. https://doi.org/10.1016/j.saa.2018.12.054

Notarstefano, V., Sabbatini, S., Pro, C., Belloni, A., Orilisi, G., Rubini, C., Byrne, H. J., Vaccari, L., & Giorgini, E. (2020). Exploiting fourier transform infrared and Raman microspectroscopies on cancer stem cells from oral squamous cells

carcinoma: New evidence of acquired cisplatin chemoresistance. *The Analyst*, *145*(24), 8038–8049. https://doi.org/10.1039/D0AN01623C

OnLine, S. di M. (2017, novembre 2). Mammella: Anatomia e funzioni del seno e delle ghiandole mammarie. *MEDICINA ONLINE*. https://medicinaonline.co/2017/11/02/mammella-anatomia-e-funzioni-del-seno-e-delle-ghiandole-mammarie/

Perou, C. M., Sørlie, T., Eisen, M. B., Van De Rijn, M., Jeffrey, S. S., Rees, C. A., Pollack, J. R., Ross, D. T., Johnsen, H., Akslen, L. A., Fluge, Ø., Pergamenschikov, A., Williams, C., Zhu, S. X., Lønning, P. E., Børresen-Dale, A.-L., Brown, P. O., & Botstein, D. (2000). Molecular portraits of human breast tumours. *Nature*, *406*(6797), 747–752. https://doi.org/10.1038/35021093

Polyak, K. (2007). Breast cancer: Origins and evolution. *The Journal of Clinical Investigation*, *117*(11), 3155–3163. https://doi.org/10.1172/JCI33295

Salgia, R., & Kulkarni, P. (2018). The Genetic/Non-genetic Duality of Drug 'Resistance' in Cancer. *Trends in Cancer*, *4*(2), 110–118. https://doi.org/10.1016/j.trecan.2018.01.001

Siegel, R. L., Giaquinto, A. N., & Jemal, A. (2024). Cancer statistics, 2024. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, *74*(1), 12–49. https://doi.org/10.3322/caac.21820

Sintomi e fattori di rischio del cancro al seno Stock Vector. (s.d.). Adobe Stock. Recuperato 30 luglio 2024, da https://stock.adobe.com/images/sintomi-e-fattori-di-rischio-del-cancro-al-seno/65098410

Stretching+Bending+simmetrico+asimmetrico+Nel+piano+Scissoring+Rocking.jpg (1024×768). (s.d.). Recuperato 26 giugno 2024, da https://slideplayer.it/slide/11848857/66/images/87/Stretching+Bending+simmetrico+asimmetrico+Nel+piano+Scissoring+Rocking.jpg

Sun, Y.-S., Zhao, Z., Yang, Z.-N., Xu, F., Lu, H.-J., Zhu, Z.-Y., Shi, W., Jiang, J., Yao, P.-P., & Zhu, H.-P. (2017). Risk Factors and Preventions of Breast Cancer. *International Journal of Biological Sciences*, *13*(11), 1387–1397. https://doi.org/10.7150/ijbs.21635

Tchounwou, P. B., Dasari, S., Noubissi, F. K., Ray, P., & Kumar, S. (2021). Advances in Our Understanding of the Molecular Mechanisms of Action of Cisplatin in Cancer Therapy. *Journal of Experimental Pharmacology*, *13*, 303–328. https://doi.org/10.2147/JEP.S267383

Tecniche Spettroscopiche e Identificazione di Composti Organici—Cinzia Chiappe, Felicia D'Andrea. (s.d.). Recuperato 26 giugno 2024, da https://www.edizioniets.com/scheda.asp?n=9788846708779

Thorn, C. F., Oshiro, C., Marsh, S., Hernandez-Boussard, T., McLeod, H., Klein, T. E., & Altman, R. B. (2011). Doxorubicin pathways: Pharmacodynamics and

adverse effects. *Pharmacogenetics and Genomics*, *21*(7), 440–446. https://doi.org/10.1097/FPC.0b013e32833ffb56

Using Fourier transform IR spectroscopy to analyze biological materials | Nature Protocols. (s.d.). Recuperato 26 giugno 2024, da https://www.nature.com/articles/nprot.2014.110

Viaggio attraverso lo spettro elettromagnetico. (2012, gennaio 13). *Anniluce*. https://anniluce.wordpress.com/2012/01/13/viaggio-attraverso-lo-spettro-elettromagnetico/

Wahba, H. A., & El-Hadaad, H. A. (2015). Current approaches in treatment of triple-negative breast cancer. *Cancer Biology & Medicine*, *12*(2), 106–116. https://doi.org/10.7497/j.issn.2095-3941.2015.0030

Weigelt, B., Geyer, F. C., & Reis-Filho, J. S. (2010). Histological types of breast cancer: How special are they? *Molecular Oncology*, *4*(3), 192–208. https://doi.org/10.1016/j.molonc.2010.04.004

Witte, I., Altenhöfer, S., Wilgenbus, P., Amort, J., Clement, A. M., Pautz, A., Li, H., Förstermann, U., & Horke, S. (2011). Beyond reduction of atherosclerosis: PON2 provides apoptosis resistance and stabilizes tumor cells. *Cell Death & Disease*, *2*(1), e112–e112. https://doi.org/10.1038/cddis.2010.91

Zagami, P., & Carey, L. A. (2022). Triple negative breast cancer: Pitfalls and progress. *Npj Breast Cancer*, *8*(1), 1–10. https://doi.org/10.1038/s41523-022-00468-0

Zhang, N., Yin, Y., Xu, S.-J., & Chen, W.-S. (2008). 5-Fluorouracil: Mechanisms of Resistance and Reversal Strategies. *Molecules*, *13*(8), 1551–1569. https://doi.org/10.3390/molecules13081551

RINGRAZIAMENTI

Un ringraziamento sincero va alla mia relatrice, la Prof.ssa Elisabetta Giorgini per i consigli, la costante attenzione nei miei confronti e per essere stata per me una guida in questo percorso di tesi.

Ringrazio il mio correlatore, il dottor Roberto Campagna per il tempo dedicatomi, le delucidazioni e la pazienza.

Ringrazio di cuore la dottoressa Chiara Santoni, per avermi preso per mano ed accompagnata al traguardo finale, spronandomi ogni giorno a credere in me stessa. Senza di te non sarebbe stato lo stesso.