



UNIVERSITÀ  
DEGLI STUDI  
FIRENZE

Scuola di  
Scienze Matematiche  
Fisiche e Naturali

Corso di Laurea in Chimica  
Curriculum Tecnologie Chimiche

# **Nuovo sistema di trasporto della metformina all'interno di cellule tumorali pancreatiche**

## **New delivery system of metformin into pancreatic cancer cells**

**Relatore**

Paolo Paoli

**Correlatore**

Stefano Cicchi

**Candidato**

Serena Rigacci

# Indice

1 Prefazione e scopo del lavoro.....	2
2 Introduzione.....	4
2.1 Struttura e proprietà dei CNTs.....	4
2.2 Funzionalizzazione dei CNTs.....	8
2.2.1 Ossidazione dei CNTs e link basato sui gruppi carbossilici.....	9
2.2.2 Reazioni con radicali.....	10
2.3 Drug Delivery.....	11
2.3.1 Endocitosi ed “effetto ago” .....	12
2.3.2 Tossicità dei CNTs.....	14
2.4 I tumori.....	15
2.5 Metabolismo delle cellule tumorali.....	17
2.6 Carcinoma pancreatico.....	21
2.7 Prospettive terapeutiche.....	25
2.7.1 La metformina come farmaco antitumorale.....	26
2.7.2 Drug delivery della metformina.....	30
2.8 Nanoparticelle come sistemi drug delivery.....	30
2.8.1 Nanoparticelle in linee cellulari cancerogene pancreatiche.....	31
2.8.2 CNTs in cellule cancerogene pancreatiche PANC-1.....	32
3 Descrizione del lavoro e risultati.....	33
3.1 Preparazione dei CNTs.....	33
3.1.1 Ossidazione dei CNTs.....	33
3.2 Attivazione dei gruppi acidi dei CNTs carbossilati.....	36
3.2.1 Clorurazione dei CNTs con (COCl) <sub>2</sub> .....	36
3.2.2 Attivazione dei gruppi acidi dei CNTs con NHS.....	38
3.3 Decorazione dei CNTs attivati con metformina.....	41
3.3.1 Decorazione dei CNTs clorurati con metformina.....	41
3.3.2 Decorazione dei CNT-NHS con metformina.....	44
3.4 Test biologici.....	45
3.4.1 Internalizzazione dei CNTs.....	45
3.4.2 Tossicità dei CNTs caricati con metformina.....	51

3.4.3 Tossicità dei CNTs salificati con metformina e funzionalizzati covalentemente col selettore.....	54
3.4.4 Tossicità dei CNTs funzionalizzati con metformina, privi di selettore.....	55
4 Conclusione e sviluppi futuri.....	56
5 Parte sperimentale.....	58
5.1 Reagenti e strumentazione.....	58
5.2 Acronimi e formule utilizzate.....	58
5.3 Sintesi effettuate.....	59
Ossidazione dei CNTs (2).....	59
Clorurazione dei CNTs con (COCl) <sub>2</sub> (3).....	60
Attivazione dei gruppi acidi dei nanotubi con NHS (4).....	61
Decorazione dei nanotubi clorurati con metformina (5).....	62
Decorazione dei CNT-NHS con metformina (6).....	63
5.4 Test biologici.....	64
Colture cellulari.....	64
Test d'internalizzazione: citofluorimetria ottica .....	64
Test di tossicità: MTT.....	65
6 Bibliografia.....	65

# 1 Prefazione e scopo del lavoro

Nell'ultimo secolo abbiamo assistito ad una evoluzione esponenziale della tecnologia e ad un notevole progresso in molte discipline compresa quella medica. Le scoperte effettuate in questo settore hanno consentito di sconfiggere molte malattie importanti che sino a pochi decenni fa provocavano la morte di milioni di persone. Questo grazie alla scoperta dei vaccini, di farmaci fondamentali come gli antibiotici, antidiabetici e farmaci per la terapia delle malattie cardiovascolari. Negli ultimi anni la ricerca ha fatto sì che venissero scoperte terapie e molte sostanze in grado di colpire lo sviluppo e la diffusione di vari tipi di tumore, come i chemioterapici, gli anticorpi monoclonali e farmaci immunoterapici. Tuttavia resta ancora molto da fare per riuscire a controllare la crescita di tumori particolarmente aggressivi quali il tumore del pancreas, che ad oggi è uno dei più difficili da combattere.

L'intervento chirurgico, quando ancora la malattia è soltanto localizzata, resta ad oggi la principale terapia, ma purtroppo in molti casi la diagnosi di questa malattia viene effettuata all'insorgenza dei sintomi, che compaiono soltanto quando la patologia si è ormai già diffusa e l'asportazione chirurgica appunto diviene insostenibile.

Altre terapie come la radioterapia e l'uso di sostanze oncotossiche costituiscono armi importantissime nella lotta ai tumori maligni sia quando la malattia è localizzata che quando si è diffusa in più organi, in quanto le cellule tumorali hanno la capacità di diffondersi in più distretti dell'organismo rendendo la lotta a questa malattia ancora più difficile.

I farmaci utilizzati spesso però, oltre ad essere nocivi per le cellule tumorali lo sono anche per quelle sane, e la maggior parte di essi causa effetti collaterali molto gravi, e talora, addirittura fatali.

Si è reso quindi necessario studiare metodi più selettivi che consentissero l'utilizzo dei farmaci oncosoppressori con un'azione più mirata e specifica, ed in grado di colpire solo le cellule tumorali. Questi farmaci "intelligenti" permetterebbero di ridurre la dose di farmaco, indirizzandolo solo dove esso sia necessario, evitando così di interessare le cellule sane dell'organismo.

Un metodo per rendere più selettivo il trasporto dei farmaci è quello che prevede l'utilizzo dei nanotubi di carbonio (CNTs).

I CNTs sono attualmente tra i nanosistemi più studiati come sistemi drug delivery, essi sono in grado di attraversare le membrane cellulari in modo efficace senza danneggiarle e rilasciare

all'interno delle cellule le molecole con le quali sono stati funzionalizzati.

Sebbene il loro preciso meccanismo di internalizzazione (endocitosi od "effetto ago") non sia ben chiaro, è riconosciuta la loro capacità di entrare nelle cellule indipendentemente dalla funzionalizzazione che presentano e dal tipo di cellule [Jabr-Milane L.S et al 2008, Kam N.W.S., 2006]. Inoltre la loro alta area superficiale prevede molti siti di ancoraggio per le molecole, consentendo così una derivatizzazione polivalente.

Da numerosi studi effettuati sia *in vitro* che *in vivo* è stato dimostrato che i CNTs funzionalizzati chimicamente risultano biocompatibili con il mezzo biologico ed il loro comportamento può essere modulato dal tipo e grado di funzionalizzazione [Kam N.W.S., 2006, Kostarelos K et al., 2007].

Nel presente lavoro di tesi sono stati quindi sintetizzati nanotubi di carbonio (CNTs) funzionalizzati con metformina come sistema drug delivery verso linee cellulari cancerogene pancreatiche (PANC-1).

Diversi studi clinici hanno dimostrato che la metformina può essere considerata un buon agente chemioterapico o comunque essere utilizzata in combinazione con un chemioterapico, per la sua azione anticancerogena verso cellule che hanno acquisito chemioresistenza durante la terapia.

Questo perché tali cellule possiedono un metabolismo respiratorio e, grazie alla capacità della metformina di inibire la respirazione mitocondriale viene inibita la loro proliferazione, provocando morte cellulare.

La metformina quindi risulta essere di grande utilità sia per il trattamento del cancro che per la riduzione della tossicità associata alla terapia standard.

La parte iniziale del lavoro consiste nella sintesi di CNTs funzionalizzati con metformina tramite funzionalizzazione covalente, passando poi a testarli sulle cellule cancerogene PANC-1.

Sono stati effettuati test d'internalizzazione con un composto funzionalizzato con sonda fluorescente BODIPY e il selettore biotina per verificare se la presenza di quest'ultimo comporta una maggiore selettività ed efficienza d'internalizzazione del sistema di drug delivery nelle cellule.

Inoltre è stata testata la tossicità del sistema funzionalizzato con biotina, come selettore e metformina in modo da verificare, in base al suo effetto sulla vitalità delle cellule, se la presenza del selettore aumentasse l'azione cancerogena della metformina.

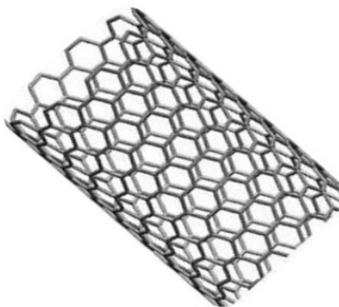
## 2 Introduzione

### 2.1 Struttura e proprietà dei CNTs

I nanotubi di carbonio sono strutture composte unicamente da atomi di carbonio. Gli atomi di carbonio sono disposti su un reticolo esagonale a formare un foglio di grafene arrotolato su se stesso ad assumere una forma cilindrica con diametro nanometrico e lunghezza micrometrica [Aqel A et al., 2012]. Possono essere chiusi alle estremità da due emisferi fullerenici, in tal caso il loro diametro dipenderà dalla dimensione di quest'ultimi.

I CNTs possono essere suddivisi in due categorie:

- Nanotubi a parete singola o **SWCNTs** (Single-Walled Carbon NanoTubes)

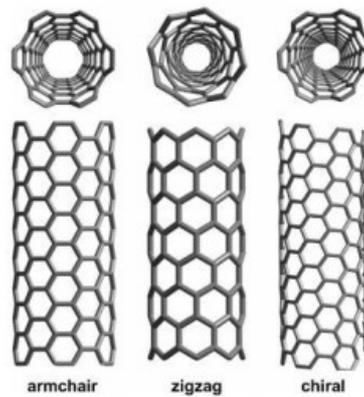


**Figura 1** - Nanotubo di carbonio a parete singola.

Sono formati da un singolo strato grafenico con diametro tra 1 a 5 nm, possiedono una lunghezza variabile da pochi nm ad alcuni  $\mu\text{m}$  ed hanno la tendenza di organizzarsi in fasci chiamati funi (ropes).

Possono essere quasi considerati strutture monodimensionali per l'elevato rapporto lunghezza/diametro che presentano ( $>10^3$ ).

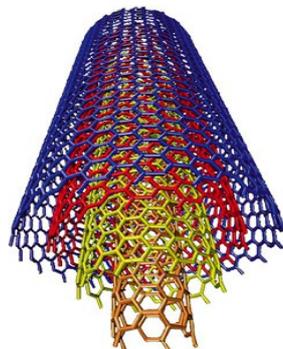
A causa delle diverse disposizioni degli anelli a sei termini intorno al loro asse centrale, quindi dei diversi reticoli di carbonio, i SWCNTs si differenziano tra loro in tre modelli configurazionali; *armchair*, *zig zag* e *chirale*.



**Figura 2** - Tipologie di SWCNT.

Queste configurazioni sono descritte da due parametri strutturali ( $n$ ,  $m$ ), coefficienti che ne determinano il diametro e l'angolo chirale (la loro elicità) e dai quali è possibile predire alcune proprietà chimico-fisiche dei nanotubi come, ad esempio, la conducibilità elettrica.

- Nanotubi a parete multipla o **MWCNTs** (Multi-Walled Carbon NanoTubes)



**Figura 3** - Nanotubo di carbonio a parete multipla.

Sono costituiti da più fogli di grafene avvolti coassialmente l'uno sull'altro con una distanza tra i diversi strati di circa  $3.4 \text{ \AA}$ , presentano un diametro variabile tra 2 a 50 nm e come i SWCNTs raggiungono lunghezze dell'ordine di decine di  $\mu\text{m}$ .

Fu il fisico giapponese Sumio Iijima nel 1991 ad aver dimostrato la loro esistenza rivelando la formazione di "tubi aghiformi" attraverso la scarica ad arco tra due elettrodi di grafite. Grazie alla microscopia elettronica è stata svelata la vera struttura di questi aghi, mostrando che ciascuno di

questi è formato da più cilindri coassiali con un numero che varia tra i 2 ai 50 ed inoltre su ogni cilindro gli esagoni di carbonio tendono a disporsi in una struttura elicoidale intorno all'asse principale dell'ago [Iijima S., 1991].

Furono così definite le caratteristiche strutturali tipiche dei nanotubi, i quali però non risultano essere sempre cilindri perfetti, ma possono anche assumere forme diverse come; nanotubi elicoidali, piegati e ramificati (ad L, Y, T) a causa della presenza di difetti sulle loro pareti. Queste imperfezioni strutturali sono dovute alla comparsa di eptagoni e pentagoni nel reticolo esagonale che porta a formare angolazioni diverse. In generale sono i MWCNTs a mostrare più difetti dei SWCNTs.

Solo dopo il 1991 i nanotubi di carbonio hanno attirato l'attenzione nella comunità scientifica, guadagnando un enorme interesse nella ricerca di tecniche di produzione e nello studio delle loro proprietà che li rende potenzialmente versatili.

Nonostante siano state messe a punto numerose tecniche di produzione dei CNTs su scala industriale, tre sono le tecniche più impiegate:

- Tecnica a scarica d'arco
- Ablazione laser
- CVD (Chemical Vapour Deposition)

Da queste tecniche vengono prodotti sia MWCNTs che SWCNTs con grado di purezza e caratteristiche strutturali (lunghezza e diametro) diversi [Aqel A et al., 2012].

Mentre i MWCNTs non necessitano di alcuna catalisi nei primi due metodi, i SWCNTs necessitano sempre l'uso di catalizzatori metallici sotto forma di nanoparticelle di Co, Ni o Fe. I CNTs ottenuti sono contaminati da prodotti indesiderati come fullereni, carbone amorfo, particelle metalliche e quindi devono subire una successiva purificazione [Ebbesen T.W et al., 1992].

Sono le loro caratteristiche proprietà meccaniche che hanno reso tali nanomateriali particolarmente interessanti da studiare. In quanto presentano un eccellente resistenza alla trazione ed elevato modulo di Young, rendendoli uno dei più forti e resistenti materiali ad essere scoperti. Inoltre la loro struttura tubulare permette di sopportare forti piegamenti e di assorbire

elevata energia elastica per ritornare nella forma originaria senza subire alterazioni strutturali e lesioni, rendendoli così altamente flessibili.

Grazie all'estesa coniugazione elettronica mostrano sorprendenti proprietà di conduttività elettrica e termica che cambiano secondo la loro geometria; infatti i nanotubi *armchair* e configurazioni simili hanno carattere metallico mentre presentano carattere di semiconduttore i nanotubi *chirali* e *zig zag*.

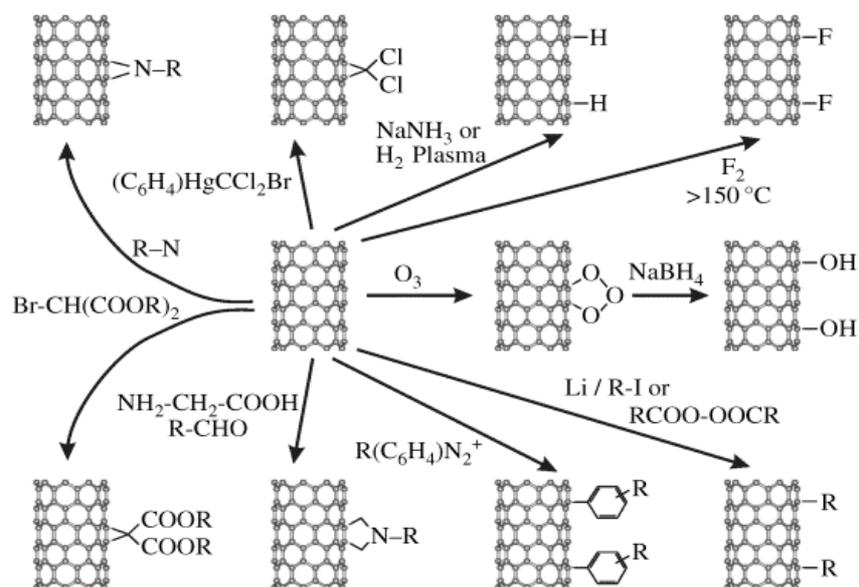
Sono caratterizzati inoltre da un elevato *aspect ratio* e da un'alta area superficiale, che li rendono variamente funzionalizzabili.

Ogni possibile applicazione, ad ogni modo, richiede di superare quello che è il problema principale dei materiali nanostrutturati a base di carbonio, cioè la loro scarsissima solubilità in tutti i solventi. Questa bassa solubilità è legata all'assenza di gruppi funzionali ed alla loro elevata area superficiale che favorisce la formazione di interazioni di van der Waals tra nanotubi invece di favorire il processo di solvatazione. Una possibile soluzione a questo problema consiste nell'inserimento di nuovi gruppi funzionali, nella riduzione della lunghezza dei nanotubi o nella formazione di complessi supramolecolari con opportuni reagenti.

## 2.2 Funzionalizzazione dei CNTs

I CNTs essendo macromolecole coniugate e prive di gruppi funzionali dovrebbero essere chimicamente inerti ed infatti, la loro ridotta reattività verso elettrofili e la scarsissima solubilità in acqua e nei mezzi organici, ne impediscono l'impiego nelle applicazioni pratiche. Ciononostante la piramidalizzazione indotta dalla curvatura ed il disallineamento degli orbitali p degli atomi di carbonio coniugati inducono uno strain locale, rendendoli sufficientemente reattivi [Niyogi S et al., 2002].

La reattività dei CNT può essere essenzialmente ricondotta a quella di sistemi coniugati elettrofili fornendo addotti con forti nucleofili, con radicali, con 1,3-dipoli. L'immagine seguente riassume la reattività dei CNTs.



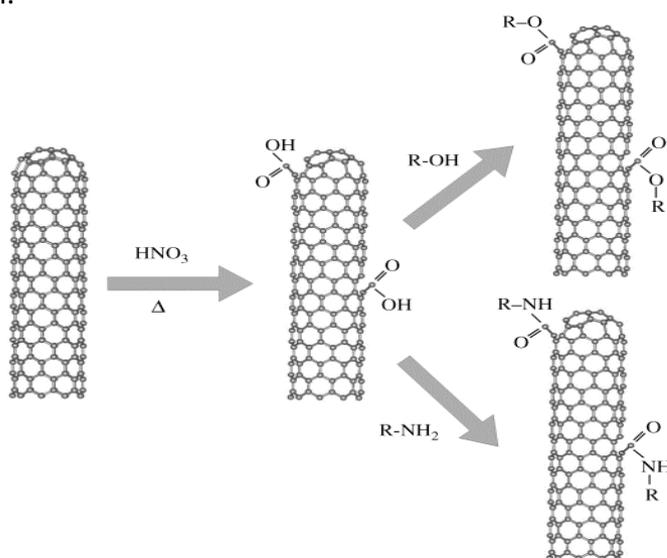
**Figura 4** – Alcune reazioni di funzionalizzazione sui CNTs.

L'inserimento di nuovi gruppi funzionali sulle pareti dei nanotubi aumenta l'interazione con i solventi e sfavorisce le interazioni idrofobiche tra le pareti dei nanotubi. Presentare la reattività dei CNTs esula dai fini di questo lavoro di tesi e quindi ci limiteremo a discutere le reazioni effettivamente utilizzate in questa tesi.

### 2.2.1 Ossidazione dei CNTs e link basato sui gruppi carbossilici

Un avanzamento molto importante per la chimica dei nanotubi è stato lo sviluppo di un processo di ossidazione per CNTs che coinvolge un intenso trattamento con ultrasuoni in una miscela di acido nitrico e solforico concentrati. Queste condizioni drastiche portano all'apertura delle estremità così come alla formazione di buchi nelle pareti, seguita da una incisione ossidativa lungo le pareti in concomitanza con lo sviluppo di  $\text{CO}_2$ . I prodotti finali sono frammenti di nanotubi con lunghezze nell'ordine di 100-300 nanometri le cui estremità e pareti sono decorate con una elevata densità di diversi gruppi funzionali contenenti ossigeno (per lo più gruppi carbossilici). In condizioni meno drastiche, come a riflusso in  $\text{HNO}_3$ , l'accorciamento dei nanotubi può essere minimizzato. La modificazione chimica quindi è limitata per lo più alla apertura delle estremità ed alla formazione di gruppi funzionali sulle posizioni recanti difetti lungo le pareti. La concentrazione dei gruppi carbossilici sui nanotubi può essere determinata spettroscopicamente o con mezzi analitici. Sulla

base di metodi diversi si è visto che la quantità di gruppi carbossilici varia da 1 fino a 8% in base al grado di ossidazione. Tali valori mostrano come oltre all'apertura ossidativa dei cappelli fullerenici si ha l'introduzione di gruppi carbossilici anche lungo la parete. I nanotubi funzionalizzati in questo modo mantengono, essenzialmente, le loro originali proprietà elettroniche e meccaniche. I gruppi carbossilici introdotti per via ossidativa rappresentano siti utili per ulteriori elaborazioni, in quanto consentono la formazione di legami covalenti con altre molecole attraverso la formazione di legami esterei od ammidici.



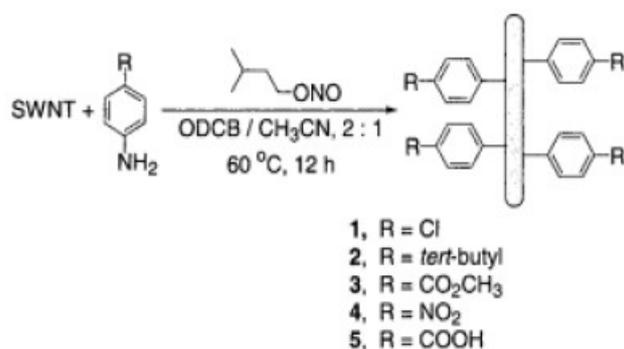
**Figura 5** – I gruppi carbossilici sui CNTs consentono la formazione di legami covalenti; legami esterei ed ammidici.

Le fondamenta per una funzionalizzazione dei nanotubi di carbonio basata su i difetti sono state poste dal gruppo di Smalley nel 1998. Facendo reagire i nanotubi ossidati con cloruro di tionile ottennero i corrispondenti cloruri acilici che vennero fatti successivamente reagire con  $\text{NH}_2\text{-(CH}_2\text{)}_{11}\text{-SH}$  ottenendo le corrispondenti ammidi che furono sfruttate, utilizzando il terminale tiolico, per l'ottenimento di complessi con nanoparticelle di oro. Questo tipo di reazione può essere fatta anche in condizioni molto più blande utilizzando attivanti dei gruppi carbossilici come la DCC od altri agenti di coupling. Con questo metodo i nanotubi possono essere forniti di una gran quantità di unità funzionali e per questo motivo si utilizzano spesso molecole bifunzionali, ad esempio diammine, come linkers. Esempi di questo approccio sono le sintesi di nanotubi dotati di residui dendrimerici, acidi nucleici, enzimi, complessi metallici. Un'altra interessante applicazione dei gruppi carbossilici è quella di trasformarli in anidridi in modo da ottenere anelli di nanotubi. La presenza di gruppi carbossilici, anche modificati come esteri od ammidi, porta alla riduzione delle interazioni di van der Waals tra nanotubi e facilita notevolmente la separazione dei fasci di

nanotubi in tubi individuali. Inoltre l'ancoraggio di gruppi adatti rende i tubi solubili in solventi organici od in acqua, aprendo la porta ad ulteriori elaborazioni possibili attraverso processi chimici classici. Una solubilità in acqua discretamente elevata, qualche decimo di grammo per mL, è stata ottenuta legando attraverso i gruppi carbossilici frammenti polimerici di polietilenglicole. A sua volta utilizzando la formazione di ammidi o di sali di ammonio con ammine a catena lunga, si è ottenuto una buona solubilità in solventi organici. Nanotubi recanti gruppi carbossilici sono stati ancorati a molti tipi di polimeri come polimetilmetacrilato, polistirene, derivati poliamminici ottenendo composti solubili in solventi organici od in altre matrici polimeriche. Inoltre l'elevata solubilità che si ottiene con questi processi consente di elaborare ulteriormente i nanotubi di carbonio in passaggi successivi.

### 2.2.2 Reazioni con radicali

Esistono molti tipi di reazioni radicaliche che coinvolgono i nanotubi di carbonio. Esistono reazioni con radicali centrati sul C, S, O. In questo paragrafo ci limiteremo a vedere la reazione di Tour che prevede la formazione di sali di diazonio a partire da aniline in presenza di isoamilnitrito.



**Figura 6** – Reazione di derivatizzazione dei CNTs con sali di diazonio generati in situ.

## 2.3 Drug Delivery

Nonostante i significativi progressi, le terapie anticancro spesso sono associate con una sistemica indesiderabile tossicità, che è dovuta alla mancata selettività per i tessuti tumorali, in quanto i farmaci citotossici, come altre terapie, non esercitando la loro azione solo su cellule tumorali ma anche su quelle sane, causano gravi effetti collaterali per i pazienti e limitano così la massima dose somministrabile. Un altro grande problema legato alla terapia antineoplastica è lo sviluppo della resistenza multi-farmaco [Tan D.S.W et al., 2010], spesso caratteristica delle cellule tumorali residue, che porta a ridurre significativamente l'efficacia di diversi agenti chemioterapici.

Pertanto è indispensabile sviluppare nuovi metodi con cui i farmaci citotossici possano esercitare la loro piena azione solo sul tessuto tumorale senza arrecare danni agli altri organi attraverso un sistema di drug delivery (DDS), il cui ruolo è di indirizzare selettivamente i farmaci citotossici al tessuto tumorale e di conseguenza ridurre la loro distribuzione in quelli sani limitando così gli effetti collaterali. Un sistema di questo tipo comporterebbe inoltre l'uso di quantitativi minori di farmaco e la riduzione del numero di somministrazioni che richiederebbe la terapia standard per ottenere lo stesso effetto.

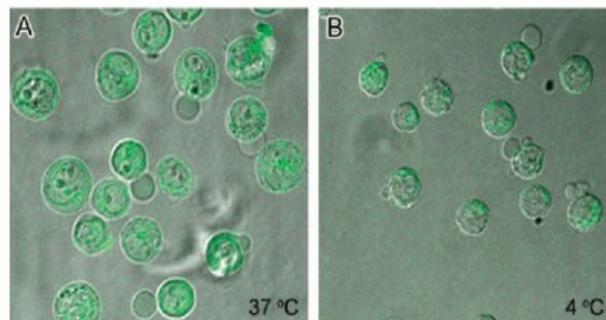
I CNTs possiedono molte caratteristiche interessanti che li rendono attraenti vettori per il drug delivery. Come altri nanovettori, i CNTs si servono del targeting passivo dovuto all'effetto di aumentata permeabilità e ritenzione (EPR), caratteristica dei tessuti tumorali, che essendo costituiti da vasi sanguigni difettosi e scarso drenaggio linfatico, consente un più alto accumulo di macromolecole nel tumore rispetto a quelle di basso peso molecolare che possono diffondersi nella circolazione e subire una rapida eliminazione per via renale [Iyer A.K et al., 2006]. Grazie all'alta area superficiale ed *aspect ratio* dei nanotubi che consentono loro di subire molteplici funzionalizzazioni, questo effetto può essere ulteriormente incrementato, legandoli allo stesso tempo ad anticorpi o selettori specifici per recettori delle cellule tumorali [Heister E et al., 2009]. Inoltre i CNTs funzionalizzati, a causa della loro capacità di attraversare le barriere cellulari, hanno mostrato di essere ottimi trasportatori per il rilascio di farmaci, DNA, proteine ed altre molecole all'interno delle cellule [Prato M et al., 2007, Heister E et al., 2009].

### 2.3.1 Endocitosi ed “effetto ago”

È riconosciuto ormai dalla comunità scientifica che i CNTs sono in grado di attraversare le membrane cellulari, ma il modo in cui lo fanno risulta tuttora controverso. Sebbene siano stati eseguiti numerosi studi per capire quale sia il reale meccanismo di internalizzazione, ancora non è stato stabilito chiaramente, dato che in alcuni casi veniva osservata l'endocitosi [Kam, N.W.S et al., 2006], mentre in altri una diffusione dei CNTs attraverso la membrana cellulare, detto “effetto ago” [Pantarotto D et al., 2004].

- **Endocitosi**

Meccanismo di trasporto in cui il materiale extracellulare viene internalizzato dalla cellula in vescicole formate dalla propria membrana plasmatica, è un processo che richiede consumo di energia da parte della cellula, di conseguenza può essere inibito alle basse temperature. La realizzazione di questo processo è stata dimostrata confrontando la quantità di CNTs marcati con sonda fluorescente internalizzati in cellule tenute in condizioni di incubazione diverse, con il risultato di avere una quantità di CNTs, in cellule incubate a temperature più basse, nettamente inferiore [Kam, N.W.S et al., 2006].

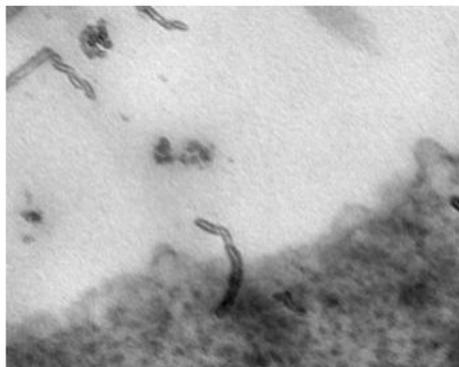


**Figura 7** - Immagini al microscopio confocale di cellule leucemiche incubate con SWCNTs marcati, in diverse condizioni (A) 37°C, (B) 4°C.

- **“Effetto ago”**

Tuttavia in altri studi l'internalizzazione non risulta essere l'endocitosi, poiché nonostante le cellule vengano mantenute in condizioni di incubazione inibitorie per questo processo, non viene

influenzata la loro capacità di internalizzare i CNTs, suggerendo invece un meccanismo in cui i nanotubi si comportino come nano aghi in grado di perforare e diffondersi attraverso il doppio strato lipidico della membrana cellulare senza indurre la morte cellulare [Bianco A et al., 2005].



**Figura 8** - "Effetto ago" di un CNT osservato con microscopio TEM.

Ci sono diversi studi di CNTs come DDS nel campo del trattamento del cancro. CNTs funzionalizzati con chemioterapici come doxorubicina [Fedeli, S et al., 2015, Ali-Boucetta, H et al., 2008], taxani [Liu Z et al., 2008], camptoceina [Wu W et al., 2009] e derivati del platino [Feazell R.P et al., 2007], sia *in vitro* che *in vivo*, mostrano possedere maggior citotossicità rispetto al farmaco libero a causa proprio della maggior internalizzazione che comportano i nanotubi come trasportatori e l'effetto risulta incrementato nel caso in cui sono anche funzionalizzati con specifici selettori.

### **2.3.2 Tossicità dei CNTs**

Nonostante i vantaggi illustrati, i CNTs, sono ancora lontani dall'essere accettati per l'uso clinico, a causa della questione controversa della loro tossicità. Numerosi studi dimostrano risultati contraddittori riguardo al loro profilo di sicurezza [Schipper M.L et al., 2008], alcuni riportano effetti tossici in seguito all'esposizione di vari tipi di cellule ai CNTs ed altri invece riportano risposte insignificanti.

A causa dell'eterogeneità dei CNTs è difficile valutare la loro tossicità, in generale essa dipende da diversi fattori come la purezza, ovvero contenuto di metalli, modifica della superficie, dimensioni, numero di strati e grado di dispersione. Tuttavia, sono le impurezze metalliche che presentano i CNTs *pristine* derivanti dalle tecniche di produzione, il fattore principale nella tossicità, residui di metalli pesanti rilasciati nell'ambiente biologico provocano effetti negativi [Kostarelos K et al., 2009]. Questo problema può essere risolto con la purificazione, il trattamento con acidi riduce il contenuto dei metalli e, con la funzionalizzazione che risulta determinante per la riduzione della

tossicità.

Dai risultati di test *in vivo* i CNTs funzionalizzati risultano possedere, oltre che una migliore biodisponibilità e stabilità in ambienti acquosi e fisiologici rispetto ai CNTs *pristine* che invece hanno la tendenza di formare aggregati, una tossicità intrinseca inferiore [Lacerda L et al., 2008, Ali-Boucetta H et al., 2011].

Anche le dimensioni fisiche, come lunghezza e diametro, sono determinanti nella tossicità dei CNTs *pristine*, infatti strutture più corte [Poland C.A et al., 2008] e spesse [Nagai H et al., 2011] sono meno dannose che più lunghe e fini.

Per utilizzare i CNTs in nanomedicina, è necessario sia studiarne il profilo tossicologico che identificarne i parametri farmacologici come la permanenza nella circolazione sanguigna, la biodistribuzione, l'accumulo e tempo di smaltimento. In generale la concentrazione nel sangue ha una emivita di poche ore [Singh R et al., 2006]. Test *in vivo* sono stati effettuati per valutare sia la tossicità che la biodistribuzione dei CNTs funzionalizzati. Per quanto riguarda la tossicità, è risultato che i CNTs, somministrati per endovena rispettano i parametri clinici di tossicità [Schipper M.L et al., 2008]. Studi sulla biodistribuzione hanno mostrato che vengono escreti per via renale con scarso accumulo di residui nel fegato, milza e polmoni [Al-Jamal K.T et al., 2012]. Questi risultati indicano come il comportamento *in vivo* di questi materiali può essere modulato dal grado e tipo di funzionalizzazione, due aspetti critici che necessitano di essere controllati accuratamente.

Inoltre alcuni lavori recenti hanno mostrato, *in vitro*, una degradazione enzimatica di SWCNTs, presentando dunque, un'altra possibilità per l'eliminazione di questi trasportatori dal corpo una volta che è stata esercitata l'azione terapeutica [Allen B.L et al., 2008]. È stato mostrato che i MWCNTs impiegano più tempo ad essere degradati dei SWCNTs ed il processo sembra avvenire gradualmente dalle pareti esterne verso l'interno. Inoltre i MWCNTs ossidati sono degradati più facilmente rispetto ai *pristine*; questo indica che i difetti indotti dall'ossidazione probabilmente facilitano l'attacco da parte dell'enzima [Zhao Y et al., 2011].

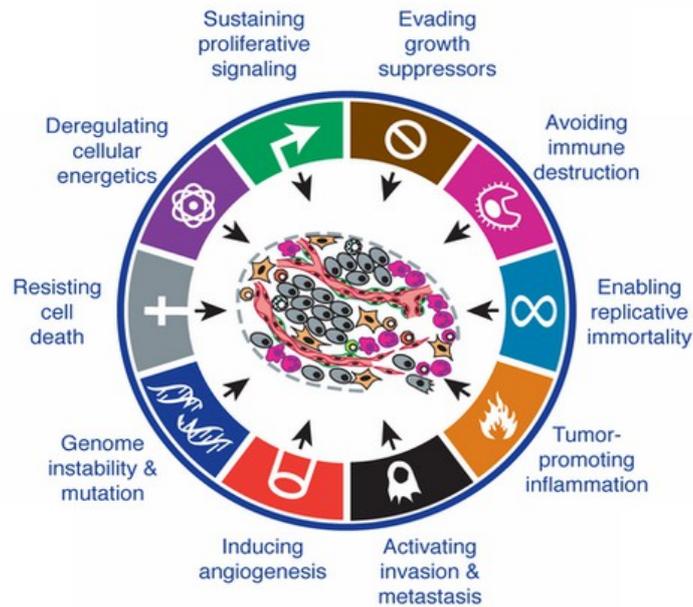
## 2.4 I tumori

Un tumore è il risultato di una crescita anormale di una massa di tessuto, nella quale si ha una divisione incontrollata e scoordinata delle cellule. Il loro numero può crescere così tanto da interferire con la funzione dei tessuti normali e degli organi, causando spesso la morte dell'ospite. La divisione cellulare, normalmente è regolata da una famiglia di fattori di crescita, che stimolano le cellule quiescenti a dividersi o a differenziarsi.

Le alterazioni genetiche sono spesso le principali cause che favoriscono la conversione delle cellule normali in cellule cancerose, favorendo così l'insorgenza dei tumori. La proliferazione cellulare è un processo alquanto complesso, regolato da numerosi geni. I geni che codificano per proteine in grado di stimolare la crescita cellulare sono chiamati oncogeni, mentre i geni che codificano per proteine in grado di inibirla sono chiamati antioncogeni o oncosoppressori. Alterazioni della funzione degli oncogeni o la perdita di un antioncogene, o entrambi, contribuiscono spesso allo sviluppo di un tumore. Generalmente il processo di carcinogenesi, processo in cui le cellule normali si evolvono progressivamente in quelle maligne, richiede l'accumulo di numerose alterazioni e talvolta può durare decenni [Nelson D & Cox MM., 2014].

I difetti genetici possono essere causati dall'azione di agenti ambientali (sostanze tossiche, infezioni virali o radiazioni ad alta energia), essere eventi di natura spontanea e stocastica [Robbins & Cotran., 2010], oppure essere ereditati da uno dei genitori. La carcinogenesi è un processo multifasico in cui le cellule acquisiscono particolari proprietà quali la capacità di crescere in modo indipendente dai fattori di crescita, la perdita di sensibilità nei confronti dei segnali di inibizione della crescita, la resistenza alla morte cellulare programmata (apoptosi), un potenziale replicativo illimitato, la capacità di stimolare l'angiogenesi, invadere i tessuti periferici o organi, consentendo così anche la diffusione del tumore [Hanahan D & Weinberg R.A., 2000].

Studi recenti suggeriscono che altre caratteristiche, acquisite dalle cellule durante la carcinogenesi, sono coinvolte nello sviluppo del tumore. Tra esse ricordiamo la loro capacità di modificare e riprogrammare il metabolismo cellulare in modo da sostenere la proliferazione, la capacità di eludere il controllo del sistema immunitario, una rilevante instabilità genomica, principale causa di mutazioni casuali e riarrangiamenti cromosomici, e l'attivazione dei processi infiammatori [Hanahan D & Weinberg RA., 2011].



**Figura 9** – Caratteristiche delle cellule tumorali.

I tumori sono composti da popolazioni di cellule morfologicamente eterogenee e con differenti funzionalità. Nonostante l'eterogeneità delle cellule, ricerche successive hanno evidenziato la natura monoclonale dei tumori. Questa apparente contraddizione può essere spiegata ipotizzando che siano le variazioni nel microambiente tumorale a favorire la selezione di molteplici subcloni genetici, favorendo così la formazione di masse tumorali molto eterogenee [Dalerba P et al., 2007]. Nei tumori possono così coesistere cellule tumorali caratterizzate da un alto tasso di proliferazione, le quali possono poi differenziare in numerosi sottotipi e sottoinsiemi di cellule e, cellule caratterizzate da un basso tasso di proliferazione ma alta tumorigenicità. Tra queste ultime, ricordiamo le Cancer Stem Cells (CSCs), cellule non differenziate e le Cancer-Initiating Cells (CICs), cellule parzialmente differenziate. Entrambe le tipologie sono in grado di rigenerare per duplicazione e successivo differenziamento masse tumorali molto eterogenee. Diversi studi hanno dimostrato che questi sottoinsiemi di cellule resistono a terapie standard come la chemioterapia e la radioterapia. I motivi principali sono il loro stato di quiescenza proliferativa, un'elevata resistenza all'apoptosi e una maggiore capacità di riparare i danni al DNA [Hirohashi Y et al., 2016]. I trattamenti chemioterapici o radioterapici distruggono la maggior parte delle cellule tumorali, ma risultano inefficaci contro tali sottopopolazioni, le quali vengono così selezionate. È molto

probabile che proprio da esse derivino le cellule tumorali resistenti (Chemo-resistant Cancer Cells, CCCs), una sottopopolazione di cellule tumorali altamente refrattarie ai farmaci antitumorali convenzionali o alla radioterapia e molto inclini a metastatizzare [Li S & Li Q., 2014].

## 2.5 Metabolismo delle cellule tumorali

La capacità di modificare il proprio metabolismo è una delle proprietà universali della maggior parte delle cellule tumorali. Il glucosio è la principale fonte di energia delle cellule tumorali. Le cellule normali assorbono glucosio e lo convertono in  $\text{CO}_2$  ed  $\text{H}_2\text{O}$  attraverso la glicolisi, il ciclo di Krebs e la fosforilazione ossidativa (OXPHOS). In tal modo la produzione di ATP viene massimizzata, riducendo al minimo indispensabile il consumo di glucosio. Al contrario, le cellule tumorali ricavano energia soprattutto attraverso la glicolisi. Tale fenomeno, chiamato glicolisi aerobica o effetto Warburg, prevede un forte consumo di glucosio, il quale viene convertito principalmente in lattato ed estruso dalla cellula. In tal modo la cellula tumorale, è in grado di ricavare ATP ed intermedi utili a sostenere un elevato tasso di crescita. Tutto ciò si verifica anche se nell'ambiente è presente ossigeno a sufficienza per sostenere la respirazione mitocondriale. La completa ossidazione di una molecola di glucosio in  $\text{CO}_2$  ed acqua produce 30-32 moli di ATP mentre ne vengono prodotte solo 2 quando viene convertito in lattato. Sebbene la glicolisi aerobica sia energeticamente meno efficiente, essa è di gran lunga preferita dalle cellule tumorali.

Una spiegazione può essere legata alla maggior necessità delle cellule tumorali di generare intermedi metabolici, come glucosio 6-fosfato, l'acetil-CoA ed il NADPH, necessari per la produzione di nucleotidi, acidi grassi, lipidi di membrana e amminoacidi. Questi intermedi sono indispensabili per sostenere l'alto tasso di proliferazione delle cellule tumorali, piuttosto che per produrre energia sotto forma di ATP.

Pertanto, la maggior parte del glucosio non viene utilizzato per produrre ATP, perché l'aumento del rapporto ATP/ADP comprometterebbe la formazione di intermedi glicolitici, cioè acetil-CoA e NADPH, necessari per la sintesi delle macromolecole. Diversi studi evidenziano che la glutammina viene catabolizzata in elevate quantità da parte delle cellule tumorali. Il suo destino può essere molteplice: può essere una fonte energetica per le cellule, può essere usata per la biosintesi di lipidi e come donatore di azoto per amminoacidi e nucleotidi [DeBerardinis R.J et al., 2007], quindi

in grado di fornire i supplementi necessari per sostenere la crescita cellulare e la replicazione [Vander Heiden M.G et al., 2009].

Il maggior assorbimento del glucosio potrebbe avere un ruolo nella protezione all'apoptosi, rendendo le cellule tumorali indipendenti da fattori di crescita [Plas D.R & Thompson C.B., 2002]. Inoltre, siccome le specie reattive dell'ossigeno sono sottoprodotti naturali della respirazione mitocondriale, è stato proposto che la conversione in lattato nelle cellule tumorali possa ridurre al minimo gli stress ossidativi durante le fasi del ciclo cellulare [Brand K., 1997].

Gli eventi chiave che spingono le cellule tumorali verso l'effetto Warburg sono l'attivazione di oncogeni come ad esempio Ras e Akt, i quali promuovono la glicolisi e quindi la proliferazione cellulare, o l'inattivazione di oncosoppressori come p53, responsabile dell'arresto del ciclo cellulare in caso di danni al DNA [Ngo DC et al., 2015].

È stato stimato che nelle cellule tumorali l'85-90% di glucosio viene convertito in lattato e gran parte di questo viene espulso come scarto nella matrice extracellulare. A sua volta l'accumulo di lattato nella matrice extracellulare determina un abbassamento del pH extracellulare e favorisce la neoangiogenesi. In aggiunta, è stato osservato che la gran quantità di lattato escreta può essere metabolizzata da altre cellule tumorali caratterizzate da un metabolismo prevalentemente respiratorio. Oltre al lattato, le cellule tumorali glicolitiche liberano altri cataboliti, citochine, enzimi e fattori di crescita utili a stimolare e sostenere la formazione del microambiente tumorale [Hunt T.K et al., 2007]. Tale termine definisce l'insieme di proteine e cellule che circonda le stesse cellule tumorali. La maggior parte dei tumori risultano infatti infiltrati da fibroblasti attivati (Cancer-Associated Fibroblasts, CAFs), da macrofagi ed altre cellule infiammatorie, le quali secernono fattori di crescita, citochine e proteine che vanno poi a formare lo stroma e la matrice extracellulare (extracellular matrix, ECM). I fibroblasti sono di particolare importanza per il sostentamento delle proprietà strutturali e funzionali della ECM e costituiscono in molti casi una popolazione cellulare preponderante dello stroma del tumore. È stato ipotizzato che il microambiente tumorale abbia un ruolo chiave per l'iniziazione, progressione e metastasi del tumore [Mueller M.M & Fusenig N.E., 2004].

Citochine secrete dalle cellule tumorali, come il fattore di crescita trasformante  $\beta$  (TGF- $\beta$ ) sono in grado di reclutare ed attivare i fibroblasti. Tale meccanismo è particolarmente utile per facilitare la guarigione delle ferite: alcuni fibroblasti si differenziano in miofibroblasti i quali poi secernono collagene ed inducono fibrosi, fenomeni essenziali per favorire la cicatrizzazione delle ferite. Una volta che la ferita si è rimarginata, i miofibroblasti muoiono per apoptosi, mentre il tessuto

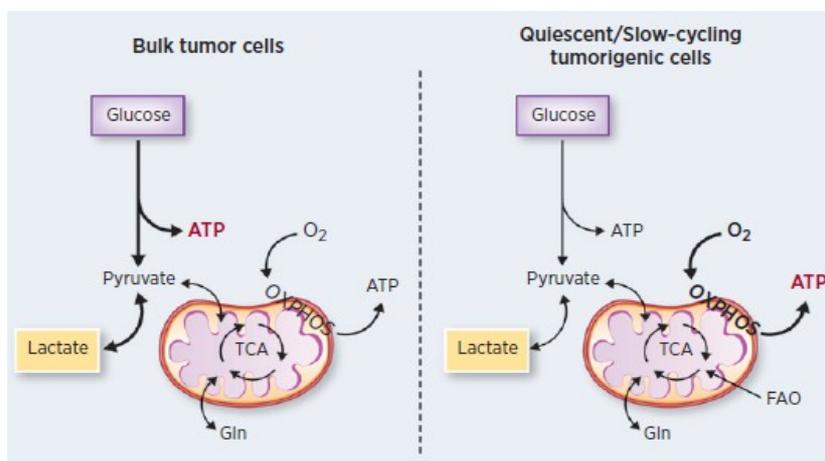
fibrotico viene in parte degradato. Tuttavia all'interno dei tumori i CAFs, non muoiono facilmente e contribuiscono ad accumulare proteine della matrice, le quali contribuiscono alla progressione del tumore [Ngo DC et al., 2015], favoriscono l'invasione, la metastatizzazione e l'angiogenesi [Hanahan D & Weinberg RA., 2011]. Pertanto i tumori sono assimilabili a ferite che non guariscono. Tali processi sono stati ampiamente descritti nei tumori solidi della mammella, pancreas e prostata [Pietras K & Ostman A., 2010, Kalluri R & Zeisberg M., 2006].

Ulteriori studi hanno dimostrato che anche i miofibroblasti svolgono “glicolisi aerobica” e secernono lattato e piruvato. Le cellule tumorali possono assorbire questi metaboliti, metabolizzarli all'interno del mitocondrio, per poi utilizzare l'energia ricavata per sostenere la proliferazione cellulare. Sulla base di tale modello, il ruolo dello stroma è quello di sostenere ed alimentare le stesse cellule tumorali fornendo loro intermedi impiegati dalle cellule tumorali per sintetizzare amminoacidi, nucleotidi, lipidi o ricavare ATP. Questo fenomeno è stato chiamato “Reverse Warburg Effect” [Pavlidis S et al., 2009].

Il fatto che i tumori siano costituiti da cellule eterogenee dotate di differenti funzioni, differente potenzialità proliferativa e differente grado di differenziamento, permette di spiegare il perché essi siano eterogenei dal punto di vista metabolico. Tuttavia, la maggior parte dei tumori solidi mostra un metabolismo Warburg e solo in seguito a condizioni di stress rilevanti, si possono osservare importanti modifiche del metabolismo tumorale. È molto probabile che in condizioni di stress, per esempio in seguito a trattamento chemioterapico o radioterapico, la maggior parte delle cellule glicolitiche muoiano, lasciando così campo libero ad una delle sottopopolazioni di cellule tumorali che risultano scarsamente proliferanti e intrinsecamente resistenti alle terapie. Queste cellule presentano un metabolismo prevalentemente respiratorio, più adatto a sostenere un basso tasso di crescita. Tale ipotesi è stata recentemente avvalorata da numerosi studi.

Studi *in vivo* effettuati su topi modello di tumore al pancreas, hanno dimostrato che la delezione di K-Ras causa una cospicua regressione della massa tumorale, ma non è sufficiente a garantire l'eradicazione del tumore. In effetti, una piccola sottopopolazione di cellule tumorali è in grado di sopravvivere, rimanendo in uno stato di quiescenza per mesi fino alla ricomparsa del tumore. Questa sottopopolazione cellulare è costituita da CSCs e CICs [Viale A et al., 2014]. Successive analisi hanno dimostrato che queste cellule presentano un elevato numero di mitocondri, consumano più ossigeno delle cellule pancreatiche tumorali parentali e possiedono un metabolismo prevalentemente respiratorio. Ulteriori analisi hanno mostrato che la glicolisi in queste cellule è compromessa e non risultano essere in grado di regolare il flusso glicolitico in

risposta ad un'acuta inibizione della respirazione mitocondriale, meccanismo di compensazione prontamente attivato dalle altre cellule tumorali. Come conseguenza, queste cellule risultano particolarmente sensibili all'azione di farmaci in grado di inibire la respirazione ossidativa e non all'azione degli inibitori della glicolisi [Viale A et al., 2015].



**Figura 10** - Rappresentazione schematica delle differenze tra glicolisi aerobica (effetto Warburg) e fosforilazione ossidativa (OXPHOS).

Recentemente è stato dimostrato che cellule leucemiche staminali possiedono un profilo metabolico differente rispetto alle cellule leucemiche altamente proliferanti e sfruttano la respirazione ossidativa per produrre energia. Come le CICs pancreatiche, anche le cellule leucemiche staminali non sono in grado di incrementare il flusso glicolitico in seguito ad inibizione della respirazione ossidativa [Lagadinou E.D et al., 2013].

Indipendentemente dal loro tessuto di origine, le cellule tumorali che si basano sulla respirazione, sono accumulate da un basso tasso di proliferazione. Questo assetto metabolico permette loro di ridurre fortemente la glicolisi e con essa, la sintesi di intermedi utili alle biosintesi, ricavando comunque tutto l'ATP necessario al loro sostentamento [Viale A et al., 2014, Lagadinou E.D et al., 2013]. La dipendenza dalla respirazione conferisce alle cellule quiescenti la capacità di sopravvivere in stato di ipossia e in ambiente impoverito di nutrienti, condizioni che limiterebbero la crescita delle cellule proliferanti. Infatti alcuni studi hanno dimostrato che la concentrazione di ossigeno non è un fattore limitante per la respirazione mitocondriale fino a che non venga raggiunto uno stato di estrema ipossia. Questi risultati sono compatibili con il modello in cui cellule tumorali quiescenti, in un microambiente ostile in cui ossigeno e glucosio sono limitati, potrebbero avere il vantaggio di essere in grado ad ossidare completamente gli scheletri carboniosi, come ad esempio

lattato ed indirizzarli al ciclo dell'acido citrico per produrre una quantità sufficiente di ATP [Viale A et al., 2015].

Il fatto che le cellule responsabili della recrudescenza tumorale e del processo di metastatizzazione sfruttino la respirazione cellulare piuttosto che la glicolisi, può rappresentare un interessante punto di partenza per sviluppare nuove strategie terapeutiche in grado di eradicare la massa tumorale.

## 2.6 Carcinoma pancreatico

La forma più comune di cancro al pancreas, l'adenocarcinoma del dotto pancreatico (PDAC), è attualmente la quinta causa di morte per cancro nei paesi occidentali [Jemal A et al., 2010]. Il carcinoma pancreatico (PC) è considerato uno dei tumori con la peggior prognosi tra tutti quelli noti: la sopravvivenza media dei soggetti affetti da tale patologia è inferiore a 6 mesi, con un tasso complessivo di sopravvivenza inferiore al 5% in 5 anni [Jemal A et al., 2010, Ferlay J et al., 2012]. Questi risultati clinici sono attribuiti alla natura aggressiva delle cellule tumorali pancreatiche, le quali sono in grado di invadere gli organi circostanti e generare metastasi [Hamada S et al., 2013]. Al momento della diagnosi più del 85% dei pazienti presentano già diversi foci metastatici, il che rende inutile il ricorso alla chirurgia ed inefficaci la maggior parte delle terapie antitumorali [Matsuno S et al., 2004].

Recenti studi hanno rivelato un compendio di lesioni genetiche associate con la progressione del tumore al pancreas ed alla sua capacità di metastatizzare. Mutazioni a carico di K-Ras sono state rilevate in circa l'80% dei pazienti affetti dal tumore al pancreas. Ulteriori ricerche hanno dimostrato che la mutazione di K-Ras rappresenta un evento precoce nel processo di tumorigenesi pancreatico [Rachagani S et al., 2011]. K-Ras è il capostipite di una famiglia di proteine appartenenti alla classe delle small GTPasi. Nella forma attiva, la proteina Ras lega il GTP. In tale forma Ras è in grado di interagire, attivandola, con la serina-treonina chinasi Raf, la quale è poi in grado di attivare altre proteine che regolano diverse vie di segnalazione. K-Ras è dotata di attività enzimatica intrinseca che determina la conversione del GTP in GDP per defosforilazione. La forma che lega il GDP è la forma inattiva della proteina. K-Ras ha una potente capacità trasformante

[Barbacid M., 1987]. Generalmente è attivato da numerosi fattori, tra i quali i fattori di crescita che, attraverso K-Ras sono in grado di regolare processi quali la crescita cellulare, il differenziamento e l'apoptosi [McCormick F., 1989]. Diversi studi hanno evidenziato il ruolo degli oncogeni quali K-Ras come uno dei principali fattori in grado di scatenare l'adenocarcinoma pancreatico [Aguirre A.J., 2003].

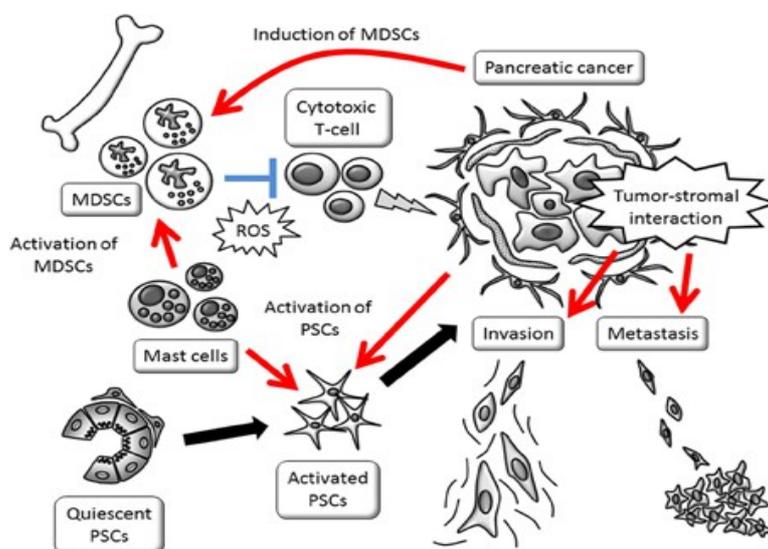
Il targeting delle vie di segnalazione degli oncogeni rappresenta, pertanto, un approccio clinicamente valido per bloccare la progressione di numerose patologie [Kantarjian H et al., 2002, Flaherty KT et al., 2010]. Sebbene diversi studi clinici dimostrino che il blocco della via di segnalazione di K-Ras determina una significativa riduzione della massa tumorale, le frequenti ricadute e la formazione di numerosi foci metastatici, suggeriscono l'esistenza di cellule tumorali in grado di sopravvivere all'arresto della segnalazione oncogenica. Tali cellule presentano un fenotipo staminali (CSCs) e sono quindi resistenti alla chemioterapia, in aggiunta presentano una elevata capacità auto-rigenerante e possono dar vita a nuove masse tumorali molto eterogenee [Quintas-Cardama A et al., 2009, Jang S & Atkins M.B., 2013]. L'analisi del trascrittoma e del metaboloma di tali cellule ha rilevato che tali cellule esprimono numerosi geni che regolano l'attività mitocondriale e utilizzano la respirazione per ricavare la maggior parte dell'ATP che gli necessita. A causa della loro incapacità di aumentare il flusso glicolitico in seguito all'inibizione dell'OXPPOS, esse mostrano un'elevata sensibilità agli inibitori di OXPPOS [Viale A et al., 2014].

Il contributo delle cellule stromali durante la progressione del carcinoma pancreatico gioca un ruolo cruciale per garantire la sopravvivenza, stimolare il movimento e la capacità invasiva delle cellule del tumore pancreatico.

Il carcinoma pancreatico mostra una struttura peculiare caratterizzata dalla presenza di un denso stroma fibroso. Ciò è dovuto al fenomeno denominato desmoplasia, il quale indica la spiccata propensione di queste cellule tumorali a secernere ampie quantità di proteine [Hamada S et al., 2013]. In effetti è noto che il tumore al pancreas mostra una delle più forti ed estese reazioni stromali desmoplastiche. A causa di tale fenomeno, i tumori del pancreas sono spesso scarsamente vascolarizzati, ipossici e possono fare affidamento su limitate quantità di nutrienti. Stranamente tali fenomeni non determinano un incremento della mortalità cellulare. L'estensione dello stroma, è spesso maggiore della componente epiteliale tumorale (fino al 80% del volume del tumore) [Hidalgo M., 2010, Chu G.C., 2007, Mahadevan D & Von Hoff D.D., 2007]. È proprio una componente della desmoplasia l'infiammazione che si verifica nel cancro al pancreas.

L'attivazione delle cellule stromali da parte delle cellule cancerogene pancreatiche è un evento

persistente che coinvolge molteplici proteine segnalatrici quali le proteine chinasi attivate da mitogeni (MAPK). Le cellule stellate pancreatiche (PSCs) si trovano in uno stato quiescente nel pancreas. Una volta attivate dall'infiammazione e da mastociti accumulatosi all'interno del tumore, iniziano a proliferare e differenziare in miofibroblasti, i quali secernono proteine della matrice extracellulare (ECM) e citochine [Masamune A., 2009, Erkan M et al., 2012]. In particolare i macrofagi associati al tumore (TAM), sono una delle principali fonti di citochine che stimolano la desmoplasia nel cancro pancreatico [Inman K.S et al., 2014] e influenzano negativamente l'esito della malattia [Chen S.J et al., 2015]. Inoltre le cellule tumorali pancreatiche sono in grado di reclutare le cellule inibitorie di derivazione mieloide (MDSCs) all'interno del tumore, con conseguente inibizione delle funzioni dei linfociti T CD8+. L'immunosoppressione locale impedisce l'eliminazione delle cellule tumorali promuovendo la progressione del tumore [Porembka M.R et al., 2012].



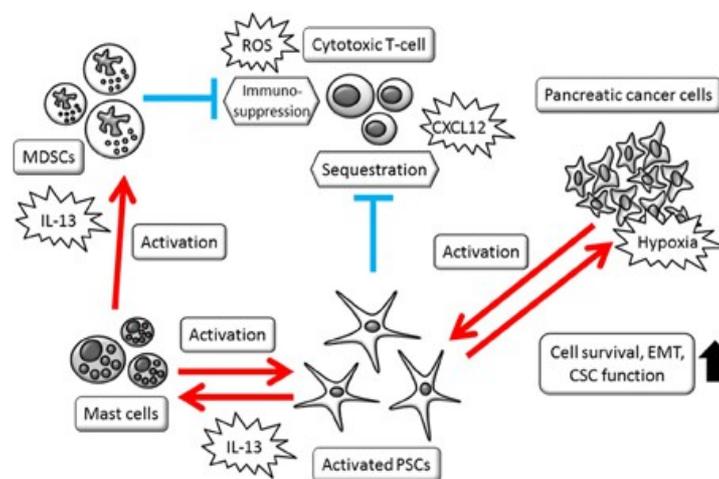
**Figura 11** – Rappresentazione schematica delle interazioni del tumore pancreatico con lo stroma.

Pertanto, l'interazione delle cellule tumorali con cellule stromali, cellule infiammatorie ed immunitarie favorisce la progressione del tumore, contribuisce a generare quel microambiente tumorale in cui ogni tipologia cellulare svolge un ruolo specifico e contribuisce alla sopravvivenza delle altre cellule [Porembka M.R et al., 2012].

Il risultante stroma denso e fibroso comprime i vasi e genera alta pressione interstiziale limitando così la vascolarizzazione nel tumore. Di conseguenza le cellule tumorali pancreatiche sono costrette a vivere e a proliferare in un ambiente molto selettivo [Bergers G & Hanahan D., 2008].

L'ipossia è una tipica caratteristica del tumore del pancreas ed è associata alla prognosi infausta

[Hoffmann A.C et al., 2008, Miyake K et al., 2008, Sun H.C et al., 2007, Couvelard A et al., 2005, Kitada T et al., 2003, Büchler P et al., 2004, Chang Q et al., 2011, Koong A.C et al., 2000]. Studi preclinici effettuati con topi modello del PC, mostrano che l'ipossia incrementa la sopravvivenza e la proliferazione delle cellule tumorali, attiva la transizione epitelio mesenchimale (EMT), che stimola la capacità migratoria ed invasiva delle cellule tumorali e rende le cellule resistenti alla chemioterapia ed alla radioterapia. La maggior parte degli effetti sono mediati dall'attivazione del fattore di trascrizione HIF- $\alpha$  (Hypoxia Inducible Factor) [Büchler P et al., 2004 , Chang Q et al., 2011, Niizeki H et al., 2002, Wang W et al., 2010, Zhu S et al., 2011, Yokoi K & Fidler I.J., 2004, Chen C & Yu Z., 2009, Chen J et al.,2003, Guillaumond F et al., 2013, Guillaumond F et al., 2014, Izuishi K et al., 2000].



**Figura 12** – Rappresentazione schematica dei molteplici ruoli delle PSCs.

Considerando l'enorme grado di complessità di sistemi come quelli descritti fino ad ora, è logico pensare che solo la dettagliata conoscenza dei meccanismi molecolari che agiscono all'interno dei tumori del pancreas, permetterà lo sviluppo di nuove opzioni terapeutiche in grado di garantire la completa eradicazione di questo tipo di tumore.

## 2.7 Prospettive terapeutiche

Attualmente il trattamento più efficace per l'adenocarcinoma pancreatico risulta essere l'asportazione chirurgica, specialmente in quei casi in cui la malattia è diagnosticata in fasi molto precoci. Tuttavia ciò si verifica solo per il 5-10% dei pazienti alla diagnosi [Jimenez R.E & Fernandez-del Castillo C., 2010]. Nonostante i recenti progressi in campo farmacologico, il carcinoma pancreatico metastatico rimane ancora una delle forme di tumore più resistente alla chemioterapia.

Il trattamento con gemcitabina è da molti anni la terapia di elezione utilizzata per curare pazienti con carcinoma pancreatico metastatico. Numerose ricerche hanno dimostrato che l'associazione della gemcitabina con altri farmaci antitumorali determina vantaggi molto ridotti ed aumenta di poco la sopravvivenza dei pazienti [Cunningham D et al., 2010].

La sovraespressione di proteina secreta acida e ricca in cisteina (SPARC), una proteina adattatrice, nei fibroblasti stromali del pancreas, è considerata una delle principali cause della resistenza alla chemioterapia. Studi preclinici hanno mostrato che si possono ottenere dei miglioramenti somministrando paclitaxel coniugato all'albumina (*nab*-paclitaxel) in aggiunta alla gemcitabina. È stato osservato che il *nab*-paclitaxel viene sequestrato da SPARC e permette di ridurre lo stroma tumorale ed aumentare la vascolarizzazione del tumore, aumentando di conseguenza anche l'efficacia della gemcitabina, la quale potrà più facilmente penetrare all'interno del tumore e agire da citotossico nei confronti delle cellule tumorali pancreatiche. È stato dimostrato che questa combinazione aumenta la sopravvivenza media dei pazienti rispetto al trattamento con la sola monoterapia a base di gemcitabina. Anche la somministrazione di mix di farmaci, quali ad esempio il leucovorin, il fluorouracile, l'irinotecan e l'oxaliplatino, può essere considerata una strategia alternativa per il trattamento del carcinoma pancreatico metastatico [Thota R et al., 2014], in quanto permette di ottenere piccoli vantaggi rispetto al trattamento con la sola gemcitabina [Cohen R et al., 2015, Cunningham D et al., 2010, Thota R et al., 2014, Scheithauer W et al., 2003, Hess V et al., 2003, Herrmann R et al., 2007, Conroy T et al., 2011]. Tuttavia esistono molte limitazioni all'utilizzo di tale strategia a causa dei seri effetti collaterali osservati in molti pazienti trattati [Thota R et al., 2014].

Considerata la scarsa efficacia delle terapie odierne utilizzate per combattere tale tipo di tumore, è evidente che lo sviluppo di nuove strategie terapeutiche rappresenta una delle maggiori sfide per il

futuro.

### 2.7.1 La metformina come farmaco antitumorale

La metformina è un biguanide ed appartiene alla famiglia dei farmaci ipoglicemizzanti. Grazie al suo eccellente profilo di sicurezza ed alla sua economicità, rappresenta il farmaco di prima scelta per la cura del diabete di tipo 2 [Aljada A & Mousa S.A., 2012]. La sua azione terapeutica si esplica attraverso vari meccanismi quali l'inibizione della gluconeogenesi epatica, l'incremento dell'utilizzo periferico del glucosio e la riduzione del suo assorbimento intestinale. Tale molecola non è sottoposta a metabolismo epatico ma viene eliminata quasi esclusivamente per via renale [UK Prospective Diabetes Study Group 1998].

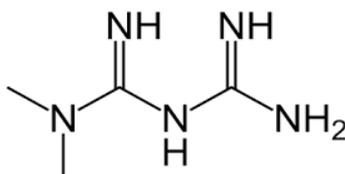


Figura 13 – Molecola della Metformina.

La principale azione della metformina è quella di inibire il complesso I della catena respiratoria mitocondriale (NADH deidrogenasi), che porta la conseguente diminuzione di ATP ed aumento di AMP. In questo modo viene stimolata la glicolisi con produzione di lattato, quindi un aumento dell'uptake di glucosio da parte delle cellule, favorendo l'abbassamento dei livelli di glicemia. L'aumento del rapporto di AMP/ATP determina l'attivazione della chinasi AMP dipendente (AMPK), la quale è in grado di inibire l'attività di mTOR, una protein-chinasi che stimola la crescita, la proliferazione e la motilità cellulare. Inoltre l'aumento del rapporto AMP/ATP determina una inibizione della gluconeogenesi epatica e della lipogenesi [Owen M.R et al., 2000]. Ulteriori studi hanno dimostrato che la metformina induce l'attivazione di p53 e p21 portando quindi ad un arresto del ciclo cellulare [Sahra IB et al., 2008]. Tuttavia la dettagliata azione antitumorale non è stata ancora completamente chiarita.

Studi epidemiologici condotti negli ultimi anni, dimostrano che i pazienti diabetici trattati con metformina, noto farmaco anti-diabetico che riduce la resistenza all'insulina e l'iperinsulinemia, presentano un minor rischio e probabilità di sviluppare vari tipi di tumore, compreso quello pancreatico [Bowker S.L et al., 2006].

Studi preclinici hanno dimostrato che in modelli animali di PDAC (adenocarcinoma del dotto pancreatico), l'utilizzo della metformina come adiuvante porta ad effettivi vantaggi in termini di durata della vita media. Tuttavia essa risulta essere particolarmente efficace se utilizzata nelle fasi precoci della malattia (in questi casi il rischio di morte si è ridotto del 32%) [Sadeghi N et al., 2012], ma non porta nessun beneficio nei casi di patologia in uno stadio metastatico avanzato [Hwang A et al., 2013].

Studi condotti in laboratorio su cellule in coltura hanno dimostrato che l'azione citotossica della metformina nei confronti delle cellule tumorali dipende fortemente dalla concentrazione di glucosio presente nel terreno di crescita. In presenza di elevate concentrazioni di glucosio (25 mM) gli effetti della metformina risultano ridotti, mentre divengono più marcati quando la concentrazione di glucosio scende a valori simili a quelli fisiologici (5 mM). In presenza di elevate concentrazioni di glucosio, le cellule tumorali sfruttano prevalentemente il metabolismo aerobico per produrre energia (ATP), mentre è stato osservato che quando la concentrazione rientra nel range fisiologico, il contributo della respirazione diviene rilevante. È probabilmente questo il principale motivo per cui le cellule cresciute in presenza di concentrazioni fisiologiche di glucosio, risultano più sensibili all'azione della metformina o ad altri inibitori della catena mitocondriale [Smith JS et al., 2013].

Sebbene i dettagli del meccanismo d'azione della metformina non siano ancora definiti chiaramente, altri studi *in vitro* suggeriscono l'esistenza di meccanismi d'azione alternativi. Per esempio è stato osservato che il trattamento con metformina determina una riduzione dei radicali liberi dell'ossigeno (ROS). Il ruolo delle ROS nelle cellule tumorali è complesso. Essi promuovono la sopravvivenza delle cellule tumorali, riducendo la loro sensibilità all'apoptosi. Livelli moderati di ROS sono richiesti per l'attivazione dei recettori con attività tirosina chinasi e sono in grado di promuovere la proliferazione. Inoltre è stato osservato che i ROS sono mediatori essenziali nelle cellule trasformate da K-Ras [Vaquero E.C et al., 2004, Weinberg F et al., 2010, Du J et al., 2013]. Al contrario, un'eccessiva produzione di ROS determina stress ossidativo e morte cellulare. Il conseguente danno mitocondriale indotto dall'inibizione del complesso I da parte della metformina riduce i livelli delle ROS al di sotto di quelli richiesti dalle cellule tumorali per sopravvivere [Cheng G & Lanza-Jacoby S., 2015].

Studi preclinici effettuati utilizzando modelli animali di tumori al pancreas, hanno dimostrato che la somministrazione orale di metformina insieme ai chemioterapici standard è più efficace nel

bloccare la crescita del tumore e prevenire la formazione di metastasi. Questo è dovuto alla sua capacità di inibire selettivamente le CSCs, le quali sfruttano un metabolismo prevalentemente respiratorio [Kitazono S et al., 2013]. Inoltre questo farmaco esplica ugualmente la sua azione antitumorale in combinazione con dosi ridotte dei chemioterapici aumentando così l'efficacia di quest'ultimi [Iliopoulos D et al., 2011].

Studi recenti hanno dimostrato l'attività della metformina nei confronti di cellule cancerogene pancreatiche resistenti alla gemcitabina. È interessante considerare che la metformina, a causa della sua natura idrofila e cationica, deve essere attivamente trasportata all'interno delle cellule da trasportatori cationici organici OCT, e queste proteine transmembrana risultano essere altamente espresse nelle cellule cancerogene pancreatiche. È stato dimostrato che la sola metformina non ha alcun effetto sulla proliferazione delle cellule cancerogene pancreatiche resistenti, ma è in grado di incrementare la sensibilità di queste cellule nei confronti della gemcitabina, aumentando la sua efficacia. Questo non può altro che apportare benefici ai pazienti affetti da cancro al pancreas che ricevono gemcitabina dopo l'asportazione del tumore [Chai X et al., 2015].

Pertanto, la metformina grazie ai suoi effetti antitumorali può presentare ampie potenzialità in vari contesti clinici: aumenta l'efficacia dei farmaci tradizionali, aiuta a prevenire l'insorgenza dei tumori e permette di ridurre le dosi di farmaci da utilizzare, minimizzando così i loro effetti collaterali.

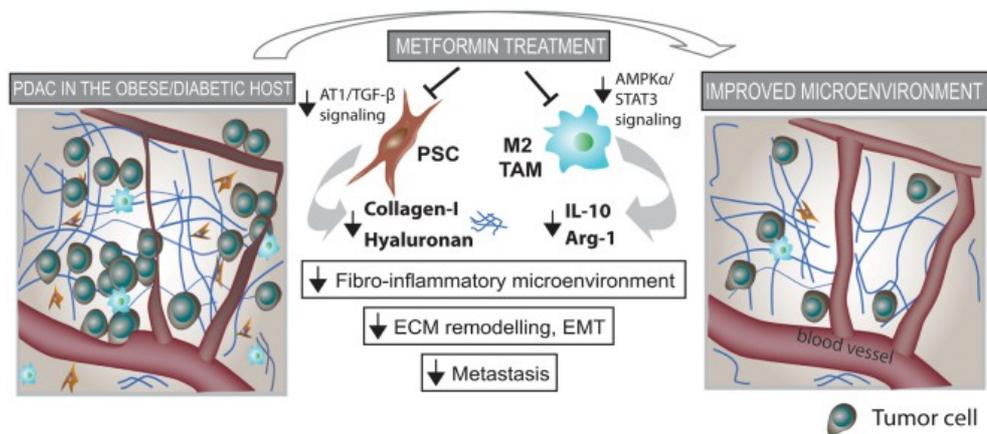
Recenti studi preclinici hanno dimostrato che la metformina è in grado di inibire la formazione del microambiente tumorale. È stato osservato che essa è in grado di riprogrammare direttamente le PSCs e TAM, allevia la fibrosi e l'infiammazione in modelli *in vivo* di PDAC .

L'effetto della metformina sull'attenuazione della desmoplasia è correlata con il rimodellamento della matrice extracellulare ed a una riduzione delle sue componenti, in particolare di acido ialuronico HA e collagene. Ciò comporta anche una inibizione dell'EMT e della metastatizzazione [Incio J et al., 2015].

La riduzione di fibrosi è dovuta alla riduzione della produzione di citochine in particolare IL-1 $\beta$ , fattore essenziale nel promuovere il processo di metastatizzazione [Tan X.L et al., 2015].

L'effetto della metformina sulla desmoplasia è stato verificato su pazienti affetti da tumore al pancreas e BMI superiore a 25 [Incio J et al., 2015]. Tuttavia, reali benefici sono stati osservati solo su alcuni gruppi di pazienti e non su tutti. Ciò suggerisce che alcuni sottogruppi di tumori risultano non responsivi alla metformina; di conseguenza risulta essenziale un'attenta selezione di pazienti

per poter verificare l'efficacia della metformina [Incio J et al., 2015].



**Figura 14** – La metformina riprogramma le PSCs e TAM, allevia la fibrosi e l'infiammazione e riduce la metastasi.

Il cancro pancreatico, come menzionato precedentemente, risulta refrattario alla chemioterapia e una delle ragioni per cui lo rendono intrattabile clinicamente è dovuta al fatto che gli agenti anticancerogeni non siano indirizzati abbastanza efficacemente verso le cellule cancerogene. Questo a causa della sua natura desmoplastica e ipovascolare che può ostacolare l'efficiente penetrazione dei chemioterapici attraverso l'intero tessuto tumorale [Hosoki T., 1983].

C'è quindi una urgente necessità di sviluppare strategie in grado di veicolare efficacemente i farmaci verso il loro bersaglio in modo da prolungare la sopravvivenza anche dei pazienti affetti da forme avanzate di tumore al pancreas.

Recentemente, nuovi sistemi di drug delivery (DDS) sono stati approvati nel campo del trattamento oncologico [Ferrari M., 2005]. Il ruolo dei sistemi drug delivery, è quello di indirizzare selettivamente i farmaci citotossici al tessuto tumorale, diminuendo la loro distribuzione in quelli normali in modo da poter ridurre i loro effetti collaterali [Muggia F.M., 1999, Koizumi F., 2006].

### 2.7.2 Drug delivery della metformina

Per valutare gli effetti antitumorali della metformina sono stati eseguiti studi *in vivo* ed *in vitro* utilizzando concentrazioni a partire da 5 mM, quindi circa 646 mg/L, di gran lunga superiore alla dose terapeutica consigliata (<2 mg/L). Tali concentrazioni risultano tossiche per l'uomo in quanto provocherebbero acidosi lattica e conseguente morte del paziente. Inoltre, siccome la metformina somministrata oralmente viene assorbita lentamente e non sufficientemente nella parte

gastrointestinale superiore, sono richieste ripetute somministrazioni di alte dosi per mantenere concentrazioni plasmatiche efficaci che, quindi, portano ad aumentare l'incidenza degli effetti collaterali [DeFronzo R et al., 2016, Pollak M.N., 2012, Corti G et al., 2008, Cetin M et al., 2013].

Lo sviluppo di un efficiente DDS permette di minimizzare gli effetti collaterali della metformina.

In letteratura esistono già alcuni esempi di studi sugli effetti dei CNTs funzionalizzati con metformina per la cura del diabete, eseguiti su modelli animali [Mirazi N et al., 2015] e, in ogni caso la metformina è stata legata ai CNTs covalentemente. Si è pensato quindi, di sfruttare le potenzialità dei CNTs per trasportare la metformina all'interno delle cellule tumorali.

## **2.8 Nanoparticelle come sistemi drug delivery**

Recenti sviluppi nella nanotecnologia hanno mostrato che nanoparticelle, strutture di dimensioni inferiori a 100 nm, risultano essere potenziali vettori farmaco. A causa delle loro piccole dimensioni, queste nanostrutture esibiscono proprietà chimico-fisiche e biologiche uniche, come una superiore reattività e l'abilità di attraversare barriere cellulari e dei tessuti, che fanno loro materiali vantaggiosi per applicazioni biomediche. Liposomi, micelle, nanoparticelle solide lipidiche, dendrimeri, polimeri, materiali di carbonio e nanoparticelle magnetiche sono gli esempi di nanovettori che sono stati testati come sistemi drug delivery (DDS). Il modo di legare il farmaco al nanovettore e la strategia del suo indirizzamento sono fondamentali per una terapia mirata. Un farmaco può essere adsorbito, legato covalentemente o attraverso interazioni elettrostatiche alla superficie del nanotrasportatore, oppure incorporato al suo interno. L'ancoraggio covalente ha il vantaggio, rispetto agli altri metodi di fissaggio, di poter controllare più precisamente la quantità di composto terapeutico consegnato. Il targeting di cellule specifiche con nanovettori può essere realizzato usando un meccanismo attivo o passivo [Wilczewska A.Z et al., 2012]. Il primo si basa sulla possibilità di legare sulla superficie del nanotrasportatore un agente che interagisca con recettori specifici o che venga riconosciuto dai tumori stessi, agenti quali peptidi, anticorpi monoclonali, proteine. Il targeting passivo, come spiegato precedentemente, è il risultato di un'aumentata permeabilità e ritenzione vascolare (EPR) caratteristica dei tessuti tumorali e sfrutta la naturale tendenza delle particelle ad accumularsi nei tumori o tessuti infiammati che possiedono

ipervascolarizzazione e scarso drenaggio linfatico. Una volta che i nanovettori raggiungono i tessuti malati rilasciano l'agente terapeutico. Un rilascio controllato di farmaci può essere ottenuto attraverso variazioni nell'ambiente fisiologico come pH, temperatura, osmolarità o tramite attività enzimatica. I nanovettori utilizzati nelle applicazioni mediche devono essere biocompatibili, in grado quindi di integrarsi con il sistema biologico senza provocare risposta immunitaria od eventuali effetti negativi, inoltre non devono essere tossici. Gli effetti indesiderati delle nanoparticelle dipendono fortemente dalla loro dimensione idrodinamica, forma, quantità, superficie chimica, via di somministrazione e dal tempo di permanenza nel sangue. A causa del numero di fattori che possono influire sulla tossicità delle nanoparticelle risulta piuttosto difficile una loro stima, pertanto sono necessari studi tossicologici per ogni nuovo sviluppo di DDS [Wilczewska A.Z et al., 2012].

### **2.8.1 Nanoparticelle in linee cellulari cancerogene pancreatiche**

Numerose strategie sono in via di sviluppo per affrontare il problema della chemioresistenza del tumore al pancreas. Diversi approcci come liposomi, polimeri, polimersomi, micelle che trasportano farmaci anticancro sono stati utilizzati per trasportare farmaci alle cellule tumorali pancreatiche, sfruttando il targeting passivo attraverso l'EPR. Un esempio, introdotto precedentemente, è l'utilizzo di nanoparticelle di paclitaxel legate all'albumina, *nab*-paclitaxel, che hanno rilevato un discreto effetto sinergico con gemcitabina. Recentemente l'ormeloxifene, una molecola sintetica, ha esposto potenti effetti anticancro attraverso l'inibizione di importanti vie di segnalazione oncogeniche e di proliferazione e per aumentare la sua azione anticancerogena è stato sviluppato un modello in cui esso è incapsulato in nanoparticelle polimeriche (acido polilattico co glicolitico). Gli studi *in vitro* effettuati hanno confermato una buona internalizzazione ed hanno mostrato un notevole effetto anticancro in diverse linee cellulari cancerogene pancreatiche, tra queste PANC-1 [Khan, S et al., 2015]. Un altro sviluppo recente è stato un DDS redox sensibile in grado di trasportare contemporaneamente i farmaci gemcitabina e doxorubicina ai nuclei delle cellule tumorali pancreatiche. Sono stati preparati polimersomi, vescicole di doppio strato lipidico, nei quali è stato incapsulato il farmaco attivamente col metodo del gradiente di pH. Inoltre è stato incorporato un polimero redox sensibile per sensibilizzare il sistema riducendo la concentrazione dell'agente e sulla loro superficie è stato coniugato arancio di acridina che impartisce proprietà localizzante nucleare. Dalle analisi, eseguite *in vitro*, le

nanoparticelle sono risultate atossiche mentre il farmaco incapsulato ha esplicito una significativa tossicità, tale sistema può quindi aumentare l'indice terapeutico fornendo i farmaci direttamente ai nuclei delle cellule [Anajafi, T et al., 2016].

Questi dimostrano che lo sviluppo di nanovettori capaci di rilasciare farmaci in modo selettivo verso cellule in rapida divisione può essere considerata una potente strategia per combattere questa malattia fatale.

### **2.8.2 CNTs in cellule cancerogene pancreatiche PANC-1**

I nanotubi di carbonio rispetto ai liposomi, dendrimeri e micelle polimeriche sono considerati i nanomateriali più promettenti con la capacità sia di rilevazione del tumore che trattamento multimodale. Sono pochi gli studi *in vitro*, presenti in letteratura, riguardo l'uso di nanotubi di carbonio come DDS su cellule cancerogene pancreatiche PANC-1. In uno di questi, sono stati utilizzati i SWCNTs per veicolare l'acido gambogico, farmaco naturale di bassa tossicità, nelle cellule tumorali pancreatiche, a causa della sua scarsa solubilità e inadeguata biodisponibilità orale. È stata valutata, *in vitro*, l'efficacia di questo complesso nel sopprimere l'integrità cellulare, gli effetti antiproliferativi dell'acido gambogico sono stati migliorati significativamente con l'uso dei SWCNTs e questi ultimi non hanno mostrato alcuna tossicità [Saeed, L.M et al., 2014]. In un altro studio *in vitro*, ma su altre linee cellulari tumorali pancreatiche, è stato progettato un DDS basato su SWCNTs per il trasporto di gemcitabina, in quanto questa presenta dei limiti nelle condizioni biologiche, coniugati con polietilenglicole (PEG) per ottenere nano coniugati con più elevata capacità di carico ed una più efficace citotossicità, oltre che un controllato rilascio dei farmaci. I relativi risultati hanno evidenziato la dipendenza della capacità di carico dal peso molecolare del PEG ma un rilascio del farmaco indipendente, mostrando tuttavia che quelli costituiti da PEG con basso peso molecolare risultavano più citotossici [Razzazan, A et al., 2016].

## 3 Descrizione del lavoro e risultati

Il presente lavoro di tesi comincia con una preliminare preparazione dei CNTs necessaria per la successiva funzionalizzazione dei CNTs con lo scopo di realizzare un nuovo sistema di trasporto della metformina all'interno di cellule cancerogene pancreatiche.

### 3.1 Preparazione dei CNTs

#### 3.1.1 Ossidazione dei CNTs

L'ossidazione permette l'introduzione di gruppi carbonilici e carbossilici sulle pareti esterne dei CNTs, necessari per poter essere successivamente trasformati in gruppi che consentiranno l'ancoraggio della metformina.

I CNTs che vengono utilizzati sono MWCNTs (*pristine*) (**1**) disponibili in commercio\*.

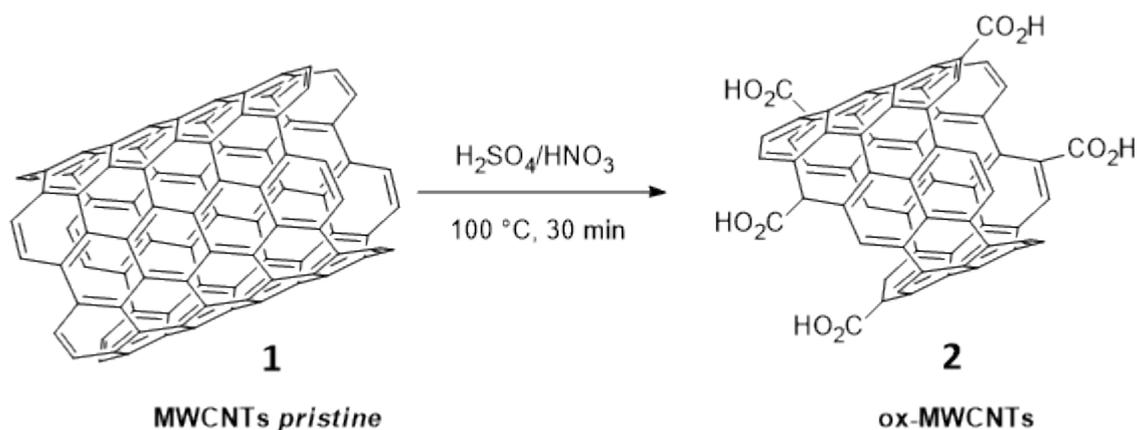


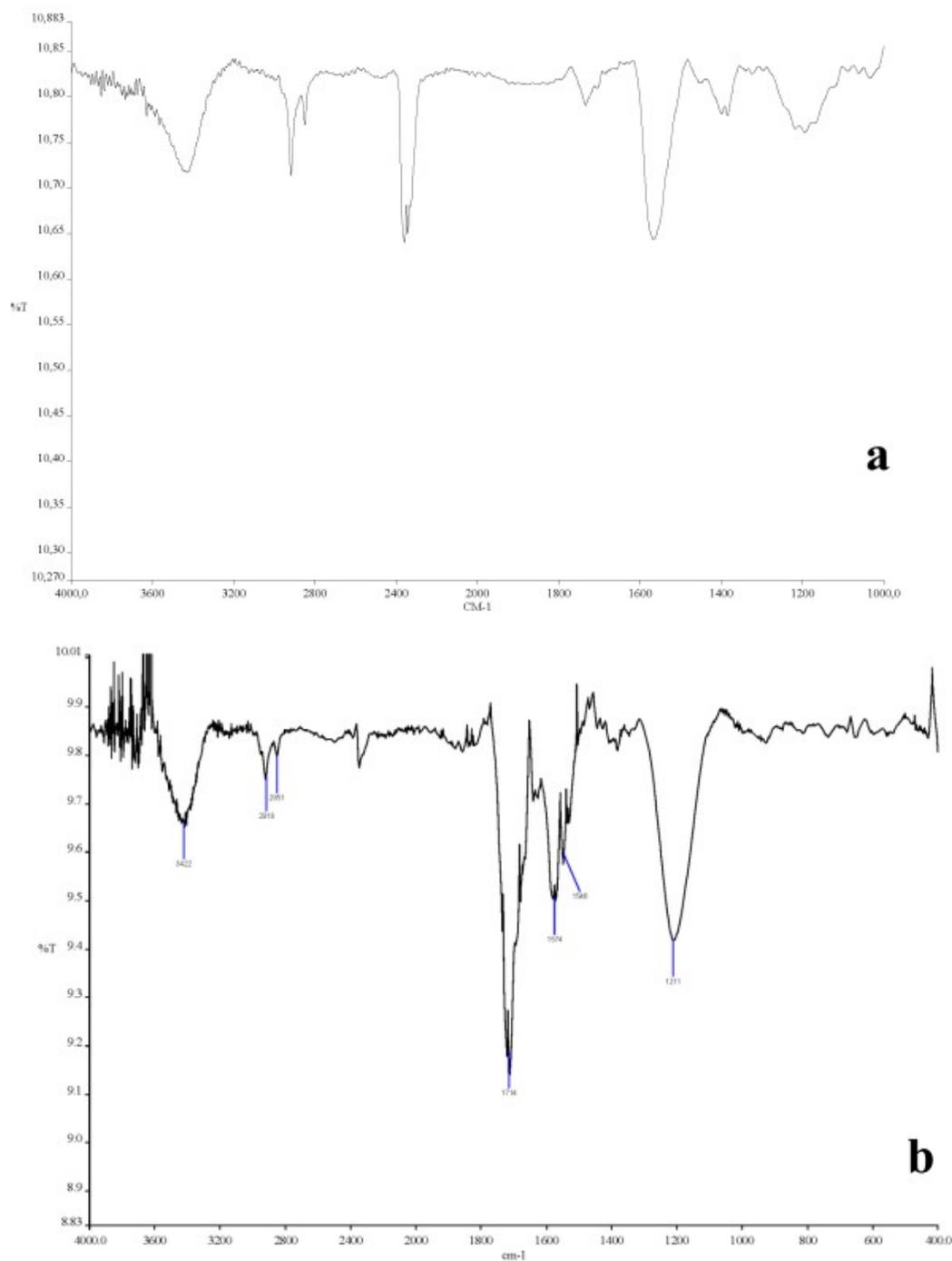
Figura 15 - Ossidazione dei MWNTs.

I MWCNTs (*pristine*) (**1**) sono trattati con una miscela di  $H_2SO_4$  e  $HNO_3$  concentrati, in rapporto 3:1 [Shaffer M.S.P et al., 1998] ad una temperatura di  $100^\circ\text{C}$  per 30 minuti. La miscela successivamente deve essere sottoposta a centrifugazione con una seguente filtrazione. Il precipitato ottenuto deve essere purificato attraverso cicli di lavaggio con miscele  $H_2O/iPrOH$  finché le acque di filtrazione non raggiungono un pH neutro. I nanotubi ottenuti vengono essiccati sottovuoto e caratterizzati tramite la spettroscopia IR e analisi elementare.

\*Sigma Adrich Carbon nanotube, multi-walled, product n.724769, lot. MKBH7743V CAS: 308068-56-6.

La spettroscopia IR consente di verificare l'eventuale presenza dei gruppi funzionali sulle pareti esterne dei MWCNTs e quindi di poterci accertare che sia avvenuta la funzionalizzazione con i gruppi carbossilici.

La misurazione è stata effettuata sotto atmosfera di N<sub>2</sub> con una pasticca di KBr e ox-MWCNTs (2).



**Figura 16** – Spettro IR (KBr) di (a) MWCNTs pristinè, (b) di ox-MWCNTs.

Lo spettro acquisito mostra una banda slargata a  $3422\text{ cm}^{-1}$  attribuita allo stretching O-H e una banda intensa a  $1714\text{ cm}^{-1}$  attribuibile allo stretching C=O, questo dimostra l'efficacia della reazione di ossidazione dei MWCNTs nel funzionalizzare le loro pareti con gruppi carbossilici.

L'analisi elementare permette di quantificare l'ossigeno presente nei nanotubi fornendo il loro grado di ossidazione. I risultati mostrano la presenza di 17.82 % di ossigeno sui CNTs.

Questo tipo di trattamento può essere ritenuto un eventuale tecnica di purificazione che esigono i CNTs dopo la loro produzione. Poiché l'ossidazione, oltre a ridurre la lunghezza dei CNTs e a purificarli da tracce metalliche eventualmente presenti nel substrato di partenza, porta ad un'estrema riduzione, arrivando persino alla scomparsa, di aggregati presenti nei CNTs (*pristine*) [Datsyuk V et al., 2008].

Inoltre la formazione dei gruppi carbossilici sulle pareti esterne portano a diminuire le interazioni che si instaurano tra i nanotubi limitando così la loro tendenza a formare aggregati.

Pertanto i ox-MWCNTs (**2**) ottenuti, mostrano una più elevata disperdibilità rispetto ai MWCNTs (*pristine*) sia in acqua (5 mg/mL) che in solventi organici (come etanolo e acetone 2.5 mg/mL) [Wang Y. Et al., 2006] con l'aiuto di brevi processi di sonicazione.

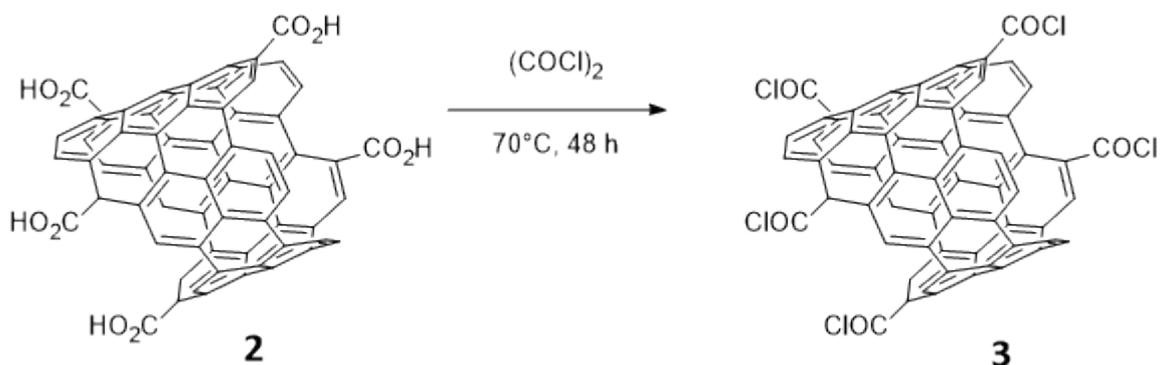
## **3.2 Attivazione dei gruppi acidi dei CNTs carbossilati**

Il progetto iniziale del presente lavoro di tesi era di attivare i gruppi acidi dei nanotubi carbossilati attraverso due procedure diverse; utilizzando in una, come reagente attivante, il  $(\text{COCl})_2$  (cloruro di ossallile) nell'altra l'NHS (l'N-idrossisuccinimide), che si basano tuttavia sullo stesso meccanismo di reazione di sostituzione nucleofila acilica.

### **3.2.1 Clorurazione dei CNTs con $(\text{COCl})_2$**

I ox-MWCNTs così ottenuti vengono attivati attraverso una reazione di sostituzione nucleofila acilica; gli acidi carbossilici vengono convertiti nei cloruri degli acidi utilizzando il  $(\text{COCl})_2$ , convertendo quindi un derivato acilico meno reattivo (gruppo carbossilico) in un derivato più

reattivo (cloruro acilico). Questo è reso possibile perché il  $(\text{COCl})_2$  converte il gruppo ossidrilico dell'acido in un migliore gruppo uscente ( $\text{O}(\text{CO})_2\text{Cl}$ ) e allo stesso tempo fornisce il nucleofilo (lo ione cloruro) in grado di sostituire il gruppo uscente.



**Figura 17** - Reazione di sostituzione nucleofila acilica: clorurazione dei ox-CNTs (**2**) con  $(\text{COCl})_2$ .

I ox-MWCNTs (**2**) vengono disciolti in  $(\text{COCl})_2$  con l'aiuto della sonicazione e mantenuti sotto agitazione ad una temperatura di  $70^\circ\text{C}$  per 24 ore, costantemente sotto flusso di  $\text{N}_2$  per rendere anidre le condizioni di reazione. L'ambiente anidro è necessario perché essendo reversibile la reazione, anche la presenza di una minima quantità di acqua potrebbe invertire la reazione e quindi riportare la formazione di ox-MWCNTs.

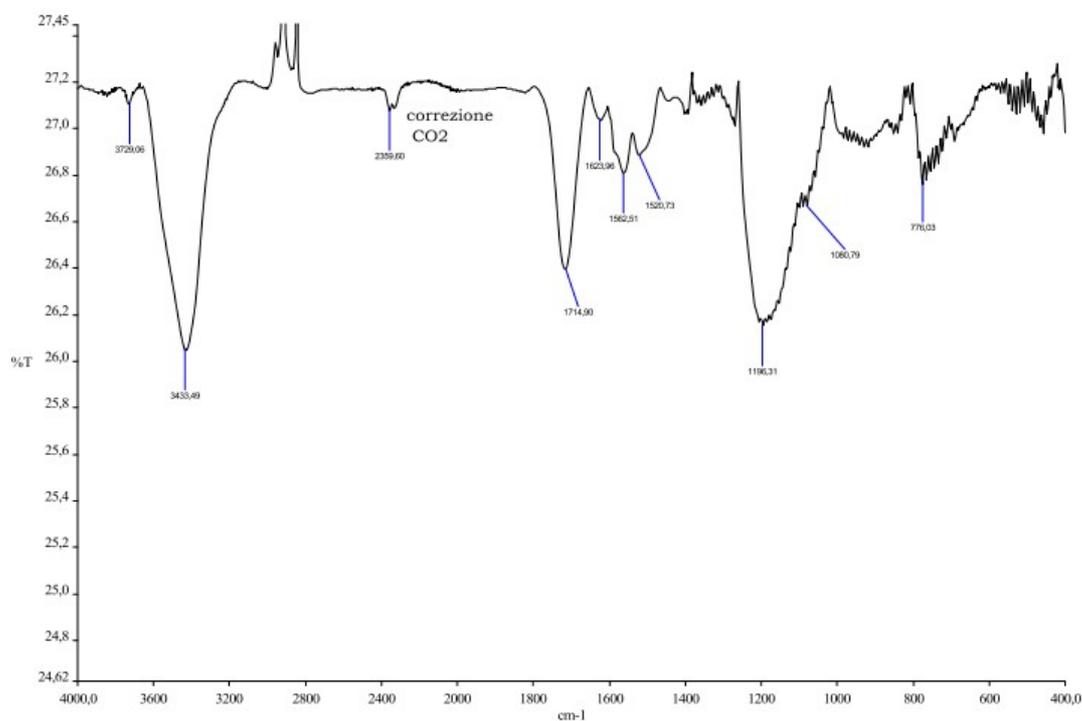
Trascorso il tempo necessario a completare la reazione viene distillato il  $(\text{COCl})_2$  non reagito, altrimenti sarà quest'ultimo a reagire poi con la metformina.

Successivamente i nanotubi vengono purificati miscelandoli con toluene anidro e filtrati su Teflon\* idrofobo tramite cicli di lavaggi utilizzando toluene anidro seguiti da pentano anidro.

Il residuo viene essiccato sotto vuoto e caratterizzato per mezzo della spettroscopia IR in modo da verificare la presenza dei gruppi acilici.

La misurazione è stata effettuata sotto atmosfera di  $\text{N}_2$  con una pasticca di KBr contenente MWCNTs- $(\text{COCl})_2$  (**3**).

\*Wathmann, porosity 20  $\mu\text{m}$ , diameter 25 mm

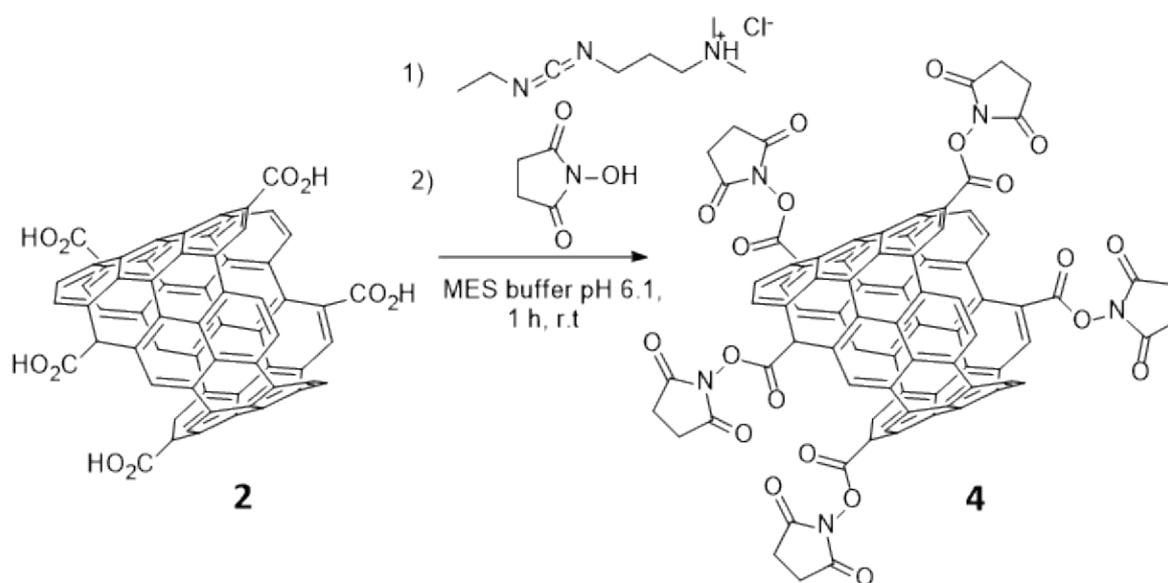


**Figura 18** – Spettro IR (KBr) di **3**.

Lo spettro acquisito mostra ancora la banda slargata a  $3430\text{ cm}^{-1}$  relativa allo stretching O-H e una banda stretta ed intensa a  $1714\text{ cm}^{-1}$  attribuibile allo stretching del C=O. Le bande a 1623 e  $1520\text{ cm}^{-1}$  sono caratteristiche dello stretching dei C=C aromatici, la banda larga e intensa a  $1190\text{ cm}^{-1}$  è tipica dello stretching del legame C-O, inoltre la presenza delle bande strette intorno a  $770\text{ cm}^{-1}$  relative allo stretching C-Cl dimostrano che la reazione di sostituzione nucleofila acilica sia avvenuta con successo.

### 3.2.2 Attivazione dei gruppi acidi dei CNTs con NHS

Anche l'attivazione dei gruppi acidi dei ox-MWCNTs con NHS è una reazione di sostituzione nucleofila acilica; gli acidi carbossilici vengono trasformati in estere utilizzando NHS, convertendo il derivato acilico (gruppo carbossilico) in un derivato con reattività pressoché simile (estere). Diversamente al caso precedente in questa reazione è l'EDAC che converte i gruppi ossidrilici degli acidi in gruppi uscenti migliori garantendo così la loro sostituzione con il nucleofilo NHS.

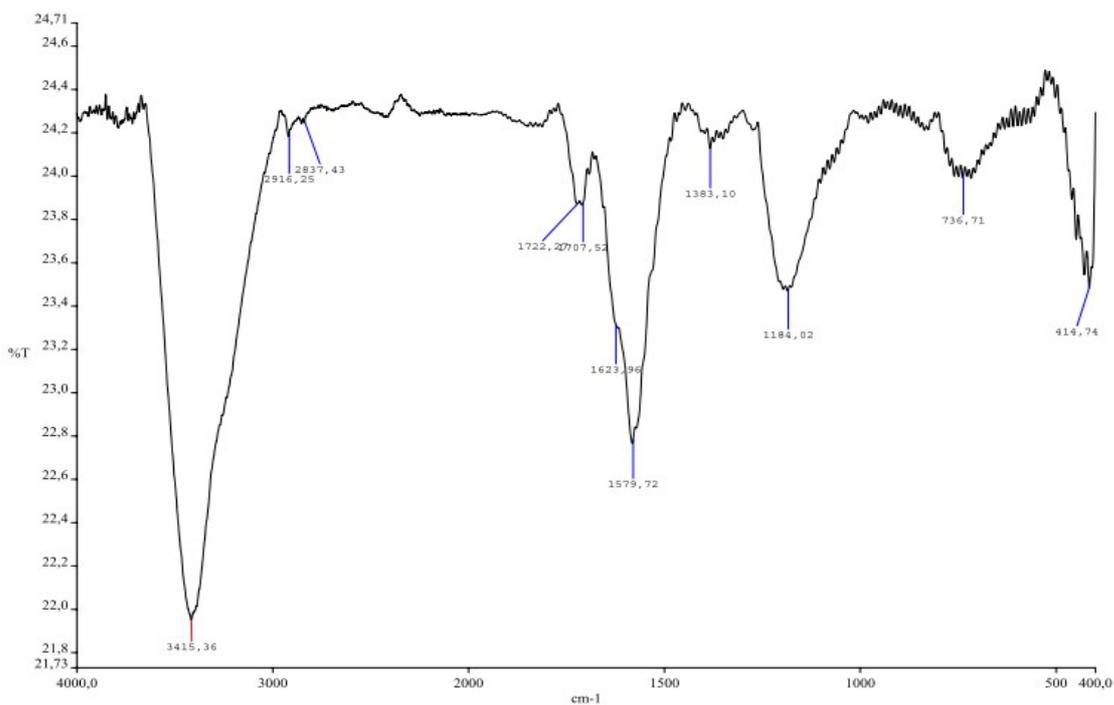


**Figura 19** – Reazione di sostituzione nucleofila acilica: attivazione dei gruppi carbossilici dei ox-CNTs (**2**) con NHS.

I ox-MWCNTs (**2**) vengono disciolti in MES (buffer) con l'aiuto della sonicazione, dopo l'aggiunta di NHS ed EDAC, anch'essi disciolti in MES (buffer), la reazione è stata fatta avvenire sotto agitazione per 1 h a temperatura ambiente. La miscela viene poi filtrata su Teflon idrofilico\* ed il residuo subisce cicli di lavaggi con MES seguito da un lavaggio con  $\text{H}_2\text{O}$  MILLIQ ed infine con MeOH per eliminare totalmente l'acqua rimasta [Jiang et al., 2004]. Il residuo recuperato viene essiccato e caratterizzato con IR ed analisi elementare.

La misurazione è stata effettuata sotto atmosfera di  $\text{N}_2$  e con una pasticca di KBr contenente MWCNTS-NHS (**4**).

\*Wathmann, porosity 20  $\mu\text{m}$ , diameter 25 mm



**Figura 20** – Spettro IR (KBr) di **4**.

Lo spettro mostra una banda molto intensa e slargata a  $3415\text{ cm}^{-1}$  caratteristica dei gruppi ossidrilici, i picchi presenti a  $2916$  e  $2837\text{ cm}^{-1}$  sono relativi allo stretching dei legami C-H con carbonio ibridato  $sp^3$ . Questo dimostra che è avvenuta la funzionalizzazione dei nanotubi con NHS dato che solo questi ultimi possiedono questi tipi di legami. I picchi a  $1722$  e  $1707\text{ cm}^{-1}$  sono relativi allo stretching del legame C=O. La presenza del picco a  $1623\text{ cm}^{-1}$  attribuibile allo stretching del legame ammidico, la banda intensa e slargata a  $1579\text{ cm}^{-1}$  attribuibile allo stretching del legame N-O, che copre quelli caratteristici degli stretching dei legami C=C dei composti aromatici ed infine la presenza del picco intenso e slargato a  $1184\text{ cm}^{-1}$  relativo allo stretching del legame C-N, ci conferma che l'attivazione dei MWCNTs carbossilati con NHS è avvenuta con successo.

Il grado di funzionalizzazione viene valutato attraverso l'analisi elementare, che consente di quantificare l' azoto presente sui nanotubi.

I risultati mostrano che è presente uno  $0.83\%$  di azoto nei CNTs.

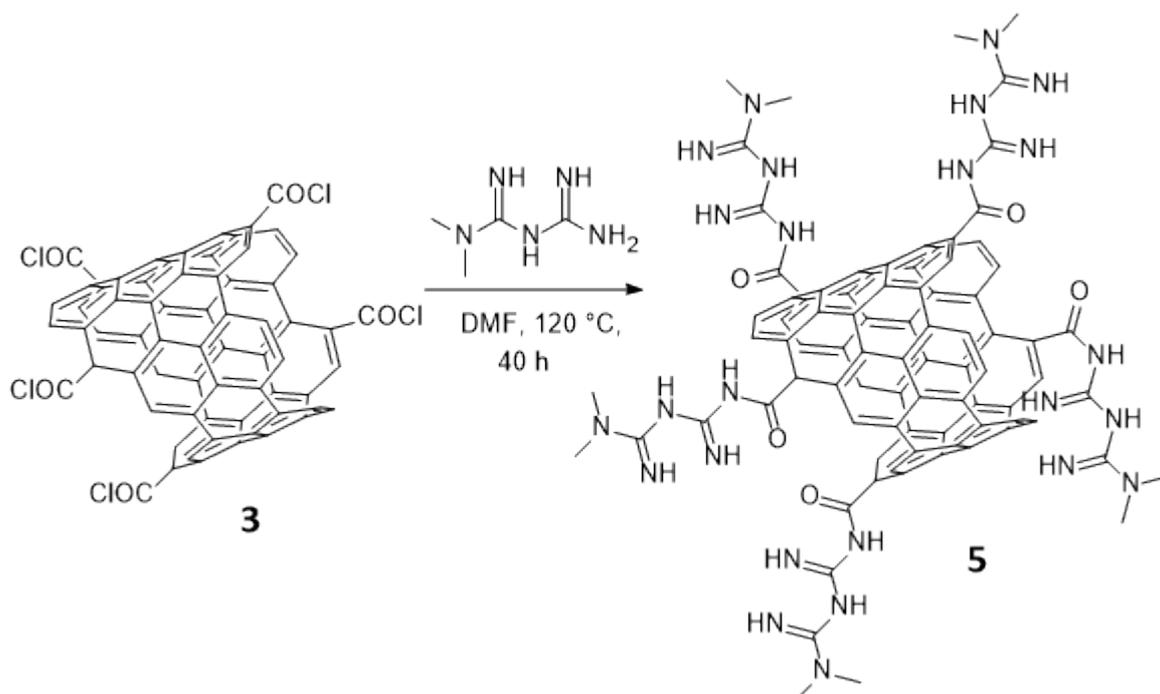
### 3.3 Decorazione dei CNTs attivati con metformina

La metformina in commercio è disponibile come sale cloridrato, condizioni che impediscono qualsiasi reazione sia con gruppi carbossilici che acilici che riportano i nostri CNTs, perciò risulta necessaria la preliminare eliminazione dello ione cloruro per renderla libera e reattiva.

Vi sono numerosi studi in cui la metformina libera tende a formare sali anche con acidi carbossilici presenti in molecole diverse tra loro, infatti il farmaco normalmente viene somministrato come sale. In letteratura troviamo pochi esempi di sintesi dei composti covalenti coinvolgenti la metformina, ma in ogni caso evidenziano la formazione di legami ammidici tra i gruppi amminici della metformina e i derivati acilici legati ai CNTs.

#### 3.3.1 Decorazione dei CNTs clorurati con metformina

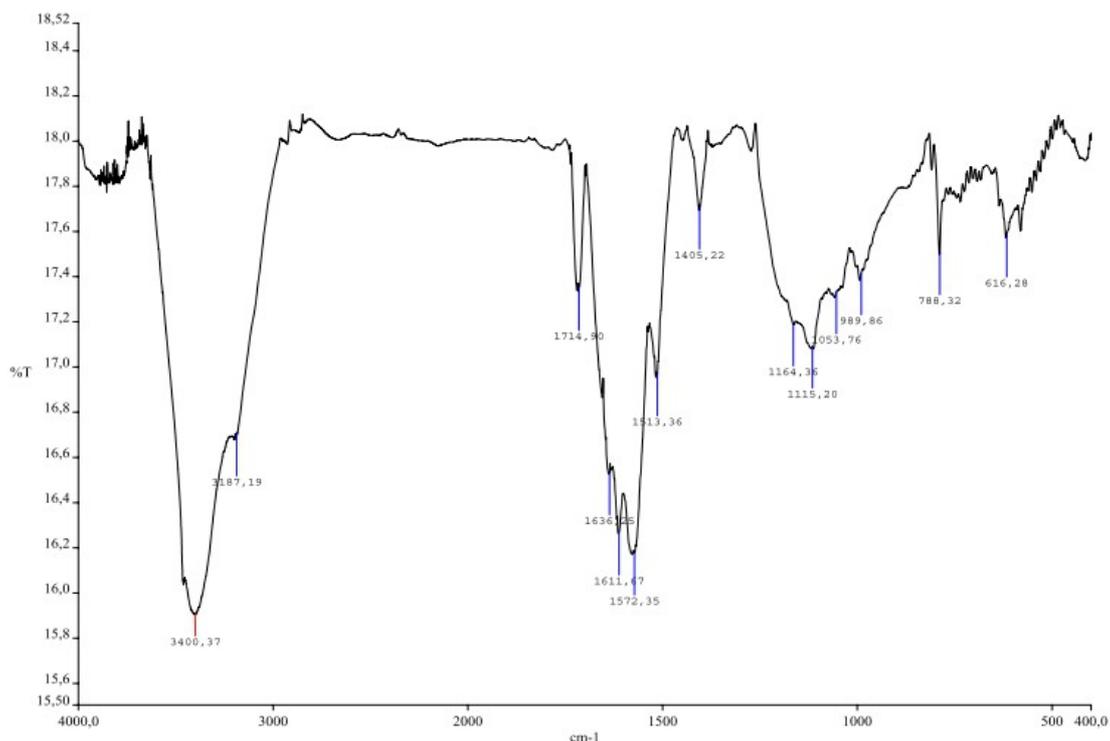
La reazione consiste nel far reagire i gruppi carbonilici con cui abbiamo funzionalizzato i CNTs e l'ammina primaria che presenta la metformina libera per ottenere la formazione di gruppi ammidici.



**Figura 21** – Funzionalizzazione dei CNTs clorurati (**3**) con la metformina.

Il prodotto (**3**), essendo molto sensibile all'acqua come già spiegato precedentemente, viene disciolto in DMF anidra e, con successiva aggiunta di metformina libera la miscela viene mantenuta

a 120°C per 40 h sotto costante flusso di N<sub>2</sub> rendendo così anidro l'ambiente di reazione. Trascorso il tempo necessario a far completare la reazione il prodotto è sottoposto a numerosi cicli di centrifugazioni e lavaggi con miscele di 2-PrOH e diisopropil etero seguiti da un ultimo lavaggio con acetone, senza così ricorrere alla filtrazione che può richiedere molto tempo, con lo scopo di rimuovere la metformina libera adsorbita sui nanotubi, che quindi non è legata covalentemente. Il prodotto (**5**) raccolto viene seccato e caratterizzato per mezzo della spettroscopia IR e analisi elementare.



**Figura 22** – Spettro IR (KBr) di **5**.

Dallo spettro vediamo che i nanotubi contengono ancora gruppi OH che non hanno reagito, mostrando la banda slargata e particolarmente intensa a 3400 cm<sup>-1</sup>, caratteristica dello stretching di questi tipi di legami e, gruppi carbonilici, per la presenza della stretta banda a 1714 cm<sup>-1</sup> relativa allo stretching del C=O. Si hanno ancora bande a 1611 e 1570 cm<sup>-1</sup> date dallo stretching dei legami C=C aromatici. Comunque possiamo osservare subito dallo spettro che la decorazione dei nanotubi con metformina è avvenuta con successo perché, oltre a presentare una banda a 1630 cm<sup>-1</sup> relativa allo stretching del legame ammidico, presenta una banda a 1513 cm<sup>-1</sup> dovuta al bending del legame C-NH ed in particolare una banda stretta a 1405 cm<sup>-1</sup> attribuibile all'ombrello mode (bending simmetrico e antisimmetrico) dei gruppi metilici terminali presenti solo nella metformina.

Infine le bande larghe a 1160 e 1115  $\text{cm}^{-1}$  generate dallo stretching C-N ci permettono di confermare che la funzionalizzazione del prodotto (**3**) col farmaco è realmente avvenuta.

Con le analisi elementari viene calcolato il grado di funzionalizzazione di azoto sul campione, permettendoci così di calcolare il carico di metformina sui nanotubi.

I risultati mostrano la presenza di un 13.84 % di azoto in 0.58 mg di CNTs che è una quantità troppo elevata di quanto ci potessimo aspettare.

Pertanto questi dati ci hanno portato a pensare che la metformina non possa essere solubile nella miscela con cui ha subito i numerosi lavaggi, altrimenti si avrebbe avuto un carico minore.

È stato quindi verificata la sua solubilità disciogliendola in una miscela 2-PrOH/diisopropilene in rapporto 1:1, con il risultato che effettivamente la metformina non risulta essere completamente solubile.

Per ottenere la totale rimozione della metformina rimasta adsorbita sui nanotubi si è provveduto quindi a filtrare il prodotto (**5**) con H<sub>2</sub>O MILLIQ su filtro in Policarbonato\* sottoponendolo a cicli di lavaggi con H<sub>2</sub>O MILLIQ seguiti da due ultimi lavaggi con MeOH.

I nanotubi raccolti vengono essiccati e caratterizzati nuovamente per mezzo dell'analisi elementare, per verificare se il contenuto di azoto è stato ridotto e quindi, se questi ultimi lavaggi eseguiti sono riusciti a purificare i nanotubi dalla metformina non reagita.

I risultati presentano adesso una quantità di azoto molto più accettabile.

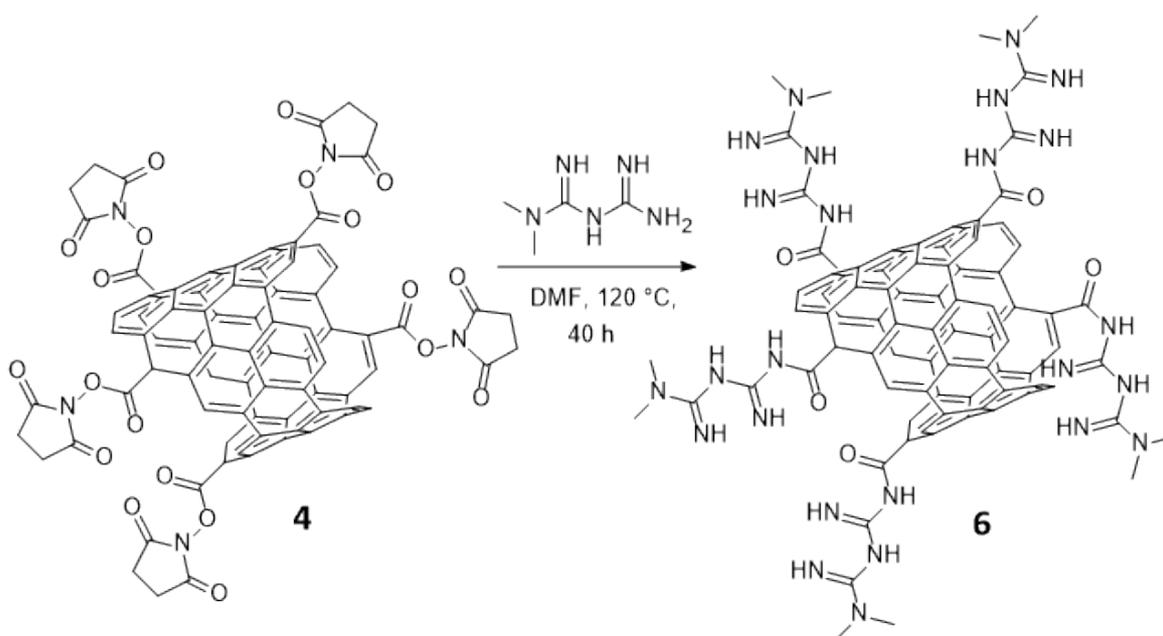
**Tabella 1** – Risultati dell'analisi elementare del composto **5**

Composto	Grado di funzionalizzazione di azoto per 1 mg di CNTs	Quantità di metformina per 1 mg di CNTs
<b>5</b>	8.20 %	0.1473 mg

\*Wathmann, porosity 20  $\mu\text{m}$ , diameter 25 mm

### 3.3.2 Decorazione dei CNT-NHS con metformina

La seguente reazione prevede lo stesso meccanismo di reazione di sostituzione nucleofila del caso precedente. I gruppi esteri attivati da NHS fungono da buoni gruppi uscenti dopo l'attacco nucleofilo da parte dei gruppi amminici delle molecole di metformina, garantendo la funzionalizzazione del farmaco attraverso la formazione di gruppi ammidici.



**Figura 23** – Funzionalizzazione dei CNTs-NHS (4) con la metformina.

La reazione viene effettuata secondo le condizioni di reazione già descritte nel paragrafo precedente per i CNTs clorurati, al termine della reazione il prodotto viene quindi filtrato su filtro in Policarbonato\* e sottoposto a cicli di lavaggi con H<sub>2</sub>O MILLIQ seguiti dagli ultimi due con MeOH. Il residuo solido successivamente viene essiccato e caratterizzato con l'analisi elementare.

**Tabella 2** – Risultati dell'analisi elementare del composto 6

Composto	Grado di funzionalizzazione di azoto per 1 mg di CNTs	Quantità di metformina per 1 mg di CNTs
6	12.37 %	0.2208 mg

I risultati ottenuti però hanno mostrato dati non coerenti a quelli che ci aspettavamo, si è ritenuto

\*Wathmann, porosity 20 µm, diameter 25 mm

che il prodotto (6) presentasse un carico di metformina troppo elevato, pertanto non lo abbiamo utilizzato nei test biologici.

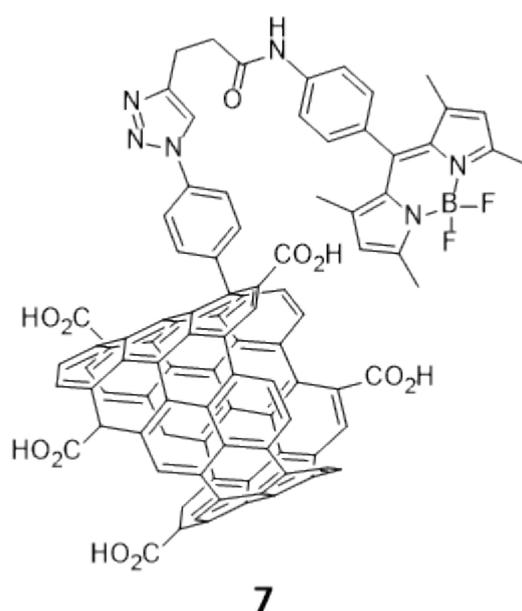
### 3.4 Test biologici

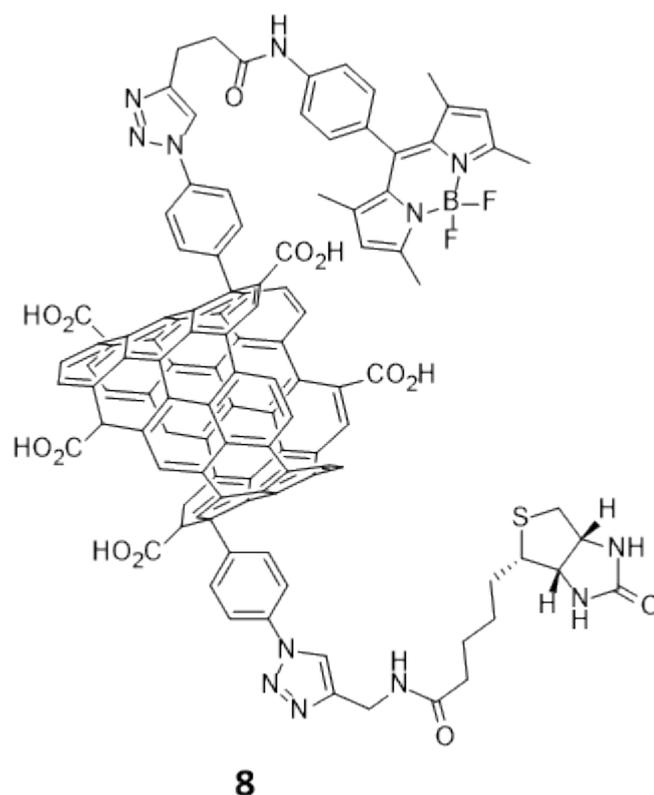
Una volta sintetizzati e caratterizzati i CNTs funzionalizzati con metformina sono stati eseguiti test *in vitro*, per testarne l'efficacia. Sono state utilizzate le cellule PANC-1 come modello sperimentale, una linea cellulare del carcinoma pancreatico. Tali cellule presentano caratteristiche delle CSCs e risultano resistenti alla chemioterapia convenzionale a causa del loro metabolismo prevalentemente respiratorio [Ning X et al., 2015]. Per questo motivo risultano sensibili alla metformina. Pertanto è nostro intento voler valutare se i CNTs possano essere validi sistemi di trasporto della metformina.

#### 3.4.1 Internalizzazione dei CNTs

Per prima cosa abbiamo valutato la capacità delle cellule pancreatiche di incorporare i nostri nanotubi.

È stato quindi eseguito un test di internalizzazione, utilizzando CNTs marcati con sonda fluorescente, BODIPY, (composto 7) e CNTs marcati e funzionalizzati con biotina (composto 8)

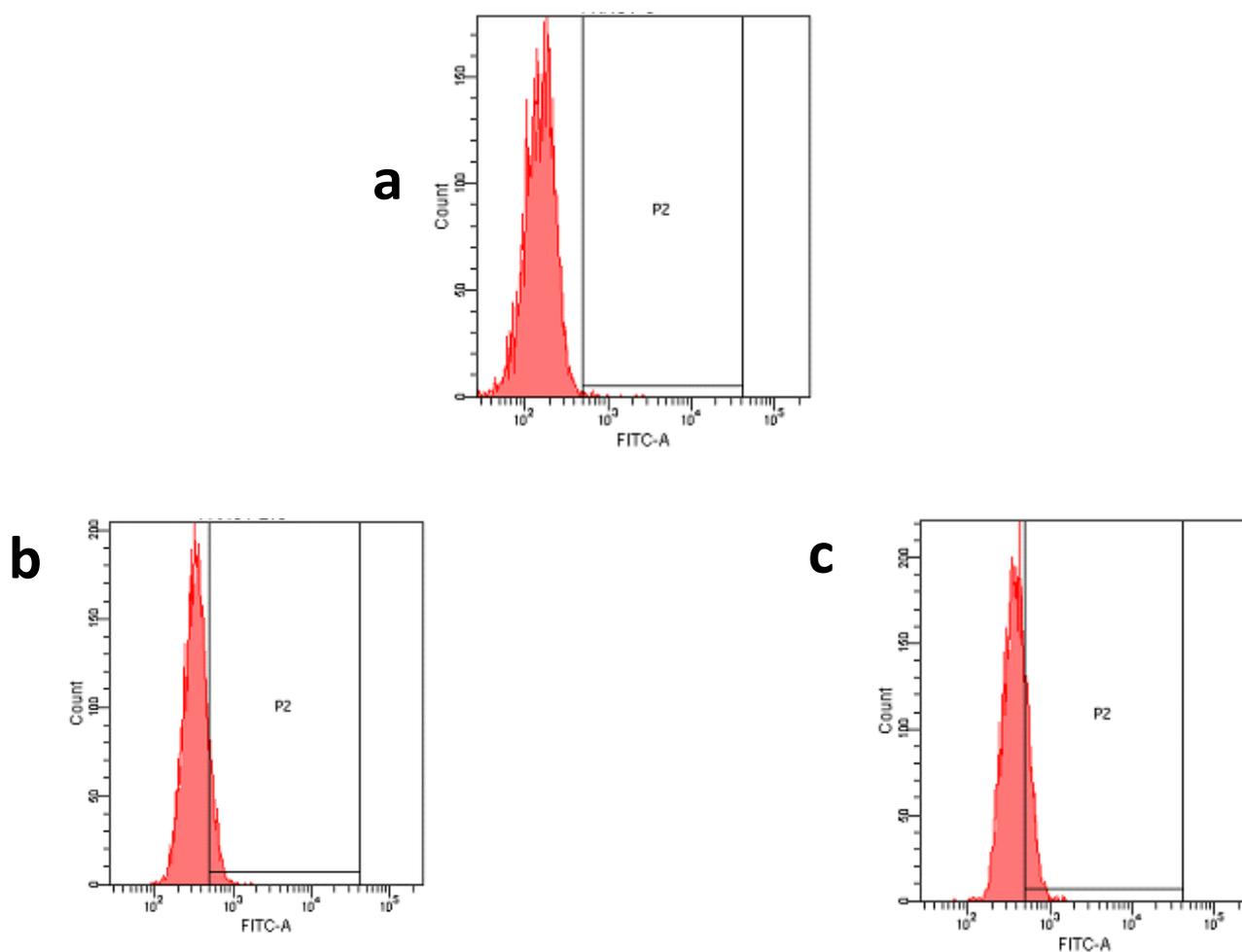




**Figura 24** - Composto **7** e composto **8**.

In questo tipo di analisi, le PANC-1 sono state tenute in incubazione in presenza di 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  del composto CNTs-BODIPY (**7**) come controllo positivo e 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  CNTs-BODIPY-Biotina (**8**) per 2 ore. Successivamente le cellule sono state lavate con PBS, tripsinizzate ed analizzate per mezzo del citofluorimetro. La citofluorimetria è un metodo che permette di analizzare le caratteristiche morfologiche delle cellule o, eventualmente, il contenuto di un determinato fluoroforo per singola cellula. Nel nostro caso, il segnale deriva dal BODIPY legato ai nanotubi. In tal modo possiamo verificare se sia avvenuta o meno l'internalizzazione dei nanotubi nelle cellule.

I risultati dell'analisi citofluorimetrica sono riportati in figura.

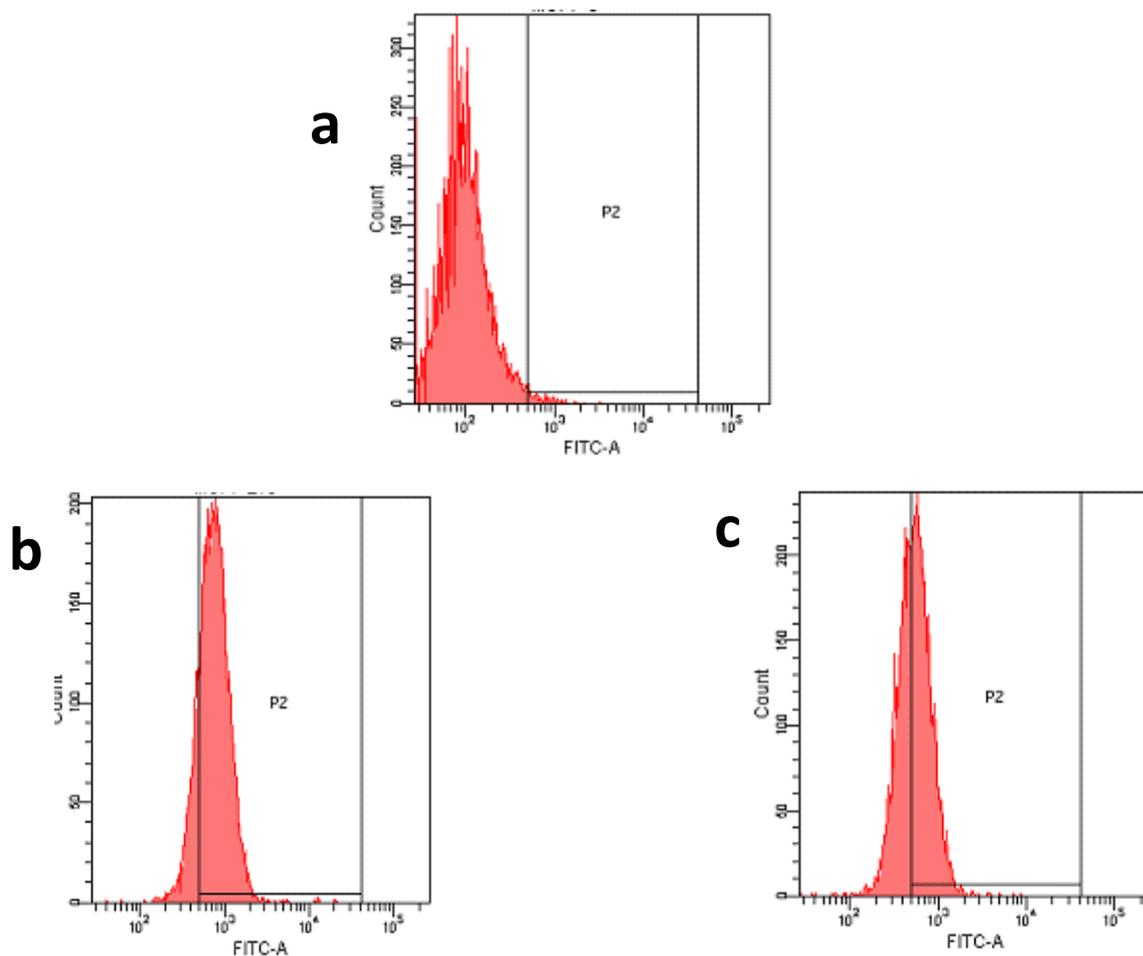


**Figura 25** – Analisi citofluorimetrica delle PANC-1 trattate con i composti **7** e **8**, incubate per 2 ore. Cellule non trattate (**a**); cellule trattate con CNTs-BODIPY (**b**); cellule trattate con BODIPY-CNTs-Biotina (**c**).

**Tabella 3** – Dati di fluorescenza delle PANC-1 trattate con i composti **7** e **8**, incubate per 2 ore

Composto	Fluorescenza (%)
Controllo	0.4
<b>7</b>	12.4
<b>8</b>	22.2

Dai risultati è evidente che la quota di nanotubi incorporata all'interno di queste cellule non è molto elevata. Ciò appare ancor più chiaro se questi ultimi dati vengono confrontati con i risultati ottenuti utilizzando altre tipologie cellulari, quali le cellule di carcinoma mammario MCF7 (Figura 26).



**Figura 26** - Analisi citofluorimetrica delle MCF7 trattate con i composti **7** e **8**, incubate per 2 ore. Cellule non trattate (**a**); cellule trattate con CNTs-BODIPY (**b**); cellule trattate con BODIPY-CNTs-Biotina (**c**).

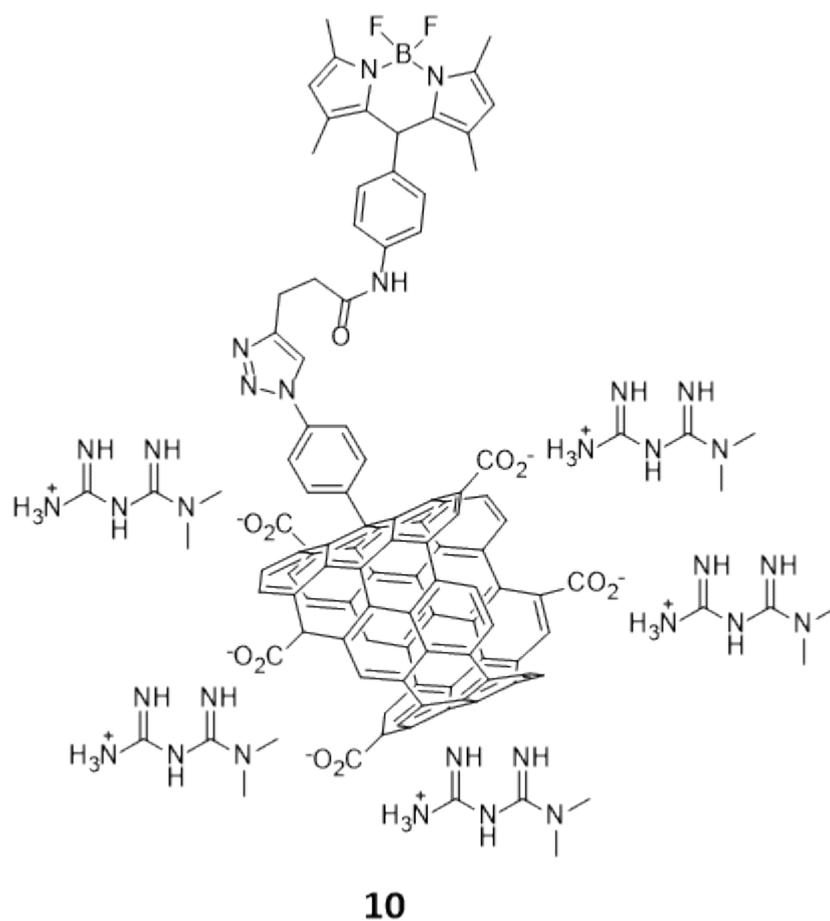
**Tabella 4** - Dati di fluorescenza delle MCF7 trattate con i composti **7** e **8**, incubate per 2 ore

Composto	Fluorescenza (%)
Controllo	1.5
<b>7</b>	83.2
<b>8</b>	58.3

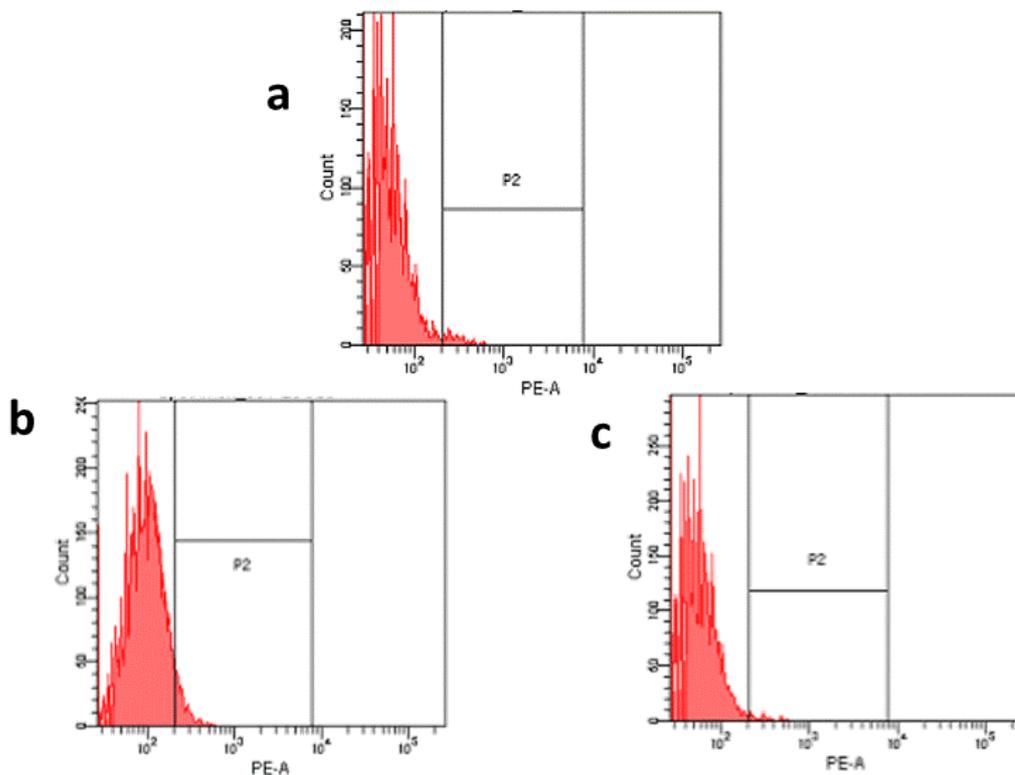
Come possiamo osservare, utilizzando le cellule di carcinoma mammario (MCF7), la maggior parte delle cellule presenta elevati livelli di fluorescenza, a dimostrazione dell'elevata capacità dei nanotubi di penetrare in queste cellule. Nel caso del composto **8**, la percentuale di cellule positive scende. Tuttavia è molto probabile che i livelli d'incorporazione siano simili e la riduzione osservata dipenda esclusivamente dalla minor quantità di fluoroforo presente sulla superficie di questi

nanotubi.

Abbiamo poi verificato se i nanotubi salificati con metformina riescono a penetrare all'interno delle cellule pancreatiche. A tal scopo abbiamo utilizzato un nanotubo marcato con sonda fluorescente e salificato con metformina (immagine composto **10**). Per valutare l'assorbimento di tale composto da parte delle cellule, abbiamo utilizzato lo stesso protocollo descritto precedentemente: le cellule sono state incubate in presenza del nanotubo e dopo 2 ore di incubazione sono state analizzate utilizzando un citofluorimetro a flusso. I risultati ottenuti sono stati riportati nella figura 28.



**Figura 27** – Composto **10**.



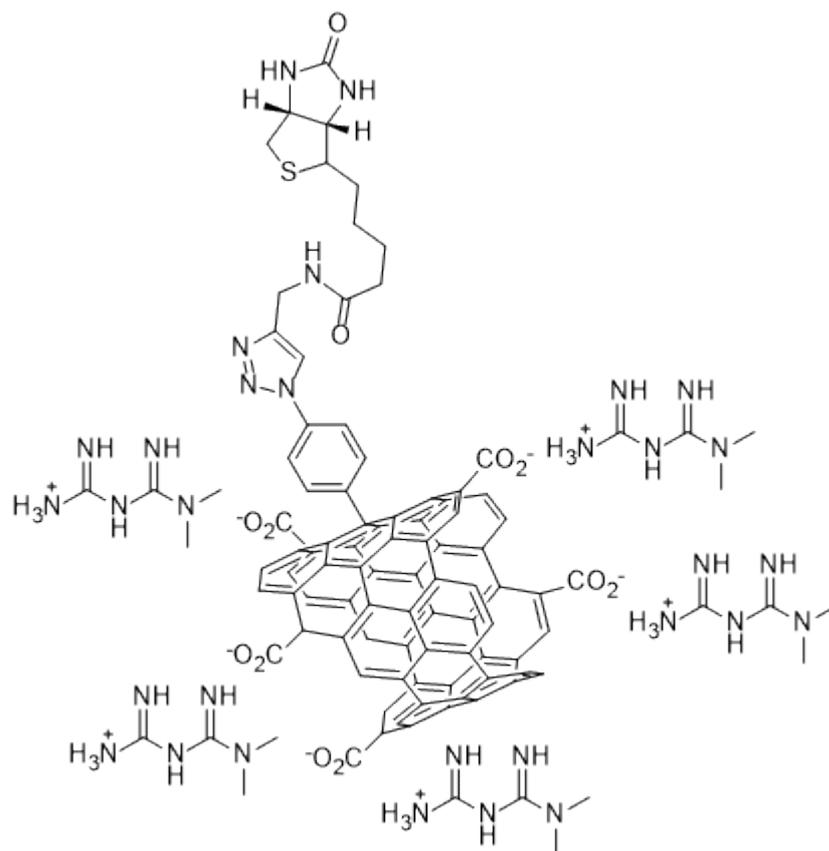
**Figura 28** – Analisi citofluorimetrica delle PANC-1 trattate con i composti **9** e **10**, incubate per 2 ore. Cellule non trattate (**a**); cellule trattate con CNTs-BODIPY (**b**); cellule trattate con BODIPY-CNTs-Metformina sale (**c**).

**Tabella 5** - Dati di fluorescenza delle PANC-1 trattate con i composti **9** e **10**, incubate per 2 ore

Composto	Fluorescenza (%)
Controllo	5.2
<b>9</b>	12.1
<b>10</b>	5.55

Come possiamo osservare dai grafici e dai dati riportati in tabella, sembra che la presenza della metformina sulla superficie del nanotubo impedisca il trasferimento degli stessi nanotubi all'interno delle cellule. Possiamo ipotizzare che tale effetto sia determinato dalla presenza della metformina sulla superficie del nanotubo. A pH fisiologico, i gruppi amminici della metformina risultano protonati e finiscono per caricare positivamente il nanotubo. In tale condizione esso non

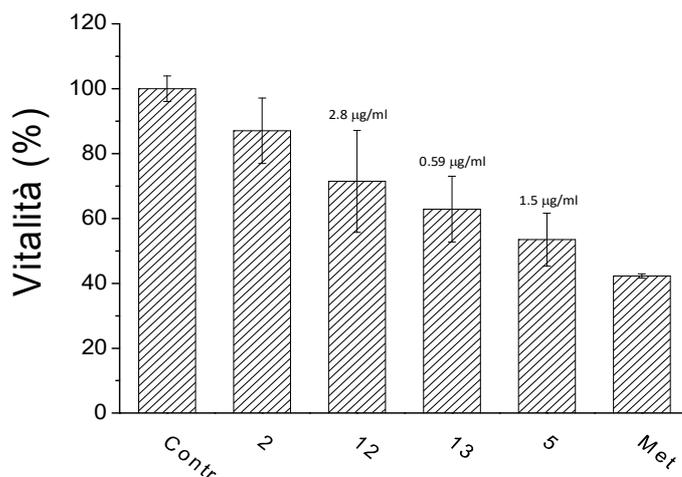




**13**

**Figura 29** - Composto **12** e composto **13**.

Alle cellule PANC-1 è stata somministrata metformina 1 mM, corrispondente a 129.17  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , come controllo positivo e 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  di nanotubi ossidati (**2**) come controllo negativo. Sono stati testati i nanotubi salificati (**12**), il composto covalente (**5**) e il composto (**13**) in dosi di 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . Le cellule sono state mantenute in incubatore a 37°C, in atmosfera contenente 5% di  $\text{CO}_2$  per 48 ore. Trascorse le 48 ore è stato eseguito il saggio MTT per valutare la tossicità dei CNTs. Il saggio MTT, è un saggio colorimetrico standard per la misurazione dell'attività degli enzimi mitocondriali che riducono l'MTT a formazano, un sale di colore blu/violaceo. Dopo un ora dalla formazione dei cristalli, le cellule vengono lavate e lisate con DMSO che solubilizza inoltre i cristalli di formazano generati dalle cellule sopravvissute. L'attività enzimatica è valutata e misurata mediante la lettura spettrofotometrica alla lunghezza d'onda di 595 nm.



**Figura 30** – Saggio di vitalità cellulare su PANC-1, determinata attraverso il test MTT. Controllo, cellule non trattate; 2, cellule incubate con ox-CNTs; 12, cellule trattate con CNTs salificati con metformina; 13, cellule trattate con CNTs salificati con metformina e legati covalentemente con biotina; 5, cellule trattate con CNTs legati covalentemente con metformina; Met, cellule trattate con metformina libera 1mM. I valori riportati in figura (2.8, 0.59 e 1.5 µg/mL) rappresentano le concentrazioni di metformina alle quali sono state esposte le cellule. I dati riportati in figura rappresentano il valor medio +/- S.E.M.

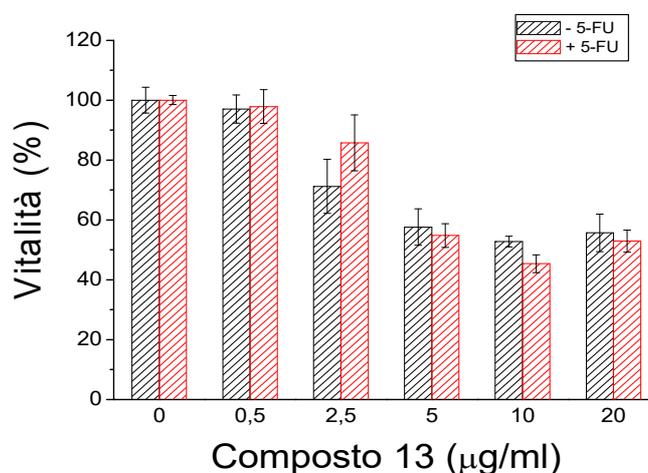
Il test evidenzia che i nanotubi ossidati non sono tossici, mentre tutti i nanotubi che trasportano metformina presentano vari gradi di tossicità. Tuttavia, non risulta semplice valutare quale tra essi sia il più efficace. Se prendiamo in considerazione la quantità di metformina trasportata dai CNTs, si osserva che il composto **5** appare il più potente tra quelli analizzati. Tuttavia il composto **13** mostra effetti poco inferiori agli altri anche se trasporta quantitativi di metformina più bassi di 2.5 volte. Il composto **12** invece è sicuramente quello meno efficace dal momento che trasporta quantitativi doppi di metformina rispetto al composto **5**. Quindi sembra che, in ogni caso, i nanotubi utilizzati risultino più potenti rispetto alla metformina libera. In particolare, utilizzando il composto **5**, grazie al quale si raggiungono concentrazioni di metformina equivalenti a circa 11 µM, si osservano effetti citotossici molto simili a quelli osservati utilizzando 1 mM di metformina libera. Ciò suggerisce che, grazie ai nanotubi, è possibile ottenere effetti tossici comparabili utilizzando concentrazioni di metformina circa 50 volte inferiori.

### 3.4.3 Tossicità dei CNTs salificati con metformina e funzionalizzati covalentemente col selettore

Molte cellule tumorali sovraesprimono il recettore per la biotina, questo probabilmente a causa della maggiore richiesta di biotina da parte delle cellule stesse per sostenere un modesto tasso di proliferazione.

Perciò sono state effettuate ulteriori analisi per capire se il nanotubo funzionalizzato con biotina, risulta essere più efficace del nanotubo privo di selettore. Inoltre abbiamo voluto valutare se un aumento della dose porta ad ottenere una tossicità maggiore.

Alle cellule PANC-1 sono state quindi somministrate dosi crescenti (0.5, 2.5, 5, 10, 20  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) del composto **13** e sono state incubate per 48 ore. Con la stessa procedura del precedente, viene eseguito il saggio MTT per valutare la tossicità dei CNTs in funzione della loro concentrazione. I risultati del test sono stati riportati in Figura 31.



**Figura 31** - Saggio di vitalità cellulare. Cellule PANC-1 sono state incubate in presenza di concentrazioni crescenti del composto **13** a 37°C per 48 ore. Dopo tale intervallo di tempo, la vitalità cellulare è stata valutata tramite il saggio MTT. Il test è stato ripetuto aggiungendo nel terreno di crescita anche il 5-FU (concentrazione finale 20  $\mu\text{M}$ ). Ciascun test è stato eseguito in quadruplo. I dati riportati in figura rappresentano il valor medio  $\pm$  S.E.M.

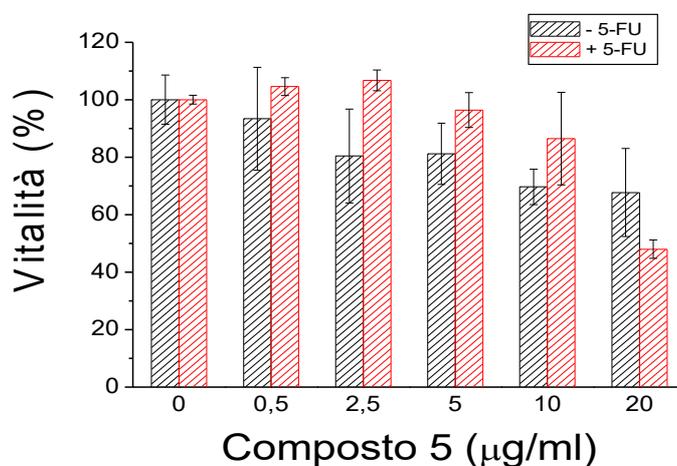
Il trattamento col composto **13** porta solo un lieve incremento della tossicità all'aumentare della concentrazione fino a stabilizzarsi dopo 5  $\mu\text{g}/\text{ml}$ . Infine, possiamo notare che l'aggiunta del 5-FU al terreno di crescita non causa un rilevante incremento della mortalità cellulare, per ciascuna

concentrazione del composto **13** utilizzata. Ciò indica che, in queste condizioni, la metformina trasportata dal nanotubo e il 5-FU non agiscono in sinergia. Tuttavia, è interessante rilevare che già alla concentrazione di 5  $\mu\text{g/ml}$  del composto **13**, si osserva una riduzione di circa il 50 % della vitalità delle cellule tumorali pancreatiche, un effetto sicuramente non riproducibile utilizzando una equivalente dose di metformina libera.

### 3.4.4 Tossicità dei CNTs funzionalizzati con metformina, privi di selettore

Come abbiamo osservato dai test preliminari, la metformina legata covalentemente ai CNTs causa morte cellulare delle PANC-1. Per capire qual è la dose maggiormente tossica sono state somministrate dosi crescenti del composto **5** (0.5, 2.5, 5, 10, 20  $\mu\text{g/ml}$ ) alle cellule PANC-1 le quali sono state poi mantenute in incubatore per 48 ore.

Anche in questo caso la tossicità dei nanotubi viene valutata attraverso il saggio MTT, con la medesima procedura dei precedenti.



**Figura 32** - Saggio di vitalità cellulare. Cellule PANC-1 sono state incubate in presenza di concentrazioni crescenti del composto **5** a 37° C per 48 ore. Dopo tale intervallo di tempo, la vitalità cellulare è stata valutata tramite il saggio MTT. Il test è stato ripetuto aggiungendo nel terreno di crescita anche il 5-FU (concentrazione finale 20  $\mu\text{M}$ ). Ciascun test è stato eseguito in quadruplo. I dati riportati in figura rappresentano il valor medio  $\pm$  S.E.M.

I risultati mostrano che il grado di vitalità cellulare decresce proporzionalmente all'aumentare della dose dei CNTs che è stata somministrata. Alla concentrazione finale di 20  $\mu\text{g/ml}$ , corrispondenti ad

una concentrazione di metformina di 23  $\mu\text{M}$ , si osserva una riduzione della vitalità di circa il 30%. Tuttavia, quando i nanotubi sono stati somministrati contemporaneamente al 5-FU, non abbiamo osservato alcun effetto sinergico alle concentrazioni più basse, mentre un incremento della tossicità è stato osservato alla concentrazione più alta di nanotubi (20  $\mu\text{g/ml}$ ).

## 4 Conclusione e sviluppi futuri

Nel presente lavoro di tesi siamo riusciti a funzionalizzare i CNTs con la metformina e a caratterizzarli attraverso un approccio semplice ed efficace. La funzionalizzazione col farmaco è stata eseguita partendo dall'attivazione dei gruppi carbossilici dei ox-CNTs, attraverso la reazione di sostituzione nucleofila acilica, che ha permesso la successiva formazione dei legami ammidici tra i gruppi carbonilici dei nanotubi attivati e l'ammina primaria della metformina. Una volta stabilito il carico di metformina sui nanotubi, il sistema è stato testato sulle cellule PANC-1 per valutarne l'efficacia. I primi test biologici sono stati eseguiti per valutare la capacità delle cellule di incorporare i CNTs, utilizzando nanotubi marcati con la sonda fluorescente BODIPY e funzionalizzati col selettore biotina. Le analisi effettuate hanno mostrato che la quota di nanotubi incorporata all'interno di queste cellule non è molto elevata. Sorprendentemente, abbiamo inoltre osservato che i nanotubi marcati con sonda fluorescente e salificati con metformina non riescono a penetrare all'interno delle cellule. Possiamo quindi ipotizzare che sia proprio la presenza della metformina sulla superficie dei nanotubi, ad impedire il loro trasferimento all'interno delle cellule, a causa della carica presente sui CNTs dovuta ai gruppi amminici della metformina, che risultano protonati a pH fisiologico.

Tuttavia i dati relativi alla tossicità dei vari nanotubi che trasportano metformina presentano diversi gradi di tossicità ed in ogni caso, superiori della metformina libera. È stato osservato che il composto salificato con metformina non presenta effetti tossici rilevanti. Tuttavia, il composto da noi sintetizzato, contenente la metformina covalentemente legata al nanotubo, mostra un grado di tossicità sicuramente superiore a quello della metformina libera. Test ulteriori hanno rilevato che la tossicità dei nostri CNTs funzionalizzati covalentemente con metformina aumenta all'aumentare della dose somministrata alle cellule. Tuttavia, quando sono stati somministrati contemporaneamente al 5-FU non hanno presentato alcun effetto sinergico fino alla più alta

concentrazione dei CNTs (20 µg/ml), alla quale si è avuto una riduzione di circa il 50 % della vitalità delle cellule tumorali pancreatiche.

I test di tossicità relativi ai vari nanotubi carichi di metformina hanno mostrato inoltre che gli effetti citotossici dei nanotubi funzionalizzati col selettore e salificati con metformina, risultano poco inferiori rispetto al nanotubo che trasporta la metformina legata covalentemente. Perciò sono state effettuate analisi per capire se il nanotubo funzionalizzato con biotina, risulta essere più efficace del nanotubo privo di selettore, valutando inoltre se l'aumento della dose porta ad ottenere una tossicità maggiore. Anche in questo caso abbiamo osservato un incremento della tossicità all'aumentare della concentrazione. Tuttavia, per concentrazioni superiori a 5 µg/ml, concentrazione che determina una riduzione quasi del 50% della vitalità cellulare, non si osserva un ulteriore aumento della tossicità. Anche in questo caso, gli effetti tossici osservati non risultano riproducibili utilizzando una equivalente dose di metformina libera, confermando che i nanotubi utilizzati riescono a veicolare, con elevata efficienza, il farmaco scelto per effettuare i nostri test. Inoltre, è evidente che la presenza di un selettore in grado di interagire con uno specifico recettore di membrana, favorisce il trasporto dei nanotubi all'interno delle cellule.

Gli sviluppi futuri riguarderanno quindi la sintesi di CNTs equipaggiati con sonda fluorescente, con un selettore e legati covalentemente con metformina, dato che questo tipo di funzionalizzazione si è rivelato più efficace dal punto di vista terapeutico. Questi composti saranno poi testati sulle cellule cancerogene pancreatiche per valutare la loro internalizzazione e l'eventuale raggiungimento di una maggiore tossicità per la presenza del selettore.

## 5 Parte sperimentale

### 5.1 Reagenti e strumentazione

I **reagenti** utilizzati di cui non è riportata la sintesi sono commercialmente disponibili (Aldrich, Fluka o TCI) e se non specificato, sono stati impiegati senza ulteriore purificazione.

Gli **spettri IR** sono stati registrati con uno spettrofotometro Perkin-Elmer FT-IR 881. Le frequenze di assorbimento sono espresse in numero d'onda  $\nu$  ( $\text{cm}^{-1}$ ).

Le **analisi elementari** sono state eseguite utilizzando un Analizzatore Elementare CHN- S Flash E1112 Thermofinnigan.

Le **analisi ICP** con uno Spettrofotometro a plasma di Argon ICP Perkin Elmer Optima 2000 OES DV.

### 5.2 Acronimi e formule utilizzate

OXPHOS: Fosforilazione ossidativa.

PDAC: Pancreatic ductal adenocarcinoma .

PC: Pancreatic cancer.

CSCs: Cancer Stem Cells.

CICs: Cancer-Initiating Cells.

CCCs: Chemo-resistant Cancer Cells.

PSCs: Pancreatic Stellate Cells.

DCC: N,N'-dicicloesilcarbodiimmide.

DMF: N, N-dimetil formammide.

H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>: Acido solforico.

HNO<sub>3</sub>: Acido Nitrico.

iPrOH: Isopropanolo.

MeOH: Metanolo.

2-PrOH: 2- propanolo.

NHS: N-idrossisuccinimide.

DMSO: Dimetilsolfossido.

NH<sub>2</sub>-(CH<sub>2</sub>)<sub>11</sub>-SH: 1- ammino undecil-1-tiolo.

EDAC: N-etil-N'-(3-dimetilamminopropil) carbodiimmide cloridrato.

N<sub>2</sub> : Flusso di azoto.

r.t: Temperatura ambiente.

MES: Acido 2-(N-morfolino) etansolfonico.

MTT: Bromuro di 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio.

PBS: Phosphate-buffered saline.

BSA: Bovine serum albumine.

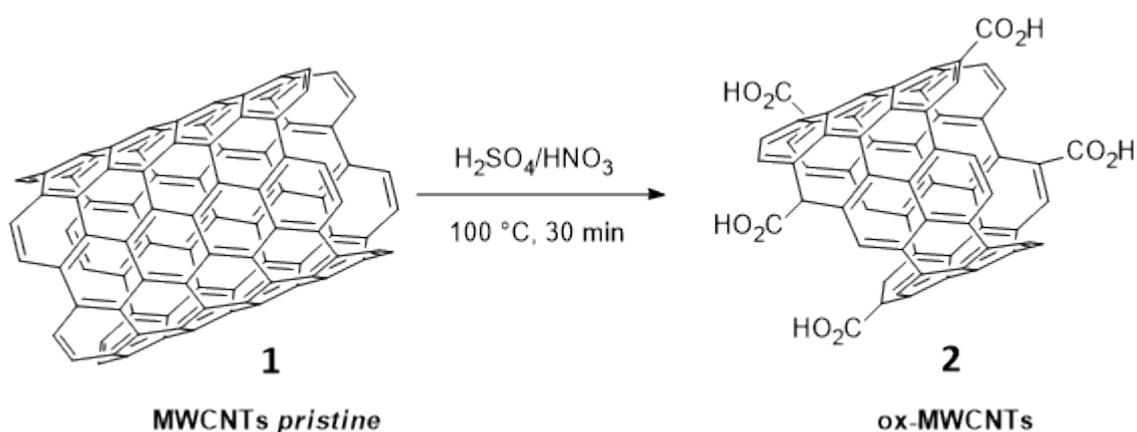
ICP: Inductively coupled plasma.

TEM: Transmission electron microscopy.

5-FU: 5-Fluorouracile.

## 5.3 Sintesi effettuate

### Ossidazione dei CNTs (2)



Una miscela di nanotubi di carbonio *pristine*\* (502.6 mg), H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 96 % (30 mL) e HNO<sub>3</sub> 65 % (10 mL) viene agitata a 100°C per 30'. Successivamente la sospensione è stata diluita con una miscela di acqua/iPrOH (1:1) e centrifugata a 1400 g per 30'. Il surnatante viene rimosso ed il residuo subisce altri quattro cicli di centrifugazioni e lavaggi con una miscela di acqua/iPrOH (1:3), fino a

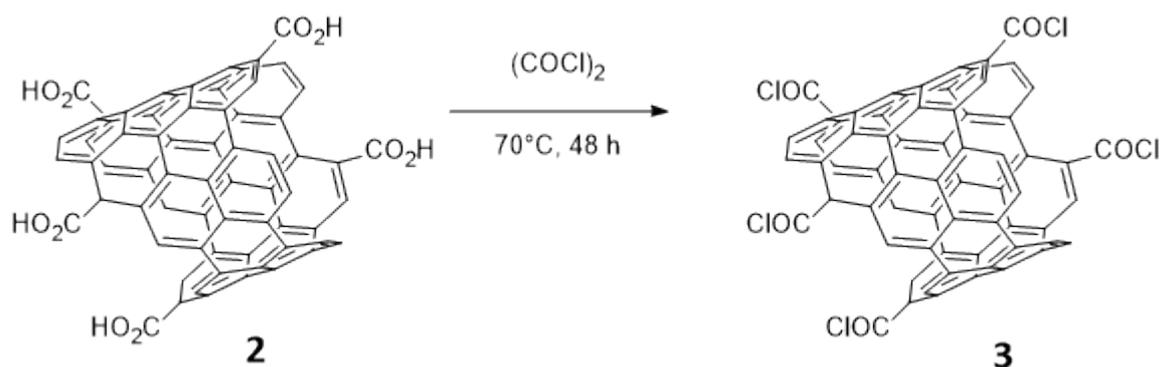
\*Sigma Adrich Carbon nanotube, multi-walled, product n.724769, lot. MKBH7743V CAS: 308068-56-6.

quando il pH del surnatante risulta neutro. Il solido viene essiccato a 80°C per 12 h, ottenendo i nanotubi come una polvere nera (382.6 mg).

IR (KBr): 3422, 1714, 1574, 1546, 1211 (cm<sup>-1</sup>).

Analisi Elementare: C 81.34 ; N 0.19 ; H 0.65 (%).

### Clorurazione dei CNTs con (COCl)<sub>2</sub> (**3**)

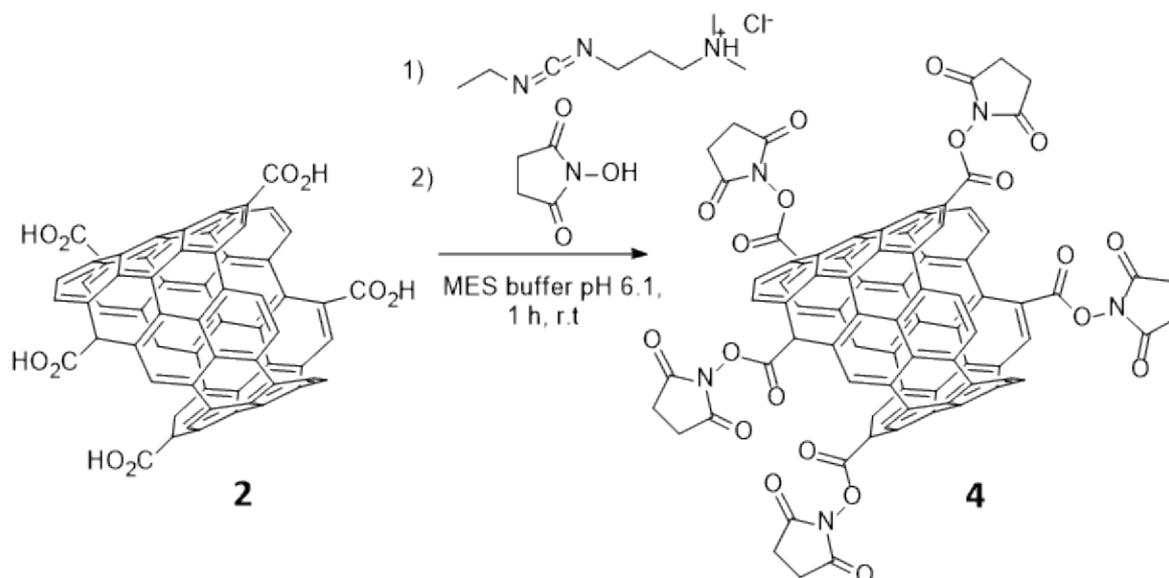


Utilizzando vetreria anidra, i nanotubi ossidati (**2**) (14.7 mg) vengono disciolti in (COCl)<sub>2</sub> (4.5 mL) sonicando per 5'. la reazione viene fatta avvenire agitando la miscela per 24 h a 70°C sotto costante flusso di N<sub>2</sub>. Dalla miscela di reazione, mantenendola sotto agitazione, viene distillato via il (COCl)<sub>2</sub> con pompa ad olio equipaggiata di una trappola ad N<sub>2</sub>. Al residuo solido viene aggiunto toluene anidro e si filtra la miscela su Teflon idrofobo\* sotto atmosfera di N<sub>2</sub>. Si eseguono quattro lavaggi con toluene anidro senza mai portare a secco e gli ultimi due lavaggi con pentano anidro. Il residuo viene essiccato sotto vuoto per 30', ottenendo il prodotto (**3**) (11.1 mg) come polvere nera.

IR (KBr): 3430, 1714, 1623, 1520, 1190, 770. (cm<sup>-1</sup>)

\*Wathmann, porosity 20 μm, diameter 25 mm

## Attivazione dei gruppi acidi dei nanotubi con NHS (4)

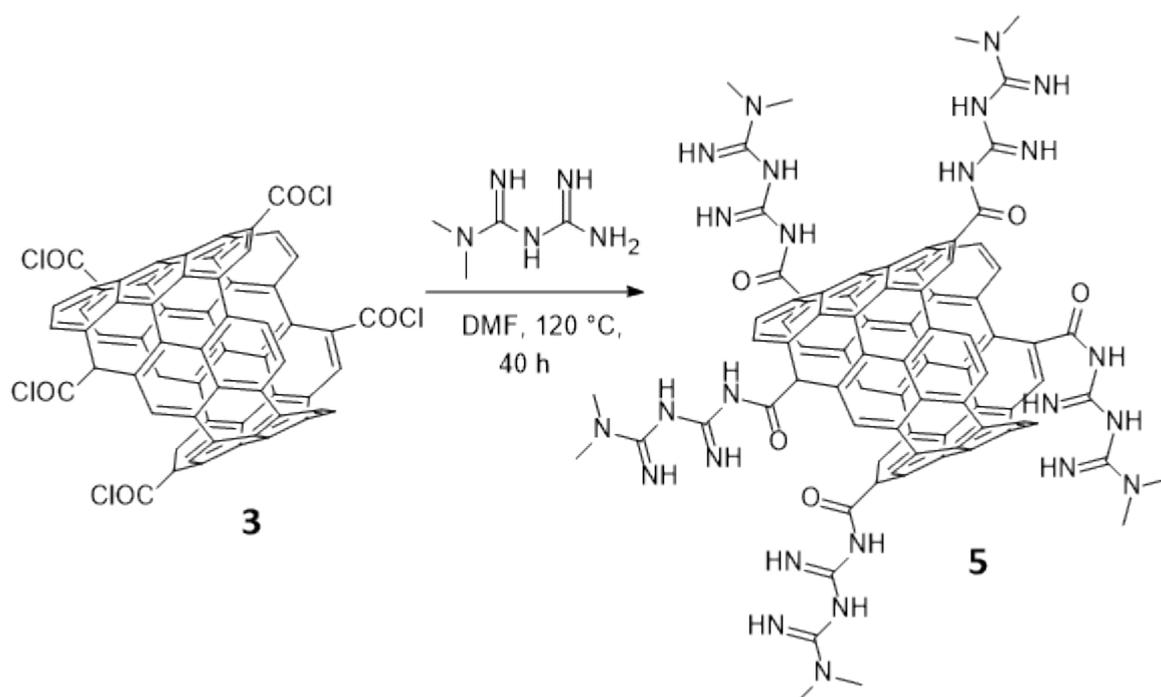


I nanotubi ossidati (**2**) (19.8 mg) vengono disciolti in MES (buffer pH 6.1) (52.8 mL) sonicando per 5', a questi si aggiunge NHS (1.09 g) precedentemente disciolto in MES (13.4 mL), si agita la miscela e si procede con l'aggiunta di EDAC (114.7 mg) anch'esso disciolto in MES (7.35 mL). La risultante miscela deve essere mantenuta sotto agitazione per 1 h, successivamente si filtra su filtro in Teflon idrofilico\* effettuando quattro lavaggi con MES (10 mL) seguiti da un lavaggio con  $\text{H}_2\text{O}$  MILLIQ (2 mL) e l'ultimo con MeOH (2 mL), per rimuovere l'acqua rimasta. Quest'operazione di filtrazione richiede molto tempo. Il precipitato viene poi mantenuto ad essiccare per 6 h sotto vuoto ottenendo il prodotto (**4**) sotto forma di polvere nera (18.7 mg).

IR (KBr): 3415, 2916, 2837, 1722, 1707, 1623, 1579, 1184 ( $\text{cm}^{-1}$ ).

Analisi elementare: C 76.91 ; N 0.825 ; H 1.13 (%).

## Decorazione dei nanotubi clorurati con metformina (5)



I nanotubi acilati (**3**) (11.1 mg) vengono sospesi in DMF anidro (3 mL) e sonicati per 10'. Si aggiunge metformina libera (58 mg) e si mantiene la miscela di reazione sotto agitazione per 40 h a 120°C in costante flusso di N<sub>2</sub>. Una volta che il prodotto (**5**) viene raffreddato a temperatura ambiente, viene lavato con 2-propanolo e sonicato per 5'. Si centrifuga la soluzione nera per 20' a 1400 g, si rimuove il surnatante, si disperde il precipitato in una miscela 2-PrOH/diisopropilene (1:1) e si sonica per 5'. Le operazioni di centrifugazione, rimozione del surnatante e dispersione del precipitato vengono ripetute quattro volte utilizzando ogni volta la miscela 2-PrOH/diisopropilene con lo scopo di rimuovere la metformina non reagita. Infine il precipitato si scioglie in acetone, si raccolgono i nanotubi in un portacampione e si portano a seccare prima sotto flusso di N<sub>2</sub> poi sotto vuoto. Si ottengono sotto forma di polvere nera (14.5 mg).

**IR** (KBr): 3400, 1714, 1611, 1570, 1630, 1513, 1405, 1160, 1115 (cm<sup>-1</sup>).

**Analisi elementare:** C 65.99 ; N 13.84 ; H 2.62 (%).

## Verifica della solubilità della metformina in una miscela 2-PrOH/Diisopropiletere (1:1)

Si disperde metformina libera (1.9 mg) in 2-PrOH (1 mL) e diisopropiletere (1 mL) si sonica per 5' e si centrifuga a 1400 g per 15'. Ad occhio è risultato non essere stata completamente disciolta pertanto è stato fatto evaporare il solvente al rotavapor ed il precipitato è stato seccato sotto flusso di N<sub>2</sub>, ottenendo una polvere bianco-rosa.

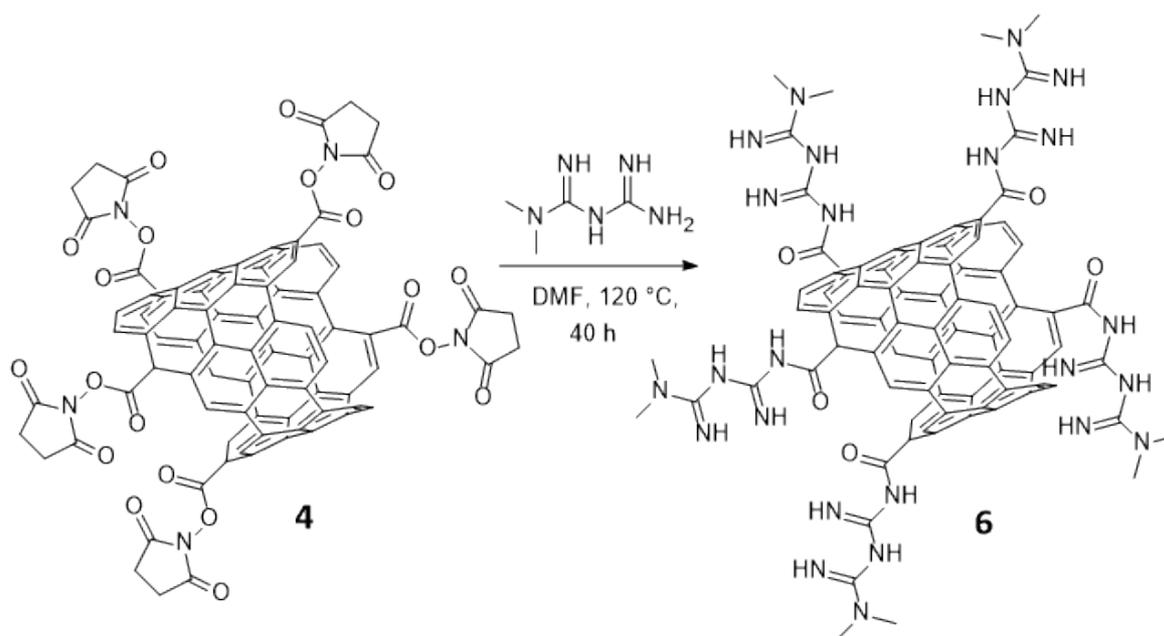
## Purificazione del prodotto (5)

Questi risultati hanno portato a purificare il prodotto (5) dalla metformina che non ha reagito seguendo una procedura diversa.

Il prodotto (5) viene disciolto in H<sub>2</sub>O MILLIQ, la miscela viene filtrata su un filtro in Policarbonato\* effettuando 6 lavaggi utilizzando H<sub>2</sub>O MILLIQ e gli ultimi due con MeOH per rimuovere completamente l'acqua rimasta. Si raccolgono i nanotubi ottenuti(5) in un portacampione e si seccano sottovuoto ottenendoli come polvere nera (10.1 mg).

**Analisi elementare:** C 68.50 ; N 8.20 ; H 1.596 (%)

## Decorazione dei CNT-NHS con metformina (6)



Mantenendo il prodotto (4) (13.7 mg) sotto flusso di N<sub>2</sub> si aggiunge metformina libera (70.5 mg), si aggiunge DMF anidro ( 3.7 mL) e si sonica la miscela per 10' sempre sotto flusso di N<sub>2</sub>.

La reazione viene fatta avvenire sotto agitazione a 120°C in atmosfera di N<sub>2</sub> per 40 h. La miscela di reazione dopo averla fatta raffreddare a temperatura ambiente, viene filtrata su un filtro in Policarbonato\* effettuando 6 lavaggi utilizzando H<sub>2</sub>O MILLIQ e gli ultimi due con MeOH per rimuovere completamente l'acqua rimasta. Si raccolgono i nanotubi ottenuti (**6**) in un portacampione e si seccano sottovuoto ottenendoli come polvere nera (15.8 mg).

**Analisi elementare:** C 61.59 ; N 12.37 ; H 1.49 (%).

## 5.4 Test biologici

### Colture cellulari

Abbiamo eseguito test su cellule derivanti da una linea cellulare di carcinoma pancreatico (PANC-1). Sono state allestite colture in capsule di Petri di diametro 1 cm circa (multiwells da 24), con un terreno di crescita completo DMEM (Dulbecco Eagle's Modified Medium) a cui è stata aggiunta glutammina 2 mM, penicillina 100 U/mL, streptomina 100 µg/ml e siero fetale bovino (FCS) al 10%. Per i test, le piastre sono state tenute in incubatore ad una temperatura di 37°C in atmosfera umidificata al 5% di CO<sub>2</sub> per 48 ore.

### Test d'internalizzazione: citofluorimetria ottica

Nei diversi test eseguiti, sono stati utilizzati nanotubi marcati con due tipi di fluoroforo. Le PANC-1 sono state incubate in presenza di 10 µg/mL di nanotubi **7** e **8** marcati con fluoroforo BODIPY di eccitazione massima 488 nm ed emissione massima 523 nm, a 37°C in atmosfera contenente 5 % CO<sub>2</sub>, per 2 ore. Alle stesse condizioni di incubazione sono state sottoposte le PANC-1 trattate con 10 µg/ml di nanotubi **10** marcati col fluoroforo BODIPY di eccitazione massima 543 nm ed emissione massima 629 nm. Successivamente il terreno è stato rimosso e le cellule sono state lavate 4 volte con 1 mL di PBS (Phosphate Saline Buffer, soluzione tampone). Le cellule poi, sono state tripsinizzate, recuperate per centrifugazione, lavate con PBS, ed infine analizzate al citofluorimetro. L'esperimento è stato ottimizzato considerando la fluorescenza in un intervallo di intensità tale da permetterci di sottrarre l'autofluorescenza delle cellule; il range di fluorescenza selezionato è l'area con la sigla P2.

---

\*Wathmann, porosity 20 µm, diameter 25 mm

## Test di tossicità: MTT

I test sono eseguiti incubando le cellule con i CNTs per 48 ore, dopo di che subiscono un lavaggio con PBS (Phosphate Saline Buffer, soluzione tampone) e viene aggiunta la soluzione di MTT a concentrazione di 0.5 mg/mL. Dopo un'ora di incubazione dall'aggiunta di MTT le cellule vengono sottoposte ad un altro lavaggio con PBS e viene aggiunto DMSO, che lisa le cellule e solubilizza i cristalli di formazano generati dalle cellule sopravvissute. L'attività enzimatica è valutata e misurata mediante la lettura spettrofotometrica del campione, alla lunghezza d'onda di 595 nm.

## 6 Bibliografia

- Aqel, A.; El-Nour, KM.MA.; Ammar, R.A.A.; Warthan, A.A.; Carbon nanotubes, science and technology part (I) structure, synthesis and characterisation. **2012**, 5, 1–23.
- Aguirre, A.J.; Bardeesy, N.; Sinha, M.; Lopez, L.; Tuveson, D.A.; Horner, J.; Redston, M.S.; DePinho, R.A. Activated Kras and Ink4a/Arf deficiency cooperate to produce metastatic pancreatic ductal adenocarcinoma. **2003**, 17, 3112–3126.
- Ali-Boucetta, H.; Al-Jamal, K.T.; McCarthy, D.; Prato, M.; Bianco, A.; Kostarelos, K. Multiwalled carbon nanotube-doxorubicin supramolecular complexes for cancer therapeutics. **2008**, 4, 459-61.
- Ali-Boucetta, H.; Al-Jamal, K. T.; Müller, K. H.; Li, S.; Porter, A. E.; Eddaoudi, A.; Prato, M.; Bianco, A.; Kostarelos, K. Cellular uptake and cytotoxic impact of chemically functionalized and polymer-coated carbon nanotubes. **2011**, 7, 3230.
- Aljada, A & Mousa, S.A. Metformin and neoplasia: Implications and indications. **2012**, 133, 108-115.
- Al-Jamal, K.T.; Nunes, A.; Methven, L.; Ali-Boucetta, H.; Li.S.; Toma, F.M.; Herrero, M.A.; Al-Jamal, W.; ten Eikelder, H.M.; Foster, J.; others. Degree of chemical functionalization of carbon nanotubes determines tissue distribution and excretion profile. **2012**, 51, 6389-93.
- Allen, B.L.; Kichambare, P.D.; Gou,P.; Vlasova, I.I.; Kapralov, A.A.; Konduru, N.;Kagan, V.E. and Star, A. Biodegradation of single-walled carbon nanotubes through enzymatic catalysis. **2008**, 8, 3899-3903.
- Anajafi, T.; Scott, M.D.; You, S.; Yang, X.; Choi, Y.; Qian, SY.; Mallik, S. Acridine Orange Conjugated Polymersomes for Simultaneous Nuclear Delivery of Gemcitabine and Doxorubicin to Pancreatic Cancer Cells. **2016**, 27(3), 762
- Barbacid, M. ras genes. **1987**, 56, 779– 827.
- Bergers, G & Hanahan, D. Modes of resistance to antiangiogenic therapy. **2008**, 8, 592–603.

- Bianco, A.; Kostarelos, K.; Prato, M.; Applications of carbon nanotubes in drug delivery *Current*. **2005**, 9, 674–679.
- Bowker, S.L.; Majumdar, S.R.; Veugelers, P.; Johnson, J.A. Increased cancer-related mortality for patients with type 2 diabetes who use sulfonylureas or insulin. **2006**, 29, 254–258.
- Brand, K. Aerobic glycolysis by proliferating cells: protection against oxidative stress at the expense of energy yield. **1997**, 29, 355–364.
- Büchler, P.; Reber, H.A.; Lavey, R.S.; Tomlinson, J.; Büchler, M.W.; Friess, H.; Hines, O.J. Tumor hypoxia correlates with metastatic tumor growth of pancreatic cancer in an orthotopic murine model. **2004**, 120, 295–303.
- Cetin, M.; Atila, A.; Sahin, S.; Vural, I. Preparation and characterization of metformin hydrochloride loaded-Eudragit RSPO and PLGA nanoparticle. **2013**, 18, 570-576.
- Chai, X.; Chu, H.; Yang, X.; Meng, Y.; Shi, P.; Gou, S. Metformin Increases Sensitivity of Pancreatic Cancer Cells to Gemcitabine by Reducing CD133 + Cell Populations and Suppressing ERK/P70S6K Signaling. **2015**, 5, 14404.
- Chang, Q.; Jurisica, I.; Do, T.; Hedley, D.W. Hypoxia Predicts Aggressive Growth and Spontaneous Metastasis Formation from Orthotopically Grown Primary Xenografts of Human Pancreatic Cancer. **2011**, 71, 3110–3120.
- Chen, C & Yu, Z.; siRNA Targeting HIF-1 $\alpha$  Induces Apoptosis of Pancreatic Cancer Cells through NF- $\kappa$ B-independent and -dependent Pathways under Hypoxic Conditions. **2009**, 29, 1367–1372.
- Chen, J.; Zhao, S.; Nakada, K.; Kuge, Y.; Tamaki, N.; Okada, F.; Wang, J.; Shindo, M.; Higashino, F.; Takeda, K.; Asaka, M.; Katoh, H.; Sugiyama, T et al. Dominant-Negative Hypoxia-Inducible Factor-1 $\alpha$  Reduces Tumorigenicity of Pancreatic Cancer Cells through the Suppression of Glucose Metabolism. **2003**, 162, 1283–1291.
- Chen, S.J.; Zhang, Q.B.; Zeng, L.J.; Lian, G.D.; Li, J.J.; Qian, C.C et al. Distribution and clinical significance of tumour-associated macrophages in pancreatic ductal adenocarcinoma: a retrospective analysis in China. **2015**, 22(1), e11–9.
- Cheng, G.; Lanza-Jacoby, S. Metformin decreases growth of pancreatic cancer cells by decreasing reactive oxygen species: Role of NOX4. **2015**, 465, 41 – 46.
- Chu, G.C.; Kimmelman, A.C.; Hezel, A.F.; DePinho, R.A. Stromal biology of pancreatic cancer. **2007**, 101, 887–907.
- Cohen, R.; Neuzillet, C.; Tijeras-Raballand, A.; Faivre, S.; De Gramont, A.; Raymond, E. Targeting cancer cell metabolism in pancreatic adenocarcinoma. **2015**, (6), 19, 16832-16840.
- Conroy, T.; Desseigne, F.; Ychou, M, et al. FOLFIRINOX versus gemcitabine for metastatic pancreatic

cancer. **2011**, 364(19), 1817–1825.

- Corti, G.; Cirri, M.; Maestrelli, F.; Mennini, N.; Mura, P.; Sustained release matrix tablets of metformin hydrochloride in combination with triacetil- $\beta$ -cyclodextrin. **2008**, 68, 303-309.
- Couvelard, A.; O'Toole, D.; Leek, R.; Turley, H.; Sauvanet, A.; Degott, C.; Ruzzniewski, P.; Belghiti, J.; Harris, A.L.; Gatter, K.; Pezzella, F. Expression of hypoxia-inducible factors is correlated with the presence of a fibrotic focus and angiogenesis in pancreatic ductal adenocarcinomas. **2005**, 46, 668–676.
- Cunningham, D.; Chau, I.; Stocken, D.D, et al. Phase III randomized comparison of gemcitabine versus gemcitabine plus capecitabine in patients with advanced pancreatic cancer. **2009**, 27(33), 5513–5518.
- Dalerba, P.; Cho, R.W and Clarke, M.F. Cancer stem cells: models and concepts. **2007**,58, 267–284.
- Datsyuk, V.; Kalyva, M.; Papagelis, K.; Parthenios, J.; Tasis, D.; Siokou, A.; Kallitsis, I.; Galiotis, C. Chemical oxidation of multiwalled carbon nanotubes. **2008**, 46, 833.
- DeBerardinis, R.J.; Mancuso, A.; Daikhin, E.; Nissim, I.; Yudkoff, M.; Wehrli, S.; Thompson, C.B. Beyond aerobic glycolysis: transformed cells can engage in glutamine metabolism that exceeds the requirement for protein and nucleotide synthesis. **2007**, 104, 19345–19350.
- DeFronzo, R.; Fleming, G.A.; Chen, K.; Bicsak, T.A. Metformin-associated lactic acidosis: Current perspectives on causes and risk. **2016**, 65(2), 20-9.
- Du, J.; Nelson, S.; Simons, A.L.; Olney, K.E.; Moser, J.C.; Schrock, H.E.; Wagner, B.A.; Buettner, G.R.; Smith, B.J.; Teoh, M.L.; Tsao, M.S.; Cullen, J.J. Regulation of pancreatic cancer growth by superoxide. **2013**, 52, 555 -567.
- Ebbesen, T.W.; Ajayan, P.M.; Large-scale synthesis of carbon nanotubes. **1992**, 358, 220.
- Erkan, M.; Adler, G.; Apte, M.V.; Bachem, M.G.; Buchholz, M.; Detlefsen, S. et al. StellaTUM: current consensus and discussion on pancreatic stellate cell research. **2012** Gut 61, 172–178.
- Feazell, R.P.; Nakayama-Ratchford, N.; Dai, H.; Lippard, S. J.J. Soluble single-walled carbon nanotubes as longboat delivery systems for platinum(IV) anticancer drug design. **2007**, 129, 8438.
- Fedeli, S.; Paoli, P.; Brandi, A.; Venturini, L.; Giambastiani, G.; Tuci, G.; Cicchi, S. Azido substituted BODIPY dyes for the production of fluorescent carbon nanotubes. **2015**, vol. 21, 15349-15353.
- Ferlay, J.; Soerjomataram, I.; Ervik, M.; Dikshit, R.; Eser, S.; Mathers, C.; Rebelo, M.; Parkin, DM.; Forman, D.; Bray, F. GLOBOCAN v1.0, Cancer Incidence and Mortality Worldwide. **2012**, No. 11.
- Ferrari, M. Cancer nanotechnology: opportunities and challenges. **2005**, 5, 161–71.
- Flaherty, K.T et al. Inhibition of mutated, activated BRAF in metastatic melanoma. **2010**, 363, 809–819.

- Guillaumond, F.; Iovanna, J.L.; Vasseur, S. Pancreatic tumor cell metabolism: focus on glycolysis and its connected metabolic pathways. **2014**, 545, 69–73.
- Guillaumond, F.; Leca, J.; Olivares, O.; Lavaut, M.N.; Vidal, N.; Berthezène, P.; Dusetti, N.J.; Loncle, C.; Calvo, E.; Turrini, O.; Iovanna, J.L.; Tomasini, R.; Vasseur, S. Strengthened glycolysis under hypoxia supports tumor symbiosis and hexosamine biosynthesis in pancreatic adenocarcinoma. **2013**, 110, 3919–3924.
- Hamada, S.; Masamune, A.; Shimosegawa, T.; Alteration of pancreatic cancer cell functions by tumor-stromal cell interaction. **2013**, Vol.4, Art. 318, 1-7.
- Hanahan, D.; Weinberg, R.A. Hallmarks of Cancer. **2000**, 100, 57-70
- Hanahan, D.; Weinberg, R.A. Hallmarks of Cancer The Next Generation Cell. **2011**, 144, 646–674.
- Heister, E.; Neves, V.; Tîlmaciu, C.; Lipert, K.; Beltrán, V.S.; Coley, H.M.; Silva, S.R.P.; McFadden, J.; Triple functionalisation of single-walled carbon nanotubes with doxorubicin, a monoclonal antibody, and a fluorescent marker for targeted cancer therapy. **2009**, 47, 2152.
- Herrmann, R.; Bodoky, G.; Ruhstaller, T, et al. Gemcitabine plus capecitabine compared with gemcitabine alone in advanced pancreatic cancer: a randomized, multicenter, phase III trial of the Swiss Group for Clinical Cancer Research and the Central European Cooperative Oncology Group. **2007**, 25(16), 2212–2217.
- Hess, V.; Salzberg, M.; Borner, M, et al. Combining capecitabine and gemcitabine in patients with advanced pancreatic carcinoma: a phase I/II trial. **2003**, 21(1), 66–68.
- Hidalgo, M. Pancreatic cancer. *New England Journal of Medicine*. **2010**, 362, 1605–1617.
- Hirohashi, Y.; Torigoe, T.; Tsukahara, T.; Kanasek, T.; Kochin, V.; Sato, N; Immune responses to human cancer stem-like cells/cancer-initiating cells. **2016**, 107(1), 12-7.
- Hoffmann, A.C.; Mori, R.; Vallbohmer, D.; Brabender, J.; Klein, E.; Drebber, U.; Baldus, S.E.; Cooc, J.; Azuma, M.; Metzger, R.; Hoelscher, A.H.; Danenberg, K.D.; Prenzel, K.L.; et al. High Expression of HIF1a Is a Predictor of Clinical Outcome in Patients with Pancreatic Ductal Adenocarcinomas and Correlated to PDGFA, VEGF, and bFGF. *Neoplasia*. **2008**, 10, 674–679.
- Hosoki, T. Dynamic CT of pancreatic tumors. **1983**, 140, 959–65.
- Hunt, T.K.; Aslam, R.S.; Beckert, S.; Wagner, S.; Ghani, Q.P.; Hussain, M.Z.; Roy, S.; Sen, C.K.; Aerobically derived lactate stimulates revascularization and tissue repair via redox mechanisms. **2007**, 9(8), 1115-1124.
- Hwang, A.; PharmD, KH.; Hwang, W.T.; Yang, Y.X. Metformin and survival in pancreatic cancer: a retrospective cohort study. **2013**, 42(7), 1054–1059.
- Iijima, S. Helical microtubules of graphitic carbon. **1991**, 354-56.

- Iliopoulos, D.; Hirsch, H.A.; Struhl, K. Metformin Decreases the Dose of Chemotherapy for Prolonging Tumor Remission in Mouse Xenografts Involving Multiple Cancer Cell Types. **2011**, 71, 3196-3201.
- Incio, J.; Suboj, P.; Chin, S.M.; Vardam-Kaur, T.; Liu, H.; Hato, T.; Babykutty, S.; Chen, I.; Deshpande, V.; Jain, R.K.; Fukumura, D. Metformin Alleviates Desmoplasia in Pancreatic Cancer. **2015**, 1–23.
- Inman, K.S.; Francis, A.A.; Murray, N.R. Complex role for the immune system in initiation and progression of pancreatic cancer. **2014**, 20(32), 11160–81.
- Iyer, A.K.; Khaled, G.; Fang, J.; Maeda, H.; Exploiting the enhanced permeability and retention effect for tumor targeting. **2006**, 11, 812.
- Izuishi, K.; Kato, K.; Ogura, T.; Kinoshita, Taira.; Esumi, H. Remarkable Tolerance of Tumor Cells to Nutrient Deprivation: Possible New Biochemical Target for Cancer Therapy. **2000**, 60, 6201–6207.
- Jabr-Milane, L.S.; Van Vlerken, L.E.; Yadav, S.; Amiji, M.M. Multi-functional nanocarriers to overcome tumor drug resistance. **2008**, 34, 592–602.
- Jang, S.; Atkins, M.B.; Which drug, and when, for patients with BRAF-mutant melanoma? The lancet oncology. **2013**, 14, e60–69.
- Jemal, A.; Siegel, R.; Xu, J.; Ward, E.; Cancer Statistics. **2010**, 60, 277–300.
- Jiang, k.; Shadler, L.S.; Siegel, R.W.; Zhang, X.; Zhang, H.; Terrones, M. Protein immobilization on carbon nanotubes via a two-step process of diimide-activated amidation. J.Mater.Chem. **2004**, 14, 37-39.
- Jimenez, R.E.; Fernandez-del Castillo, C. Pancreatic Cancer. **2010**, 9.
- Kalluri, R.; Zeisberg, M.; Fibroblasts in cancer. **2006**, 6(5), 392–401.
- Kam, N.W.S.; Liu, Z.; Dai, H. Carbon nanotubes as intracellular transporters for proteins and DNA: an investigation of the uptake mechanism and pathway. **2006**, 45, 577.
- Kantarjian, H et al. Hematologic and cytogenetic responses to imatinib mesylate in chronic myelogenous leukemia. **2002**, 346, 645–652.
- Khan, S.; Chauhan, N.; Yallapu, M.M.; Ebeling, M.C.; Balakrishna, S.; Ellis, R.T.; Thompson, P.A.; Balabathula, P.; Behrman, S.W.; Zafar, N.; Singh, M.M.; Halaweish, F.T.; Jaggu, M.; Chauhan, S.; Nanoparticle formulation of ormeloxifene for pancreatic cancer. **2015**, 53, 731-43.
- Kitada, T.; Seki, S.; Sakaguchi, H.; Sawada, T.; Hirakawa, K.; Wakasa, K.; Clinicopathological significance of hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$  expression in human pancreatic carcinoma. **2003**, 43, 550–555.
- Kitazono, S.; Takiguchi, Y.; Ashinuma, H.; Saito-Kitazono, M.; Kitamura, A.; Chiba, T.; Sakaida, E.; Sekine, I.; Tada, Y.; Kurosu, K.; Sakao, S.; Tanabe, N.; Iwama, A.; Yokosuka, O.; Tatsumi, K. Effect of metformin on residual cells after chemotherapy in a human lung adenocarcinoma cell line. **2013**,

43, 1846–54.

- Koizumi, F.; Kitagawa, M.; Negishi, T et al. Novel SN-38-incorporating polymeric micelles, NK012, eradicate vascular endothelial growth factor- secreting bulky tumors. **2006**, 66, 10048–56.
- Koong, A.C.; Mehta, V.K.; Le, Q.T.; Fisher, G.A.; Terris, D.J.; Brown, J.M.; Bastidas, A.J.; Vierra, M. Pancreatic tumors show high levels of hypoxia. **2000**, 48, 919–922.
- Kostarelos, K.; Bianco, A.; Prato, M. Promises, facts and challenges for carbon nanotubes in imaging and therapeutics. **2009**, 4, 627–633.
- Kostarelos, K.; Lacerda, L.; Pastorin, G.; Wu, W.; Wieckowski, S.; Luangsivilay, J.; Godefroy, S.; Pantarotto, D.; Briand, J.-P.; Muller, S.; Prato, M.; Bianco, A. Cellular uptake of functionalized carbon nanotubes is independent of functional group and cell type. **2007**, 2, 108.
- Lacerda, L.; Herrero, M. A.; Venner, K.; Bianco, A.; Prato, M.; Kostarelos, K. Carbon-nanotube shape and individualization critical for renal excretion. **2008**, 4, 1130.
- Lagadinou, E.D.; Sach, A.; Callahan, K.; Rossi, R.M.; Neering, S.J.; Minhajuddin, M et al. BCL-2 inhibition targets oxidative phosphorylation and selectively eradicates quiescent human leukemia stem cells. **2013**, 12, 329–41.
- Li, S.; Li, Q. Cancer stem cells and tumor metastasis (Review). **2014**, 44, 1806–12.
- Liu, Z.; Chen, K.; Davis, C.; Sherlock, S.; Cao, Q.; Chen, X.; Dai, H. Multiwalled carbon nanotube-doxorubicin supramolecular complexes for cancer therapeutics. **2008**, 15, 68(16), 6652-60.
- Mahadevan, D.; Von Hoff, D.D.; Tumor-stroma interactions in pancreatic ductal adenocarcinoma. **2007**, 6, 1186–1197.
- Marchand-Brustel, Y.; Bost, F. The Antidiabetic Drug Metformin Exerts an Antitumoral Effect in Vitro and in Vivo through a Decrease of Cyclin D1 Level. **2008**, 27, 3576-86.
- Masamune, A.; Watanabe, T.; Kikuta, K. and Shimosegawa, T. Roles of pancreatic stellate cells in pancreatic inflammation and fibrosis. **2009**, 7, S48–S54.
- Matsuno, S.; Egawa, S.; Fukuyama, S.; Motoi, F.; Sunamura, M.; Isaji, S.; Imaizumi, T.; Okada, S.; Kato, H.; Suda, K.; Nakao, A.; Hiraoka, T.; Hosotani, R.; Takeda KPancreatic Cancer Registry in Japan: 20 years of experience. **2004**, 28(3), 219–230.
- McCormick, F. ras GTPase activating protein: signal transmitter and signal terminator. **1989**, 56(1), 5–8.
- Mirazi, N.; Shoaie, J.; Khazaei, A.; Hosseini, A. A comparative study on effect of metformin and metformin-conjugated nanotubes on blood glucose homeostasis in diabetic rats. **2015**, 40(3), 343-8.
- Miyake, K.; Yoshizumi, T.; Imura, S.; Sugimoto, K.; Batmunkh, E.; Kanemura, H.; Morine, Y.; Shimada, M. Expression of Hypoxia-Inducible Factor-1 $\alpha$ , Histone Deacetylase 1, and Metastasis-Associated

- Protein 1 in Pancreatic Carcinoma: Correlation With Poor Prognosis With Possible Regulation. **2008**, 36, e1–9.
- Mueller, M.M & Fusenig, N.E. Friends or foes — bipolar effects of the tumour stroma in cancer. **2004**, 4, 839–849.
  - Muggia, F.M. Doxorubicin-polymer conjugates: further demonstration of the concept of enhanced permeability and retention. **1999**, 5, 7–8.
  - Nagai, H.; Okazaki, Y.; Chew, S. H.; Misawa, N.; Yamashita, Y.; Akatsuka, S.; Ishihara, T.; Yamashita, K.; Yoshikawa, Y.; Yasui, H.; Jiang, L.; Ohara, H.; Takahashi, T.; Ichihara, G.; Kostarelos, K.; Miyata, Y.; Shinohara, H.; Toyokuni, S. Diameter and rigidity of multiwalled carbon nanotubes are critical factors in mesothelial injury and carcinogenesis. **2011**, 108, E1330.
  - Nelson, D.; Cox, M.M.; V Ed. I principi di biochimica di Lehninger. **2014**, 475-480.
  - Ngo, D.C.; Ververis, K.; Tortorella, S.M.; Karagiannis, T.C. Introduction to the molecular basis of cancer metabolism and the Warburg effect. **2015**, 42, 819–823.
  - Niizeki, H.; Kobayashi, M.; Horiuchi, I.; Akakura, N.; Chen, J.; Wang, J.; Hamada, J.; Seth, P.; Katoh, H.; Watanabe, H.; Raz, A.; Hosokawa, M. Hypoxia enhances the expression of autocrine motility factor and the motility of human pancreatic cancer cells. **2002**, 86, 1914–1919.
  - Ning, X.; Du, Y.; Ben, Q.; Huang, L.; He, X.; Gong, Y.; Gao, J.; Wu, H.; Man, X.; Jin, J.; Xu, M.; Li, Z. Bulk pancreatic cancer cells can convert into cancer stem cells(CSCs) in vitro and 2 compounds can target these CSCs. **2016**, 15(3), 403-12.
  - Niyogi, S.; Hamon, M. A.; Hu, H.; Zhao, B.; Bhowmik, P.; Sen, R.; Itkis, M. E.; Haddon, R.C. Chemistry of Single-Walled Carbon Nanotubes. **2002**, 35, 1105.
  - Owen, M.R.; Doran, E.; Halestrap, A.P. Evidence that met- formin exerts its anti-diabetic effects through inhibition of complex 1 of the mitochondrial respiratory chain. **2000**, 348, 607–614.
  - Pantarotto, D.; Briand, J.-P.; Prato, M.; Bianco, A. Translocation of bioactive peptides across cell membranes by carbon nanotubes. **2004**, 16.
  - Pavlides, S.; Whitaker-Menezes, D.; Castello-Cros, R.; Flomenberg, N.; Witkiewicz, A.K.; Frank, P.G.; Casimiro, M.C.; Wang, C.; Fortina, P.; Addya, S.; Pestell, R.G.; Martinez-Outschoorn, U.E.; Sotgia, F.; Lisanti, M.P. The reverse Warburg effect: aerobic glycolysis in cancer associated fibroblasts and the tumor stroma. **2009**, 23, 3984-4001.
  - Pietras, K.; Ostman, A.; Hallmarks of cancer: interactions with the tumor stroma. **2010**, 316(8), 1324–1331.
  - Plas, D.R. and Thompson, C.B. Cell metabolism in the regulation of programmed cell death. **2002**, 13, 75–78.

- Poland, C.A.; Duffin, R.; Kinloch, I.; Maynard, A.; Wallace, W. A. H.; Seaton, A.; Stone, V.; Brown, S.; MacNee, W.; Donaldson, K. Carbon nanotubes introduced into the abdominal cavity of mice show asbestos-like pathogenicity in a pilot study. **2008**, 3, 423.
- Pollak, M.N. Investigating metformin for cancer prevention and treatment: the end of the beginning. **2012**, 2, 778–790.
- Porembka, M.R.; Mitchem, J.B.; Belt, B.A.; Hsieh, C.S.; Lee, H.M.; Herndon, J.; et al. Pancreatic adenocarcinoma induces bone marrow mobilization of myeloid-derived suppressor cells which promote primary tumor growth. **2012**, 61, 1373–1385.
- Prato, M.; Kostarelos, K.; Bianco, A. Functionalized carbon nanotubes in drug design and discovery. **2007**, 41, 60.
- Quintas-Cardama, A.; Kantarjian, H.; Cortes, J. Imatinib and beyond--exploring the full potential of targeted therapy for CML. **2009**, 6, 535–543.
- Rachagani, S.; Senapati, S.; Chakraborty, S.; Ponnusamy, M.P.; Kumar, S.; Smith, L.M.; Jain, M.; Batra, S.K.; Activated KrasG12D is associated with invasion and metastasis of pancreatic cancer cells through inhibition of E-cadherin. **2011**, 104, 1038 – 1048.
- Razzazan, A.; Atyabi, F.; Kazemi, B.; Dinarvand, R. Influence of PEG Molecular Weight on the Drug Release and In Vitro Cytotoxicity of Single-Walled Carbon Nanotubes-PEG-Gemcitabine Conjugates. **2016**, Jan 11.
- Robbins & Cotran; VIII Ed. Basi patologiche delle malattie : patologia generale Elsevier Masson. **2010**, 474.
- Saeed, L.M.; Mahmood, M.; Pyrek, S.J.; Fahmi, T.; Xu, Y.; Mustafa, T.; Nima, Z.A.; Bratton, S.M.; Casciano, D.; Dervishi, E.; Radominska-Pandya, A and Biris, A.S. Single-walled carbon nanotube and graphene nanodelivery of gambogic acid increases its cytotoxicity in breast and pancreatic cancer cells. **2014**, 34(11), 1188–1199.
- Sadeghi, N.; Abbruzzese, J.L.; Yeung, S.C.; Hassan, M.; Li D. Metformin use is associated with better survival of diabetic patients with pancreatic cancer. **2012**, 18(10), 2905 – 12.
- Sahra, I.B.; Laurent, K.; Loubat, A.; Giorgetti-Peraldi, S.; Colosetti, P.; Auberger, P.; Tanti, J.F.; Le Smith, J.S.; Kisfalvi, K.; Kui, R.; Rozengur, E. Metformin inhibition of mTORC1 activation, DNA synthesis and proliferation in pancreatic cancer cells: dependence on glucose concentration and role of AMPK. **2013**, 430(1), 352–357.
- Scheithauer, W.; Schull, B.; Ulrich-Pur, H, et al. Biweekly high-dose gemcitabine alone or in combination with capecitabine in patients with metastatic pancreatic adenocarcinoma: a randomized phase II trial. **2003**, 14(1), 97–104.

- Schipper, M.L.; Nakayama-Ratchford, N.; Davis, C.R.; Kam, N.W.; Chu, P.; Liu, Z.; Sun, X.; Dai, H.; Gambhir, S.S.; A pilot toxicology study of single-walled carbon nanotubes in a small sample of mice. **2008**, 3, 216–221.
- Shaffer, M.S.P.; Fan, X.; Windle, A.H. Dispersion and packing of carbon nanotubes. **1998**, 36, 1603.
- Singh, R.; Pantarotto, D.; Lacerda, L.; Pastorin, G.; Klumpp, C.; Prato, M.; Bianco, A.; Kostarelos, K.; Tissue biodistribution and blood clearance rates of intravenously administered carbon nanotube radiotracers. **2006**, 103, 3357-3362.
- Sun, H.C.; Qiu, Z.J.; Liu, J.; Sun, J.; Jiang, T.; Huang, K.J.; Yao, M.; Huang, C. Expression of hypoxia-inducible factor-1 alpha and associated proteins in pancreatic ductal adenocarcinoma and their impact on prognosis. **2007**, 30, 1359–1367.
- Tan, X.L.; Bhattacharyya, K.K.; Dutta, S.K.; Bamlet, W.R.; Rabe, K.G.; Wang, E et al. Metformin Suppresses Pancreatic Tumor Growth With Inhibition of NFkappaB/STAT3 Inflammatory Signaling. **2015**, 44(4), 636 – 47.
- Tan, D.S.W.; Gerlinger, M.; Teh, B.T.; Swanton, C. Anti-cancer drug resistance: understanding the mechanisms through the use of integrative genomics and functional RNA interference. **2010**, 46, 2166–2177.
- Thota, R.; Pauff, J.M.; Berlin, J.D.; Treatment of metastatic pancreatic adenocarcinoma: a review. **2014**, 28(1), 70-4.
- UK Prospective Diabetes Study Group. Effect of intensive blood-glucose control with metformin on complications in overweight patients with type 2 diabetes (UKDPS 34). **1998**, 352, 854-65.
- Vander Heiden, M.G.; Cantley, L.C.; Thompson, CB. Understanding the Warburg effect: the metabolic requirements of cell proliferation. **2009**, 324(5930), 1029–33.
- Vaquero, E.C.; Edderkaoui, M.; Pandol, S.J.; Gukovsky, I.; Gukovskaya, A.S. Reactive oxygen species produced by NADPH oxidase inhibits apoptosis in pancreatic cancer cells. **2004**, 279, 34643-34654.
- Viale, A.; Corti, D.; Draetta, G.F. Tumors and Mitochondrial Respiration: A Neglected Connection. **2015**, 75, 3687-3691.
- Viale, A.; Pettazzoni, P.; Lyssiotis, C.A.; Ying, H.; Sanchez, N.; Marchesini, M. et al. Oncogene ablation resistant pancreatic cancer cells depend on mitochondrial function. **2014**, 514, 628–32
- Wang, Y.; Iqbal, Z.; Mitra, S. Rapidly functionalized, water-dispersed carbon nanotubes at high concentration. **2006**, 128, 95-9.
- Wang, W.; Reiser-Erkan, C.; Michalski, C.W.; Raggi, M.C.; Quan, L.; Yupei, Z.; Friess, H.; Erkan, M.; Kleeff, J. Hypoxia inducible BHLHB2 is a novel and independent prognostic marker in pancreatic ductal adenocarcinoma. **2010**, 401, 422–428.

- Weinberg, F.; Hamanaka, R.; Wheaton, W.W.; Weinberg, S.; Joseph, J.; Lopez, M. Mitochondrial metabolism and ROS generation are essential for Kras- mediated tumorigenicity. **2010**, 107, 8788-8789.
- Wilczewska, A.Z.; Niemirowicz, K.; Markiewicz, K.H.; Car, H. Nanoparticles as drug delivery systems. **2012**, 64, 1020-1037.
- Wu, W.; Li, R.; Bian, X.; Zhu, Z.; Ding, D.; Li, X.; Jia, Z.; Jiang, X.; Hu, Y. Covalently combining carbon nanotubes with anticancer agent: preparation and antitumor activity. **2009**, 3, 2740.
- Yokoi, K & Fidler, I.J. Hypoxia Increases Resistance of Human Pancreatic Cancer Cells to Apoptosis Induced by Gemcitabine. **2004**, 10, 2299–2306.
- Zhao, Y.; Allen, B.L.; Star, A. Enzymatic degradation of multiwalled carbon nanotubes. **2011**, 115(34), 9536-44.
- Zhu, S.; Zhou, Y.; Wang, L.; Zhang, J.; Wu, H.; Xiong, J.; Zhang, J.; Tian, Y.; Wang, C.; Wu, H. Transcriptional upregulation of MT2-MMP in response to hypoxia is promoted by HIF-1 $\alpha$  in cancer cells. **2011**, 50, 770–780.