



SAPIENZA
UNIVERSITÀ DI ROMA

DOTTORATO IN MEDICINA MOLECOLARE
XXXIII° CICLO

“Effetti biologici e meccanismi molecolari indotti
dagli ultrasuoni a bassa intensità su
cheratinociti e melanoma umano”

DOTTORANDA

Dott.ssa Sabrina Giantulli

DOCENTE GUIDA

Prof.ssa Ida Silvestri

COORDINATRICE DEL DOTTORATO

Prof.ssa Isabella Screpanti

A.A. 2020-2021

Ai miei genitori: le mie stelle polari

Indice

Abbreviazioni	I
Indice figure	II
Abstract	III
Riassunto	IV
1. Introduzione	1
1.1 La fisica degli ultrasuoni	2
1.2 Dosimetria, indice termico e meccanico.....	4
1.3 Bioeffetti correlati all'esposizione agli ultrasuoni: effetti termici.....	5
1.4 Effetti non termici indotti dagli ultrasuoni:	
Effetti sonomeccanici e sonochimici	7
1.5 Sonoporazione	10
1.6 Stress meccanico e ultrasuoni.....	13
1.7 Lo stretto legame tra infiammazione, cancro e il ruolo delle citochine..	16
1.8 Il fattore di trascrizione NF- κ B e il suo ruolo nell'infiammazione	21
2. Scopo della ricerca	27
3. Materiali e metodi	29
3.1 Linee cellulari e condizioni di coltura.....	29
3.2 Setup espositivo e protocollo sperimentale	29
3.3 Microscopia confocale a scansione laser.....	31
3.4 Real-time PCR.....	32
3.5 Analisi del rilascio di IL-6 attraverso ELISA test.....	32
3.6 Analisi dell'attivazione di NF- κ B mediante immunofluorescenza	33
3.7 Analisi della proliferazione cellulare mediante saggio MTT.....	33
3.8 Analisi del ciclo cellulare e del picco SubG1 mediante citofluorimetria a flusso.....	34
3.9 Test di clonogenicità.....	34
4. Analisi statistica	35

4. Risultati	36
4.1 Studio degli effetti degli ultrasuoni sulla morfologia e permeabilità di membrana.....	36
4.2 Effetti sull'espressione di IL-6.....	40
4.3 Studio degli effetti degli ultrasuoni sul fattore di trascrizione nucleare NF- κ B.....	42
4.4 Effetto degli ultrasuoni sulla proliferazione e vitalità cellulare.....	44
4.5 Effetti degli ultrasuoni a bassa intensità sulle linee di melanoma umano SK-MEL-5 e SK-MEL-28.....	46
5. Discussione	50
6. Bibliografia	54

Abbreviazioni

ARF	Forza di radiazione acustica o <i>Acoustic radiation force</i>
BLS	<i>Bilayer sonophore</i>
cLIPUS	Ultrasuoni a bassa intensità pulsati o <i>Low-intensity pulsed ultrasound</i>
CLSM	<i>Confocal Laser Scanning Microscope</i>
DAMP	Profili molecolari associati al danno o <i>Damage Associated Molecular Patterns</i>
DII	1,1'-dioctadecyl-3,3,3',3'-tetramethylindocarbocyanine perchlorate
DMSO	Dimetil solfossido
EMT	Transizione epitelio-mesenchima o <i>Epithelial–mesenchymal transition</i>
GAPDH	Gliceraldeide-fosfato deidrogenasi o <i>Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase</i>
HIFU	Ultrasuoni focalizzati a alta intensità o <i>High Intensity Focused Ultrasound</i>
IEC	Commissione Elettronica Internazionale o <i>International Electrotechnical Commission</i>
IL	Interluchina
IM	Indice meccanico
ISPTA	Intensità spaziale e temporale media o <i>Spatial-peak temporal-average intensity</i>
IT	Indice meccanico
JAK	<i>Janus kinase</i>
MMP	Metalloproteinasi della matrice o <i>Matrix metalloproteinases</i>
NF-κB	Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells
PAMP	Profili molecolari associati ai patogeni o <i>Pathogen Associated Molecular Patterns</i>
PBS	Tampone fosfato salino o <i>Phosphate buffered saline</i>
PI	Ioduro di Propidio o <i>Propidium Iodide</i>
ROS	Specie reattive dell'ossigeno o <i>Reactive Oxygen Species</i>
SP	Sonoporazione
STAT3	<i>Signal transducer and activator of transcription 3</i>
TNF	Fattore di necrosi tumorale o <i>Tumor necrosis factor</i>
US	Ultrasuoni

INDICE DELLE FIGURE

Figura 1. Rappresentazione schematica delle diverse forme di US utilizzabili.....	2
Figura 2. Spettro acustico degli US.....	3
Figura 3. Effetti della cavitazione stabile e inerziale sulle cellule endoteliali.....	10
Figura 4. Bioeffetti della cavitazione stabile o inerziale.....	12
Figura 5. Bioeffetti indotti dall'interazione US sulla membrana cellulare e citoscheletro	15
Figura 6. Vie di segnale di IL-6.....	18
Figura 7. Vie di attivazione di NF- κ B	22
Figura 8. Ruolo di NF- κ B nello sviluppo e progressione dell'inflammazone.....	23
Figura 9. Ruolo di NF- κ B nella regolazione dell'inflammasoma.....	25
Figura 10. Schema del set-up sperimentale utilizzato per gli irraggiamenti con US.....	30
Figura 11. Analisi time-lapse eseguita con CLSM del recovery della membrana plasmatica cellule HaCaT.....	37
Figura 12. Analisi time-lapse eseguita con CLSM del recovery della membrana plasmatica delle cellule HaCaT.....	38
Figura 13. Ricostruzione 3D con CLSM Z-stacks.....	39
Figura 14. Analisi con CSLM, dell'internalizzazione della calceina in cellule HaCaT..	40
Figura 15. Analisi in Real-time PCR dell'espressione genica di IL-6 nelle cellule HaCaT	41
Figura 16. Analisi della secrezione di IL-6 eseguita mediante ELISA test.....	42
Figura 17. Analisi in immunofluorescenza delle cellule HaCaT.....	43
Figura 18. Immagine ingrandita delle cellule HaCaT analizzate in immunofluorescenza	43
Figura 19. Analisi della proliferazione cellulare mediante MTT test sulle cellule HaCaT	44
Figura 20. Analisi del ciclo cellulare sulle cellule HaCaT.....	45
Figura 21. Analisi $\Delta\Delta$ CT in Real-time PCR dell'espressione genica di BAX nelle cellule HaCaT.....	45
Figura 22. Analisi del ciclo cellulare sulle cellule SK-MEL-28 e SK-MEL-5.....	47
Figura 23. Test di clonogenicit� sulle cellule SK-MEL-28 e SK-MEL-5.....	48
Figura 24. Analisi in Real-time PCR dell'espressione genica di IL-6 sulle SK-MEL-28 e SK-MEL-5.....	49

Abstract

Over the last few years, low intensity ultrasounds (US) have been widely used as therapeutic tool. The widespread use of US in different fields drove researchers to study the related bioeffects, the more significant range from membrane poration (sonoporation) to the triggering of cytotoxic and inflammatory processes. Currently, a univocal experimental methodology accepted to investigate and quantitatively describe the biological risk with proper indicator is still lacking.

As well known, keratinocytes are the main cell type of the skin and one of the most exposed cells to environmental factors, providing a first line of defence barrier for the host and also actively participating in immune response.

Herein, we investigated whether mechanical energy transported by low intensity 1 MHz US, which are widely used in the biological and therapeutic field, could generate a mechanical stress able to induce the release of inflammatory cytokine IL-6 in human keratinocyte cell line, HaCaT.

Our results point out that US promotes the overexpression and secretion of IL-6, associated with the activation of Nuclear Factor- κ B (NF- κ B). Moreover, we observed alterations in cell morphology and membrane permeability together with a reduced cell viability dependent on exposure parameters.

In this framework, we investigated the biological effects of US in human melanoma SK-MEL-5 and SK-MEL-28 cell lines, with different p53 expression. Preliminary data showed an increase in mRNA levels of IL-6 in SK-MEL-28 cells accompanied by a G2/M arrest more evident in SK-MEL-5, suggest that p53 could modulate the different effects induced by US. These results can open the avenue for further investigating the molecular mechanisms related to US exposure.

Riassunto

Negli ultimi anni gli Ultrasuoni (US) a bassa intensità sono stati largamente utilizzati come strumento terapeutico. Il loro vasto utilizzo in diversi campi ha così guidato i ricercatori a studiare i relativi bioeffetti da essi indotti, tra i più significativi abbiamo la porazione (sonoporazione) della membrana, l'attivazione di processi citotossici e infiammatori. Attualmente una metodologia sperimentale univoca accettata per studiare e descrivere quantitativamente il rischio biologico è ancora mancante.

Come noto, i cheratinociti sono il principale tipo cellulare della pelle e i più esposti a fattori ambientali, fornendo la prima linea di barriera difensiva nell'ospite e partecipando inoltre attivamente alla risposta immunitaria.

Abbiamo così studiato se l'energia meccanica trasportata dagli US a bassa intensità alla frequenza di 1 MHz potesse generare uno stress meccanico in grado di indurre il rilascio della citochina infiammatoria IL-6 nella linea cellulare di cheratinociti umani HaCaT.

I nostri risultati evidenziano come gli US siano in grado di indurre overespressione e secrezione di IL-6, associata all'attivazione del fattore nucleare κ B (NF- κ B). Inoltre, sono state osservate alterazioni nella morfologia e permeabilità di membrana insieme a una ridotta vitalità cellulare in funzione dei parametri di esposizione.

In tale contesto, sono stati indagati i bioeffetti degli US sulle linee di melanoma umano SK-MEL-5 e SK-MEL-28, le quali presentano una diversa espressione di p53.

Preliminarmente, tali dati hanno mostrato un aumento dei livelli di mRNA di IL-6 esclusivamente nelle cellule SK-MEL-28 accompagnato da un arresto del ciclo cellulare in G2/M più evidente nelle SK-MEL-5, suggerendo un potenziale ruolo di p53 nel modulare i differenti effetti indotti dagli US.

Questi risultati possono pertanto aprire la strada per studiare ulteriormente i meccanismi molecolari legati all'esposizione agli US.

1. Introduzione

Gli ultrasuoni (US) da diversi decenni hanno attirato l'attenzione della comunità scientifica grazie alle loro molteplici aree di applicazione. Il loro utilizzo è entrato a far parte della pratica clinica da più di 50 anni, principalmente come mezzo diagnostico non invasivo¹, il quale attualmente ne consente un uso come metodo combinato nel gene e drug delivery²⁻⁴, diventando così una tecnologia ampiamente utilizzata nella biomedicina. Questo suggerisce come il corpo umano possa essere esposto a una vasta gamma di frequenze ultrasoniche sia in campo industriale, medico o estetico, andando dalle alte frequenze (1-20 MHz) utilizzate nei mezzi diagnostici, alle medie frequenze (0.7-3 MHz) in campo terapeutico, e alle basse frequenze (20-200 kHz) per le applicazioni industriali e terapeutiche^{5,6}.

Gli US terapeutici nati nel campo della terapia fisica, possono essere distinti in US ad "alta e bassa intensità", in funzione della loro capacità di promuovere la distruzione o la rigenerazione di un tessuto.

È possibile inoltre classificare US con modalità continua o pulsata. Gli US continui (USC) sono in grado di generare effetti termici stimolando la rigenerazione tissutale, indurre cambiamenti nella permeabilità di membrana e aumentare la concentrazione intracellulare di Ca^{2+} . Gli US pulsati (USP) producono viceversa effetti non termici aumentando ad esempio il metabolismo cellulare⁷.

Tra i loro molteplici utilizzi, la tecnologia con alla base gli US focalizzati ad alta intensità o *High Intensity Focused Ultrasound* (HIFU) trova sempre più impiego per l'ablazione termica o meccanica non invasiva di tessuti benigni o maligni⁸. Diffuso è anche l'impiego di US a bassa intensità pulsati o *Low-intensity pulsed ultrasound* (LIPUS) per promuovere la guarigione di fratture ossee. A questa si affiancano US a bassa intensità continui o *Low-intensity continuous ultrasound* (cLIUS). In tale contesto i LIUS (sia regime pulsato che continuo) trovano oggi nuove applicazioni come nella rigenerazione di tessuti molli, inclusi cartilagine, tendini e legamenti, nonché in terapie a base di cellule staminali mesenchimali/stromali⁹ per rafforzare la riparazione/rigenerazione. Inoltre, studiato è l'uso degli US pulsati focalizzati

(pFUS) caratterizzati da alte intensità utilizzabili per brevi periodi di tempo allo scopo evitare il danneggiamento del tessuto irraggiato.

Infine, pur non essendo considerati US convenzionali, è possibile ricordare le onde d'urto, ossia onde di pressione acustica in grado di trasferire l'energia meccanica al tessuto irraggiato, approvati per la litotripsia e in fisioterapia⁹.

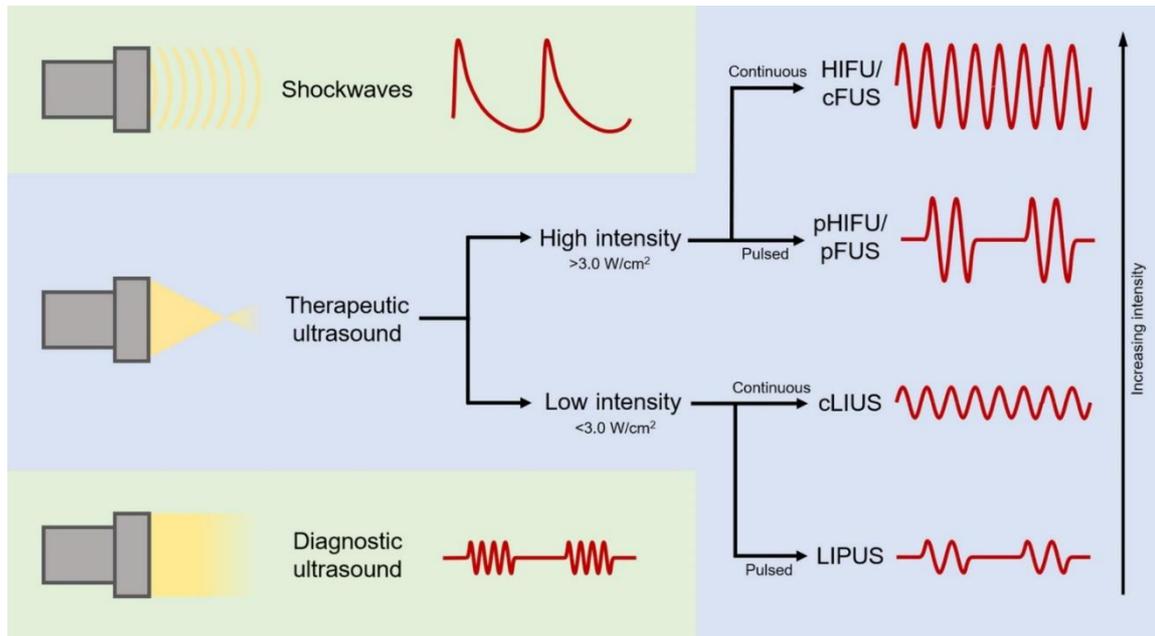


Figura 1. Rappresentazione schematica delle diverse forme di US utilizzabili (Daniel D. Liu, *Stem Cells Translational Medicine*, 2020)⁹.

Le vaste e promettenti applicazioni degli US sottolineano pertanto la necessità di approfondire i meccanismi di interazione con cellule e tessuti, nonché i potenziali effetti biologici da essi indotti allo scopo di incrementare la sicurezza nel loro impiego¹⁰.

1.1 La fisica degli ultrasuoni

Gli US vengono definiti come onde acustiche (o sonore) con frequenze superiori a quelle udibili dall'orecchio umano (> 20 KHz), generate per mezzo di trasduttori piezoelettrici, resistivi, magnetostrittivi o elettrostatici, che si propagano longitudinalmente attraverso un mezzo elastico, come i tessuti, creando zone alternate di compressione e rarefazione (Fig.1).

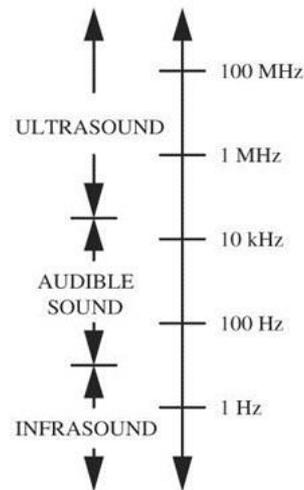


Figura 2. Spettro acustico degli US (William D. O'Brien, Jr. *Prog Biophys Mol Biol*, 2007)⁵.

Tra i parametri che permettono di definire tali onde meccaniche ricordiamo alcuni che verranno utilizzati di seguito nel testo:

- Frequenza f (Hz): numeri di cicli di compressione e rarefazione nell'unità di tempo;
- Intensità dell'onda (W/cm^2): quantità di energia che fluisce nell'unità di tempo attraverso una superficie di unità unitaria, perpendicolare alla direzione di propagazione dell'onda;
- Duty cycle: rapporto tra la durata dell'impulso US in unità di tempo e la lunghezza del periodo, calcolato come percentuale;
- Intensità spaziale e temporale media o *Spatial-peak temporal-average intensity* (I_{spta}): potenza del fascio US, considerato il valore medio durante tutto il periodo di emissione e ricezione dell'impulso, diviso l'area del fascio.

L'interazione degli US con i tessuti biologici produce un assorbimento di energia che è proporzionale al coefficiente di assorbimento del tessuto attraversato e alla frequenza delle onde, le quali sono soggette a fenomeni di riflessione, rifrazione e attenuazione influenzata dalla natura della struttura che le onde US incontrano.

Il tempo di esposizione nell'uomo nei diversi utilizzi può variare da alcuni secondi come nel drug delivery transdermico realizzato attraverso la sonoforesi¹¹

(tecnica che utilizza gli US come strumento di potenziamento meccanico per la somministrazione sistemica di agenti terapeutici grazie all'incremento della permeabilità della pelle da essi indotto), ad alcune ore o giorni per esposizioni aeree industriali. È ormai noto come gran parte dei danni indotti dagli US siano fortemente legati alla loro energia. Quando quest'ultima eccede la soglia cavitazionale, si osserva la produzione di bolle di gas che negativamente agiscono sulle cellule e tessuti^{12,13}. Tuttavia, diversi studi cellulari, animali e umani¹⁴⁻¹⁷, hanno documentato come anche al di sotto della soglia cavitazionale gli US possano indurre alterazioni a livello molecolare, morfologico e strutturale. Tali effetti derivano dalle interazioni termiche e meccaniche tra il campo acustico e la struttura cellulare coinvolta, nonché dai parametri di esposizione, dalle proprietà del tessuto e dalla configurazione del fascio.

1.2 Dosimetria, indice termico e meccanico

La dosimetria permette di quantificare l'interazione di un agente fisico con il materiale biologico di interesse. Il suo obiettivo risulta essere quello di correlare le grandezze di quantità specifiche, come l'intensità, la pressione acustica, lo spostamento delle particelle, ecc., con la probabilità che si verifichi un'alterazione biologica⁵. La grandezza più ampiamente utilizzata nello studio dei bioeffetti degli US è l'intensità espressa in W/cm^2 , anche se tuttavia questa non fornisce una reale misura della dose. Il campo della dosimetria ultrasonica nonostante la sua rilevanza scientifica non si è sviluppato al livello della dosimetria delle radiazioni ionizzanti. Negli USA le dosi degli US considerate accettabili sono regolate dalle linee guida sviluppate dalla *Food and Drug Administration (FDA) Center for Devices and Radiological Health (CDRH)*, mentre in Europa dalla corrispondente Commissione Elettronica Internazionale o *International Electrotechnical Commission (IEC)*. Proprio quest'ultima attraverso la norma 60601-2-37 (2001a,b) in riferimento ad US utilizzati ai fini diagnostici, ha introdotto due diversi parametri

nel controllo dei bioeffetti generati dall'esposizione agli US ad alta frequenza⁶, l'indice termico (IT) e l'indice meccanico (IM).

L'IT è proporzionale alla potenza acustica trasferita al tessuto (W) e inversamente proporzionale alla potenza acustica richiesta per indurre un rialzo di temperatura di 1 °C (W_{deg}):

$$IT = W / W_{deg}$$

Al decrescere della frequenza, i valori di W_{deg} richiesti saranno maggiori a fronte di una diminuzione di W. Ciò indica che quando gli effetti non lineari sono insignificanti, a parità di valore di ampiezza della pressione sonora, l'IT dell'US kHz è inferiore alla sua controparte nell'intervallo MHz. Pertanto, a una data intensità, l'IT nella gamma di frequenze MHz sarà superiore all'IT a bassa frequenza.

L'IM che permette di quantificare la probabilità degli effetti biologici indotti dalla cavitazione (**Sez. 1.4**), è il risultato del rapporto fra il picco di pressione acustica negativa (P_r , misurata in MPa) e la radice quadrata della frequenza (misurata in MHz):

$$IM = P_r / \sqrt{f}$$

Esso viene calcolato in riferimento ad un medium equivalente ad un tessuto omogeneo con coefficiente di attenuazione (fattore derating) di 0.3 dB cm⁻¹ MHz⁻¹, applicato per correggere e rendere meglio rappresentativo il valore di IM (in quanto calcolato in base alle sole misurazioni standard in acqua) nelle applicazioni cliniche degli US¹⁸.

1.3 Bioeffetti correlati all'esposizione agli ultrasuoni: effetti termici

Il vasto impiego degli US ha evidenziato nel tempo la necessità di comprendere il loro meccanismo di interazione con i tessuti biologici e gli effetti generati da tale interazione. E' ormai noto, come gli US siano in grado di indurre effetti non solo attraverso il riscaldamento del tessuto irraggiato ma anche attraverso meccanismi

non termici che includono tra questi la cavitazione, lo stress meccanico o altri indefiniti processi non termici¹⁷.

La variazione di temperatura indotta dagli US è il risultato della differenza tra l'energia assorbita dal tessuto biologico e l'energia dissipata per conduzione, convezione e radiazione superficiale, in funzione dei parametri di esposizione, configurazione del fascio nonché delle proprietà dei tessuti irraggiati¹⁰.

Nello specifico l'ampiezza dell'onda ultrasonica diminuisce quando attraversa un tessuto o un materiale attenuante, dovuta al suo assorbimento o dispersione. Quest'ultimo fenomeno noto anche come "scattering" può essere definito come una porzione dell'onda che cambia direzione, mentre l'assorbimento come il meccanismo attraverso il quale una porzione dell'energia dell'onda viene convertita in un aumento di temperatura (calore)¹⁹. L'IT (**Sez 1.2**) fornisce informazioni circa l'aumento della temperatura del tessuto.

Nell'ambito degli effetti termici legati alla terapia ad US è possibile distinguere un'ipertermia letale da una ipertermia sub-letale.²⁰ Nel primo caso l'aumento di temperatura indotto nel tessuto irraggiato è tale da indurre la morte cellulare attraverso necrosi coagulativa, diversamente da quanto osservabile in caso di ipertermia sub-letale^{5,21}. In ragione di tali considerazioni, in diagnostica, l'aumento di temperatura e i conseguenti potenziali bioeffetti sono contenuti o mantenuti relativamente bassi o trascurabili, applicando il principio ALARA (mantenere i valori di potenza e il tempo di esposizione i più bassi possibili per quanto ragionevolmente possibile), intensità medie temporali di esposizione limitate e in generale seguendo brevi periodi di esposizione¹⁷. Diversamente, le applicazioni terapeutiche degli US che sfruttano il riscaldamento da essi indotto necessitano di esposizioni più durature con l'impiego di raggi non focalizzati o focalizzati ad alta intensità (HIFU).

Il riscaldamento non focalizzato trova impiego ad esempio in fisioterapia nel trattamento ai fini curativi di tessuti ad alto assorbimento come ossa o tendini.

La modalità focalizzata già introdotta nella Sez. 1.1 è utilizzata in diverse applicazioni terapeutiche come la trombolisi, gene e drug delivery e nell'HIFU.

Tuttavia, la modalità focalizzata specialmente per gli HIFU, non è priva di effetti cellulari dannosi. In quest'ultima applicazione, gli US inducono un innalzamento della temperatura tale da provocare la coagulazione del tessuto irraggiato e grazie al coefficiente di attenuazione tissutale e alla facilità di messa a fuoco, sono stati ampiamente studiati e impiegati nella ipertermia oncologica^{22,23} e nell'ablazione tissutale, ottenute mediante la combinazione di diversi parametri di esposizione (duty cycle, frequenza, frequenza di ripetizione dell'impulso, durata del trattamento e intensità).

Il riscaldamento generato dagli US può quindi provocare cambiamenti irreversibili nei tessuti sonicati dove a seconda dei gradienti di temperatura, gli effetti di tale esposizione possono includere riscaldamento lieve, necrosi coagulativa, vaporizzazione dei tessuti o tutti e tre gli effetti¹⁷, sottolineando la necessità di massimizzare il rapporto beneficio/rischio nell'uomo, richiedendo la maggiore comprensione dei meccanismi con i quali gli US interagiscono con i tessuti¹⁰.

1.4 Effetti non termici indotti dagli US: Effetti sonomeccanici e sonochimici

Le applicazioni terapeutiche degli US che sfruttano la tipologia di effetti non termici da essi indotti, sono diventate nel tempo sempre più oggetto di studio da parte della comunità scientifica²².

A tale scopo, le più comuni frequenze utilizzate risultano comprese nell'intervallo di 20 kHz-3 MHz con modalità pulsata o continua, focalizzata o non focalizzata in cui nel tessuto irraggiato non si osserva un aumento significativo di temperatura. Le risposte biologiche indotte possono essere invece distinte in sonomeccaniche e sonochimiche²⁰.

La forza di radiazione acustica o *acoustic radiation force* (ARF) e la cavitazione¹⁰ sono considerate tra i principali effetti sonomeccanici indotti dagli US.

La ARF è definita come l'interazione fisica tra un'onda acustica e l'oggetto fonoassorbente con cui essa interagisce²⁰.

Come già evidenziato, quando gli US attraversano un mezzo si verifica una perdita di energia dovuta all'assorbimento e alla dispersione dell'onda. La perdita di energia corrisponde a una perdita di quantità di moto nell'onda, che viene trasferita al mezzo. A seconda dell'entità dell'ARF, può verificarsi uno spostamento del tessuto e l'entità dello spostamento è inversamente proporzionale alla rigidità del tessuto stesso^{10,24}. Quando l'ARF agisce su un mezzo fluido, provoca la formazione di un flusso, streaming acustico, che può aumentare il trasporto di farmaci nei tessuti. Diversi studi hanno dimostrato come l'ARF sia in grado di influenzare il macroambiente cellulare, nonché modificare la dinamica della membrana cellulare²⁵, facilitando l'efficienza della trasfezione genica e del drug delivery²⁴.

La cavitazione è senz'altro il meccanismo non termico degli US più studiato e alla base di diverse applicazioni terapeutiche, data la sua capacità di indurre una transiente e reversibile alterazione delle giunzioni tra le cellule endoteliali²⁶. A tale fenomeno possono essere collegati diversi effetti sonomeccanici e sonochimici osservabili sia *in vitro* che *in vivo*¹². Tale fenomeno origina dall'interazione degli US con un liquido, a seguito del quale si osserva la formazione, oscillazione e collasso di cavità gassose (bolle) durante il cambiamento del gradiente di pressione nel campo degli US¹². Tali bolle possono formarsi da corpi gassosi stabilizzati preesistenti o nuclei di gas, dove in particolare da quest'ultimi è possibile la formazione di microbolle¹².

Si possono distinguere due tipi di cavitazione, stabile e inerziale (Fig.3). La cavitazione stabile fa riferimento all'oscillazione di bolle in risposta al campo di onde ad US le quali non collassano violentemente e non portano alla formazione di specie reattive dell'ossigeno o *Reactive Oxygen Species* (ROS), ma la cui oscillazione può determinare la produzione di calore, microstreaming dei liquidi vicini e forze di taglio localizzate¹². Diversamente, la cavitazione inerziale o

transiente conosciuta anche come la formazione di microbolle e il loro relativo collasso, è caratterizzata da un'espansione rapida delle bolle di gas all'interno del mezzo. L'inizio di tale cavitazione è in parte dipendente dalla frequenza, dalla dimensione della bolle e dall'ampiezza della pressione acustica. Gli effetti sonomeccanici indotti dal collasso di tali bolle includono la generazione di onde d'urto e micro-jets in grado di danneggiare le cellule²⁰.

Tra gli effetti sonochimici indotti dagli US predominante è la formazione di ROS. Come indicato sopra, durante la cavitazione inerziale le bolle di gas collasano quasi istantaneamente, provocando un notevole aumento di temperatura, formazione di ROS e conseguente morte cellulare²⁰.

La cavitazione è stata così considerata come la causa di diversi fenomeni distruttivi a carico della membrana plasmatica, dei cromosomi, figure mitotiche e il nucleo¹⁶. *In vitro* sono stati riportati effetti di rottura a singolo filamento a carico del DNA su sospensioni cellulari irraggiate con US.

E' inoltre importante sottolineare come sia ormai noto che diversi bioeffetti siano osservabili anche al di sotto della soglia cavitazionale^{15,27}. In accordo al modello "bilayer sonophore" (BLS)¹⁴, il doppio strato lipidico della membrana cellulare, in determinate condizioni espositive, è in grado di trasformare la pressione acustica in nanometriche e micrometriche deformazioni intracellulari. La conseguente contrazione ed espansione del BLS infatti può stimolare cicli di allungamento (*stretch*) e rilascio nelle membrane cellulari e nel citoscheletro, in grado di attivare proteine meccanosensibili e/o aumentare la permeabilità di membrana, fenomeno sfruttabile per il rilascio di farmaci in siti localizzati, come la barriera ematoencefalica e la pelle. Tuttavia, come evidenziato in diversi studi, tali risposte biologiche possono generare effetti dannosi che verranno meglio illustrati nella **Sez. 1.6**.

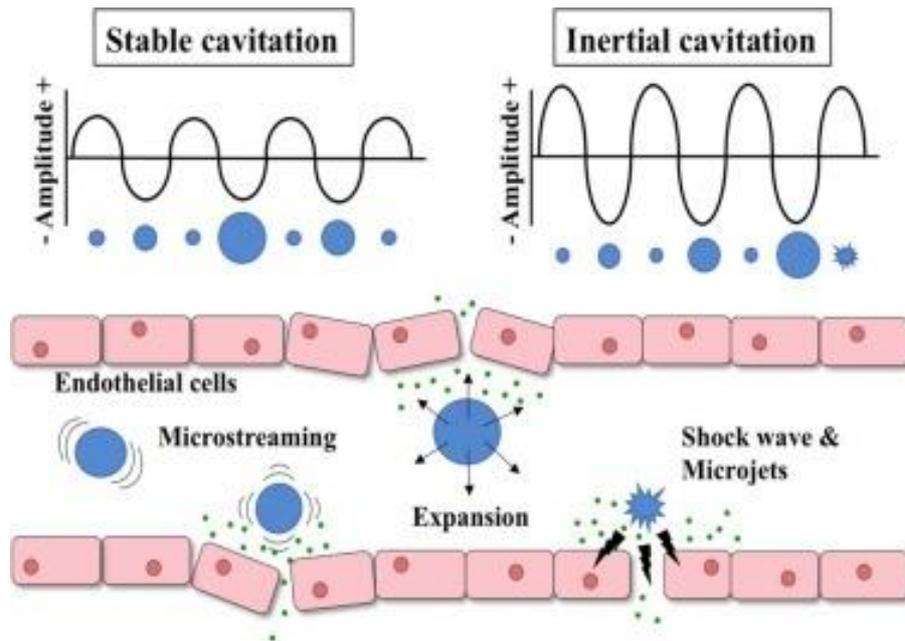


Figura 3. Effetti della cavitazione stabile e inerziale sulle cellule endoteliali (Peruzzi, *Colloids Surfaces B Biointerfaces*, 2018)²⁶.

1.5 Sonoporazione

Il sinergismo tra gli effetti sonochimici e sonomeccanici indotti dagli US è in grado di promuovere, un temporaneo aumento della permeabilità della membrana cellulare, attraverso la formazione di pori²⁸. Tale fenomeno, noto come sonoporazione (SP), favorisce un più efficiente e sicuro rilascio *in situ* di farmaci, nonché l'uptake di molecole a basso e alto peso molecolare, materiale genetico (pDNA, siRNA, mRNA), proteine, trasformando gli US in un valido strumento di drug e gene delivery²⁸⁻³².

Diversi studi riportano l'uso delle microbolle, definite come strutture riempite di gas e stabilizzate da lipidi, proteine o guscio polimerico, alcune di loro approvate in clinica come agenti di contrasto, per amplificare e caratterizzare gli effetti biologici provocati dagli US. Nell'ambito della cavitazione, quella inerziale sembra giocare un ruolo preponderante nell'attivazione del processo della SP.

Tra le condizioni che contribuiscono allo sviluppo di tale fenomeno è possibile classificare²⁸:

- a) US a bassa intensità che favoriscono la cavitazione stabile delle microbolle;
- b) US ad alta intensità che favoriscono la cavitazione inerziale con il collasso delle microbolle;
- c) Applicazioni di US in assenza di microbolle.

Nell'ambito della cavitazione stabile sono stati enunciati due meccanismi che contribuiscono all'uptake di molecole, quali la formazione di piccoli pori, le cui dimensioni sono altamente correlate a parametri quali pressione acustica, tempo di durata della sonicazione e frequenza di ripetizione dell'impulso³³, e l'endocitosi. *Meijering et al*³⁴, attraverso lo studio dell'uptake di *Fluorescein isothiocyanate* (FITC)-destrani (peso molecolare tra 4.4 e 500 kDa), dimostrarono come il contributo dell'endocitosi prevaleva sulle molecole di dimensioni maggiori, mentre la formazione di pori, indotta sia dagli effetti meccanici che chimici associati agli US, rappresentava il meccanismo principale per i destrani a basso peso molecolare. È riportato come i destrani non siano in grado di penetrare significativamente nelle cellule³⁵ se non esposte a regime cavitazionale attraverso la promozione della SP e del processo di traffico endosomiale.

Domenici et al, attraverso analisi citofluorimetrica valutarono così l'efficienza di up-take di FITC-destrani (peso molecolare 10, 40 e 70 kDa) sulle cellule HaCaT sonicate per 15' alla frequenza di 1 MHz a diversi valori di I_{spta} (7-16 mW/cm²)³⁶. I risultati riportati mostrarono un'efficienza di up-take dipendente dalle dimensioni molecolari, permettendo di escludere la concomitante attivazione di endocitosi, evidenziando come gli US a bassa intensità potessero indurre SP di membrana come meccanismo principale coinvolto nel trasporto dei destrani attraverso la membrana cellulare.

Gli effetti meccanici associati sia alla cavitazione stabile che inerziale sono in grado di promuovere la formazione di pori nella membrana cellulare,

permettendo a molecole quali farmaci e ioni come il Ca^{2+} di entrare nelle cellule per diffusione passiva (Fig.4).

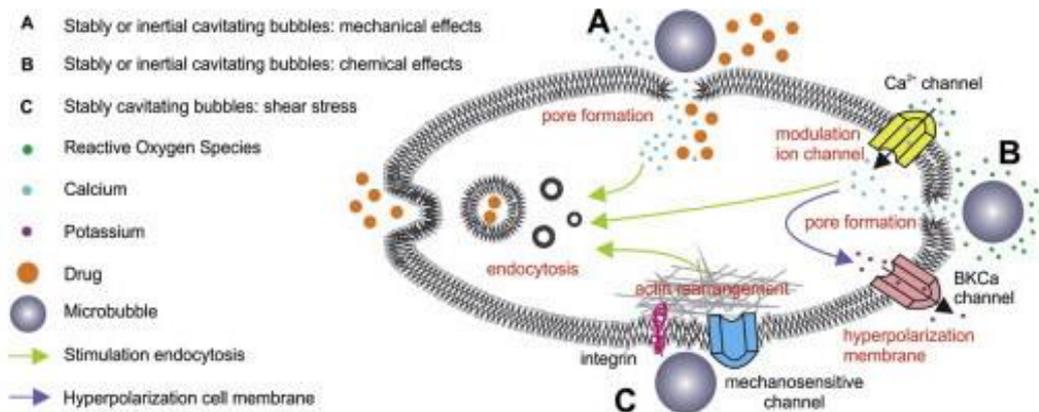


Figura 4. Bioeffetti della cavitazione stabile e inerziale
(Lentacker, *Advanced Drug Delivery Reviews*, 2014)²⁸.

Inoltre, tra gli effetti chimici associati ad entrambi i tipi di cavitazione, abbiamo la formazione di ROS, i quali possono modulare i canali ionici voltaggio dipendenti del Ca^{2+} o la perossidazione lipidica che può determinare un riarrangiamento del doppio strato lipidico e distruzione della membrana. Tale risposta risulta compensata dall'efflusso di K^+ dai canali del K^+ Calcio-dipendenti ad alta conduttanza (BK_{Ca}), portando all'iperpolarizzazione della membrana cellulare.

Inoltre, i microstreaming generati dalla cavitazione stabile e il corrispondente shear stress sembrano in grado di deformare la membrana plasmatica con riarrangiamenti nel citoscheletro come risultato di cambiamenti nella tensione della membrana cellulare. I meccanosensori come le integrine e i canali ionici attivati dallo stretching sono in grado di indurre a loro volta processi come l'endocitosi e l'esocitosi. Le integrine, che legano la matrice extracellulare all'actina del citoscheletro, possono influenzare questi processi attraverso una via di segnalazione intracellulare nonché mediare l'ingresso di Ca^{2+} e/o promuovere il suo rilascio dai depositi intracellulari, giocando un ruolo centrale nell'endocitosi mediata dagli US^{28,37}.

Tali considerazioni insieme a recenti studi incentrati sul ruolo della SP nell'alterare l'organizzazione del citoscheletro e indurre contrazione del nucleo cellulare, sottolineano come il fenomeno sia un olistico e complesso processo, e non solo un fenomeno confinato a livello della membrana cellulare³³.

1.6 Stress meccanico e Ultrasuoni

I processi meccanici sono importanti regolatori nell'interazione tra le cellule e l'ambiente, in cui le forze generate risultano fondamentali non solo nella migrazione, divisione cellulare ma sono alla base anche dei cambiamenti morfologici che avvengono in un tessuto durante il suo sviluppo. I tessuti sono fisiologicamente esposti a forze meccaniche che alterano la forma cellulare in modo transitorio attraverso il loro stiramento o compressione. Tale deformazione può agire direttamente o indirettamente sul funzionamento cellulare, influenzando diversi processi tra cui la trasduzione del segnale, l'espressione genica, la crescita cellulare, la differenziazione e la sopravvivenza^{38,39}.

Nell'organismo adulto le cellule mantengono un'omeostasi tensionale la cui alterazione può essere legata a diverse malattie quali il cancro.

Diversi studi riportano come lo stress meccanico esercitato sulle cellule da gradienti di pressione, onde acustiche o US sia in grado di influenzare alcuni processi cellulari⁴⁰. Come già sottolineato, gli US a bassa intensità sono in grado di esercitare una pressione meccanica sulla materia¹², probabilmente in modo simile al carico meccanico diretto⁴¹ e allo sforzo di taglio nei fluidi^{42,43}. Gli Us, similmente al carico meccanico, inducono alterazioni nell'organizzazione integrine-actina e nei canali ionici, come riportato in diversi studi^{44,45}.

Tuttavia, il meccanismo con cui lo stress meccanico sia in grado di alterare l'omeostasi di membrana innescando diverse vie di segnale non è ancora completamente noto.

Per meglio comprendere tale aspetto, *Di Giacinto et al*, investigarono sulla linea di fibroblasti murini, NIH-3T3, l'effetto degli US, a valori di intensità e frequenza

tipicamente di uso medicale, sulla fluidità di membrana⁴⁰. Attraverso microscopia a due fotoni impiegando la sonda fluorescente Laurdan rilevarono nelle cellule esposte ad US una diminuzione di fluidità tempo-dipendente.

Milowska et al, mostrarono come eritrociti esposti a US alla frequenza di 1 MHz in regime continuo a valori di intensità tra 0.61 e 2.44 W/cm² per 5', presentavano un aumento nel grado di emolisi e ad intensità più elevate un aumento della fragilità osmotica e della perossidazione lipidica, causata probabilmente dalla cavitazione inerziale⁴⁶.

Una diminuzione delle fluidità di membrana fu osservata anche da *Verstraeten et al* sulla linea cellulare di linfoblasti T (Jurkat) sottoposta a stress meccanico, nonché alterazioni sulla dinamica del citoscheletro, aumento della concentrazione intracellulare di Ca²⁺ in grado di indurre l'attivazione dei fattori di trascrizione *Nuclear factor of activated T-cells* (NFAT), AP-1, e nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells (NF-κB)^{38,47}.

Tali studi evidenziano come un'alterazione della fluidità della membrana cellulare potrebbe essere un'importante forza motrice per studiare la risposta cellulare che collega lo stress meccanico indotto dagli US e la trasduzione del segnale.

Il modello BLS¹⁴, già riportato in precedenza (**Sez 1.4**) permette di evidenziare come la membrana cellulare sia intrinsecamente in grado di assorbire l'energia meccanica del campo US, causando transienti alterazioni nella forma delle cellule e in particolare la deformazione del piano e dello spessore del doppio strato, attivando canali ionici con *gate* ed alterare la distribuzione intracellulare degli elettroliti.

Recentemente, l'attività dei canali cationici meccanosensibili in risposta allo stiramento della membrana plasmatica è stata studiata nelle linee cellulari NIH-3T3⁴⁸.

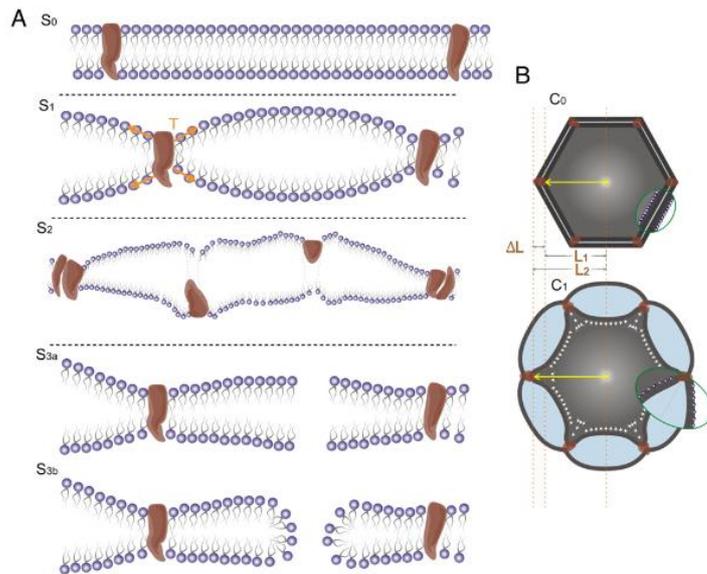


Figura 5. Bioeffetti indotti dall'interazione US sulla membrana cellulare e citoscheletro. (A) L'estensione aumenta gradualmente nei foglietti attorno a un BLS pulsante, dallo stadio di riferimento (S_0), i foglietti leggermente allungati potrebbero inizialmente attivare proteine mecano-sensibili (S_1); la crescente tensione nei lembi potrebbe danneggiare le proteine della membrana (S_2) e quindi potrebbe indurre la formazione di pori (S_{3a} , S_{3b}) o causare la rottura della membrana ad alti livelli di allungamento. (B) Le pulsazioni dei BLS che circondano una cellula inizialmente (C_0) potrebbero indurre da un lieve stiramento reversibile delle fibre del citoscheletro alla rottura irreversibile (C_1) (Boris Krasovitski, *PNAS*, 2010)¹⁴.

Alcuni studi riportano inoltre gli effetti degli US sul citoscheletro e in particolare sui microtubuli. *Zeghimi et al*³⁷, osservarono la distruzione della tubulina del citoscheletro dopo irraggiamenti con US alla frequenza di 1 MHz (20% duty cycle, intensità di 1 W/cm², 40 Hz pulsato, per 60') su cellule primarie di glioblastoma umano, U-87 MG.

*Mizrahi et al*⁴⁴, dimostrarono come nei loro esperimenti gli US a bassa intensità fossero in grado di indurre la fluidificazione reversibile del citoscheletro nelle cellule irraggiate, accompagnata da un'accelerazione nella velocità di rimodellamento del citoscheletro stesso. Ulteriori studi hanno evidenziato la capacità degli US di indurre un disassemblaggio dei microtubuli in seguito a sonicazione, con riarrangiamento dei filamenti F-actina del citoscheletro.

A tali lavori, si affiancano alcuni incentrati ad investigare gli effetti degli US sul fuso mitotico. Tra questi si riporta il lavoro di *Udroi et al*, che recentemente hanno studiato l'effetto degli US al di sotto e al di sopra della soglia cavitazionale⁴⁹. Gli

esperimenti condotti su tre diverse linee cellulari, le HeLa (adenocarcinoma della cervice), le MCF-7 (adenocarcinoma mammario) e le MRC-5 (fibroblasti), hanno mostrato come la sonicazione era in grado di indurre nelle cellule in mitosi una disorganizzazione del fuso probabilmente riconducibile al parziale e transiente disassemblaggio/distruzione dei microtubuli. Ciò evidenzia pertanto come gli US a scopo terapeutico possono influenzare l'integrità del genoma anche ad intensità al di sotto della soglia cavitazionale.

Infine, tra le diverse risposte biologiche indotte dallo stress meccanico non meno importante è la capacità di indurre il rilascio di citochine infiammatorie, ROS, proteine e enzimi coinvolti nell'azione antiossidante verso tale sforzo meccanico⁵⁰. Diversi studi, sono stati condotti per valutare gli effetti della stimolazione meccanica sull'espressione di citochine pro-infiammatorie in diverse linee cellulari, quali condrociti⁵¹, osteoblasti, cellule muscolari⁵², cellule staminali della polpa dentale⁵⁰, nonché i cheratinociti⁵³. Tra questi alcuni lavori evidenziano il ruolo dello stress biomeccanico nel rilascio dell'interleuchina (IL)-6⁵⁴, che sarà oggetto di studio in tale progetto di ricerca.

1.7 Lo stress legame tra infiammazione, cancro e il ruolo delle citochine

Sebbene l'infiammazione controllata sia necessaria per una serie di processi quali l'eliminazione della noxa patogena, la riparazione tissutale, la guarigione di ferite, l'infiammazione cronica e incontrollata è stata associata a diverse patologie, quali l'asma, l'aterosclerosi, l'artrite reumatoide, la sclerosi multipla, l'Alzheimer e diversi tipi di cancro⁵⁵⁻⁵⁷. Diversi studi, riportano lo stretto legame che intercorre tra infiammazione e cancerogenesi, evidenziando come il rischio di sviluppare un cancro aumenti sensibilmente in presenza di malattie infiammatorie croniche⁵⁸, infezioni o agenti ambientali in grado di indurre infiammazione.

Nel microambiente tumorale un vasto network di mediatori pro-infiammatori partecipano a un complesso processo di segnalazione che facilita la extravasazione delle cellule tumorali dallo stroma favorendo la progressione

tumorale⁵⁷. Tra tali mediatori infiammatori giocano un ruolo chiave le citochine, le chemochine, i ROS, la cicloossigenasi 2 (COX-2), la 5-lipossigenasi (5-LOX), le metalloproteinasi della matrice o *Matrix metalloproteinases* (MMP) e fattori di trascrizione quali NF-κB e *Signal transducer and activator of transcription 3* (STAT3), proteina attivatrice-1 o *Activator protein* (AP)-1 e il fattore 1 indotto dall'ipossia o *Hypoxia-Inducible Factor* (HIF)-1⁵⁹. Tra tali mediatori NF-κB mostra un ruolo centrale nella secrezione e attivazione di numerose citochine pro-infiammatorie da parte di diversi tipi di cellule, tra cui i macrofagi, le cellule T, le cellule epiteliali, regolando la crescita cellulare e pertanto contribuendo alla promozione e progressione del cancro. Tra le citochine pro-tumorogeniche, l'IL-6 è stata negli anni oggetto di studio da parte della comunità scientifica dato il ruolo nello sviluppo del cancro e nell'attivazione di pathways oncogenici⁶⁰.

L'IL-6 è una catena polipeptidica glicosilata con peso molecolare di circa 25 kDa⁶¹, secreta da diversi tipi cellulari, tra cui le cellule T e B, cellule polimorfonucleate, eosinofili, monociti/macrofagi, cellule dendritiche, cellule neuronali, cellule epiteliali, fibroblasti e alcuni tipi di cellule tumorali⁶².

L'IL-6, è considerata come un tipico esempio di citochina pleiotropica coinvolta in diversi processi biologici, tra cui l'oncogenesi, la proliferazione e la sopravvivenza cellulare e nell'angiogenesi attraverso la via di segnalazione *Janus kinase* (JAK)/STAT, meglio illustrata più avanti.

E' inoltre considerata un importante agente immunomodulatore, con un ruolo attivo nella regolazione delle reazioni di fase acuta, attivazione delle cellule T helper (Th), inibizione delle cellule T regolatorie (Treg) e differenziazione delle cellule B⁶³.

Tali effetti biologici vengono indotti attraverso l'attivazione di due diverse vie: la via di trans-segnalazione e la via classica⁵⁶ (Fig.6).

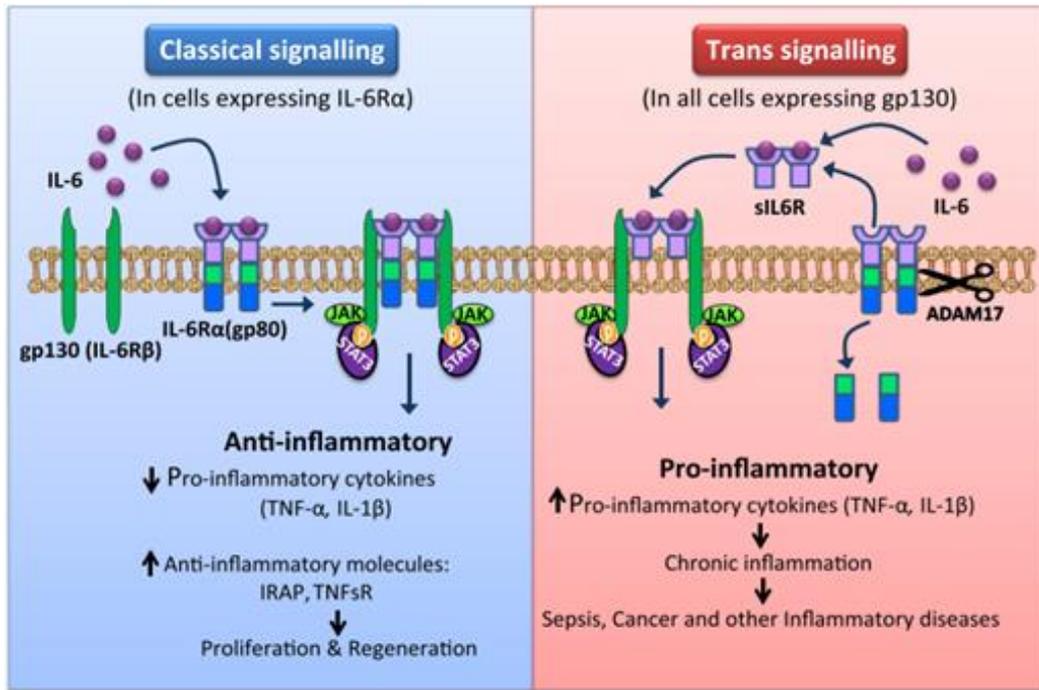


Figura 6. Vie di segnale di IL-6 (Kumari, *Tumor Biology*, 2016)⁵⁶.

Nella trans-segnalazione, l'IL-6 forma un complesso con il recettore solubile sIL-6R il quale è prodotto ad opera di metallo proteasi o splicing alternativo del recettore di membrana mbIL-6R α . Le reazioni infiammatorie inducono la produzione di sIL-6R, che suscita la risposta a IL-6 in cellule che non esprimono il recettore mbIL-6R α e/o rimangono inerti alla segnalazione di IL-6 in condizioni fisiologiche normali.

Nella via classica, l'IL-6 si lega al recettore mbIL-6R α (espressione limitata agli epatociti, cellule epiteliali e alcuni leucociti), il quale forma un complesso con il recettore cellulare gp130 espresso ubiquitariamente su tutte le cellule. Mentre tale via attiva pathways antiinfiammatori e promuove la rigenerazione di tessuti, la trans-segnalazione è nota per attivare pathways infiammatori e per il suo ruolo in diverse malattie quali la sepsi e il cancro.

La produzione di IL-6 risulta essere indotta da diversi stimoli tra cui il danno tissutale (radiazioni ionizzanti, UV, ROS, carenza di ossigeno e da e altre citochine pro-infiammatorie come IL-1 α). Tale produzione è inoltre regolata da

cambiamenti nell'espressione genica di fattori di trascrizione quali NF- κ B, CCAAT/enhancer-binding protein e AP-1.

Come già indicato, la sua liberazione transitoria è importante nella difesa dell'ospite, ma per la sua azione pleiotropica, una sua disregolazione è associata a diverse condizioni patologiche⁶⁴. Tra queste possiamo ricordare la malattia di Alzheimer, l'asma bronchiale, la fibrosi cistica, la sclerosi multipla, l'obesità, il diabete mellito e molte altre, tra cui patologie associate a polimorfismi a carico del gene di IL-6 e in diversi tumori, come il melanoma, il cancro della prostata, il sarcoma di Kaposi, agendo come fattore di crescita autocrino per tali neoplasie. Alte concentrazioni di tale citochina sono state rilevate nel siero e nei tessuti tumorali, le quali sono associate a prognosi sfavorevole e una minor sopravvivenza dei pazienti. Inoltre, gli stessi agenti chemioterapici e la radioterapia sono in grado di indurre l'espressione di IL-6 nelle cellule tumorali e stromali attraverso la via di segnale NF- κ B portando alla resistenza terapeutica. Tali evidenze, sottolineano il ruolo di IL-6 nel promuovere la progressione tumorale⁶⁴ e come il blocco di tale citochina o delle vie di segnale a valle può fornire un bersaglio terapeutico nei tipi di tumori con alti livelli di IL-6. Inoltre, agendo sulle cellule endoteliali, fibroblasti ed epiteliali promuove la secrezione di mediatori dell'infiammazione quali chemochine, fattori di crescita e la stessa IL-6. In particolare, si è notato come insieme a IL-17 o il fattore di necrosi tumorale o *Tumor necrosis factor* (TNF)- α , la produzione di questi mediatori sia sinergica. Tale sinergismo risulta essere mediato dalla co-attivazione di NF- κ B e STAT3, i quali svolgono un ruolo cardine in vari aspetti del processo tumorigenico in una serie di tumori maligni⁶⁵. Tali fattori di trascrizione risultano essere costitutivamente attivati nelle cellule neoplastiche a causa della sovraregolazione delle vie di segnalazione a monte in risposta a fattori autocrini e paracrini prodotti nel microambiente tumorale. Questi regolano l'espressione di diversi geni importanti per la proliferazione cellulare, l'angiogenesi, la riparazione tissutale. Inoltre attivati da citochine e fattori di crescita, controllano l'espressione di altre citochine

e mediatori dell'immunità innata e specifica agendo come centro di regolazione che coordina le risposte infiammatorie e immunitarie.

Entrambe le vie di segnalazione di IL-6, sopra citate, convergono sulla via della chinasi JAK/STAT3. Nella patogenesi del cancro, elevati livelli di IL-6 stimolano l'iperattivazione di tale via, associata a prognosi sfavorevoli^{66,67}. L'iperattivazione di STAT3 è stata rilevata nelle cellule tumorali come risultato di elevati livelli di IL-6 nel siero e/o nel microambiente tumorale, a causa dei segnali di altri fattori di crescita e/o dei loro recettori, attivazione da parte di tirosin chinasi non recettoriali (come SRC e BCR-ABL1) o mutazioni con perdita di funzione che interessano i regolatori negativi di STAT3.

L'IL-6 è in grado di indurre l'espressione di geni target di STAT3 nelle cellule tumorali, i quali codificano per proteine che promuovono la proliferazione cellulare, quali la Ciclina D1 (CCND1), o la sopravvivenza quali BCL-2. Lo stesso STAT3 è in grado di promuovere l'espressione genica di IL-6 innescando un ciclo di feedback autocrino, nonché indurre l'espressione di fattori in grado di promuovere l'angiogenesi (come VEGF), invasività e/o metastasi, come MMPs e immunosoppressione così come IL-10 e TGF- β ⁶⁶.

Visto l'aumento di IL-6 associato a diverse condizioni patologiche, l'uso di inibitori di questa citochina è stato proposto nel trattamento di alcune malattie⁶⁸. In particolare possiamo ricordare Siltuximab e Tocilizumab, quest'ultimo approvato per il trattamento dell'artrite reumatoide⁶⁹, anticorpi monoclonali con bersaglio IL-6 e il recettore IL-6R- α .

Tofacitinib, inibitore tirosin chinasi, con target JAK1 e JAK3 è stato approvato dalla FDA per il trattamento dell'artrite, mentre Ruxolinitib inibitore di JAK1 e 2 è stato approvato per il trattamento di pazienti affetti da mielofibrosi o policitemia vera. Inoltre, diversi agenti inibitori di IL-6, IL-6R, JAK sono in fase di sperimentazione preclinica e/ clinica.

Più recentemente è stato evidenziato il ruolo fondamentale di IL-6 nella patogenesi della malattia da Coronavirus (COVID 19) causa della sindrome

respiratoria acuta grave Coronavirus-2 (SARS-CoV-2) che sta affliggendo tutto il mondo. Elevati livelli di IL-6 sono stati trovati in più della metà dei pazienti affetti da tale patologia⁷⁰, nonché associati con la risposta infiammatoria, l'insufficienza respiratoria, la necessità di ventilazione meccanica e mortalità nei pazienti affetti da COVID-19. Pertanto diversi studi, supportano l'idea di come tale citochina possa essere un potenziale marcatore per predire il peggioramento di tale patologia^{71,72}. Recentemente, *Salvarani et al* nell'analizzare l'IL-6 come bersaglio farmacologico, hanno riportato in un studio randomizzato come il trattamento con Tocilizumab non sembra ridurre il rischio di peggioramento clinico nei pazienti con il rapporto di tensione arteriosa di O₂/frazione inspirata di O₂ (PaO₂/FIO₂) compreso tra 200 e 300 mmHg⁷³.

1.8 Il fattore di trascrizione NF-κB e il suo ruolo nell'infiammazione

Il fattore nucleare NF-κB rappresenta una famiglia di fattori di trascrizione inducibili composta da cinque membri strutturalmente legati, quali NF-κB1/p50, NF-κB2/p52, RelA/p65, RelB e c-Rel, che esercitano la loro funzione regolativa sui processi trascrizionali sottoforma di omo-eterodimeri⁷⁴.

Gli stimoli che inducono l'attivazione dei pathway di NF-κB sono stati ampiamente studiati e tra questi è possibile ricordare i batteri o loro componenti (Lipopolissacaride, Lipide A), virus, condizioni di stress come le radiazioni UV, US⁴⁷, misfolding proteico, ROS, agenti chemioterapici, mitogeni e fattori di crescita che promuovono tale attivazione attraverso due diverse vie, la canonica e la non canonica (o alternativa) (Fig. 7), entrambe con un importante ruolo regolatorio nelle risposte infiammatorie e immunitarie.

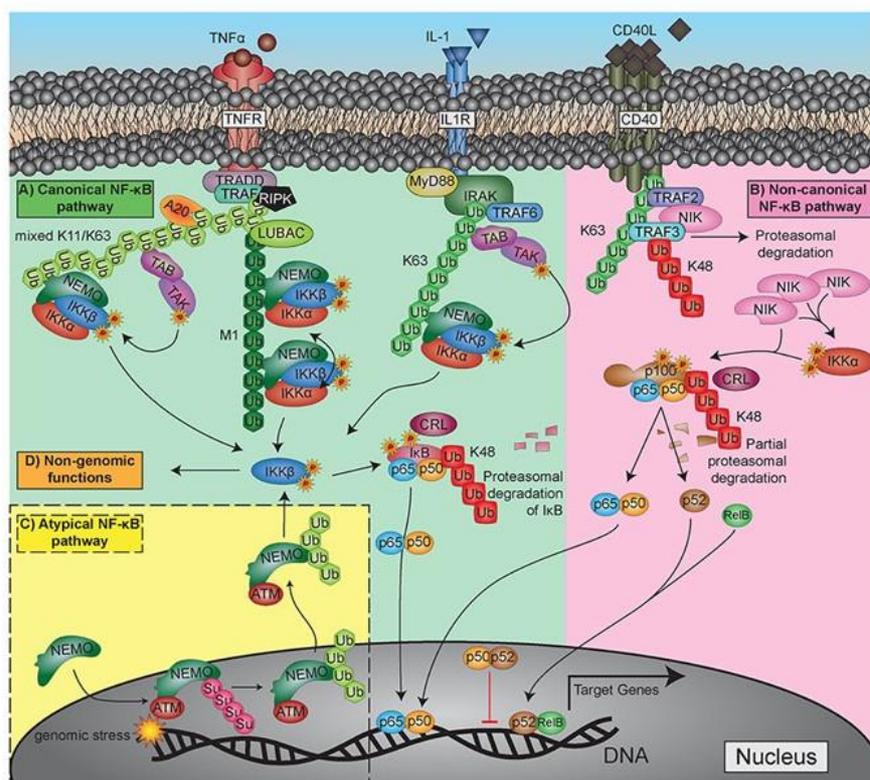


Figura 7. Vie di attivazione di NF-κB (Mussbacher, *Front Immunol*, 2019).⁷⁵

La via canonica è attivata da diversi stimoli, tra i quali i ligandi di vari recettori delle citochine, *Pattern Recognition Receptors* (PRRs), la superfamiglia del recettore del TNF, il recettore dei linfociti T o *T cell receptor* (TCR) e delle cellule B o *B cell receptor* (BCR).

Le proteine NF-κB sono generalmente sequestrate nel citoplasma da una famiglia di proteine inibitrici, i membri della famiglia delle chinasi IκB (IKK) formate da due subunità catalitiche, IKKα e IKKβ, e una regolatrice IKKγ/NEMO.

La via canonica vede la sua attivazione mediante la degradazione inducibile di IKKα innescata dalla sua fosforilazione mediata dal complesso IKK su due residui N-terminali di serina e alla conseguente degradazione ubiquitina-dipendente di IKKα nel proteosoma, risultando in una transiente e rapida traslocazione nucleare dei dimeri di NF-κB, principalmente p50/RelA e p50/c-Rel.

Diversamente dal pathway canonico, quello non canonico risponde a una serie di stimoli che includono i ligandi di un sottoinsieme di membri della superfamiglia

del recettore del TNF, quali il recettore β della linfotossina (LT β R), il recettore del fattore di attivazione delle cellule B o *B-Cell Activating Factor* (BAFFR), CD40 e il recettore attivatore del fattore nucleare κ B o *receptor activator of nuclear factor- κ B* (RANK). Inoltre, l'attivazione di tale via non coinvolge la degradazione di IKK α ma l'elaborazione della proteina precursore di NF- κ B2, p100. NF- κ B-chinasi (NIK) attiva coopera con IKK α per mediare tale fosforilazione, che determina l'ubiquitinazione di p100 e la cui parziale degradazione genera NF- κ B p52 maturo e traslocazione del non canonico complesso NF- κ B p52/RelB. Nell'insieme la via canonica sembra essere coinvolta principalmente nelle risposte immunitarie, mentre la non canonica coopera con i pathway di NF- κ B canonici nel regolare determinate funzioni dell'immunità specifica come asse di segnalazione supplementare.

NF- κ B è infatti considerato come un mediatore chiave nell'induzione di diverse funzioni dell'immunità specifica e innata⁷⁴, nonché di vari geni pro-infiammatori nelle cellule immunitarie innate (Fig.8).

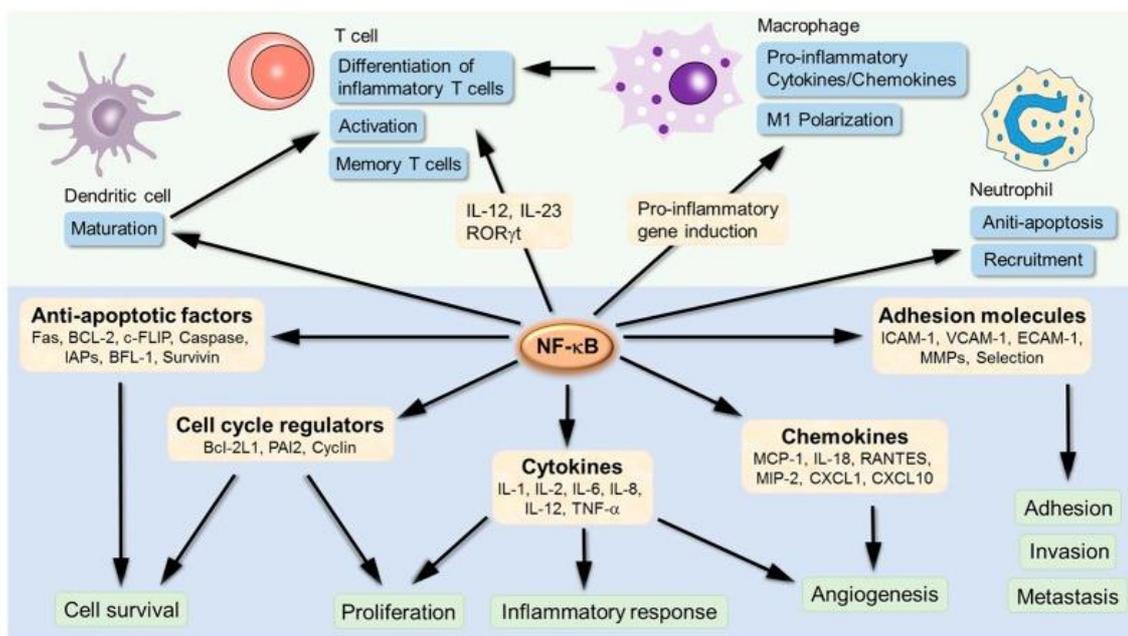


Figura 8. Ruolo di NF- κ B nello sviluppo e progressione dell'infiammazione (Ting Liu, *Nature* 2017)⁷⁴.

Un comune evento segnale dei recettori PRRs è l'attivazione del pathway canonico di NF- κ B, responsabile di promuovere la trascrizione di citochine pro-infiammatorie, chemochine, così come IL quali IL-1, IL-6, IL-8, IL-10, IL-18, IL-20 e TNF- α ,⁷⁶⁻⁷⁸e altri mediatori in diverse cellule dell'immunità innata.

La funzione pro-infiammatoria di NF- κ B è stata ampiamente studiata nei macrofagi. In risposta a diversi Profili molecolari associati al danno o *Damage Associated Molecular Patterns* (DAMP) e profili molecolari associati ai patogeni o *Pathogen Associated Molecular Patterns* (PAMP) i macrofagi diventano rapidamente attivi e in grado di rilasciare una vasta gamma di citochine e chemochine. In particolare, NF- κ B è un fattore di trascrizione chiave dei macrofagi M1 ed è richiesto per l'induzione di un vasto numero di geni infiammatori che codificano per TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-12p40 e COX-2.

Come noto, l'infiammazione inoltre coinvolge diversi componenti dell'immunità specifica, in particolare le cellule CD4⁺ Th. È stato dimostrato come RelA e c-Rel abbiano un ruolo centrale nel mediare il segnale TCR e nell'attivazione delle cellule T naive. Pertanto, la deregolata attivazione di NF- κ B può causare una aberrante attivazione delle cellule T associata a risposte infiammatorie e autoimmuni.

A tali funzioni si aggiunge il ruolo regolatorio di NF- κ B nell'attivazione dell'inflammasoma, un complesso multiproteico assemblato in risposta al riconoscimento di un ampio spettro di PAMPs e DAMPs, e caratterizzato dall'attivazione di caspasi infiammatorie (Fig.9).

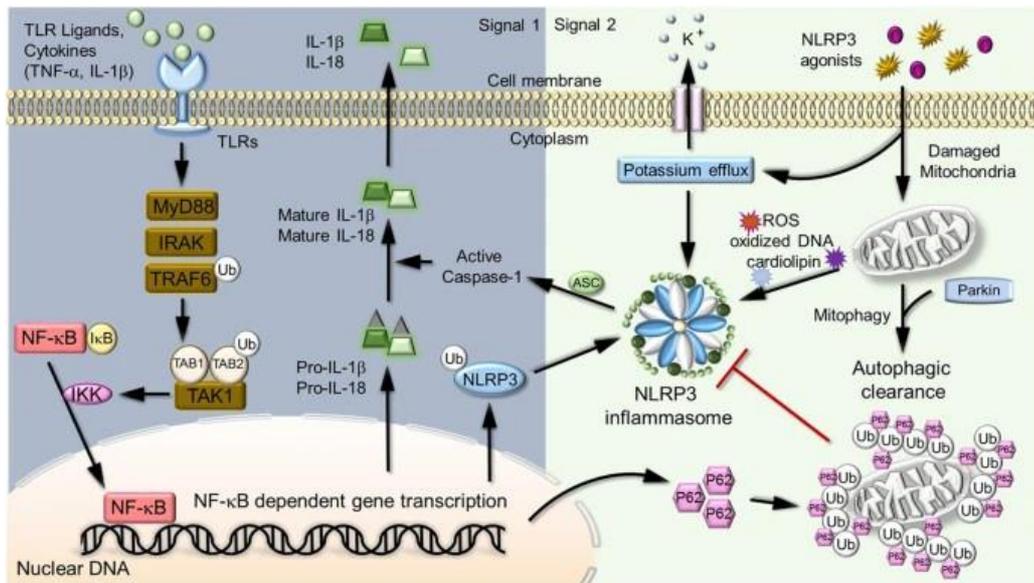


Figura 9. Ruolo di NF- κ B nella regolazione dell'inflammasoma
(Ting Liu, *Nature* 2017)⁷⁴.

I canonici inflammasomi sono definiti complessi multiproteici, costituiti da membri appartenenti alla famiglia dei NOD-like receptor (NLR) come AIM-2 (assente in melanoma 2), la proteina adattatrice ASC (la proteina speck associata all'apoptosi contenente un dominio di reclutamento di caspasi) e la pro-caspasi 1. In seguito a stimolazione, i recettori dell'inflammasoma (i più studiati sono NLRP1, NLP3, NLRC4 e AIM2) oligomerizzano e reclutano la pro-caspasi 1 via ASC, così promuovendo la conversione a caspasi 1. Quest'ultima è in grado di clivare pro-IL-1 β e pro-IL-18 portando alla loro successiva secrezione.

L'inflammasoma NLP3 è attualmente il più studiato, la cui attivazione richiede due segnali, un segnale di priming (tra i tipici induttori abbiamo componenti microbiche, come ligandi del TLR, e citochine come TNF- α e IL-1 β) e un segnale di attivazione (segnale 2). Dopo il primo segnale di priming, NF- κ B trasloca nel nucleo promuovendo la trascrizione di geni NF- κ B dipendenti, quali NLP3, pro-IL1 β e pro-IL-18, necessari per l'attivazione dell'inflammasoma. Il secondo segnale è innescato da PAMPs e DAMPs, così come tossine formanti pori, RNA virali, ATP e sostanze cristalline. Tali stimoli, attraverso l'attivazione di NLP3, inducono

diverse risposte tra cui l'efflusso di K^+ , il segnale del Ca^{2+} , danno mitocondriale e lisosomiale, nonché l'assemblaggio dell'inflammasoma e secrezione di IL-1 β ⁷⁴.

Come è evidente, l'inflammasoma costituisce una parte essenziale dell'immunità innata contro le infezioni da patogeni e la sua deregolazione è coinvolta nell'insorgenza di diverse malattie infiammatorie e autoimmuni.

Infine, si ricorda tra le molteplici funzioni di NF- κ B quella di promuovere l'acquisizione di fenotipi migratori e invasivi nella transizione epitelio-mesenchima o *Epithelial-mesenchymal transition* (EMT) e pertanto di favorire la progressione tumorale⁷⁹.

2. Scopo della ricerca

Ben noto è ormai il vasto impiego degli US in diversi campi tra cui quello clinico, il cui utilizzo come mezzo diagnostico e terapeutico sottolinea la necessità di meglio comprendere i bioeffetti indotti dalla loro interazione.

Obiettivo del presente progetto di ricerca è stato così quello di valutare *in vitro*, grazie alla collaborazione con il Dipartimento di Scienze e Tecnologie Chimiche dell'Università degli studi di Roma "Tor Vergata" (Prof. Gaio Paradossi, Dott. Fabio Domenici) e il Dipartimento Innovazioni Tecnologiche e Sicurezza degli Impianti, Prodotti e Insediamenti Antropici (DIT), INAIL (Dott. Angelico Bedini), le risposte biologiche indotte dallo stress meccanico generato dagli US. Diversi studi riportano come quest'ultimo sia in grado di influenzare diverse vie di segnalazione e funzioni cellulari, attraverso alterazioni dell'omeostasi di membrana, della dinamica del citoscheletro e danno genomico.

La procedura sperimentale è stata articolata andando dapprima a valutare gli effetti degli US a bassa intensità ed in particolare alla frequenza di 1 MHz, sui cheratinociti umani HaCaT, un modello di linea cellulare immortalizzata che mostra molte somiglianze con i cheratinociti primari delle cellule basali.⁸⁰ L'attenzione verso tali cellule è stata inoltre dettata dal fatto che la maggior parte dei trattamenti medici non invasivi con alla base gli US al campo acustico di frequenza di 1 MHz, interagiscono dapprima proprio con i cheratinociti.

Nello specifico è possibile riassumere le seguenti fasi che hanno caratterizzato la ricerca:

1. Studio degli effetti indotti dagli US sulla morfologia e permeabilità di membrana riconducibili allo stress meccanico da essi generato sulle cellule HaCaT;
2. Studio della possibile attivazione di pathways dell'infiammazione, e nello specifico della possibile alterazione dell'espressione e secrezione della citochina IL-6, da tempo oggetto di diversi studi, in quanto coinvolta in una

- serie di importanti attività biologiche, nonché per il suo ben noto ruolo in diverse malattie infiammatorie e nella progressione tumorale;
3. Analisi della possibile attivazione del fattore di trascrizione nucleare NF- κ B, il quale coordina l'espressione di diversi geni pro-infiammatori e secrezione di diverse citochine, tra cui l'IL-6;
 4. Valutazione degli effetti sulla proliferazione/vitalità cellulare;
 5. Studio dei potenziali effetti biologici degli US su due linee di melanoma umano, le SK-MEL-5 e le SK-MEL-28.

3. Materiali e metodi

3.1 Linee cellulari e condizioni di coltura

Tutti gli esperimenti sono stati condotti sulle linee cellulari di cheratinociti umani HaCaT e melanoma SK-MEL-5 e SK-MEL-28, ottenute dall'Interlab Cell line Collection di Genova (Istituto Nazionale per la Ricerca sul Cancro), Italia. Le cellule sono state coltivate in terreno Dulbecco's Modified Eagle's medium (DMEM, Corning, Manassas, VA, USA) addizionato con 10% di siero bovino fetale (FBS), 1% penicillina/streptomina, 1% L-glutamina (Euroclone, Pero, Italia). Il terreno delle linee cellulari SK-MEL-5 e SK-MEL-28 è stato addizionato inoltre con l'1% di aminoacidi non essenziali (NEAA) e l'1% di Sodio piruvato (NaPyr) esclusivamente per le SK-MEL-5. Le cellule sono state mantenute in incubatore cellulare a 37 °C, 5% CO₂.

Per gli irraggiamenti con gli US le cellule sono state seminate in piastre di Petri per colture cellulari delle dimensioni di 9.6 cm² (Falcon® Easy Grip™, Becton Dickinson Labware, Franklin Lakes, NJ; © ibidi GmbH, Martinsried, Germany) per 24 h alla densità di 3-4 × 10⁵ cellule/piastra.

3.2 Setup espositivo e protocollo sperimentale

Per l'esposizione agli US, è stato impiegato un dispositivo come mostrato in Fig.10 che permette di eseguire esposizioni controllate e riproducibili, fornendo inoltre onde sinusoidali ben definite indipendentemente dalle condizioni espositive. L'apparato è formato da un generatore di segnale (Agilent 33220 A), un amplificatore di segnale (Amplifier Research 25A250) e un trasduttore US piezoresistivo impermeabile (Precision Acoustics Ltd) con un diametro di 44 mm sintonizzato a 1 MHz.

Il trasduttore si trova sul fondo di una vasca in plexiglass (dimensioni 30 × 30 × 30 cm) riempita con acqua Milli-Q (resistività di 18.2 MΩ·cm.). Le piastre di Petri ermeticamente sigillate, contenenti la coltura cellulare in un volume di 2 mL, sono

state posizionate alla superficie dell'acqua, immerse fino a metà del loro spessore e verticalmente allineate con il trasduttore. Lo misura dello spessore del fondo della Petri corrispondeva a 0.90 mm (Falcon) o ~0.17 mm (ibidi), quest'ultimo impiegato per obiettivi ad immersione ad alta risoluzione per il microscopio confocale a scansione laser o *Confocal Laser Scanning Microscope* (CLSM).

Sul fondo della vasca è stato disposto un rivestimento acustico assorbente allo scopo di minimizzare gli effetti delle onde di riflessione. La temperatura dell'acqua è mantenuta a un valore costante di 25°C. Le geometrie delle piastre di Petri e del modello di configurazione dell'esposizione complessiva sono state impostate per evitare effetti di risonanza.

L'irraggiamento dei campioni è stato effettuato in regime pulsato con un duty cycle 10% mantenendo costante la distanza tra la piastra di Petri e il trasduttore, a 7 cm, per minimizzare gli effetti di campo vicino.

L'intensità acustica è stata calibrata misurando il campo trasmesso dall'area inferiore delle piastre di Petri irraggiate nelle diverse condizioni di esposizione con un idrofono ad ago di 0.5 mm di diametro (Precision Acoustics, UK). Le intensità sono state valutate in termini di *Spatial Peak Temporal Average* (SPTA, I_{spta}) nella gamma di valori compresi tra 18 e 65 mW/cm², al di sotto della soglia cavitazionale di 100 mW/cm², e tempi di esposizione tra 5 e 60'. La variabilità dei valori di I_{spta} è stata misurata entro il 10%, fornendo così una calibrazione del campo US stabile e riproducibile.

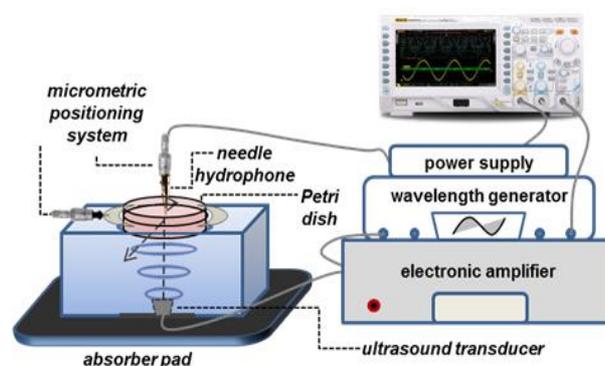


Figura 10. Schema del set-up sperimentale utilizzato per gli irraggiamenti con US (Domenici et al. 2017)³⁶.

3.3 Microscopia confocale a scansione laser

Le immagini al CLSM sono state acquisite con un microscopio confocale invertito Nikon Eclipse (Ti-E C1) (obiettivi 20×, 40×, 60× and 100×), dotato di un laser a ioni di Argon (Spectra Physics, Mountain View, California) con emissione a 488 nm, un laser He-Ne (Melles Griot, Florence, Italy), emissione a 543 nm e uno stage motorizzato.

Per la scansione lungo l'asse (z), è stato utilizzato un obiettivo ad immersione in olio Plan Apo 60× (Nikon, Florence, Italy) con apertura di 1.40 e le immagini Z-stacks sono state acquisite ad incrementi di 0.15 μm , secondo il criterio di Nyquist, calcolato automaticamente con il software di acquisizione Nikon EZ-C1. Per le immagini 3D, è stato impiegato il software NIS Elements AR 4.30 (Nikon, Florence, Italy).

L'alterazione della permeabilità di membrana è stata analizzata usando il colorante a fluorescenza verde calceina (Sigma-Aldrich Italy, con lunghezza d'onda di eccitazione ed emissione rispettivamente di 495 e 515 nm). Prima dell'irraggiamento con US, 2 mL di soluzione di calceina 4 μM in tampone fosfato salino (PBS) è stata aggiunta a ciascun campione; dopo i trattamenti sono stati programmati 10' di recovery e i campioni sciacquati con PBS e analizzati con CLSM.

Gli effetti sull'integrità del doppio strato lipidico e sulla morfologia di membrana sono stati studiati usando il colorante fluorescente 1,1'-dioctadecyl-3,3,3',3'-tetramethylindocarbocyanine perchlorate (DiI, Sigma-Aldrich Italy) (lunghezze d'onda di eccitazione e emissione rispettivamente di 549 e 565 nm); per marcare la membrana cellulare ogni campione è stato addizionato con DiI 5 μM , e incubato per 5' a temperatura ambiente (RT) sotto leggera agitazione; il colorante in eccesso è stato rimosso con PBS e la morfologia di membrana analizzata prima e dopo irraggiamento mediante CLSM.

3.4 Real-time PCR

L'mRNA totale è stato isolato usando un Total RNA Purification Kit (Norgen Biotek, ON, Canada) in accordo alle istruzioni del produttore. 1 µg di RNA è stato retrotrascritto in cDNA mediante retroscrittasi inversa M-MULV (New England BioLabs, UK). La Real-time PCR è stata effettuata con strumento Rotor-Gene Q (Qiagen, Hilden, Germany) usando BrightGreen qPCR MasterMix (abm, BC, CANADA). Le sequenze degli specifici forward e reverse primers impiegati sono i seguenti: GAPDH F: 5'- GAAGGTGAAGGTCGGAGTC-3', R: 5'- TTGAATGGCAACAATATCCACTT-3'; IL-6 F: 5'- AAGCCAGAGCTGTGCAGATG-3', R: 5'- GTCCTGCAGCCACTGGTTCT-3'; BAX F: 5'- GGGCCACCAGCTCTGAGCAGA-3', R: 5'- GCCACGTGGGCGTCCCAAAGT-3'; BCL-2 F: 5'- TACGATAACCGGGAGATAGTGA-3', R: 5'-CAGGTGCCGGTTCAGGTACT-3'. L'espressione di ogni gene è stata normalizzata all'espressione del gene housekeeping gliceraldeide-fosfato deidrogenasi o *Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase* (GAPDH) e le concentrazioni relative di mRNA di ciascun campione sono state calcolate usando il metodo $\Delta\Delta CT$.

3.5 Analisi del rilascio di IL-6 attraverso ELISA test

L'analisi della produzione e secrezione di IL-6 da parte delle cellule HaCaT, è stata eseguita dapprima seminando 3×10^5 cellule/piastra. Dopo l'avvenuta adesione cellulare, il terreno di coltura è stato cambiato con terreno fresco, e le cellule sonicate per 60'. Dopo il trattamento, le cellule sono state mantenute in incubatore a 37°C per un tempo di recovery di 15', 3 h e 24 h. 1mL di sopranatante è stato raccolto e centrifugato a 1000 rpm per 10'. Standards e replicati sono stati preparati e saggiati in triplicato per ogni campione. Il rilascio di citochina IL-6 nel sopranatante è stato quantificato usando un High sensitivity human ELISA kit (Abcam, Cambridge, UK), l'assorbanza misurata alla lunghezza d'onda di 450 nm con lettore ELISA plate reader (Labsystem Multiskan MS), e i dati analizzati

usando una curva standard, con il programma GraphPad prism 5.0 (GraphPad software Inc, La Jolla, CA, USA). I livelli di IL-6 sono stati espressi come percentuale relativa di IL-6 rilasciata nel terreno, comparando ogni campione al relativo controllo.

3.6 Analisi dell'attivazione di NF- κ B mediante immunofluorescenza

Le cellule HaCaT sono state seminate in chamber slides Falcon® e dopo 24 h sonicate per 60'. Dopo il trattamento, le cellule sono state lavate con PBS e fissate con tampone paraformaldeide freddo al 4 % (Sigma-Aldrich) per 20' a 4 °C, lavate una volta con PBS e permeabilizzate con 0.01% Triton X-100 per 5' a RT. Le cellule sono state incubate per 1 h con siero di albumina fetale (BSA) (Sigma-Aldrich) a RT e successivamente con anticorpo monoclonale di topo anti-NF- κ B p65 (Santa Cruz Biotechnology, CA, USA), diluizione 1:25 per 1 h a RT, risciaquate tre volte con PBS e incubate con Alexa Fluor 594 coniugato con goat anti-mouse IgG (Jackson Immuno Research) diluito 1:200, per 1 h a RT. Dopo il risciaquo con PBS, il nucleo è stato colorato per 5 minuti con Hoechst 33342 (10 μ g/mL, Sigma-Aldrich) in PBS. Infine, le cellule sono state sciaquate due volte con PBS, montate con reagente anti-sbiadimento Prolong (Molecular Probes) e analizzate usando un microscopio a fluorescenza Olympus BX52 (Hamburg, Germany). Le immagini sono state acquisite e elaborate con IAS 2000 software (Delta Sistemi, Rome, Italy).

3.7 Analisi della proliferazione cellulare mediante saggio MTT

5×10^3 cellule/pozzetto sono state seminate in piastre da 96 pozzetti e sonicate per 1 h. Le cellule sono state poi incubate con terreno senza FBS contenente MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) per 4 h. I cristalli di formazano formati sono stati disciolti in 100 μ L di DMSO e dopo 15' l'assorbanza misurata in un spettrofotometro per lettore di piastre (Labsystem Multiskan MS), usando una lunghezza d'onda test di 540 nm e una lunghezza di riferimento di 690 nm. Le cellule incubate con terreno di coltura e non sonicate rappresentavano

il controllo mentre i pozzetti contenenti solo terreno il bianco. La proliferazione cellulare, espressa in percentuale, è stata ottenuta dal rapporto dell'assorbanza media dei campioni trattati rispetto a quella dei campioni controllo.

3.8 Analisi del ciclo cellulare e del picco SubG1 mediante citofluorimetria a flusso

La citofluorimetria a flusso è stata impiegata per l'analisi del ciclo cellulare e l'eventuale apoptosi, mediante colorazione del DNA e quantificazione utilizzando Ioduro di Propidio o *Propidium Iodide* (PI). 5×10^5 cellule sono state seminate in piastre di Petri da 9.6 cm². Dopo trattamento con US, sia le cellule adese che in sospensione sono state raccolte in PBS, fissate in etanolo freddo al 70% e incubate per 30' a 4 °C. Il pellet cellulare è stato lavato due volte in tampone fosfato-citrato e trattato con 50 µL di RNasi (100 µg/mL, Sigma) per garantire la colorazione esclusivamente del DNA e sono stati aggiunti 200 µL di PI (50 µg/mL, Sigma). L'analisi del ciclo cellulare e del picco Sub G1 è stata eseguita con FACS CantoII (BD Biosciences). Il PI è stato eccitato mediante un laser a 488 nm, e la fluorescenza di emissione raccolta sopra i 580 nm. La dispersione diretta e ad angolo retto è stata utilizzata per definire la popolazione cellulare e l'elaborazione dell'impulso del segnale PI è stata utilizzata per distinguere le cellule G2 vere dai doppietti G1. 10.000 eventi singoli sono stati acquisiti per ogni campione.

3.9 Test di clonogenicità

Il test di clonogenicità è stato eseguito seminando 1×10^3 cellule/petri, e dopo 24 h i campioni sono stati sonicati. Al termine del trattamento le cellule sono state mantenute in incubatore per circa 15 giorni e successivamente colorate con Cristal violetto (Sigma-Aldrich), lavate con PBS per rimuovere l'eccesso di colorante e le colonie contate con software Image J.

4. Analisi statistica

Tutti gli esperimenti sono stati eseguiti in triplicato e i dati espressi come la media \pm la deviazione standard (SD).

I risultati ottenuti sono stati interpretati attraverso l'analisi della varianza a una via (ANOVA) e attraverso il test t di Student, usando il software GraphPad Prism 5.0. Valori di $p < 0.05$ sono stati considerati staticamente significativi.

4. Risultati

4.1 Studio degli effetti degli Ultrasuoni sulla morfologia e permeabilità di membrana

Il presente progetto di ricerca è stato focalizzato sulla comprensione degli effetti biologici indotti *in vitro* dagli US a bassa intensità. Diversi studi riportano come lo stress meccanico da essi generato sia in grado di alterare diverse funzioni e componenti cellulari, tra cui l'omeostasi di membrana. Per tale ragione si è andati dapprima ad analizzare nelle condizioni espositive oggetto di studio, gli effetti sulla morfologia e permeabilità di membrana.

Mediante marcatura con il colorante fluorescente DiI, è stata eseguita l'analisi microscopica di membrana sulle cellule HaCaT. La risposta al trattamento durante i primi 10' successivi alla sonicazione è stata monitorata in tempo reale con microscopio confocale *time-lapse* acquisendo immagini di regioni fisse ogni 30''. In Fig. 11 sono riportate alcune immagini rappresentative di campioni irraggiati con un campo di frequenza di 1 MHz e $I_{spta} = 18 \text{ mW/cm}^2$ per 30' e 60' a confronto con il campione di controllo non irraggiato.

Dalle immagini riportate è possibile evidenziare un'apparente perdita del piano focale solo nelle cellule sonicate, più marcato dopo 60' di trattamento, dove la maggior parte delle cellule risultano essere fuori dal piano focale dopo 6' dallo spegnimento dell'apparecchio US.

Si riportano in Fig. 12 alcune immagini rappresentative delle cellule HaCaT trattate con US per 60' a valori di $I_{spta} = 18, 30$ e 65 mW/cm^2 . Le cellule sonicate rispetto alle cellule controllo e analogamente con quanto riportato sopra mostrano una perdita del piano focale, ma più rapido a valori maggiori di intensità, dove le cellule non risultano visibili già dopo 4'.

Tale fenomeno spiegabile con un distacco parziale delle cellule HaCaT durante il trattamento con gli US, risulta pertanto più evidente all'aumentare del tempo e

dell'intensità di esposizione, con il successivo rilassamento delle cellule che tornano a aderire sul fondo della Petri.

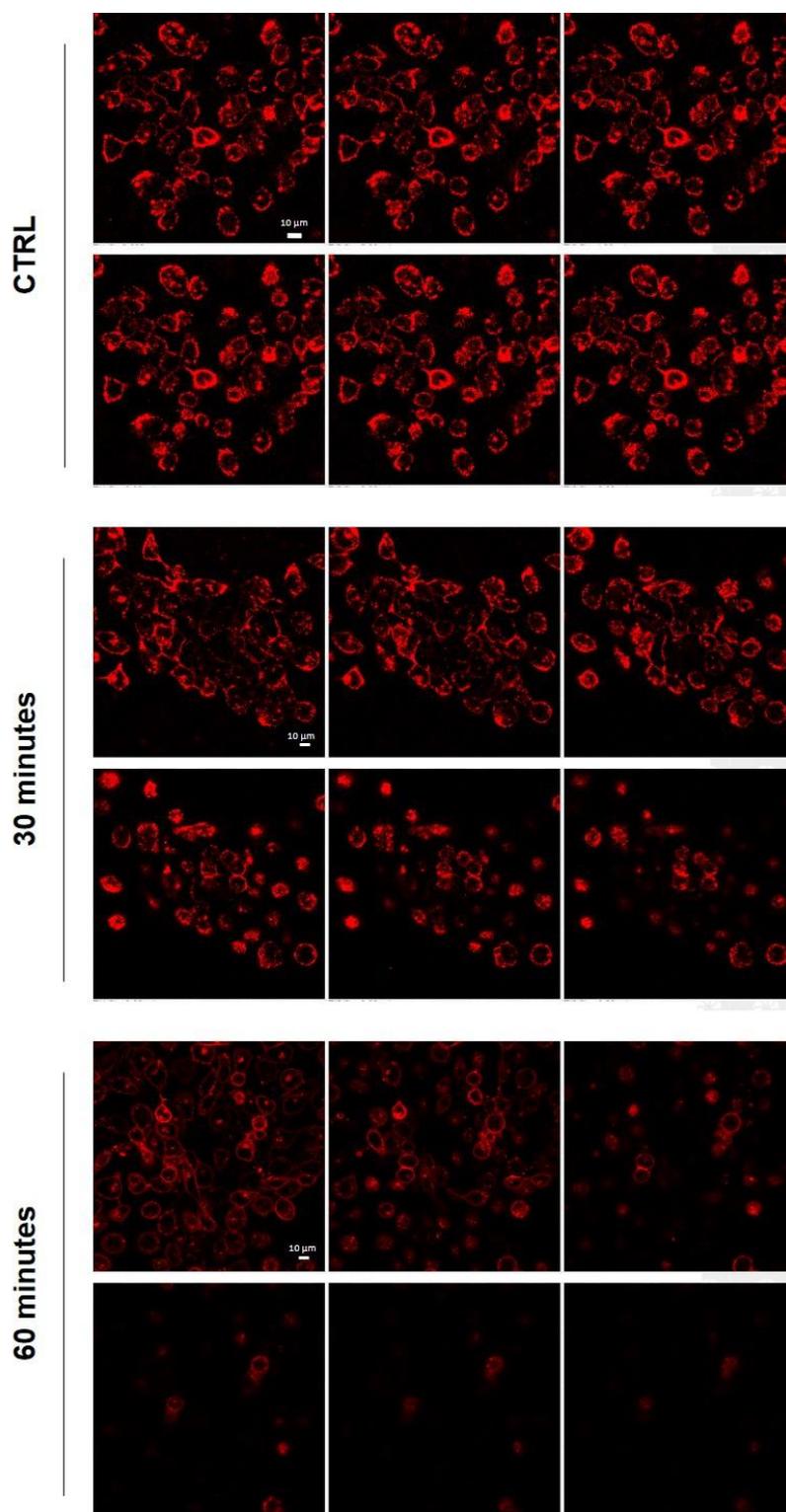


Figura 11. Analisi time-lapse eseguita con CLSM del recovery della membrana plasmatica delle cellule HaCaT sonicate per 60' alla frequenza di 1 MHz e $I_{spta} = 18 \text{ mW/cm}^2$. Per ogni campione è mostrato un fotogramma acquisito ogni 2'.

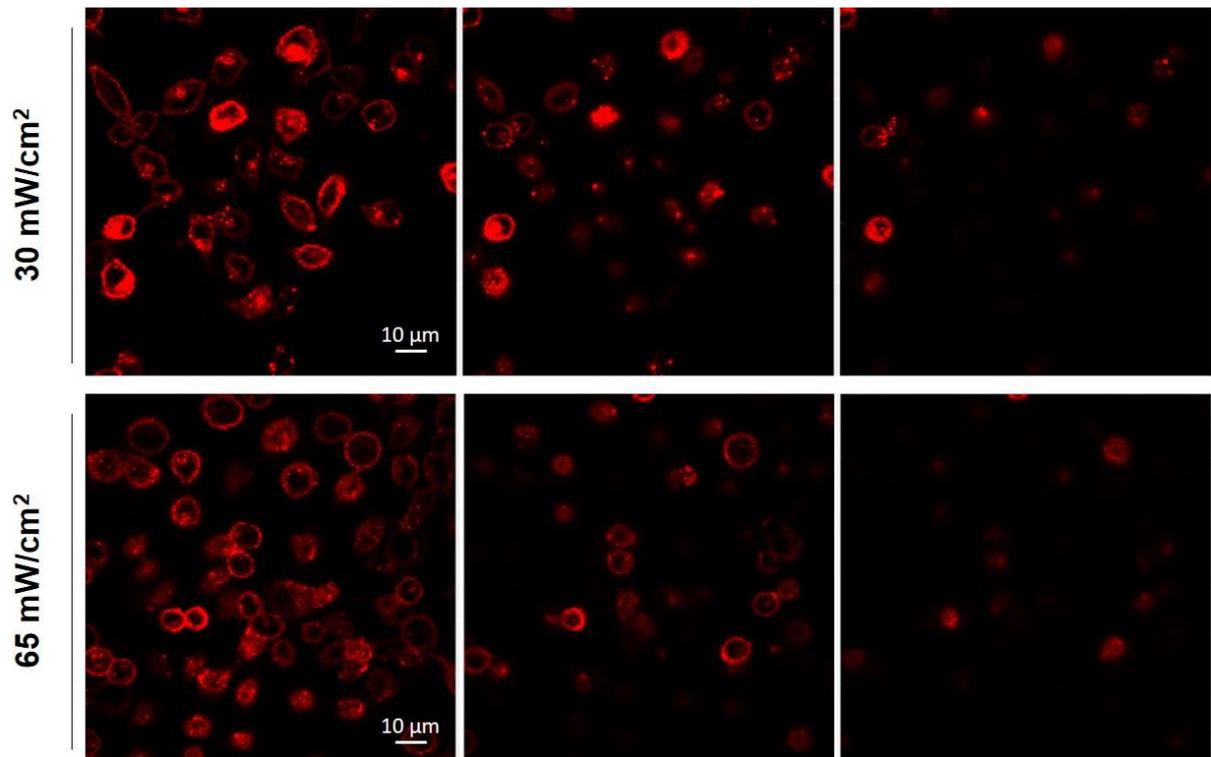


Figura 12. Analisi time-lapse in CLSM del recovery della membrana plasmatica delle cellule HaCaT in funzione dei valori di $I_{spta}=30$ e 65 mW/cm^2 , al campo di frequenza di 1 MHz. Per ogni campione è mostrato un fotogramma acquisito ogni 2'.

Per meglio caratterizzare la risposta all'irraggiamento a livello dei domini lipofili è stata realizzata una ricostruzione 3D con CLSM Z-stacks. Come mostrato in Fig. 13 nei campioni trattati sono ulteriormente evidenziabili eventi di distacco delle giunzioni con il substrato, e in aggiunta la formazione e l'esocitosi di piccole vescicole. Nel campione trattato con $I_{spta}= 65 \text{ mW/cm}^2$ tali fenomeni risultano più marcati come evidenziabile nel pannello E, dove si evidenzia anche un distacco delle giunzioni con il substrato.

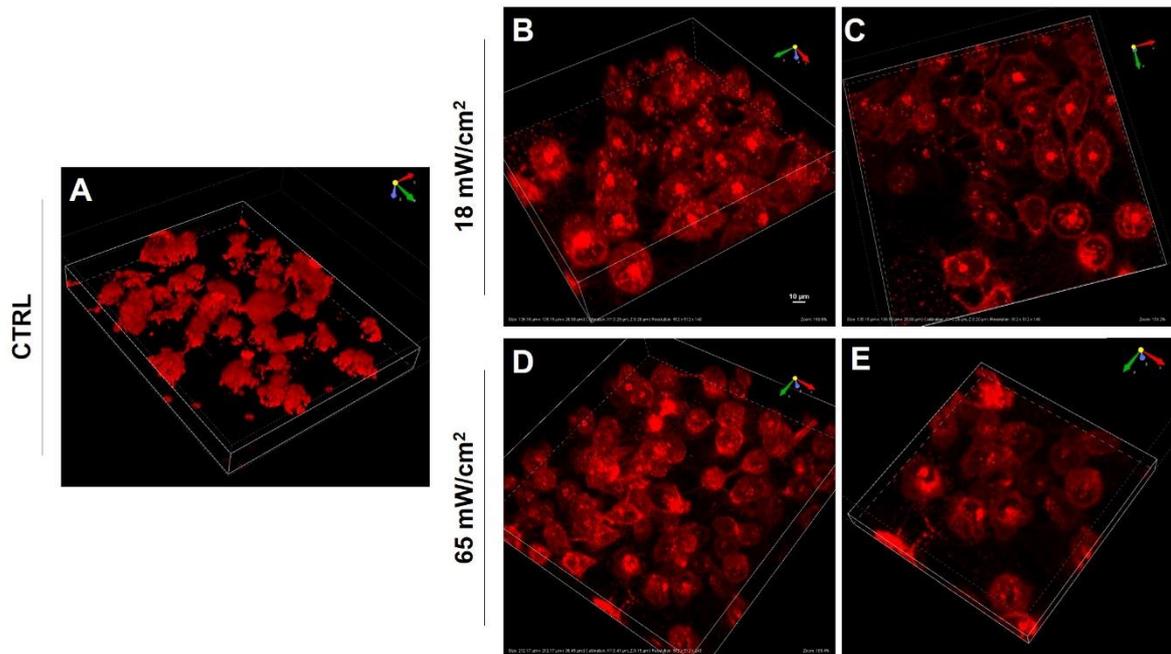


Figura 13. Ricostruzione 3D con CLSM Z-stacks della membrana cellulare delle HaCaT non sonicate (CTRL) e trattate con US per 60' a $I_{spta} = 18 \text{ mW/cm}^2$ e 65 mW/cm^2 .

Oltre alla morfologia di membrana è stato valutato l'effetto degli US sulla permeabilità in seguito a sonicazione, in termini di efficienza di internalizzazione del colorante fluorescente calceina, in quanto il doppio strato lipidico in condizioni normali risulta essere impermeabile a tale colorante. In Fig. 14 sono riportate alcune immagini rappresentative delle HaCaT irraggiate alla frequenza di 1 MHz, al variare del tempo (30 e 60') e dei valori di I_{spta} utilizzati (30 e 65 mW/cm^2). È possibile notare come le cellule trattate mostrano rispetto alle cellule controllo un'efficienza di uptake direttamente proporzionale al tempo di trattamento e ai valori di I_{spta} . L'analisi mediante CLSM mostra inoltre come tale internalizzazione sia principalmente localizzata nella membrana plasmatica delle cellule sonicate e all'aumentare dei tempi di trattamento una distribuzione della calceina anche nel citoplasma e nella regione perinucleare.

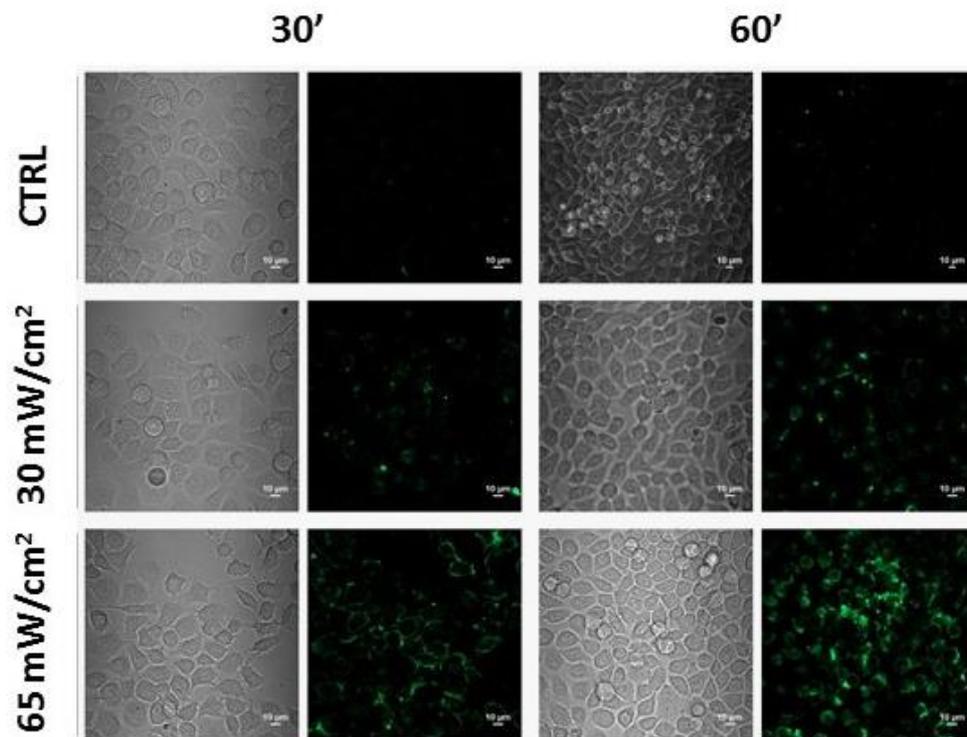


Figura 14. Analisi con CLSM, dell'internalizzazione della calceina in cellule HaCaT irraggiate ad 1 MHz al variare del tempo e dei valori di I_{spta} .

4.2 Effetti sull'espressione di IL-6

Diversi studi, riportano gli effetti dello stress biomeccanico sull'espressione di citochine pro-infiammatorie, tra le quali spicca l'IL-6⁵⁴.

Al fine di valutare l'effetto degli US sull'espressione genica di tale citochina, le cellule HaCaT sono state sonicate per 60' alla frequenza di 1 MHz e valori di I_{spta} compresi tra 18 e 65 mW/cm². Dall'analisi dell'espressione genica eseguita mediante Real-Time PCR, si è evidenziato un significativo aumento dei valori di mRNA di IL-6 subito dopo il trattamento, in funzione dell'incremento dei valori di I_{spta} (particolarmente evidente a valori pari a 65 mW/cm²). Tuttavia, tale over espressione non risulta statisticamente significativa dopo 24 h dall'esposizione agli US. I risultati riportati evidenziano come le cellule HaCaT sonicate nelle condizioni oggetto di studio mostrano una transiente up-regulation dell'espressione di IL-6.

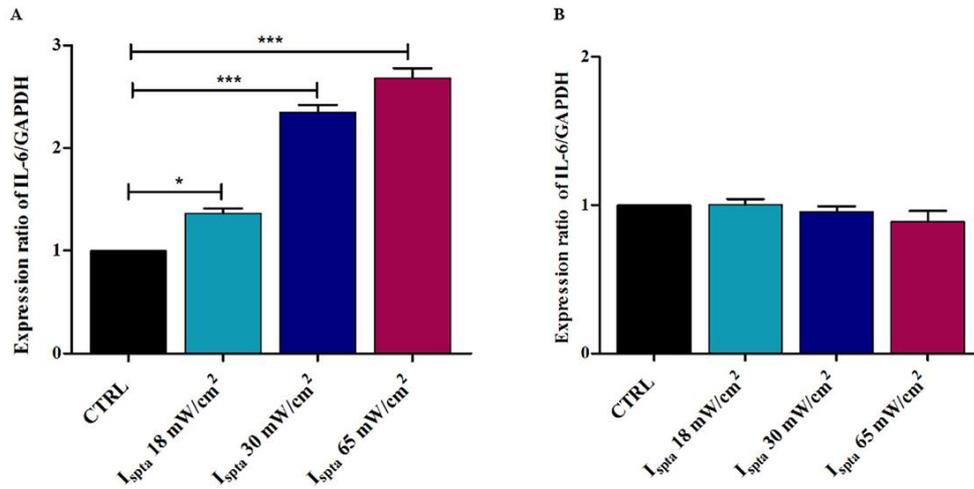


Figura 15. Analisi in Real-time PCR dell'espressione genica di IL-6 nelle cellule HaCaT sonicate a 1 MHz per 60' al variare dei valori di I_{spta} e analizzate al tempo 0 (A) e dopo 24 h (B) dal trattamento. L'espressione genica di IL-6 è stata normalizzata al gene housekeeping GAPDH. Le barre di errore rappresentano la SD dalla media; gli asterischi indicano la significatività dei trattati rispetto al controllo (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$). Il grafico è rappresentativo di tre esperimenti indipendenti tra loro.

Alla luce di tali risultati, si è andati ad analizzare se gli US, nelle condizioni di esposizione in cui si evidenziava una più significativa espressione genica di IL-6, fossero in grado di indurre la secrezione della proteina. Il terreno di coltura delle cellule HaCaT è stato raccolto, centrifugato e analizzato mediante saggio ELISA, dopo 1 h di irraggiamento, a valori di $I_{spta} = 65 \text{ mW/cm}^2$ e dopo diversi tempi di recovery, rispettivamente 15', 3 h e 24 h. Dalla Fig. 16 si può evidenziare un aumento del rilascio della citochina IL-6 nelle cellule trattate rispetto alle cellule controllo di circa il 27% già dopo 15' di recovery. Diversamente, non si osserva un aumento statisticamente significativo all'aumentare dei tempi di recovery. Tali risultati sottolineano come gli US a bassa intensità possano indurre un precoce ma transiente aumento del rilascio di tale citochina, in accordo con quanto evidenziato già in Real-time PCR. Tali risultati, mostrano come sarebbe utile inoltre valutare la possibile attivazione della via di segnalazione di STAT3, considerato il principale mediatore degli effetti di IL-6 (Sez. 1.7).

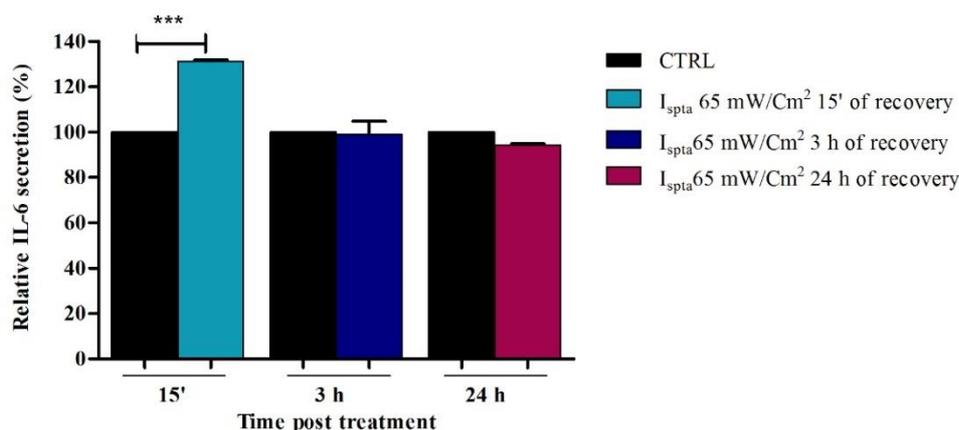


Figura 16. Analisi della secrezione di IL-6 eseguita mediante ELISA test sul terreno di coltura delle cellule HaCaT sonicate per 60' alla frequenza di 1 MHz e $I_{spta} = 65 \text{ mW/cm}^2$, seguito da diversi tempi di recovery. Le barre di errore rappresentano la SD dalla media; gli asterischi indicano la significatività dei trattati rispetto al controllo (***) $p < 0.001$). Il grafico è rappresentativo di tre esperimenti indipendenti tra loro.

4.3 Studio degli effetti degli ultrasuoni sul fattore di trascrizione nucleare NF- κ B

Come già illustrato nella **Sez. 1.8** è noto il ruolo chiave di NF- κ B nella trascrizione genica di IL-6. Pertanto, tenendo conto dei risultati ottenuti in Real-time PCR ed ELISA, è stata analizzata la sua possibile attivazione da parte degli US. Dopo 1 h di esposizione alla frequenza di 1 MHz e al valore di $I_{spta} = 65 \text{ mW/cm}^2$, è stata eseguita una immunodetection della localizzazione cellulare di NF- κ B. Come già indicato in precedenza, l'accumulo di NF- κ B nel citoplasma allo stato stazionario e la successiva traslocazione nel nucleo in seguito ad attivazione, è in grado di regolare la trascrizione di diversi geni⁷⁴ tra cui quelli che codificano per IL-6. Inoltre, alcuni studi riportano come tra gli stimoli in grado di promuovere l'attivazione di NF- κ B vi siano anche gli US⁴⁷.

Come si può osservare dalla Fig. 17A le cellule di controllo presentano NF- κ B p65 quasi esclusivamente nel citoplasma. Dopo esposizione ad US è evidenziabile un aumento della concentrazione citoplasmatica di NF- κ B p65 affiancato però a sua volta da un aumento della traslocazione nucleare in tutte le cellule analizzate, meglio evidenziabile dall'immagine ingrandita riportata in Fig. 18. L'analisi

densitometrica (Fig. 17B) mostra infatti nelle cellule trattate un incremento della presenza di NF- κ B nel nucleo in rapporto al citoplasma di circa l'11,5% rispetto alle cellule controllo che presentano un valore di circa l'1,5%. Tali risultati evidenziando pertanto la capacità degli US di esercitare una perturbazione nel microambiente in grado di promuovere la traslocazione di NF- κ B.

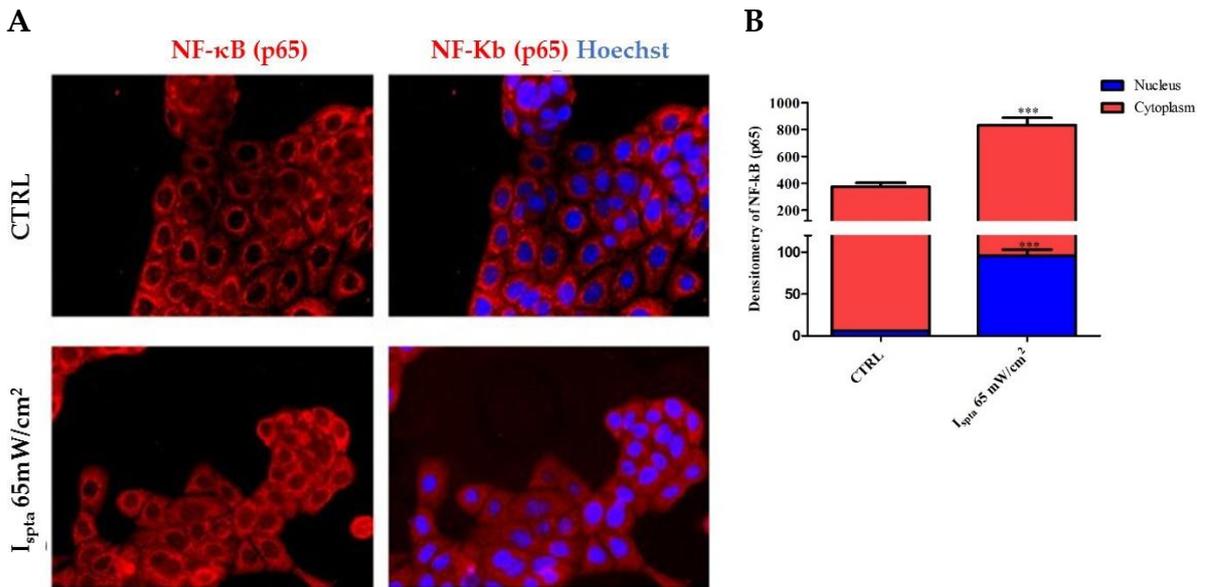


Figura 17. Analisi in immunofluorescenza delle cellule HaCaT non trattate (CTRL) e sonicate per 1 h alla frequenza di 1 MHz e $I_{spta} = 65 \text{ mW/cm}^2$ (A). Le cellule sono state colorate con NF- κ B (p65) (rosso) e Hoechst 33342 (blu) per la colorazione del nucleo. L'intensità della fluorescenza è stata analizzata con il software Image J: la densitometria è stata misurata selezionando casualmente 10 sezioni dalle singole cellule e nuclei e le medie e le relative SD rappresentate graficamente (B). Le barre di errore rappresentano la SD dalla media; gli asterischi indicano la significatività dei trattati rispetto al controllo (***) $p < 0.001$). Il grafico è rappresentativo di tre esperimenti indipendenti tra loro.

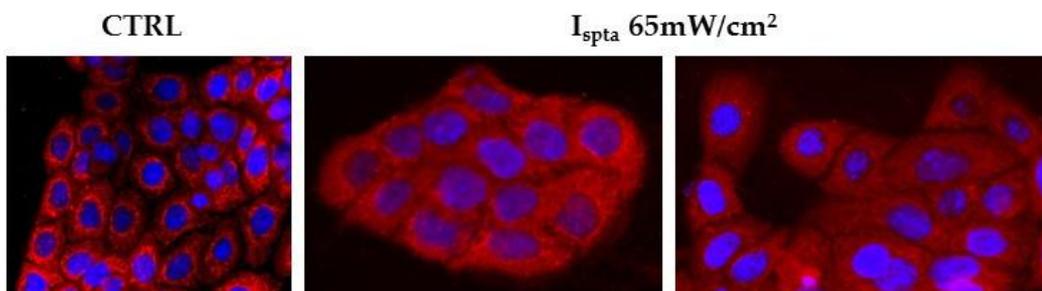


Figura 18. Immagine ingrandita delle cellule HaCaT analizzate in immunofluorescenza e sonicate per 60' alla frequenza di 1 MHz e $I_{spta}=65\text{mW/cm}^2$ dove risulta evidente la traslocazione nucleare di NF- κ B rispetto alle cellule CTRL, in cui la localizzazione è prevalentemente citoplasmatica.

4.4 Effetto degli ultrasuoni sulla proliferazione e vitalità cellulare

Sulla base dei risultati ottenuti in un precedente lavoro⁵⁹, è stato studiato l'effetto degli US, sulla proliferazione cellulare. Tramite MTT test è stata evidenziata una diminuzione della vitalità cellulare in funzione dei valori di I_{spta} dopo irraggiamento di 1 h nelle cellule HaCaT. In Fig. 19 è infatti possibile osservare una diminuzione statisticamente significativa della proliferazione cellulare al valore di $I_{spta} = 65 \text{ mW/cm}^2$, non evidenziabile a valori di intensità minori.

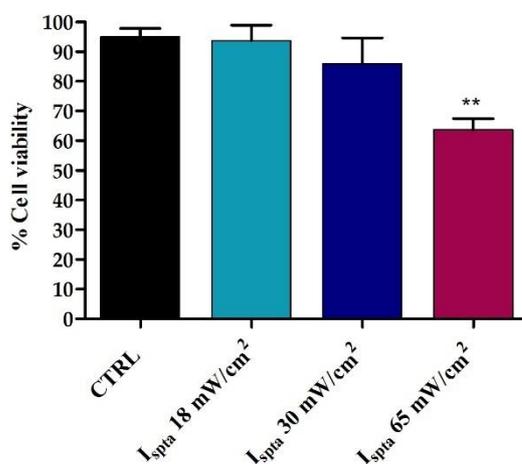


Figura 19. Analisi della proliferazione cellulare mediante MTT test sulle cellule HaCaT irraggiate con US alla frequenza di 1 MHz, $I_{spta} = 18, 30$ e 65 mW/cm^2 . Le barre di errore indicano SD dalla media; gli asterischi indicano la differenza significativa dai controlli (** $p < 0.01$). Il grafico rappresenta la media di almeno tre esperimenti condotti indipendentemente.

Si è voluto così meglio investigare tramite citofluorimetria a flusso, gli effetti degli US, al variare del tempo e dell'intensità, sul ciclo cellulare.

Dapprima, dall'analisi del picco ipodiploide Sub-G1 (Fig. 20) è possibile osservare un leggero aumento della percentuale delle cellule apoptotiche a partire da valori di $I_{spta} = 30 \text{ mW/cm}^2$ dopo 30' di irraggiamento. Tale incremento risulta aumentare leggermente in funzione del tempo e dell'intensità di esposizione accompagnato da una leggera variazione nella distribuzione della popolazione cellulare nelle varie fasi del ciclo in funzione dei parametri di esposizione.

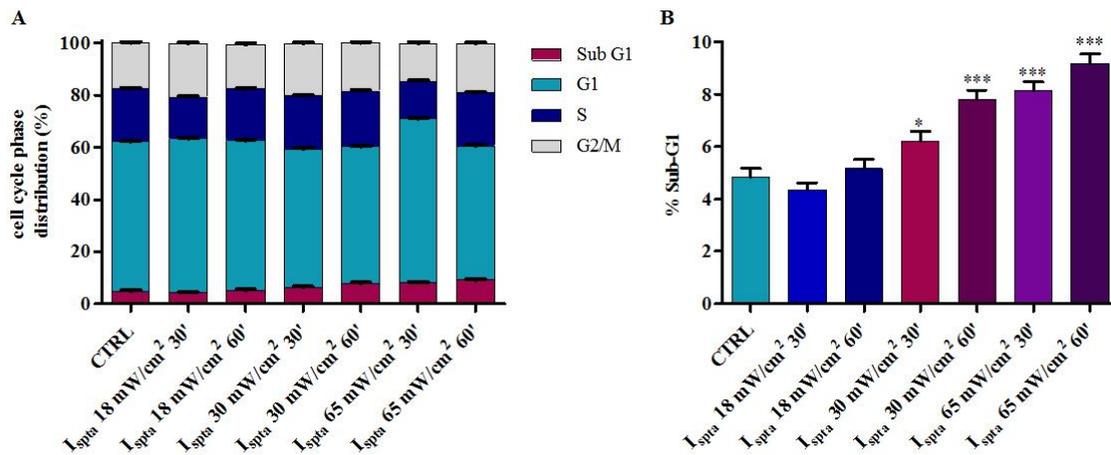


Figura 20. Analisi del ciclo cellulare sulle HaCaT sonicate alla frequenza di 1 MHz per 30 e 60', a differenti valori di I_{spta} . (A). Grafico della % della fase Sub-G1 analizzata in ciascun campione (B). Le barre di errore rappresentano la SD dalla media; gli asterischi indicano la significatività dei trattati rispetto al controllo (* $p < 0.05$, *** $p < 0.001$). Il grafico è rappresentativo di tre esperimenti indipendenti tra loro.

In considerazione dei risultati ottenuti, attraverso Real-time PCR è stata valutata l'espressione di due membri della famiglia delle proteine BCL-2, noti come fattori di regolazione dell'apoptosi⁸¹, ossia BAX (Bcl-2-associated X protein) e BCL-2. La Fig. 21 mostra come ai valori più elevati di I_{spta} , nelle cellule irraggiate si rilevi un aumento del rapporto BAX/BCL-2 rispetto alle cellule controllo, confermando quanto evidenziato mediante MTT test e dall'analisi del picco Sub-G1. Pertanto, nelle condizioni di esposizione applicate, gli US mostrano la capacità di indurre un'attivazione del processo apoptotico nelle cellule sonicate per 60' in particolare ai valori di $I_{spta}=65$ mW/cm².

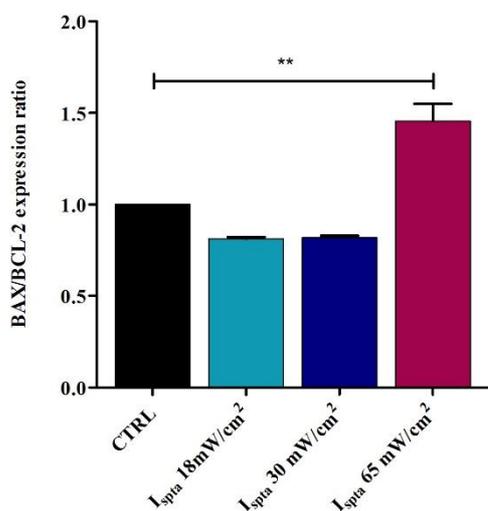


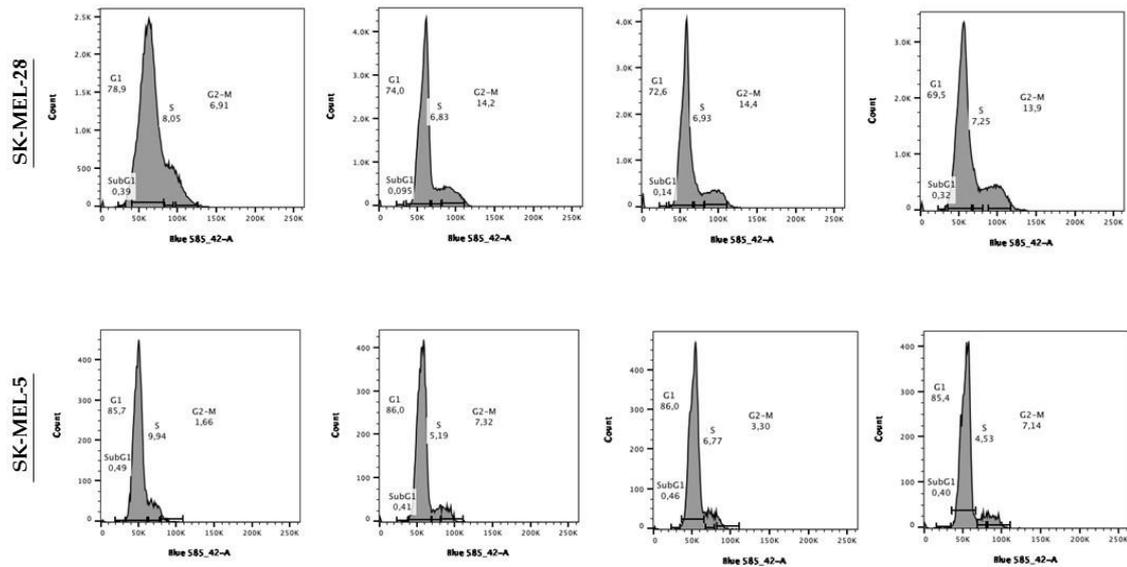
Figura 21. Analisi $\Delta\Delta CT$ in Real-time PCR dell'espressione genica di BAX/BCL-2 nelle cellule HaCaT trattate per 1 h con US a 1 MHz ai valori di $I_{spta}=18, 30$ e 65 mW/cm². Tale espressione è stata normalizzata al gene housekeeping GAPDH. Le barre di errore indicano la SD dalla media; gli asterischi indicano la differenza significativa dai controlli (** $p < 0.01$). Il grafico rappresenta la media di almeno tre esperimenti condotti indipendentemente.

4.5 Effetti degli ultrasuoni a bassa intensità sulle linee di melanoma umano SK-MEL-5 e SK-MEL-28

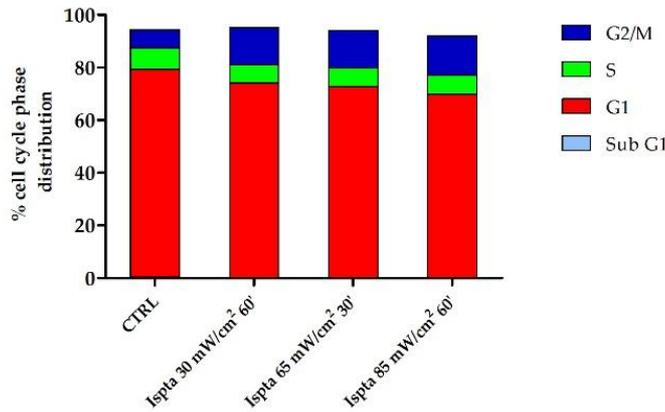
Analizzando quanto osservato sulla linea di cheratinociti umani HaCaT, si è andati ad investigare l'effetto degli US a bassa intensità, su due diverse linee cellulari di melanoma, le SK-MEL-5 e le SK-MEL-28, le quali presentano una diversa espressione di p53, wild type e mutata rispettivamente.

Attraverso citofluorimetria a flusso è stata eseguita l'analisi del ciclo cellulare. Le cellule sono state irraggiate a partire da valori di I_{spta} di 30 mW/cm² fino a 85 mW/cm² allo scopo di poter studiare ulteriormente la risposta cellulare all'aumentare dell'intensità di esposizione, ma ancora operando al di sotto della soglia cavitazionale.

Dalla Fig. 22 si evince come in entrambe le linee non vi sia un aumento della percentuale delle cellule in Sub-G1 diversamente da quanto osservabile nelle cellule HaCaT. Tuttavia, è possibile evidenziare in particolare sulle SK-MEL-5 un aumento delle cellule in G2/M. Tali risultati permettono di ipotizzare come gli US in tali condizioni espositive, possano indurre un arresto del ciclo cellulare, in accordo con quanto riportato in letteratura.



A



B

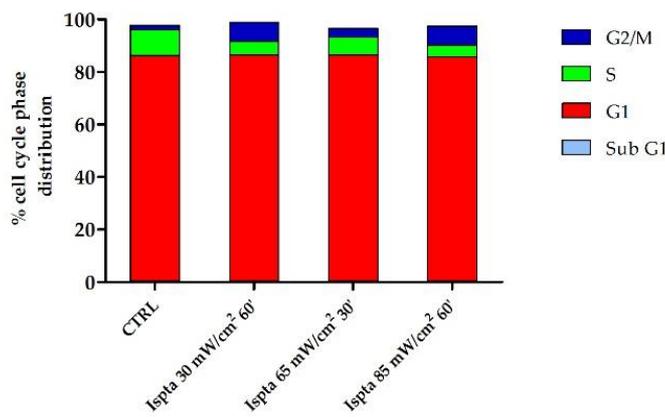


Figura 22. Analisi del ciclo cellulare sulle cellule SK-MEL-28 e SK-MEL-5. In alto si riporta l'analisi eseguita in citofluorimetria delle SK-MEL-28 e SK-MEL-5 analizzate dopo 60' di irraggiamento al variare dei valori di I_{spta} e al campo di frequenza di 1 MHz. La distribuzione cellulare nelle diverse fasi del ciclo è stata rappresentata graficamente tramite Graph Pad Prism 5.0. In entrambi le linee non si evidenzia un aumento del picco Sub-G1, ma un incremento della percentuale di cellule in G2/M. Tale incremento risulta maggiormente significativo sulle SK-MEL-5 (B) rispetto alle SK-MEL-28 (A).

A tali risultati, è stato affiancato un test di clonogenicità (Fig.23) che non mostra nelle cellule sonicate un calo del numero di cloni statisticamente significativo.

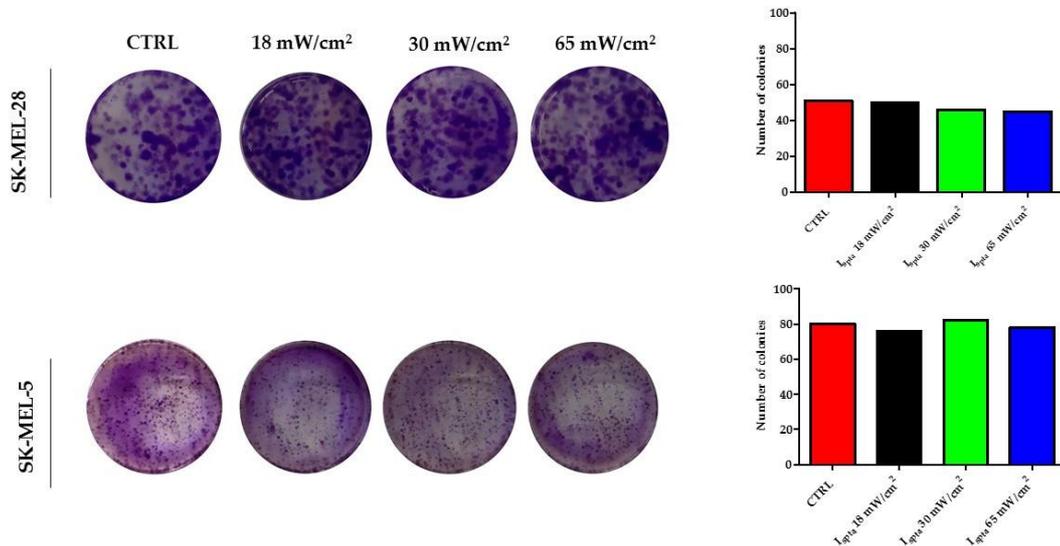


Figura 23. Test di clonogenicità sulle cellule SK-MEL-28 e SK-MEL-5. Le cellule sonicate per 60' alla frequenza di 1 MHz e al variare dei valori I_{spta} , dopo colorazione con Cristal Violetto non mostrano una variazione nel numero di cloni nelle cellule trattate rispetto alle cellule controllo, come evidenziabile anche dalla rappresentazione grafica eseguita con Graph Pad Prism 5.0.

Analogamente a quanto studiato sui cheratinociti, si è andati inoltre a valutare la capacità degli US di indurre anche in tali cellule un'alterazione nell'espressione genica di IL-6. Come evidenziato sulle cellule HaCaT, l'analisi in Real-Time PCR ha mostrato un'over espressione di tale citochina al variare dei valori di I_{spta} e della linea cellulare irraggiata. Dalla Fig. 24 si può infatti evincere come tale incremento sia evidenziabile esclusivamente sulle cellule SK-MEL-28 e non sulle SK-MEL-5 e in modo proporzionale all'aumentare dell' I_{spta} .

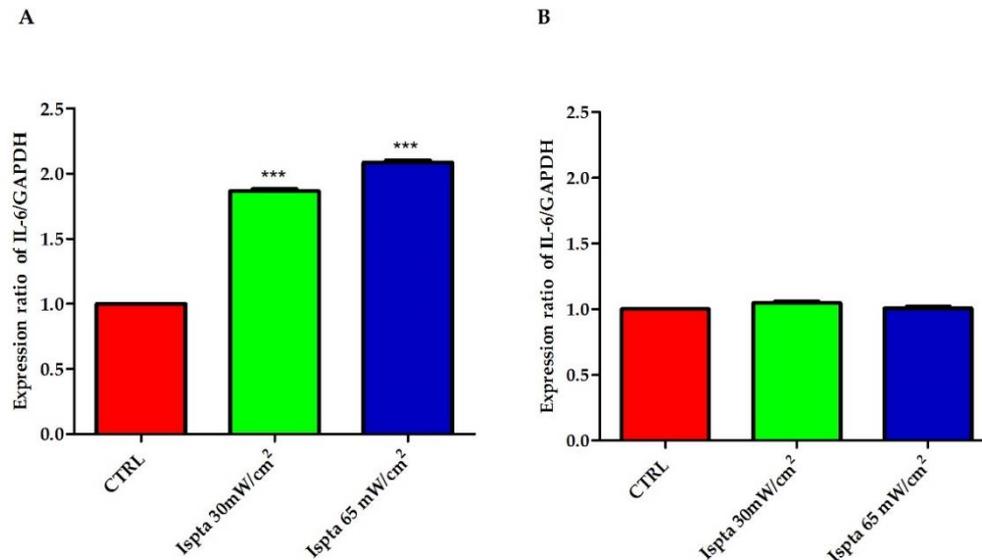


Figura 24. Analisi in Real-time PCR dell'espressione genica di IL-6 sulle SK-MEL-28 e SK-MEL-5. Si evidenzia nelle SK-MEL-28 (A) un aumento significativo di IL-6 ad entrambi i valori di I_{spta} analizzati. Diversamente le SK-MEL-5 (B) non mostrano variazioni nei livelli di mRNA nelle cellule trattate rispetto alle cellule controllo. Tale espressione è stata normalizzata al gene housekeeping GAPDH. Le barre di errore indicano SD dalla media; gli asterischi indicano la differenza significativa dai controlli (***) $p < 0.001$.

Tali risultati seppur preliminari, mostrano come gli US a bassa intensità al campo di frequenza di 1 MHz possano indurre diverse risposte biologiche non solo in funzione dei parametri espositivi ma anche della linea cellulare irraggiata. In particolare, la diversa espressione dell'oncosoppressore p53 potrebbe giustificare i diversi effetti biologici indotti sulle linee di melanoma, in particolare sul ciclo cellulare, dato il ruolo di p53 nel regolare la transizione G2/M⁸².

5. Discussione

Il vasto impiego degli US suggerisce la necessità di meglio comprendere gli effetti biologici correlati alla loro esposizione.

Particolare interesse è stato dato negli ultimi anni al fenomeno della sonoporazione, attraverso il quale l'energia meccanica associata agli US è in grado di indurre una temporanea alterazione della permeabilità di membrana, ragione per la quale trova attualmente applicazione nelle nuove strategie di drug e gene delivery.

Come noto la pelle è esposta a diversi stimoli, tra cui gli US, e i cheratinociti, i principali costituenti della pelle direttamente interagiscono con stimoli biochimici e biofisici e sono in grado di produrre diverse citochine le quali come è noto presentano un'azione regolatoria sulle cellule del sistema immunitario.

Nell'ambito di tale scenario la ricerca oggetto della tesi è stata dapprima focalizzata sulla linea cellulare HaCaT, ossia cellule spontaneamente immortalizzate che presentano somiglianze con i cheratinociti basali primari e che allo stesso tempo garantiscono un alto grado di riproducibilità⁸⁰.

Si è andati così a studiare gli effetti biologici indotti dall'esposizione ad US a bassa intensità (regime sub-cavitazionale) e alla frequenza di 1 MHz, condizioni largamente utilizzate in campo biologico e terapeutico.

Nelle condizioni di esposizione analizzate, le cellule HaCaT hanno mostrato un'aumentata produzione e secrezione nel terreno di coltura della citochina IL-6. Tale incremento a livello proteico è risultato essere correlato con l'aumento dei valori di mRNA analizzati in Real-time PCR, evidenziando un'up-regulation di IL-6.

A fronte di tali dati, è stato studiato l'effetto degli US sull'attivazione del fattore di trascrizione nucleare NF- κ B. Sono riportati tra gli stimoli in grado di promuoverne l'attivazione anche gli stessi US⁴⁷. A ciò si aggiunge il ruolo chiave di NF- κ B nella trascrizione genica di IL-6⁷⁴.

È stata così eseguita una immunodetection della localizzazione cellulare di NF- κ B nelle HaCaT sonicate per 60' a valori di $I_{spta}=65$ mW/cm², la quale ha rilevato la sua forma attiva esclusivamente nel nucleo delle cellule trattate. Questi risultati permettono di suggerire come lo stress meccanico indotto dagli US, nelle nostre condizioni sperimentali, potrebbe promuovere l'aumento della secrezione di IL-6 attraverso la via di segnale NF- κ B.

È infatti noto come gli US a bassa intensità esercitino una pressione meccanica sulla materia, probabilmente in modo simile al carico meccanico diretto e allo sforzo di taglio nei fluidi come già riportato in precedenza. Tenendo conto di ciò, è possibile dedurre che nei cheratinociti esposti agli US, lo stress meccanico da essi generato potrebbe provocare una sorte di alterazione nell'organizzazione integrina-actina, in modo simile a quanto riportato in altri studi, e determinare una deformazione e danni transienti delle strutture cellulari, così come il nucleo, attivando diverse vie di segnale tra cui quella di NF- κ B.

Successivamente è stata valutato l'effetto degli US sulla proliferazione e vitalità cellulare. L'aumentata espressione genica di BAX rispetto BCL-2 associata con un incremento della popolazione cellulare in Sub-G1, suggerisce come una piccola percentuale di cellule vada incontro a morte apoptotica.

Dall'analisi microscopica della membrana cellulare delle cellule HaCaT è stata evidenziata un'apparente perdita del piano focale dopo irraggiamento, spiegabile con un distacco parziale delle cellule durante il trattamento con gli US, più evidente all'aumentare del tempo e dell'intensità di esposizione.

Alcuni studi riportano una diminuzione nelle dimensioni cellulari in seguito all'esposizione con US a bassa intensità⁴³. Pertanto, è ipotizzabile come la riduzione delle dimensioni cellulari con l'alterazione dell'interazione integrina-actina, contribuiscono a indurre il distacco delle cellule causando il fenomeno dell'apoptosi noto come anoikis.

In ragione tale risultati, abbiamo voluto studiare le diverse risposte biologiche indotte dagli US non solo tenendo conto dei parametri espositivi ma anche della

diversa linea cellulare trattata. A tale scopo sono state irraggiate due diverse linee di melanoma, le SK-MEL-5 e le SK-MEL-28. I risultati ottenuti hanno mostrato una over espressione della citochina IL-6 esclusivamente nella linea SK-MEL-28 affiancata da un'azione di blocco nella fase G2/M maggiormente evidente sulle SK-MEL-5, come mostrato dall'analisi del ciclo cellulare eseguita in citofluorimetria, senza un apparente aumento del picco Sub G1. I risultati ottenuti sulle due diverse linee di melanoma seppur preliminari mostrano una diversa risposta indotta dagli US a seconda del sistema cellulare studiato con attenzione in tal caso alla diversa espressione di p53, il quale potrebbe spiegare i diversi effetti sulle due linee di melanoma. Questi ultimi risultati, potrebbero aprire la strada per meglio approfondire, gli eventuali pathways attivati dal microstress meccanico indotto dall'esposizione acuta agli US, sulle linee cellulari che presentano mutazioni puntiformi di p53.

I dati raccolti nel complesso mostrano come gli US a bassa intensità siano in grado di indurre un'alterazione transiente della secrezione di IL-6 sottolineando la necessità di studiare ulteriormente come gli US anche ad esposizioni ripetute possano dare origine ad un microambiente che potrebbe favorire la progressione neoplastica.

Sarebbe, inoltre utile studiare la possibile attivazione della via di segnalazione JAK/STAT3. Come riportato STAT3 risulta costitutivamente attivato in diversi tipi di tumori, compreso il melanoma. In quest'ultimo gioca un ruolo importante nel promuovere la crescita tumorale e l'angiogenesi. Diversi studi riportano inoltre come STAT3 è in grado di favorire lo sviluppo di metastasi cerebrali, che si manifestano nel 60-80 % dei pazienti affetti da melanoma metastatico⁸³.

Infine potrebbe essere importante valutare gli effetti dell'alterazione dell'omeostasi di membrana nel facilitare l'entrata di vettori esogeni all'interno di strutture omo- ed etero-cellulari tridimensionali. Tali modelli sono in grado infatti di rappresentare quasi perfettamente il comportamento e l'organizzazione (morfologia e fisiologia) delle cellule in vivo.

I dati ottenuti e presentati in tale progetto di ricerca mostrano pertanto l'importanza di dedicare ulteriori sforzi nello studiare e comprendere ulteriormente le diverse risposte biologiche indotte dagli US in funzione dei parametri espositivi, nonché riconsiderare il bisogno di individuare indicatori del rischio biologico associato alla loro esposizione a livello cellulare.

6. Bibliografia

1. de Lucas, B., Pérez, L. M., Bernal, A. & Gálvez, B. G. Ultrasound therapy: Experiences and perspectives for regenerative medicine. *Genes (Basel)*. **11**, 1–21 (2020).
2. Yu, J., Chen, Z. & Yan, F. Advances in mechanism studies on ultrasonic gene delivery at cellular level. *Prog. Biophys. Mol. Biol.* **142**, 1–9 (2019).
3. Cai, X. *et al.* Ultrasound-responsive materials for drug/gene delivery. *Frontiers in Pharmacology* (2020).
4. Tian, Y. *et al.* New aspects of ultrasound-mediated targeted delivery and therapy for cancer. *Int. J. Nanomedicine* **15**, 401–418 (2020).
5. O'Brien, W. D. Ultrasound-biophysics mechanisms. *Prog. Biophys. Mol. Biol.* **93**, 212–255 (2007).
6. Ahmadi, F., McLoughlin, I. V., Chauhan, S. & Ter-Haar, G. Bio-effects and safety of low-intensity, low-frequency ultrasonic exposure. *Prog. Biophys. Mol. Biol.* **108**, 119–138 (2012).
7. Zeng, C. *et al.* Effectiveness of continuous and pulsed ultrasound for the management of knee osteoarthritis: A systematic review and network meta-analysis. *Osteoarthr. Cartil.* (2014).
8. Elhelf, I. A. S. *et al.* High intensity focused ultrasound: The fundamentals, clinical applications and research trends. *Diagnostic and Interventional Imaging* (2018).
9. Liu, D. D., Ullah, M., Concepcion, W., Dahl, J. J. & Thakor, A. S. The role of ultrasound in enhancing mesenchymal stromal cell-based therapies. *Stem Cells Translational Medicine* (2020).
10. Izadifar, Z., Babyn, P. & Chapman, D. Mechanical and Biological Effects of Ultrasound: A Review of Present Knowledge. *Ultrasound Med. Biol.* **43**, 1085–1104 (2017).
11. Park, D., Park, H., Seo, J. & Lee, S. Sonophoresis in transdermal drug delivery. *Ultrasonics* (2014).
12. Dalecki, D. Mechanical Bioeffects of Ultrasound. *Annu. Rev. Biomed. Eng.* **6**, 229–248 (2004).
13. O'Brien, W. D. Ultrasound-biophysics mechanisms. *Progress in Biophysics and Molecular Biology* **93**, 212–255 (2007).
14. Krasovitski, B., Frenkel, V., Shoham, S. & Kimmel, E. Intramembrane cavitation as a unifying mechanism for ultrasound-induced bioeffects. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* (2011).
15. Domenici, F. *et al.* Structural and permeability sensitivity of cells to low intensity ultrasound: Infrared and fluorescence evidence in vitro. *Ultrasonics* **54**, 1020–1028 (2014).
16. Udrioiu, I. *et al.* Potential genotoxic effects of low-intensity ultrasound on fibroblasts, evaluated with the cytokinesis-block micronucleus assay. *Mutat. Res. - Genet. Toxicol. Environ. Mutagen.* (2014).

17. Miller, D. L. *et al.* Overview of therapeutic ultrasound applications and safety considerations. *J. Ultrasound Med.* **31**, 623–634 (2012).
18. Nelson, T. R., Fowlkes, J. B., Abramowicz, J. S. & Church, C. C. Ultrasound biosafety considerations for the practicing sonographer and sonologist. *Journal of Ultrasound in Medicine* (2009).
19. Coiado, O. C., Lowe, J. & O'Brien, W. D. Therapeutic Ultrasound in Cardiovascular Medicine. *J. Ultrasound Med.* 1–16 (2020).
20. Tang, J., Guha, C. & Tomé, W. A. Biological Effects Induced by Non-thermal Ultrasound and Implications for Cancer Therapy: A Review of the Current Literature. *Technol. Cancer Res. Treat.* **14**, 221–235 (2015).
21. van den Bijgaart, R. J. E. *et al.* Thermal and mechanical high-intensity focused ultrasound: perspectives on tumor ablation, immune effects and combination strategies. *Cancer Immunology, Immunotherapy* (2017).
22. FERIL, Jr., L. B. & KONDO, T. Biological Effects of Low Intensity Ultrasound: The Mechanism Involved, and its Implications on Therapy and on Biosafety of Ultrasound. *J. Radiat. Res.* **45**, 479–489 (2004).
23. Sequeiros, R. B., Joronen, K., Komar, G. & Koskinen, S. K. High intensity focused ultrasound (HIFU) in tumor therapy. *Duodecim.* **133**, 143–149 (2017).
24. Afadzi, M. *et al.* Effect of Acoustic Radiation Force on the Distribution of Nanoparticles in Solid Tumors. *IEEE Trans. Ultrason. Ferroelectr. Freq. Control* **3010**, 1–1 (2020).
25. Prieto, M. L., Oralkan, Ö., Khuri-Yakub, B. T. & Maduke, M. C. Dynamic Response of Model Lipid Membranes to Ultrasonic Radiation Force. *PLoS One* (2013).
26. Peruzzi, G., Sinibaldi, G., Silvani, G., Ruocco, G. & Casciola, C. M. Perspectives on cavitation enhanced endothelial layer permeability. *Colloids Surfaces B Biointerfaces* **168**, 83–93 (2018).
27. Feng, Y., Tian, Z. & Wan, M. Bioeffects of Low-Intensity Ultrasound In Vitro. *J. Ultrasound Med.* (2010).
28. Lentacker, I., De Cock, I., Deckers, R., De Smedt, S. C. & Moonen, C. T. W. Understanding ultrasound induced sonoporation: Definitions and underlying mechanisms. *Advanced Drug Delivery Reviews* (2014).
29. Seah, B. C. Q. & Teo, B. M. Recent advances in ultrasound-based transdermal drug delivery. *Int. J. Nanomedicine* **13**, 7749–7763 (2018).
30. Deng, C. X., Sieling, F., Pan, H. & Cui, J. Ultrasound-induced cell membrane porosity. *Ultrasound Med. Biol.* **30**, 519–526 (2004).
31. Tachibana, K., Uchida, T., Ogawa, K., Yamashita, N. & Tamura, K. Induction of cell-membrane porosity by ultrasound. *Lancet* (1999).
32. Escoffre, J. M., Kaddur, K., Rols, M. P. & Bouakaz, A. In Vitro Gene Transfer by Electrosonoporation. *Ultrasound Med. Biol.* **36**, 1746–1755 (2010).
33. Wang, M. *et al.* Sonoporation-induced cell membrane permeabilization and cytoskeleton disassembly at varied acoustic and microbubble-cell parameters. *Sci. Rep.* (2018).

34. Meijering, B. D. M. *et al.* Ultrasound and microbubble-targeted delivery of macromolecules is regulated by induction of endocytosis and pore formation. *Circ. Res.* (2009).
35. Moumaris, M., Rajoelya, B. & Abuafa, N. Fluorescein Isothiocyanate-Dextran can Track Apoptosis and Necrosis Induced by Heat Shock of Peripheral Blood Mononuclear Cells and HeLa Cells. *Open Biol. Sci. J.* (2015).
36. Domenici, F. *et al.* Differential effects on membrane permeability and viability of human keratinocyte cells undergoing very low intensity megasonic fields. *Sci. Rep.* **7**, 1–10 (2017).
37. Zeghimi, A., Escoffre, J. M. & Bouakaz, A. Role of endocytosis in sonoporation-mediated membrane permeabilization and uptake of small molecules: A electron microscopy study. *Phys. Biol.* (2015).
38. Verstraeten, S. V., Mackenzie, G. G. & Oteiza, P. I. The plasma membrane plays a central role in cells response to mechanical stress. *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.* (2010).
39. Schwarz, U. S. & Gardel, M. L. United we stand - Integrating the actin cytoskeleton and cell-matrix adhesions in cellular mechanotransduction. *Journal of Cell Science* (2012).
40. Di Giacinto, F., De Spirito, M. & Maulucci, G. Low-Intensity Ultrasound Induces Thermodynamic Phase Separation of Cell Membranes through a Nucleation–Condensation Process. *Ultrasound Med. Biol.* **45**, 1143–1150 (2019).
41. Perry, M. J. *et al.* Ultrasound mimics the effect of mechanical loading on bone formation in vivo on rat ulnae. *Med. Eng. Phys.* (2009).
42. McCormick, S. M., Saini, V., Yazicioglu, Y., Demou, Z. N. & Royston, T. J. Interdependence of pulsed ultrasound and shear stress effects on cell morphology and gene expression. *Ann. Biomed. Eng.* (2006).
43. Hu, Y., Wan, J. M. F. & Yu, A. C. H. Cytomechanical Perturbations during Low-Intensity Ultrasound Pulsing. *Ultrasound Med. Biol.* (2014).
44. Mizrahi, N. *et al.* Low intensity ultrasound perturbs cytoskeleton dynamics. *Soft Matter* (2012).
45. Hauser, J., Hauser, M., Muhr, G. & Esenwein, S. Ultrasound-induced modifications of cytoskeletal components in osteoblast-like SAOS-2 cells. *J. Orthop. Res.* (2009).
46. Milowska, K., Gabryelak, T., Lypacewicz, G., Tymkiewicz, R. & Nowicki, A. Effect of ultrasound on nucleated erythrocytes. *Ultrasound Med. Biol.* (2005).
47. Hou, C. H., Lin, J., Huang, S. C., Hou, S. M. & Tang, C. H. Ultrasound stimulates NF- κ B activation and iNOS expression via the Ras/Raf/MEK/ERK signaling pathway in cultured preosteoblasts. *J. Cell. Physiol.* **220**, 196–203 (2009).
48. Chubinskiy-Nadezhdin, V. I., Efremova, T. N., Negulyaev, Y. A. & Morachevskaya, E. A. Coupled activation of mechanosensitive and calcium-dependent potassium channels in 3T3 and 3T3-SV40 cells. *Tsitologiya* (2018).

49. Udrouiu, I. *et al.* In vitro effects of 1-MHz ultrasound on the mitotic spindle. *Environ. Mol. Mutagen.* (2019).
50. Lee, S. K. *et al.* Mechanical Stress Activates Proinflammatory Cytokines and Antioxidant Defense Enzymes in Human Dental Pulp Cells. *J. Endod.* (2008).
51. Tanaka, N. *et al.* Cyclic mechanical strain regulates the PTHrP expression in cultured chondrocytes via activation of the Ca²⁺ channel. *J. Dent. Res.* (2005).
52. Haga, J. H., Li, Y. S. J. & Chien, S. Molecular basis of the effects of mechanical stretch on vascular smooth muscle cells. *Journal of Biomechanics* (2007).
53. Oh, S. *et al.* Effect of Mechanical Stretch on the DNCB-induced Proinflammatory Cytokine Secretion in Human Keratinocytes. *Sci. Rep.* (2019).
54. Zampetaki, A., Zhang, Z., Hu, Y. & Xu, Q. Biomechanical stress induces IL-6 expression in smooth muscle cells via Ras/Rac1-p38 MAPK-NF- κ B signaling pathways. *Am. J. Physiol. - Hear. Circ. Physiol.* (2005).
55. Diakos, C. I., Charles, K. A., McMillan, D. C. & Clarke, S. J. Cancer-related inflammation and treatment effectiveness. *The Lancet Oncology* (2014).
56. Kumari, N., Dwarakanath, B. S., Das, A. & Bhatt, A. N. Role of interleukin-6 in cancer progression and therapeutic resistance. *Tumor Biol.* **37**, 11553–11572 (2016).
57. Sethi, G., Shanmugam, M. K., Ramachandran, L., Kumar, A. P. & Tergaonkar, V. Multifaceted link between cancer and inflammation. *Biosci. Rep.* **32**, 1–15 (2012).
58. Piotrowski, I., Kulcenty, K. & Suchorska, W. Interplay between inflammation and cancer. *Reports Pract. Oncol. Radiother.* **25**, 422–427 (2020).
59. Balkwill, F. & Mantovani, A. Cancer and inflammation: Implications for pharmacology and therapeutics. *Clinical Pharmacology and Therapeutics* (2010).
60. Grivennikov, S. I. & Karin, M. Inflammatory cytokines in cancer: Tumour necrosis factor and interleukin 6 take the stage. in *Annals of the Rheumatic Diseases* (2011).
61. Crusz, S. M. & Balkwill, F. R. Inflammation and cancer: Advances and new agents. *Nat. Rev. Clin. Oncol.* **12**, 584–596 (2015).
62. Kamimura, D., Hirano, T. & Murakami, M. Interleukin-6. *Curated Ref. Collect. Neurosci. Biobehav. Psychol.* 430–439 (2016).
63. Hunter, C. A. & Jones, S. A. IL-6 as a keystone cytokine in health and disease. *Nature Immunology* (2015).
64. Unver, N. & McAllister, F. IL-6 family cytokines: Key inflammatory mediators as biomarkers and potential therapeutic targets. *Cytokine Growth Factor Rev.* **41**, 10–17 (2018).
65. Grivennikov, S. I. & Karin, M. Dangerous liaisons: STAT3 and NF- κ B collaboration and crosstalk in cancer. *Cytokine Growth Factor Rev.* (2010).
66. Johnson, D. E., O'Keefe, R. A. & Grandis, J. R. Targeting the IL-6/JAK/STAT3

- signalling axis in cancer. *Nature Reviews Clinical Oncology* (2018).
67. Wu, P. *et al.* Prognostic role of STAT3 in solid tumors: A systematic review and meta-analysis. *Oncotarget* (2016).
 68. Choy, E. H. *et al.* Translating IL-6 biology into effective treatments. *Nat. Rev. Rheumatol.* **16**, 335–345 (2020).
 69. Ogata, A., Kato, Y., Higa, S. & Yoshizaki, K. IL-6 inhibitor for the treatment of rheumatoid arthritis: A comprehensive review. *Modern Rheumatology* (2019).
 70. Zhang, Z. L., Hou, Y. L., Li, D. T. & Li, F. Z. Laboratory findings of COVID-19: a systematic review and meta-analysis. *Scandinavian Journal of Clinical and Laboratory Investigation* (2020).
 71. Grifoni, E. *et al.* Interleukin-6 as prognosticator in patients with COVID-19. *Journal of Infection* (2020).
 72. Wang, C., Fei, D., Li, X., Zhao, M. & Yu, K. IL-6 may be a good biomarker for earlier detection of COVID-19 progression. *Intensive Care Medicine* (2020).
 73. Salvarani, C. *et al.* Effect of Tocilizumab vs Standard Care on Clinical Worsening in Patients Hospitalized with COVID-19 Pneumonia: A Randomized Clinical Trial. *JAMA Intern. Med.* (2020).
 74. Liu, T., Zhang, L., Joo, D. & Sun, S. C. NF- κ B signaling in inflammation. *Signal Transduct. Target. Ther.* **2**, (2017).
 75. Mussbacher, M. *et al.* Cell Type-Specific Roles of NF- κ B Linking Inflammation and Thrombosis . *Frontiers in Immunology* **10**, 85 (2019).
 76. Pasparakis, M. Regulation of tissue homeostasis by NF-B signalling: Implications for inflammatory diseases. *Nature Reviews Immunology* (2009).
 77. Taniguchi, K. & Karin, M. NF-B, inflammation, immunity and cancer: Coming of age. *Nature Reviews Immunology* (2018).
 78. Liu, T., Zhang, L., Joo, D. & Sun, S. C. NF- κ B signaling in inflammation. *Signal Transduction and Targeted Therapy* **2**, (2017).
 79. Pires, B. R. B. *et al.* NF-kappaB is involved in the regulation of EMT genes in breast cancer cells. *PLoS One* (2017).
 80. Colombo, I. *et al.* HaCaT Cells as a Reliable in Vitro Differentiation Model to Dissect the Inflammatory/Repair Response of Human Keratinocytes. *Mediators Inflamm.* **2017**, (2017).
 81. Peña-Blanco, A. & García-Sáez, A. J. Bax, Bak and beyond – mitochondrial performance in apoptosis. *FEBS Journal* (2018).
 82. Taylor, W. R. *et al.* Mechanisms of G2 arrest in response to overexpression of p53. *Mol. Biol. Cell* (1999).
 83. Lesinski, G.B. The potential for targeting the STAT3 pathway as a novel therapy for melanoma. *Future Oncol.* **9**, 925–927 (2013).

Lista pubblicazioni

- Sciarra, A., Maggi, M., Salsiccia, S., Nicolai, A., Tortorella, E., **Giantulli, S.** *et al.* Tissue Expression of Androgen Receptor Splice Variant 7 at Radical Prostatectomy Predicts Risk of Progression in Untreated Nonmetastatic Prostate Cancer. *Oncology* (2021).
- **Giantulli, S.**, Tortorella, E., Brasili, F., *et al.* Effect of low intensity megasonic fields in the proinflammatory cytokine secretion in human keratinocytes. Submitted to *Sci Rep.* 2020 july.
- Fasolato, C., **Giantulli, S.**, Capocéfalo, A., *et al.* Antifolate SERS-active nanovectors: quantitative drug nanostructuring and selective cell targeting for effective theranostics. *Nanoscale*. **32**, (2019).
- Silvestri, I., Tortorella, E., **Giantulli, S.**, *et al.* Immunotherapy in Prostate Cancer: Recent Advances and Future Directions. *EMJ* **1**, (2019).
- Chronopoulou, L., Domenici, F., **Giantulli, S.**, *et al.* PLGA based particles as "drug reservoir" for antitumor drug delivery: characterization and cytotoxicity studies. *Colloids Surf B Biointerfaces*, **180** (2019).
- **Giantulli, S.**, De Iuliis, F., Carradori, S., *et al.* Growth arrest and apoptosis induced by K858 and its 1,3,4-thiadiazoline analogue on tumor cells. *Anticancer drugs* **7**,(2018).

Poster:

1. In vitro biological effects induced by ultrasounds-cell interaction.
S. Giantulli, F. Brasili, E. Tortorella, D. Palmieri, A. Bedini, G. Paradossi, S. Morrone, F. Domenici, I.Silvestri. 2019
2. In vitro analysis of the mechanical and biological effects induced by the ultrasound-cell interaction. F.Brasili, **S. Giantulli**, E. Tortorella D. Palmieri, A. Bedini, G. Paradossi, S. Morrone, F. Domenici, I.Silvestri.2019

Abstract:

1. SERS-active antifolate nanovectors: spectroscopy and theranostics at single cell level.
C. Fasolato, A. Capocéfalo, **S. Giantulli**, F. Ripanti, F. Domenici, P. Postorino. 2020
2. Innovative nanofabrication methodologies for the preparation of drug delivery system.
L. Chronopoulou, A. Di Nitto, A. Amalfitano, I. Silvestri, **S. Giantulli**, F. Brasili, C. Palocci. 2018

