



UNIVERSITÀ
DEGLI STUDI
FIRENZE

DOTTORATO DI RICERCA IN SCIENZE CLINICHE
Indirizzo in Medicina Clinica e Sperimentale

CICLO XXVIII

COORDINATORE Prof. Francesco Annunziato

“Sviluppo di vettori cellulari come agenti di contrasto
per l'*imaging* biomedico”

Settore Scientifico Disciplinare MED/36

Dottorando

Dott.ssa Borri Claudia

Tutore

Prof. Colagrande Stefano

Coordinatore

Prof. Annunziato Francesco

Anni 2012/2015

INDICE

| | |
|--|-----------|
| 1. INTRODUZIONE | 3 |
| 1.1 Cenni storici sull'impiego di nanoparticelle d'oro | 3 |
| 1.2 Proprietà ottiche delle nanoparticelle d'oro | 4 |
| 1.3 Applicazioni biomediche | 7 |
| 1.4 Strategie di <i>targeting</i> tumorale con l'impiego di GNRs | 10 |
| 1.5 Ruolo dei macrofagi nell'immunità innata | 12 |
| 1.6 La polarizzazione dei macrofagi | 14 |
| 1.7 Le principali citochine infiammatorie prodotte dai macrofagi | 16 |
| 1.7.1 Interleuchina-1 | 17 |
| 1.7.2 Fattore di necrosi tumorale- α | 18 |
| 1.7.3 Interleuchina-6 | 20 |
| 1.8 Le chemochine | 21 |
| 1.9 <i>Imaging</i> fotoacustico | 23 |
| 1.10 Tomografia computerizzata | 24 |
| 1.11 Brachiterapia | 26 |
| 2. SCOPO DELLA TESI | 28 |
| 3. MATERIALI E METODI | 29 |
| 3.1 Reagenti | 29 |
| 3.2 Coltura cellulare di macrofagi murini | 29 |
| 3.3 Sintesi di nanocilindri d'oro | 30 |
| 3.4 Microscopia elettronica a trasmissione | 32 |
| 3.5 Determinazione quantitativa dell' <i>uptake</i> intracellulare | 33 |
| 3.6 Test di citotossicità | 34 |

| | | |
|------|--|----|
| 3.7 | Proliferaazione cellulare | 34 |
| 3.8 | Test di chemiotassi | 35 |
| 3.9 | Saggio immunoenzimatico ELISA | 36 |
| 3.10 | Analisi fotoacustica | 37 |
| 3.11 | Analisi del contrasto mediante tomografia computerizzata | 38 |
| 3.12 | Brachiterapia con ¹⁹² Iridio | 38 |
| 3.13 | Analisi statistica | 39 |
| 4 | RISULTATI | 40 |
| 4.1 | Valutazione qualitativa dell'internalizzazione di GNRs | 40 |
| 4.2 | Valutazione quantitativa dell' <i>uptake</i> intracellulare | 41 |
| 4.3 | Effetto dei GNRs sulla vitalità cellulare | 42 |
| 4.4 | Effetto dei GNRs sulla proliferazione cellulare | 43 |
| 4.5 | Effetto dei GNRs sulla migrazione cellulare | 43 |
| 4.6 | Effetto dei GNRs sul rilascio di citochine pro-infiammatorie | 44 |
| 4.7 | Analisi fotoacustica in presenza di GNRs | 44 |
| 4.8 | Valutazione del contrasto da parte di GNRs mediante TC | 46 |
| 4.9 | Valutazione del trattamento combinato di raggi γ e GNRs | 47 |
| 5 | DISCUSSIONE | 48 |
| 6 | BIBLIOGRAFIA | 55 |
| 7 | FIGURE | 67 |

1. INTRODUZIONE

1.1 Cenni storici sull'impiego di nanoparticelle d'oro.

Nell'ultimo decennio, i nanomateriali metallici hanno ricevuto notevole attenzione per le loro potenziali applicazioni in biologia e in medicina.

In particolare, i materiali nanostrutturati a base di oro hanno suscitato un rilevante interesse per la loro facilità di sintesi, tollerabilità, inerzia e scarsa reattività con l'organismo (Alkilany A.M. et al., 2010).

Secondo la definizione standard di ASTM (*American Society for Testing and Materials*), le nanoparticelle sono particelle di materiali inorganici bi- o tridimensionali con dimensioni di 1-100 nanometri.

Le nanoparticelle sono spesso disperse in una soluzione colloidale. Un colloide è una sostanza di dimensioni microscopiche che si trova in uno stato finemente disperso, intermedio tra la soluzione omogenea e la dispersione eterogenea.

L'utilizzo dell'oro colloidale risale al IV secolo d.C. e la coppa di Licurgo rappresenta uno degli esempi più noti di manufatti di epoca romana in cui sono state trovate nanoparticelle d'oro (GNPs) e d'argento di dimensioni comprese tra 5 e 60 nm. Le nanoparticelle conferiscono al vetro della coppa un comportamento dicroico, facendolo così apparire verde in riflessione e rosso in trasmissione (Figura 1).

In Italia, durante il XV e XVI secolo, gli artigiani utilizzavano nanoparticelle per decorare il vasellame, che presentava difatti una patina lucente iridescente color rosso-oro. Tale effetto era ottenuto mescolando sali di argento ed oro con aceto, ocre ed argilla e applicando la mistura al vasellame precedentemente smaltato con una vernice vetrosa. Dopo il riscaldamento in forno gli ioni metallici della mistura venivano ridotti a nanoparticelle metalliche di 5-100 nm di diametro. Si trattava di una tecnica messa a punto dai musulmani del Medio Oriente durante il IX secolo poi diffusasi in Spagna durante il medioevo ed infine arrivata in Italia.

In epoca moderna la sintesi dell'oro colloidale risale al lavoro pionieristico di Michael Faraday che introdusse un metodo di preparazione di dispersioni acquose stabili di nanoparticelle d'oro basato sulla riduzione di sali di oro (Faraday M., 1857).

Nel 1890 il batteriologo Robert Koch scoprì che composti a base di oro e cianuro esercitavano un'azione batteriostatica (Koch R., 1890).

Alla fine degli anni '20, l'oro colloidale è stato impiegato durante test clinici su metalli pesanti per il trattamento dell'artrite reumatoide (Forestier J., 1929).

1.2 Proprietà ottiche delle nanoparticelle d'oro.

Le nanoparticelle d'oro possiedono interessanti proprietà fisico-chimiche (Schmid G. et al., 1994; Pen S.G. et al., 2003) che dipendono non solo dalla loro composizione ma anche dalla loro dimensione e dalla loro forma (Kelly K.L. et al., 2003; Noguez C., 2007).

Possono essere eccitate nell'intervallo del vicino infrarosso (NIR, *near infrared*) all'interno della finestra di trasmissione ottica dei tessuti biologici ($\lambda = 650-1300$ nm). In questo intervallo di lunghezze d'onda molti cromofori endogeni (tra i quali emoglobina e melanina) assorbono la radiazione a differenza dell'acqua, la fluorescenza di fondo è minima e pertanto la luce può penetrare in profondità nei tessuti (Weissleder R., 2001) (Figura 2).

In particolare, l'attivazione delle nanoparticelle si basa sull'eccitazione di risonanze plasmoniche, ossia oscillazioni collettive di carica, a frequenze interne alla finestra NIR di principale interesse, mediando una varietà di processi quali un intenso assorbimento ottico, lo *scattering* di Rayleigh (Truong P.L. et al., 2014; Shi J. et al., 2015) e l'innalzamento del campo elettrico della radiazione ricevuta in prossimità della superficie delle nanoparticelle (*near-field enhancement*) (Harrison R.K. et al., 2010). Inoltre, la luce assorbita può essere riemessa sottoforma di fluorescenza (Mohamed M.B. et al., 2000).

A differenza dei fluorofori, le nanoparticelle sono dei cromofori esogeni ad elevata stabilità che non incorrono nel fenomeno di *photobleaching*, dovuto alla degradazione fotochimica del colorante.

Quando un metallo viene esposto ad una radiazione elettromagnetica, gli elettroni di valenza sostengono oscillazioni collettive, muovendosi in fase ad una frequenza propria, detta frequenza di plasma. Il moto oscillatorio degli elettroni che segue il modo sinusoidale del campo elettrico è definito modo plasmonico o plasmone. Quando la radiazione elettromagnetica incide sulle nanoparticelle induce un dipolo elettrico istantaneo, spostando gli elettroni di valenza lungo la direzione del campo. Come in un sistema massa-molla, lo sbilanciamento di carica genera a sua volta una forza di richiamo per gli elettroni, che dipende dalla densità di carica di superficie e perciò dalla dimensione e dalla forma della superficie stessa.

I moti collettivi delle cariche elettriche sono localizzati in prossimità della superficie del materiale e il fenomeno viene appunto definito come *Localized Surface Plasmon Resonance* (LSPR) (Eustis S. et al., 2006; Juve V. et al., 2013). Queste eccitazioni sono rese possibili quando la lunghezza d'onda della luce è molto più grande del diametro della particella e, se la radiazione elettromagnetica ha una frequenza risonante con queste oscillazioni, l'interazione tra radiazione e nanoparticella risulta estremamente intensa.

Le LSPR delle nanoparticelle d'oro possiedono una energia inferiore rispetto all'oro macroscopico e cadono generalmente nella regione del visibile e del NIR.

Le GNPs forniscono dunque una specifica colorazione alla matrice in cui sono immerse (Figura 3). All'aumentare delle dimensioni delle particelle, la frequenza di assorbimento diminuisce, spostandosi verso le lunghezze d'onda del rosso.

Ancora più sensibile è la dipendenza della frequenza di assorbimento dall'indice di rifrazione (costante dielettrica) del mezzo. Una costante di assorbimento maggiore induce una frequenza plasmonica, e quindi di assorbimento, più bassa, sempre più spostata verso il rosso.

Il potenziale biomedico di sospensioni colloidali di nanoparticelle d'oro dipende dalle loro interazioni dinamiche con la luce NIR e l'ambiente biologico. Queste interazioni possono essere controllate modulando le dimensioni, la forma e le caratteristiche superficiali delle nanoparticelle (Jain P.K. et al., 2006), permettendone così l'impiego come sensori molecolari ad altissima sensibilità (Chen S.J. et al., 2004;

Chen C.D. et al., 2007). È dunque possibile disegnare e sintetizzare nanoparticelle con proprietà predefinite.

La dimensione può influenzare parametri come l'assorbimento ottico delle particelle e lo *scattering* (Kelly K.L. et al., 2003), il loro caricamento cellulare (Jiang W. et al., 2008), la citotossicità (Pan Y. et al., 2007) e l'efficienza di conversione fototermica (Huang X. et al., 2008; Kessentini S. et al., 2012) e fotoacustica (Cavigli L. et al., 2014).

La loro forma, intesa come rapporto tra lunghezza e larghezza (*aspect ratio*), determina principalmente la stabilità e la posizione delle risonanze plasmoniche (Bauer L.A. et al., 2004; Pérez-Juste J. et al., 2005; DeBrosse M.C. et al., 2013) e quindi la loro risposta ottica (Figura 3).

Le nanoparticelle possono essere prodotte in molteplici forme: sfera (Oikawa K. et al., 2007; Mukhopadhyay A. et al., 2012), cilindro (Nikoobakht B. et al., 2003; Ratto F. et al., 2010), triangolo (Shankar S.S. et al., 2005), esagono (Kundu S. et al., 2004), cubo (Tokonami S. et al., 2012), stella (Aaron J. et al., 2008; Barbosa S. et al., 2010), conchiglia (Tuersun P. et al., 2013), gabbia (Au L. et al., 2010) e filo (Pei L. et al. 2004; Selvakannan P. et al., 2004) (Figura 4).

È possibile sintetizzare GNPs cave al loro interno, che presentano frequenze di assorbimento più basse delle corrispondenti nanoparticelle piene. Questo fenomeno è dovuto all'interazione tra l'oscillazione di carica sulla superficie interna e quella sulla superficie esterna della particella.

Una particella di forma allungata, come per esempio un nanocilindro d'oro (GNR, *gold nanorod*), invece, avrà due modi principali di oscillazione, uno longitudinale all'asse, con una frequenza più bassa, e uno trasversale, con una frequenza più alta.

Per motivi analoghi, se due o più particelle si avvicinano molto possono sviluppare modi di oscillazione della carica elettrica comuni, andando incontro al fenomeno noto come aggregazione plasmonica (Vial S. et al., 2007; Funston A.M. et al., 2009).

In pratica, dal punto di vista ottico, più nanoparticelle aggregate appariranno come un'unica nanoparticella di dimensioni maggiori e quindi con una frequenza di assorbimento più bassa.

Parallelamente allo sviluppo di nuovi processi sperimentali per la sintesi di nanoparticelle d'oro di dimensioni e forme controllabili, la chimica correlata alla modifica superficiale ha raggiunto notevole interesse.

La dimostrazione che i gruppi funzionali amminico (-NH₂) e solfidrilico (-SH) si legano fortemente alle nanoparticelle d'oro ha permesso la modificazione della loro superficie con aminoacidi (Selvakannan P.R. et al., 2004; Joshi H. et al., 2004) e proteine (Gole A. et al., 2001; Phadtare S. et al., 2003). Inoltre, le particelle possono essere coniugate a carboidrati (Lin C-C. et al., 2002; Halkes K.M. et al., 2005), lipidi (Chatterjee S. et al., 2008), oligonucleotidi (Sandhu K.K. et al., 2002; Han G. et al., 2006) e anticorpi monoclonali (Arruebo M. et al., 2009; Centi S. et al., 2014), promuovendo lo sviluppo di importanti applicazioni biomediche.

1.3 Applicazioni biomediche.

Le GNPs possono essere utilizzate in molteplici applicazioni in ambito biomedico. Ad esempio, possono funzionare come marcatori per la microscopia elettronica (Baschong W. et al., 1990; Bielinska A. et al., 2002) e per tecniche di *immunostaining* (Roth J., 1996), grazie all'elevato numero atomico e all'accurata identificazione delle strutture marcate, favorendo un intenso contrasto e la quantizzazione dell'immunomarcatura.

Per merito delle loro interessanti proprietà ottiche possono essere impiegate nella spettroscopia Raman (Nikoobakht B. et al., 2002) e nella spettroscopia di luminescenza (Huang X. et al., 2007) o come agenti di contrasto in tecniche di *imaging*, che si basano su diverse modalità, quali lo *scattering* di Rayleigh (Takahashi H. et al., 2008), la fluorescenza (Durr N.J. et al., 2007) e la fotoacustica (Eghtedari M. et al., 2007). In particolare, la risonanza plasmonica longitudinale dei GNRs fornisce fondamentali proprietà di *scattering*, regolabili alle varie lunghezze d'onda dei più comuni laser NIR, che possono essere sfruttate nella creazione di un intenso contrasto ottico. Grazie alla profondità di penetrazione e assenza di invasività, il laser NIR permette un rischio minimo di danneggiamento dei tessuti sani e riduce la generazione di una indesiderata autofluorescenza da parte del tessuto stesso.

Inoltre, le particelle plasmoniche possono essere utilizzate come biosensori (Olofsson L. et al., 2003), ovvero sonde ottiche per il rilevamento di specifici analiti biologici. Un primo approccio prevede che l'interazione tra l'analita e la particella possa modificare la sua risonanza plasmonica di superficie, facilmente misurabile, inducendo un cambiamento nella stabilità colloidale o nell'indice di rifrazione locale. Il secondo metodo consiste nel sfruttare la SPR delle particelle per aumentare lo *scattering* di Raman dell'analita localizzato nelle vicinanze o sulla superficie della particella.

Le nanoparticelle d'oro sono impiegate con successo in diagnostica clinica, ad esempio, per l'identificazione e la quantificazione di proteine d'interesse (You C.C. et al., 2007; Baptista P. et al., 2008) o per lo *screening* di specifiche sequenze oligonucleotidiche (Mirkin C.A. et al., 1996) con elevata sensibilità. Questa tecnologia è definita *lab-on-a-chip* e permette di rilevare anche marcatori tumorali nel siero umano (Aćimović S.S. et al., 2014).

Le GNPs possono essere inoltre coinvolte nel trasporto selettivo di farmaci o DNA (Storhoff J.J. et al., 1999; Niemeyer C.M. et al., 2001; Kim C.K. et al., 2009) e nel loro rilascio controllato tramite la modulazione dell'effetto SPR (Skirtach A.G. et al., 2005; Vivero-Escoto J.L. et al., 2009), superando le principali barriere biologiche (come ad esempio la barriera emato-encefalica in caso di necessaria veicolazione al cervello) e i classici problemi di *clearence* renale. La bio-coniugazione di molecole terapeutiche alla superficie delle nanoparticelle può avvenire tramite legami covalenti, interazioni elettrostatiche, crescita strato su strato o per mezzo di un rivestimento con proteine endogene (interazione protein-corona).

Le GNPs attivate dalla luce laser sono in grado di promuovere la chirurgia mini-invasiva mediante effetti fototermici (Huang X. et al., 2008) o fotoacustici (Tong L. et al., 2007).

Sicuramente l'ablazione fototermica del cancro costituisce l'approccio più innovativo ed interessante dell'impiego di nanoparticelle in medicina. Essa è indotta dal riscaldamento del tessuto fino ad una temperatura di 41-47°C (ipertermia) per un tempo limitato (Svaasand L.O. et al., 1990; Van der Zee J., 2002).

Il calore è generato dalle particelle, grazie al loro intenso assorbimento della luce laser ed elevata efficienza di conversione fototermica (Sanchez Lopez de Pablo C. et al., 2014). Impiegando un laser NIR, i tumori possono quindi essere selettivamente distrutti perché mostrano una ridotta tolleranza al calore rispetto ai tessuti normali, attribuibile alla loro scarsa e alterata irrorazione sanguigna con conseguente bassa tensione di ossigeno e pH (Corry P.M. et al., 2005). L'ipertermia è in grado di provocare un danno cellulare irreversibile alle membrane cellulari e induce la denaturazione delle proteine, innescando il processo di apoptosi (Ahmed K. et al., 2013).

È evidente che la biocompatibilità delle nanoparticelle rappresenta una caratteristica cruciale per lo sviluppo di qualsiasi applicazione clinica.

La maggior parte degli studi di efficacia, tossicità e farmacocinetica di preparazioni farmacologiche a base di oro sono stati condotti in pazienti affetti da artrite reumatoide nel XX secolo. Sebbene l'oro sia impiegato nella pratica clinica da diversi decenni ci sono ancora considerevoli dibattiti su quale sia la via di somministrazione ottimale per il trattamento di questa patologia.

Negli anni '80 furono sviluppati trattamenti per l'artrite reumatoide per via orale, come Auranofin (approvato nel 1985 dalla *Food and Drug Administration*), pensati per migliorare i profili farmacocinetici riducendo la ritenzione tissutale, la tossicità ed i livelli sierici di oro (Finkelstein A.E. et al., 1976). A causa degli effetti collaterali riscontrati e per il timore di una soppressione immunitaria a lungo termine, i composti iniettabili, come l'aurotiomalato di sodio e l'aurotioglucosio, sono rimasti i farmaci elettivi a base di oro per il trattamento dell'artrite reumatoide (Kean W.F. et al., 2008).

Nei pazienti in terapia con Auranofin, aurotiomalato o aurotioglucosio è stato possibile osservare le proprietà antistaminiche e antimicrobiche dei farmaci e le potenzialità terapeutiche anche per la cura di tumori e di altre patologie autoimmunitarie (Pricker S.P. et al., 1996).

Nanoparticelle di circa 150 nm sono state oggetto di sperimentazioni cliniche per la terapia fototermica di tumori refrattari e/o ricorrenti testa-collo (AuroLase™, Nanospectra Bioscience Inc., USA, ClinicalTrials.gov ID: NCT00848042).

In precedenti studi condotti sul piccolo animale queste particelle avevano dimostrato un'efficiente ablazione fototermica del cancro (Hirsch L.R. et al., 2003).

Aurimune™ (National Cancer Institute, USA, ClinicalTrials.gov ID: NCT00436410) è invece un farmaco costituito da una soluzione colloidale di nanoparticelle sferiche (27 nm di diametro) coniugate ad un fattore di necrosi tumorale che sembra stimolare una risposta immunitaria in grado di ostacolare la crescita neoplastica in pazienti sottoposti a resezione chirurgica di tumori solidi primitivi o metastatici (Tamarkin L., 2007).

1.4 Strategie di *targeting* tumorale con l'impiego di GNRs.

I pazienti oncologici sono sottoposti a trattamenti invasivi, come la chirurgia, la radioterapia e la chemioterapia. La radioterapia comporta l'uso di radiazioni ionizzanti per distruggere le cellule maligne danneggiando in modo irreversibile il DNA. Tuttavia, uno dei limiti di questa tecnica è legata alla incapacità delle radiazioni ionizzanti di discriminare tra le cellule sane e maligne (Hainfeld J.F. et al., 2004). Anche la chemioterapia classica non è in grado di agire unicamente sulle cellule tumorali a causa della sua scarsa specificità d'azione (Ibsen S. et al., 2013).

In questo scenario, la selezione dei tessuti è una condizione prioritaria per ridurre al minimo gli effetti collaterali, talvolta anche gravi. L'idea di sfruttare le anomalie vascolari di tumori per accedervi in modo esclusivo, evitando il raggiungimento dei tessuti normali, è particolarmente attraente.

In questo contesto, il *targeting* dei tumori attraverso la mediazione di nanoparticelle è emerso come uno degli approcci per superare la mancanza di specificità.

Allo stato attuale, le soluzioni più utilizzate sono i nanocilindri d'oro, i dendrimeri e i liposomi (Torchilin V.P., 2012).

Schematicamente, il *targeting* tumorale si basa su due approcci diversi: uno passivo e uno attivo, anche se il *targeting* attivo non può prescindere dall'effetto passivo, essendo il suo presupposto (Byrne J.D. et al., 2008; Danhier F. et al., 2010).

Per ottenere un *targeting* passivo, i GNRs sono ricoperti da glicole polietilenico (PEG), che rappresenta il rivestimento più comune per proteggere le nanoparticelle dalla captazione del sistema reticolo-endoteliale. L'aggiunta di PEG sulla superficie delle nanoparticelle comporta un aumento della loro emivita nella circolazione sanguigna (Tatini F. et al., 2014).

Tipicamente, i vasi tumorali hanno una struttura altamente disorganizzata ed esibiscono un'elevata permeabilità vascolare e defenestrations che consentono lo stravasamento di macromolecole fino a 400 nm di diametro. Inoltre, i tumori presentano un drenaggio linfatico molto scarso. La combinazione di questi fattori porta ad un accumulo passivo di nanoparticelle ed è stato definito effetto EPR (*Enhanced permeability and retention*) (Maeda H. et al., 2003).

Nel *targeting* attivo, specifici ligandi sono coniugati alla superficie di GNRs per promuovere il legame ad elevata affinità e specificità con i rispettivi recettori espressi nel tessuto d'interesse.

I ligandi comprendono una vasta gamma di molecole, come gli anticorpi monoclonali, i frammenti di anticorpi, gli aptameri, i peptidi e molecole di piccole dimensioni (Centi S. et al., 2014; Ratto F. et al., 2015). L'interazione con la molecola bersaglio può essere superficiale o mediare la localizzazione sub-cellulare di GNRs bio-coniugati nel citoplasma e nel nucleo.

Infine, un altro approccio promettente per raggiungere i tumori è rappresentato dall'uso di vettori cellulari, vale a dire cellule del sistema immunitario o del compartimento staminale che presentano un forte tropismo per il microambiente tumorale, che possono essere caricati con GNRs ed usati come cavalli di Troia (Amara I. et al., 2011).

1.5 Ruolo dei macrofagi nell'immunità innata.

L'immunità innata rappresenta la prima linea di difesa dell'ospite ed è caratterizzata da una immediata e rapida risposta indotta dal riconoscimento aspecifico dei microorganismi da parte di cellule effettrici.

La risposta immunitaria innata dipende in particolare dall'attività di granulociti, monociti/macrofagi, cellule dendritiche, cellule NK (*Natural killer*) e mastociti.

Le cellule del sistema immunitario originano da cellule staminali ematopoietiche nel midollo osseo. I macrofagi (o fagociti mononucleati o istiociti) derivano da un progenitore mieloide e rappresentano, insieme a granulociti neutrofili e cellule dendritiche, uno dei tre tipi di fagociti del sistema immunitario.

I monociti, precursori dei macrofagi, costituiscono gli elementi circolanti di maggiori dimensioni (14-17 μm). Possiedono forma variabile, da tondeggiante a ovale, con contorni lisci o irregolari per la presenza di corti pseudopodi mediante i quali si possono spostare con movimento ameboide.

I monociti mostrano un citoplasma abbondante contenente numerosi granuli azzurrofilari (lisosomi). Il nucleo ha comunemente un aspetto reniforme, più raramente appare tondeggiante od ovale. I monociti maturi provenienti dal midollo osseo, vengono immessi nel torrente circolatorio dove permangono per 24-72 ore. Una volta migrati nei tessuti, si differenziano in macrofagi e vi risiedono per mesi.

I macrofagi sono presenti in grande quantità nei tessuti connettivi nello strato della sotto-mucosa del tratto gastrointestinale, nei polmoni (dove possono trovarsi sia negli interstizi sia negli alveoli), lungo certi vasi sanguigni del fegato (cellule di Kupffer) e nella milza, dove rimuovono cellule del sangue senescenti.

I fagociti mononucleati riconoscono i patogeni attraverso i recettori espressi sulla superficie cellulare, che permettono di distinguere tra le molecole di superficie esposte dai patogeni e quelle proprie dell'ospite (Janeway C.A. et al., 2002).

Questi recettori comprendono i recettori per carboidrati batterici (mannosio e glucani) (Feizi T., 2000), per lipidi (CD14, un recettore per lipopolisaccaridi batterici (LPS)) (Beutler B., 2000), i recettori spazzini o *scavenger* (Gough P.J. et al., 2000), che legano molti ligandi carichi negativamente che compongono la parete dei batteri

Gram-positivi (ad esempio l'acido lipoteicoico), e i recettori *Toll-like* (TLRs) (Medzhitov R. et al., 2000).

A differenza dei recettori che mediano la risposta immunitaria acquisita, i recettori dell'immunità innata non sono distribuiti in modo clonale ed il legame con specifiche componenti dà origine ad una risposta molto rapida (0-4 ore).

In primo luogo, il legame dei patogeni ai recettori dei macrofagi stimola la fagocitosi (Aderem A. et al., 1999).

La fagocitosi è un processo attivo in cui il patogeno legato è inizialmente circondato dalla membrana del fagocita e successivamente internalizzato in una vescicola legata alla membrana, detta fagosoma o vacuolo endocitico. Il fagosoma va quindi incontro ad acidificazione, promuovendo l'uccisione di gran parte dei patogeni.

Le cellule fagocitarie possiedono, inoltre, granuli legati alla membrana, chiamati lisosomi, che contengono enzimi litici, proteine e peptidi in grado di mediare una risposta antimicrobica intracellulare. Il fagosoma si fonde con uno o più lisosomi formando il fagolisosoma, nel quale è rilasciato il contenuto lisosomiale per distruggere l'agente patogeno.

Durante la fagocitosi i macrofagi producono una grande varietà di sostanze tossiche che favoriscono l'uccisione del microorganismo fagocitato. I più importanti di questi sono l'ossido nitrico (NO), l'anione superossido (O_2^-) e il perossido di idrogeno (H_2O_2) (Bogdan C. et al., 2000).

NO è prodotto mediante una forma molto reattiva di ossido sintasi, iNOS₂, mentre il superossido è generato da una NADPH ossidasi lisosomiale della catena respiratoria ed è convertito dall'enzima superossido dismutasi in H_2O_2 .

Ulteriori reazioni chimiche ed enzimatiche producono una varietà di composti chimici tossici a partire dal perossido di idrogeno, come il radicale idrossido ($OH\cdot$), lo ione ipoclorito (OCl^-) e lo ione ipobromito (OBr^-).

Il secondo importante effetto dell'interazione tra patogeni e macrofagi tissutali è l'attivazione a rilasciare citochine, chemochine e altri mediatori che determinano uno stato d'infiammazione nel tessuto e il reclutamento di neutrofili e proteine plasmatiche nel sito d'infezione.

Il segnale mediato da diversi recettori, come i TLRs, in risposta a componenti batteriche causa la secrezione di citochine pro-infiammatorie, quali interleuchina-1 (IL-1), interleuchina-6 (IL-6) e il fattore di necrosi tumorale- α (TNF- α) (Bowie A. et al., 2000; Dalpke A. et al., 2002). Questi recettori mediano anche segnali che inducono l'espressione di molecole co-stimolatorie (CD86), necessarie alla presentazione dell'antigene e all'innesco della risposta immunitaria acquisita.

1.6 La polarizzazione dei macrofagi.

I macrofagi sono cellule dotate di plasticità, capaci di modificare i loro profili funzionali in risposta ai cambiamenti del microambiente (Watkins S.K. et al., 2007). Analogamente alla nomenclatura Th1/Th2 dei linfociti, i fagociti mononucleati si suddividono in due classi chiamate, M1 e M2 (Martinez F.O. et al., 2006).

Quando i macrofagi sono esposti a LPS o a interferone γ , si polarizzano verso il fenotipo M1 in grado di produrre un'elevata quantità di citochine infiammatorie e specie reattive dell'ossigeno, svolgendo in questo modo una risposta immunitaria che esercita effetti anti-neoplastici (Mills C.D. et al., 2000).

Il fenotipo M2 viene invece indotto dall'azione di citochine secrete dai linfociti Th2, quali interleuchina-4 (IL-4) e interleuchina-13 (IL-13), ed è capace di promuovere principalmente la riparazione tissutale e l'angiogenesi, contribuendo alla crescita tumorale (Mantovani A. et al., 2002; Sica A. et al., 2012).

Rispetto ai macrofagi M1, gli M2 producono bassi livelli di TNF- α , IL-1 β e IL-6 ed elevate quantità di TGF- β (*Transforming growth factor beta*) (Tjiu J.W. et al., 2009).

Le cellule M2 esprimono inoltre particolari molecole di superficie come CD206 (recettore per il mannosio) e CD204 (recettore *scavenger A*) (Mantovani A. et al., 2004).

Attualmente l'infiammazione è riconosciuta come una delle caratteristiche del cancro.

I macrofagi associati al tumore (TAMs), ovvero cellule che infiltrano e risiedono nel microambiente tumorale, sono cellule di tipo M2 (Sica A. et al., 2006). È stato riconosciuto che i TAMs possono promuovere la crescita, l'invasione e le metastasi

tumorali ed attivare oncogeni in cellule cancerose (Chen J.J. et al., 2003; Lewis C.E. et al., 2006).

I monociti possono essere reclutati nella lesione maligna attraverso chemochine rilasciate dal tumore e dai fibroblasti stromali (Siveen K.S. et al., 2009; Hao N.B. et al., 2012). Nel carcinoma prostatico, i fibroblasti associati al tumore (CAFs) inducono attivamente il reclutamento di monociti e la loro differenziazione verso il fenotipo M2, prevalentemente tramite SDF-1 (*Stromal-derived factor 1*) (Comito G. et al., 2014).

I TAMs possono costituire fino al 50% del microambiente tumorale in tumori solidi, come il carcinoma mammario (O'Sullivan C. et al., 1994).

L'interazione tra M2 e CAFs è reciproca, infatti, i macrofagi sono in grado di influenzare la reattività dei fibroblasti e promuovere la loro transizione verso miofibroblasti. Inoltre, CAFs e macrofagi M2 collaborano nell'attivazione di cellule endoteliali per guidare la neoangiogenesi, indispensabile per la fuga di cellule tumorali dalla sede primaria e la diffusione di metastasi.

Le due popolazioni cellulari cooperano anche nel reclutare precursori di cellule endoteliali derivanti dal midollo osseo, che sono capaci di influenzare il comportamento delle cellule tumorali sottoponendole alla transizione epiteliomesenchima (Giannoni E. et al., 2011).

Le strategie d'intervento mirate a prevenire la progressione maligna, prevedono la contemporanea riprogrammazione dei macrofagi M2, tramite la somministrazione di molecole anti-infiammatorie, e l'utilizzo di approcci che limitino la reattività dei fibroblasti stromali.

La possibilità di sfruttare la capacità di monociti/macrofagi o cellule staminali di essere richiamate nella lesione maligna da diversi fattori rilasciati dal microambiente tumorale potrebbe rappresentare una strategia innovativa per la diagnosi e la terapia del cancro. Una volta isolate, caratterizzate e caricate con GNRs *ex vivo*, queste cellule potrebbero essere impiegate come vettori cellulari in grado di veicolare le nanoparticelle plasmoniche nel tumore. In questo modo può essere favorito l'*imaging* del tessuto, grazie al contrasto generato dalle particelle, ed essere programmata una terapia mirata per mezzo dell'ipertermia ottica o della radioterapia.

1.7 Le principali citochine infiammatorie prodotte dai macrofagi.

Le citochine sono fattori solubili di natura glicoproteica che regolano in maniera pleiotropica diverse funzioni cellulari del sistema immunitario ed ematopoietico, tra cui la proliferazione e la differenziazione.

Presentano una notevole eterogeneità strutturale e funzionale, ma sono accomunate da dimensioni contenute (circa 8-25 kDa) e dalla capacità di agire come mediatori della comunicazione intercellulare.

Nella maggior parte dei casi le citochine non sono prodotte costitutivamente ma vengono sintetizzate *de novo* da differenti tipi cellulari tra cui, prevalentemente, cellule dell'immunità innata ed acquisita, e da cellule endoteliali, epiteliali e mesenchimali in risposta ad opportuni stimoli.

Possono agire in modo autocrino, influenzando il comportamento della cellula che rilascia le citochine stesse, in modo paracrino, influenzando il comportamento di cellule adiacenti e talvolta in modo endocrino, interagendo con cellule distanti attraverso il torrente circolatorio. Una stessa citochina può svolgere azioni differenti e citochine diverse possono esercitare la stessa funzione biologica (ridondanza) (Thomson A., 2001).

Le citochine infiammatorie primarie sono rappresentate da IL-1, IL-6 e TNF- α , che vengono prodotte e rilasciate localmente nel tessuto durante le fasi iniziali del processo infiammatorio da parte di diversi tipi cellulari (principalmente macrofagi attivati) in risposta a svariati stimoli pro-infiammatori, quali prodotti microbici come LPS, immunocomplessi, traumi. Le citochine infiammatorie secondarie, indotte dalle primarie, sono rappresentate invece dalle chemochine, responsabili del processo di reclutamento leucocitario.

1.7.1 Interleuchina-1.

IL-1 α e IL-1 β sono due molecole agoniste che svolgono funzioni simili ed interagiscono con gli stessi specifici recettori, nonostante presentino un'omologia di sequenza solo del 20%. Vengono sintetizzate come pro-peptidi, processate ad una forma matura all'interno della cellula ad opera dell'enzima Caspasi-1 o ICE (*IL-1 converting enzyme*) e sono in grado di interagire con due specifici recettori di membrana, IL-1R di tipo I e II (Sims J.E. et al., 1993; Colotta F. et al., 1993).

IL-1R di tipo I è costituito da una porzione extracellulare con tre domini immunoglobulinici, un singolo dominio transmembrana, e un dominio intracitoplasmatico denominato TIR (*Toll-like/IL-1 Receptors*), coinvolto nella trasduzione del segnale. Per l'attivazione completa del segnale, oltre ad essere richiesta l'interazione del ligando con la catena recettoriale, è necessaria la presenza di una proteina accessoria (AcP), non coinvolta nel *binding* recettoriale ma indispensabile per il reclutamento alla membrana dei trasduttori del segnale.

IL-1R di tipo II è strutturalmente analogo al recettore di tipo I per quanto riguarda la porzione extracellulare, ma è prodotto da un gene indipendente e privo del dominio TIR.

Oltre ai due agonisti è stata identificata una molecola antagonista, IL-1ra, che è in grado di riconoscere il recettore di tipo I, indurre un blocco funzionale ed impedire alle molecole agoniste di interagire col recettore (Arend W.P., 1993).

In seguito all'interazione di IL-1 con il suo recettore specifico, viene reclutata la proteina adattatrice MyD88 (*Myeloid differentiation primary response protein 88*), che si associa al dominio TIR del recettore tramite il suo dominio corrispondente (Bowie A. et al., 2000). Essa è in grado di attivare le chinasi IRAK (*IL-1 Receptor Associated Kinase*), attraverso il suo dominio DD (*death domain*), che fosforilano l'adattatore TRAF6 (*TNF Receptor Associated Factor 6*), capace di reclutare a sua volta differenti chinasi. Possono essere attivate vie di segnalazione proliferative e differenziative attraverso JNK (*c-Jun N-terminal protein kinase*) e p38 o vie pro-infiammatorie mediante la serin treonin chinasi TAK1 (*Transforming growth factor beta-activated kinase 1*) che attiva NF κ B (*Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells*),

promuovendo l'attivazione trascrizionale di geni codificanti citochine pro-infiammatorie, chemochine, molecole di adesione endoteliali e molecole co-stimolatorie che attivano la risposta immunitaria (CD80).

1.7.2 Fattore di necrosi tumorale- α .

Il TNF- α è una molecola omotrimerica sintetizzata come precursore ed espressa come proteina transmembrana. Inoltre, può essere secreto in seguito all'azione della metalloproteasi TACE (*TNF- α converting enzyme*) (Perez C. et al., 1990).

Sia la forma di membrana che quella solubile sono capaci di interagire con specifici recettori ed attivare risposte biologiche. In particolare, TNF- α è in grado di reagire con due differenti molecole recettoriali, TNFR1 e TNFR2, che presentano una significativa omologia di sequenza nella porzione extracellulare, basata sulla presenza di 4 domini ricchi di residui cisteinici, ma differiscono sensibilmente nella porzione intracitoplasmatica, mediando segnali intracellulari e risposte biologiche differenti (Borset M. et al., 1996).

TNFR1 è fondamentalmente un recettore di morte, capace di attivare un processo di apoptosi attraverso il reclutamento alla membrana di TRADD (*TNF receptor-associated death domain*) che, tramite il suo dominio di morte, interagisce con una seconda molecola adattatrice, FADD (*Fas-associated death domain*), la quale recluta ed attiva la caspasi 8 portando all'avvio dell'attivazione della cascata di enzimi proteolitici (caspasi effettrici).

TNFR2 promuove invece l'attivazione di una via di segnalazione pro-infiammatoria tramite il reclutamento di molecole adattatrici come TRAF1 e 2 che attivano la chinasi RIP1 (*Receptor-interacting protein 1*) in grado di attivare la chinasi IKK- β (*I κ B kinase beta*), determinando la fosforilazione e successiva poli-ubiquitinazione e degradazione mediante il proteasoma di I κ B α , inibitore di NF κ B.

Questo fattore trascrizionale risulta così attivo e libero di traslocare nel nucleo e favorire l'attivazione di specifici geni *target* coinvolti nel processo infiammatorio. Alternativamente, TNFR2 stimola l'attivazione di cascate chinasiche dipendenti da JNK e p38.

La sintesi di IL-1 e TNF- α comporta la generazione di una serie di effetti locali quali la produzione di chemochine e molecole di adesione al fine di promuovere lo stravasamento dei leucociti dal torrente circolatorio e richiamarli nella sede del danno; l'espressione di enzimi iNOS (*Inducible nitric oxide synthase*) e COX2 (*Cyclooxygenase 2*) che portano alla sintesi di monossido d'azoto e prostaciclina che svolgono un'azione vasodilatatoria; l'attivazione di proprietà pro-coagulanti dell'endotelio attraverso l'aumento di espressione del fattore tissutale ed inattivazione di processi anticoagulanti; l'induzione della proliferazione di fibroblasti e della produzione di proteasi e prostaglandine che determinano un rimodellamento tissutale; il potenziamento delle attività citotossiche dei fagociti infiltranti e la promozione della loro sopravvivenza.

IL-1 agisce sul sistema ematopoietico favorendo la proliferazione e differenziazione dei precursori ematopoietici, mediante la produzione di fattori di crescita come GM-CSF (*Granulocyte macrophage-colony stimulating factor*) e IL-6. Il TNF- α svolge in questo compartimento effetti opposti, causando l'inibizione dei precursori ematopoietici e diventando responsabile dell'insorgenza di anemia in corso di patologie croniche infiammatorie.

A livello sistemico queste due citochine si comportano da pirogeni endogeni, agendo sui centri ipotalamici della termoregolazione, favorendo un aumento della temperatura corporea che ostacola la sopravvivenza di alcuni batteri che non sono in grado di vivere a temperature superiori a 37° e potenzia l'intensità della risposta immunitaria adattiva. In realtà è un ruolo indiretto perché mediato direttamente da IL-6 e prostaglandine.

IL-1 e TNF- α esercitano la loro azione sull'asse ipotalamico-ipofisario favorendo anche il rilascio di ACTH (*Adrenocorticotropic hormone*) che, agendo sulla ghiandola surrenalica, determina la produzione di glucocorticoidi che svolgono una funzione anti-infiammatoria. Il TNF- α esplica un ruolo importante anche nella regolazione della massa corporea, promuovendo la mobilitazione di lipidi e proteine causando perdita di peso.

La sovrapproduzione di TNF- α può causare astenia, cachessia, ipotensione, aumento eccessivo della permeabilità vascolare con perdita di volume plasmatico, coagulazione intravascolare disseminata (CID), shock settico e morte (Pfeffer K., 2003).

1.7.3 Interleuchina-6.

IL-6 prodotta da macrofagi, cellule endoteliali, fibroblasti e linfociti T e B, riconosce uno specifico recettore eterodimerico costituito dalla catena gp130, comune anche ad altri recettori citochinici e responsabile della trasduzione del segnale, e la catena specifica IL-6R α . Esiste una variante solubile di IL-6R α che forma con il ligando il complesso IL-6/IL-6R α capace di interagire con la catena segnalante gp130 espressa sulla superficie di cellule endoteliali, determinando una risposta biologica attraverso un meccanismo di *trans-signalling* (Narazaki M. et al., 1993).

IL-6 contribuisce alla transizione dalla fase di infiammazione acuta alla fase cronica attraverso la produzione di citochine chemoattraenti per monociti piuttosto che per neutrofili. È la diretta responsabile della sintesi di proteine di fase acuta da parte del fegato (Mackiewicz A. et al., 1992), come la proteina C-reattiva, che è capace di riconoscere la fosfocolina dei lipopolissacaridi presenti sulla parete di alcuni batteri e funghi, favorendo l'opsonizzazione del patogeno e l'attivazione della cascata del complemento (Akira S. et al., 1993).

1.8 Le chemochine.

Nello sviluppo della risposta infiammatoria un aspetto importante è svolto dal reclutamento di leucociti dal torrente circolatorio verso il tessuto danneggiato (Matsukawa A. et al., 2000).

Inizialmente si verifica una fase di vasodilatazione che comporta una riduzione della velocità del flusso ematico, favorendo una lieve stasi, che determina la marginazione dei leucociti sulla parete del vaso. Segue una fase di rotolamento, caratterizzata dall'espressione sulle cellule endoteliali di selettine (P, E, L), glicoproteine di membrana con un dominio lectino-simile capace di legare ligandi oligosaccaridici fucosilati presenti sui leucociti, con bassa affinità.

Successivamente, si verifica una adesione salda all'endotelio attivato, grazie all'aumento di espressione di molecole di adesione (ICAMs (*Intercellular adhesion molecules*), VCAMs (*Vascular cell adhesion molecules*)) che interagiscono mediante legami ad alta affinità con le integrine espresse dai leucociti, tramite un cambiamento conformazionale indotto dalle chemochine (Alon R. et al., 2002; Johnston B. et al., 2002).

In seguito, per merito dell'aumento della permeabilità vascolare, i leucociti stravasano, attraversando la parete endoteliale per mezzo di CD31, espresso sia dai leucociti che dalle giunzioni intercellulari, e penetrano nella membrana basale che viene degradata ad opera di metalloproteasi di matrice. Grazie al richiamo da parte di chemochine tissutali, i neutrofili e successivamente i monociti e i linfociti migrano verso la sede del danno (Ono S.J. et al., 2003).

Oltre alla funzione chemoattraente nel focolaio d'infezione, le chemochine inducono altre risposte biologiche nelle cellule bersaglio, come la regolazione del traffico di linfociti negli organi linfoidei, l'attivazione di meccanismi citotossici nei fagociti, la polarizzazione della risposta immunitaria specifica e la stimolazione/inibizione della proliferazione.

Finora sono state descritte oltre 50 chemochine che riconoscono specifici recettori a 7 domini transmembrana accoppiati a proteine G eterotrimeriche.

Vengono raggruppate in due grosse famiglie: le α -chemochine (IL-8), che presentano due cisteine alla porzione N-terminale separate da un singolo aminoacido (CXC), sono prodotte da fagociti mononucleati, cellule endoteliali, fibroblasti e megacariociti e promuovono l'attivazione di neutrofili; le β -chemochine (MIP (*Macrophage inflammatory protein*), MCP-1 (*Monocyte chemoattractant protein-1*), RANTES (*Regulated on activation, normal T cell expressed and secreted*), dove le cisteine sono adiacenti (CC), che sono prodotte dai linfociti T attivati ed agiscono su linfociti T, macrofagi, basofili ed eosinofili.

Esistono inoltre la linfotattina con un solo residuo cisteinico (C), e la fractalkina con tre residui amminoacidici che separano le cisteine N-terminali (CX3C).

In particolare, MIP-1 α , conosciuta anche come CCL3, è strettamente correlata a CCL4, o MIP-1 β . Sebbene entrambe siano fattori chemoattraenti per monociti, macrofagi e cellule dendritiche, CCL3 promuove preferenzialmente il reclutamento di linfociti T CD8⁺ mentre i linfociti T CD4⁺ sono maggiormente responsivi a CCL4 (Schall T.J. et al., 1993). Oltre a esercitare un ruolo cruciale nel reclutamento dei leucociti al sito d'infiammazione, CCL3 induce la secrezione di citochine infiammatorie, la degranolazione di mastociti e l'attivazione delle cellule NK.

E' inoltre stato descritto un suo ruolo nell'inibizione della proliferazione delle cellule staminali ematopoietiche e nel mantenimento del loro stato di quiescenza (Cook D.N. et al., 1996). Infine, CCL3 sembra promuovere la sopravvivenza e la proliferazione cellulare nel mieloma multiplo (Lentzsch S. et al., 2003).

1.9 *Imaging* fotoacustico.

L'effetto fotoacustico (PA) è il principio fisico su cui si fondano le tecniche di *imaging* PA e si riferisce alla generazione di onde acustiche tramite l'assorbimento di energia elettromagnetica.

Nel 1880 Alexander Graham Bell scoprì che quando un fascio di luce solare periodicamente interrotto illumina un solido in una cella chiusa, può essere percepito un suono udibile mediante un ricevitore (Rosencwaig A. et al., 1976). L'effetto fotoacustico fu considerato una curiosità di nessun valore pratico e fu presto dimenticato.

Negli ultimi dieci anni il lavoro sull'*imaging* fotoacustico in ambito biomedico ha condotto notevoli passi avanti (Minghua X. et al., 2006). Onde non ionizzanti, come brevi impulsi laser, sono usate per generare onde ad ultrasuoni (US), correlate a segnali fotoacustici o termoacustici nei tessuti biologici.

Il vantaggio dell'*imaging* fotoacustico è quello di combinare la risoluzione degli ultrasuoni con un contrasto elevato dovuto all'assorbimento ottico. A differenza dei raggi X ionizzanti, le onde non ionizzanti non presentano alcun rischio per la salute. Nelle metodologie di *imaging* ottico il fenomeno della dispersione ottica, che si può verificare all'interno di tessuti molli, riduce la risoluzione spaziale in modo significativo con la profondità. Dal momento che la dispersione degli ultrasuoni è più bassa di 2-3 ordini di grandezza rispetto a quella ottica, essi possono fornire una risoluzione migliore dell'*imaging* ottico per profondità superiori a 1 mm (Minghua X. et al., 2006).

D'altra parte l'*imaging* a US si fonda sulla rilevazione delle proprietà meccaniche nei tessuti biologici e il suo debole contrasto non è in grado, ad esempio, di identificare tumori ad uno stadio precoce. Inoltre, gli ultrasuoni non permettono di misurare, ad esempio, né la saturazione dell'ossigeno né la concentrazione di emoglobina, per le quali l'assorbimento ottico è invece molto sensibile.

La tecnica di *imaging* PA acquista dunque importanza nel superare le problematiche appena menzionate. Nell'*imaging* PA le onde ad ultrasuoni sono generate irradiando il tessuto biologico con una eccitazione ottica fornita da un laser pulsato a frequenze

dell'ordine del nanosecondo. L'assorbimento della luce da parte di cromofori endogeni come l'emoglobina e la melanina, o da agenti esogeni, come coloranti organici o nanoparticelle plasmoniche, determina un aumento locale di temperatura (Wang L.V., 2009; Beard P., 2011). Questo evento genera una conseguente espansione termoelastica che produce onde acustiche a banda larga che possono essere rilevate usando dei ricevitori ad ultrasuoni.

Diverse forme di nanoparticelle d'oro sono state testate come agenti di contrasto per applicazioni fotoacustiche (Joshi P.P. et al., 2013; Pan D. et al., 2013).

1.10 Tomografia Computerizzata.

La tomografia computerizzata (TC) è una tecnica non invasiva che permette di discriminare gli organi e i tessuti in base al differente grado di attenuazione dei raggi X. Il coefficiente di attenuazione è infatti determinato dal numero atomico e dalla densità elettronica del tessuto in modo direttamente proporzionale.

Le basi teoriche della TC furono introdotte dal matematico Johann Radon nel 1917 mentre le prime applicazioni in medicina nucleare risalgono intorno agli anni '60 ad opera del fisico Allan McLeod Cormack. Nel 1972 fu messo a punto il primo prototipo di sistema TC dall'ingegnere Godfrey Hounsfield ed il neuroradiologo James Ambrose.

Dopo una scansione assiale del corpo viene generata una immagine digitale bidimensionale con l'impiego di appositi algoritmi di ricostruzione. Ciascun elemento della matrice (pixel) rappresenta le caratteristiche di assorbimento di un piccolo volume (voxel) del corpo umano. Ad ogni pixel dell'immagine TC è associato un numero, detto "numero TC", che è correlato matematicamente al coefficiente di attenuazione lineare del tessuto contenuto nel voxel corrispondente. Il numero TC viene misurato secondo una scala relativa all'attenuazione dell'acqua ed è comunemente espresso in Unità Hounsfield (HU). I tessuti molli, con attenuazione simile a quella dell'acqua presentano HU prossime allo zero; i tessuti compatti come l'osso mostrano un valore positivo molto alto (+1000 HU) mentre l'aria un'attenuazione negativa (-1000 HU).

I mezzi di contrasto usati quotidianamente in clinica, come lo iodio, si basano su molecole in grado di favorire l'assorbimento di raggi X ma prive di specificità poiché non possono essere coniugate con la maggior parte dei componenti biologici o con *markers* tumorali. In aggiunta, il tempo di scansione dev'essere molto rapido a causa dell'elevata *clearance* renale.

L'oro è un metallo che esercita una forte attenuazione della radiazione ionizzante e per le sue particolari caratteristiche fisiche e chimiche, è considerato un promettente candidato come agente di contrasto per TC (Bulte J.W.M., 2010; Ahn S. et al., 2013).

L'oro ha infatti un numero atomico ($Z = 79$) e una densità (19.32 g/cm^3) maggiori dello iodio ($Z = 53$, densità di 4.93 g/cm^3).

La TC è uno strumento diagnostico molto conveniente in termini di efficienza e costi ma non è considerata una modalità di *imaging* molecolare, a differenza della risonanza magnetica e delle tecniche usate in medicina nucleare (tra cui PET e SPET).

L'uso di nanoparticelle d'oro funzionalizzate, ad esempio con specifici anticorpi diretti contro antigeni sovraespressi sulla superficie di cellule tumorali, potrebbe rappresentare una strategia innovativa per la diagnosi di particolari patologie mediante TC (Popovtzer R. et al., 2008). Inoltre, la possibilità di tracciare *in vivo* cellule, opportunamente caricate con GNRs, costituirebbe un approccio particolarmente interessante.

1.11 Brachiterapia.

La brachiterapia, altrimenti definita come radioterapia interna o curieterapia, è una metodica di radioterapia che consiste nell'introduzione di sorgenti radioattive all'interno, a contatto o nelle vicinanze della zona da trattare. È indicata nel trattamento di tumori anatomicamente accessibili, di volume limitato e definito.

La sua efficacia è dimostrata nella terapia del cancro della cervice uterina, della prostata, della mammella, della cute e di sarcomi di tessuti molli (Guedea F. et al., 2007). Uno dei vantaggi rispetto alla radioterapia classica, o esterna, è rappresentato dall'ottimizzazione della dose, ovvero l'uso di una radiazione localizzata con ridotta esposizione ai tessuti sani. Il principale svantaggio è invece determinato dall'invasività.

Le maggiori sorgenti radioattive usate in brachiterapia sono rappresentate da ^{103}Pd (energia media di 21 keV), ^{125}I (28 keV), ^{192}Ir (395 keV) e ^{137}Cs (662 keV).

L'interazione tra raggi gamma e nanoparticelle d'oro può indurre un effetto fotoelettrico, lo *scattering* di Compton, l'appaiamento elettrone-positrone ed elevata energia di eccitazione.

L'effetto fotoelettrico si manifesta con l'emissione di elettroni dalla superficie del metallo dopo interazione con la radiazione elettromagnetica e si verifica principalmente in un intervallo di 10-500 keV.

L'effetto Compton (a 662 keV) deriva da un urto elastico tra i fotoni della radiazione e gli elettroni del metallo, con conseguente trasferimento di energia cinetica a quest'ultimi. Dopo l'urto i fotoni possiedono infatti minore energia, minore frequenza e lunghezza d'onda maggiore.

L'appaiamento elettrone-positrone, causato dall'annichilazione del fotone, si genera per energie superiori a 1.02 MeV. L'alta energia di eccitazione promuove la transizione fotone-fonone.

I raggi gamma forniscono alle nanoparticelle plasmoniche una forte energia che si trasforma in energia termica e rilascio di elettroni liberi. L'energia termica promuove la nucleazione delle particelle ed un aumento della risonanza plasmonica di superficie (Zhang X.D. et al., 2009).

In letteratura sono presenti diversi studi che mirano a identificare la migliore combinazione di nanoparticelle (in base alla forma, dimensioni e localizzazione cellulare) e tipo di radiazione ionizzante (brachiterapia a basso o elevato dosaggio, raggi X) per ottenere un terapia anti-tumorale efficace (Carter J.D. et al., 2007; Rahman W.N. et al., 2009; Jones B.L. et al., 2010).

A questo proposito è di particolare interesse lo studio di Lechtman E. et al. (2011) in cui sono descritte due possibili strategie d'intervento. La prima prevede l'utilizzo di una radiazione con energia inferiore al *k-edge* dell'oro (80.7 keV) in cui, predominando l'effetto della cascata di elettroni Auger (estremamente localizzato e dell'ordine di 1 μm), sono necessarie particelle di piccole dimensioni capaci di localizzarsi in prossimità del nucleo per indurre un danno irreversibile al DNA.

La seconda, invece, riguarda radiazioni con energie superiori al *k-edge* dell'oro dove il meccanismo d'azione di basa prevalentemente sull'effetto fotoelettrico; in questo caso le dimensioni e la localizzazione delle particelle sono meno rilevanti e acquista importanza la loro concentrazione nel tumore. I fotoelettroni emessi dalle particelle possono viaggiare fino a distanze di 10 μm e reagire facilmente con il nucleo dall'esterno della cellula.

Uno studio *in vitro* ha inoltre dimostrato come un trattamento continuo a bassa dose di raggi gamma sia più efficace di uno con raggi X ad alta energia, in presenza di nanoparticelle d'oro (Ngwa W. et al., 2013).

2. SCOPO DELLA TESI

Grazie alle loro caratteristiche fisico-chimiche, le nanoparticelle d'oro esibiscono peculiari proprietà ottiche che le rendono adatte in molteplici applicazioni biomedicali.

Oltre alle eventuali strategie di *targeting* passivo ed attivo con particelle plasmoniche, la possibilità di sfruttare il tropismo di particolari tipi cellulari, come i monociti/macrofagi o le cellule staminali, nei confronti di una lesione maligna potrebbe rappresentare un approccio innovativo in teranostica. Tali cellule possono infatti essere impiegate come vettori cellulari per il trasporto di nanoparticelle d'oro nella sede del tumore, favorendo la contemporanea diagnosi (mediante tecniche di *imaging* biomedico) e terapia (tramite ablazione fototermica e/o brachiterapia o radioterapia) del cancro.

Tra le varie tipologie di nanoparticelle plasmoniche, i nanocilindri d'oro sembrano rappresentare la soluzione ideale grazie allo loro estrema stabilità, biocompatibilità ed efficienza di assorbimento ottico fino a 10^5 volte superiori rispetto ai migliori pigmenti organici.

Lo scopo iniziale di questo progetto di ricerca è stato valutare l'effetto del trattamento di due differenti tipi di GNRs cationici su macrofagi d'origine murina ed individuare il protocollo ottimale di marcatura cellulare, che non compromettesse la vitalità e la proliferazione delle cellule. Una volta esclusa la tossicità, l'obiettivo successivo è stato investigare l'azione dei nanocilindri su alcune delle principali funzioni pro-infiammatorie svolte dai macrofagi.

È stata inoltre valutata la fattibilità dell'impiego di GNRs come agenti di contrasto per tecniche di *imaging* fotoacustico e in tomografia computerizzata, all'interno del vettore cellulare.

Infine, è stata indagata la capacità dei nanocilindri d'oro di potenziare l'effetto esercitato da un trattamento brachiterapico.

3. MATERIALI E METODI

3.1 Reagenti.

I reagenti impiegati per la sintesi delle nanoparticelle quali HAuCl_4 , CTAB, NaBH_4 , acido ascorbico, nitrato d'argento, NHS, EDC, Tween® 20, Mutab e tutte le sostanze chimiche necessarie alla preparazione delle soluzioni tampone sono stati acquistati da Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA) mentre mPEG-SH e c-PEG-SH da Iris Biotech GmbH (Marktredwitz, Germania). Il CPP è stato fornito dall'azienda Giotto Biotech S.r.l (Firenze, Italia).

Il lipopolissaccaride batterico, la chemochina ricombinante murina MIP-1 α , paraformaldeide, glutaraldeide e i coloranti ematossilina ed eosina sono stati acquistati da Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA) mentre la [^3H] timidina da GE Healthcare Life Sciences (Amersham, Buckinghamshire, UK).

3.2 Coltura cellulare di macrofagi murini.

La linea cellulare J774A.1 è stata fornita da American Type Culture Collection (ATCC® TIB-67™, Manassas, VA, USA) e deriva da un sarcoma a cellule reticolari in un topo femmina Balb/cN.

Le cellule sono state mantenute in coltura in Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) supplementato con siero fetale bovino al 10%, L-glutamina (2 mM) e 1% di soluzione antibiotica/antimicotica (tutti i componenti sono stati forniti da BioWhittaker®, Lonza, Svizzera) in atmosfera costituita da aria umidificata al 95% di O_2 e 5% di CO_2 , ad una temperatura costante di 37°C.

Ogni trattamento cellulare è stato effettuato in SFM (*Serum-free medium*), ovvero in un terreno privo di siero, allo scopo di mantenere le cellule in una condizione di carenza nutrizionale (*starvation*).

Quando necessario, i macrofagi sono stati attivati somministrando LPS (da *Escherichia Coli* 0111:B4), il maggiore costituente della parete cellulare di molti

batteri Gram-negativi, in grado di stimolare le cellule del sistema immunitario innato tramite l'interazione con il recettore TLR4 (*Toll-like receptor 4*).

La figura 5 mostra la morfologia e la struttura di cellule J774A.1, fotografate al microscopio confocale in trasmissione con un ingrandimento 63X.

3.3 Sintesi di nanocilindri d'oro.

La preparazione delle particelle plasmoniche avviene in tre fasi che prevedono la sintesi di nuclei sferici d'oro, la loro sovracrescita in particelle cilindriche con bande plasmoniche nella finestra del vicino infrarosso e la loro modificazione per mediarne l'*uptake* cellulare aspecifico.

I nuclei sferici d'oro sono stati sintetizzati mediante addizione goccia a goccia di 840 μM di boridruro di sodio (NaBH_4) a 0°C in soluzione acquosa contenente 92 mM di bromuro di cetrimonio (CTAB) e 240 μM di acido cloroaurico (HAuCl_4) a temperatura ambiente e sotto agitazione.

Le particelle cilindriche d'oro, di dimensioni 10×40 nm (diametro \times lunghezza) e con bande plasmoniche attorno a 800 nm (Figura 6), sono state sintetizzate tramite la riduzione autocatalitica di HAuCl_4 in presenza di acido ascorbico, secondo il protocollo proposto da Nikoobakht B. et al. (2003) e successivamente modificato da Ratto F. et al. (2010).

In breve, i nanocilindri d'oro sono stati prodotti tramite iniezione rapida di quantità diverse di una sospensione acquosa di nuclei sferici d'oro, tipicamente tra 50 nM e 4 μM di Au, in soluzione acquosa contenente 94 mM di CTAB, 0.1% di Tween® 20 (polisorbato 20), 470 μM di HAuCl_4 , 92 μM di nitrato d'argento (AgNO_3) e 520 μM di acido ascorbico a temperatura ambiente. Dopo 24 ore, la sintesi è stata ultimata con l'aggiunta di 190 μM di acido ascorbico a temperatura ambiente.

A questo punto, i nanocilindri d'oro sono stati modificati con due differenti molecole cationiche (Figura 7) per minimizzare la citotossicità e massimizzare il caricamento intracellulare, seguendo due procedure distinte. Il primo protocollo prevede il rivestimento delle particelle cilindriche d'oro con una ammina quaternaria,

denominata Mutab (*11-Mercaptoundecyl*)-*N,N,N*-trimethylammonium bromide) mentre il secondo la funzionalizzazione con CPP (*Cell-penetrating peptide*).

Nel primo caso, dopo 2 cicli di centrifugazione, decantazione e dispersione in 500 μM di CTAB, le particelle sono state trasferite in 100 mM di tampone acetato contenente 0.01% di Tween® 20 a pH 5 alla concentrazione nominale di 1.6 mM di Au e rivestite con PEG (*poly(ethylene glycol)*) mediante l'aggiunta di 50 μM alfa-mercapto-omega-metossi-PEG (m-PEG-SH, MW \approx 5000 g mol^{-1}). Trascorse due ore a 37°C, è stato aggiunto Mutab (500 μM) in DMSO (dimetilsolfossido), incubato per 30 min a 37°C e, successivamente, mantenuto overnight a 4°C, al fine di favorire il chemiadsorbimento dell'ammina quaternaria sulla superficie d'oro delle nanoparticelle. In seguito, le particelle sono state purificate mediante 3 cicli di centrifugazione con un rapporto di volume di \approx 1/200, trasferite in PBS (*Phosphate buffered saline*) sterile alla concentrazione di 4 mM Au e conservate a 4°C.

Per la coniugazione delle particelle con CPP si è proceduto dapprima alla PEGilazione aggiungendo 5 μM di alfa-mercapto-omega-carbossi-PEG (c-PEG-SH, MW \approx 5000 g mol^{-1}) per 30 min a 37°C e, in seguito, 50 μM di m-PEG-SH (MW \approx 5000 g mol^{-1}) per 1 ora e 30 min a 37°C. Dopo 2 cicli di centrifugazione, decantazione e dispersione in soluzione acquosa contenente 0.01% di Tween® 20, le particelle PEGilate sono state centrifugate, fatte decantare e disperdere in tampone acetato contenente 0.01% di Tween® 20, 10 mM di MES (*2-(N-morpholino)ethanesulfonic acid*) e 130 mM di NaCl a pH \approx 5 alla concentrazione nominale di 1.9 mM di Au; è stato poi aggiunto un volume uguale di tampone MES contenente 0.01% di Tween® 20, 10 mM di MES, 130 mM di NaCl, 4 mM di NHS (*N-hydroxysuccinimide*) e 16 mM di EDC (*1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide*) ed incubato per 15 min a 37°C.

Le particelle sono state quindi modificate con CPP con l'aggiunta di un volume doppio di tampone MES contenente 0.01% di Tween® 20, 10 mM di MES, 130 mM di NaCl e 20 ppm di CPP per 1 ora a 37°C. E' stata aggiunta metossietilammina (10 mM) per 30 min a 37°C ed eseguiti due lavaggi in tampone PBS contenente 0.01% Tween® 20. Infine, le particelle sono state risospese in PBS sterile alla concentrazione nominale di 4 mM Au e conservate a 4°C.

3.4 Microscopia elettronica a trasmissione.

Dal punto di vista qualitativo l'internalizzazione di GNRs in macrofagi murini è stata osservata al microscopio elettronico a trasmissione (TEM, CM 12, FEI Company, OR, USA).

I campioni trattati con 100 μ M Au di GNRs-Mutab per 24 ore sono stati fissati con glutaraldeide al 2.5% in tampone cacodilato (0.1 M, pH 7.2) per un'ora a temperatura ambiente. Successivamente, sono stati lavati con tampone cacodilato supplementato con saccarosio al 2% ed è stato aggiunto tetrossido di osmio (OsO_4 , Fluka, Buchs, Svizzera) all'1% in tampone cacodilato per un'ora a 4°C. I due composti agiscono su specifici costituenti cellulari (rispettivamente proteine e lipidi) mantenendo inalterata la loro struttura e i rapporti funzionali con gli altri componenti cellulari.

Eseguiti due lavaggi, i campioni sono stati disidratati con concentrazioni crescenti di etanolo e successivamente inclusi in resina a bassa viscosità (*LR white*, Fluka, Buchs, Svizzera), sostituendo progressivamente l'etanolo con soluzioni a concentrazioni crescenti di resina in ossido di propilene (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). Raggiunta la completa infiltrazione del campione si è proceduto con la fase di polimerizzazione a temperatura ambiente overnight. Le cellule vengono infiltrate gradualmente con il mezzo di inclusione al fine di aumentare la consistenza del campione per procedere al taglio. Il sezionamento è stato eseguito con un ultramicrotomo (MT-XL/PC con sistema CR-X, RMC Boeckeler Instruments, AZ, USA) che ha prodotto fette di spessore compreso tra 60 e 100 nm. Per mettere in evidenza le strutture, le cellule sono state colorate con acetato di uranile e citrato di piombo (Fluka, Buchs, Svizzera).

Infine, le sezioni sono state osservate e fotografate al TEM con diversi ingrandimenti.

3.5 Determinazione quantitativa dell'*uptake* intracellulare.

L'accumulo di GNRs all'interno di macrofagi è stato quantificato mediante analisi ottica con uno spettrofotometro UV-NIR (V-560, Jasco, Giappone).

5×10^5 cellule J774A.1 sono state coltivate in piastre Petri e incubate con 4, 10, 40, 100 e 400 μM Au di GNRs-Mutab per 24 ore. In un esperimento successivo, le cellule sono state trattate con 100 e 400 μM Au di GNRs-Mutab per 0.5-1-2-4-8-16-24 ore e di GNRs-CPP per 2-4-8-16-24-32 ore.

I macrofagi sono poi stati raccolti, lavati con PBS e fissati con una soluzione di paraformaldeide al 3.6% in PBS per 10 minuti a temperatura ambiente. In seguito, le cellule sono state lavate in PBS per rimuovere l'eccesso di agente fissativo e risospese in 120 μl di PBS in una cuvetta di quarzo per eseguire la lettura allo spettrofotometro. L'acquisizione degli spettri è stata effettuata impostando i seguenti parametri: intervallo dello spettro compreso tra 400 e 900 nm; larghezza di banda di 2 nm; velocità di scansione 400 nm/min con intervallo di 1 nm.

Gli spettri di estinzione ottica sono stati interpretati come somma di un empirico *background* determinato dalla popolazione di cellule e un'approssimazione numerica della banda plasmonica derivata da una soluzione colloide di nanocilindri d'oro. Quest'ultima è stata descritta come un integrale di linea di Gans (Pérez-Juste J. et al., 2005), usando la funzione dielettrica dell'oro da Etchegoin P.G. et al. (2006).

I dettagli di questo metodo si possono trovare in letteratura (Ratto F. et al., 2011; Matteini P. et al., 2012; Ratto F. et al., 2015).

3.6 Test di citotossicità.

La vitalità cellulare è stata valutata mediante il test WST-8 (*Cell counting kit-8*, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). Il sale di tetrazolio WST-8 (*2-(2-methoxy-4-nitrophenyl)-3-(4-nitrophenyl)-5-(2,4-disulfophenyl)-2H-tetrazolium, monosodium salt*), altamente idrosolubile, viene convertito dalle deidrogenasi mitocondriali delle cellule vive in formazano, un prodotto colorato giallo-arancione. L'assorbanza ottica del formazano può essere misurata spettrofotometricamente alla lunghezza d'onda di 460 nm e risulta direttamente proporzionale al numero di cellule vitali.

8×10^3 macrofagi sono stati coltivati in piastre da 96 pozzetti e successivamente incubati con 50, 100, 200, 400 μM Au di GNRs per 4-24-48-72-96 ore. Ogni campione è stato preparato in triplicato. Al termine del trattamento, ogni pozzetto è stato lavato con PBS e le cellule sono state incubate con 100 μl di terreno privo di siero, addizionato con 10% di WST-8, per 2-4 ore a 37°C.

Il formazano prodotto è stato quindi quantificato utilizzando un lettore di micropiastre (*LT-400 microplate reader*, Labtech, Bergamo, IT) a 460 nm (con λ_{rif} a 630 nm), sottraendo un bianco di riferimento. I risultati sono stati espressi come percentuale del segnale rispetto ai campioni di controllo, ovvero non trattati con GNRs.

3.7 Proliferazione cellulare.

La proliferazione cellulare è stata analizzata tramite test di incorporazione di timidina triziata (^3H timidina) nel DNA.

4×10^3 cellule sono state piastrate in triplicato in piastre da 96 pozzetti. Raggiunto l'80-90% di confluenza i macrofagi sono stati trattati con 100 e 400 μM Au di GNRs in SFM per 24 e 48 ore. Dopo 18 ore di incubazione con 2.5% di ^3H timidina (0.5 $\mu\text{Ci/ml}$), le cellule sono state raccolte su un filtro di carta con un *harvester* automatico (Micromate 196, Canberra Packard Inc., Meriden, CT, USA) e la timidina triziata incorporata nel DNA è stata quantificata utilizzando un beta-counter (Matrix 9600 Direct Beta Counter, Canberra Packard Inc., Meriden, CT, USA).

I risultati sono stati espressi come conta per minuto (cpm). L'indice mitogenico è stato misurato come rapporto tra il valore medio dei campioni trattati rispetto a quello del controllo.

3.8 Test di chemiotassi.

Il test di migrazione cellulare è stato eseguito mediante l'uso di supporti permeabili *Transwell*[®] (Costar[®], Corning Life Sciences, Lowell, MA, USA), costituiti da membrane di policarbonato di diametro di 6.5 mm e pori di 8 µm.

Una volta raggiunta la confluenza, i macrofagi sono stati incubati in SFM e quindi trattati con 100 e 400 µM Au di GNRs per 24 ore.

Dopo la raccolta, 2.5×10^4 cellule sono state risospese in 100 µl di terreno privo di siero e aggiunte nella parte superiore dell'inserito. Il compartimento inferiore è stato invece riempito con 600 µl di SFM (controllo negativo) o di terreno contenente 50 ng/ml di chemochina MIP-1α in presenza di 0.1% di BSA (*Bovine serum albumin*).

La piastra è stata incubata overnight a 37°C.

Al termine del periodo di stimolazione, il terreno è stato eliminato dalla parte interna dell'inserito e le cellule che non hanno migrato sono state rimosse con un bastoncino di cotone. Le restanti cellule sono state così fissate con 80 µl di una soluzione di paraformaldeide al 3.6% in PBS per 10 minuti e colorate con ematossilina-eosina.

Una volta fatti asciugare a temperatura ambiente, gli inserti sono stati osservati al microscopio ottico con un ingrandimento di 40X e le cellule contate scegliendo casualmente 5 campi ottici. Il numero totale di cellule che hanno migrato per inserto è stato calcolato dividendo la media del numero di cellule per l'area del campo ottico e moltiplicando il valore ottenuto per l'area totale dell'inserito.

La percentuale di migrazione è stata così ottenuta dividendo il numero totale di cellule per il numero di cellule piastrate e moltiplicando per 100.

Differenze tra i campioni stimolati e i rispettivi controlli sono state considerate significative per valori superiori al 20%.

3.9 Saggio immunoenzimatico ELISA

Il rilascio di citochine pro-infiammatorie nel surnatante di macrofagi murini è stato determinato utilizzando il saggio immunoenzimatico ELISA (*Enzyme-Linked Immuno-Sorbent Assay*), seguendo la procedura riportata nello specifico kit (Thermo Scientific, Pierce Biotechnology, Rockford, IL, USA).

In particolare, è stata testata la produzione di tre differenti citochine, IL-1 beta, IL-6 e TNF-alfa in seguito a stimolazione con LPS (50 µg/ml per 24 ore) in presenza o assenza di un pre-trattamento con GNRs (100 e 400 µM Au per 24 ore).

5×10^3 cellule sono state coltivate in una piastra da 96 pozzetti e lasciate aderire per 24 ore. Al termine dei trattamenti in SFM, il surnatante di ogni campione è stato raccolto, centrifugato e trasferito in nuovi tubi eppendorf.

Successivamente, 50-100 µl di ogni standard e di ogni campione sono stati aggiunti in duplicato in ciascun pozzetto della piastra pre-trattata con l'anticorpo primario.

La piastra è stata così ricoperta e incubata per 2 ore a 20-25°C. Sono stati eseguiti 3-5 lavaggi con lo specifico *wash buffer* e aggiunti ad ogni pozzetto 100 µl di anticorpo secondario biotinilato per 1 ora a temperatura ambiente. Dopo altri 3-5 lavaggi, sono stati incubati 100 µl di una soluzione contenente streptavidina coniugata all'enzima perossidasi per 30 minuti a temperatura ambiente. Sono stati effettuati nuovamente 3-5 lavaggi e i pozzetti trattati con 100 µl di substrato TMB (*3,3',5,5'-tetramethylbenzidine*) per 30 minuti al buio.

Terminato il periodo d'incubazione, 50-100 µl di una soluzione di blocco (0.2 M acido solforico) sono stati aggiunti per stoppare la reazione colorimetrica e l'assorbanza è stata immediatamente misurata a 450 nm (con riferimento a 550 nm) con un lettore di micropiastre.

Il contenuto di citochine presente nei campioni analizzati è stato quantificato interpolando i valori di assorbanza con la concentrazione della specifica citochina usando la curva di calibrazione tramite il software Origin (OriginLab Corporation, Northampton, MA, USA). Le concentrazioni delle citochine sono state espresse in pg/ml.

3.10 Analisi fotoacustica.

Le misure fotoacustiche sono state eseguite con un apparecchio commerciale di *imaging* fotoacustico (Vevo LAZR, VisualSonics Inc., Toronto, Canada) che genera immagini PA co-registrate con immagini delle strutture di fondo in modalità-B.

Una descrizione completa della progettazione del sistema è disponibile in Needles A. et al. (2010).

I segnali PA sono stati prodotti da un laser pulsato Nd:YAG (con frequenza 20 Hz e larghezza di impulso 6-8 ns) e sintonizzabile (da 680 a 970 nm) con un oscillatore ottico parametrico per illuminare il campione attraverso due fasci rettangolari di fibre ottiche posizionati su entrambi i lati di un trasduttore lineare (da 13 a 24 MHz e campo di vista 23 mm × 30 mm) con un angolo di 30 gradi rispetto al piano di *imaging*. Il tempo di acquisizione dello spettro di assorbimento è stato di circa 60 s per 146 lunghezze d'onda (ogni 2 nm). Per le misurazioni PA è stato utilizzato un dispositivo di plastica costituito da 6 micro-canali (μ -slide VI^{0.1}, Ibidi GmbH, Germania). Uno strato di 3 mm di materiale che mima il tessuto biologico, composto da polidimetilsilossano (PDMS) miscelato con TiO₂ (0.73 mg/ml) e inchiostro di china (0.25 mg/ml) è stato depositato sui canali della μ -slide durante le acquisizioni per evitare il rimodellamento delle nanoparticelle a causa dell'irraggiamento laser.

Una descrizione dettagliata sulla preparazione del materiale bio-mimetico è disponibile in Avigo C. et al. (2015).

Una curva di calibrazione è stata determinata utilizzando le seguenti concentrazioni crescenti di GNRs risospese in PBS: 0.1, 0.2, 0.4, 1, 2, 4, 10, 20, 40 mM Au. In seguito, sono stati acquisiti gli spettri di macrofagi (circa 10⁷/ml) incubati con 100, 200 e 400 μ M Au e fissati in paraformaldeide al 3.6% in PBS.

Per valutare la capacità di contrasto di GNRs in un fluido biologico, è stato condotto un esperimento analogo risospesando i nanocilindri d'oro (0.1, 0.2, 0.4, 1, 2 mM Au) e le cellule, precedentemente trattate con 100, 200, 400 μ M Au, in un campione di sangue prelevato da un volontario sano, previo consenso informato.

E' stata infine studiata la variazione dinamica del segnale PA nel tempo con una lunghezza d'onda fissata a 840 nm.

3.11 Analisi del contrasto mediante tomografia computerizzata.

Per investigare la capacità dei GNRs di assorbire i raggi X e dunque il loro eventuale potenziale come agenti di contrasto per TC, sono state eseguite delle scansioni con un tomografo preclinico multimodale ad alta risoluzione (IRIS PET/CT, Raytest, Inviscan Imaging System, Germania).

Una piastra da 96 pozzetti è stata allestita con diverse concentrazioni di GNRs (0.1, 0.2, 0.4, 1, 2, 4, 5, 10, 20, 40 mM Au) in sospensione e con macrofagi pre-trattati con 400 μ M Au per 24 ore (per un totale di circa 1.5×10^7 cellule fissate in 300 μ l di volume finale).

È stata acquisita anche una curva di calibrazione con Iodio (400 mg/ml, Iomeron®, Bracco, Italia) alle concentrazioni di 0.0315, 0.315, 3.15, 31.5, 315 mM.

Le scansioni sono state eseguite con un voltaggio di 80 kV, amperaggio di 1 mA e con un voxel di dimensione di 80 μ m. Il tempo di acquisizione è stato di circa 1 minuto per 1280 viste a 360°.

Una descrizione dettagliata ed una valutazione delle prestazioni dello scanner sono disponibili in Panetta D. et al. (2015).

Le immagini sono state ricostruite utilizzando un algoritmo di retroproiezione filtrata di Feldkamp (Feldkamp L.A. et al., 1984) su una *workstation* dedicata in cui i dati vengono trasferiti automaticamente ed elaborati alla fine di ogni studio. Tutte le immagini ricostruite sono misurate in unità Hounsfield e convertite nel formato standard DICOM (*Digital Imaging and COmmunications in Medicine*).

3.12 Brachiterapia con ¹⁹²Iridio.

1.2×10^4 cellule sono state coltivate in terreno completo contenente 25 mM di hepes (acido 4-2-idrossietil-1-piperazinil-etansolfonico, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) in piastre da 96 pozzetti per 24 ore. I macrofagi sono poi stati trattati per 24 ore con 100 e 400 μ M Au di GNRs-Mutab in terreno privo di siero ma addizionato con hepes. Sono stati preparati 6 campioni per ciascuna condizione.

Al termine dell'incubazione, i GNRs sono stati rimossi e l'avvenuto caricamento cellulare è stato controllato al microscopio ottico.

Una piastra è stata immediatamente irraggiata con 8 Gy di ¹⁹²Iridio (circa 2 ore d'esposizione) mentre una di controllo è stata mantenuta semplicemente fuori dall'incubatore senza esposizione ai raggi gamma.

L'irraggiamento è stato eseguito utilizzando un opportuno supporto in plexiglass costituito da solchi per l'alloggiamento della piastra e dei cateteri dell'apparecchio Selectron® LDR (*Low dose rate*) che consente il caricamento remoto della sorgente di Iridio. È stato preparato un piano di trattamento impartendo la dose ad una regione di 2.6 cm × 8 cm, usando 9 guide distanti tra loro 2.5 mm. Il piano di trattamento è stato programmato tramite il TPS (*Treatment planning system*, Oncentra® MasterPlan, Nucletron, Columbia, MD, USA), che stabilisce il tempo in cui la sorgente staziona in ciascuna posizione del catetere per avere una distribuzione uniforme della dose desiderata. E' stata ottenuta una disomogeneità solamente del 3%.

In figura 21, è mostrata la distribuzione di un piano di 8 Gy in una sezione trasversale, sagittale e coronale della piastra.

Dopo 24 e 48 ore dall'irraggiamento è stata valutata la vitalità cellulare con il test WST-8, precedentemente descritto. I risultati sono stati espressi come percentuale dell'assorbanza di formazano in campioni trattati rispetto al controllo negativo.

3.13 Analisi statistica.

I dati sperimentali mostrati sono espressi come valore medio ± deviazione standard ed analizzati con il test t di Student. Le differenze sono state considerate significative per valori di $p < 0.05$.

4. RISULTATI

4.1 Valutazione qualitativa dell'internalizzazione di GNRs.

Il processo d'internalizzazione dei nanocilindri d'oro è stato osservato tramite microscopia elettronica a trasmissione.

I macrofagi catturano le particelle per fagocitosi. La prima fase del meccanismo è rappresentata dall'estroflessione di pseudopodi in prossimità delle particelle (Figura 8, riquadri a e b). Successivamente, il *cluster* di particelle viene internalizzato in vescicole nel citoplasma (Figura 8, riquadri c e d).

Come è evidenziato in figura 8e, la forma cilindrica delle particelle si conserva all'interno delle vescicole.

La figura 8b mette chiaramente in evidenza il cambiamento di morfologia a cui va incontro una cellula durante la fagocitosi rispetto ad una che ha appena terminato il processo.

Come si osserva dalle immagini, le particelle sono ben visibili e possono essere rilevate facilmente al microscopio ottico, al microscopio confocale in trasmissione o al TEM senza l'ausilio di colorazioni (come ad esempio, il *silver staining*).

La figura 9 mette a confronto macrofagi caricati con 100 e 400 μM Au di GNRs-Mutab e GNRs-CPP rispetto a cellule di controllo.

4.2 Valutazione quantitativa dell'*uptake* intracellulare.

Il contenuto di GNRs a livello intracellulare è stato misurato per via spettrofotometrica.

È stato inizialmente investigato l'andamento del caricamento cellulare con GNRs-Mutab in funzione della concentrazione (4, 10, 40, 100, 400 $\mu\text{M Au}$) ad un tempo stabilito di 24 ore.

Come mostrato dagli spettri di estinzione ottica, cellule trattate con GNRs cationiche esibiscono due bande, a circa 520 nm ed intorno a 780 nm, che rappresentano rispettivamente le componenti trasversali e longitudinali, tipiche delle oscillazioni plasmoniche (Figura 10A, linea tratteggiata).

È stato dimostrato che la quantità di nanoparticelle d'oro all'interno delle cellule può essere determinata a partire dalla concentrazione di 10 $\mu\text{M Au}$ e che l'assorbanza ottica cresce linearmente all'aumentare della concentrazione di oro, mostrando una chiara e distinta banda plasmonica a 780 nm alla dose di 400 $\mu\text{M Au}$ (Figura 10A).

Dall'analisi degli spettri ottenuti, è stato possibile stimare la massa di oro ed il numero di particelle per cellula. Ad esempio, dopo un'incubazione di 24 ore con 100 e 400 $\mu\text{M Au}$ di GNRs-Mutab, ciascuna cellula contiene circa 2 e 8 pg di Au (Figura 10B), che corrispondono a 6×10^4 e 2×10^5 particelle, rispettivamente (Figura 10C).

In seguito, è stato analizzato il processo di *uptake* in funzione del tempo alle concentrazioni scelte di 100 e 400 $\mu\text{M Au}$.

La figura 11A mette chiaramente in evidenza come il processo di internalizzazione di GNRs-Mutab inizi già dopo 30 minuti d'incubazione e cresca progressivamente nel tempo fino a 24 ore.

Il contenuto di oro ed il numero di particelle all'interno delle cellule aumentano notevolmente al trascorrere del tempo, raggiungendo risultati analoghi a quelli precedente descritti, dopo 24 ore di trattamento (Figure 11B e C).

Il caricamento di macrofagi in seguito ad esposizione con 100 e 400 $\mu\text{M Au}$ di GNRs-CPP mostra una cinetica più lenta rispetto alle particelle rivestite con Mutab, risultando difatti apprezzabile dopo 2 ore di trattamento e raggiungendo una saturazione intorno a 32 ore (Figura 12A). La forma dello spettro di assorbimento

dopo 32 ore di incubazione, rappresentata da un allargamento della banda e uno spostamento verso 800 nm (rispetto a 730 nm degli altri spettri), indica una lieve aggregazione plasmonica.

Anche in seguito a somministrazione di GNRs-CPP, la quantità di oro per cellula aumenta progressivamente in funzione del tempo e della concentrazione. A 32 ore d'incubazione la massa di Au è intorno a 1.5 pg/cellula e 3.5 pg/cellula per 100 e 400 μM Au, rispettivamente (Figura 12B).

Sono stati inoltre eseguiti esperimenti di *uptake* con nanocilindri PEGilati ma non coniugati a molecole cationiche, alla concentrazione massima di 400 μM Au per 18-24-48-72 ore.

È importante sottolineare che la mancata funzionalizzazione delle particelle, seppur aspecifica, non ha permesso l'ingresso dei nanocilindri all'interno delle cellule.

Non è stato infatti possibile rilevare il contenuto di oro nei macrofagi. Gli spettri di estinzione ottica ottenuti hanno mostrato un andamento paragonabile a quello tipico della condizione di controllo (ovvero cellule non esposte a nanoparticelle), non presentando alcuna banda plasmonica.

4.3 Effetto dei GNRs sulla vitalità cellulare.

In una prima serie di esperimenti è stato valutato l'eventuale effetto tossico indotto dal trattamento di macrofagi murini con dosi crescenti di nanoparticelle (50, 100, 200, 400 μM Au) per 4-24-48-72-96 ore, attraverso il test di citotossicità WST-8, più sensibile del convenzionale test MTT.

Come illustrato nella figura 13A, la somministrazione di GNRs-CPP non determina alcuna tossicità ad ogni concentrazione testata fino a 4 giorni d'esposizione.

Al contrario, è stato riscontrato che il trattamento con GNRs-Mutab non mostra segni di citotossicità significativa fino a 48 ore ma un'esposizione prolungata (72 e 96 h) induce una marcata sofferenza cellulare con riduzione della vitalità del 50-90% (Figura 13B).

Sulla base di questi risultati, è stato scelto il trattamento di 24 ore con 100 e 400 μM Au di GNRs come protocollo ottimale per gli esperimenti successivi.

4.4 Effetto dei GNRs sulla proliferazione cellulare.

Per avere conferma che il trattamento con GNRs non influenzi l'attività proliferativa delle cellule J774A.1 è stato eseguito il test d'incorporazione di timidina triziata nel DNA dopo 24 e 48 ore d'incubazione con GNRs alle concentrazioni di 100 e 400 μM Au.

Come mostrato nella figura 14, sia la somministrazione di GNRs-CPP che di GNRs-Mutab non sembra compromettere né promuovere la capacità di sintesi del DNA, che risulta difatti paragonabile ai rispettivi campioni di controllo, ad ogni concentrazione e tempo studiato.

È da sottolineare che l'esposizione a 400 μM Au GNRs-Mutab, provoca una riduzione lieve ma non significativa dell'indice mitogenico, che è infatti risultato essere circa 0.88 e 0.85, per 24 e 48 ore, rispettivamente. Questo effetto correla con i risultati ottenuti tramite il test di citotossicità.

4.5 Effetto dei GNRs sulla migrazione cellulare.

Per stabilire se i nanocilindri d'oro siano in grado di modulare le funzioni pro-infiammatorie dei macrofagi, sono stati valutati gli effetti del trattamento dei due tipi di particelle su alcune delle principali attività biologiche di tale tipo cellulare.

In particolare, per analizzare gli effetti dei GNRs sulla migrazione è stato allestito un test di chemiotassi utilizzando inserti permeabili *Transwell*®.

La condizione di controllo è rappresentata dalla sola presenza di terreno privo di siero, in cui le cellule, non ricevendo alcuno stimolo chemiotattico, presentano bassi livelli di motilità.

Analogamente, il solo trattamento con GNRs in assenza di chemochina non promuove la migrazione cellulare, dimostrando che le nanoparticelle non inducono l'attivazione di una risposta pro-infiammatoria.

Come atteso, l'incubazione delle cellule con la chemochina MIP-1 α (50 ng/ml) esercita un aumento significativo della chemiotassi (Figura 15); un effetto analogo si osserva esponendo i macrofagi caricati con i due tipi di nanocilindri d'oro a MIP-1 α .

Come risulta evidente, i GNRs non esplicano un'azione inibitoria sulla chemiotassi dei macrofagi, ad entrambe le concentrazioni testate.

4.6 Effetto dei GNRs sul rilascio di citochine pro-infiammatorie.

La produzione e la secrezione di IL-6, TNF- α e IL-1 β nel surnatante di macrofagi murini è stata determinata con l'utilizzo di specifici kit ELISA.

Cellule J774A.1 trattate con LPS per 24 ore hanno prodotto livelli elevati di IL-6 (circa 970 pg/ml), intermedi di TNF- α (650 pg/ml) e bassi di IL-1 β (240 pg/ml).

Il pre-trattamento di 24 ore con 100 e 400 μ M Au di GNRs non ha indotto alcun cambiamento significativo nella capacità delle cellule di sintetizzare citochine, in seguito ad uno stimolo pro-infiammatorio (Figura 16). Ciò dimostra che i macrofagi caricati con nanocilindri plasmonici sono in grado di attivarsi dopo opportuna stimolazione con LPS, in modo paragonabile alle cellule di controllo.

Non è stato possibile determinare i livelli di ciascuna citochina nei campioni costituiti da cellule non trattate o trattate con 100 e 400 μ M Au di GNRs in assenza di LPS. Questo risultato conferma ulteriormente che entrambi i tipi di particelle testate non promuovono l'attivazione di processi infiammatori in macrofagi murini.

4.7 Analisi fotoacustica in presenza di GNRs.

La capacità dei nanocilindri d'oro di generare un segnale fotoacustico è stata investigata utilizzando un apparecchio commerciale di *imaging* PA progettato per test preclinici.

La figura 17A mostra gli spettri fotoacustici di concentrazioni crescenti di GNRs-Mutab (da 0.1 a 40 mM Au in PBS), dal basso verso l'alto. Come è possibile osservare, le particelle esibiscono la loro caratteristica banda longitudinale intorno a 840 nm.

Il segnale PA è rilevabile a partire dalla concentrazione di 100 μ M Au e cresce all'inizio con andamento lineare e poi esponenziale con l'aumentare della dose. L'intensità di segnale è infatti proporzionale alla concentrazione di GNRs e raggiunge una saturazione esponenziale intorno a 40 mM Au (Figura 17B).

La figura 18A mostra invece gli spettri PA prodotti da macrofagi pre-trattati con 100, 200, 400 μM Au per 24 ore. Le cellule di controllo presentano un andamento sovrapponibile a quello del PBS.

Anche in questo caso, i GNRs internalizzati nelle cellule sono in grado di generare un segnale fotoacustico che incrementa con il dosaggio.

La forma degli spettri PA si discosta leggermente da quella degli spettri di estinzione ottica, probabilmente a causa dell'elevata densità delle particelle, e possibile aggregazione plasmonica, all'interno delle vescicole endocitiche. Il caricamento cellulare non sembra però alterare le proprietà ottiche e PA dei GNRs.

Il segnale PA dei macrofagi correla con il numero di particelle per cellula e si inserisce correttamente nella curva di calibrazione (Figura 18B).

Allo scopo di valutare la capacità di contrasto dei nanocilindri d'oro in un fluido biologico, è stato condotto un esperimento analogo risospendendo in un campione di sangue umano i GNRs (da 0.1 a 2 mM Au) e i macrofagi pre-trattati con 100, 200, 400 μM Au.

Anche in questo caso i segnali fotoacustici generati dai nanocilindri sono ben rilevabili e aumentano linearmente con la concentrazione. Un risultato simile è stato riscontrato per i campioni cellulari. L'intensità del segnale fotoacustico concorda dunque con il contenuto di oro. Per esempio, è stato calcolato che il campione pre-trattato con 400 μM Au corrisponde alla concentrazione di (2.3 ± 0.5) mM Au.

In figura 19A sono riportati alcuni spettri PA rappresentativi rispetto al *background* (solo sangue). Lo spettro PA del sangue esibisce l'impronta tipica dell'emoglobina ossigenata.

Sulla base dei dati ottenuti, si può affermare che il limite di rilevamento dei macrofagi resta al di sotto di 100 μM Au, anche in un fluido biologico.

Nelle immagini 19B e C è possibile osservare il segnale prodotto dai nanocilindri risospesi in PBS o in sangue.

Infine, dall'analisi della variazione dinamica del segnale PA, quest'ultimo è risultato stabile a 840 nm in tutte le acquisizioni eseguite.

4.8 Valutazione del contrasto da parte di GNRs mediante TC.

Allo scopo di stabilire se i nanocilindri plasmonici siano capaci di attenuare la radiazione X e possano essere rilevati in profondità all'interno dei tessuti biologici, è stato analizzato il contrasto prodotto dai GNRs-Mutab tramite un tomografo PET/CT destinato a un uso preclinico.

In figura 20A è riportato il segnale generato dall'assorbimento di raggi X da parte di concentrazioni crescenti di GNRs-Mutab (0.1-40 mM Au), espresso in unità Hounsfield. Il segnale cresce con l'aumentare della concentrazione di oro ad un tasso di $(1.6 \pm 0.2) \times 10^3 \text{ HU/M}_{\text{Au}}$, arrivando intorno a 800 HU alla dose più alta.

Nel riquadro in alto a sinistra è mostrata l'ottimizzazione del segnale TC in funzione del voltaggio (80, 100, 120 kV) eseguita con una TC clinica. È possibile constatare che l'assorbimento della radiazione da parte di 40 mM Au di GNRs diminuisce progressivamente all'incrementare del voltaggio, dimostrando che il parametro ideale è 80 kV.

Il cerchio nero rappresenta il campione di macrofagi pre-trattati con 400 μM Au per 24 ore, che corrisponde complessivamente a 5.4 mM Au. Come è possibile osservare, il segnale TC rispecchia la concentrazione totale nel campione cellulare.

L'intensità del contrasto prodotto dallo iodio è riportata nel grafico della figura 20B. A parità di concentrazione la capacità di attenuazione della radiazione X da parte di GNRs e iodio è comparabile.

La figura 20C mostra l'immagine del fantoccio preparato con cellule caricate con GNRs (400 μM Au), GNRs in sospensione (4 mM Au) e diluizioni scalari (1:10) di iodio in PBS. La dose più alta di iodio (315 mM) corrisponde ad un ordine di grandezza inferiore alla concentrazione impiegata quotidianamente in clinica ed esercita un marcato contrasto. Purtroppo la preparazione di una concentrazione corrispondente di GNRs richiede una grossa quantità di materiale che complica notevolmente il processo di sintesi e potrebbe alterare la stabilità delle particelle. Per questi motivi non è stato possibile confrontare l'efficienza di contrasto dei nanocilindri d'oro ad un dosaggio così elevato.

4.9 Valutazione del trattamento combinato di raggi γ e GNRs.

La vitalità cellulare di campioni incubati con GNRs-Mutab è stata valutata mediante il test WST-8 dopo 24 e 48 ore dall'irraggiamento con ^{192}Ir .

Il trattamento con iridio, alla dose di 8 Gy, induce una significativa riduzione della vitalità cellulare rispetto ai controlli non irraggiati.

In particolare, dopo 24 ore dal trattamento brachiterapico il numero di cellule vive è sceso al 75.4% e dopo 48 ore al 58.4% (Figura 22).

Nei campioni incubati con 100 μM Au GNRs e successivamente sottoposti ad irraggiamento è stata riscontrata una consistente riduzione della vitalità cellulare rispetto alle cellule trattate solamente con 100 μM Au. Questi risultati sono però paragonabili a quelli ottenuti irraggiando le cellule non caricate con nanocilindri d'oro.

Macrofagi pre-trattati con 400 μM Au GNRs mostrano una vitalità cellulare del 48.4% e 34.7%, dopo 24 e 48 ore dall'irraggiamento. Questo marcato decremento è risultato significativo rispetto sia ai campioni trattati solamente con 400 μM Au che al controllo irraggiato. Ciò sembra dunque indicare che i nanocilindri d'oro sono in grado di potenziare l'effetto della dose d'irraggiamento di 1.5 (a 24 ore) e 1.7 volte (a 48 ore) rispetto al solo trattamento con Iridio.

5. DISCUSSIONE

Presso l'Istituto di Fisica Applicata "Nello Carrara" del Consiglio Nazionale delle Ricerche di Sesto Fiorentino sono stati messi a punto nuovi approcci per la sintesi e la modificazione superficiale di sospensioni colloidali acquose di nanoparticelle d'oro.

In particolare, due tipi di nanocilindri d'oro coniugati a due diverse molecole cationiche, Mutab e CPP, sono stati oggetto di questo studio.

Una delle principali questioni che richiede di essere affrontata prima di una seria applicazione biomedica è quella rappresentata dalla modalità di internalizzazione delle nanoparticelle all'interno delle cellule e la loro successiva localizzazione.

In base a quanto osservato al TEM e in trasmissione al microscopio confocale i macrofagi J774A.1 internalizzano i nanocilindri plasmonici tramite il processo di fagocitosi. Le particelle restano localizzate nel citoplasma in prossimità del nucleo e mantengono la loro forma all'interno delle vescicole.

Questi dati confermano quanto riportato da altri gruppi di ricerca che hanno studiato il processo di captazione delle particelle da parte di macrofagi (Krpetic Z. et al., 2010) o altri tipi cellulari (Chithrani B.D. et al., 2007; Khan J.A. et al., 2007; Nativo P. et al., 2008).

Come mostrato dagli spettri di estinzione ottica, analizzati nel corso degli esperimenti di *uptake* cellulare, entrambe le particelle presentano le caratteristiche plasmoniche tipiche della forma a cilindro (una banda trasversale a 520 nm e una longitudinale intorno a 800 nm) che conferisce loro peculiari proprietà ottiche (Ratto F. et al., 2010).

Sono stati eseguiti esperimenti di caricamento cellulare sia in funzione della concentrazione che del tempo. Il numero di particelle per cellula aumenta linearmente con la concentrazione e va incontro ad una saturazione esponenziale con il tempo.

I GNRs-CPP mostrano una cinetica di *uptake* più lenta rispetto ai GNRs-Mutab, raggiungendo, ad esempio, un contenuto di oro di 3 e 8 pg/ml dopo 24 ore d'incubazione alla concentrazione massima testata (400 μ M Au), rispettivamente.

Ciò può essere attribuito alla diversa carica elettrostatica presente sulla superficie delle particelle. Il potenziale Z è stato misurato mediante DLS (*Dynamic Light Scattering*), il cui valore medio è risultato essere (-5 ± 3) mV per i GNRs-CPP e (20.4 ± 0.5) mV per i GNRs-Mutab. Le particelle rivestite con il Mutab sono quindi più stabili in sospensione e possiedono un'ammina quaternaria che conferisce una carica positiva maggiore rispetto al peptide CPP, favorendo così una elevata e più rapida captazione cellulare.

Se da un lato il Mutab sembra fornire un importante vantaggio, dall'altro l'accumulo massivo all'interno delle cellule sembra produrre un marcato effetto citotossico dopo incubazioni a lungo termine (72 e 96 ore). Tale evento non è stato in alcun modo riscontrato in seguito a trattamento con particelle legate al CPP.

Risultati analoghi sono stati ottenuti analizzando l'attività proliferativa di cellule esposte ai GNRs per 24 e 48 ore. La somministrazione di entrambe le particelle non interferisce con la capacità di sintesi del DNA e pertanto non compromette la replicazione cellulare. Inoltre, i GNRs non sembrano nemmeno attivare la proliferazione, che è infatti risultata paragonabile ai campioni di controllo.

Negli ultimi due decenni molti studi si sono incentrati sulla valutazione degli eventuali aspetti citotossici delle nanoparticelle e sulla loro biocompatibilità, in base alla loro dimensione (Service R.F., 2000; Pan Y. et al., 2007), forma (Lam C.W. et al., 2004; Warheit D.B. et al., 2004; Mustafa D.E. et al., 2010) e modificazione chimica superficiale (Hoshino A. et al., 2004; Rayn J.A. et al., 2007; Sun L. et al. 2008).

I dati che emergono dalla letteratura scientifica sono controversi e spesso difficili sono le interpretazioni dei risultati e il loro confronto tra i vari gruppi di ricerca.

Comunque, i possibili effetti dannosi possono essere ridotti o minimizzati scegliendo un protocollo ottimale di trattamento.

Il rivestimento con PEG o con materiali biocompatibili migliora sicuramente la tollerabilità (Leonov A.P. et al., 2008; Lau I.P. et al., 2012; Dinish U.S. et al., 2013) e la stabilità delle particelle (Zhang G. et al., 2009; Rayavarapu R.G. et al., 2010).

Evidenze sperimentali hanno messo in luce che le particelle PEGilate prive di funzionalizzazione non vengono captate dalle cellule del sistema reticolo-endoteliale, al punto tale che molti ricercatori utilizzano frequentemente il PEG per prolungare la circolazione delle particelle nel sangue durante test *in vivo* (Kawano T. et al., 2006; Akiyama Y. et al., 2009; Liu X. et al., 2014). Anche le nostre particelle rivestite unicamente da glicole polietilenico non vengono internalizzate dai macrofagi nemmeno dopo 72 ore d'incubazione alla concentrazione di 400 μM Au.

Sebbene il nostro gruppo di ricerca non abbia investigato in maniera approfondita la causa e le modalità con cui venga indotta tossicità, riteniamo che possa essere imputata ai reagenti utilizzati durante il processo di sintesi delle particelle.

Primo tra tutti il CTAB che, nonostante le molteplici centrifugazioni, può non essere del tutto rimosso e venire di conseguenza rilasciato nel terreno di coltura o all'interno delle cellule. Benché il CTAB sia strettamente necessario nella fase di elongazione e stabilizzazione dei nanocilindri, la sua tossicità è infatti nota (Niidome T. et al., 2006; Ray P.C. et al., 2009).

Altri meccanismi biologici alla base della tossicità delle particelle sembrano risiedere nell'induzione dello stress ossidativo (Li J.J. et al., 2008) e nel rilascio di ossido nitrico (Jia H.Y. et al., 2009).

Nonostante i numerosi rapporti sulla citotossicità di nanoparticelle d'oro cationiche e anioniche funzionalizzate (Goodman C.M. et al., 2004; Connor E.E. et al., 2005), poca attenzione è stata focalizzata sulla risposta immunologica di cellule esposte a nanoparticelle d'oro.

Per stabilire se i nostri nanocilindri d'oro fossero in grado di modulare le funzioni pro-infiammatorie dei macrofagi, sono stati valutati gli effetti del loro trattamento sulla chemiotassi e sulla produzione di citochine.

Dai risultati conseguiti è possibile affermare che, in seguito ad opportuno stimolo chemiotattico, la migrazione di macrofagi caricati con 100 e 400 μM Au di GNRs non

subisce alcuna forma d'inibizione, risultando difatti paragonabile al controllo positivo.

Questi dati concordano con altri studi riportati in letteratura in cui la captazione di differenti forme di particelle non altera la capacità migratoria di altri tipi cellulari (Madsen S.J. et al., 2012; Schnarr K. et al. 2013).

Analogamente, è stato riscontrato che i medesimi pre-trattamenti di 24 ore con GNRs non inducono alcun decremento significativo nella sintesi e nel rilascio di IL-1 β , IL-6, e TNF- α , in seguito a stimolazione con LPS.

È inoltre importante sottolineare che il semplice trattamento con i GNRs non promuove una risposta pro-infiammatoria in macrofagi murini, in assenza di MIP-1 α o LPS. La funzionalizzazione di nanoparticelle con specifici peptidi può però indurre l'attivazione di macrofagi (Bastus N.G. et al., 2009) e cellule dendritiche derivanti da midollo osseo (Niikura K. et al., 2013).

È stato inoltre verificato che i GNRs-Mutab in soluzione o all'interno di macrofagi sono in grado di generare un segnale fotoacustico.

L'intensità di tale segnale è risultata direttamente proporzionale alle concentrazioni di GNRs analizzate e ha mostrato una saturazione esponenziale con l'incremento della dose, rispecchiando l'assorbimento della fluenza ottica da parte delle particelle. È stata anche appurata la capacità di contrasto di macrofagi caricati con GNRs in un fluido biologico. Tutti i dati dimostrano che i macrofagi J774A.1 sono rilevabili senza ambiguità in un fantoccio che mima i vasi sanguigni periferici a partire da una concentrazione di trattamento di 100 μ M Au.

Questi risultati sono particolarmente promettenti, considerando che talvolta i macrofagi associati al tumore possono costituire fino al 50% del compartimento cellulare in una lesione maligna (Loeffler D.A. et al., 1990; Lewis C.E. et al., 1995).

La forma degli spettri PA di macrofagi caricati con particelle plasmoniche si discosta leggermente da quella degli spettri di estinzione ottica (maggiore larghezza del picco e spostamento verso 850 nm), probabilmente a causa dell'elevata densità delle particelle, e possibile aggregazione plasmonica, all'interno delle vescicole endocitiche.

Quando si verificano fenomeni di aggregazione le particelle perdono i loro comportamenti ottici a causa dell'accoppiamento plasmonico. Ciò potrebbe verificarsi facilmente all'interno delle vescicole per colpa del confinamento ristretto a cui sono sottoposti i *cluster* di particelle.

Per ovviare a questo evento, potrebbe risultare interessante l'introduzione della silice (SiO_2), in grado di separare fisicamente le particelle le une dalle altre ed aumentarne la stabilità, prevenendo così l'aggregazione.

Molti autori infatti hanno proposto la silanizzazione come soluzione per preservare le caratteristiche plasmoniche dei nanocilindri d'oro (Rodríguez-Fernández J. et al., 2007; Veith G.M. et al., 2009; Son M. et al., 2014).

Al momento nel nostro laboratorio sono in corso studi sulla sintesi di GNRs con differenti spessori di silice (5 e 30 nm) e test preliminari di *uptake* e citotossicità in macrofagi J774A.1 (Lai S. et al., 2015).

In alcuni nostri recenti lavori è stata dimostrata la fotostabilità di particelle coniugate a Mutab in seguito ad irraggiamento con un laser pulsato e la loro capacità di conversione fotoacustica dopo inclusione in chitosano, uno *scaffold* biomimetico (Cavigli L. et al., 2014; Cavigli L. et al., 2015). L'irraggiamento con 500 impulsi ad una fluena di 5 mJ/cm^2 non ha provocato alcun cambiamento di forma dei nanocilindri.

Le nanoparticelle rivestite con Mutab possono quindi essere considerate promettenti agenti di contrasto per tecniche di *imaging* biomedico, che si basano su modalità di assorbimento ottico. Anche altre forme di particelle possono emettere segnali fotoacustici (Pan D. et al., 2013).

In un lavoro del 2009 di G. von Maltzahn e suoi collaboratori è stato presentato un tipo di nanoparticelle d'oro molto simile al nostro per forma e dimensioni, in grado però di assorbire la radiazione X due volte di più rispetto allo iodio.

Al contrario, i nostri esperimenti hanno messo in evidenza un assorbimento di raggi X da parte di nanocilindri d'oro comparabile allo iodio a parità di dosaggio.

Ciò può derivare dal fatto che ci siamo focalizzati su un regime di concentrazioni di oro più basso ma maggiormente accessibile all'impiego di vettori cellulari mentre il

gruppo di von Maltzahn è arrivato a testare dosi di 0.1-1 M Au, assolutamente non compatibili con un caricamento cellulare ottimale (privo di tossicità).

D'altra parte sebbene le nostre particelle siano in grado di attenuare i raggi X, la concentrazione di GNRs necessaria per ottenere un contrasto significativo e rilevante in clinica sarebbe molto elevata e difficilmente producibile in termini di materiale, stabilità plasmonica, convenienza e costi.

In letteratura è inoltre presente una grossa mole di dati relativi al possibile utilizzo di nanoparticelle d'oro come agenti radiosensibilizzanti (Chithrani D.B. et al., 2010; Hainfeld J.F. et al., 2010; Ngwa W. et al., 2013).

Il trattamento combinato di nanoparticelle d'oro e radiazione X o gamma sembra amplificare l'effetto della radioterapia, contrastando efficacemente la progressione di tumori in studi condotti *in vivo* (Hainfeld J.F. et al., 2004; Chang M.Y. et al., 2008; Lechtman E. et al., 2011).

I nostri risultati sperimentali confermano l'abilità di nanocilindri plasmonici di potenziare l'effetto della dose brachiterapica alla concentrazione di 400 μ M Au.

In conclusione, durante questo progetto di tesi sono stati prodotti e caratterizzati due tipi di nanocilindri d'oro cationici biocompatibili, che non compromettono le funzioni vitali, replicative ed infiammatorie di macrofagi murini.

Entrambi i nanocilindri non promuovono l'attivazione delle cellule in assenza di stimoli pro-infiammatori.

Cellule caricate con GNRs mantengono le proprie caratteristiche morfologiche e funzionali. Preservano la loro capacità di migrazione dopo opportuno stimolo chemiotattico e possono essere utilizzate come vettori cellulari in strategie di *targeting* tumorale in teranostica.

Le particelle hanno dimostrato un'elevata stabilità sia in soluzione che dopo internalizzazione cellulare, conservando le loro caratteristiche fisico-chimiche e pertanto le loro proprietà ottiche e fotoacustiche. Possono essere considerati promettenti agenti di contrasto per modalità di *imaging* che si basano su proprietà ottiche ed eventualmente permettere il *tracking* di vettori cellulari plasmonici.

Infine, i GNRs possono essere sfruttati per potenziare la distruzione di tumori aggressivi, resistenti alla radioterapia classica.

In base a quanto appena discusso è possibile affermare che i nostri nanocilindri d'oro sono altamente versatili e possono essere utilizzati in svariate applicazioni biomediche in modo efficace.

6. BIBLIOGRAFIA

Aaron J, de la Rosa E, Travis K, Harrison N, Burt J, José-Yacamán M, Sokolov K. Polarization microscopy with stellated gold nanoparticles for robust monitoring of molecular assemblies and single biomolecules. *Opt Express* 2008; **16**(3):2153-2167.

Acímović SS, Ortega MA, Sanz V, Berthelot J, Garcia-Cordero JL, Renger J, Maerkl SJ, Kreuzer MP, Quidant R. LSPR Chip for Parallel, Rapid, and Sensitive Detection of Cancer Markers in Serum. *Nano Lett.* 2014; **14**(5):2636-2641.

Aderem A, Underhill DM. Mechanisms of phagocytosis in macrophages. *Annu. Rev. Immunol.* 1999; **17**:593-623.

Ahmed K, Zaidi SF. Treating cancer with heat: hyperthermia as promising strategy to enhance apoptosis. *J Pak Med Assoc.* 2013; **63**(4):504-508.

Ahn S, Jung SY, Lee SJ. Gold nanoparticle contrast agents in advanced X-ray imaging technologies. *Molecules* 2013; **18**:5858-5890.

Akira S, Taga T, Kishimoto T. Interleukin-6 in biology and medicine. *Adv Immunol.* 1993; **54**:1-78.

Akiyama Y, Mori T, Katayama Y, Niidome T. The effects of PEG grafting level and injection dose on gold nanorod biodistribution in the tumor-bearing mice. *Journal of Controlled Release* 2009; **139**(1):81-84.

Alkilany AM, Murphy CJ. Toxicity and cellular uptake of gold nanoparticles: what we have learned so far? *J Nanopart Res.* 2010; **12**(7):2313-2333.

Alon R, Feigelson S. From rolling to arrest on blood vessels: leukocyte tap dancing on endothelial integrin ligands and chemokines at sub-second contacts. *Semin Immunol.* 2002; **14**(2):93-104.

Amara I, Touati W, Beaune P, de Waziers I. Mesenchymal stem cells as cellular vehicles for prodrug gene therapy against tumors. *Biomaterials* 2011; **32**:2540-2545.

Arend WP. Interleukin-1 receptor antagonist. *Adv Immunol.* 1993; **54**:167-227.

Arruebo M, Valladares M, González-Fernández A. Antibody-Conjugated Nanoparticles for Biomedical Applications. *Journal of Nanomaterials* 2009; **2009**:439389.
<http://dx.doi.org/10.1155/2009/439389>.

Au L, Zhang Q, Cobley CM, Gidding M, Schwartz AG, Chen J, Xia Y. Quantifying the cellular uptake of antibody-conjugated Au nanocages by two-photon microscopy and inductively coupled plasma mass spectrometry. *ACS Nano* 2010; **4**(1):35-42.

Avigo C, Di Lascio N, Armanetti P, Kusmic C, Cavigli L, Ratto F, Meucci S, Masciullo C, Cecchini M, Pini R, Faita F, Menichetti L. Organosilicon phantom for photoacoustic imaging. *Journal of Biomedical Optics* 2015; **20**(4):046008.

Baptista P, Pereira E, Eaton P, Doria G, Miranda A, Gomes I, Quaresma P, Franco R. Gold nanoparticles for the development of clinical diagnosis methods. *Anal Bioanal Chem.* 2008; **391**(3):943-950.

- Barbosa S, Agrawal A, Rodríguez-Lorenzo L, Pastoriza-Santos I, Alvarez-Puebla RA, Kornowski A, Weller H, Liz-Marzán LM. Tuning size and sensing properties in colloidal gold nanostars. *Langmuir* 2010; **26**(18):14943-14950.
- Baschong W, Wrigley NG. Small colloidal gold conjugated to Fab fragments or to immunoglobulin G as high-resolution labels for electron microscopy: a technical overview. *J Electron Microsc. Tech.* 1990; **14**(4):313-23.
- Bastús NG, Sánchez-Tilló E, Pujals S, Farrera C, Kogan MJ, Giralt E, Celada A, Lloberas J, Puentes V. Peptides conjugated to gold nanoparticles induce macrophage activation. *Mol Immunol.* 2009; **46**(4):743-748. doi: 10.1016/j.molimm.2008.08.277.
- Bauer LA, Birenbauma NS, Meyer GJ. Biological applications of high aspect ratio nanoparticles. *J. Mater. Chem.* 2004; **14**:517-526.
- Beard P. Biomedical photoacoustic imaging. *Interface Focus* 2011; **1**(4):602-631.
- Beutler B. Endotoxin, Toll-like receptor 4 and the afferent limb of innate immunity. *Curr. Opin. Microbiol.* 2000; **3**:23-38.
- Bielinska A, Eichman JD, Lee I, Baker JR, Balogh LJ. Imaging Au-0-PAMAM gold dendrimer nanocomposites in cells. *J Nanopart Res* 2002; **4**:395-403.
- Bogdan C, Rollinghoff M, Diefenbach A. Reactive oxygen and reactive nitrogen intermediates in innate and specific immunity. *Curr. Opin. Immunol.* 2000; **12**:64-76.
- Börset M, Medvedev AE, Sundan A, Espevik T. The role of the two TNF receptors in proliferation, NF-kappa B activation and discrimination between TNF and LT alpha signalling in the human myeloma cell line OH-2. *Cytokine* 1996; **8**(6):430-438.
- Bowie A, O'Neill LA. The interleukin-1 receptor/Toll-like receptor superfamily: signal generators for pro-inflammatory interleukins and microbial products. *J Leukoc Biol.* 2000; **67**(4):508-514.
- Bulte JWM. Science to practice: can CT be performed for multicolor molecular imaging? *Radiology* 2010; **256**(3):675-676.
- Byrne JD, Betancourt T, Brannon-Peppas L. Active targeting schemes for nanoparticle systems in cancer therapeutics. *Advanced Drug Delivery Reviews.* 2008; **60**:1615-1626.
- Carter JD, Cheng NN, Qu Y, Suarez GD, Guo T. Nanoscale energy deposition by x-ray absorbing nanostructures. *J Phys Chem. B* 2007; **111**:11622-11625.
- Cavigli L, de Angelis M, Ratto F, Matteini P, Rossi F, Centi S, Fusi F, Pini R. Size Affects the Stability of the Photoacoustic Conversion of Gold Nanorods. *J. Phys. Chem. C* 2014; **118**(29):16140-16146. doi: 10.1021/jp502647p
- Cavigli L, Ratto F, Tatini F, Matteini P, Cini A, Giovannelli I, de Angelis M, Rossi F, Centi S, Pini R. The influence of cellular uptake on gold nanorods photostability and photoacoustic conversion efficiency. *Proceedings of SPIE - The International Society for Optical Engineering* 2015; **9323**:932346. doi: 10.1117/12.2077632
- Centi S, Tatini F, Ratto F, Gnerucci A, Mercatelli R, Romano G, Landini I, Nobili S, Ravalli A, Marrazza G, Mini E, Fusi F, Pini R. In vitro assessment of antibody-conjugated gold nanorods for systemic injections. *Journal of Nanobiotechnology* 2014; **12**:55-65.
- Chang MY, Shiau AL, Chen YH, Chang CJ, Chen HH, Wu CL. Increased apoptotic potential and dose-enhancing effect of gold nanoparticles in combination with single-dose clinical electron beams on tumor-bearing mice. *Cancer Sci.* 2008; **99**(7):1479-1484.

- Chatterjee S, Krikorian M, Gafney HD, Gersten B. Synthesis and self-assembly of lipid (DMPC)-conjugated gold nanoparticles. *MRS Proceedings* 2008; **1061**.
doi: <http://dx.doi.org/10.1557/PROC-1061-MM09-08>.
- Chen CD, Cheng SF, Chau LK, Wang CR. Sensing capability of the localized surface plasmon resonance of gold nanorods. *Biosens Bioelectron.* 2007; **22**(6):926-932.
- Chen JJ, Yao PL, Yuan A, Hong TM, Shun CT, Kuo ML et al. Upregulation of tumor interleukin-8 expression by infiltrating macrophages: its correlation with tumor angiogenesis and patient survival in non-small cell lung cancer. *Clin Cancer Res* 2003; **9**:729-737.
- Chen SJ, Chien FC, Lin GY, Lee KC. Enhancement of the resolution of surface plasmon resonance biosensors by control of the size and distribution of nanoparticles. *Opt Lett.* 2004; **29**(12):1390-1392.
- Chithrani BD, Chan WCW. Elucidating the mechanism of cellular uptake and removal of protein-coated gold nanoparticles of different sizes and shapes. *Nano Lett.* 2007; **7**:1542-1550.
- Chithrani DB, Jelveh S, Jalali F, van Prooijen M, Allen C, Bristow RG, Hill RP, Jaffray DA. Gold nanoparticles as radiation sensitizers in cancer therapy. *Radiat Res.* 2010; **173**(6):719-728.
- Colotta F, Re F, Muzio M, Bertini R, Polentarutti N, Sironi M, Giri JG, Dower SK, Sims JE, Mantovani A. Interleukin-1 type II receptor: a decoy target for IL-1 that is regulated by IL-4. *Science.* 1993; **261**(5120):472-475.
- Comito G, Giannoni E, Segura CP, Barcellos-de-Souza P, Raspollini MR, Baroni G, et al. Cancer-associated fibroblasts and M2-polarized macrophages synergize during prostate carcinoma progression. *Oncogene* 2014; **33**(19):2423-2431.
- Connor EE, Mwamuka J, Gole A, Murphy CJ, Wyatt MD. Gold nanoparticles are taken up by human cells but do not cause acute cytotoxicity. *Small* 2005; **1**(3):325-327.
- Cook DN. The role of MIP-1 alpha in inflammation and hematopoiesis. *J Leukoc Biol.* 1996; **59**(1):61-66.
- Corry PM, Armour EP. The heat shock response: role in radiation biology and cancer therapy. *Int J Hyperthermia.* 2005; **21**(8):769-778.
- Dalpke A, Heeg K. Signal integration following Toll-like receptor triggering. *Crit. Rev. Immunol.* 2002; **22**:217-250.
- Danhier F, Feron O, Préat V. To exploit the tumor microenvironment: Passive and active tumor targeting of nanocarriers for anti-cancer drug delivery. *Journal of Controlled Release* 2010; **148**:135-146.
- DeBrosse MC, Comfort KK, Untener EA, Comfort DA, Hussain SM. High aspect ratio gold nanorods displayed augmented cellular internalization and surface chemistry mediated cytotoxicity. *Materials Science and Engineering C* 2013; **33**:4094-4100.
- Derfus AM, Chan WCW, Bhatia SN. Probing the cytotoxicity of semiconductor quantum dots. *Nano Lett.* 2004; **4**:11-18.
- Dinish US, Goh D, Fu CY, Bhuvanewari R, Sun W, Olivo M. Optimized Synthesis of PEG-Encapsulated Gold Nanorods for Improved Stability and Its Application in OCT Imaging with Enhanced Contrast. *Plasmonics* 2013; **8**(2):591-598.
- Durr NJ, Larson T, Smith DK, Korgel BA, Sokolov K, Ben-Yakar A. Two-photon luminescence imaging of cancer cells using molecularly targeted gold nanorods. *Nano Lett.* 2007; **7**(4):941-945.
- Dykman LA, Khlebtsov NG. Gold Nanoparticles in Biology and Medicine: Recent Advances and Prospects. *Acta Naturae.* 2011; **3**(2):34-55.

- Eghtedari M, Oraevsky A, Copland JA, Kotov NA, Conjusteau A, Motamedi M. High sensitivity of in vivo detection of gold nanorods using a laser optoacoustic imaging system. *Nano Lett.* 2007; **7**(7):1914-1918.
- Etchegoin PG, Le Ru EC, Meyer M. An analytic model for the optical properties of gold. *J Chem Phys.* 2006; **125**:164705.
- Eustis S, El-Sayed MA. Why gold nanoparticles are more precious than pretty gold: noble metal surface plasmon resonance and its enhancement of the radiative and nonradiative properties of nanocrystals of different shapes. *Chem Soc Rev.* 2006; **35**(3):209-217.
- Faraday M. Experimental Relations of Gold (and Other Metals) to Light. *Philos. Trans. R. Soc. London* 1857; **147**:145-181.
- Feizi T. Carbohydrate-mediated recognition systems in innate immunity. *Immunol. Rev.* 2000; **173**:79-88.
- Feldkamp LA, Davis LC, Kress JW. Practical cone-beam algorithm. *J. Opt. Soc. Am. A* 1984; **1**:612-619.
- Finkelstein AE, Walz DT, Batista V, Mizraji M, Roisman F, Misher A. Auranofin. New oral gold compound for treatment of rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis.* 1976; **35**(3):251-257.
- Forestier J. L'aurothérapie dans les rhumatismes chroniques. *Bull Mém Soc Méd Hôp Paris* 1929; **53**:323-327.
- Funston AM, Novo C, Davis TJ, Mulvaney P. Plasmon coupling of gold nanorods at short distances and in different geometries. *Nano Lett.* 2009; **9**(4):1651-1658.
- Giannoni E, Bianchini F, Calorini L, Chiarugi P. Cancer associated fibroblasts exploit reactive oxygen species through a proinflammatory signature leading to epithelial mesenchymal transition and stemness. *Antioxid Redox Signal* 2011; **14**:2361-2371.
- Gole A, Dash C, Soman C, Sainkar SR, Rao M, Sastry M. On the preparation, characterization, and enzymatic activity of fungal protease-gold colloid bioconjugates. *Bioconjugate Chem.* 2001; **12**(5):684-690.
- Goodman CM, McCusker CD, Yilmaz T, Rotello VM. Toxicity of gold nanoparticles functionalized with cationic and anionic side chains. *Bioconjugate Chem.* 2004; **15**(4):897-900.
- Gough PJ, Gordon S. The role of scavenger receptors in the innate immune system. *Microbes Infect.* 2000; **2**:305-311.
- Guedea F, Ellison T, Venselaar J, Borrás JM, Hoskin P, Poetter R, Heeren G, Nisin R, Francois G, Mazeron JJ, Limbergen EV, Ventura M, Taillet M, Cottier B. Overview of brachytherapy resources in Europe: a survey of patterns of care study for brachytherapy in Europe. *Radiotherapy and Oncology* 2007; **82**:50-54.
- Hainfeld JF, Slatkin DN, Smilowitz HM. The use of gold nanoparticles to enhance radiotherapy in mice. *Phys Med Biol.* 2004; **49**(18):N309-N315.
- Hainfeld JF, Dilmanian FA, Zhong Z, Slatkin DN, Kalef-Ezra JA, Smilowitz HM. Gold nanoparticles enhance the radiation therapy of a murine squamous cell carcinoma. *Phys Med Biol.* 2010; **55**(11):3045-3059.
- Halkes KM, Carvalho de Souza A, Maljaars CEP, Gerwig GJ, Kamerling JP. A Facile Method for the Preparation of Gold Glyconanoparticles from Free Oligosaccharides and Their Applicability in Carbohydrate-Protein Interaction Studies. *European Journal of Organic Chemistry* 2005; **2005**(17):3650-3659.

- Han G, Martin CT, Rotello VM. Stability of gold nanoparticle-bound DNA toward biological, physical, and chemical agents. *Chem Biol Drug Des*. 2006; **67**(1):78-82.
- Hao NB, Lü MH, Fan YH, Cao YL, Zhang ZR, Yang SM. Macrophages in Tumor Microenvironments and the Progression of Tumors. *Clinical and Developmental Immunology* 2012; **2012**:948098.
- Harrison RK, Ben-Yakar A. Role of near-field enhancement in plasmonic laser nanoablation using gold nanorods on a silicon substrate. *Opt Express*. 2010; **18**(21):22556-22571.
- Hirsch LR, Stafford RJ, Bankson JA, Sershen SR, Rivera B, Price RE, Hazle JD, Halas NJ, West JL. Nanoshell-mediated near-infrared thermal therapy of tumors under magnetic resonance guidance. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2003; **100**(23):13549-13554.
- Hoshino A, Fujioka K, Oku T, Suga M, Sasaki YF, Ohta T, Yasuhara M, Suzuki K, Yamamoto K. Toxicity of Nanocrystal Quantum Dots Depend on Their Surface Modification. *Nano Letters*, 2004; **4**(11):2163-2169.
- Huang X, Jain PK, El-Sayed IH, El-Sayed MA. Gold nanoparticles: interesting optical properties and recent applications in cancer diagnostics and therapy. *Nanomedicine* 2007; **2**(5):681-693.
- Huang X, Jain PK, El-Sayed IH, El-Sayed MA. Plasmonic photothermal therapy (PPTT) using gold nanoparticles. *Lasers Med Sci*. 2008; **23**(3):217-228.
- Ibsen S, Schutt CE, Esener S. Microbubble-mediated ultrasound therapy: a review of its potential in cancer treatment. *Drug Des Devel Ther*. 2013; **7**:375-388.
- Jain PK, Lee KS, El-Sayed IH, El-Sayed MA. Calculated absorption and scattering properties of gold nanoparticles of different size, shape, and composition: applications in biological imaging and biomedicine. *J Phys Chem B*. 2006; **110**(14):7238-7248.
- Janeway CA, Medzhitov R. Innate immune recognition. *Ann. Rev. Immunol*. 2002; **20**:197-216.
- Jia HY, Liu Y, Zhang XJ, Han L, Du LB, Tian Q, Xu YC. Potential Oxidative Stress of Gold Nanoparticles by Induced-NO Releasing in Serum. *J. Am. Chem. Soc*. 2009; **131**(1):40-41.
- Jiang W, Kim BY, Rutka JT, Chan WC. Nanoparticle-mediated cellular response is size-dependent. *Nat Nanotechnol*. 2008; **3**(3):145-150.
- Johnston B, Butcher EC. Chemokines in rapid leukocyte adhesion triggering and migration. *Semin Immunol*. 2002; **14**(2):83-92.
- Jones BL, Krishnan S, Cho SH. Estimation of microscopic dose enhancement factor around gold nanoparticles by Monte Carlo calculations. *Med Phys*. 2010; **37**:3809-3816.
- Joshi H, Shirude PS, Bansal V, Ganesh KN, Sastry M. Isothermal titration calorimetry studies on the binding of amino acids to gold nanoparticles. *J. Phys. Chem. B* 2004; **108**:11535-11540.
- Joshi PP, Yoon SJ, Chen YS, Emelianov S, Sokolov KV. Development and optimization of near-IR contrast agents for immune cell tracking. *Biomedical Optics Express* 2013; **4**(11):2609-2618.
- Juvé V, Cardinal MF, Lombardi A, Crut A, Maioli P, Pérez-Juste J, Liz-Marzán LM, Del Fatti N, Vallée F. Size-dependent surface plasmon resonance broadening in nonspherical nanoparticles: single gold nanorods. *Nano Lett*. 2013; **13**(5):2234-2240.
- Kawano T, Yamagata M, Takahashi H, Niidome Y, Yamada S, Katayama Y, Niidome T. Stabilizing of plasmid DNA in vivo by PEG-modified cationic gold nanoparticles and the gene expression assisted with electrical pulses. *Journal of Controlled Release* 2006; **111**(3):382-389.

- Kean WF, Kean IR. Clinical pharmacology of gold. *Inflammopharmacology*. 2008; **16**(3):112-125.
- Kelly KL, Coronado E, Zhao LL, Schatz GC. The Optical Properties of Metal Nanoparticles: The Influence of Size, Shape, and Dielectric Environment. *J. Phys. Chem. B* 2003; **107**(3):668-677.
- Kessentini S, Barchiesi D. Quantitative comparison of optimized nanorods, nanoshells and hollow nanospheres for photothermal therapy. *Biomed Opt Express*. 2012; **3**(3):590-604.
- Khan JA, Pillai B, Das TK, Sigh Y, Maiti S. Molecular effects of uptake of gold nanoparticles in HeLa cells. *ChemBioChem* 2007; **8**:1237-1240.
- Kim CK, Ghosh P, Rotello VM. Multimodal drug delivery using gold nanoparticles. *Nanoscale* 2009; **1**(1):61-67.
- Kirchner C, Liedl T, Kudera S, Pellegrino T, Javier AM, Gaub HE, Stolzle S, Fertig N, Parak WJ. Cytotoxicity of colloidal CdSe and CdSe/ZnS nanoparticles. *Nano Lett*. 2005; **5**:331-338.
- Koch R. An address on bacteriological research. *The British Medical Journal* 1890; **2**(1546):380-383.
- Krpetic Z, Porta F, Caneva E, Dal Santo V, Scari G. Phagocytosis of biocompatible gold nanoparticles. *Langmuir* 2010; **26**(18):14799-14805. doi: 10.1021/la102758f
- Kundu S, Pal A, Ghosh SK, Nath S, Panigrahi S, Praharaaj S, Pal T. A new route to obtain shape-controlled gold nanoparticles from Au(III)-beta-diketonates. *Inorg Chem*. 2004; **43**(18):5489-5491.
- Lai S, Centi S, Borri C, Ratto F, Tatini F, Colagrande S, Pini R. Biological profiles of plasmonic particles modified with a cell penetrating peptide. *International Conference on BioPhotonics* 2015. doi: 10.1109/BioPhotonics.2015.7304054
- Lam CW, James JT, McCluskey R, Hunter RL. Pulmonary toxicity of single-wall carbon nanotubes in mice 7 and 90 days after intratracheal instillation. *Toxicol. Sci*. 2004; **77**:126-134.
- Lau IP, Chen H, Wang J, Ong HC, Leung KCF, Hod HP, Kong SK. In vitro effect of CTAB- and PEG-coated gold nanorods on the induction of eryptosis/erythroptosis in human erythrocytes. *Nanotoxicology* 2012; **6**(8):847-856.
- Lechtman E, Chattopadhyay N, Cai Z, Mashouf S, Reilly R, Pignol JP. Implications on clinical scenario of gold nanoparticle radiosensitization in regards to photon energy, nanoparticle size, concentration and location. *Phys Med Biol*. 2011; **56**(15):4631-4647.
- Lentzsch S, Gries M, Janz M, Bargou R, Dörken B, Mapara MY. Macrophage inflammatory protein 1-alpha (MIP-1) triggers migration and signaling cascades mediating survival and proliferation in multiple myeloma (MM) cells. *Blood* 2003; **101**:3568-3573.
- Leonov AP, Zheng J, Clogston JD, Stern ST, Patri AK, Wei A. Detoxification of gold nanorods by treatment with polystyrenesulfonate. *ACS Nano*. 2008; **2**(12):2481-2488.
- Lewis CE, Leek R, Harris A, McGee JOD. Cytokine regulation of angiogenesis in breast cancer: the role of tumor-associated macrophages. *J. Leuk. Bio*. 1995; **57**:747-751.
- Lewis CE, Pollard JW. Distinct role of macrophages in different tumor microenvironments. *Cancer Res* 2006; **66**:605-612.
- Li JJ, Zou L, Hartono D, Ong C-N, Bay B-H, Yung L-YL. Gold nanoparticles induce oxidative damage in lung fibroblasts in vitro. *Advanced Materials* 2008; **20**(1):138-142.

- Lin CC, Yeh YC, Yang CY, Chen CL, Chen GF, Chen CC, Wu YC. Selective Binding of Mannose-Encapsulated Gold Nanoparticles to Type 1 Pili in Escherichia coli. *J. Am. Chem. Soc.*, 2002; **124**(14):3508-3509.
- Liu X, Huang N, Li H, Wang H, Jin Q, Ji J. Multidentate Polyethylene Glycol Modified Gold Nanorods for in Vivo Near-Infrared Photothermal Cancer Therapy. *ACS Appl. Mater. Interfaces* 2014; **6**(8):5657-5668.
- Loeffler DA, Keng PC, Baggs RB, Lord EM. Lymphocytic infiltration and cytotoxicity under hypoxic conditions in the EMT6 mouse mammary tumor. *Int J Cancer*. 1990; **45**(3):462-467.
- Mackiewicz A, Schooltink H, Heinrich PC, Rose-John S. Complex of soluble human IL-6-receptor/IL-6 up-regulates expression of acute-phase proteins. *The Journal of Immunology* 1992; **149**(6):2021-2027.
- Madsen SJ, Baek S, Makkouk AR, Krasieva T, Hirschberg H. Macrophages as cell-based delivery systems for nanoshells in photothermal therapy. *Ann Biomed Eng.* 2012; **40**(2):507-515. doi:10.1007/s10439-011-0415-1.
- Maeda H, Fang J, Inutsuka T, Kitamoto Y. Vascular permeability enhancement in solid tumor: various factors, mechanisms involved and its implications. *Int Immunopharmacol.* 2003; **3**(3):319-328.
- Mantovani A, Sozzani S, Locati M, Allavena P, Sica A. Macrophage polarization: tumor-associated macrophages as a paradigm for polarized M2 mononuclear phagocytes. *Trends Immunol.* 2002; **23**:549-555.
- Mantovani A, Sica A, Sozzani S, Allavena P, Vecchi A, Locati M. The chemokine systems in diverse forms of macrophage activation and polarization. *Trends Immunol.* 2004; **25**:677-686.
- Martinez FO, Gordon S, Locati M, Mantovani A. Transcriptional profiling of the human monocyte-to-macrophage differentiation and polarization: new molecules and patterns of gene expression. *J Immunol.* 2006; **199**:7303-7311.
- Matsukawa A, Hogaboam CM, Lukacs NW, Kunkel SL. Chemokines and innate immunity. *Rev Immunogenet.* 2000; **2**(3):339-358.
- Matteini P, Ratto F, Rossi F, De Angelis M, Cavigli L, Pini R. Hybrid nanocomposite films for laser-activated tissue bonding. *J Biophotonics.* 2012; **5**:868-877.
- Medzhitov R, Janeway CA. The toll receptor family and microbial recognition. *Trends Microbiol.* 2000; **8**:452-456.
- Mills CD, Kincaid K, Alt JM, Heilman MJ, Hill AM. M-1/M-2 macrophages and the Th1/Th2 paradigm. *J Immunol.* 2000; **164**:6166-6173.
- Minghua X, Lihong VW. Photoacoustic imaging in biomedicine. *Rev. Sci. Instrum.* 2006; **77**:041101. doi:10.1063/1.2195024.
- Mirkin CA, Letsinger RL, Mucic RC, Storhoff JJ. A DNA-based method for rationally assembling nanoparticles into macroscopic materials. *Nature.* 1996; **382**(6592):607-609.
- Mohamed MB, Volkov V, Link S, El-Sayed MA. The 'lightning' gold nanorods: fluorescence enhancement of over a million compared to the gold metal. *Chemical Physics Letters* 2000; **317**:517-523.
- Mukhopadhyay A, Grabinski C, Afroz AR, Saleh NB, Hussain S. Effect of gold nanosphere surface chemistry on protein adsorption and cell uptake in vitro. *Appl Biochem Biotechnol.* 2012; **167**(2):327-337.

- Mustafa DE, Yang T, Xuan Z, Chen S, Tu H, Zhang A. Surface Plasmon Coupling Effect of Gold Nanoparticles with Different Shape and Size on Conventional Surface Plasmon Resonance Signal. *Plasmonics* 2010; **5**(3):221-231.
- Narazaki M, Yasukawa K, Saito T, Ohsugi Y, Fukui H, Koishihara Y, Yancopoulos GD, Taga T, Kishimoto T. Soluble forms of the interleukin-6 signal-transducing receptor component gp130 in human serum possessing a potential to inhibit signals through membrane-anchored gp130. *Blood* 1993; **82**(4):1120-1126.
- Nativo P, Prior IA, Brust M. Uptake and intracellular fate of surface-modified gold nanoparticles. *ACS Nano* 2008; **2**:1639-1644.
- Needles A, Heinmiller A, Ephrat P, Bilan-Tracey C, Trujillo A, Theodoropoulos C. Development of a combined photoacoustic micro-ultrasound system for estimating blood oxygenation. *IEEE Ultrasonics Symp.* 2010; 390-393. doi: 10.1109/ULTSYM.2010.5935920.
- Ngwa W, Korideck H, Kassis AI, Kumar R, Sridhar S, Makrigiorgos GM, Cormack RA. In vitro radiosensitization by gold nanoparticles during continuous low-dose-rate gamma irradiation with I-125 brachytherapy seeds. *Nanomedicine* 2013; **9**(1):25-27.
- Niemeyer CM. Nanoparticles, proteins and nucleic acids: Biotechnology meets materials science. *Angew. Chem. Int. Ed.* 2001; **40**:4128-4158.
- Niidome T, Yamagata M, Okamoto Y, Akiyama Y, Takahashi H, Kawano T, Katayama Y, Niidome Y. PEG-modified gold nanorods with a stealth character for in vivo applications. *J Control Release.* 2006; **114**(3):343-347.
- Niikura K, Matsunaga T, Suzuki T, Kobayashi S, Yamaguchi H, Orba Y, Kawaguchi A, Hasegawa H, Kajino K, Ninomiya T, Ijio K, Sawa H. Gold nanoparticles as a vaccine platform: influence of size and shape on immunological responses in vitro and in vivo. *ACS Nano.* 2013; **7**(5):3926-3938.
- Nikoobakht B, Wang J, El-Sayed MA. Surface-enhanced Raman scattering of molecules adsorbed on gold nanorods: off-surface plasmon resonance condition. *Chemical Physics Letters.* 2002; **366**(1):17-23.
- Nikoobakht B, El-Sayed MA. Preparation and growth mechanism of gold nanorods (NRs) using seed-mediated growth method. *Chem Mater.* 2003; **15**:1957-1962.
- Noguez C. Surface Plasmons on Metal Nanoparticles: The Influence of Shape and Physical Environment. *J. Phys. Chem. C* 2007; **111**(10):3806-3819.
- O'Sullivan C, Lewis CE. Tumour-associated leukocytes: friends or foes in breast carcinoma. *J. Pathol.* 1994; **172**:229-235.
- Oikawa K, Kim H, Watanabe N, Shigeno M, Shirakawabe Y, Yasuda K. Measuring the sizes of nanospheres on a rough surface by using atomic force microscopy and a curvature-reconstruction method. *Ultramicroscopy* 2007; **107**(10-11):1061-1067.
- Olofsson L, Rindzevicius T, Pfeiffer I, Kall M, Hook F. Surface-based gold-nanoparticle sensor for specific and quantitative DNA hybridization detection. *Langmuir* 2003; **19**(24):10414-10419.
- Ono SJ, Nakamura T, Miyazaki D, Ohbayashi M, Dawson M, Toda M. Chemokines: roles in leukocyte development, trafficking, and effector function. *J Allergy Clin Immunol.* 2003; **111**(6):1185-1199.
- Pan D, Kim B, Wang LV, Lanza GM. A brief account of nanoparticle contrast agents for photoacoustic imaging. *Wiley Interdiscip Rev Nanomed Nanobiotechnol.* 2013; **5**(6):517-543.
- Pan Y, Neuss S, Leifert A, Fischler M, Wen F, Simon U, Schmid G, Brandau W, Jahnke-Dechent W. Size-dependent cytotoxicity of gold nanoparticles. *Small* 2007; **3**(11):1941-1949.

- Panetta D, Belcari N, Tripodi M, Burchielli S, Salvadori PA, Del Guerra A. Performance evaluation of the CT component of the IRIS PET/CT preclinical tomograph. *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research A* 2015. doi:10.1016/j.nima.2015.08.044
- Pei L, Mori K, Adachi M. Formation process of two-dimensional networked gold nanowires by citrate reduction of AuCl₄⁻ and the shape stabilization. *Langmuir* 2004; **20**(18):7837-7843.
- Penn SG, He L, Natan MJ. Nanoparticles for bioanalysis. *Curr Opin Chem Biol.* 2003; **7**(5):609-615.
- Perez C, Albert I, DeFay K, Zachariades N, Gooding L, Kriegler M. A nonsecretable cell surface mutant of tumor necrosis factor (TNF) kills by cell-to-cell contact. *Cell.* 1990; **63**(2):251-258.
- Pérez-Juste J, Pastoriza-Santos I, Liz-Marzán LM, Mulvaney P. Gold nanorods: synthesis, characterization and applications. *Coord Chem Rev.* 2005; **249**:1870-1901.
- Pfeffer K. Biological functions of tumor necrosis factor cytokines and their receptors. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2003; **14**(3-4):185-191.
- Phadtare S, Kumar A, Vinod VP, Dash C, Palaskar DV, Rao M, Shukla PG, Sivaram S, Sastry M. Direct assembly of gold nanoparticle "shells" on polyurethane microsphere "cores" and their application as enzyme immobilization templates. *Chem Mater* 2003; **15**:1944-1949.
- Popovtzer R, Agrawal A, Kotov NA, Popovtzer A, Balter J, Carey TE, Kopelman R. Targeted gold nanoparticles enable molecular CT imaging of cancer. *Nano Lett.* 2008; **8**(12):4593-4596.
- Pricker SP. Medical uses of gold compounds: Past, present and future. *Gold Bulletin* 1996; **29**(2):53-60.
- Rahman WN, Bishara N, Ackerly T, He CF, Jackson P, Wong C, Davidson R, Geso M. Enhancement of radiation effects by gold nanoparticles for superficial radiation therapy. *Nanomedicine* 2009; **5**:136-142.
- Ratto F, Matteini P, Rossi F, Pini R. Size and shape control in the overgrowth of gold nanorods. *J Nanopart Res.* 2010; **12**:2029-2036.
- Ratto F, Matteini P, Cini A, Centi S, Rossi F, Fusi F, Pini R. CW laser-induced photothermal conversion and shape transformation of gold nanodogbones in hydrated chitosan films. *J Nanopart Res.* 2011; **13**:4337-4348.
- Ratto F, Witort EJ, Tatini F, Centi S, Lazzeri L, Carta F, Lulli M, Vullo D, Fusi F, Trandafir Supuran C, Scozzafava A, Capaccioli S, Pini R. Plasmonic particles that hit hypoxic cells. *Advanced Funtional Materials.* 2015; **25**(2):316-323.
- Ray PC, Yu H, Fu PP. Toxicity and environmental risks of nanomaterials: challenges and future needs. *J Environ Sci Health C Environ Carcinog Ecotoxicol Rev.* 2009; **27**(1):1-35. doi: 10.1080/10590500802708267.
- Rayavarapu RG, Petersen W, Hartsuiker L, Chin P, Janssen H, van Leeuwen FW, Otto C, Manohar S, van Leeuwen TG. In vitro toxicity studies of polymer-coated gold nanorods. *Nanotechnology* 2010; **21**(14):145101.
- Ryan JA, Overton KW, Speight ME, Oldenburg CN, Loo LN, Robarge W, Franzen S, Feldheim DL. Cellular Uptake of Gold Nanoparticles Passivated with BSA-SV40 Large T Antigen Conjugates. *Anal. Chem.* 2007; **79**(23):9150-9159.
- Rodríguez-Fernández J, Pastoriza-Santos I, Pérez-Juste J, García de Abajo FJ, Liz-Marzán LM. The Effect of Silica Coating on the Optical Response of Sub-micrometer Gold Spheres. *The Journal of Physical Chemistry C* 2007; **111**(36):13361-13366.
- Rosencwaig A, Gersho A. Theory of the photoacoustic effect with solids. *Journal of Applied Physics.* 1976; **47**(1):64-69.

- Roth J. The silver anniversary of gold: 25 years of the colloidal gold marker system for immunocytochemistry and histochemistry. *Histochem Cell Biol.* 1996; **106**(1):1-8.
- Sánchez López de Pablo C, Olmedo JJ, Rosales AM, Ramírez Hernández N, Del Pozo Guerrero F. A method to obtain the thermal parameters and the photothermal transduction efficiency in an optical hyperthermia device based on laser irradiation of gold nanoparticles. *Nanoscale Res Lett.* 2014; **9**(1):441.
- Sandhu KK, McIntosh CM, Simard JM, Smith SW, Rotello VM. Gold nanoparticle-mediated transfection of mammalian cells. *Bioconjug Chem.* 2002; **13**(1):3-6.
- Schall TJ, Bacon K, Camp RD, Kaspari JW, Goeddel DV. Human macrophage inflammatory protein alpha (MIP-1 alpha) and MIP-1 beta chemokines attract distinct populations of lymphocytes. *J Exp Med.* 1993; **177**(6):1821-1826.
- Schmid G. Ed. Clusters and Colloids. VCH: Weinheim, Germany, 1994.
- Schnarr K, Mooney R, Weng Y, Zhao D, Garcia E, Armstrong B, Annala AJ, Kim SU, Aboody KS, Berlin JM. Gold nanoparticle-loaded neural stem cells for photothermal ablation of cancer. *Adv Healthc Mater.* 2013; **2**(7):976-982.
- Selvakannan P, Mandal S, Pasricha R, Sastry M. Hydrophobic, organically dispersible gold nanoparticles of variable shape produced by the spontaneous reduction of aqueous chloroaurate ions by hexadecylaniline molecules. *J Colloid Interface Sci.* 2004; **279**(1):124-131.
- Selvakannan PR, Mandal S, Phadtare S, Gole A, Pasricha R, Adyanthaya SD, Sastry MJ. Water-dispersible tryptophan-protected gold nanoparticles prepared by the spontaneous reduction of aqueous chloroaurate ions by the amino acid. *Colloid Interface Sci.* 2004; **269**(1):97-102.
- Service RF. Is nanotechnology dangerous? *Science* 2000; **290**:1526-1527.
- Shankar SS, Bhargava S, Sastry M. Synthesis of gold nanospheres and nanotriangles by the Turkevich approach. *J Nanosci Nanotechnol.* 2005; **5**(10):1721-1727.
- Shi J, Wu H, Liu J, Li S, He X. Stimulated scattering effects in gold-nanorod-water samples pumped by 532 nm laser pulses. *Scientific Reports* 2015; **5**:11964.
- Sica A, Schioppa T, Mantovani A, Allavena P. Tumour-associated macrophages are a distinct M2 polarised population promoting tumour progression: potential targets of anti-cancer therapy. *Eur J Cancer* 2006; **42**:717-727.
- Sica A, Mantovani A. Macrophage plasticity and polarization: in vivo veritas. *J Clin Invest* 2012; **122**:787-795.
- Sims JE, Gayle MA, Slack JL, Alderson MR, Bird TA, Giri JG, Colotta F, Re F, Mantovani A, Shanebeck K, et al. Interleukin 1 signaling occurs exclusively via the type I receptor. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1993; **90**(13):6155-6159.
- Siveen KS, Kuttan G. Role of macrophages in tumour progression. *Immunology Letters* 2009; **123**(2):97-102.
- Skirtach AG, Dejugnat C, Braun D, Susha AS, Rogach AL, Parak WJ, Möhwald H, Sukhorukov GB. The role of metal nanoparticles in remote release of encapsulated materials. *Nano Lett.* 2005; **5**(7):1371-1377.
- Son M, Lee J, Jang DJ. Light-treated silica-coated gold nanorods having highly enhanced catalytic performances and reusability. *Journal of Molecular Catalysis A: Chemical* 2014; **385**:38-45.
- Storhoff JJ, Mirkin CA. Programmed Materials Synthesis with DNA. *Chem. Rev.* 1999; **99**(7):1849-1862.

- Sun L, Liu D, Wang Z. Functional Gold Nanoparticle–Peptide Complexes as Cell-Targeting Agents. *Langmuir* 2008; **24**(18):10293-10297.
- Svaasand LO, Gomer CJ, Morinelli E. On the physical rationale of laser induced hyperthermia. *Lasers Med Sci.* 1990; **5**:121-128.
- Takahashi H, Niidome T, Kawano T, Yamada S, Niidome Y. Surface modification of gold nanorods using layer-by-layer technique for cellular uptake. *Journal of Nanoparticle Research* 2008; **10**(1):221-228.
- Tamarkin L. Development of a colloidal gold-based, tumor-targeted nanomedicine: CYT-6091 (Aurimune). *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine* 2007; **3**(4):339.
- Tatini F, Landini I, Scaletti F, Massai L, Centi S, Ratto F, Nobili S, Romano G, Fusi F, Messori L, Mini E, Pini R. Size dependent biological profiles of PEGylated gold nanorods. *Journal of Materials Chemistry B.* 2014; **2**:6072-6080.
- Thomson A. The cytokine handbook. IV edition. *Academic Press.* San Diego, 2001.
- Tjiu JW, Chen JS, Shun CT, Lin SJ, Liao WH, Chu CY, Tsai TF, Chiu HC, Dai YS, Inoue H, Yang PC, Kuo ML, Jee SH. Tumor-Associated Macrophage-Induced Invasion and Angiogenesis of Human Basal Cell Carcinoma Cells by Cyclooxygenase-2 Induction. *Journal of Investigative Dermatology* 2009; **129**(4):1016-1025.
- Tokonami S, Yamamoto Y, Shiigi H, Nagaoka T. Synthesis and bioanalytical applications of specific-shaped metallic nanostructures: a review. *Anal Chim Acta.* 2012; **716**:76-91.
- Tong L, Zhao Y, Huff TB, Hansen MN, Wei A, Cheng JX. Gold Nanorods Mediate Tumor Cell Death by Compromising Membrane Integrity. *Adv Mater.* 2007; **19**:3136-3141.
- Torchilin VP. Multifunctional nanocarriers. *Advanced Drug Delivery Reviews.* 2012; **64**:302-315.
- Truong PL, Ma X, Sim SJ. Resonant Rayleigh light scattering of single Au nanoparticles with different sizes and shapes. *Nanoscale* 2014; **6**(4):2307-2315.
- Tuersun P, Han X. Optical absorption analysis and optimization of gold nanoshells. *Appl Opt.* 2013; **52**(6):1325-1329.
- Van der Zee J. Heating the patient: a promising approach? *Ann Oncol.* 2002; **13**(8):1173-1184.
- Veith GM, Lupini AR, Rashkeev S, Pennycook SJ, Mullins DR, Schwartz V, Bridges CA, Dudney NJ. Thermal stability and catalytic activity of gold nanoparticles supported on silica. *Journal of Catalysis* 2009; **262**:92-101.
- Vial S, Pastoriza-Santos I, Pérez-Juste J, Liz-Marzan LM. Plasmon coupling in layer-by-layer assembled gold nanorod films. *Langmuir* 2007; **23**(8):4606-4611.
- Vivero-Escoto JL, Slowing II, Wu CW, Lin VSY. Photoinduced Intracellular Controlled Release Drug Delivery in Human Cells by Gold-Capped Mesoporous Silica Nanosphere. *J. Am. Chem. Soc.* 2009; **131**(10):3462-3463.
- Wang LV. Multiscale photoacoustic microscopy and computed tomography. *Nat. Photon.* 2009; **3**(9):503-509.
- Warheit DB, Laurence BR, Reed KL, Roach DH, Reynolds GAM, Webb TR. Comparative pulmonary toxicity assessment of single-wall carbon nanotubes in rats. *Toxicol Sci.* 2004; **77**:117-125.
- Watkins SK, Egilmez NK, Suttles J, Stout RD. IL-12 rapidly alter the functional profiles of tumor-associated and tumor-infiltrating macrophages in vitro and in vivo. *J Immunol* 2007; **178**:1357-1362.

Weissleder R. A clearer vision for in vivo imaging. *Nat Biotechnol.* 2001; **19**:316-317.

You CC, Miranda OR, Gider B, Ghosh PS, Kim IB, Erdogan B, Krovi SA, Bunz UH, Rotello VM. Detection and identification of proteins using nanoparticle-fluorescent polymer 'chemical nose' sensors. *Nat Nanotechnol.* 2007; **2**(5):318-323.

Zhang G, Yang Z, Lu ZW, Zhang R, Huang Q, Tiana M, Li L, Liang D, Li C. Influence of anchoring ligands and particle size on the colloidal stability and in vivo biodistribution of polyethylene glycol-coated gold nanoparticles in tumor-xenografted mice. *Biomaterials* 2009; **30**(10):1928-1936.

Zhang XD, Guo ML, Wu HY, Sun YM, Ding YQ, Feng X, Zhang LA. Irradiation stability and cytotoxicity of gold nanoparticles for radiotherapy. *International Journal of Nanomedicine* 2009; **4**:165-173.

7. FIGURE



Figura 1. Coppa di Licurgo risalente al IV secolo d.C. e attualmente conservata nel British Museum di Londra. È costituita da nanoparticelle d'oro che le conferiscono una colorazione verde in riflessione (sinistra) e rosso in trasmissione (destra).

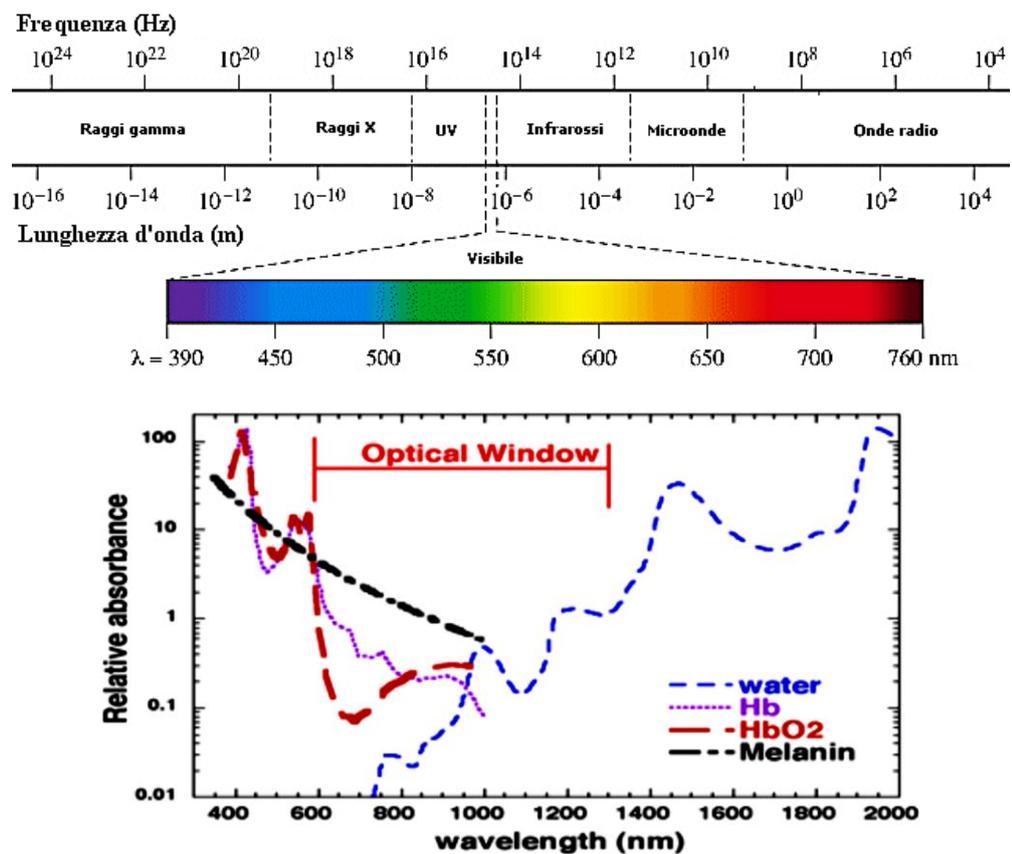


Figura 2. Spettro delle radiazioni elettromagnetiche. La finestra di trasmissione ottica dei tessuti biologici cade nel visibile e nel vicino infrarosso, in particolare, nell'intervallo di lunghezze d'onda compreso tra 650 e 1300 nm.

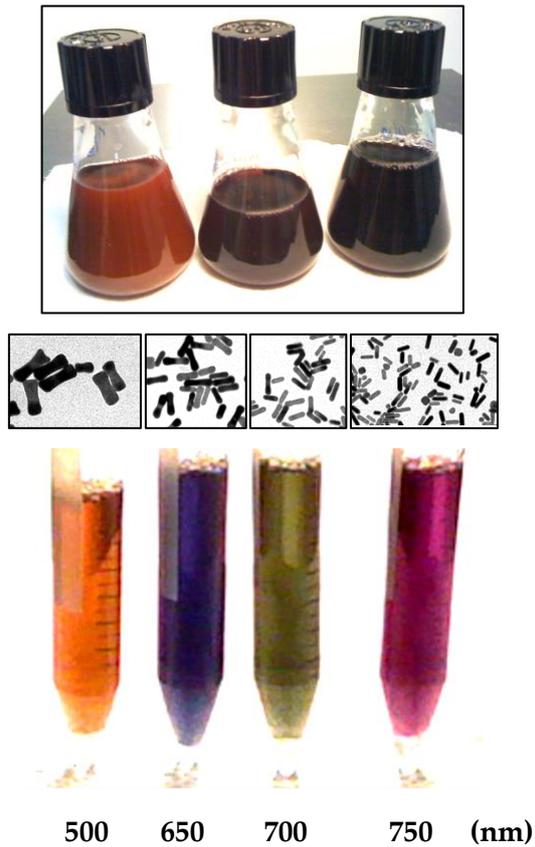


Figura 3. L'*aspect ratio* (forma) delle nanoparticelle determina principalmente la stabilità e la posizione delle risonanze plasmoniche, influenzando la risposta ottica. Aumentando l'*aspect ratio* lo spettro di assorbimento dei nanocilindri d'oro si sposta verso lunghezze d'onda maggiori, conferendo diverse colorazioni alla soluzione.

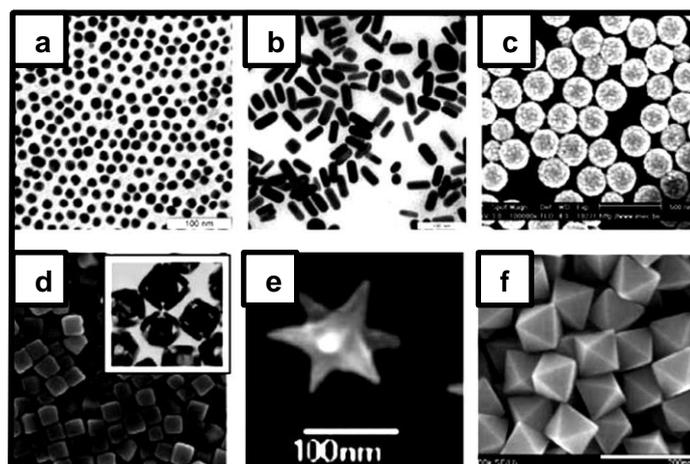


Figura 4. Esempi di nanoparticelle d'oro sintetizzate con forme differenti: a) sfere b) cilindri c) conchiglie d) cubi e) stelle f) poliedriche. Immagine TEM modificata da Dykman L.A. et al., *Acta Naturae*, 2011.

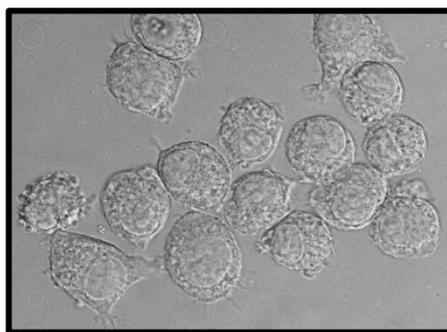


Figura 5. Fotografia al microscopio confocale in trasmissione di macrofagi murini J774A.1 con un ingrandimento 63X.

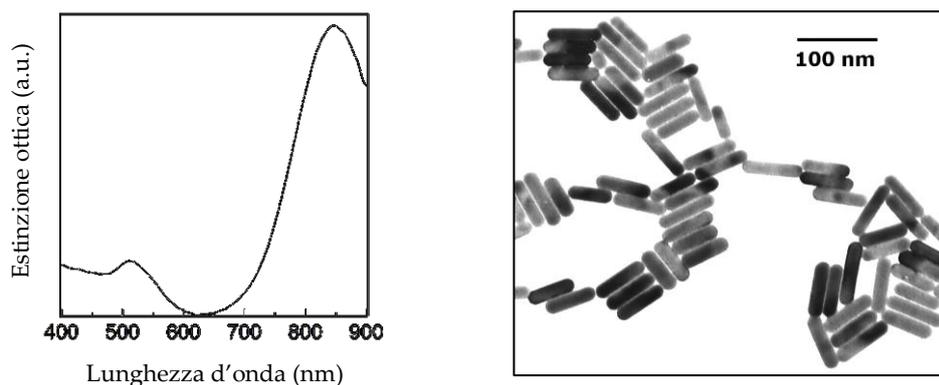


Figura 6. A sinistra: spettro di assorbimento ottico di nanocilindri d'oro che evidenzia le due bande plasmoniche caratteristiche a 520 nm (trasversale) e intorno a 800 nm (longitudinale). A destra: immagine TEM rappresentativa di nanocilindri di dimensioni 10×40 nm.

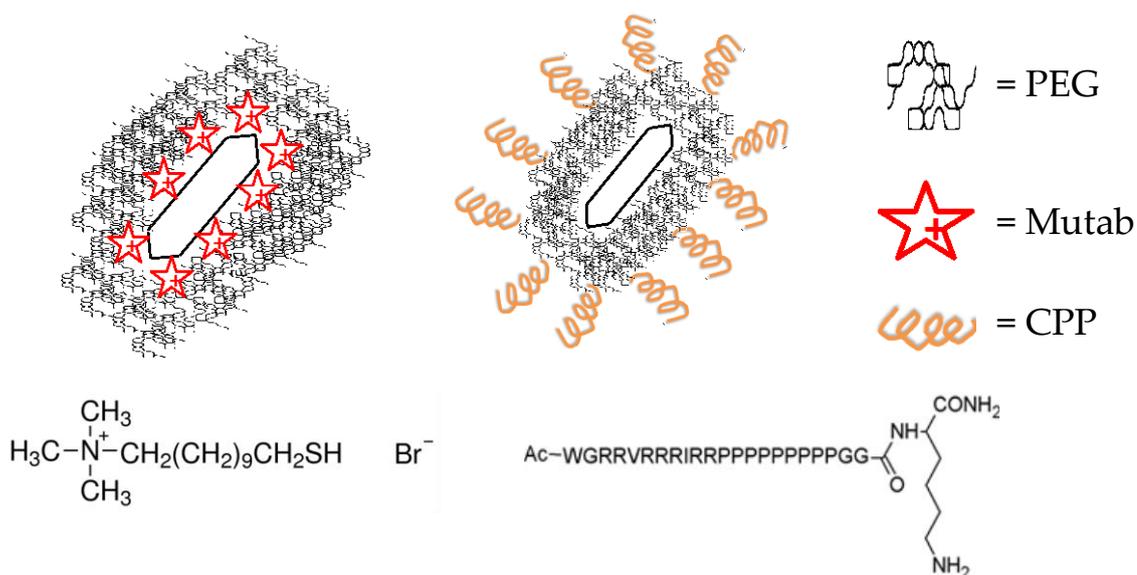


Figura 7. Rappresentazione schematica del rivestimento di nanocilindri d'oro con PEG e della loro funzionalizzazione con molecole cationiche. In basso sono riportate le formule di struttura di Mutab (a sinistra) e di CPP (a destra).

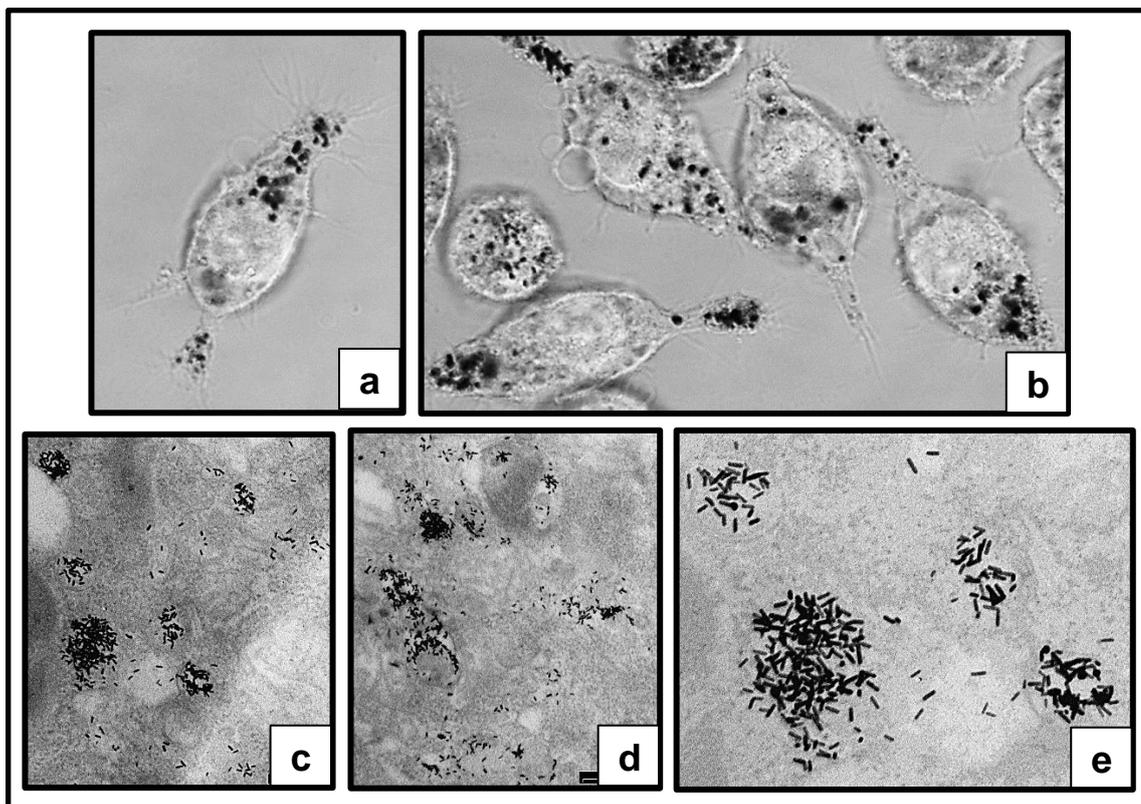


Figura 8. Studio del processo di internalizzazione di nanoparticelle d'oro coniugate a Mutab ($100 \mu\text{M Au}$) da parte di macrofagi murini tramite microscopia confocale in trasmissione (a, b) e TEM (c, d, e).

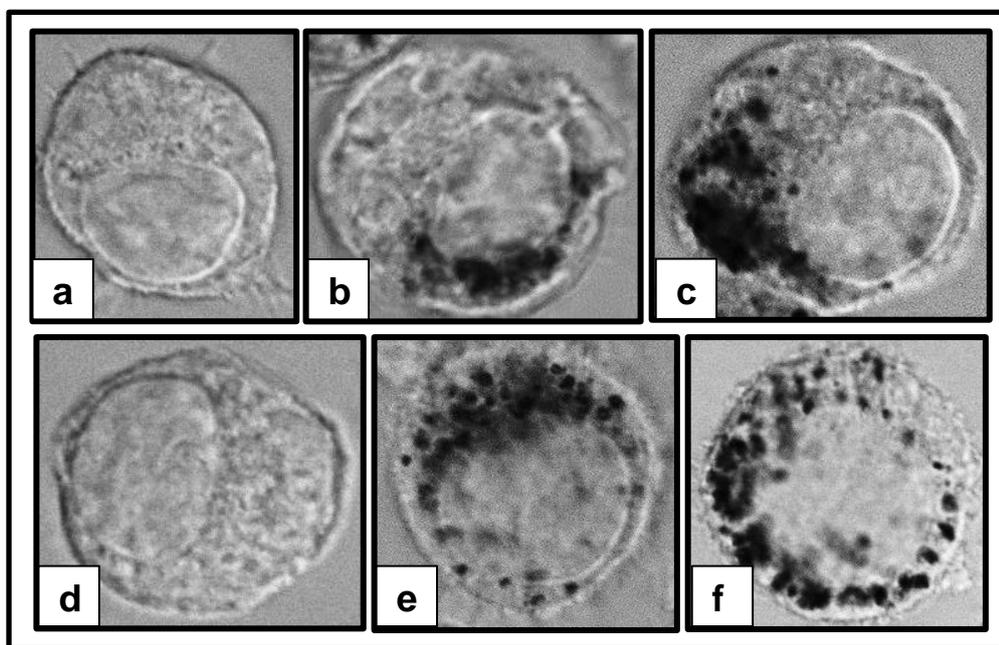


Figura 9. Confronto tra cellule trattate con 100 e $400 \mu\text{M Au}$ di GNRs-Mutab (b, c) e GNRs-CPP (e, f) rispetto ai controlli (a, d). Le immagini sono state ottenute al microscopio confocale in trasmissione con un ingrandimento $63\times$ ed elevata risoluzione.

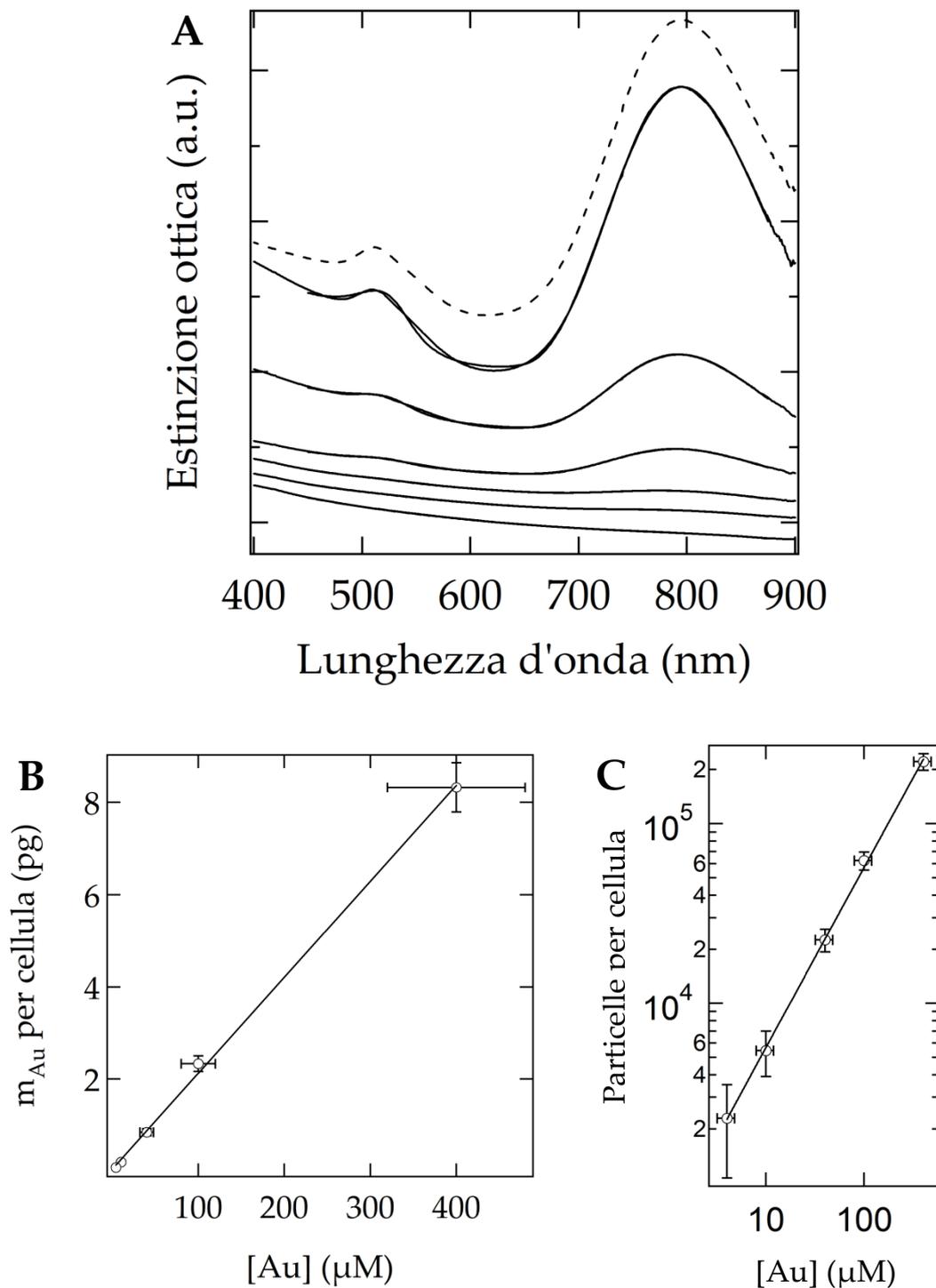


Figura 10. Valutazione quantitativa del caricamento cellulare con GNRs-Mutab mediante spettrofotometria. L'immagine A mostra gli spettri di estinzione ottica di macrofagi trattati con 0, 4, 10, 40, 100 e 400 μ M Au di GNRs per 24 ore, dal basso verso l'alto. La linea tratteggiata indica lo spettro di assorbimento del *batch* di GNRs-Mutab usato negli esperimenti, dimostrando l'assenza di modificazioni significative in seguito all'internalizzazione cellulare. Nelle figure in basso è riportata l'analisi della quantificazione intracellulare di GNRs, espressa come massa_{Au}/cellula (B) e numero di particelle/cellula (C).

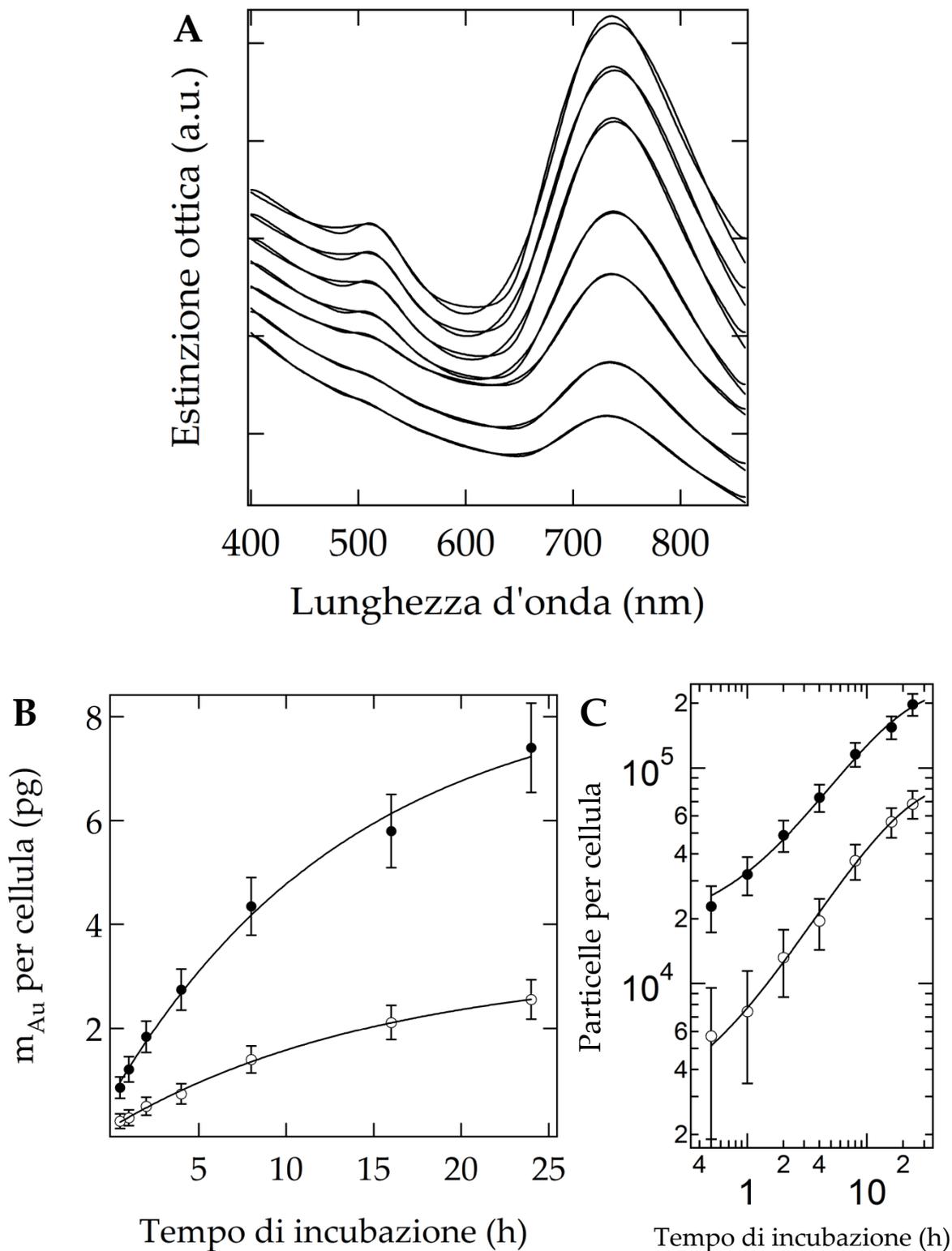


Figura 11. Analisi dell'*uptake* cellulare con GNRs-Mutab in funzione del tempo. A) Spettri di estinzione ottica a 400 μ M Au per 0.5, 1, 2, 4, 8, 16, 24 ore, dal basso verso l'alto. Gli spettri sono stati normalizzati intorno a 400 nm. La quantificazione del contenuto di oro per incubazioni con 100 (punti bianchi) e 400 μ M Au (punti neri) è stata calcolata seguendo il metodo riportato in letteratura da Ratto F. et al. (2011) ed espressa in massa_{Au}/cellula (B) e numero di particelle/cellula (C).

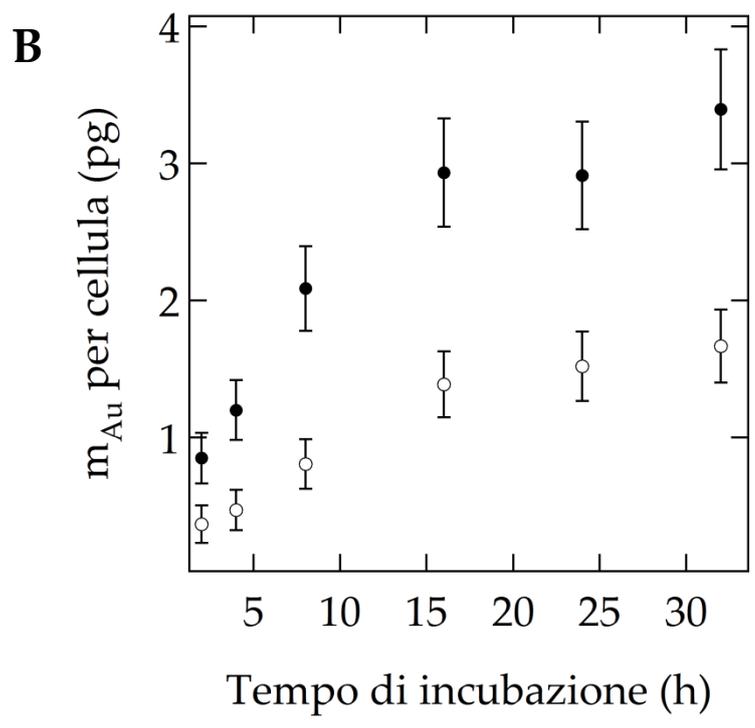
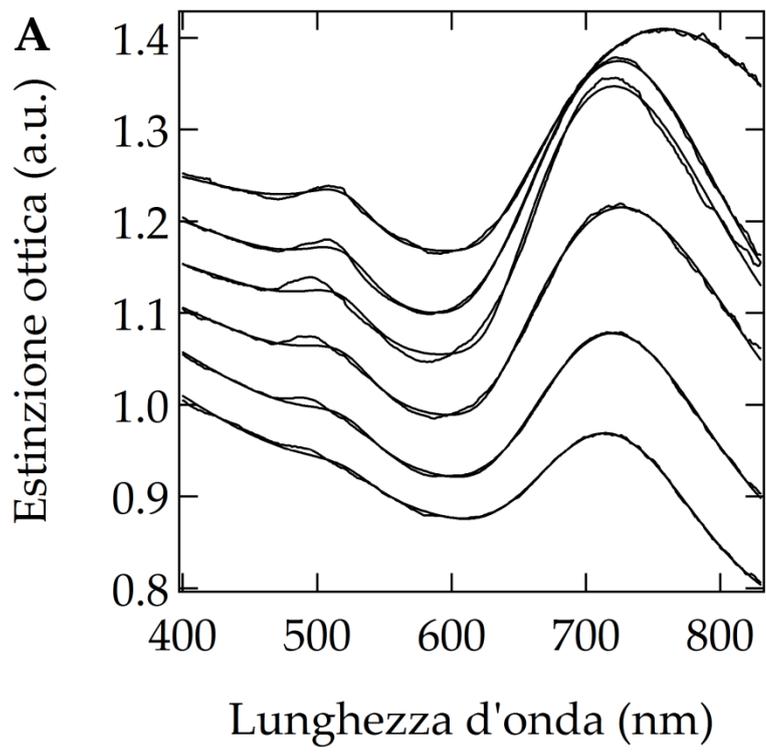


Figura 12. Analisi del caricamento cellulare con GNRs-CPP in funzione del tempo mediante spettrofotometria. La figura A rappresenta gli spettri di estinzione ottica di macrofagi trattati con $400 \mu\text{M}$ Au per 2, 4, 8, 16, 24, 32 ore, dal basso verso l'alto. La figura B riporta la massa_{Au}/cellula dopo incubazione con 100 (punti bianchi) e $400 \mu\text{M}$ Au (punti neri).

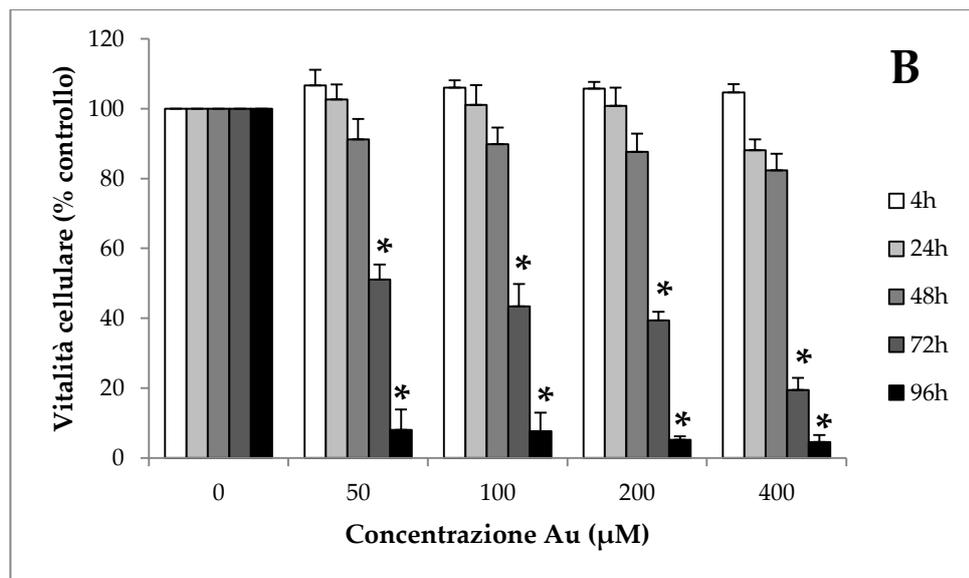
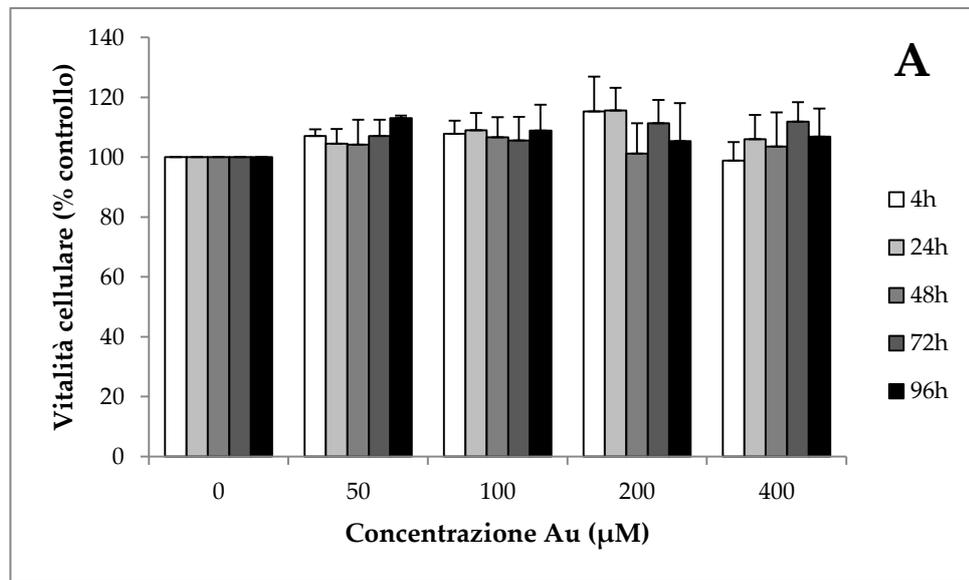


Figura 13. Vitalità cellulare di macrofagi trattati con diverse concentrazioni di GNRs PEGilati coniugati a CPP (A) o a Mutab (B) per 4-24-48-72-96 ore.

La citotossicità è stata valutata mediante il test WST-8. I risultati sono espressi come percentuale di formazano prodotto da cellule trattate rispetto al controllo. I valori sono riportati come media \pm DS di tre esperimenti indipendenti. * $p < 0.05$ rispetto al controllo.

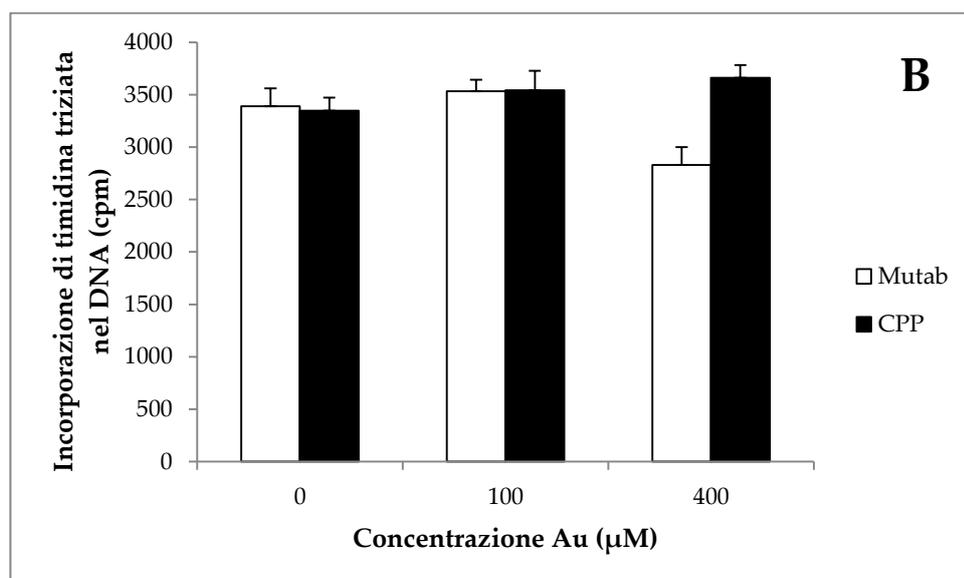
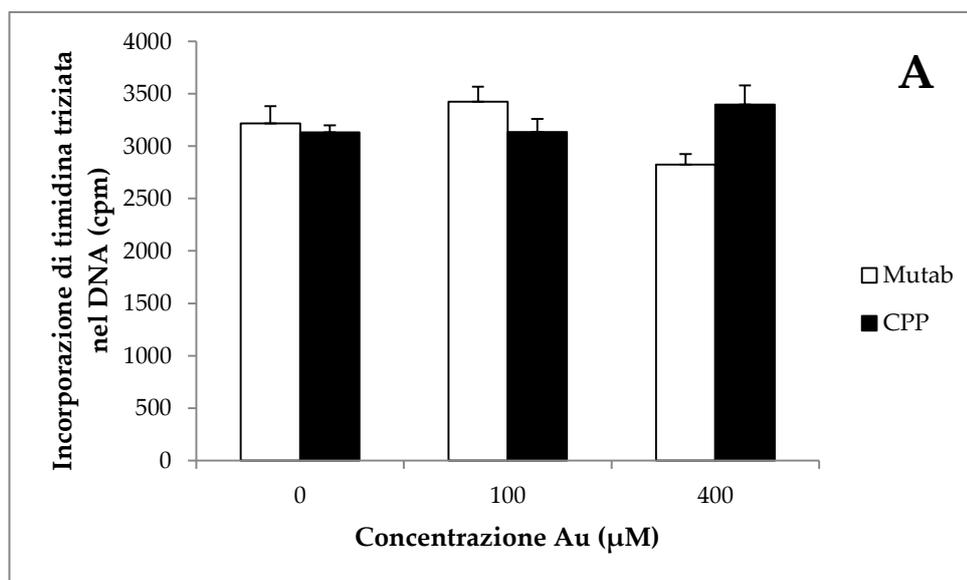


Figura 14. Proliferazione cellulare di macrofagi trattati con 100 e 400 µM Au di GNRs per 24 (A) e 48 (B) ore d'incubazione. La capacità di sintesi del DNA è stata analizzata tramite il test d'incorporazione di timidina triziata. I dati sono espressi come conta per minuto (cpm). I valori sono riportati come media ± DS di tre esperimenti indipendenti.

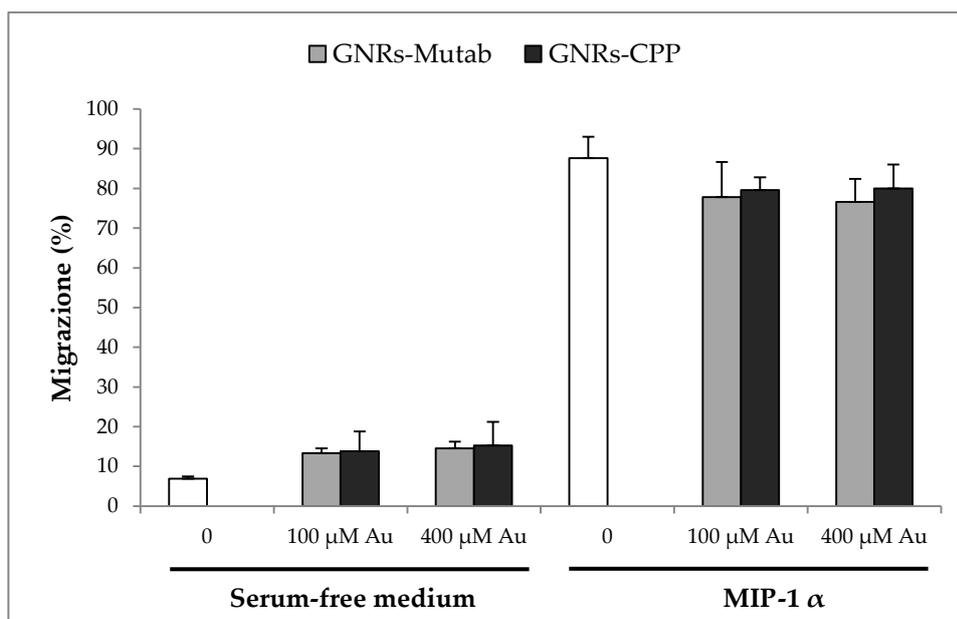


Figura 15. Effetto dei GNRs sulla chemiotassi indotta da MIP-1 α (50 ng/ml). La migrazione delle cellule J774A.1, pre-trattate con 100 e 400 μ M Au per 24 ore, è stata determinata con l'uso di Transwell. Le condizioni di controllo sono rappresentate dalla sola presenza di medium deprivato di siero. I dati sono mostrati come media \pm DS di tre esperimenti indipendenti.

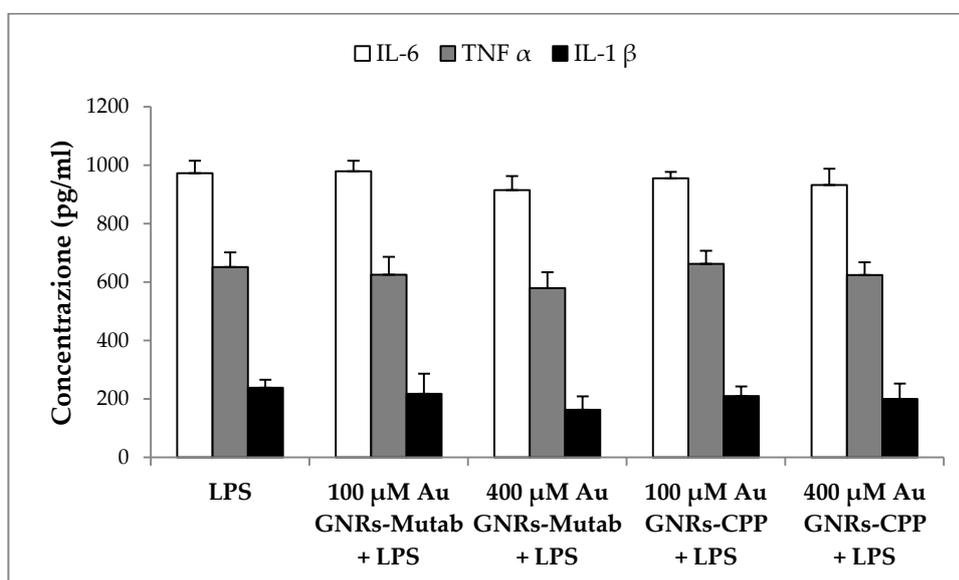


Figura 16. Dosaggio di citochine pro-infiammatorie nel surnatante di macrofagi murini mediante test ELISA. Le cellule sono state stimulate con LPS (50 μ g/ml) in presenza o assenza di un pre-trattamento con GNRs (100 e 400 μ M Au per 24 ore). Nei campioni di controllo e in quelli esposti solamente alle particelle non è stato possibile determinare il contenuto di citochine. I dati sono mostrati come media \pm DS di tre esperimenti indipendenti.

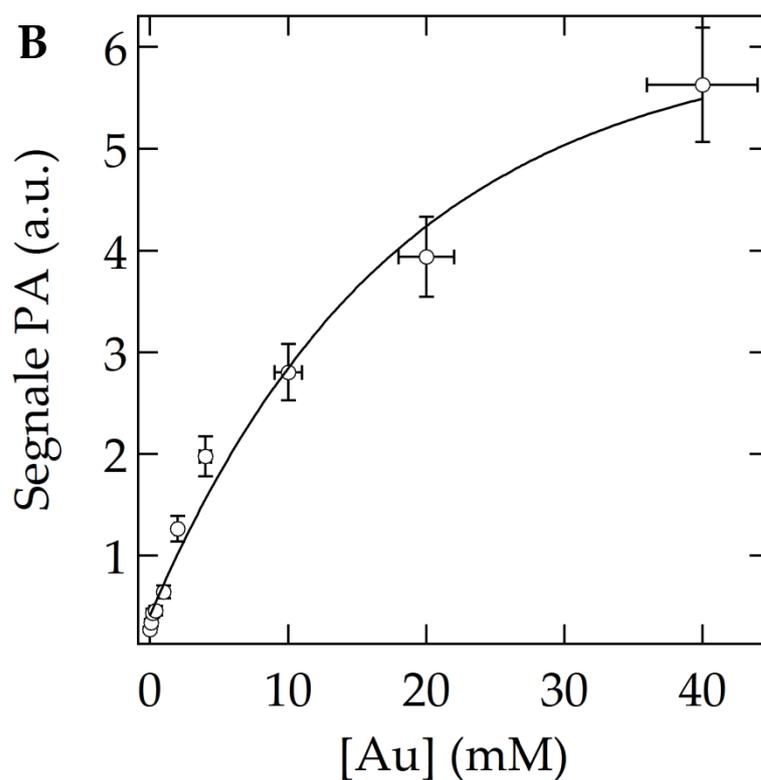
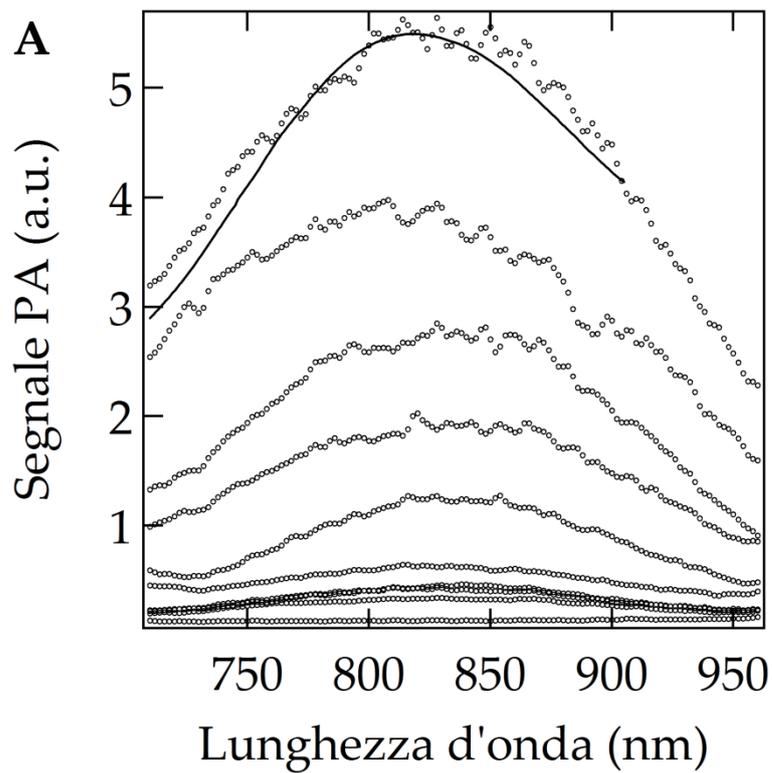


Figura 17. Analisi fotoacustica di concentrazioni crescenti di nanoparticelle cationiche in soluzione tramite l'utilizzo di un apparecchio di *imaging* PA progettato per test preclinici. Le immagini mostrano gli spettri PA di 0, 0.1, 0.2, 0.4, 1, 2, 4, 10, 20 e 40 mM Au, dal basso verso l'alto (A) e l'andamento esponenziale del segnale generato dai GNRs (B). Il segnale PA è misurato in unità arbitrarie (a.u.).

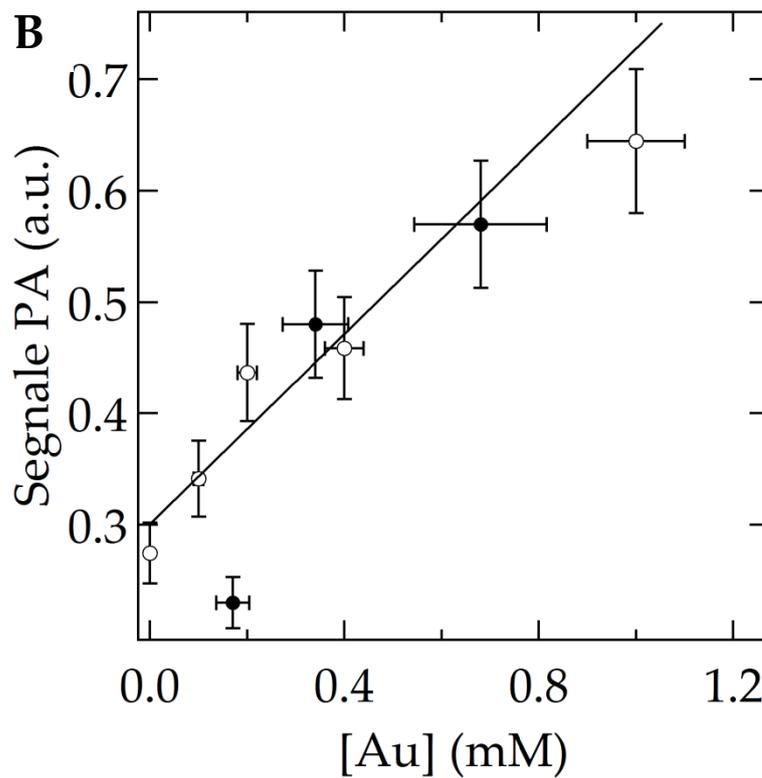
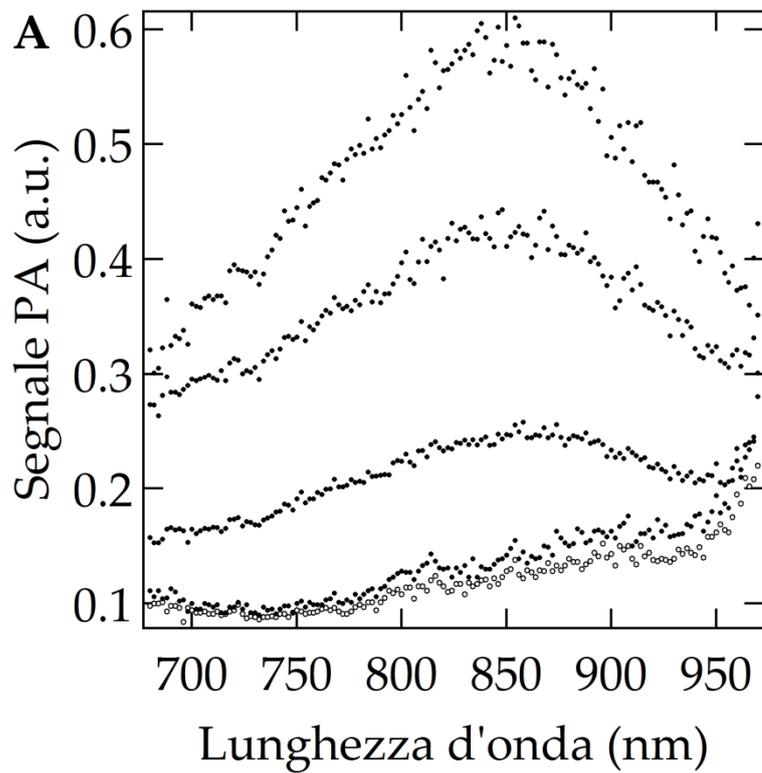


Figura 18. Analisi fotoacustica di macrofagi trattati con particelle plasmoniche per 24 ore. A) Spettri PA di PBS, cellule di controllo e cellule incubate con 100, 200 e 400 μM Au di GNRs, dal basso verso l'alto. B) Andamento del segnale PA dei campioni cellulari caricati con GNRs (punti neri) in riferimento alla curva di calibrazione. Il segnale fotoacustico è misurato in unità arbitrarie.

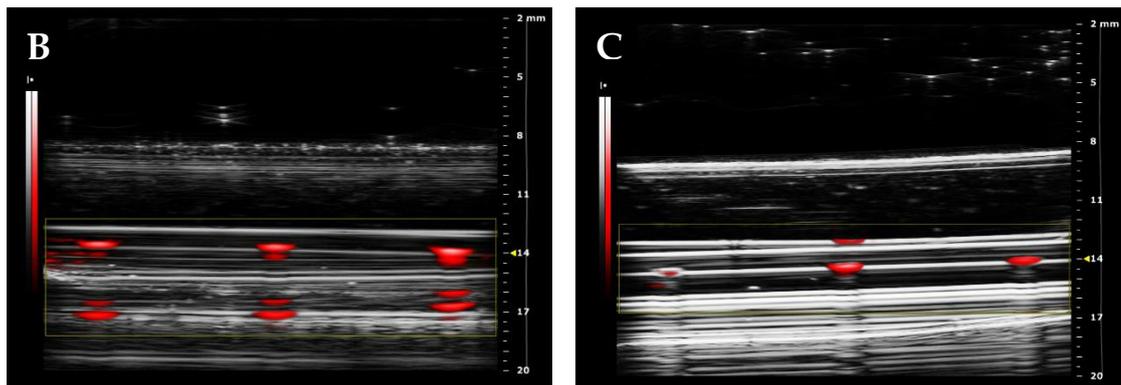
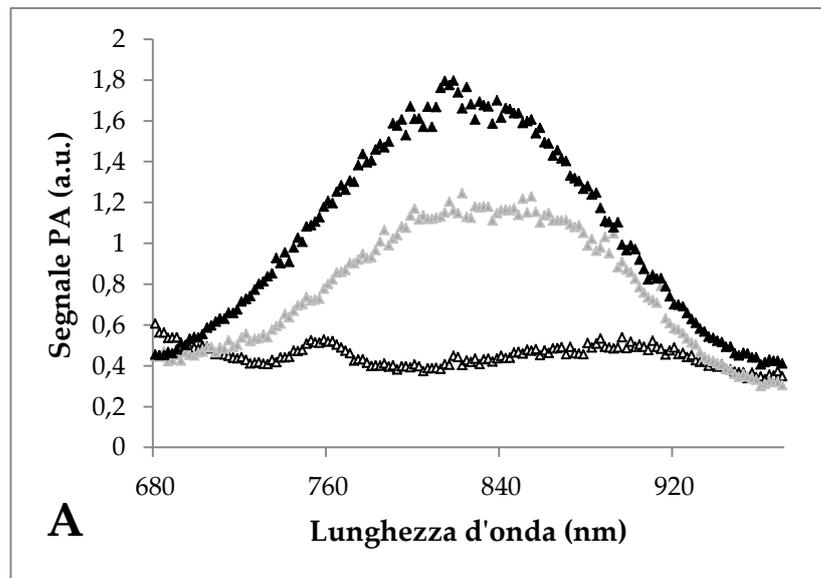


Figura 19. A) Spettri fotoacustici rappresentativi di macrofagi pre-trattati con $400 \mu\text{M}$ Au per 24 ore (\blacktriangle) e GNRs (1 mM Au , \triangle), risospesi in un fluido biologico. Lo spettro PA del sangue esibisce l'impronta tipica dell'emoglobina ossigenata (\triangle). Il segnale è espresso in unità arbitrarie in funzione della lunghezza d'onda.

In basso sono riportate immagini rappresentative del segnale fotoacustico generato da 10, 20, 40 mM Au di GNRs in PBS (B) e da sangue, macrofagi incubati con $400 \mu\text{M}$ Au e 1 mM Au di GNRs in sangue (C).

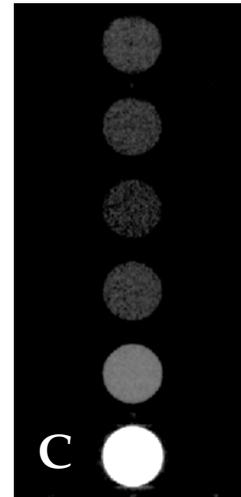
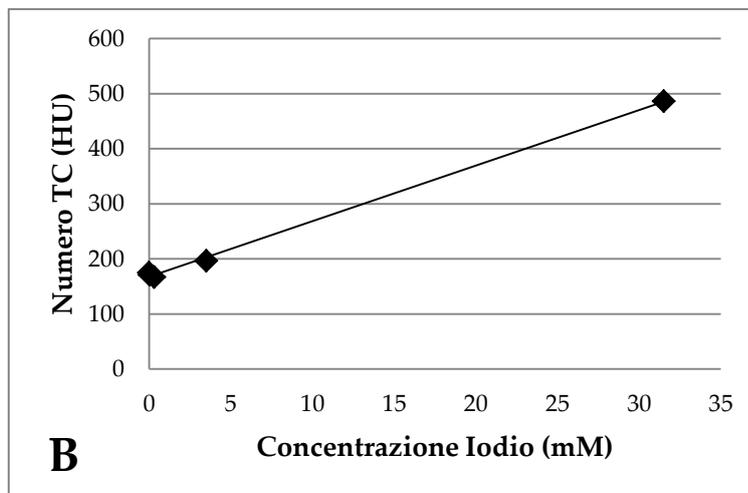
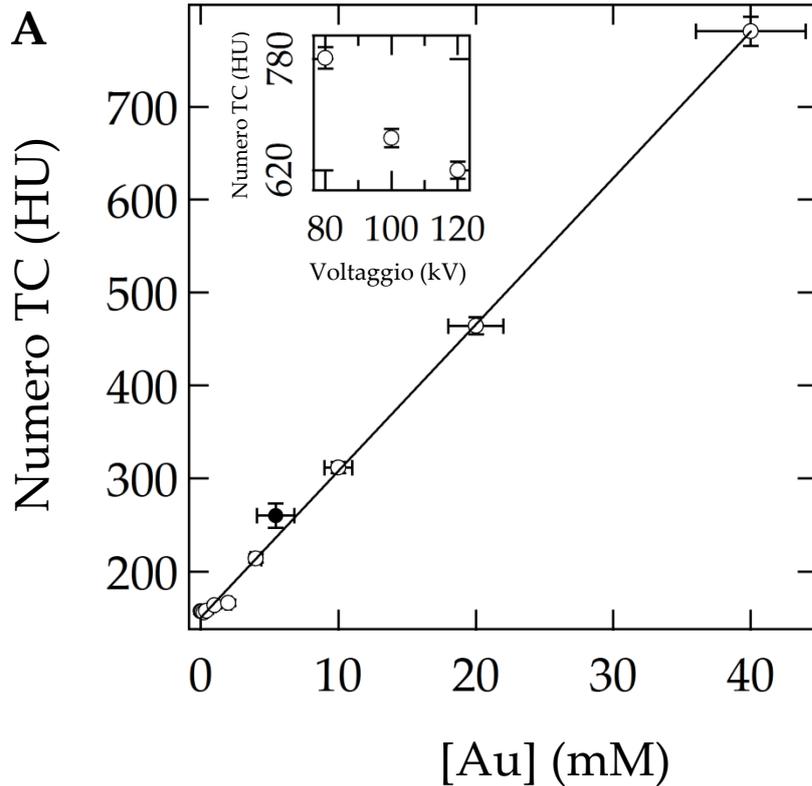


Figura 20. Valutazione dell'attenuazione di raggi X da parte di concentrazioni crescenti di GNRs in soluzione e caricati in macrofagi mediante tomografia computerizzata.

A) Il segnale TC generato da 0.1, 0.2, 0.4, 1, 2, 4, 10, 20, 40 mM Au (punti bianchi) e da cellule pre-trattate con 400 μ M Au (punto nero) è stato acquisito a 80 kV ed espresso in HU. Il riquadro in alto a sinistra indica l'ottimizzazione del segnale in funzione del voltaggio per 40 mM Au. B) Curva di calibrazione con dosi crescenti di iodio (0.0315, 0.315, 3.15, 31.5 mM). C) Scansione TC del fantoccio allestito con macrofagi trattati con 400 μ M Au, 4 mM Au di GNRs in soluzione, PBS e dosi scalari di iodio (3.15, 31.5, 315 mM), rispettivamente dall'alto verso il basso.

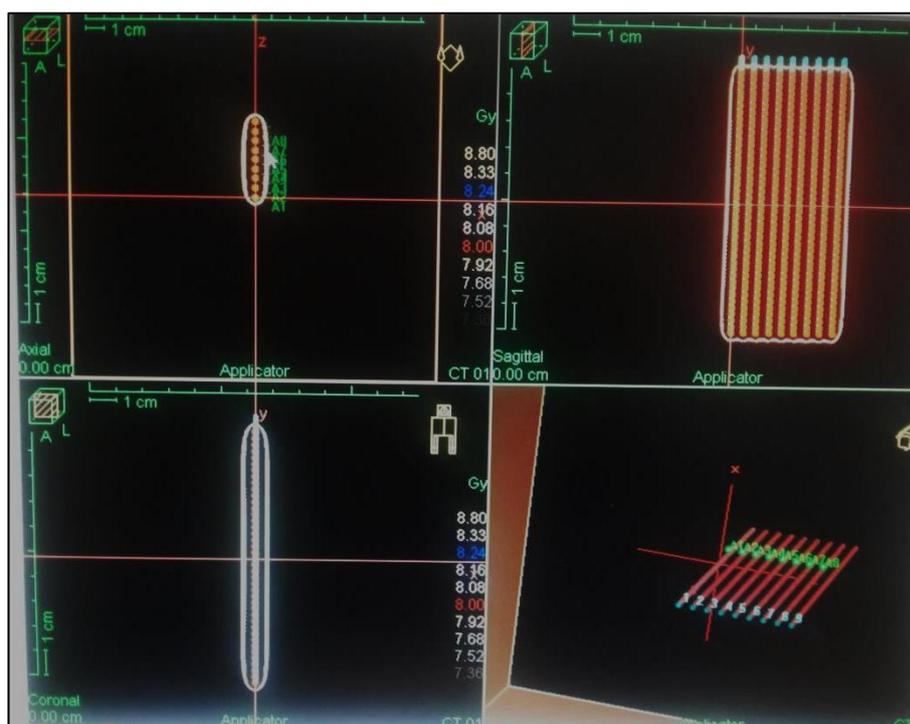


Figura 21. Sezioni trasversale, sagittale e coronale della piastra esposta a 8 Gy di ^{192}Ir secondo il piano di trattamento programmato.

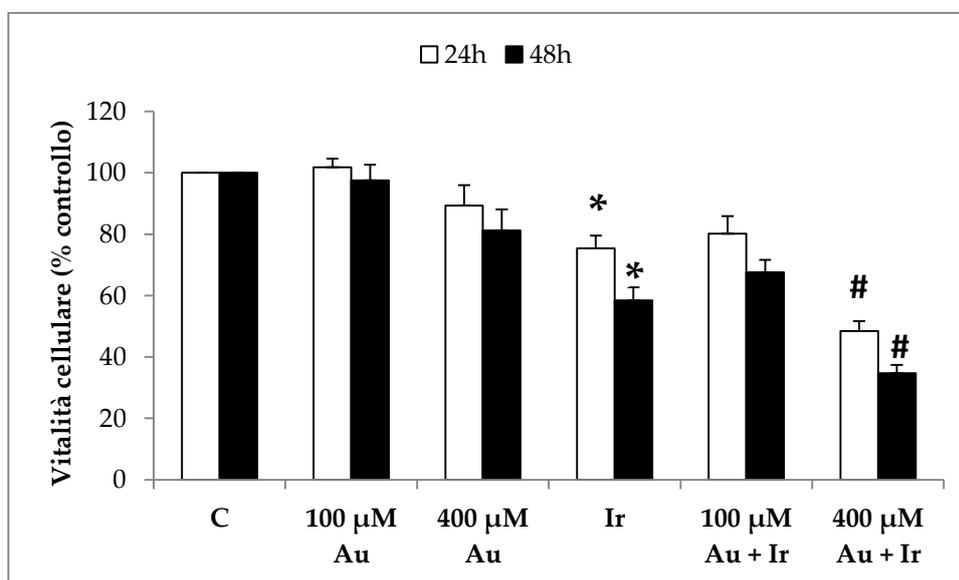


Figura 22. Vitalità cellulare dopo 24 e 48 ore dall'irraggiamento con Iridio 192 (8 Gy) di cellule pre-incubate con 100 e 400 μM Au di GNRs per 24 ore. Il danno cellulare è stato valutato mediante test WST-8. I valori sono espressi come percentuale dell'assorbanza prodotta dal formazano in campioni trattati rispetto al controllo. I dati sono riportati come media \pm DS di tre esperimenti indipendenti. * $p < 0.05$ vs. controllo negativo; # $p < 0.05$ vs. controllo irraggiato.