

Somministrazione intranasale di nanosistemi di ivermectina come agente antitumorale: attenzione alla soppressione del glioma

Maiara Callegaro Velho, Valeria Luiza Winck, Camila da Silveira Mariot, Juliete Nathali Scholl, Augusto Ferreira Weber, Rita de K. UNSSIA Souza, Fernanda Visioli, Fabricio Figueiro, Monique Deon, Diogo André Pellegrino e Ruy Carlos Ruver Beck*



Cita questo: *ACS Biomater. Sci. Ing.* 2025, 11, 4231–4244

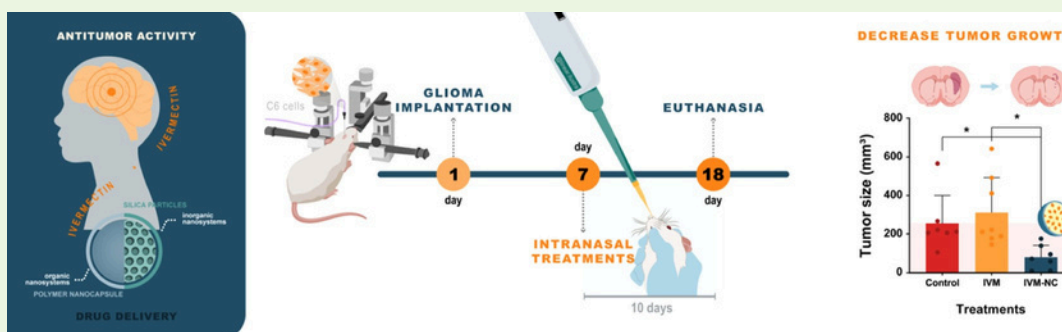


Leggi online

ACCESSO

Metriche e altro

Raccomandazioni di articoli



ASTRATTO: Il glioblastoma presenta sfide significative in neuro-oncologia a causa della sua natura aggressiva, della resistenza ai farmaci e delle restrizioni imposte dalla barriera emato-encefalica. L'ivermectina (IVM), nota per le sue proprietà antiparassitarie, è stata evidenziata come un trattamento promettente per i tumori e una terapia alternativa per il glioma, sebbene presenti una bassa biodisponibilità orale. Pertanto, abbiamo studiato *in vivo* l'effetto dell'incapsulamento IVM nei nanosistemi organici e inorganici, prima proiezione *in vitro* contro diverse cellule tumorali e successivamente valutate *in vivo* in modelli di glioma. Abbiamo prodotto poli(caricati con IVM-caprolattone) (IVM-NC) utilizzando il metodo di deposizione interfacciale e particelle di silice nanostrutturate caricate con IVM (IVM-MCM) caricando IVM in silice commerciale MCM-41 utilizzando il metodo di bagnatura incipiente. IVM-NC presentava dimensioni nanometriche (190 nm), una distribuzione dimensionale unimodale (span <2) e un'elevata efficienza di incapsulamento (100% a 1 mg/mL). IVM-MCM presentava una struttura mesoporosa esagonale ben organizzata e un elevato carico di farmaco (0,12 mg/mg). L'IVM nanoincapsulato ha ridotto significativamente la vitalità di varie linee cellulari tumorali, in particolare linee cellulari di glioma, il che ci ha portato a valutarle in un modello preclinico di glioma. Abbiamo impiantato cellule C6 in ratti Wistar maschi adulti. La somministrazione intranasale di IVM-NC (60 µg/ratto/giorno per 10 giorni) ha determinato una maggiore riduzione delle dimensioni del tumore rispetto al gruppo trattato con IVM libero, insieme a miglioramenti istopatologici. Il trattamento con IVM-MCM non ha ridotto le dimensioni del tumore. Tuttavia, entrambi i trattamenti sono stati ben tollerati, senza effetti avversi sul peso, sui parametri biochimici o ematologici o sull'istologia polmonare. Inoltre, la dose equivalente efficace di IVM (26 µg/kg) nel modello di glioma nel ratto era inferiore alla dose umana approvata per le infezioni parassitarie. Questo studio rappresenta la prima esplorazione della somministrazione di IVM al cervello. In sintesi, la somministrazione nasale di IVM nanoincapsulata tramite nanocapsule rappresenta una promettente strada per la terapia mirata contro il glioblastoma, con potenziali implicazioni per la traslazione clinica.

PAROLE CHIAVE: cancro, glioblastoma, ivermectina, naso-cervello, nanocapsule, silice mesoporosa

1. INTRODUZIONE

L'incidenza del cancro è allarmante: è la seconda causa di morte più comune al mondo ed è responsabile di circa 1 decesso su 6.¹ Nel 2022 si stima che si siano verificati 20 milioni di nuovi casi di cancro e 9,7 milioni di decessi.² Questo scenario è influenzato dall'invecchiamento della popolazione, dalle abitudini di vita e dai fattori ambientali.³

Il cancro al seno e al polmone sono i tumori più comunemente diagnosticati al mondo, mentre i tumori del sistema nervoso centrale (SNC) si classificano al 18° posto per incidenza.⁴ I gliomi sono i tumori primari del

SNC; rappresentano circa il 60% dei tumori cerebrali.⁵ La classificazione dei gliomi si basa sul sistema dell'Organizzazione Mondiale della Sanità (OMS), con gradi da I a IV.

Ricevuto: 1 aprile 2025

Revisionato: 22 maggio 2025

Accettato: 23 maggio 2025

Pubblicato: 11 giugno 2025



I gliomi di grado inferiore (grado II e III) presentano una natura invasiva e un rischio elevato di progressione o recidiva in gliomi di grado elevato (grado IV).⁶Il glioblastoma di grado IV rappresenta il sottotipo più comune e aggressivo, caratterizzato da elevata invasività e mutazioni multiple. La prognosi è, nella migliore delle ipotesi, infausta, con un'aspettativa di vita di circa 15 mesi.⁷La sua posizione anatomica pone delle sfide alla terapia convenzionale a causa della presenza della barriera emato-encefalica (BBB) e dei meccanismi di resistenza multifarmaco (MDR).⁸

L'ivermectina (IVM) è un farmaco importante per il controllo delle infezioni parassitarie grazie al suo basso costo e all'ampio spettro d'azione.⁹Nell'ultimo decennio, l'IVM ha attirato l'attenzione grazie al suo interessante potenziale per il riposizionamento dei farmaci, soprattutto nel trattamento del cancro. Esistono prove dei suoi effetti antiproliferativi e antitumorali multi-target.*in vitro* e *in vivo* in vari tipi di cancro umano.¹⁰Nell'adenocarcinoma mammario, l'IVM ha dimostrato la capacità di inibire la proliferazione cellulare inducendo apoptosi e autofagia.¹¹Meccanismi simili sono stati riportati nelle linee cellulari del cancro ovarico,¹²cancro alla prostata,¹³cancro al colon e melanoma.¹⁴Inoltre, l'IVM ha portato alla morte cellulare attraverso l'induzione di disfunzione mitocondriale e danno ossidativo nelle linee cellulari di leucemia umana.^{13,15}e cancro renale.¹⁶Nello specifico, nelle cellule del glioma, i meccanismi antiproliferativi dell'IVM sono stati associati all'induzione dell'apoptosi attraverso un percorso dipendente dalla caspasi,¹⁷inibizione del ciclo cellulare nel G0/G1 fase,¹⁸e l'inibizione dell'RNA elicasi, bloccando così l'invasione e la proliferazione cellulare.¹⁹Pertanto, il meccanismo d'azione multitarget e il profilo di sicurezza dell'IVM lo rendono un candidato promettente per la sperimentazione preclinica. Tuttavia, le proprietà indesiderate dell'IVM, come la bassa solubilità in acqua e la biodisponibilità limitata,²⁰ostacolano la sua idoneità come farmaco candidato e ne limitano l'applicazione clinica. Di conseguenza, è necessaria un'accurata selezione e ottimizzazione della formulazione e della via di somministrazione per il target terapeutico.

Lo sviluppo di sistemi di somministrazione di farmaci offre una strategia promettente per migliorare l'efficacia antitumorale dell'IVM. Inoltre, la somministrazione intranasale, in particolare mediante nanovettori, rappresenta un approccio alternativo per la somministrazione dei farmaci al cervello, aumentandone l'assorbimento e la biodisponibilità cerebrale. Aggirando la barriera ematoencefalica attraverso l'innervazione olfattiva e trigeminale, la somministrazione intranasale facilita il trasporto diretto e rapido dei farmaci al cervello, superando i limiti delle vie di somministrazione convenzionali.²¹

I sistemi basati su nanoparticelle hanno dimostrato efficacia nella somministrazione al cervello attraverso la via naso-cervello, in particolare migliorando il targeting del farmaco e riducendo al minimo la distribuzione sistemica.^{21–25}In questo scenario, i nanomateriali organici e inorganici sono stati segnalati come vettori per un'efficiente somministrazione di farmaci al cervello tramite somministrazione intranasale,²⁶compresi i vettori polimerici e lipidici.²⁷Sono attualmente all'avanguardia nei nuovi trattamenti neurofarmacologici, dimostrando versatilità chimica nell'incapsulare i farmaci e modificarne la farmacocinetica e la biodistribuzione. Parallelamente, le nanoparticelle inorganiche, con composizioni diverse (ad esempio, silice, grafene, argento, oro e ossido di ferro) e forme (barre, prismi, sfere e strutture porose), offrono un'opzione vantaggiosa per la creazione di sistemi avanzati di somministrazione di farmaci.²⁶

Nel nostro studio precedente, ci siamo concentrati sul potenziamento delle proprietà biofarmaceutiche dell'IVM per migliorarne l'efficacia antitumorale a concentrazioni clinicamente rilevanti. Abbiamo studiato l'incapsulamento dell'IVM in diversi sistemi nanostrutturati, inclusi sistemi inorganici (particelle di silice nanostrutturate) e

organico (poli-e-nanocapsule di caprolattone). Poli(eLe nanocapsule di PCL (caprolattone) hanno dimostrato una maggiore efficienza di incapsulamento, una migliore stabilità e un rilascio controllato di IVM. Al contrario, le particelle di silice hanno offerto un'elevata capacità di carico del farmaco e hanno migliorato la velocità di dissoluzione di IVM.²⁸Nel presente studio, abbiamo valutato l'impatto di questi nanovettori sull'*in vitro* e *in vivo* effetti antiproliferativi dell'IVM contro i modelli di cellule tumorali e i loro *in vivo* efficacia, utilizzando un modello preclinico di glioma nei ratti. La nostra indagine ha incluso lo screening per valutare la vitalità di diverse linee cellulari tumorali *in vitro* e valutazione *in vivo* Soppressione della crescita del glioma dopo somministrazione intranasale. Questo studio rappresenta la prima indagine sulla somministrazione naso-cervello di nanosistemi caricati con IVM per il trattamento del glioblastoma. Inoltre, abbiamo monitorato la sicurezza delle formulazioni valutando parametri ematologici, marcatori metabolici, marcatori epatici e istopatologia.

2. MATERIALI E METODI

2.1. Prodotti chimici. IVM (purezza 97,5%, peso molecolare = 875,1 g/mol) è stato ottenuto da Hebei Veyong Animal Pharmaceutical (Hebei, Cina). Per quanto riguarda gli eccipienti della formulazione, PCL e monooleato di sorbitano (Span 80) sono stati acquistati da Sigma-Aldrich (San Paolo, Brasile), mentre trigliceridi a catena media e polisorbato 80 (Tween 80) sono stati ottenuti rispettivamente da Delaware (Porto Alegre, Brasile) e Henrifarma (San Paolo, Brasile). La silice commerciale tipo MCM-41 è stata acquistata da Sigma-Aldrich (San Paolo, Brasile). Il terreno di coltura Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM), la penicillina/streptomycin, l'amfotericina e il reagente 4,5-dimetil tiazol-2-il-2,5-difenil tetrazolio (MTT) sono stati acquistati da Sigma-Aldrich (St. Louis, USA), mentre il siero fetale bovino (FBS) è stato ottenuto da Gibco (Grand Island, NY, USA).

2.2. Preparazione e caratterizzazione fisico-chimica del poli caricato con ivermectinae-caprolattone) Nanocapsule. Le nanocapsule PCL sono state prodotte mediante deposizione interfacciale di polimeri preformati.^{28,29}Per la preparazione di nanocapsule caricate con ivermectina (IVM-NC), è stata formulata una fase organica (un volume totale di 27 mL), sciogliendo 0,01 g di IVM, 165 μ L di trigliceridi a catena media e 0,1 g di PCL, con agitazione magnetica a 40 °C per 4 ore. Successivamente, la fase organica è stata iniettata in una fase acquosa (54 mL) contenente 0,078 g di polisorbato 80 con agitazione continua, mantenuta per un periodo di 10 minuti. Infine, l'acetone è stato rimosso e la sospensione è stata concentrata a pressione ridotta (Rotavapor R-100, Buchi, Flawil, Svizzera), fino a raggiungere un volume finale di 10 mL e una concentrazione di 1 mg/mL di IVM. Dopo la preparazione, le dimensioni delle particelle e la distribuzione dimensionale (Span) sono state determinate mediante diffrazione laser (Mastersizer, Malvern Instruments, Malvern, Regno Unito), con il diametro mediano calcolato in base al diametro medio ponderato in volume (D[4,3]). Inoltre, il diametro idrodinamico medio delle particelle (z-media) e l'indice di polidispersità (PDI) sono stati valutati utilizzando la diffusione dinamica della luce (Zetasizer Nano ZS, Malvern Instruments) dopo aver diluito i campioni 500 volte in acqua ultrapura filtrata (0,45 μ m). Il potenziale zeta (ZP) è stato misurato utilizzando la tecnica della mobilità elettroforetica nello stesso strumento, utilizzando campioni diluiti 500 volte in NaCl filtrato 10 mM (0,45 μ m). Infine, il pH della sospensione di nanocapsule è stato valutato utilizzando un potenziometro precedentemente calibrato (DM-22, Digimed, San Paolo, Brasile) immerso direttamente nella formulazione. Il contenuto di IVM è stato

quantificato utilizzando la cromatografia liquida ad alte prestazioni (HPLC) basata su un metodo precedentemente convalidato (Velho et al. 2024). Il sistema cromatografico includeva un cromatografo liquido (Shimadzu, Kyoto, Giappone) dotato di una colonna Shim-pack CIC Shimadzu (4,6 mm×250 mm, con estremità chiusa). Il campione è stato eluito con una miscela metanolo:acqua (90:10) a una portata di 1 mL/min. L'estrazione del farmaco da IVM-NC è stata eseguita utilizzando metanolo (20 µg/mL) con agitazione magnetica per 6 min seguita da agitazione con vortice per 2 min. Il farmaco è stato rilevato a una lunghezza d'onda di 254 nm, con un volume di iniezione del campione di 50 µL. Le curve di calibrazione lineare per IVM sono state stabilite nell'intervallo 0,5–20 µg/mL ($R > 0,99$). L'efficienza di incapsulamento (%EE) è stata determinata dopo la separazione di IVM-NC dalla frazione libera di IVM mediante ultrafiltrazione-centrifugazione (0,45 µm membrana con pori da m, Millipore, Burlington, USA).

2.3. Preparazione e caratterizzazione fisico-chimica di particelle di silice nanostrutturate caricate con ivermectina. L'IVM è stato incorporato nella silice nanostrutturata commerciale MCM-41 (esagonale) utilizzando il metodo di bagnatura incipiente³⁰ e una soluzione etanolica di 20 mg/mL IVM, come descritto nel nostro studio precedente.²⁸ Poi, 700 µL di questa soluzione sono stati aggiunti a 100 mg di MCM-41 precedentemente essiccato, equivalenti a un carico di farmaco del 12%. Il campione è stato essiccato a temperatura ambiente per 72 ore fino alla completa evaporazione del solvente. Le nanoparticelle di silice mesoporosa (MSN) caricate con IVM sono state denominate IVM-MCM. Il contenuto di farmaco della formulazione IVM-MCM è stato determinato mediante HPLC secondo le condizioni cromatografiche descritte nella Sezione 2.2. IVM-MCM è stato essiccato a 90°C per 2 ore per eliminare l'umidità. Successivamente, 8 mg del campione sono stati miscelati con 50 mL di metanolo, sottoposti ad agitazione ultrasonica per 2 ore a temperatura ambiente, seguita da agitazione magnetica per 1 ora (750 rpm). La sospensione risultante è stata centrifugata e il surnatante raccolto è stato filtrato (0,45 µm) prima di essere iniettati nel sistema cromatografico. L'analisi termogravimetrica (TGA) è stata utilizzata come metodo complementare per valutare il carico di farmaco di IVM-MCM e la sua stabilità termica. L'analisi è stata condotta utilizzando un analizzatore termogravimetrico (modello TGA-50, Shimadzu, Kyoto, Giappone). I campioni sono stati riscaldati da temperatura ambiente a 90°C a una velocità del 20°C/min, sotto un flusso di argon di 50 mL/min.

2.4. Analisi morfologiche. IVM-NC e IVM-MCM sono stati caratterizzati morfologicamente utilizzando un microscopio elettronico a trasmissione (JEOL JEM-1011, Peabody, USA) a una tensione di accelerazione di 100 kV, utilizzando griglie di rame rivestite di carbonio. IVM-MCM è stato disperso in isopropanolo, sottoposto ad agitazione ultrasonica per 5 minuti e quindi applicato alla griglia. La sospensione di IVM-NC è stata diluita 1:10 (v/v) in acqua ultrapura filtrata. L'acetato di uranile (2%, p/v) è stato utilizzato come contrasto negativo.³¹

2.5. Valutazione dell'effetto antiproliferativo in vitro e della citotossicità. Lo screening antitumorale dei sistemi nanostrutturati di IVM è stato condotto utilizzando una linea cellulare di adenocarcinoma mammario umano (MCF-7), due linee cellulari di carcinoma cervicale umano (HeLa e SiHa) e una linea cellulare di glioma di ratto (C6). Inoltre, due linee cellulari sane – cellule renali fibroblasto-simili (Vero) e cellule fibroblastiche polmonari fetali (MRC-5) – sono state valutate come controlli non tumorali per valutare la citotossicità di IVM nell'intervallo di concentrazione testato. Le linee cellulari tumorali sono state acquistate dall'American Type Culture Collection (Rockville, MD, USA).

2.5.1. Coltura cellulare. Le linee cellulari sono state coltivate in DMEM integrato con il 10% (v/v) di FBS, contenente l'1% di penicillina/streptomicina e lo 0,1% di amfotericina. Tutte le linee cellulari sono state mantenute in fiasche di polistirene a 37°C in un'atmosfera umida contenente il 5% di CO₂. Dopo aver determinato il numero di cellule vitali mediante colorazione con blu di tripan allo 0,4% e conteggio in una camera di Neubauer, le cellule sono state seminate in piastre da 96 pozzetti (5.000 cellule/pozzetto). Ventiquattro ore dopo, sono state trattate e incubate per 48 o 72 ore (37°C e 5% CO₂). I trattamenti sono stati descritti nella Sezione 2.5.2.

2.5.2. Trattamenti. I trattamenti consistevano in IVM-NC, IVM-MCM e IVM non incapsulato a concentrazioni di 0,5, 1, 5, 10 e 25 µM del farmaco. Sono state valutate anche formulazioni prive di farmaco, ovvero nanocapsule semplici (NC) e MCM-41 (particelle di silice) in una quantità di particelle equivalente alla concentrazione più elevata di ciascuna formulazione. IVM-NC è stato diluito direttamente nei pozzetti di trattamento, mentre IVM-MCM è stato sospeso in soluzione salina tamponata con fosfato (PBS) per raggiungere una concentrazione di 1 mg/mL di farmaco e successivamente diluito nei pozzetti. Per la preparazione della soluzione di IVM libera, è stata preparata una soluzione madre con 16,4 mg/mL (16,7 mM) di farmaco disciolti in dimetilsolfossido (DMSO) e successivamente diluiti in PBS per raggiungere una concentrazione di lavoro di 0,5 mg/mL. La concentrazione massima di DMSO utilizzata per trattare le cellule è stata dello 0,6%; è stata valutata anche come controllo del veicolo. Il controllo negativo (CN) ha ricevuto solo terreno di coltura. Per questo esperimento, tutte le sospensioni di nanocapsule sono state preparate in condizioni asettiche per garantirne la sterilità e consentire una valutazione biologica sicura. Le particelle di silice sono state sottoposte a esposizione ai raggi ultravioletti (UV) (20 min) prima della somministrazione di ciascun trattamento per prevenire qualsiasi contaminazione microbiologica.

2.5.3. Saggio di vitalità cellulare. La vitalità cellulare è stata valutata con il test MTT.³² Al termine del periodo di trattamento (48 o 72 ore), il surnatante è stato rimosso e i pozzetti sono stati lavati con PBS. Quindi, 100 µL della soluzione MTT (0,5 mg/mL) è stata aggiunta a ciascun pozzetto e le piastre sono state incubate per 4 ore (37°C e 5% CO₂) al riparo dalla luce. Il surnatante è stato rimosso dai pozzetti e le cellule sono state risospese in DMSO per la solubilizzazione dei cristalli di formazano formati dalla riduzione del sale MTT da parte delle cellule vitali. Infine, l'assorbanza è stata misurata a 570 e 630 nm con uno spettrofotometro (Spectramax M2e e interfaccia software SoftMax Pro, Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA). L'effetto citotossico è stato espresso come percentuale di vitalità cellulare rispetto alle cellule di controllo (100%).

2.6. Progettazione sperimentale in vivo.
2.6.1. Animali. Per la sperimentazione sono stati utilizzati ratti Wistar maschi (300–400 g, 10 settimane di età). In vivo esperimento, approvato dal Comitato Etico dell'Università Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS, Porto Alegre, Brasile; numero di protocollo: 43058) ed eseguito in accordo con le linee guida fornite in "Principi di cura degli animali da laboratorio". I ratti sono stati alloggiati in condizioni ambientali controllate (fotoperiodo di 12 ore a 22 ± 2°C), con cibo e acqua forniti *ad libitum*. I ratti sono stati acclimatati per 2 settimane prima di iniziare l'esperimento.

2.6.2. Dimensione del campione. In uno studio pilota per determinare la dose appropriata del farmaco, la dimensione del campione è stata calcolata in base alla letteratura pertinente.²⁴ La dimensione del campione prevista, indicata come N , è stato fissato a 7 ratti per gruppo, inclusi i gruppi di trattamento IVM, IVM-NC e IVM-MCM. Per le dimensioni del tumore, l'analisi ematologica, biochimica e istopatologica, in accordo con studi precedenti che coinvolgevano un modello di impianto di glioblastoma in

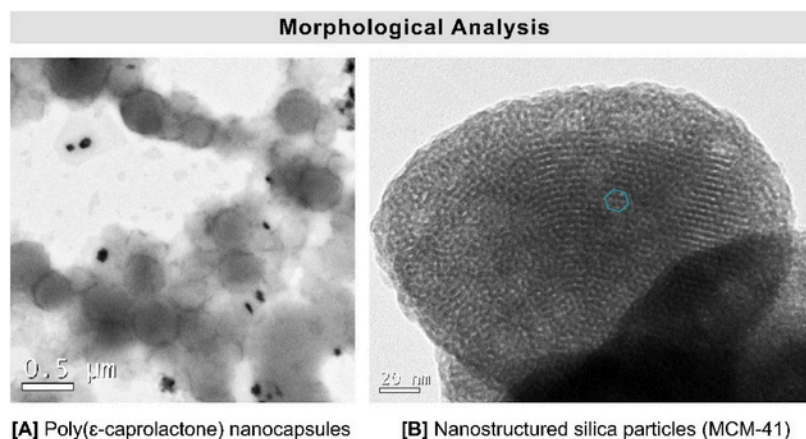


Figura 1. Analisi morfologica mediante microscopia elettronica a trasmissione. [A] Nanocapsule caricate con ivermectina (IVM-NC) con un'immagine ingrandita 200.000×, e [B] silice nanostrutturata mesoporosa (MCM-41) con un'immagine ingrandita 300.000×. La forma verde indica la disposizione esagonale dei pori.

ratti,³³ La dimensione del campione calcolata è stata adattata a 10 ratti per gruppo, per un totale di 81 ratti per l'intero esperimento.

2.6.3. Trattamenti antitumorali. In uno studio pilota, la somministrazione intranasale è stata convalidata per la sua capacità di somministrare il trattamento al cervello e per la dose appropriata del farmaco. Ratti ($N=7$) sono stati trattati con IVM-NC, IVM-MCM o una soluzione di IVM, tutti alla dose di 1 mg/mL di farmaco. I ratti sono stati posti in posizione supina e 30 μ L del trattamento è stato somministrato delicatamente in ciascuna narice utilizzando una micropipetta, equivalente a 60 μ g di farmaco per ratto. Dopo 1 ora, i ratti sono stati soppressi per l'analisi della concentrazione del farmaco nel cervello. Per il trattamento antitumorale, i ratti sono stati divisi casualmente in sei gruppi di trattamento ($N=8-10$ ratti per gruppo):

1. Gruppo di controllo: DMSO al 5% in soluzione salina;
2. Gruppo IVM – Soluzione IVM (1 mg/mL);
3. Gruppo IVM-NC – Nanocapsule caricate con IVM (1 mg/mL di farmaco);
4. Gruppo NC – nanocapsule scariche;
5. Gruppo IVM-MCM – Particelle di silice mesoporosa caricate con IVM (1 mg/mL di farmaco);
6. Gruppo MCM-41 – particelle di silice incontaminate.

Sette giorni dopo l'impianto del glioma, è stato condotto un protocollo di somministrazione intranasale di 10 giorni secondo un metodo precedentemente stabilito, somministrando una dose di IVM di 60 μ g/ratto in un volume totale di 60 μ L al giorno. La dose è stata determinata in base al volume massimo di somministrazione intranasale raccomandato nei ratti e alla tolleranza osservata durante lo studio pilota, assicurando che non si verificassero starnuti o inalazione rapida. Inoltre, la dose del farmaco è stata limitata dalla massima incapsulazione dell'IVM in nanocapsule polimeriche, ovvero lo 0,1% (p/v, 1 mg/mL). Il 18° giorno dello studio (7 giorni dopo l'impianto del glioma + 10 giorni di trattamento), i ratti sono stati soppressi con sovradosaggio di isoflurano. I cervelli sono stati estratti per la quantificazione del volume e la valutazione istopatologica, i polmoni sono stati rimossi per la valutazione istologica e sono stati raccolti campioni di sangue per analisi biochimiche ed ematologiche.

2.7. Modello di glioma in vivo. L'impianto del glioma è stato effettuato secondo un protocollo stabilito.^{33,34} In breve, le cellule di glioma di ratto C6 (a circa l'80% di confluenza) sono state sottoposte a tripsinizzazione, un singolo lavaggio con DMEM, centrifugazione e sospensione nello stesso mezzo. Maschio

I ratti Wistar (300-400 g) sono stati anestetizzati tramite somministrazione intraperitoneale (ip) di ketamina/xilazina (rispettivamente 90 e 6 mg/kg). Successivamente, utilizzando una microsiringa Hamilton accoppiata a una pompa per infusione (1 μ L/min), circa 3×10^5 cellule in un volume di 3 μ L sono stati iniettati a una profondità di 6 mm nello striato destro (coordinate del bregma: 0,5 mm posteriormente e 3 mm lateralmente). I ratti sono stati trattati 7 giorni dopo l'impianto.

2.8. Volume del tumore e analisi istopatologica. I cervelli estratti sono stati fissati in formalina al 10% e successivamente sezionati sul piano coronale in quattro fette dal punto di impianto del tumore (due fette in avanti e due fette indietro), ciascuna delle quali misurava 3 mm. Quindi, le fette sono state incluse in paraffina e nuovamente sezionate con un microtomo scorrevole (3 μ m di spessore) per la colorazione con ematossilina ed eosina (HandE) e la successiva analisi istopatologica. Infine, le immagini sono state acquisite utilizzando una fotocamera digitale collegata a un microscopio (BX-51, Olympus, Tokyo, Giappone). L'area tumorale (mm²) è stato determinato utilizzando il software ImageJ (National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA). Quindi, il volume totale del tumore (mm³) è stato calcolato moltiplicando l'area per lo spessore della sezione e sommando i volumi delle aree segmentate.

Un patologo calibrato ($\kappa > 0,75$) all'oscuro dei gruppi di trattamento ha esaminato le sezioni cerebrali colorate con la tecnica HandE. La valutazione si è basata su parametri quali emorragia intratumorale, necrosi, edema peritumorale, pseudopalisata periferica, proliferazione vascolare e infiltrazione linfocitaria, classificati come assenti o presenti. In ciascuna sezione istologica, è stato selezionato il segmento con la più alta frazione tumorale per analizzare questi parametri.

2.9. Valutazione preliminare della tossicità. Il peso corporeo di ciascun ratto è stato misurato periodicamente durante lo studio per valutare se il trattamento avesse causato un aumento o una perdita di peso anormali. I pesi sono stati registrati il giorno dell'intervento chirurgico di impianto del tumore (giorno 0), prima dell'inizio del trattamento (giorno 7) e al termine del trattamento (giorno 18). Per confermare che i trattamenti e la via di somministrazione scelta non inducessero tossicità polmonare, i tessuti polmonari sono stati rimossi, fissati in formalina al 10%, trattati regolarmente e inclusi in paraffina. Successivamente, 3 μ m sezioni sono state ottenute e colorate con HandE. Un patologo ignaro del gruppo di trattamento ha condotto un'analisi istologica per valutare

presenza o assenza di emorragia, edema, infiammazione e necrosi. Campioni di sangue sono stati ottenuti mediante puntura intracardiaca dai ratti soppressi, raccolti in una provetta con acido etilendiamminotetraacetico (EDTA) e una provetta con attivatore di coagulazione. L'obiettivo era valutare i parametri ematologici e i marcatori metabolici, tra cui glucosio e colesterolo sierici. Inoltre, sono stati valutati i marcatori epatici, ovvero alanina aminotransferasi (ALT) e aspartato aminotransferasi (AST), e i marcatori della funzionalità renale, creatinina e urea.

2.10. Analisi statistica. Per l'analisi statistica è stato utilizzato GraphPad Prism (GraphPad Software, La Jolla, CA, USA). I dati sono presentati separatamente per ciascun protocollo sperimentale, espressi come media \pm deviazione standard ove applicabile. La significatività statistica è stata valutata utilizzando l'analisi della varianza unidirezionale (ANOVA). *in vitro* I dati del test sono stati sottoposti ad analisi utilizzando i test post hoc di Dunnett e Tukey. I dati sul volume tumorale sono stati pre-elaborati utilizzando il metodo ROUT con un coefficiente Q dell'1% per identificare e rimuovere i valori anomali. Un'ulteriore analisi statistica ha coinvolto il test non parametrico di Kruskal-Wallis. Un valore $p < 0,05$ è stato considerato statisticamente significativo.

3. RISULTATI

3.1. Nanocapsule caricate con ivermectina. Formulazioni IVM-NC ($N=3$) sono stati preparati con un contenuto di farmaco pari a $1,02 \pm 0,04$ mg/mL (0,1% p/v), un'elevata efficienza di incapsulamento dell'IVM (100%) e caratteristiche macroscopiche omogenee. Le nanocapsule hanno mostrato una distribuzione granulometrica unimodale esclusivamente nell'intervallo nanometrico, con un diametro medio ($D[4,3]$) di 187 ± 8 nm e uno Span di $1,5 \pm 0,1$. Secondo le analisi di diffusione dinamica della luce, l'IVM-NC ha mostrato una media Z di 213 ± 10 nm e un PDI basso ($0,13 \pm 0,02$). Le nanocapsule hanno anche mostrato uno ZP negativo di -11 ± 1 mV. Le sospensioni acquose avevano un pH leggermente acido di $4,8 \pm 0,01$. Le nanocapsule non caricate hanno mostrato caratteristiche nanometriche simili. Inoltre, la microscopia elettronica a trasmissione (Figura 1A) ha rivelato particelle sferiche con bordi regolari e ben definiti e un diametro medio stimato di 400 nm.

3.2. Particelle di silice nanostrutturate caricate con ivermectina. Sulla base di analisi di microscopia elettronica a trasmissione (Figura 1B), MCM-41 presentava una disposizione esagonale dei pori nell'intervallo nanometrico con organizzazione regolare. IVM-MCM aveva un contenuto di farmaco stimato di 0,12 mg/mg, che rappresenta un carico teorico di farmaco del 12% (p/p). Il contenuto di IVM era pari a $0,080 \pm 0,004$ mg/mg.

Abbiamo utilizzato la TGA come metodo aggiuntivo per valutare il carico di farmaco in IVM-MCM. I profili termici di MCM-41, IVM-MCM e IVM sono mostrati in Figura 2. La perdita di massa iniziale fino a 150°C osservata in tutti i campioni può essere attribuita al desorbimento dell'acqua. La decomposizione organica dell'IVM inizia intorno ai 300°C , con decomposizione totale che avviene sopra i 450°C .³⁵ I campioni di silice (MCM-41 e IVM-MCM) hanno mostrato un calo di massa superiore a 600°C dovuto al processo di deidrossilazione.³⁶ Il termogramma IVM-MCM ha mostrato una diminuzione della massa intorno a 400°C , suggerendo che la perdita di massa è correlata alla decomposizione dell'IVM. Abbiamo calcolato il carico di farmaco sottraendo i valori di perdita di peso di MCM-41 da IVM-MCM nell'intervallo 150 – 800°C . La perdita di massa è stata dell'11,5%, equivalente a un contenuto di farmaco di 0,116 mg/mg, convalidando la quantità teorica di IVM inizialmente aggiunta alla formulazione.

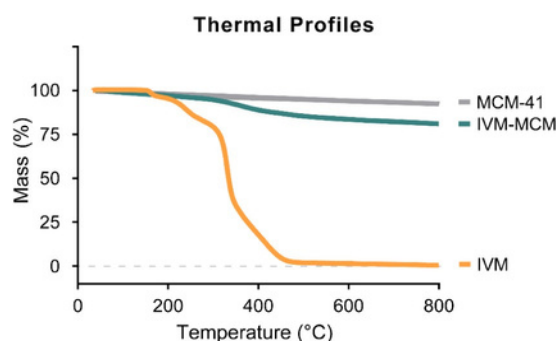


Figura 2. Analisi termogravimetrica di silice nanostrutturata (MCM-41), particelle di silice caricate con ivermectina (IVM-MCM) e ivermectina pura (IVM).

3.3. Effetto inibitorio sulla crescita delle cellule cancerose.

Abbiamo valutato la vitalità delle cellule di adenocarcinoma mammario (MCF-7), delle cellule di carcinoma cervicale (HeLa e SiHa) e delle cellule di glioma (C6) esposte a IVM-NC e IVM-MCM per 48 e 72 ore utilizzando il test MTT. Il trattamento con IVM-NC ha avuto un effetto meno pronunciato nell'inibire la vitalità cellulare a 48 ore (Figura 3). Alla dose più alta testata ($25\mu\text{M}$), ha dimostrato una citotossicità moderata (vitalità del 69%–80%) per tutte le linee cellulari tumorali testate. L'estensione del tempo di esposizione a 72 ore ha aumentato l'effetto inibitorio sulle cellule HeLa e SiHa rispettivamente del 58% e del 48%. Tuttavia, ciò ha rappresentato un grado moderato di citotossicità.³⁷ Al contrario, per le cellule MCF-7 e C6, il tempo di esposizione non sembra influenzare l'effetto citotossico. Tuttavia, la concentrazione inibitoria semi-massimale (IC_{50}) è diminuito all'aumentare del tempo di esposizione per le cellule HeLa ($\text{IC}_{50} = 25\mu\text{M}$) e cellule SiHa ($\text{IC}_{50} = 22\mu\text{M}$).

D'altro canto, l'esposizione a IVM e IVM-MCM non incapsulati per 48 e 72 ore ha portato a un declino simile della vitalità in tutte le linee cellulari tumorali testate (Figura 3). In particolare, si è osservata una citotossicità moderata (vitalità intorno all'80%) a una concentrazione di $5\mu\text{M}$, che mostra una risposta citotossica dipendente dalla concentrazione. Si è verificata un'inibizione completa alla dose più alta testata ($25\mu\text{M}$). Nelle cellule del glioma, IVM-MCM ($\text{IC}_{50} = 5\mu\text{M}$) ha avuto un effetto citotossico più pronunciato rispetto all'IVM non incapsulato ($\text{IC}_{50} = 9\mu\text{M}$).

Abbiamo anche studiato l'effetto delle nanoparticelle disperse sulla morte delle cellule cancerose. Abbiamo trattato le cellule con NC o MCM-41 in un volume di particelle equivalente al trattamento con le loro particelle omologhe caricate con IVM con $25\mu\text{M}$ del farmaco. La risposta è stata coerente in tutte le linee cellulari: NC ha leggermente ridotto la vitalità cellulare, mantenendo livelli di vitalità tra il 75% e il 100%. In particolare, nelle cellule MCF-7 e HeLa, NC ha mostrato un effetto simile a IVM-NC dopo 72 ore di trattamento. D'altra parte, MCM-41 ha mostrato un notevole effetto citotossico dopo 48 ore, riducendo la vitalità cellulare al 30–40%. Sorprendentemente, questo effetto è stato invertito dopo 72 ore di trattamento, con la vitalità cellulare recuperata a circa l'80%. Nella linea cellulare C6, MCM-41 ha ridotto la vitalità cellulare di circa il 20% dopo 72 ore (Figura 3).

3.4. Esperimento in vivo. 3.4.1. Effetti delle nanoparticelle caricate con ivermectina sulla soppressione della crescita del glioma.

Abbiamo rimosso i cervelli il 18° giorno dell'esperimento, 7 giorni dopo l'impianto delle cellule del glioma, seguito da 10 giorni di trattamento intranasale (dose IVM di $60\mu\text{g/giorno}$) – e analizzato le dimensioni e le caratteristiche istopatologiche dei tumori impiantati utilizzando la colorazione HandE di routine. IVM-NC ha ridotto il volume del tumore del 70% (volume del tumore residuo = 79 ± 23 millimetri³) rispetto ai gruppi di controllo (254 ± 55 e 277 ± 76).

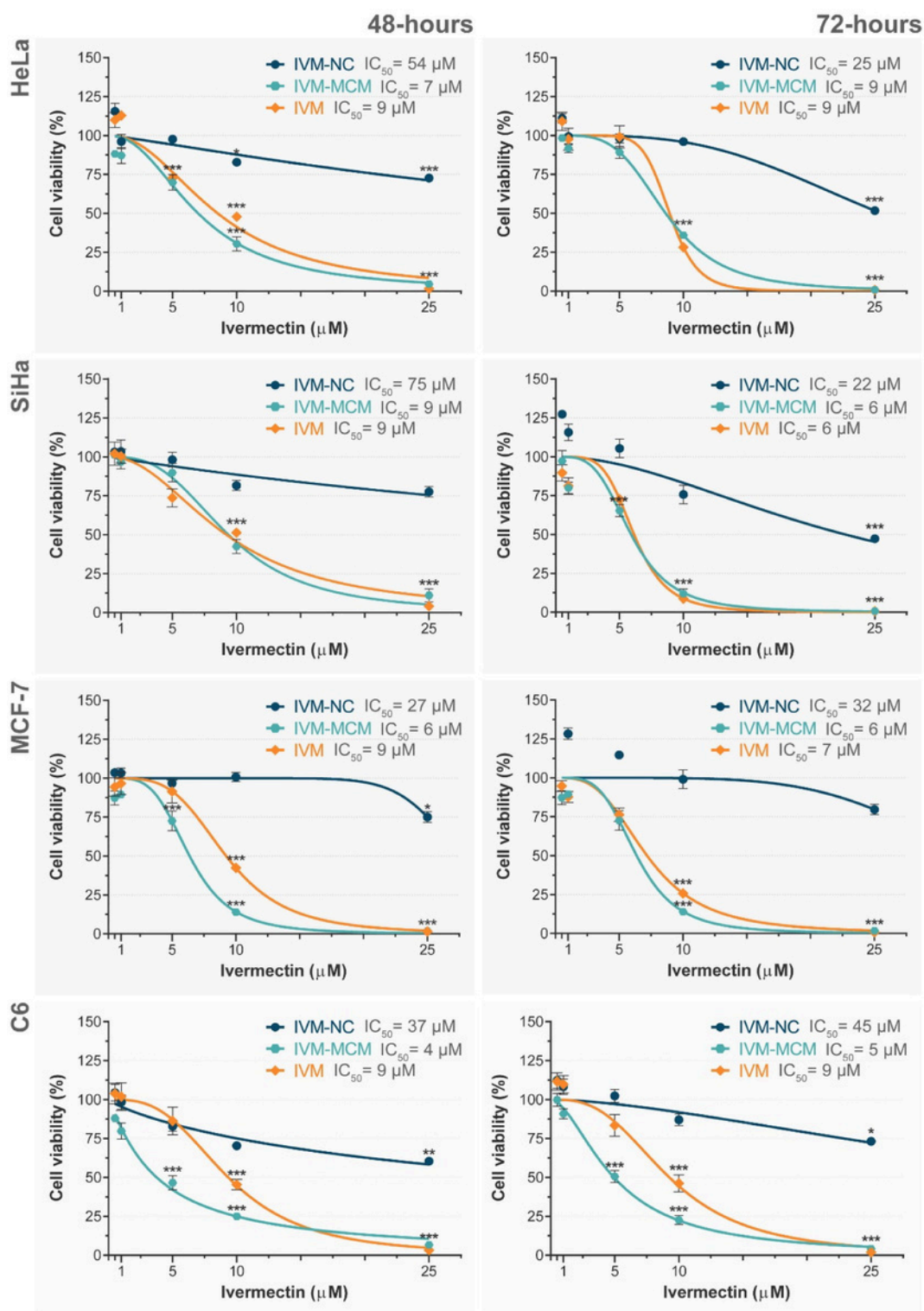


Figura 3. Vitalità delle cellule di adenocarcinoma mammario (MCF-7), cellule di carcinoma cervicale (HeLa e SiHa) e cellule di glioma (C6) dopo esposizione a ivermectina non incapsulata (IVM), nanocapsule caricate con ivermectina (IVM-NC) e particelle di silice caricate con ivermectina (IVM-MCM) per 48 e 72 ore. I punti dati rappresentano le concentrazioni di trattamento e il corrispondente IC_{50} e le curve sono mostrate come linee. I risultati sono espressi come media \pm deviazione standard ($N=4$), rispetto al controllo negativo (100%). Gli asterischi (***) indicano differenze statisticamente significative rispetto al controllo negativo, come determinato dall'ANOVA a una via seguita dal test post hoc di Dunnett ($P < 0.001$).

mm3 rispettivamente per non trattati e NC (Figura 4). Al contrario, l'IVM libero e l'IVM-MCM non hanno ridotto significativamente le dimensioni del tumore (311 ± 64 e 174 ± 34 millimetri³, rispettivamente) rispetto ai gruppi di controllo (254 ± 55 e 345 ± 36 millimetri³ rispettivamente per i non trattati e per MCM-41).

L'analisi istopatologica dei tumori impiantati ha mostrato che necrosi, infiltrazione linfocitaria, emorragia intratumorale, palizzata periferica e proliferazione vascolare erano presenti nel gruppo di controllo (Tabella 1). Mentre l'IVM non incapsulato non ha ridotto il volume del tumore, ha ridotto il

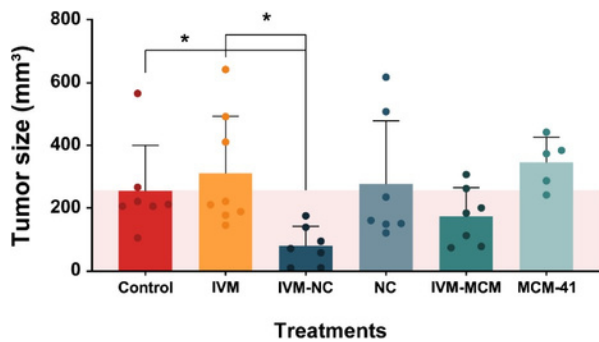


Figura 4. Quantificazione del volume del tumore gliale. Gruppi di trattamento: Controllo - soluzione salina; IVM - ivermectina non incapsulata; IVM-NC - nanocapsule caricate con ivermectina; NC - nanocapsule non caricate con farmaci; IVM-MCM - particelle di silice caricate con ivermectina; MCM-41 - particelle di silice non caricate con farmaci. Le variazioni nella dimensione del campione tra i gruppi sono attribuibili all'assenza di impianto tumorale nei ratti di alcuni gruppi. I dati sono stati presentati come media \pm deviazione standard e sono stati analizzati utilizzando l'analisi della varianza unidirezionale seguita dal test di Kruskal-Wallis. * indica una differenza significativa rispetto ai gruppi di controllo e IVM ($P < 0,05$).

incidenza di necrosi, edema peritumorale, palizzata periferica e proliferazione vascolare, che indicano una potenziale soppressione dell'invasione e dell'aggressività del tumore.³⁸ Oltre alla riduzione del volume tumorale, IVM-NC ha ridotto l'incidenza di edema peritumorale e proliferazione vascolare. Il trattamento con IVM-MCM non ha invertito i segni istopatologici.

3.5. Valutazione preliminare della tossicità. Abbiamo valutato la sicurezza dei trattamenti IVM *in vitro* e *in vivo*. Figura 5 mostra gli effetti citotossici (basati sul test MTT) sia dell'IVM non incapsulato che di quello nanoincapsulato nelle linee cellulari sane, vale a dire cellule renali simili ai fibroblasti (Vero) e cellule fibroblastiche polmonari fetali (MRC-5), trattate per 72 ore.

Le concentrazioni di IVM-NC testate non sono risultate citotossiche. D'altra parte, IVM non incapsulato e IVM-MCM hanno dimostrato una citotossicità significativa a concentrazioni più elevate in entrambe le linee cellulari. Al 10 μ M Concentrazione del farmaco M, IVM ha mostrato una citotossicità moderata (65% di vitalità cellulare) per le cellule Vero e un'elevata citotossicità (35% di vitalità cellulare) per le cellule MRC-5, mentre IVM-MCM ha mostrato un'elevata citotossicità in entrambe le linee cellulari (20% di vitalità cellulare).³⁷ Si è verificata una completa inibizione della proliferazione cellulare a 25 μ M per entrambi i trattamenti.

Durante il *in vivo* esperimento, abbiamo misurato periodicamente il peso corporeo di ogni ratto dal periodo pre-operatorio all'impianto del tumore

e post-trattamento. Al termine del protocollo di trattamento di 10 giorni, abbiamo rimosso i polmoni per la valutazione istologica e raccolto campioni di sangue per analisi biochimiche ed ematologiche. I ratti a cui è stato impiantato il glioma non hanno mostrato differenze significative nel peso corporeo tra i gruppi (Figura 6). L'analisi biochimica, come presentata in Tabella 2, non hanno evidenziato alterazioni nei marcatori metabolici (glucosio e colesterolo), nei marcatori epatici (ALT e AST) o nei marcatori della funzionalità renale (creatinina e urea) nel siero dopo 10 giorni di trattamento. Inoltre, il profilo ematologico è rimasto entro i valori normali osservati per il sangue di ratto (Tabella 3).

D'altro canto, l'esame istopatologico dei tessuti polmonari ha rivelato cambiamenti nei ratti trattati con IVM non incapsulato, con focolai di emorragia e infiammazione (Tabella 4). I ratti trattati con IVM-NC non hanno mostrato alterazioni istologiche, ma i ratti trattati con IVM-MCM presentavano aree di emorragia ed edema polmonare. Sebbene l'infiammazione non fosse evidente in questo gruppo, la neutrofilia rilevata dall'analisi ematologica, rispetto ai ratti di controllo, poteva essere attribuita alla presenza di edema.

4. DISCUSSIONE

Studi precedenti hanno evidenziato il potenziale clinico dell'IVM per il trattamento del glioma, una malattia neuro-oncologica complessa a causa della sua natura aggressiva e della resistenza al trattamento.³⁹ Tuttavia, l'efficacia dell'IVM è limitata dalla sua scarsa solubilità e dalla bassa biodisponibilità orale. Per risolvere questo problema, abbiamo sviluppato due diverse proposte per superare questi inconvenienti e migliorare l'efficacia antitumorale dell'IVM a concentrazioni clinicamente praticabili.

Di recente, in un'ampia revisione della letteratura, abbiamo discusso di come i sistemi di micro/nano-somministrazione di farmaci possano manipolare le proprietà fisico-chimiche dell'IVM, fornendo prove inequivocabili che la nanotecnologia è uno strumento efficace per migliorare la solubilità e la biodisponibilità dell'IVM, coprendo anche le proprietà di targeting di organi o tessuti specifici e facilitando concentrazioni sostenute del farmaco nel sito d'azione.⁹ Sperimentalmente, in uno studio precedente, abbiamo studiato i vantaggi dell'incapsulamento e il comportamento dell'IVM in distinti sistemi nanostrutturati: organici (poli(ϵ -caprolattone) nanocapsule) e inorganiche (particelle di silice nanostrutturate)

per valutare la loro influenza sulla solubilità intrinseca e sulla modulazione del profilo di rilascio *in vitro*. I nostri dati hanno indicato che la nanoincapsulazione dell'IVM in particelle organiche o inorganiche consente un netto miglioramento nell'*in vitro* prestazioni della solubilità in acqua dell'IVM. Inoltre,

Tabella 1. Caratteristiche istologiche dei gliomi impiantati^{UN}

	Controllare	IVM	IVM-NC	NC	IVM-MCM	MCM-41
Emorragia intratumorale	6/8 (75%)	7/9 (78%)	6/8 (75%)	9/9 (100%)	7/9 (78%)	5/8 (62%)
Necrosi	6/8 (75%)	6/9 (67%) [↓]	6/8 (75%)	7/9 (78%)	7/9 (78%)	5/8 (62%)
Edema peritumorale	4/8 (50%)	4/9 (44%) [↓]	3/8 (37%) [↓]	5/9 (55%)	6/9 (67%)	4/8 (50%)
Palizzata periferica	4/8 (50%)	3/9 (33%) [↓]	5/8 (62%)	6/9 (67%)	6/9 (67%)	3/8 (37%)
Proliferazione vascolare	8/8 (100%)	8/9 (89%) [↓]	7/8 (87%) [↓]	8/9 (89%)	9/9 (100%)	8/8 (100%)
infiltrazione linfocitaria	7/8 (87%)	9/9 (100%)	7/8 (87%)	9/9 (100%)	9/9 (100%)	8/8 (100%)

^{UN}Note: Le variabili istologiche sono state espresse come percentuali, considerando vetrini colorati con ematossilina ed eosina che presentano le variazioni istologiche relative al numero di campioni nel gruppo valutato. Gruppi di trattamento ($N=8-9$): Controllo - soluzione salina; IVM - ivermectina non incapsulata; IVM-NC - nanocapsule caricate con ivermectina; NC - nanocapsule non caricate con farmaci; IVM-MCM - particelle di silice caricate con ivermectina; MCM-41 - particelle di silice non caricate con farmaci. La freccia in basso ([↓]) indica una diminuzione dell'incidenza del parametro istopatologico rispetto al gruppo di controllo.

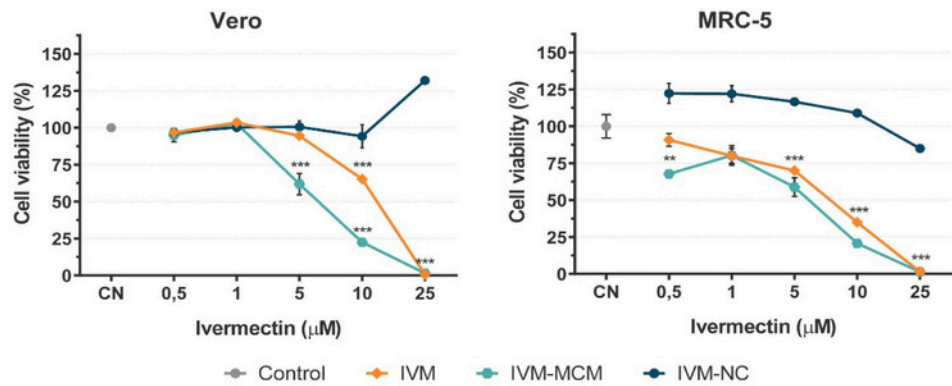


Figura 5. Valutazione della vitalità cellulare di linee di fibroblasti normali (Vero e MRC-5) dopo incubazione con ivermectina non incapsulata (IVM), nanocapsule caricate con ivermectina (IVM-NC) e particelle di silice caricate con ivermectina (IVM-MCM) per 72 ore. I risultati sono stati espressi come media \pm deviazione standard ($N=4$), percentuale relativa al controllo negativo (CN, 100%). I punti dati contrassegnati con *** indicano una differenza significativa basata sull'analisi della varianza seguita dal test post hoc di Dunnett ($P<0,001$).

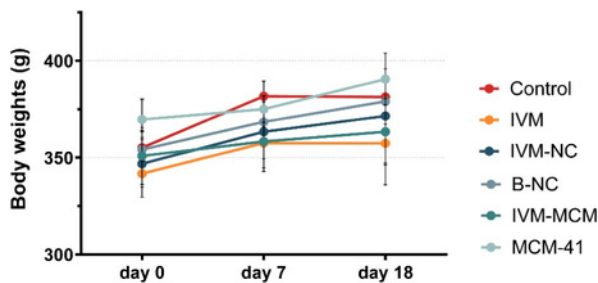


Figura 6. Peso corporeo dei ratti Wistar durante l'esperimento di 18 giorni (prima dell'intervento chirurgico, prima del trattamento e dopo il trattamento): soluzione salina (controllo), ivermectina non incapsulata (IVM), nanocapsule caricate con ivermectina (IVM-NC), nanocapsule non caricate con farmaci (NC), particelle di silice caricate con ivermectina (IVM-MCM) e particelle di silice non caricate con farmaci (MCM-41). I dati sono presentati come media \pm deviazione standard.

Risultati precedenti suggeriscono che i nanocarrier inorganici (IVM-MCM) offrono un tasso di dissoluzione più efficiente rispetto ai carrier organici (IVM-NC).²⁸

Nel presente studio, ci siamo concentrati sulla comprensione di come il tipo di nanocarrier per IVM e la cinetica di rilascio del farmaco possano influenzare l'efficacia terapeutica antitumorale dell'IVM. I carrier nanostrutturati offrono vantaggi convincenti per il trattamento dei tumori solidi maligni, tra cui un controllo preciso del dosaggio e una maggiore efficacia terapeutica, ottenuta attraverso la modulazione farmacocinetica.⁴⁰ Tra i nanomateriali organici, le nanocapsule polimeriche si distinguono per la loro biocompatibilità, la capacità di rilascio prolungato del farmaco e la migliore permeabilità e ritenzione nel sito del tumore.⁴¹ Al contrario, i nanocarrier inorganici, esemplificati dai MSN, mostrano notevoli

stabilità, elevata capacità di carico del farmaco e facile funzionalizzazione.²⁵ Gli MSN hanno acquisito importanza nella scienza farmaceutica, in particolare come vettori per farmaci scarsamente solubili in acqua, utilizzati per la terapia del cancro.⁴²

Qui abbiamo prodotto IVM-NC, che presentava un sistema omogeneo senza formazione di precipitati e mostrava una distribuzione dimensionale nanometrica uniforme nell'intervallo tipico per questo tipo di nanoparticelle (150-250 nm).^{29,43} Inoltre, IVM-NC ha mostrato una ZP negativa, attribuibile alla natura elettronegativa dei composti superficiali, alla presenza del guscio in PCL e alla stabilizzazione sterica fornita dal polisorbato 80. La formulazione ha inoltre mostrato un pH leggermente acido, coerente con le proprietà del polimero; le cariche anioniche tendono ad acidificare la formulazione. Tali caratteristiche sono comunemente osservate nelle nanocapsule a base di PCL, il cui pH varia tipicamente da 5 a 6.^{44,45} Questo intervallo di pH è ben tollerato biologicamente, supportando *in vivo* l'elevata efficienza di incapsulamento può essere attribuita all'elevato log P dell'IVM, che gli consente di disperdersi bene nel nucleo oleoso delle nanocapsule, mantenendo al contempo una concentrazione del farmaco al di sotto del punto di saturazione nell'olio. La produzione di IVM-NC è risultata costante e riproducibile, in linea con i parametri precedentemente stabiliti per questa nanoformulazione.²⁸ Gli sforzi per sviluppare nuove formulazioni IVM utilizzando nanovettori sono stati ampiamente documentati, concentrandosi principalmente sul trattamento delle malattie parassitarie.⁹ Studi hanno dimostrato che le nanoparticelle polimeriche caricate con IVM presentano proprietà promettenti, come una dimensione delle particelle di 96-400 nm, un'elevata efficienza di incapsulamento e caratteristiche fisico-chimiche stabili.⁴⁶⁻⁴⁸

Tabella 2. Parametri biochimici nei ratti con glioma impiantato trattati con ivermectina non incapsulata e nano-incapsulata^{UN}

	Controllare	IVM	IVM-NC	IVM-MCM
Glucosio (mg/dL)	165 \pm 17	183 \pm 22	210 \pm 33	246 \pm 45
Colesterolo (mg/dL)	42 \pm 5	46 \pm 3	45 \pm 7	46 \pm 7
Alanina aminotransferasi (U/L)	66 \pm 7	56 \pm 9	61 \pm 9	62 \pm 4
Aspartato aminotransferasi (U/L)	127 \pm 8	141 \pm 24	133 \pm 31	126 \pm 35
Creatinina (mg/dL)	0,56 \pm 0,06	0,54 \pm 0,05	0,56 \pm 0,05	0,52 \pm 0,06
Urea (mg/dL)	48 \pm 4	48 \pm 3	48 \pm 3	49 \pm 1

^{UN}Nota: i dati sono presentati come media \pm deviazione standard ($N=6$). Gruppi di trattamento: Controllo - soluzione salina; IVM - ivermectina non incapsulata; IVM-NC - nanocapsule caricate con ivermectina; IVM-MCM - particelle di silice caricate con ivermectina.

Tabella 3. Parametri ematologici nei ratti con glioma impiantato trattati con ivermectina non incapsulata e nanoincapsulata^{UN}

	Controllare	IVM	IVM-NC	IVM-MCM
Globuli bianchi ($\times 10^3/\mu\text{L}$)	2.7 \pm 1.5	4.9 \pm 0.7	4.4 \pm 2.4	4.8 \pm 1.8
Neutrofili (%)	10.4 \pm 1.4	16.3 \pm 1.7	14.9 \pm 2.5	20.2 \pm 2.7**
Linfociti (%)	88.2 \pm 2.1	81.7 \pm 7.6	81.8 \pm 2.6	76.6 \pm 3*
Eosinofili (%)	0.1 \pm 0.05	0.5 \pm 0.06	0.5 \pm 0.01	0.5 \pm 0.01
Monociti (%)	2.2 \pm 1	1 \pm 0.2	1.2 \pm 0.4	2.8 \pm 0.6
Globuli rossi ($\times 10^6/\mu\text{L}$)	10.1 \pm 1.1	8.2 \pm 0.7	8.6 \pm 0.8	8.5 \pm 0.3
Ematocrito (%)	61.1 \pm 6.9	50.1 \pm 3.2	51 \pm 5.2	50.8 \pm 2.2
RDW (%)	14 \pm 0.6	13.7 \pm 0.1	13.4 \pm 0.5	13.8 \pm 0.3
Piastrine ($\times 10^3 \mu$)	657 \pm 12	730 \pm 70	657 \pm 96	727 \pm 28

^{UN}Nota: i dati sono presentati come media \pm deviazione standard (N=3). Gruppi di trattamento: Controllare – soluzione salina; IVM – ivermectina non incapsulata; IVM-NC – nanocapsule caricate con ivermectina; IVM-MCM – particelle di silice caricate con ivermectina. I punti dati contrassegnati con * o ** indicano una differenza significativa basata sull'analisi della varianza seguita dal test post hoc di Dunnett ($P < 0.05$ e $P < 0.01$, rispettivamente).

Tabella 4. Caratteristiche istologiche del polmone nei ratti con glioma impiantato trattati con ivermectina non incapsulata e nanoincapsulata^{UN}

	Controllare	IVM	IVM-NC	NC	IVM-MCM	MCM-41
Emorragia	Assente	Assente	Assente	Assente	3/3 (100%)	Assente
Edema	Assente	2/3 (67%)	Assente	Assente	2/3 (67%)	3/3 (100%)
Infiammazione	Assente	2/3 (67%)	Assente	Assente	Assente	Assente
Necrosi	Assente	Assente	Assente	Assente	Assente	Assente

^{UN}Note: Le variabili istologiche sono state considerate presenti o assenti. Gruppi di trattamento: Controllare – soluzione salina; IVM – ivermectina non incapsulata; IVM-NC – nanocapsule caricate con ivermectina; IVM-MCM – particelle di silice caricate con ivermectina.

Parallelamente, abbiamo incorporato in modo efficiente l'IVM in particelle di silice nanostrutturate, ottenendo un carico di farmaco del 12% (p/p), come riportato in precedenza.²⁸ MCM-41, con la sua disposizione esagonale dei pori e l'elevata area superficiale, ha facilitato un migliore caricamento del farmaco. Il nostro studio precedente ha indicato che IVM-MCM presentava un'area superficiale e un volume ridotti, in linea con gli effetti di caricamento dei pori, con IVM stabilizzato nella sua forma amorfa all'interno dei pori di dimensioni nanometriche.²⁸ Il recupero incompleto del farmaco (70%, p/p) tramite HPLC era probabilmente dovuto al forte adsorbimento tra IVM e i pori di silice.⁴⁹ La TGA ha confermato che non si è verificata alcuna perdita sostanziale di farmaco durante il processo di caricamento (recupero del farmaco >96%). IVM-MCM ha mostrato un'eccellente stabilità fisico-chimica, mantenendo il suo carico di farmaco per oltre 12 mesi, come confermato dalla TGA. In particolare, il nostro gruppo di ricerca è pioniere nell'uso di particelle di silice nanostrutturate per il rilascio di IVM.

Sebbene vi sia un crescente interesse nel riutilizzo dell'IVM per il trattamento del cancro e un chiaro potenziale per i nanocarrier di migliorarne le proprietà biofarmaceutiche, la combinazione di questi due approcci rimane inesplorata. I nostri risultati contribuiscono a colmare questa lacuna dimostrando che l'ottimizzazione della somministrazione di IVM tramite nanoincapsulamento può migliorarne l'efficacia terapeutica, come supportato dal nostro screening di citotossicità con diverse linee cellulari tumorali e dalla successiva validazione in *unin vivo* modello tumorale.

Il trattamento con il nanocarrier inorganico (IVM-MCM) ha ridotto la vitalità delle linee cellulari di adenocarcinoma mammario (MCF-7), carcinoma cervicale (HeLa e SiHa) e glioma (C6) in modo dipendente dalla concentrazione. A 25 μM , si è osservata una soppressione della crescita. Questi risultati sono paragonabili all'effetto citotossico dell'IVM non incapsulato. Tuttavia, l'IC50 ha indicato che metà della concentrazione di IVM incapsulata in MCM (4–5 μM) è necessario per ottenere la stessa efficacia antitumorale dell'IVM non incapsulato (8–9 μM). Al contrario, il trattamento con il nanocarrier organico (IVM-NC) ha dimostrato una citotossicità moderata per tutte le linee cellulari tumorali allo

dose più alta testata (25 μM). Gli effetti citotossici divergenti dei sistemi nanostrutturati contenenti IVM possono essere attribuiti alle variazioni nei tassi di rilascio e diffusione del farmaco, come recentemente riportato dal nostro gruppo.²⁸ IVM-MCM ha mostrato una maggiore velocità di dissoluzione del farmaco (78% entro 24 ore) grazie al rilascio per diffusione attraverso i suoi pori. Al contrario, IVM-NC ha dimostrato un rilascio più controllato (30% entro 24 ore), richiedendo circa 72 ore per il rilascio totale del farmaco a causa della permeabilità dello strato polimerico.²⁸ Di conseguenza, le concentrazioni inibitorie efficaci potrebbero non essere raggiunte entro le prime 48-72 ore a causa delle basse concentrazioni di farmaco libero nel mezzo cellulare.

Nostri *in vitro* risultati sono in linea con i precedenti rapporti che indicano che l'IVM induce la morte cellulare in diverse linee cellulari tumorali con un IC comparabile a valori: 6–8 μM per cellule HeLa,⁵⁰ 1–5 μM per le linee cellulari del glioma U87 e T98G,⁵¹ e 9–16 μM per

cellule C6.¹⁸ Inoltre, l'IVM mostra citotossicità nelle cellule MCF-7.¹¹ In particolare nelle linee cellulari del glioma (U87, T98G e C6), l'IVM mostra un significativo effetto antiproliferativo, inducendo l'apoptosi tramite un percorso dipendente dalla caspasi, indicato dall'aumento dell'attività della caspasi-3 e della caspasi-9.^{18,51} e arrestando il ciclo cellulare nel G0/G1 fase.¹⁸ Inoltre, l'IVM induce disfunzione mitocondriale e stress ossidativo, come riflesso dalla riduzione della respirazione mitocondriale, del potenziale di membrana e dei livelli di adenosina trifosfato (ATP), insieme all'elevata produzione di superossido mitocondriale.^{51,52}

Si raccomanda di valutare gli effetti dei nanomateriali senza farmaci per chiarire l'attività intrinseca associata alla nanostruttura.⁴³ Abbiamo quindi valutato la citotossicità delle nanoparticelle non caricate – particelle di silice pura (MCM-41) e nanocapsule di PCL non caricate (NC) – per distinguere i benefici della nanoincapsulazione IVM. Le NC hanno ridotto la vitalità cellulare, sebbene in misura minore rispetto a IVM-NC. Nello specifico, nelle cellule MCF-7 e HeLa, le NC hanno mostrato un effetto simile a IVM-NC dopo 72 ore. Gli effetti intrinseci delle nanoparticelle sono allineati.

partendo dal presupposto che il rilascio del farmaco da IVM-NC non sia riuscito a inibire adeguatamente queste cellule specifiche, indicando che l'impatto di IVM è meno pronunciato di quello delle nanoparticelle. MCM-41 ha mostrato una marcata citotossicità a 48 ore, parzialmente invertita a 72 ore, con un passaggio a livelli di tossicità moderati. In particolare, nella linea cellulare C6, gli effetti citotossici sono rimasti gravi anche dopo 72 ore. Sebbene MCM-41 da solo abbia mostrato attività citotossica, il suo effetto è stato meno pronunciato rispetto a IVM-MCM, evidenziando l'attività farmacologica dell'ivermectina. È stato ipotizzato che un'elevata concentrazione di nanoparticelle possa creare una barriera fisica sulle cellule,⁴⁵ ostacolando gli scambi ambientali e causando la morte cellulare accidentale, che è il risultato di un effetto fisico piuttosto che biologico.

Ricerche precedenti supportano i nostri risultati, dimostrando che i NC caricati con doxazosina mostrano effetti antiproliferativi migliorati contro le cellule MCF-7 rispetto ai farmaci liberi.⁵³ Allo stesso modo, le nanocapsule con nucleo lipidico caricate con tretinoina hanno dimostrato un'efficacia prolungata nelle cellule HL60,⁵⁴ e l'incapsulamento dell'orlistat in nanocapsule ha amplificato il suo effetto citotossico contro le cellule HeLa.⁴⁵ Inoltre, il potenziale degli MSN per farmaci scarsamente idrosolubili nella terapia del cancro è evidente. Ad esempio, gli MSN caricati con paclitaxel hanno mostrato una maggiore citotossicità contro le cellule di carcinoma epatico HepG2, ottenendo una IC significativamente inferiore.⁵⁰ rispetto alla soluzione di paclitaxel.⁵⁵ Inoltre, la somministrazione concomitante di camptotecina e survivina mediante MSN peghilati ha aumentato la citotossicità e indotto l'apoptosi nelle cellule del cancro del colon-retto C26.⁵⁶ Tuttavia, *in vitro* i test presentano limitazioni riguardanti i tempi di trattamento e le concentrazioni del farmaco; pertanto, l'efficacia antitumorale di IVM-NC non può essere ignorata rispetto ai trattamenti IVM-MCM e IVM. Ciò sottolinea la necessità di una valutazione in modelli più complessi. È inoltre essenziale riconoscere che *in vitro* le valutazioni di efficacia nelle cellule tumorali si concentrano principalmente sulle interazioni cellula-particella, spesso trascurando i cambiamenti nella biodistribuzione, nella mucoadesione e nella permeazione attraverso le barriere biologiche. Pertanto, sulla base dei dati favorevoli *in vitro* risultati osservati nella linea cellulare C6, tra cui un IC inferiore⁵⁰ e prove convincenti a sostegno del potenziale dell'IVM contro il glioma,^{17-19,52} abbiamo utilizzato un modello preclinico di glioma utilizzando ratti Wistar. Sebbene in precedenza *in vitro* e *in vivo* studi hanno indagato l'applicazione dell'IVM nel trattamento del glioma, per quanto ne sappiamo, nessuno studio ha affrontato specificamente l'*in vivo* utilizzo di nanosistemi caricati con IVM per la somministrazione mirata dal naso al cervello.

Una sfida significativa nel trattamento del glioblastoma è raggiungere la biodisponibilità cerebrale di un farmaco chemioterapico efficace. Superare la barriera ematoencefalica è fondamentale; tuttavia, le concentrazioni del farmaco devono essere sostenute e tollerabili per inibire la crescita tumorale senza causare danni al tessuto cerebrale. La somministrazione intranasale sfrutta l'innervazione olfattiva e trigeminale e fornisce una potenziale via per il trasporto diretto e rapido dei farmaci dalla cavità nasale al cervello, bypassando la barriera ematoencefalica.⁵⁷ Di conseguenza, la somministrazione intranasale si sta affermando come un promettente metodo non invasivo per la somministrazione di farmaci al cervello. I nanosistemi per la somministrazione di farmaci possono aumentare il tempo di ritenzione nella mucosa nasale, facilitandone l'assorbimento.⁵⁸ e aumentando la biodisponibilità, in particolare per quelli scarsamente solubili in acqua,²⁴ superando così specifiche limitazioni inerenti a questo percorso.

Il nostro protocollo di trattamento prevedeva la somministrazione di basse dosi di IVM (164 µg/giorno) consecutivamente per 10 giorni a ratti portatori di glioma. I ratti trattati con IVM-NC hanno mostrato un significativo

Riduzione di 3 volte delle dimensioni del tumore rispetto al gruppo di controllo (trattato con DMSO al 5% in soluzione salina). Inoltre, si è osservata una riduzione dell'incidenza delle principali caratteristiche istopatologiche del glioblastoma, tra cui edema peritumorale e proliferazione vascolare. In particolare, né l'IVM non incapsulato né l'IVM-MCM hanno influenzato significativamente le dimensioni del tumore. Pertanto, la soppressione della crescita tumorale osservata può essere attribuita all'uso del nanocarrier organico come sistema di rilascio.

La risposta farmacologica è direttamente influenzata dalla concentrazione del farmaco nel sito bersaglio. I nostri risultati dimostrano un approccio promettente per il trasporto dell'IVM dal naso al cervello utilizzando nanocapsule contenenti PCL. Questo metodo bypassa efficacemente la barriera cerebrale selettiva, facilitando il rilascio efficace del farmaco al sito tumorale. Abbiamo dimostrato come la nanotecnologia offra una strategia promettente per migliorare il rilascio dell'IVM al cervello, garantendo al contempo sicurezza ed efficacia in un *in vivo* modello di glioma.

I meccanismi precisi alla base della traslocazione delle nanoparticelle attraverso la BBB non sono ancora completamente chiariti. Processi mediati dalle cellule endoteliali come il riconoscimento delle proteine di superficie, l'endocitosi, la modulazione delle giunzioni strette e l'inibizione della Pgp sono state fortemente proposte.^{59,60} Inoltre, attributi chiave delle nanoparticelle come le dimensioni, la composizione del polimero e le caratteristiche della superficie svolgono un ruolo fondamentale nella stabilizzazione sterica, nella circolazione sistemica prolungata e nell'accumulo aumentato nei tumori cerebrali.^{60,61} Alcune nanoparticelle polimeriche possiedono la capacità di eludere i meccanismi MDR e di migliorare la ritenzione delle particelle colloidali nell'interstizio tumorale.³⁸ Tuttavia, è essenziale riconoscere che, per molti farmaci, l'assorbimento sostanziale avviene ancora attraverso le pareti dei microvasi nasali, oltre alle consolidate vie di assorbimento olfattive e trigeminali.⁶² Inoltre, la BBB è costituita da un monostrato di cellule capillari endoteliali con abbondante glicoproteina P (P-gp), un trasportatore di efflusso che contribuisce alla barriera espellendo attivamente farmaci, come l'IVM, dalle cellule endoteliali cerebrali nel flusso sanguigno.^{26,63}

In linea con i nostri risultati, studi precedenti hanno indicato che la somministrazione nasale di simvastatina in nanocapsule di PCL stabilizzate da polisorbato 80 ha migliorato la permeabilità del farmaco e il suo trasporto al cervello rispetto alla soluzione del farmaco.²³ Allo stesso modo, i vettori lipidici a base di olio di sesamo che utilizzano polisorbato 80 hanno migliorato l'accesso al sistema nervoso centrale, probabilmente grazie all'inibizione della P-gp.²² Ulteriori prove supportano queste osservazioni, poiché l'indometacina incapsulata in nanocapsule di PCL rivestite con polisorbato 80 ha raggiunto concentrazioni intracerebrali più elevate rispetto alla soluzione del farmaco.⁶⁴ In particolare, nei ratti a cui è stato impiantato un glioma, l'accumulo di indometacina era più pronunciato nell'emisfero interessato dal tumore rispetto al lato sano controlaterale, il che suggerisce che la rottura della BBB indotta dal glioma può facilitare la penetrazione del farmaco.⁶⁴ La rottura locale della BBB, caratterizzata dalla presenza di capillari e fenestrature, consente l'effetto di permeabilità e ritenzione migliorata (EPR), facilitando l'accumulo passivo di farmaci nanostrutturati nel sito del tumore.^{64,65}

Uno degli aspetti più importanti dei nostri risultati è il ruolo della dimensione delle particelle nel determinare l'efficienza di somministrazione del farmaco al cervello attraverso la via nasale. Studi precedenti hanno dimostrato che nanoparticelle di piccole dimensioni, caricate con il farmaco, tipicamente comprese tra 100 e 400 nm, mostrano un trasporto naso-cervello migliorato.^{21,60} Nel nostro studio, le differenze nel *in vivo* l'efficacia osservata tra i sistemi nanostrutturati caricati con IVM può essere attribuita ai loro distinti profili dimensionali: IVM-NC ha mostrato una distribuzione dimensionale ristretta intorno

200 nm, mentre IVM-MCM ha mostrato una distribuzione più ampia, che va dai nanometri ai micrometri. A supporto di ciò, i MSN caricati con ponatinib con un intervallo dimensionale ristretto di circa 100 nm hanno mostrato un aumento della quantità di farmaco trasportato al cervello quando somministrati per via intranasale rispetto al farmaco libero.²⁵ I MSN caricati con curcumina, sviluppati per la somministrazione dal naso al cervello, hanno mostrato un assorbimento da parte delle cellule olfattive a una dimensione delle nanoparticelle <500 nm.⁶⁶ Pertanto, particelle di dimensioni inferiori e superfici più ampie migliorano la solubilità del farmaco, l'interazione con la mucosa e la permeazione del farmaco rispetto alle soluzioni farmacologiche.²⁶ Questo aspetto dovrebbe essere preso in considerazione in studi futuri per ottimizzare le particelle IVM-MCM qui valutate, controllandone le dimensioni su scala nanometrica o tramite funzionalizzazione.

Pochissimi rapporti hanno affrontato il problema *in vivo*. Efficacia antitumorale di IVM nei modelli di glioma. Gli studi disponibili hanno utilizzato principalmente modelli di xenotrapianto con impianto di cellule U251 in topi nudi BALB/c, al di fuori del SNC. I topi trattati con IVM (20 mg/kg, ip) hanno mostrato una crescita tumorale più lenta rispetto a quelli trattati con soluzione salina e marcatori di apoptosi elevati, indicando il potenziale di IVM di sopprimere la crescita delle cellule U251 e di indurre l'autofagia ad alte dosi.^{17,18} Nel nostro studio, abbiamo valutato una dose di IVM clinicamente rilevante che è inferiore alla dose tipica approvata di circa 200 µg/kg per uso umano. Ogni ratto ha ricevuto una dose giornaliera di IVM di 164 µg/kg per 10 giorni, pari a 26 µg/kg negli esseri umani in base alla formula di Reagan-Shaw:⁶⁷ Dose equivalente umana = dose animale (mg/kg) × Km ratto / Km umano, dove i Km umano e ratto sono rispettivamente 37 e 6.

I nostri risultati confermano inoltre che la somministrazione intranasale di IVM è stata sicura e ben tollerata dai ratti, in quanto non abbiamo osservato variazioni significative del peso tra i gruppi e i parametri biochimici e i profili ematologici sono rimasti entro i valori normali per il sangue periferico del ratto. I nostri risultati concordano con uno studio precedente.⁶⁸ e suggeriscono che il trattamento con IVM alla dose di 60 µg/giorno si è rivelato sicuro e ben tollerato dai ratti, indipendentemente dal fatto che fosse incapsulato o meno e dal sistema di somministrazione del farmaco. Inoltre, la preservazione dell'istologia polmonare normale implica il mantenimento della normale funzionalità dell'organo dopo il trattamento con IVM-NC. Ciò è coerente con i dati di citotossicità ottenuti per le linee cellulari sane, inclusa MRC-5: IVM-NC non è risultato citotossico a una concentrazione di IVM di 25 µM.

È importante notare che i risultati ottenuti *in vitro* lo screening delle cellule tumorali non rifletteva precisamente l'effetto antitumorale. Questa discrepanza sottolinea l'importanza di un robusto disegno sperimentale che includa test complementari a diversi livelli di complessità. Il potenziale antitumorale inizialmente suggerito per le particelle nanostrutturate inorganiche (IVM-MCM) è stato superato dalle nanoparticelle organiche (IVM-NC) quando valutato in un modello che incorpora molteplici fattori intrinseci ed estrapola oltre un microambiente controllato. La nostra ricerca preclinica sottolinea la capacità dei nanosistemi IVM intranasali, in particolare delle nanocapsule polimeriche, di facilitare la somministrazione naso-cervello minimamente invasiva con un rilascio efficace del farmaco. Una strategia così promettente si allinea non solo alle specifiche esigenze biofarmaceutiche dell'IVM, ma soddisfa anche i requisiti clinici di sicurezza ed efficacia nel trattamento del glioma.

5. CONCLUSIONE

Abbiamo progettato formulazioni IVM innovative basate su sistemi di somministrazione nanotecnologici per applicazioni in oncoterapia,

in particolare per il trattamento del glioblastoma. Nello specifico, le nanocapsule polimeriche hanno consentito l'efficiente somministrazione di IVM al cervello, affrontando le sfide biofarmaceutiche dell'IVM, convalidando la via intranasale come strategia minimamente invasiva e dimostrando un significativo *in vivo* effetto antitumorale. Abbiamo dimostrato l'efficacia antitumorale a dosi inferiori a quelle utilizzate clinicamente nell'uomo. Inoltre, i trattamenti hanno dimostrato buona sicurezza e tollerabilità. Il potenziale delle nanoparticelle inorganiche non può essere ignorato, ma sono necessari ulteriori studi per ottimizzare il loro intervallo di dimensioni nanometriche, promuovere un'efficiente permeazione attraverso la barriera ematoencefalica e ottenere una migliore biodisponibilità del farmaco nel cervello. In conclusione, la terapia naso-cervello mirata mediante nanoincapsulamento IVM ha mostrato risultati promettenti contro il glioblastoma e un potenziale di

traslazione clinica.



INFORMAZIONI SULL'AUTORE

Autore corrispondente

Ruy Carlos Ruver Beck –Programa de Pos-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, Rio Grande do Sul (RS) 90620-170, Brasile; Laboratório de Nanocarreadores e Impressão 3D in Tecnologia Farmacêutica (Nano3D), Faculdade de Farmácia UFRGS, Porto Alegre, RS 90620-170, Brasile; Departamento de Patologia Bucal, Faculdade de Odontologia–UFRGS, Porto Alegre, RS 90620-170, Brasile;

orcid.org/0000-0001-6262-1097; Telefono: + 55

51 3308-5951; E-mail: ruy.beck@ufrgs.br

Autori

Maiara Callegaro Velho –Programa de Pos-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, Rio Grande do Sul (RS) 90620-170, Brasile; Laboratório de Nanocarreadores e Impressão 3D in Tecnologia Farmacêutica (Nano3D), Faculdade de Farmácia UFRGS, Porto Alegre, RS 90620-170, Brasile

Valeria Luiza Winck –Laboratório de Nanocarreadores e Stampa 3D com la Tecnologia Farmacêutica (Nano3D), Faculdade de Farmácia UFRGS, Porto Alegre, RS 90620-170, Brasile

Camila da Silveira Mariot –Laboratório de Análise Bioquímica e Citológicas (LABC), Faculdade de Farmácia UFRGS, Porto Alegre, RS 90620-170, Brasile; Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, Rio Grande do Sul (RS) 90620-170, Brasile

Juliete Nathali Scholl –Laboratório de Imunobioquímica e Câncer (LIBC), Departamento de Bioquímica UFRGS, Porto Alegre, RS 90620-170, Brasile

Augusto Ferreira Weber –Laboratório de Imunobioquímica e Câncer (LIBC), Departamento de Bioquímica–UFRGS, Porto Alegre, RS 90620-170, Brasile; Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica, Instituto de Ciências Biológicas da Saúde–UFRGS, Porto Alegre, RS 90620-170, Brasile

Rita de Kássia Souza –Programa de Pos-Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica, Instituto de Ciências Biológicas da Saúde–UFRGS, Porto Alegre, RS 90620-170, Brasile; Departamento de Patologia Bucal, Faculdade de Odontologia – UFRGS, Porto Alegre, RS 90620-170, Brasile

Visioli –Programa de Pos-Graduação em Ciências


Biológicas: Bioquímica, Instituto de Ciências Biológicas da

Sauáde–UFRGS, Porto Alegre, RS 90620-170, Brasile;
 Dipartimento di Patologia Bucale, Faculdade de Odontologia
 –UFRGS, Porto Alegre, RS 90620-170, Brasile Fabrício

Figueiró –Laboratório de Imunobiologia fare
 Câncer (LIBC), Departamento de Bioquímica UFRGS, Porto
 Alegre, RS 90620-170, Brasile; Programa de Pós-
 Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica, Instituto de
 Ciências BUNsicas da Saúde–UFRGS, Porto Alegre, RS
 90620-170, Brasile

Monique Deon –Laboratório de Nanocarreadores e
 Stampa 3D com la Tecnologia Farmaceutica (Nano3D), Faculdade de
 Fattoria UNcia–UFRGS, Porto Alegre, RS 90620-170, Brasile;
 Programa de Pós-Graduação em Biociências, Universidade
 Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre (UFCSPA), Porto
 Alegre, RS 90620-170, Brasile;

 orcid.org/0000-0002-9889-7420

Diogo André Pilger –Programa de Pós-Graduação em
 Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Rio Grande do
 Sul (UFRGS), Porto Alegre, Rio Grande do Sul (RS) 90620-170,
 Brasile; Laboratório de AnUNLises Bioquímicas e Citolo-
 gicas (LABC), Faculdade de FarmUNcia–UFRGS, Porto Alegre, RS
 90620-170, Brasile;  orcid.org/0000-0002-6773-6480

Le informazioni di contatto complete sono disponibili all'indirizzo:

<https://pubs.acs.org/10.1021/acsbiomaterials.5c00642>

Contributi degli autori

Tutti gli autori hanno contribuito all'ideazione e al disegno dello studio. La preparazione del materiale, la raccolta dei dati e l'analisi sono state eseguite da MCV, VLW, CDSM e JNS. La prima bozza del manoscritto è stata redatta da MCV e tutti gli autori hanno commentato le versioni precedenti del manoscritto. Tutti gli autori hanno letto e approvato il manoscritto finale.

Finanziamento

Il costo di elaborazione dell'articolo per la pubblicazione di questa ricerca è stato finanziato dal Coordenacao de Aperfeicoamento de Pessoal de Nivel Superior (CAPES), Brasile (codice ROR: 00x0ma614). Lo studio è stato finanziato da CNPq/Brasile (CNPq; n. 406035/2021-0 e PQ n. 311580/2021-1, Figueiró F), FAPERGS/Brasile e CAPES (codice finanziario 001). Questo studio fa parte del progetto dell'Istituto Nazionale di Scienza e Tecnologia per la stampa 3D e Materiali Avanzati Applicati alla Salute Umana e Veterinaria - INCT_3D-Saúde, finanziato da CNPq, Brasile (Grant n. 406436/2022-3).

Note

Questo studio è stato condotto in conformità con le linee guida per la cura e l'uso degli animali da laboratorio del National Institutes of Health ed è stato approvato dal Comitato etico dell'Università federale di Rio Grande do Sul (numero di protocollo: 43058).

Gli autori dichiarano di non avere alcun conflitto di interessi finanziari.

RINGRAZIAMENTI

Gli autori esprimono il loro apprezzamento a Linear Scientific Visual Communication (linear.ilustra@gmail.com) per aver creato le figure utilizzate in questo articolo.

RIFERIMENTI

(1) Plummer, M.; de Martel, C.; Vignat, J.; Ferlay, J.; Bray, F.; Franceschi, S. Carico globale di tumori attribuibili alle infezioni nel 2012: un'analisi sintetica. *Lancet Glob Health*. 2016, 4, N. e609-16.

(2) Bray, F.; Laversanne, M.; Sung, H.; Ferlay, J.; Siegel, RL; Soerjomataram, I.; Jemal, A. Statistiche globali sul cancro 2022: stime GLOBOCAN di incidenza e mortalità in tutto il mondo per 36 tumori in 185 paesi. *Ca-Cancer J. Clin.* 2024, 74(3), 229–263.

(3) de Oliveira Santos, M. Estimativa 2023: Incidência de Câncer No Brasil. In *Revista Brasileira de Cancerologia*. INCA 2022. vol:64, pp 119-120.

(4) Ferlay, J.; Colombet, M.; Soerjomataram, I.; Parkin, DM; Pinéros, M.; Znaor, A.; Bray, F. Osservatorio globale sul cancro: Cancer Today. Rivista internazionale sul cancro. 2021, 149, 778-789. (5) Kapoor, M.; Gupta, V. *Astrocitoma*. Libreria NCB. Un servizio della Biblioteca Nazionale di Medicina.; Istituti Nazionali di Sanità. StatPearls, 2024.

(6) Thomas, DL 2021 Aggiornamenti alla classificazione dell'Organizzazione Mondiale della Sanità dei gliomi diffusi di tipo adulto e pediatrico: una revisione della pratica clinica. *Clinica oncologica cinese* 2023, 12(1), 7–7. (7) Xu, S.; Tang, L.; Li, X.; Fan, F.; Liu, Z. Immunoterapia per il glioma: gestione attuale e applicazione futura. *Cancro Lett.* 2020, 476(Febbraio), 1-12.

(8) Van Meir, EG; Hadjipanayis, CG; Norden, AD; Shu, HK; Wen, PY; Olson, JJ Nuovi entusiasmi progressi in neuro-oncologia: la strada verso una cura per il glioma maligno. *Ca-Cancer J. Clin.* 2010, 60(3), 166–193.

(9) Velho, MC; de Andrade, DF; Beck, RCR Ivermectina: approcci recenti nella progettazione di nuovi medicinali veterinari e umani. *Farmaceutica, Sviluppo, Tecnologia* 2022, 27(8), 865–880.

(10) Juarez, M.; Scholnik-Cabrera, A.; Duenas-Gonzalez, A. Il farmaco multi-target Ivermectina: da agente antiparassitario a farmaco antitumorale riposizionato. *Am. J. Cancer Res.* 2018, 8(2), 317-331. (11) Dou, Q.; Chen, HN; Wang, K.; Yuan, K.; Lei, Y.; Li, K.; Lan, J.; Chen, Y.; Huang, Z.; Xie, N.; Zhang, L.; Xiang, R.; Bello, CE; Wei, Y.; Huang, C. L'ivermectina induce l'autofagia citostatica bloccando l'asse PAK1/Akt nel cancro al seno. *Ricerca sul cancro* 2016, 76(15), 4457–4469.

(12) Hashimoto, H.; Messerli, SM; Sudo, T.; Maruta, H. L'ivermectina inattiva la chinasi PAK1 e blocca la crescita dipendente da PAK1 delle linee cellulari del cancro ovarico umano e del tumore NF2. *Scoperta di farmaci Ther.* 2009, 3(6), 243–246.

(13) Sharmeen, S.; Skrtic, M.; Sukhai, Massachusetts; Hurren, R.; Gronda, M.; Wang, X.; Fonseca, SB; Sun, H.; Wood, TE; Ward, R.; Minden, MD; Batey, RA; Datti, A.; Wrana, J.; Kelley, SO; Schimmer, AD L'agente antiparassitario ivermectina induce iperpolarizzazione della membrana dipendente dal cloruro e morte cellulare nelle cellule leucemiche. *Sangue* 2019, 116(18), 3593–3604.

(14) Melotti, A.; Mas, C.; Kuciak, M.; Lorente-Trigos, A.; Borges, I.; Ruiz i Altaba, A. Il farmaco per la cecità dei fiumi I Vermectina e i lattoni macrociclici correlati inibiscono le risposte del percorso WNT-TCF nel cancro umano. *EMBO Mol. Med.* 2014, 6(10), 1263–1278. (15) Wang, J.; Xu, Y.; Wan, H.; Hu, J. L'antibiotico ivermectina induce selettivamente l'apoptosi nella leucemia mieloide cronica attraverso l'induzione della disfunzione mitocondriale e dello stress ossidativo. *Biochimica. Biofisica. Ricerca. Commun.* 2018, 497(1), 241–247.

(16) Zhu, M.; Li, Y.; Zhou, Z. L'antibiotico ivermectina colpisce preferibilmente il cancro renale inducendo disfunzione mitocondriale e danno ossidativo. *Biochimica. Biofisica. Ricerca. Commun.* 2017, 492(3), 373–378.

(17) Liu, J.; Liang, H.; Chen, C.; Wang, X.; Qu, F.; Wang, H.; Yang, K.; Wang, Q.; Zhao, N.; Meng, J.; Gao, A. L'ivermectina induce la morte cellulare mediata dall'autofagia attraverso il percorso di segnalazione AKT/MTOR nelle cellule del glioma. *Rappresentante di Bioscienze* 2019, 39(dicembre), 1-13. (18) Canzone, D.; Liang, H.; Qu, B.; Li, Y.; Liu, J.; Zhang, Y.; Li, L.; Hu, L.; Zhang, X.; Gao, A. L'ivermectina inibisce la crescita delle cellule del glioma inducendo l'arresto del ciclo cellulare e l'apoptosi in vitro e in vivo. *J. Cell. Biochimica* 2019, 120(1), 622–633.

(19) Yin, J.; Park, G.; Lee, JE; Choi, EY; Park, JY; Kim, TH; Park, N.; Jin, X.; Jung, JE; Shin, D.; Hong, JH; Kim, H.; Yoo, H.; Lee, SH; Kim, YJ; Park, JB; Kim, JH DEAD-Box RNA Helicase

DDX23 modula la malignità del glioma aumentando la biogenesi di MIR-21. *Cervello* 2015, 138(9), 2553–2570.

(20) Patel, VP; Lakkad, HA; Ashara, KC Studi di formulazione del sistema di rilascio di farmaci autoemulsionanti solidi di ivermectina. *Folia Med.* 2018, 60(4), 580–593.

(21) Sonvico, F.; Clementino, A.; Buttini, F.; Colombo, G.; Pesca, S.; Guterres, SS; Pohlmann, AR; Nicoli, S. Nanovetorimodificati in superficie per la somministrazione dal naso al cervello: dalla bioadesione al targeting. *Farmaceutica* 2018, 10(1), 1–34.

(22) Abourehab, MAS; Khames, A.; Genedy, S.; Mostafa, S.; Khaleel, MA; Omar, MM; El Sisi, AM Trasportatori lipidici nanostrutturati a base di olio di sesamo di nicergolina, sistema di somministrazione intranasale per il targeting cerebrale della protezione cerebrovascolare sinergica. *Farmaceutica* 2021, 13(4), 581.

(23) Clementino, AR; Pellegrini, G.; Banella, S.; Colombo, G.; Cantu, L.; Sonvico, F.; Del Favero, E. Struttura e destino delle nanoparticelle progettate per la somministrazione nasale di farmaci scarsamente solubili. *Mol. Farmaceutica* 2021, 18(8), 3132–3146.

(24) Colombo, M.; Figueiro, F.; de Fraga Dias, A.; Teixeira, HF; Battastini, AMO; Koester, LS La nanoemulsione mucoadesiva caricata con kaempferolo per la somministrazione intranasale riduce la crescita del glioma in vitro. *Int. J. Pharm.* 2018, 543(1–2), 214–223.

(25) Sanchez-Dengra, B.; Alfonso, M.; González-Álvarez, I.; Bermejo, M.; González-Álvarez, M.; Martínez-Mániz, R. Somministrazione intranasale di nanoparticelle mesoporose con cancello molecolare per aumentare la consegna di Ponatinib al cervello. *Nanomedicina* 2023, 18(25), 1799–1813.

(26) Formica, ML; Real, DA; Picchio, ML; Catlin, E.; Donnelly, RF; Paredes, AJ Sulla strada per il cervello: una revisione sulla somministrazione di farmaci dal naso al cervello mediante nanoparticelle. *Appl. Mater. Oggi* 2022, 29, 101631.

(27) Maher, R.; Moreno-Borralló, A.; Jindal, D.; Mai, BT; Ruiz-Hernandez, E.; Harkin, A. Nanocarrier intranasali polimerici e a base di lipidi per la somministrazione di farmaci al sistema nervoso centrale. *Farmaceutica* 2023, 3, 746.

(28) Velho, MC; Funk, NL; Deon, M.; Benvenuti, EV; Buchner, S.; Hinrichs, R.; Pilger, DA; Beck, RCR Silice mesoporosa caricata con ivermectina e nanocapsule polimeriche: impatto sul caricamento del farmaco, miglioramento della solubilità in vitro e prestazioni di rilascio. *Farmaceutica* 2024, 16(3), 325.

(29) de Oliveira, E. G.; de Oliveira, RS; Zatta, KC; Furian, AF; Oliveira, MS; Pohlmann, AR; Guterres, SS; Beck, RCR Le nanocapsule a nucleo lipidico caricate con fenitoina migliorano le proprietà tecnologiche e le prestazioni in vivo dei granuli a letto fluido. *Laurea Magistrale in Scienze Ing.* 2020, 111, 110753.

(30) Charnay, C.; Bégu, S.; Tourné-Péteilh, C.; Nicole, L.; Lerner, DA; Devoisselle, JM Inclusionediibuprofene nella silicemesoporosa templata: proprietà di caricamento e rilascio del farmaco. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 2004, 57, 533–540.

(31) Paese, K.; Ortiz, M.; Frank, LA; Kuikamp-Guerreiro, IC; Rolim, CMB; Barros, DM; Pohlmann, AR; Guterres, SS Produzione di nanocapsule isotoniche, sterili e cineticamente stabili con nucleo lipidico per somministrazione iniettabile. *AAPS PharmSciTech* 2017, 18(1), 212–223.

(32) Mosmann, T. Saggiocolorimetrico rapido per la crescita e la sopravvivenza cellulare: applicazione ai test di proliferazione e citotossicità. *J. Immunol. Metodi* 1983, 65(1–2), 55–63.

(33) Figueiro, F.; De Oliveira, CP; Rockenbach, L.; Mendes, FB; Bergamin, LS; Jandrey, EHF; Edelweiss, MI; Guterres, SS; Pohlmann, AR; Battastini, AMO Miglioramento farmacologico e valutazione preclinica di nanocapsule a nucleo lipidico caricate con metotrexato in un modello di glioblastoma. *J. Biomed. Nanotecnologia*. 2015, 11(10), 1808–1818.

(34) Scholl, JN; De Fraga Dias, A.; Pizzato, PR; Lopes, DV; Moritz, CE; Jandrey, EHF; Souto, GD; Colombo, M.; Rohden, F.; Sévigny, J.; Pohlmann, AR; Guterres, SS; Battastini, AMO; Figueiro, F. Caratterizzazione e attività antiproliferativa delle vescicole extracellulari derivate dal glioma. *Nanomedicina* 2020, 15(10), 1001–1018.

(35) Valarini Junior, O.; Cardoso, LONTANO; de Souza, GBM; Machado Giufri, W.; Cardozo-Filho, L. Processo di incapsulamento in fase singola di ivermectina in polimero biocompatibile utilizzando un processo con sistema antisolvente supercritico. *Asia-Pac. J. Chem. Eng.* 2021, 16(e2672), 1–14.

(36) Unger, KK Chimica superficiale della silice porosa. *J. Cromatografia Lib.* 2009, 16, 57–146.

(37) Oliveira, MPD Analizzare in vitro la citotossicità e la proliferazione cellulare in equivalenti della pelle umana; Pontificia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, 2009.

(38) Figueiro, F.; Bernardi, A.; Frozza, RL; Terroso, T.; Zanotto-Filho, A.; Jandrey, EHF; Moreira, JCF; Salbego, CG; Stella alpina, MI; Pohlmann, AR; Guterres, SS; Battastini, il trattamento con nanocapsule AMO con nucleo lipidico caricato con resveratrolo riduce la crescita del glioma in vitro e in vivo. *J. Biomed. Nanotecnologia*. 2013, 9(3), 516–526.

(39) Jiapaer, S.; Furuta, T.; Tanaka, S.; Kitabayashi, T.; Nakada, M. Potenziali strategie per superare la resistenza al temozolomide per il glioblastoma. *Neurol. Med. Chir.* 2018, 58(10), 405–421. (40) Ahmadvipour, E.; Godrati-Azar, Z.; Spotin, A.; Norouzi, R.; Hamishehkar, H.; Nami, S.; Heydarian, P.; Rajabi, S.; Mohammadi, M.; Perez-Cordon, G. Trasportatori lipidici nanostrutturati di ivermectina come nuovo sistema di somministrazione di farmaci nell'idatiidiosi. *Parassiti. Vettori* 2019, 12(1), 469.

(41) Begines, B.; Ortiz, T.; Pérez-Aranda, M.; Martínez, G.; Merinero, F.; Arguëlles-Arias, F.; Alcudia, A. Nanoparticelle polimeriche per la somministrazione di farmaci: sviluppi recenti e prospettive future. *Nanomateriali* 2020, 10(7), 1403.

(42) Esfahani, MKM; Alavi, SE; Caboto, PJ; Islam, Nord; Izake, E. L. Applicazione di nanoparticelle di silice mesoporosa nella terapia del cancro e somministrazione di antelmintici riutilizzati per la terapia del cancro. *Farmaceutica* 2022, 14, 1579.

(43) dos Santos, RB; Fungetto-Ribeiro, AC; Maciel, TR; Fonseca, DP; Favarin, FR; Nogueira-Librelotto, DR; de Gomes, MG; Nakamura, TU; Rolim, CMB; Haas, SE Valutazione dell'effetto in vivo e in vitro per Se di policaprolattone ed Eudragit® Nanoparticelle basate su RS100. *Biomed. Farmacoaltri*. 2022, 153, 113410.

(44) Chaves, PDS; Frank, LA; Frank, AG; Pohlmann, AR; Guterres, SS; Beck, RCR Proprietà mucoadesive di Eudragit® RS100, Eudragit® S100 e Poly(e-Caprolattone) Nanocapsule: influenza del veicolo e della superficie della mucosa. *AAPS PharmSciTech* 2018, 19(4), 1637–1646.

(45) Nascimento, J.; Fare Canto Olegário, I.; Mariot, C.; di Oliveira, TV; dos Santos Chaves, P.; Oliveira, R.; de Oliveira, EG; Guterres, SS; Buffon, A.; Pilger, DA; Beck, RCR L'incapsulamento dell'orlistat in nanocapsule polimeriche biodegradabili migliora il suo effetto citotossico contro le cellule del cancro cervicale. *J. Scienza e tecnologia per la somministrazione di farmaci*. 2023, 89(Settembre), 105086.

(46) Ullio-Gamboa, GV; Palma, SD; Lifschitz, A.; Ballent, M.; Lanusse, C.; Passirani, C.; Benoit, JP; Allemandi, DA Nanocapsule lipidiche caricate con ivermectina: verso lo sviluppo di un nuovo sistema di somministrazione antiparassitaria per applicazioni veterinarie. *Parasitol. Res.* 2016, 115(5), 1945–1953.

(47) Ali, M.; Afzal, M.; Verma, M.; Bhattacharya, SM; Ahmad, F. J.; Samim, M.; Abidin, MZ; Dinda, AK Efficacia terapeutica delle nanoparticelle di poli (acido lattico-co-glicolico) incapsulate nell'ivermectina (nano-ivermectina) contro la filariosi brugianella nel modello sperimentale di roditori. *Parasitol. Res.* 2014, 113(2), 684–691.

(48) Guo, D.; Dou, D.; Li, X.; Zhang, Q.; Bhutto, ZA; Wang, L. Nanoparticelle lipidiche solide caricate con invermezone: preparazione, caratterizzazione, stabilità e comportamento transdermico. *Cellule artificiali, nanomedicine, biotecnologie*. 2018, 46(2), 255–262.

(49) Mtunzi, FM; Diagboya, PN; Durante, RA; Olu-Owolabi, B. I. SBA-15 mesoporoso funzionalizzato con poli(ammidoammina) G-5: un adsorbente sostenibile per il sequestro efficace di un contaminante acquoso emergente. *ACS Appl. Nano Mater.* 2021, 4(3), 3052–3061.

(50) Zhang, P.; Zhang, Y.; Liu, K.; Liu, B.; Xu, W.; Gao, J.; Ding, L.; Tao, L. L'ivermectina induce l'arresto del ciclo cellulare e l'apoptosi delle cellule HeLa tramite il percorso mitocondriale. *Proliferazione cellulare* 2019, 52, 1–10. (51) Liu, Y.; Fang, S.; Sun, Q.; Liu, B. Il farmaco antelmintico ivermectina inibisce l'angiogenesi, la crescita e la sopravvivenza del glioblastoma inducendo disfunzione mitocondriale e stress ossidativo. *Biochimica. Biofisica. Ricerca. Commun.* 2016, 480(3), 415–421.

(52) Feng, Y.; Wang, J.; Cai, B.; Bai, X.; Zhu, Y. L'ivermectina accelera la morte autofagica delle cellule del glioma inibendo la glicolisi attraverso il blocco dell'attivazione del percorso di segnalazione JAK/STAT mediato da GLUT4. *Ambiente. Tossico.* 2022, 37(4), 754.

(53) Krai, J.; Beckenkamp, A.; Gaelzer, M.; Pohlmann, A.; Guterres, S.; Filippi-Chiela, E.; Salbego, C.; Buffon, A.; Beck, R. La nanoincapsulazione della doxazosina migliora i suoi effetti antiproliferativi e anticonogenici in vitro sulle cellule del cancro al seno. *Biomed. Farmacoaltr.* 2017, 94, 10–20.

(54) Ourique, A.F.; Azoubel, S.; Ferreira, C.V.; Silva, C.B.; Marchiori, M.C.L.; Pohlmann, A.R.; Guterres, S.; Beck, R. Nanocapsule del nucleo lipidico come nanomedicina per la somministrazione parenterale di tretinoina: sviluppo e attività antitumorale in vitro sulle cellule della leucemia mieloide umana. *J. Biomed. Nanotecnologia.* 2010, 6(3), 214–223.

(55) He, Y.; Liang, S.; Long, M.; Xu, H. Nanoparticelle di silice mesoporosa come potenziali vettori per una maggiore solubilità del farmaco Paclitaxel. *Laurea Magistrale in Ingegneria, C2017*, 78, 12–17.

(56) Babaei, M.; Abnous, K.; Taghdisi, S.M.; Taghavi, S.; Saljooghi, A.; Ramezani, M.; Albolandi, M. Nanoparticelle di silice mesoporosa a forma di bastoncino mirate per la co-somministrazione di camptotecina e survivina ShRNA nell'adenocarcinoma del colon in vitro e in vivo. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 2020, 156(luglio), 84–96.

(57) Jeong, S.H.; Jang, J.H.; Lee, Y.B. Somministrazione di farmaci al cervello tramite la via di somministrazione nasale: esplorazione di obiettivi chiave e fattori di considerazione principali. *J. Farmaceutico Investigativo* 2023, 53(1), 119–152.

(58) Bruinsmann, F.A.; de Cristo Soares Alves, A.; de Fraga Dias, A.; Lopes Silva, L.F.; Visioli, F.; Raffin Pohlmann, A.; Figueiró, F.; Sonvico, F.; Staniscuški Guterres, S. La somministrazione naso-cervello di simvastatina mediata da nanocapsule con nucleo lipidico rivestite di chitosano consente il trattamento del glioblastoma in vivo. *Int. J. Pharm.* 2022, 616(Gennaio), 121563.

(59) Al-Hajaj, N.; Khalil, R.; Hussein, G.A. Somministrazione intranasale di farmaci: percorsi, sfide e progressi nel targeting del SNC. *J. Scienza e tecnologia per la somministrazione di farmaci.* 2025, 107, 106825. (60) Karim, R.; Palazzo, C.; Evrard, B.; Piel, G. Nanocarrier per il trattamento del glioblastoma multiforme: stato attuale dell'arte. *J. Rilascio controllato* 2016, 227, 23–37.

(61) Liu, S.; Tan, B.; Wang, F.; Yu, Y. Applicazioni di nanoparticelle polimeriche nella somministrazione di farmaci per il glioblastoma. *Fronte. Farmaco.* 2025, 1519479.

(62) Bors, L.A.; Bajza, Á.; Mandoki, M.; Tasi, B.J.; Cserey, G.; Imre, T.; Szabo, P.; Erdo, F. Modulazione del rilascio dal naso al cervello di un farmaco modello substrato della glicoproteina P (MDR1) (chinidina) nei ratti. *Brain Res. Bull.* 2020, 160(gennaio), 65–73.

(63) Schinkel, A.H.; Smit, J.J.M.; van Tellingen, O.; Beijnen, J.H.; Wagenaar, E.; van Deemter, L.; Mol, C.A.M.; van der Valk, M.A.; Robanus-Maandag, C.E.; Te Riele, H.P.J.; Berns, A.J.M.; Borst, P. L'interruzione del gene della glicoproteina P Mdr1a del topo porta a una carenza della barriera emato-encefalica e ad una maggiore sensibilità ai farmaci. *Cella* 1994, 77(4), 491–502.

(64) Bernardi, A.; Braganhol, E.; Jäger, E.; Figueiro, F.; Stella alpina, M.; Pohlmann, A.R.; Guterres, S.; Battastini, A.M.O. Il trattamento con nanocapsule caricate con indometacina riduce la crescita del glioblastoma in vivo in un modello di glioma nel ratto. *Cancro Lett.* 2009, 281(1), 53–63.

(65) Din, F.U.; Aman, W.; Ullah, I.; Qureshi, O.S.; Mustapha, O.; Shafique, S.; Zeb, A. Uso efficace di nanovettori come sistemi di somministrazione di farmaci per il trattamento di tumori selezionati. *Int. J. Nanomed.* 2017, 12, 7291–7309.

(66) Lungare, S.; Hallam, K.; Badhan, R.K.S. Nanoparticelle di silice mesoporosa caricate con sostanze fitochimiche per la somministrazione di farmaci olfattivi dal naso al cervello. *Int. J. Pharm.* 2016, 513(1–2), 280–293.

(67) Reagan-Shaw, S.; Nihal, M.; Ahmad, N. Traduzione della dose dagli studi sugli animali a quelli sull'uomo rivista. *Faseb J.* 2008, 22(3), 659–661. (68) Lima, C.M.; Lima, A.K.; Melo, M.G.D.; Doria, G.A.; Leite, B.S.; Serafini, M.R.; Albuquerque-Júnior, R.L.C.; Araújo, A.A.S. Valores de Referência Hematológicos e Bioquímicos de Ratos (*Rattus Norvegicus* Linhagem Wistar) Provenientes Do Biotério Da Universidade Tiradentes | Scienza Plena. *Sci. Plena* 2014, 10, 1–9.



CAS INSIGHTS™

EXPLORE THE INNOVATIONS SHAPING TOMORROW

Discover the latest scientific research and trends with CAS Insights. Subscribe for email updates on new articles, reports, and webinars at the intersection of science and innovation.

Subscribe today

CAS
A division of the American Chemical Society