

**UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI NAPOLI “FEDERICO II”**



**DOTTORATO DI RICERCA IN BIOETICA**

**XXIV CICLO**

**“NUOVA PROSPETTIVA DI TERAPIA E ASPETTI ETICI NEL  
TRATTAMENTO DI NEOPLASIE LINFOIDI IN ETA’  
PEDIATRICA”**

**Coordinatore**

Prof. Giuseppe Lissa

**Candidata**

Dott.ssa Annalisa Di Santi

**Tutor**

Prof. ssa Alessandra Pica

**ANNO ACCADEMICO 2010/2011**

# INDICE

1. PREMESSA	pag. 4
1.1 Il paziente oncologico in età pediatrica: il dolore e la <i>fatigue</i>	pag. 5
1.2 Diritti del paziente oncologico	pag. 7
1.3 La qualità della vita del paziente oncologico	pag. 19
1.4 La Leucemia linfoblastica acuta: una neoplasia ematologica frequente in età pediatrica	pag. 22
1.5 Chemioterapia: “Morte per trattamento medico?”	pag. 26
1.5.1 La Malattia Minima Residua (MMR)	pag. 27
1.5.2 Considerazioni etiche sulla chemioterapia	pag. 28
1.6 L’industria farmaceutica e il conflitto di interessi	pag. 31
1.7 La sperimentazione di un nuovo farmaco	pag. 34
2. SEZIONE SPERIMENTALE	pag. 38
2.1 INTRODUZIONE	pag. 38
2.2 Ruolo dello stress ossidativo e dei ROS nella genesi del tumore	pag. 40
2.3 Meccanismi riparativi dello stress ossidativo: gli enzimi antiossidanti	pag. 43
2.4 Il peptide leader della rMnSOD quale carrier di citostatici	pag. 45
2.5 La Manganese Superossido Dismutasi ricombinante (rMnSOD): un nuovo farmaco antitumorale?	pag. 47
3. MATERIALI E METODI	pag. 49
3.1 Campioni: linfoblasti di pazienti oncologici in età pediatrica e linee stabilizzate	pag. 49
3.2 Estrazione dei linfoblasti dal sangue midollare	pag. 50
3.3 Scongellamento dei linfoblasti	pag. 51
3.4 Allestimento delle colture cellulari e tests di vitalità	pag. 52
3.5 Trattamento dei campioni	pag. 55

3.6 Visualizzazione della proteina internalizzata mediante tecnica immunocitochimica	pag. 57
3.7 Visualizzazione ultrastrutturale dell'internalizzazione	pag. 59
3.8 Estrazione delle proteine	pag. 61
3.9 Analisi delle proteine mediante Saggio Western Blotting	pag. 63
4. RISULTATI	pag. 66
4.1 Trattamento con il peptide leader della rMnSOD	pag. 66
4.2 Trattamento con il peptide leader della rMnSOD coniugato a cisplatino	pag. 70
4.3 Trattamento con il peptide leader della rMnSOD coniugato ad epirubicina	pag. 77
4.4 Trattamento con la proteina rMnSOD di linfoblasti di LLA T e B <i>ex vivo</i>	pag. 82
4.5 Trattamento con la proteina rMnSOD dei linfoblasti da soggetto sano	pag. 95
4.6 Trattamento con la proteina rMnSOD delle linee stabilizzate di LLA T (Jurkat)	pag. 101
5. CONCLUSIONI	pag. 115
6. BIBLIOGRAFIA	pag. 119

## 1. PREMESSA

La sperimentazione clinica necessita di una specifica attenzione ai criteri etici di riferimento tendenti a salvaguardare i beni e i valori umani fondamentali.

Spesso gli interessi commerciali interferiscono con gli interessi scientifici, compromettendo il benessere psichico del malato e/o la sua dignità di essere umano.

Nei pazienti oncologici la sofferenza fisica, che rappresenta soltanto un sintomo della malattia, determina necessariamente un'alterazione della qualità di vita e può condizionarne la vita di relazione. Tutto questo viene ovviamente amplificato quando il malato è un bambino che, talora, è incapace di esprimere, localizzare e quantificare la sua sofferenza.

Gli oncologi pediatrici lamentano la mancanza di farmaci antitumorali studiati per i bambini, in considerazione del fatto che i chemioterapici utilizzati nei protocolli di cura degli adulti non sono spesso egualmente efficaci in età pediatrica. Le aziende farmaceutiche hanno poco interesse a sviluppare farmaci per la popolazione pediatrica oncologica per motivi di natura economica, dipendenti dalla esiguità del numero di pazienti pediatrici rispetto alla popolazione adulta. In generale la produzione di farmaci antitumorali alternativi trova resistenza nell'ambito dell'industria farmaceutica coinvolta nei profitti relativi al mercato dei chemio e radioterapici.

## **1.1 Il paziente oncologico in età pediatrica: il dolore e la *fatigue***

In ambito pediatrico, ancor più che nell'adulto, nella gestione del paziente oncologico occorre attenzione allo stato psicofisico durante le procedure terapeutiche. Non basta, infatti, solo valutare lo stato di salute fisica del malato, considerando l'efficacia del trattamento in base alla risposta clinica o all'aumento della sopravvivenza, ma bisogna anche tenere in considerazione il benessere psichico del bambino.

Anche se nel bambino non sempre il grado di consapevolezza della malattia è completo, il suo stato psicologico è alterato dai cambiamenti di vita, di immagine del proprio corpo e di pensiero. Durante la terapia molta attenzione deve essere prestata ai problemi emozionali che l'evoluzione della malattia comporta: la negazione (il rifiuto di prendere coscienza che ciò che si sta vivendo è segno della progressione della malattia), la rabbia (verso tutto ciò che è vita che continua solo per gli altri) e la depressione (per la perdita dei rapporti sociali, della propria autonomia fisica e decisionale e paura per la consapevolezza di avvicinarsi alla morte) (Kubler-Ross, 2005).

Il *dolore*, per il paziente oncologico, è l'espressione più tangibile della propria malattia: spesso è un segnale importante per la diagnosi iniziale, fattore sensibile nell'indicare evoluzioni positive o negative durante il decorso, innegabile presenza in corso di molteplici procedure diagnostiche e/o terapeutiche e costante riflesso di paura e ansia per tutto quello che la malattia comporta.

L'incidenza del dolore in corso di malattia oncologica in età pediatrica, è elevata: in più del 50% dei casi, è presente fra i sintomi d'esordio e la percentuale aumenta durante il decorso della malattia. Nel 100% dei bambini è presente dolore iatrogeno, cioè secondario a procedure terapeutiche, basti pensare alla chemioterapia. Quindi, la gestione del bambino affetto da neoplasia, non può prescindere da una corretta valutazione e terapia del

sintomo dolore: sintomo che più di tutti mina l'integrità fisica e psichica del bambino, che ne conserva il ricordo (Benini, 2000).

Anche la *fatigue* è uno dei disturbi più frequentemente riferiti dai pazienti oncologici. La *fatigue* è stata definita come malattia nella decima revisione della International Classification of Disease (ICD10) del 1998, la classificazione internazionale delle malattie dell'OMS. È un fenomeno multidimensionale che si sviluppa nel tempo, riduce i livelli di energia, le capacità mentali e lo stato psicologico dei pazienti oncologici. Il paziente/bambino prova un'estrema stanchezza, spossatezza, debolezza, mancanza di energia e ha bisogno di riposare più frequentemente o comunque in maniera non proporzionale alle attività sostenute. Non è semplicemente un insieme di sintomi da affaticamento, ma una malattia nella malattia che affligge i bambini malati. La *fatigue* riguarda il 78-96% della popolazione oncologica e addirittura il 50% la avverte prima del trattamento. Può aumentare del 60-90% durante la chemioterapia e del 75-100% durante la radioterapia. A volte la *fatigue* persiste anche dopo la fine del trattamento, tanto che al termine della chemioterapia la *fatigue* viene segnalata dai pazienti come il sintomo di più lunga durata e invalidante nella vita quotidiana. Il 61% dei malati di cancro la ritiene peggiore del dolore e della depressione (Ricciuti, 2006).

## **1.2 Diritti del paziente oncologico**

Per comprendere le necessità e i problemi psicologici di un malato, sia esso un bambino che un adulto, bisogna tenere in considerazione da un lato la malattia e dall'altro la terapia da adottare. Malattia e terapia non possono essere considerate indipendenti dal momento che i pazienti, molto spesso, attribuiscono una maggiore gravità alla loro malattia quanto più le terapie sono mutilanti o debilitanti.

In Italia, oggi, il paziente maggiorenne, insieme al medico, decide delle sue cure e dei suoi trattamenti (tramite il consenso informato). Il paziente ha diritto di essere informato, di scegliere se e a quale trattamento sottoporsi e di conoscere eventuali rischi, pertanto è giusto ed etico informare il paziente, rispettando la sua sensibilità. I diritti del paziente oncologico tra i quali la libertà di decidere la terapia, rientrano in quelli oggetto di tutela da parte della Costituzione Italiana secondo cui nessuno può essere obbligato ad un trattamento terapeutico e che la legge non può comunque violare i limiti imposti dal rispetto della persona umana (art.32 Costituzione Italiana).

In occasione del vertice Mondiale contro il cancro per il nuovo Millennio, tenutosi a Parigi il 4 febbraio 2000, è stata predisposta la carta di Parigi. Questo è il primo appello lanciato su scala mondiale per chiamare alla lotta comune, nel nuovo millennio, medici, industrie, politici e pazienti. La Carta raccoglie dieci articoli che riguardano gli aspetti più importanti della lotta: i diritti dei pazienti oncologici sono diritti umani; eliminare lo stigma associato al cancro; ampliare le frontiere della conoscenza; garantire il diritto alla cura di qualità del cancro; promuovere la prevenzione contro il cancro; priorità allo screening ed alla diagnosi precoce; potenziare il ruolo attivo del paziente; migliorare la qualità della vita dei pazienti; sostenere le strategie locali contro il cancro; sviluppare reti di cooperazione.

La carta di Parigi, quindi, è un documento che afferma i diritti dei pazienti oncologici. Il diritto a ricevere cure di qualità in maniera omogenea in tutte le strutture ospedaliere e avere accesso, in ogni caso, alla miglior cura disponibile, e anche il diritto a migliorare la qualità della propria vita, alleviando i disagi fisici e sociali causati sia dalla malattia che dalle cure. I pazienti oncologici hanno diritto all'eguaglianza nel trattamento. Pazienti, familiari ed amici devono poter contare su un sostegno morale e su assistenza specifica durante e dopo il trattamento. I malati di cancro hanno diritto a cure qualitativamente adatte e all'avanguardia, ma anche ad un rapporto umano con gli operatori sanitari. Hanno diritto a ricevere sempre l'assistenza sanitaria per la cura, riabilitazione e prevenzione dal rischio di recidive. Viene loro riconosciuto il diritto di scegliere da quali medici e presso quale ospedale farsi curare e di cambiarli se insoddisfatti, o semplicemente chiedere la consulenza di altri medici. Inoltre, hanno diritto a un trattamento che assicuri la terapia del dolore e a una morte dignitosa. Devono essere informati sul loro stato di salute, sulle procedure mediche, sui rischi e benefici a cui vanno incontro e sulle eventuali alternative alle prescrizioni proposte, dunque devono essere informati sulla diagnosi, prognosi e decorso del trattamento. Il diritto all'informazione vale anche per qualsiasi partecipazione del paziente a ricerca scientifica. Per di più, le informazioni devono essere fornite al malato in maniera appropriata e chiara. Su sua esplicita richiesta il malato può non essere informato oppure può indicare una persona che dovrà essere informata su tutto ciò che lo riguarda. Anche i familiari hanno diritto a ricevere informazioni comprensibili riguardo sia alla diagnosi che ai trattamenti terapeutici, soprattutto nel caso in cui il paziente oncologico è un minorenne, e devono poter contare su sostegno psicologico. I malati di cancro hanno diritto all'autodeterminazione sugli atti medici, ma se i malati sono incapaci, è necessario il consenso di un rappresentante legale e se quest'ultimo si rifiuta di dare il consenso, la decisione finale sarà presa in conformità con la procedura di legge. Le

informazioni sullo stato di salute dei malati di cancro e le loro stesse identità sono riservate. I malati possono chiedere di consultare le proprie cartelle cliniche, i referti e qualunque altro documento che riguarda la diagnosi e la prognosi, qualora lo ritenessero necessario hanno diritto ad ottenere una copia di tutti i documenti. I malati di cancro molto spesso si trovano ad affrontare problemi economici, per cui hanno diritto a ricevere sostegno economico, finanziario e sociale, e adeguato accesso all'istruzione. Inoltre, il mantenimento del posto di lavoro deve essere loro assicurato, nonostante le assenze prolungate dovute ai trattamenti terapeutici. I pazienti devono collaborare con i medici fornendo loro tutte le informazioni richieste e devono cercare di stabilire un buon rapporto con gli operatori sanitari e i centri di cura. Quanto precedentemente esposto è stato trasfuso negli articoli di seguito riportati:

**Articolo I:** I diritti dei pazienti oncologici sono diritti umani. Le azioni in corso volte a definire ed adottare i diritti dei pazienti oncologici sono di primaria importanza al fine di riconoscere e difendere il valore e la dignità degli individui malati di cancro di tutto il mondo.

**Articolo II:** Lo stigma associato al cancro rappresenta un grosso ostacolo al progresso sia nei paesi industrializzati che in quelli in via di sviluppo, provocando spesso:

- eccessivi traumi emotivi per i pazienti e le loro famiglie
- pregiudizio e discriminazione nei confronti dell'impiego professionale di individui malati di cancro e/o della loro partecipazione e del loro contributo nella società
- relative difficoltà finanziarie e calo di produttività
- scarsità di comunicazione e insufficiente istruzione pubblica in materia
- ingiustificato senso di fatalismo che può sortire un impatto negativo sull'impegno dei governi, degli organismi sanitari e sulle istituzioni private coinvolte nella lotta contro il cancro.

*Le parti s'impegnano a comprendere meglio e ad eliminare gli stigmi associati al cancro, nonché a ridefinire questa malattia in quanto patologia biologica curabile e non condizione sociale.*

Il riallineamento positivo dell'opinione, della percezione e delle preoccupazioni del pubblico nei confronti del cancro e dei milioni di persone che esso colpisce permetterà la piena realizzazione di ognuna delle seguenti priorità.

**Articolo III:** Le parti s'impegnano fortemente a costituire un ambiente ottimale per l'innovazione della ricerca sul cancro.

1. La conoscenza della biologia delle neoplasie e dei meccanismi fondamentali, attraverso i quali il cancro si manifesta e progredisce, è all'origine di ogni progresso che ha migliorato e che migliorerà il livello di cura e di qualità della vita di milioni di persone di tutto il mondo. Se il nostro obiettivo è quello di vincere la lotta contro il cancro, è opportuno accelerare l'identificazione di nuovi bersagli molecolari per l'identificazione, la diagnosi e il trattamento. Le parti concordano nel preparare il terreno per incentivare i finanziamenti alla ricerca di base da parte dei Governi e delle industrie; incoraggiare, difendere e stimolare le persone impegnate nel processo di innovazione e migliorare i mezzi grazie ai quali gli scienziati possono lavorare in libertà intellettuale, al fine di ampliare costantemente le frontiere delle conoscenze attuali.

2. La ricerca clinica è l'unico mezzo attraverso il quale la ricerca di base assume un'utilità per le vite umane. Le grandi scoperte nell'ambito della biologia molecolare o della genetica non possono avere impatti sulla prevenzione, sullo screening, sulla diagnosi e sul trattamento a meno che non vengano attentamente valutate e sviluppate tramite saggi clinici.

La ricerca nel settore clinico può inoltre fornire immediatamente informazioni a coloro che lavorano nel settore della ricerca di base. Questo tipo di ricerca "traslata", generalmente effettuata in istituti dotati di reparti clinici e laboratori di ricerca, è in grado di testare rapidamente le ipotesi formulate in laboratorio. Il feedback immediato proveniente dal reparto clinico ed ottenuto attraverso la

ricerca traslata può reindirizzare gli sforzi della ricerca di base e stimolare l'elaborazione di nuove e importanti ipotesi.

Malgrado la sua importanza, la ricerca clinica è costantemente messa alla prova non solo dalla mancanza di fondi, ma anche dallo scarso coinvolgimento dai parte dei professionisti del settore sanitario e delle istituzioni, oltre che dalla scarsa coscienza dei pazienti riguardo agli scopi e ai benefici della partecipazione agli studi clinici. Un'inadeguata armonizzazione legale e legislativa tra i diversi paesi significa inoltre che la realizzazione di test clinici - quelli strategicamente significativi e che sono dunque in grado di far progredire rapidamente la pratica clinica - può rivelarsi estremamente difficile e costosa.

*Le parti s'impegnano ad elevare la coscienza e l'impegno nella ricerca clinica in tutte le Istituzioni da essi rappresentate, e di cogliere ogni opportunità per rafforzare l'infrastruttura di ricerca internazionale.*

*Le parti s'impegnano inoltre a promuovere il riconoscimento universale del consenso informato - il processo attraverso il quale i pazienti sono dettagliatamente informati circa lo scopo, i rischi e i benefici di qualsiasi studio clinico. In tal modo, le parti cercano di permettere la realizzazione di sperimentazioni cliniche rapide, efficaci e complete in cui i pazienti siano coinvolti su basi etiche ed in cui essi partecipino con maggior livello decisionale.*

**Articolo IV:** Malgrado i notevoli progressi effettuati nella lotta contro il cancro, i risultati concernenti la sopravvivenza variano drammaticamente in tutto il mondo - non solo tra paese e paese e città e città, ma anche tra Istituti della stessa città. Grandi variazioni negli standard di trattamento e accesso ad un trattamento di buona qualità sono la causa di tali discrepanze - nonché della morbilità e della mortalità che ne derivano e che sono spesso ingiustificate.

Le parti riaffermano l'Articolo 25 della Dichiarazione Universale dei Diritti Umani, che stabilisce che ogni individuo "ha il diritto ad un tenore di vita

adeguato alla salute e al benessere di se stesso e della sua famiglia, compresi alimenti, vestiti, casa e assistenza medica". Le parti affermano inoltre che data l'ubiquità del cancro e il suo impatto sulla società, l'accesso ad un trattamento di buona qualità nell'ambito del contesto economico locale costituisce un diritto umano basilare. Le parti s'impegnano quindi a promuovere:

1. Pratica medica basata sull'evidenza scientifica e chiara definizione del concetto di "trattamento di buona qualità", secondo ogni evidenza scientifica attualmente disponibile.
2. Sviluppo sistematico di linee guida basate sulle migliori prove scientifiche disponibili in materia di prevenzione, diagnosi, trattamento e cura palliativa.
3. Definizione appropriata delle priorità di una cura anticancro di buona qualità ad ogni livello dell'assistenza sanitaria, compatibilmente con la gravità della malattia.
4. Incrementare le specializzazioni in campo oncologico ed una migliore integrazione del trattamento tra le discipline mediche.
5. Ampio accesso del paziente a test clinici di elevata qualità.

**Articolo V:** L'Organizzazione Mondiale della Sanità stima che entro il 2020 si manifesteranno ogni anno 20 milioni di nuovi casi di cancro. Il 70% dei pazienti vivrà in paesi che, tutti insieme, avranno accesso a meno del 5% delle risorse disponibili per il controllo di questa malattia. Nel nuovo millennio il cancro contribuirà in maniera sempre crescente ad aumentare il peso totale delle malattie presenti sul nostro pianeta, malgrado molti tipi di cancro siano prevenibili attraverso il controllo del consumo di tabacco, della dieta, delle infezioni e dell'inquinamento. Si stima ad esempio che le infezioni - molte delle quali potenzialmente prevenibili - siano la causa del 15% di casi di cancro in tutto il mondo e del 22% dei casi di cancro nei paesi in via di sviluppo. Il consumo di tabacco provoca ogni anno milioni di nuovi casi di cancro e di morti dovute ad esso, tanto nei paesi industrializzati quanto in quelli in via di sviluppo.

Questa realtà enfatizza il bisogno di sviluppare politiche pubbliche che sostengano la lotta contro il cancro e l'urgente dispiegamento delle conoscenze e delle tecnologie esistenti nella prevenzione di base al fine di arginare la marea crescente di questa malattia. Le parti s'impegnano a:

1. Sostenere attivamente e globalmente i programmi di prevenzione oncologica già esistenti e incoraggiare la consapevolezza e l'impegno nelle Istituzioni da essi rappresentate.
2. Identificare le opportunità di accelerare l'istruzione pubblica in materia di controllo del consumo di tabacco, delle infezioni, dei cambiamenti relativi alle abitudini alimentari e alla protezione ambientale.
3. Organizzare il sostegno dell'industria e dei governi per favorire la prevenzione oncologica quando possibile attraverso le tecnologie mediche.

**Articolo VI:** È un fatto incontestabile che l'identificazione precoce di uno o di tutti gli oltre 200 tipi di cancro porta a risultati migliori per il paziente. Caratteristica rilevante, il trattamento di alcune condizioni precancerose riconoscibili può permettere addirittura di prevenire il cancro. La paura e l'ignoranza rispetto ad alcuni segnali e sintomi di cancro o a condizioni precancerose sono tuttavia comuni, e per la sua natura può essere difficile e insidioso individuare precocemente il cancro senza un adeguato intervento di screening. È inoltre noto che l'identificazione precoce è particolarmente importante in caso di persone ad alto rischio a causa dello stile di vita, dell'ambiente, dell'occupazione, della predisposizione familiare o del non elevato stato socioeconomico. Il fatto che i primissimi sintomi del cancro possano essere confusi con malattie comuni enfatizza ancor più la necessità di uno screening efficace e di un'attenta diagnosi medica. La metodologia di screening per identificare in cancro può estendersi dalla semplice osservazione, dai test di laboratorio e dalle radiografie a esami più sofisticati, che hanno dimostrato efficacia nell'identificazione precoce di diversi tipi di cancro.

Oltre all'educazione alla prevenzione oncologica, l'attuazione di programmi di screening - nei limiti delle possibilità economiche - dovrebbe essere un obiettivo fondamentale al fine di ridurre il "peso" del cancro.

Per essere efficaci, i programmi di screening devono essere accompagnati dall'accesso ad un trattamento di elevata qualità.

Le parti s'impegnano ad accelerare lo sviluppo e l'applicazione diffusa di tecnologie di screening già testate o emergenti, in maniera tale che tutti ne traggano beneficio indipendentemente dalla razza o dallo stato socioeconomico.

**Articolo VII:** Il supporto attivo individuale o di gruppi di pazienti ha influito in maniera diretta e favorevole sulla lotta contro il cancro nei casi in cui disponeva delle giuste informazioni ed era radicato nella comprensione e nell'impegno nei confronti di una pratica medica di buona qualità basata sull'evidenza scientifica. Come principale detentore della posta in gioco della lotta contro il cancro, il paziente deve unicamente far convergere tutti i suoi sforzi sull'eliminazione della malattia e sull'utilizzo ottimale delle risorse per il beneficio delle persone a rischio di cancro e di coloro che vivono e lottano contro questa malattia.

*Le parti s'impegnano a rafforzare la posizione del paziente oncologico in quanto partner attivo nella lotta contro il cancro e promuoveranno attivamente i seguenti principi:*

1. Tutte le persone malate di cancro o che potrebbero potenzialmente ammalarsi dovrebbero avere un libero ed eguale accesso alle informazioni sull'origine e sulla prevenzione della malattia nonché sugli standard di individuazione, diagnosi e trattamento.
2. È essenziale una comunicazione aperta e collaborativa tra i malati di cancro, i professionisti nel settore della sanità e gli scienziati.
3. L'impegno di garantire il completo benessere dei pazienti implica non solo assistenza clinica ma anche informazioni e sostegno psicologico. I

professionisti del settore sanitario e i pazienti oncologici condividono la stessa responsabilità di soddisfare totalmente le esigenze dei malati.

4. I malati di cancro di tutto il mondo hanno l'opportunità di informarsi, organizzarsi ed acquisire influenza.

5. La comunità medica, riconoscendo il potere e i benefici derivanti da un pubblico attivo ed informato, contribuiranno a facilitare l'impegno della popolazione sia nei confronti del progresso scientifico che della pratica medica basata sull'evidenza scientifica.

6. Le comunità della ricerca medica, dell'industria e della politica considereranno i sostenitori dei pazienti informati come partner strategici molto importanti in ogni aspetto della lotta contro il cancro, compreso lo sviluppo degli standard di trattamento e sopravvivenza.

**Articolo VIII:** Migliorare la qualità della vita dei pazienti è un obiettivo di primaria importanza nella lotta contro il cancro. Sia il peso fisico che quello emotivo di questa malattia possono avere una forte incidenza, e sono inoltre spesso accompagnati dagli effetti collaterali del trattamento. Poiché i risultati clinici possono essere influenzati dallo stato generale del benessere sia mentale che fisico del paziente, il mantenimento della qualità della vita, compresi i meccanismi fisici, psicologici e sociali, dovrebbe costituire una priorità medica quanto umanitaria. È inoltre opportuno notare che mentre negli ultimi 20 anni sono stati fatti passi da gigante nell'elevare i tassi di curabilità, la maggior parte dei malati di cancro di tutto il mondo non sperimenta alcuna cura. Quando il cancro non è curabile, è ancora possibile ottenere dei significativi vantaggi a livello di qualità della vita attraverso trattamenti anticancro ottimali (chemioterapia, radioterapia) e cure di sostegno, comprese la gestione del dolore e palliazione per gli stati terminali.

Al fine di migliorare l'impegno nei confronti delle questioni relative alla qualità della vita nel corso della lotta contro il cancro, le parti s'impegnano a perseguire i seguenti obiettivi:

1. Miglioramento della cura generale dei malati di cancro, comprese le terapie di sostegno e palliative, attraverso modalità specifiche di trattamento.
2. Riconoscimento sia al livello clinico che politico dell'importanza della qualità della vita dei pazienti, indipendentemente dallo stadio della malattia e dalla prognosi, e della cura di sostegno ottimale per i pazienti oncologici, particolarmente nei casi in cui non c'è possibilità di guarigione.
3. Dare priorità alla qualità della vita come obiettivo chiave nella produzione di nuovi farmaci e anche nella cura del paziente.
4. Sviluppo continuo e aggressivo di strumenti scientifici volti a misurare e valutare la qualità della vita nell'ambiente clinico.
5. Educazione intensiva dei professionisti sanitari e dei pazienti sia per quanto riguarda sia la necessità che l'opportunità di controllare il dolore provocato dal cancro durante ogni fase della malattia e del trattamento. Il dolore può incidere profondamente sulla qualità della vita ed è spesso fortemente sottovalutato e scarsamente trattato, anche nei casi in cui esso potrebbe essere adeguatamente controllato.
6. Perseguimento di una migliore comprensione nonché trasformazione degli atteggiamenti nei confronti della morte, in maniera tale da assicurarsi che la fine della vita venga accettata come un'esperienza naturale che può e dovrebbe essere affrontata al livello medico, psicologico, emotivo e spirituale. Una cura ottimale del paziente in fase terminale deve essere efficace, umana e compassionevole.

**Articolo IX:** Riconoscendo l'aspetto molto variabile delle risorse e dello sviluppo dell'epidemiologia in tutto il mondo, le parti sono concordi nell'affermare che ogni singolo paese deve stabilire individualmente le strategie nazionali contro il cancro, a seconda delle necessità locali, ed utilizzare le risorse laddove esse hanno l'impatto maggiore.

Alcune nazioni potranno scegliere, ad esempio, di finanziare prioritariamente strategie contro le forme di cancro prevenibili e curabili, inclusi l'educazione

alla prevenzione e i trattamenti specifici. Altri paesi potranno rafforzare gli sforzi di immunizzazione come parte di una strategia globale di controllo del cancro o sostenere più energicamente l'utilizzo della chemioterapia adiuvante per migliorare i risultati in termini di sopravvivenza. Ognuna di queste necessità e opportunità variabili è stata recentemente definita dall'Organizzazione Mondiale della Sanità nel suo sforzo di attuare una strategia globale di controllo del cancro.

Risulta evidente che indipendentemente dalle contingenze economiche, una valutazione critica delle necessità della lotta contro il cancro, un'adeguata pianificazione e una definizione delle priorità possono ridurre in maniera considerevole l'impatto del cancro sia nei paesi industrializzati che in quelli in via di sviluppo.

Le parti s'impegnano a sostenere attivamente il concetto di pianificazione nazionale anticancro secondo le esigenze e le risorse locali. Promettono inoltre di stimolare tutte le comunità impegnate nella lotta contro il cancro ad assicurare che tale pianificazione dia sufficiente priorità alla crisi dovuta al cancro che si va profilando, e a cogliere tutte le opportunità per ridurre la morbilità e la mortalità di questa malattia.

**Articolo X:** Poiché il cancro non conosce frontiere, e i singoli paesi non possono affrontare le proprie sfide isolatamente, è opportuno stabilire un nuovo atteggiamento cooperativo alla ricerca, al supporto attivo sul tema cancro, alla prevenzione e al trattamento.

Le parti s'impegnano a sviluppare nuove e globali alleanze e reti di rapporti volti a perseguire gli obiettivi di questa Carta. S'impegnano inoltre ad assicurare che gli obiettivi di detta Carta non siano accantonati dopo la firma, nei seguenti modi:

1. Riconoscendo la dichiarazione di tutte le istituzioni "ad hoc" che definisce il 4 febbraio "Giornata Mondiale Del Cancro" in modo tale che ogni anno la Carta di Parigi sia nelle menti e nei cuori delle persone di tutto il mondo.

2. Istituito commissioni permanenti che stileranno relazioni annuali, segnalando i progressi rispetto ad ognuno degli articoli della Carta.
3. Formando una rete globale dei gruppi di sostegno per incoraggiare un sostegno radicato degli articoli della Carta nell'ambito delle loro comunità.
4. Creando un'organizzazione di ricerca globale formata dalle principali società professionali del mondo. L'attività di tale gruppo sarà volta a garantire che le attuali conoscenze siano condivise oltre i confini, che i vuoti della ricerca siano identificati e che le aree più promettenti vengano esplorate.
5. Chiamando a raccolta un milione di persone provenienti da ogni parte del mondo per firmare la Carta di Parigi entro il 2001, mostrando così la loro volontà di mobilitarsi in favore dei malati di cancro.

### **1.3 La qualità della vita del paziente oncologico**

La Food and Drug Administration, dal 1985, ha stabilito che i nuovi farmaci antitumorali, per essere immessi sul mercato, dovessero fornire un effetto vantaggioso in termini di sopravvivenza oppure di miglioramento della Qualità di Vita dei pazienti. Negli ultimi anni, grazie ai progressi in medicina, si è riuscito ad allungare la vita di molti pazienti oncologici. Va posta l'attenzione, tuttavia, non solo alla durata della vita ma anche alla qualità, in quanto il dolore e la *fatigue*, causati in maggior misura dai trattamenti antitumorali (chemio e radioterapia), hanno una notevole influenza sull'indipendenza e sullo stato psichico del malato e della sua famiglia.

La percezione soggettiva del proprio stato di salute e l'effetto che un intervento medico può avere sulla qualità della vita (Quality of life, QOL) sono di particolare interesse per i clinici ed anche per i pazienti. Questa valutazione concorre quindi insieme alle valutazioni di efficacia clinica alla misura della qualità di cura. La misurazione della QOL può rappresentare una delle finalità etiche primarie di uno studio clinico. In questo caso si tratta di una effettiva necessità di valutare questo parametro come fattore che condiziona il problema considerato; ad esempio la scelta tra la ospedalizzazione e la cura a domicilio del paziente pediatrico, la necessità di un supporto psicologico, la valutazione di un trattamento farmacologico, ecc. La scelta dello strumento per la misurazione della QOL rappresenta il problema principale. E' facile capire come sia estremamente complesso trasferire in un unico valore quantitativo un parametro che è difficilmente oggettivabile. In primo luogo è importante distinguere le diverse prospettive da cui questa misurazione può essere condotta: da un lato quella del paziente e dall'altro quella di un osservatore esterno. La modalità più completa per eseguire questa misurazione è costituita sicuramente dai questionari che valutano i vari domini e le loro componenti con punteggi diversificati. I questionari possono essere diversi nella forma

(breve o più dettagliato, di autosomministrazione o con intervista diretta o telefonica), costruiti diversamente a seconda del tipo di interlocutore (paziente, medico, personale di assistenza) e inoltre possono essere generici o specifici per patologia. L'obiettivo etico che la moderna medicina si prefigge è quello di imprimere caratteristiche di globalità ad un'assistenza che deve rispondere ai bisogni dell'infanzia, anche dal punto di vista umano. Le attuali strategie terapeutiche sono finalizzate al conseguimento di un'assistenza "globale" a favore di bambini e adolescenti malati ai quali può non bastare la terapia medica o chirurgica. In questi casi, infatti, è necessario anche il sostegno psicologico, da garantire ai bambini, ma anche ai loro genitori, mediante attività ludiche, ricreative, educative, e di supporto scolastico, organizzate negli ospedali ed istituti di ricovero per l'infanzia. Contestualmente deve essere totale l'impegno di tutti gli operatori per migliorare i livelli assistenziali delle strutture ospedaliere "dedicate" all'infanzia.

Nel 2004, il National Institute di Bethesda ha effettuato uno studio sulla qualità di vita di centinaia di pazienti oncologici: dalla ricerca è emerso che più della metà degli adulti è costretto ad abbandonare il lavoro, mentre il 35% deve ridurre le proprie responsabilità per lo stress emotivo. I bambini, invece, sono costretti a rinunciare ad attività sportive e in alcuni casi non possono frequentare l'asilo o la scuola (Rustøen et al., 1998; 2005). E' quindi importante ed etico per i medici interessarsi dello stato emotivo dei bambini. Per esempio, la pet-therapy non può certo guarire un bambino ma di sicuro allevia la sua sofferenza e rende la sua degenza meno sofferta. Anche in ambiente ospedaliero è necessario ed etico far vivere ai piccoli pazienti momenti stimolanti attraverso i quali il bambino possa rielaborare l'esperienza della malattia attraverso nuovi canali di comunicazione che si creano spontaneamente nell'interazione bambino-animale (Brodie et al., 1999). Nella cura del malato gli aspetti relazionali e di sostegno diventano di estrema importanza sia per aiutare il piccolo paziente ad adattarsi alla sua nuova realtà

sia per migliorare la sua partecipazione alle terapie migliorandone, in tal modo, la qualità di vita nell'ospedale e nella società. Inoltre, oggi, sempre maggior risalto deve essere dato al supporto psicologico della famiglia; per affrontare problemi legati alle fasi depressive che coinvolgono genitori e fratelli/sorelle di un bambino affetto da patologia oncologica, che hanno dimostrato di essere fattori rilevanti sia nella qualità di vita del bambino malato sia nello sviluppo di patologie a carattere neurologico e oncologico in chi l'assiste.

## **1.4 La Leucemia linfoblastica acuta: una neoplasia ematologica frequente in età pediatrica**

Nei bambini, oggi, si segnalano sempre più frequentemente neoplasie ematologiche, ossia malattie maligne che originano da cellule del sangue: leucemie linfoide, leucemie mieloidi, linfomi di Hodgkin e linfomi non-Hodgkin. Tra queste certamente la leucemia linfoblastica acuta (LLA) è la malattia tumorale più frequente in età pediatrica con un rapporto maschi/femmine pari a 4:1 (Sallan, 2006).

Anche se nella grande maggioranza delle LLA non si riconoscono cause genetiche o ambientali, probabilmente la leucemia si sviluppa per una combinazione tra le cause ambientali, la presenza di una suscettibilità genetica e l'azione di oncogeni tumorali (Gao et al., 2005; Greaves, 2006).

La leucemia linfoblastica acuta trae origine dalla trasformazione neoplastica di un precursore della linfoitopoiesi, B o T, o di una cellula staminale pluripotente. La trasformazione neoplastica genera una progenie di blasti linfoide leucemici (linfoblasti) che sostituiscono la normale emopoiesi midollare, circolano nel sangue periferico e infiltrano organi e tessuti (linfonodi, milza, fegato, sistema nervoso centrale, testicoli e ossa) (Tura e Baccarani, 2007). La malattia, quindi, deriva da una progressiva sostituzione delle cellule normali con blasti leucemici, fino a giungere a una condizione di insufficienza midollare quando il parenchima midollare viene completamente sostituito dalle cellule blastiche. Le stesse cellule blastiche possono essere riscontrate anche nel sangue periferico. Soggetti con LLA presentano una forte leucocitosi ( $>25.000/\mu\text{L}$ ), dominata dai blasti che possono raggiungere valori  $>80\%$  nel sangue periferico, anemia, piastrinopenia e granulocitopenia. A livello midollare vi sono circa il 50-90% di blasti leucemici, mentre gli elementi normali sono scarsissimi o assenti (Della Corte e D'Ippolito, 1999).

La diagnosi e la classificazione della LLA si basano sull'analisi morfologica, citochimica, immunofenotipica, citogenetica e genetica. Tali procedure consentono non solo un corretto inquadramento clinico-biologico della leucemia, ma aiutano anche nella scelta terapeutica.

In base a criteri morfologici, citochimici e al fenotipo immunologico espresso è possibile suddividere le LLA in diversi sottotipi. La classificazione FAB (Franco-Americana-Britannica), presentata nel 1976 da un gruppo di sette ematologi francesi, statunitensi e britannici, distingue le LLA in tre gruppi secondo la morfologia dei blasti: la L1 che è caratterizzata da cellule di piccole dimensioni, a nucleo rotondeggiante, cromatina nucleare dispersa, nucleoli poco evidenti e citoplasma scarso e poco basofilo; la L2 che è caratterizzata da cellule morfologicamente eterogenee, a nucleo irregolare, cromatina finemente dispersa o addensata grossolanamente, con uno o più nucleoli e citoplasma basofilo a volte scarso, a volte abbondante; la L3 (tipo Burkitt) che è caratterizzata da grosse cellule rotondeggianti con nucleo regolare, cromatina addensata omogeneamente, nucleoli ben evidenti, citoplasma abbondante, basofilo e con presenza di vacuoli (Bennett et al., 1976).

Dal punto di vista citochimico è possibile differenziare le LLA dalle leucemie mieloidi acute (LMA). Le cellule di LLA sono negative alle reazioni della perossidasi e del Sudan nero e sono positive all'acido periodico di Schiff (PAS), alla fosfatasi, alla  $\alpha$ -naftilacetato esterasi e alla  $\beta$ -glicuronidasi. Sebbene lo studio citochimico rappresenti una fase importante della diagnosi differenziale delle leucemie acute linfoidi e mieloidi, nel 90% dei casi è sufficiente uno studio morfologico dei blasti.

In aggiunta agli studi morfologici e citochimici, è fondamentale la caratterizzazione immunofenotipica mediante citometria a flusso. Essa consente di evidenziare simultaneamente, mediante l'utilizzo di anticorpi monoclonali, diversi antigeni di membrana e intracellulari associati a un particolare citotipo leucemico. Questa tecnica risulta di particolare utilità per la

sua elevata sensibilità e rapidità sia nella fase diagnostica che nel monitoraggio della terapia. L'immunofenotipizzazione attraverso la citofluorimetria è essenziale per fare una diagnosi certa di LLA e soprattutto per distinguere i vari sottotipi che saranno trattati con un diverso programma terapeutico (Pui, 2010).

Ogni anno, in Europa, vengono diagnosticati circa 10.000 nuovi casi di LLA. La LLA rappresenta circa il 15% delle leucemie nell'adulto. Negli adulti con più di 15 anni, la metà dei casi ha meno di 50 anni e sono rari quelli con più di 70 anni. In età pediatrica, la LLA rappresenta il 30% di tutti i tumori e l'80% delle leucemie. Il picco di incidenza si registra nei bambini con età compresa tra i 2 e 6 anni (Ferlay et al., 1999; 2001).

Nell'88% dei casi, le leucemie linfoidi del bambino sono di origine B, mentre nel 12% sono T. La prognosi nei bambini è influenzata da diversi fattori identificabili all'esordio della malattia e differenziabili a seconda del tipo B o T: per i pazienti con forma B, l'età compresa tra 1 e 9 anni e un numero di globuli bianchi inferiore ai 50.000/ $\mu$ L la prognosi è buona; la forma T è, invece, considerata sempre "ad alto rischio", in tal caso, l'età e il numero dei globuli bianchi nel sangue hanno poco significato. Nei bambini affetti da leucemia ad alto rischio si utilizzano protocolli terapeutici complessi che prevedono l'utilizzo contemporaneo di 5 o 6 farmaci. Il trattamento di una LLA è tipicamente suddiviso in più fasi: induzione, consolidamento, mantenimento e profilassi del sistema nervoso centrale (SNC). In linea generale, la terapia d'induzione, che ha lo scopo di ottenere una remissione morfologica completa in poche settimane, in altre parole una normalizzazione del mielogramma, è classicamente costituita dall'associazione di più farmaci quali vincristina, prednisone ed antracicline (daunorubicina o idarubicina o adriamicina) che ne rappresentano la "spina dorsale"; è comune associare a questi farmaci anche l'uso di L-asparaginasi e, per via intratecale, di methotrexate per la profilassi del SNC; le dosi e la combinazione dei farmaci

sono diverse in base ai protocolli di terapia che vengono utilizzati. Nelle terapia di consolidamento si utilizzano farmaci come la citosina-arabina o il methotrexate ad alto dosaggio sfruttando anche la loro capacità di passare la barriera ematoencefalica per la profilassi del SNC. La terapia di mantenimento standard è costituita dall'uso di farmaci come la 6-mercaptopurina ed il methotrexate associati a reinduzioni mensili con vincristina e prednisone per la durata complessiva di 2-3 anni. I pazienti che raggiungono una risposta immunologica o molecolare dopo sei settimane di trattamento sono considerati a basso rischio di recidiva; mentre i bambini con una mancata risposta vengono considerati ad alto rischio di recidiva e quindi candidati come unica possibilità ad una procedura trapiantologica con cellule staminali da donatore compatibile, nel caso sia possibile trovare un donatore compatibile (Pullen et al. 1999; Willemse et al. 2002; Pui and Williams, 2006; Fielding, 2008; Bassan and Hoelzer, 2011).

## **1.5 Chemioterapia: “Morte per trattamento medico?”**

Fin dai tempi di Ippocrate (470-375 a.c.) è noto che nella cura del paziente bisogna cercare sempre di eliminare o ridurre il dolore, evitandogli al tempo stesso il più possibile di causare effetti collaterali e/o danni, utilizzando se possibile rimedi naturali. Infatti, il primo insegnamento, per importanza, che il padre della medicina dettava ai suoi allievi era “primum non nocere”, ovvero agire sempre senza arrecare danno al malato o comunque il minore possibile.

Oggi, uno dei metodi più diffusi per la cura dei tumori è una miscela di citostatici (la chemioterapia) che sembra non rispettare tale principio.

La chemioterapia è una cura invasiva e tossica che si presume elimini le cellule cancerose; tuttavia la sua feroce azione chimica non è in grado di distinguere queste ultime da cellule e tessuti circostanti sani. Per semplificare, le chemioterapie, che prevedono la somministrazione di un “cocktail” di citostatici, basano la loro efficacia sulla maggior “affinità metabolica” dei componenti chemioterapici nei confronti delle cellule malate piuttosto che per quelle “sane”. Tuttavia, la funzionalità dei chemioterapici risulta collegata non ad una vera selettività del principio attivo nei confronti delle cellule malate, ma alla maggior quantità di composto tossico che queste riescono ad assorbire dai fluidi corporei rispetto alle loro consorelle “sane”. Quello che “fa la differenza” è la velocità del metabolismo. Le cellule malate sono in genere molto più attive della maggior parte delle “sane” per cui assorbono una maggiore quantità di citostatico rispetto alle cellule sane e, in teoria, dovrebbero morire con maggior facilità. Le terapie radianti o radioterapie, invece, rendono incapace la cellula neoplastica di replicarsi o distruggendola o alterandone i meccanismi di funzionamento. Il bersaglio biologico delle radiazioni è il DNA contenuto nel nucleo delle cellule neoplastiche che presentano meccanismi di riparazione del danno meno efficienti rispetto alle cellule sane. Le radioterapie cercano di uccidere le cellule tumorali attraverso il

bombardamento con radiazioni provenienti da sorgenti esterne (es. cobaltoterapia), oppure facendo assorbire alle cellule neoplastiche, attraverso la circolazione sanguigna, un composto radioattivo in quantità letale. Il bombardamento con radiazioni uccide tutte le cellule della zona trattata che è quella in cui si sviluppa la massa tumorale; la somministrazione di composti radioattivi è, invece, un meccanismo d'azione assimilabile, per obiettivi ed effetti "sistemici", a quello delle chemioterapie. Se le cellule tumorali sono molto numerose, la radioterapia perde in parte o completamente la sua efficacia. Il trattamento radioterapico deve essere allora integrato con la chirurgia e/o la chemioterapia. Le ripetute somministrazioni di chemioterapia e di radiazioni uccidono gradualmente l'intero organismo. Purtroppo, però, esistono anche cellule staminali tumorali in stato di "latenza" (dette anche "quiescenti", cioè in una sorta di letargo e pertanto con un metabolismo praticamente fermo) localizzate in tessuti poco "irrorati" che sfuggono alla "chemio", mentre purtroppo muoiono avvelenate molte cellule sane e particolarmente le più "attive" dal punto di vista metabolico. Per cui, la presenza di cellule staminali tumorali in fase quiescente impedisce la totale eradicazione della neoplasia con le chemio e radioterapie.

### **1.5.1 La Malattia Minima Residua (MMR)**

La quota di cellule neoplastiche ancora presente dopo la terapia (chemio e radioterapia), quantizzabile con tecniche altamente sensibili come la citofluorimetria, viene definita Malattia Minima Residua (MMR). La malattia minima residua è un importante fattore predittivo di recidiva (ricaduta) nelle neoplasie oncoematologiche (Campana, 2004). Quando con la terapia si riesce a ridurre la malattia minima residua (percentualmente a valori prossimi allo zero), si ha un' alta probabilità che la malattia non si presenti più anche in assenza di terapia. Se, invece, la malattia minima residua rimane quiescente (valori percentuali di cellule leucemiche più alti) appena si sospende la terapia, la malattia si ripresenta, con il "risveglio" delle cellule staminali tumorali che

proliferano in un organismo ormai debilitato dalla terapia. Se è vero quindi che la chemioterapia è spesso efficace nella riduzione e talora scomparsa del tumore in quanto agisce sulla progenie della staminale tumorale, bloccando la crescita tumorale finchè dura la terapia, dati recenti hanno dimostrato che cellule già mature, già differenziate, possono tuttavia acquisire caratteristiche di staminalità, diventando quindi capaci di eludere la terapia, in fase quiescente, restando capaci di “risvegliarsi” e produrre nuove cellule tumorali. Quindi, anche quando il paziente va in remissione non si è in grado di dire se da qualche parte c’è una cellula quiescente/dormiente, e dunque se si tratta di una remissione a lungo termine o di una eradicazione completa. Certo è che minore è il numero delle cellule staminali tumorali e minore è la probabilità che esse si risvegliino (Sagar et al, 2007).

### **1.5.2 Considerazioni etiche sulla chemioterapia**

Una conseguenza secondaria della chemioterapia è la progressiva debilitazione del sistema immunitario che è reso incapace di ristabilire le proprie funzioni di protezione dell’organismo dalle malattie comuni, ciò è causa frequente di esito infausto. Infatti, molto spesso, i pazienti oncologici, in seguito a trattamenti con chemioterapia, muoiono a causa di infezioni opportunistiche derivate dall’inefficienza del sistema immunitario, determinata dalla natura tossica e aggressiva dei farmaci. In tal caso, secondo alcuni, si potrebbe parlare di “morte per trattamento medico” non “eticamente accettabile”. D’altro canto gli stessi effetti collaterali della chemioterapia e della radioterapia sono assai vari: vertigini, calo sensoriale, nausea, diarrea, caduta dei capelli, decolorazione della cute, menomazioni audio/visive, mancanza di appetito e conseguente malnutrizione, lesioni permanenti e malfunzionamento degli organi, emorragie interne, danni ai tessuti e infiltrazione cardiovascolare (Ransom, 2002). In età pediatrica, inoltre, in seguito ai trattamenti chemio e radioterapici, nella femmina l’unica opzione possibile per far fronte alla compromissione della futura fertilità è data dalla crioconservazione di frammenti di tessuto ovarico e

il successivo autotrapianto, procedura che è tuttavia ancora in fase sperimentale. (Serebrovska et al, 2006; Anderson et al., 2008, Levine et al., 2010). Per i maschi in fase pre-puberale la schermatura delle gonadi durante la radioterapia può essere utile, ma solo per campi selezionati. La crioconservazione di tessuto testicolare, invece, è ancora sperimentale e i potenziali usi futuri includono la maturazione in vitro degli spermatogoni in spermatoцитi o il trapianto di cellule germinali nel tessuto testicolare (Jeruss, 2009). Nell'effettuare il prelievo di tessuto ovarico nella femmina e di cellule germinali dal tessuto testicolare nel maschio ci si chiede, però, se sia etico posticipare la terapia anticancro al fine di effettuare il prelievo, considerando che c'è anche la possibilità di trasferire con il successivo autotrapianto cellule neoplastiche.

Sulla chemioterapia come metodo di cura antitumorale, i pareri sono discordanti nello stesso campo medico. Per alcuni rappresenta l'unica terapia affidabile, mentre per altri è ritenuta dannosa e talora inutile.

Nel marzo del 2005 al Senato australiano è stata presentata una "Inchiesta sui servizi e sulle opzioni di trattamento di pazienti oncologici", prodotta dal Cancer Information & Support Society, del St. Leonards di Sydney. Secondo tale inchiesta, negli anni '90, alcuni scienziati del McGill Cancer Center di Montreal in Canada, inviarono a 118 medici, esperti di cancro ai polmoni, un questionario per determinare quale grado di fiducia nutrissero nelle terapie da loro applicate, nel caso essi stessi avessero sviluppato la malattia. Risposero 79 medici e 64 di loro dichiararono che non avrebbero acconsentito a sottoporsi ad un trattamento che contenesse Cisplatino (un chemioterapico molto utilizzato a base di platino). Mentre 58 dei 79 reputavano che tutte le terapie sperimentali in questione fossero inaccettabili a causa dell'inefficacia e dell'elevato grado di tossicità. Un risultato eclatante: l'81% degli oncologi intervistati, in caso di tumore, non si sarebbero fatti somministrare un chemioterapico, mentre il 73%

di essi reputavano addirittura le “chemioterapie inaccettabili per l’elevato grado di tossicità” (Pamio, 2008).

Oggi, tuttavia, molti oncologi raccomandano la chemioterapia praticamente per qualsiasi tipo di tumore, con una fiducia non scoraggiata dagli insuccessi, pressoché costanti (Braverman, 1991). Infatti, nonostante il diffuso impiego della chemioterapia negli ultimi anni, il numero di morti fra i pazienti oncologici è ancora elevato. Non vi è, inoltre, alcuna prova che nella stragrande maggioranza dei casi la chemioterapia prolunghi le aspettative di sopravvivenza e questa è la grande menzogna su questa terapia.

Ciò che è noto, invece, è che il costo medio dei cicli di chemioterapici varia sensibilmente in base ai farmaci/citostatici utilizzati e si aggira su svariate decine di migliaia di euro per vari cicli (fino a 50.000 euro).

È stato stimato che ogni anno, nel Regno Unito viene diagnosticato il cancro a circa 200.000 persone, di cui circa 152.500 muoiono. Negli Stati Uniti il tasso annuale di decessi per cancro è di circa 547.000 individui. Tutti questi decessi vengono registrati come dovuti al cancro, ma in realtà non tutti sono attribuibili alla malattia in sé; gran parte di essi dovrebbero essere registrati come “morte per trattamento medico”. Quest’ultima ipotesi diventa ancora più fondata, se si tiene in considerazione che le cure convenzionali consistono quasi interamente in radioterapia, chemioterapie e somministrazioni a lungo termine di farmaci/citostatici tossici, cure ben note per i loro effetti collaterali (Ransom, 2002). Per tali motivi, alcuni medici, oggi, si chiedono se sia eticamente corretto sottoporre i pazienti a terapie così aggressive, soprattutto nei malati terminali, che peggiorano sensibilmente la loro qualità di vita.

Sulla base di tali considerazioni, l’interrogativo sulla eticità di terapie così aggressive si va sempre più estendendo nella classe medica sensibile al benessere del paziente, e diventa, quindi, un imperativo etico orientare la ricerca verso terapie alternative.

## **1.6 L'industria farmaceutica e il conflitto di interessi**

In mezzo secolo, i farmaci hanno cambiato la storia naturale, cioè il “normale” decorso di molte malattie. Quanto dell'allungamento delle prospettive di vita sia dovuto alla medicina e quanto al miglioramento delle condizioni di vita e alimentazione, è oggi oggetto di accesa discussione. Sicuramente l'industria dei farmaci ha mutato in profondità non solo le condizioni di salute degli individui, ma anche il loro modo di “pensare la malattia”. Infatti, la stessa parola “malattia”, perlomeno nei paesi industrializzati, ha perso in gran parte dei casi il significato terrorizzante che aveva prima. Un po' come la parola “fame” che da noi evoca più spesso solo una sensazione di piacevole languore anziché l'atavico tormento dell'umanità.

Tuttavia, c'è anche delusione e sfiducia nei confronti delle aziende farmaceutiche quando ci si scontra con la realtà delle molte malattie oggi ancora incurabili. Mai, nell'ambito delle attività produttive una branca manifatturiera è stata oggetto di aspettative così grandi, e nello stesso tempo, di critiche tanto spietate quanto l'industria farmaceutica. Specialmente dopo la seconda guerra mondiale, tra la gente si era diffusa l'illusione che la scienza medica potesse trovare una cura per tutte le malattie, da quelle più comuni alle patologie a prognosi più infausta. Oggi, se da un lato ci si aspetta che l'industria farmaceutica materializzi il sapere scientifico in farmaci pronti per l'uso e disponibili nella farmacia più vicina; dall'altro è cresciuto un forte odio nei confronti delle aziende farmaceutiche che perseguono i propri obiettivi economici più che dedicarsi alla salute pubblica. Le critiche più accese all'industria del farmaco sono sul piano morale. Alcune pratiche commerciali sono considerate intollerabili per un'attività produttiva che proclama di lavorare con funzionalità etiche. Le industrie farmaceutiche, infatti, non si comportano diversamente da tutte le altre fabbriche, l'obiettivo primario è costituito dai profitti. Per di più, le motivazioni etiche su cui dovrebbe basarsi

l'industria farmaceutica, cioè l'alta scienza come obiettivo di salute, diventano esse stesse strumenti di marketing. La scienza si presenta come "essere per il progresso", ma nel capitalismo diventa "essere per il plusvalore". Infatti, l'immagine etica che le industrie farmaceutiche hanno cercato di costruirsi si ritorce contro di loro. Vi sono innumerevoli patologie che ancora oggi vengono trascurate dalla ricerca farmaceutica perché poco diffuse per cui gli eventuali farmaci avrebbero mercato ristretto e uno scarso ritorno economico. Oppure malattie, come la malaria, molto diffuse ma che colpiscono consumatori "indigenti". Inoltre, la scoperta di un nuovo farmaco antitumorale potrebbe danneggiare gravemente il business farmaceutico dei chemioterapici la cui diffusione costituisce un vero business per l'industria farmaceutica. Ne risulta, quindi, un imperativo comune dei colossi farmaceutici che è quello di insistere con farmaci costosi che sicuramente troveranno riscontro nell'alta capacità di spesa delle persone malate tutelate dai sistemi sanitari nei ricchi mercati occidentali (Casavola, 2009; 2011).

Le aziende farmaceutiche, inoltre, incentivano "il conflitto di interesse". In termini generali possiamo dire che si ha un conflitto di interesse quando ci si trova in una condizione nella quale il giudizio professionale riguardante un interesse primario (la salute del paziente) tende ad essere indebitamente influenzato da un interesse secondario (guadagno economico o vantaggio personale). Oggigiorno, sta crescendo la pressione economica che le industrie farmaceutiche esercitano sui medici e sui gruppi professionali e sta aumentando il contrasto tra il conseguimento del proprio interesse e il consolidamento dei principi etici. Diventa quindi sempre più attuale il conflitto di interesse che può colpire a tutti i livelli, dal medico generico al grande specialista, dal ricercatore al direttore di una importante rivista, dal presentatore di una breve comunicazione a un congresso regionale, all'opinion-leader che ricava cospicui finanziamenti da cicli di conferenze, dal piccolo gruppo di colleghi alla grande associazione professionale. I medici molto

spesso sono sottoposti a pressioni di tipo commerciale che possono distoglierli dal loro impegno primario, la cura del paziente, e influenzare in modo indebito le loro scelte professionali nel campo della diagnostica e della terapia. Il pericolo, però, è che tali interferenze possano minare la fiducia dei pazienti, nel momento in cui si rendono conto che alcune decisioni possono essere condizionate da un interesse extraprofessionale. Perciò anche se il conflitto di interesse non può essere abolito con un decreto legge né con un decalogo di norme etiche, è necessario sottoporre all'attenzione dei medici queste riflessioni e ciò non significa demonizzare i rapporti tra industria e medici, ma sfrondarli dai possibili pericoli, insiti in regole poco chiare e non controllabili. La correttezza e la trasparenza dei rapporti non potrà che giovare all'immagine dei professionisti e a quelle industrie che si caratterizzano per elevati livelli di serietà e rigore (Blumenthal, 1992; Pitt and Gostin, 1994; Boyd et al., 1997).

## 1.7 La sperimentazione di un nuovo farmaco

Il percorso che va dalla scoperta di un farmaco alla sua commercializzazione è molto lungo, mediamente 16 anni, ed è caratterizzato da più fasi, in ognuna delle quali vengono esaminate più caratteristiche per validarne l'efficacia e soprattutto la sicurezza. Queste fasi hanno un ordine ben preciso e se una di esse non viene superata con successo, non si procede oltre e il percorso viene arrestato (Fig.1).

Un farmaco è costituito da piccoli gruppi funzionali detti farmacofori che sono in grado di intervenire su un bersaglio (target) ben preciso per modificare, interrompere o evitare il decorso di una malattia.

Inizialmente, i “nuovi farmaci” vengono sottoposti a tests pre-clinici *in vitro* in cui tali sostanze vengono testate su colture cellulari (modelli *in vitro*) per verificarne dapprima la biocompatibilità e l'assenza di citotossicità.

In seguito, vengono effettuati altri tests più complessi su modelli animali (modelli *in vivo*) per verificare le reazioni dell'organismo vivente.

In Italia, la legge che regola la sperimentazione animale è il decreto legislativo n.116 del 27/1/1992, attuazione della Direttiva n.86/609/CEE, che si rifà alla “legge delle 3 R” (Replacement, Reduction, Refinement), elaborata nel 1959 da Russell e Burch. Per rendere più eticamente accettabile la sperimentazione sull'animale sarebbe necessario considerare la possibilità di sostituire (Replacement significa sostituzione), là dove possibile, la metodica di sperimentazione sull'animale con altre metodologie altrettanto efficaci, ad esempio rimpiazzare l'uso degli animali con tecniche *in vitro*. Inoltre, si auspica di ridurre (Reduction significa riduzione) il numero degli animali necessari ad eseguire un determinato saggio, pur ottenendo lo stesso livello di informazione e di raffinare i metodi per ridurre la sofferenza e lo stress imposti all'animale durante l'esecuzione di un saggio (Refinement significa raffinamento). Una cosa abbastanza interessante da tenere in considerazione è

che il risultato di biocompatibilità e di efficacia del farmaco nell'animale non sempre comportano necessariamente una buona efficacia anche nell'uomo. I motivi di una non costante collimazione tra i risultati ottenuti sull'animale e dell'uomo sono spesso legati a differenze di farmaco- o tossico-cinetica (assorbimento, distribuzione, escrezione e metabolismo) tra le specie, infatti la velocità dei processi metabolici può condizionare la durata e l'intensità dell'effetto. Un altro motivo di critiche e difficoltà nell'estrapolazione dei dati dell'animale all'uomo, risiede nella differenza di sensibilità tra specie e tra dosi necessarie alla determinazione di effetti farmacologici e tossicologici nell'animale e nell'uomo. Del resto, è da considerare che notevole diversità di effetti per un determinato composto possono aversi anche nell'uomo.

Accertato un certo grado di sicurezza per il farmaco, grazie a esperimenti su animali, si passa ai tests clinici sull'uomo divisi in tre fasi distinte e successive: fase I, farmacologia clinica, fase II, studio di efficacia e fase III, studio multicentrico. La cosa che caratterizza maggiormente queste tre fasi è il numero di pazienti (volontari) che, da circa una quarantina nella prima fase, aumenta fino anche a decine di migliaia nella terza fase.

Nella fase I vengono avviati gli studi sui meccanismi di farmacocinetica, farmacodinamica, metabolismo e biodisponibilità con apparecchiature sofisticate. Si valutano anche i possibili effetti del farmaco a carico di altri organi e altre funzioni dell'organismo, i cosiddetti effetti collaterali: capita spesso infatti che un dato principio attivo agisca su più organi, a volte in modi diversi. In questo stadio è possibile apportare gli ultimi ritocchi alla molecola del principio attivo, sia in termini di composizione chimica che di processo di produzione: se dopo questa fase vengono apportate modifiche alla molecola e/o al processo produttivo, il prodotto viene sottoposto di nuovo a tutte le sperimentazioni precliniche e cliniche.

Nella fase II, terminata l'analisi farmacologica, si passa a determinare l'efficacia terapeutica del nuovo farmaco. In alcuni selezionati centri

ospedalieri dotati di comitati etici di controllo, che devono autorizzare sia il protocollo generale di sperimentazione che ogni singolo passo della sperimentazione stessa, si realizzano una serie di studi sul campo, che comprendono sia un ulteriore affinamento dell'analisi sulla tossicità e sugli effetti collaterali, sia degli studi in doppio cieco su pazienti (i pazienti non sanno se il farmaco somministrato sia quello vero o un placebo); ciò viene effettuato per misurare di quanto l'effetto del nuovo farmaco sia superiore all'effetto placebo, considerato come una specie di "zero farmaceutico". Ogni paziente che partecipa alla sperimentazione deve essere informato puntualmente sugli effetti del nuovo farmaco e sui potenziali rischi previsti, e firmare una dichiarazione di consenso informato.

Nella fase III, terminato con successo lo studio dell'efficacia clinica del nuovo farmaco (numero di pazienti trattati con successo con il farmaco nettamente superiore a quelli trattati con il placebo), si continua la sperimentazione allargando il numero di centri, cioè di ospedali e cliniche coinvolte, con l'obiettivo di confermare l'efficacia, affinare i dosaggi e la formulazione scelta, valutare il valore terapeutico, meglio definire il rapporto sicurezza/efficacia, e superare il problema della variabilità individuale, cioè il problema delle possibili diverse reazioni su pazienti diversi. Terminata questa fase di sperimentazione si fa domanda di registrazione presso il Ministero della Sanità, per ottenere l'autorizzazione alla commercializzazione della nuova specialità farmaceutica (il farmaco vero e proprio).

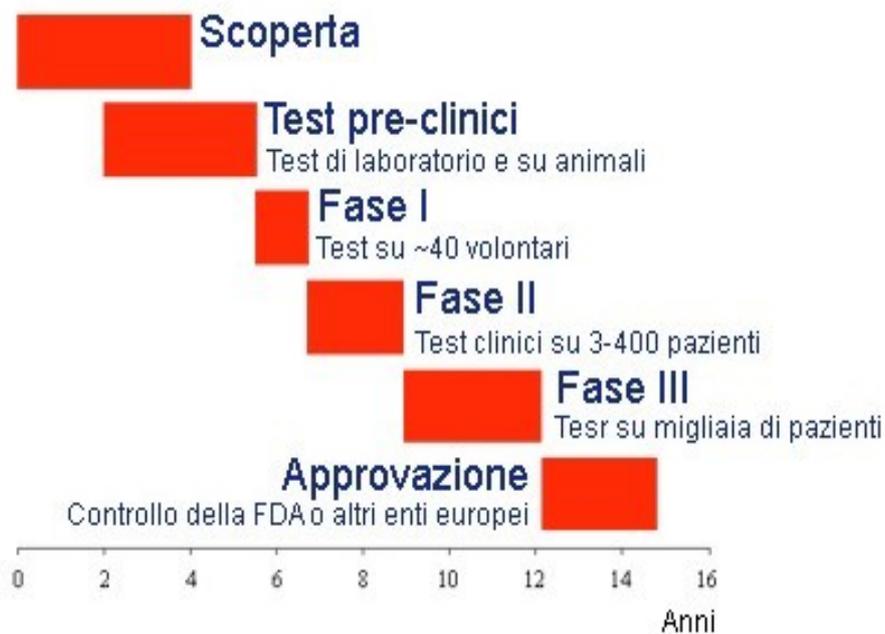
Durante le prime fasi della sperimentazione clinica (fase III compresa), il farmaco non è ancora in vendita ma può essere usato soltanto negli ospedali e soltanto sui pazienti selezionati che partecipano allo studio.

Infine, se tutte le fasi si sono concluse con un successo, il farmaco viene approvato e messo in vendita nelle farmacie, ma il percorso di valutazione non è finito: anche dopo la commercializzazione il nuovo farmaco viene tenuto sotto controllo per rilevare effetti collaterali e/o problemi eventualmente

sfuggiti ai tests clinici precedenti, perché si manifestano molto raramente o a lungo/lunghissimo termine, o solo in condizioni particolari in abbinamento ad altre sostanze ingerite. Chiaramente, a seguito di queste considerazioni, l'approvazione data a un farmaco può sempre essere revocata.

Si deve sottolineare che la legge europea istitutiva dell'ente regolatorio europeo, EMEA, stabilisce che un nuovo farmaco debba essere valutato sulla base di tre caratteristiche: qualità, efficacia e sicurezza.

Quindi, il meccanismo dalla scoperta alla vendita di un farmaco è molto lungo e in un certo senso giustifica i costi elevati che tocca pagare agli utilizzatori finali ((EC) No 726/2004).



**Fig. 1:** Fasi della sperimentazione clinica di un nuovo farmaco.

## **2. SEZIONE SPERIMENTALE**

### **2.1 INTRODUZIONE**

Nel corso dell'ultima decade, i protocolli terapeutici (chemioterapia e radioterapia) per i pazienti pediatrici affetti da leucemia linfoblastica acuta (LLA) sono sensibilmente migliorati, aumentando il tasso di guarigione, in particolare per le leucemie di origine B, mentre le leucemie di tipo T presentano ancora un'alta resistenza alla chemioterapia. Pur esistendo considerevoli differenze individuali nella risposta al trattamento farmacologico, i pazienti con leucemia T presentano spesso mancata risposta alla terapia e sono pertanto candidati al trapianto, quale unica possibilità. I chemio e radioterapici, però, pur avendo efficacia nel trattamento di alcune leucemie, presentano effetti collaterali che peggiorano la qualità della vita dei pazienti oncologici pediatrici.

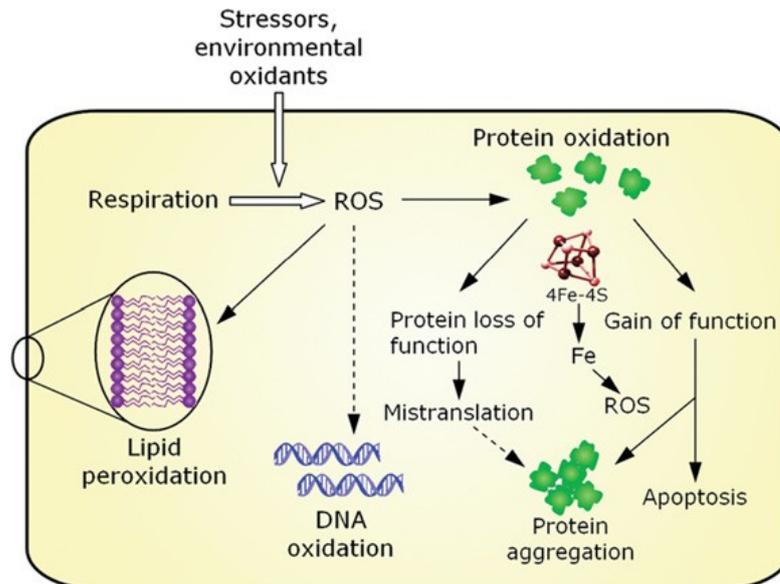
Obiettivo primario del mio progetto di ricerca è stato, pertanto, lo studio di una molecola non tossica, senza effetti collaterali, di recente scoperta che ha mostrato efficacia nella riduzione di diversi tumori (carcinoma mammario, ovarico, endometriale e mesotelioma), quale prima fase di sperimentazione del protocollo richiesto per la messa a punto di un nuovo farmaco. In particolare, tale studio ha valutato, inizialmente, l'efficacia d'azione, sulle cellule leucemiche in coltura, di un trattamento chemioterapico a dosi molto ridotte, ottenuto utilizzando una piccola molecola, il peptide leader della rMnSOD (manganese superossido dismutasi ricombinante) quale trasportatore intracellulare del citostatico. È stato dimostrato infatti che uno dei problemi fondamentali della chemioterapia è costituito dalla scarsa permeabilità della membrana della cellula tumorale all'internalizzazione dei citostatici; a causa di ciò le terapie attuali utilizzano alte dosi di chemioterapici, provocando effetti collaterali indesiderati, mentre la dose di citostatico che effettivamente entra

nelle cellule tumorali e ne produce la morte è davvero esigua (Borrelli et al.,2011). Il peptide leader, che è una piccola parte della rMnSOD, è stato testato coniugato a citostatici (cisplatino ed epirubicina) con l'obiettivo di aumentare l'efficacia di tali farmaci riducendone notevolmente le dosi e quindi gli effetti collaterali, sfruttando le proprietà di carrier intracellulare del frammento della rMnSOD precedentemente isolato e studiato su altri modelli di tumore. Nella seconda fase dello studio è stata testata la sola r-MnSOD che è una proteina antitumorale isolata e sequenziata, per la prima volta, da cellule di liposarcoma umano (LSA) presso il laboratorio di Oncologia Sperimentale dell'Istituto dei Tumori di Napoli, G. Pascale, dal Dott. Aldo Mancini, con l'obiettivo di proporre una nuova terapia priva degli effetti collaterali comuni alle terapie oggi utilizzate e più sensibile al benessere del paziente.

## 2.2 Ruolo dello stress ossidativo e dei ROS nella genesi del tumore

È attualmente noto che nella genesi di tutti i tumori viene riconosciuto uno squilibrio ossidativo (Mehta and Siddik, 2009). Il termine “stress ossidativo” fu definito nel 1985 da Sies come uno squilibrio tra specie ossidanti ed antiossidanti, a cui segue un incremento nei livelli cellulari di specie reattive all’ossigeno (ROS). Le ROS sono molecole di ossigeno a cui manca un elettrone, tra cui l’anione superossido ( $O_2^-$ ), il radicale idrossilico ( $\cdot OH$ ) e il perossido di idrogeno ( $H_2O_2$ ) (Valko et al., 2006). Le principali sedi di produzione dei ROS sono: mitocondrio, reticolo endoplasmatico liscio, membrane nucleari, perossisomi e granuli primari dei granulociti (Barber and Harris, 1994). Nel nostro organismo si producono ROS nel corso di diversi processi biologici: nella catena di trasporto degli elettroni sulla membrana mitocondriale, nelle reazioni immunitarie cellulo-mediate, nelle reazioni di detossificazione epatica e nelle fasi di ri-perfusione dei tessuti dell’organismo interessati da fenomeni ischemici (Klaunig and Kamendulis, 2004).

I radicali liberi per cui sono indispensabili alla vita, ma, quando se ne producono troppi o quando il corpo umano non riesce più a controllarli, diventano dannosi. La produzione dei ROS può essere dovuta sia a stimoli esterni quali radiazioni ionizzanti, barbiturici ed esteri del forbolo che ad attività metaboliche endogene quali reazioni enzimatiche (Valko et al., 2005; Klaunig et al., 2011). Le ROS ad elevate concentrazioni possono essere importanti mediatori di danno agli acidi nucleici, ai lipidi e alle proteine e ad altre strutture cellulari (Fig.2).



**Fig. 2:** I principali bersagli ed effetti cellulari dei ROS (da Avery, 2011).

Il radicale idrossile è considerato il principale ROS capace di interagire con pirimidine, purine e proteine del DNA e di dar luogo a basi modificate, instabilità genomica ed alterazione dell'espressione genica, che sono causa di mutagenesi e cancerogenesi (Lu et al., 2001). Il DNA mitocondriale (mtDNA), ancor di più del DNA nucleare, è suscettibile all'ossidazione mediata dai ROS a causa della sua vicinanza ai costituenti della catena di trasporto degli elettroni (Inoue et al., 2003; Brandon et al., 2006). Le ROS, inoltre, possono reagire direttamente con le proteine oppure con i zuccheri e i lipidi, generando prodotti che possono reagire con le proteine (Freeman et al., 2009). Il danno ossidativo delle proteine può avere importanti conseguenze biologiche, come modificazioni post-traduzionali, a cui segue una difettosa attività enzimatica. In alcuni casi le ROS riescono perfino ad interferire con la traduzione dell'mRNA (Shenton et al., 2006). Le proteine ossidate, inoltre, possono formare degli aggregati che nel tempo possono diventare altamente tossici (Campioni et al., 2010). I prodotti della perossidazione lipidica, per di più, sono in grado: di inibire direttamente proteine come la pompa  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ , o di inibire i trasportatori del glutammato, o di generare epossidi che reagiscono

con i centri nucleofili nelle cellule, legandosi a DNA, RNA e proteine (Matès et al., 1999).

Lo stress ossidativo è fortemente associato con la cancerogenesi, come dimostrato da studi epidemiologici (Seril et al., 2003). Il danno ossidativo al DNA è il principale meccanismo attraverso cui i ROS contribuiscono alla cancerogenesi. Le modificazioni delle basi del DNA portano certamente a cambiamenti nell'informazione genetica (Toyokuni, 2006; Klaunig et al., 2011). Le cellule trasformate, generalmente, sono prive di punti di controllo, grazie ai quali le cellule normali sono in grado di arrestare il ciclo cellulare in presenza di danni al DNA, riparare il danno e riprendere la divisione (Hanahan and Weinberg, 2000). L'oncosoppressore p53 svolge un ruolo determinante nel controllo dell'integrità genomica, innescando il processo apoptodico qualora ci sia un danno esteso al DNA. Studi dimostrano che le azioni di p53 sono strettamente connesse al cancro e sembrano essere correlate ai livelli di ROS (Hofseth et al., 2003; Hofseth et al., 2004; Bensaad and Vousden, 2005; Halliwell, 2007).

### 2.3 Meccanismi riparativi dello stress ossidativo: gli enzimi antiossidanti

Parallelamente alla generazione dei ROS, esistono dei meccanismi di protezione sia di tipo enzimatico che non. I principali enzimi antiossidanti sono la superossido dismutasi, la catalasi e la glutazione perossidasi, invece tra le sostanze non enzimatiche si annoverano la vitamina E, la vitamina C, i carotenoidi, le antocianine, il resveratrolo, il licopene ecc. (Betteridge, 2000; Abuja and Alberini, 2001; Clarkson and Thompson 2000; Luo and Wu, 2011; Yoon et al., 2011). Quindi, il nostro organismo riesce a difendersi dai radicali liberi grazie ai sistemi antiossidanti. Gli antiossidanti forniscono ai radicali liberi gli elettroni di cui sono privi permettendo ai sistemi enzimatici della cellula di neutralizzarli. Nel donare l'elettrone, l'antiossidante diventa un radicale libero che è più stabile e che può essere eliminato con maggiore facilità. Se però all'interno della cellula sono presenti elevate quantità di radicali liberi, il sistema antiossidante non è in grado di neutralizzarli, ne consegue che i radicali liberi aggrediscono la cellula provocando stress ossidativo (Cervato et al., 1993).

Le superossido dismutasi (SODs) sono enzimi antiossidanti che costituiscono una classe di metallo-enzimi che riducono i rischi derivati dall'accumulo dei radicali liberi in quanto capaci di convertire l'anione superossido in perossido di idrogeno che successivamente è convertito in ossigeno e acqua dall'enzima catalasi (McCord and Fridovich, 1969; Ookawara et al., 2002).

**Mn-SOD**



**Catalasi**



Nell'uomo sono presenti tre isoforme di SOD: la rame-zinco SOD (Cu/Zn SOD) presente nel citoplasma e in bassissime quantità nei perossisomi, la Cu/Zn SOD extracellulare (ecSOD) e la manganese SOD (MnSOD) presente

nella matrice mitocondriale (Oberley, 2005). La Cu/Zn SOD è un omodimero ed è costituita da due subunità ciascuna con un atomo di rame e uno di zinco (Chaturvedi et al., 2001). La SOD extracellulare è un omotetramero e contiene rame e zinco come cofattori metallici (Chomczynski and Sacchi, 1987). La MnSOD, invece, è una proteina omotetramerica costituita da quattro subunità omologhe e ciascuna subunità lega un atomo di manganese. Dopo essere stata sintetizzata nel citoplasma, la sequenza leader (2 KDa), guida la MnSOD nella matrice mitocondriale, dove il peptide viene clivato generando la proteina attiva enzimaticamente (Wispe et al., 1989). La MnSOD è l'enzima che consente la dismutazione dell'anione superossido in perossido d'idrogeno, riducendo l'accumulo di radicali liberi nella cellula.

## 2.4 Il peptide leader della rMnSOD quale carrier di citostatici

È ben noto che la chemioterapia non può essere considerata una vera cura, perché in media permette la sopravvivenza solo per altri 5 o 10 anni, in quanto non riesce ad uccidere tutte le cellule tumorali. In realtà, questa strategia terapeutica riesce solo a limitare la cinetica delle cellule tumorali ed è finalizzata ad un'attività anti-replicativa, perciò agisce sulle cellule che sono in fase di duplicazione, senza selettività e specificità per le cellule tumorali. Purtroppo, non sono ancora in commercio farmaci con attività antitumorale specifica e selettiva.

La rMnSOD (Manganese superossido dismutasi ricombinate), una isoforma di Manganese Superossido Dismutasi recentemente estratta da colture cellulari di liposarcoma umano e ottenuta in forma ricombinante, invece, è citotossica per le sole cellule tumorali che esprimono il recettore degli estrogeni, è facilmente utilizzabile *in vivo* mediante iniezioni sistemiche ed essa raggiunge e penetra le cellule attraverso il suo peptide leader, che è il suo vettore molecolare (Mancini et al., 2006; 2008; Borrelli et al., 2009). Considerando la capacità di questo vettore di penetrare nelle cellule, recentemente è stato dimostrato che se è combinato con citostatici (cisplatino), il vettore entra nelle cellule e rilascia il citostatico nel citoplasma delle cellule, quindi aumentando notevolmente l'indice terapeutico del farmaco. Con questo sistema è stato possibile trasformare l'attività antireplicativa del citostatico in un'attività antitumorale specifica (Borrelli et al., 2011).

Il vantaggio di usare il peptide leader è che consente di utilizzare una minima dose di citostatico rispetto alla terapia tradizionale che ne utilizza elevate quantità. Il peptide leader quindi consente non solo di ridurre la quantità di farmaco da utilizzare e gli effetti collaterali successivi, ma di trasformare l'attività generica antireplicativa del citostatico in una attività anti-tumorale specifica e selettiva, che migliora notevolmente la sopravvivenza del paziente.

Tuttavia, occorre considerare che il peptide è in grado di penetrare tutte le cellule e quindi anche quelli normali. Per cui, è ovvio che anche in queste cellule verrà rilasciata una certa quantità di citostatico. Però, come dimostrato in studi recenti, l'effetto citotossico del peptide leader coniugato a cisplatino sulle cellule normali non è molto dannoso (Borrelli et al., 2011). Per spiegare questa apparente contraddizione, si deve tenere in considerazione che i radicali liberi che si creano all'interno della cellula in seguito all'ingresso del cisplatino, vengono facilmente neutralizzati nelle cellule normali da enzimi antiossidanti (superossido dismutasi, catalasi e glutazione perossidasi), presenti normalmente nelle cellule sane; mentre le cellule tumorali, che ne contengono una ridotta quantità, non possono riparare il danno ossidativo. Dati sperimentali hanno confermato la capacità del peptide leader di portare all'interno delle cellule di tumore mammario ed endometriale, una quantità di cisplatino cinque volte superiore a quando il cisplatino è somministrato da solo, provocando rapidamente la morte delle cellule tumorali, suggerendo che tale trattamento possa sostituire quello tradizionale che consiste nel somministrare il solo cisplatino (Borrelli et al., 2010; 2011).

Un effetto terapeutico ancora più selettivo potrebbe essere ottenuto mediante un trattamento concomitante con peptide leader coniugato a citostatico e la rMnSOD.

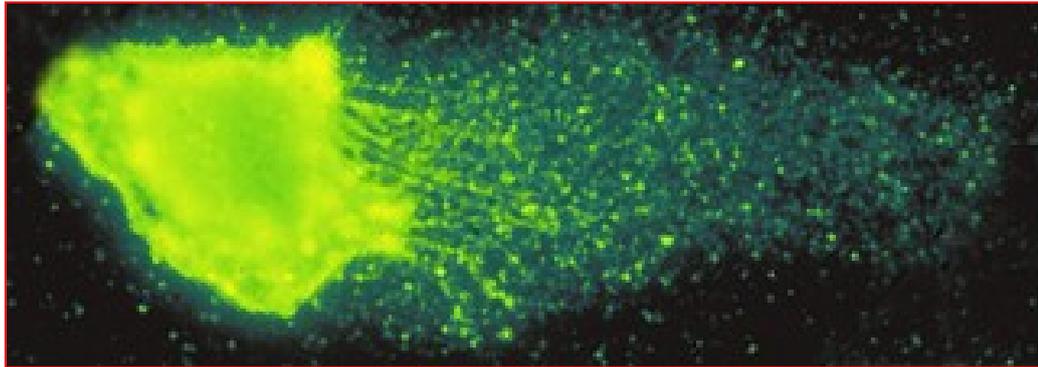
## **2.5 La Manganese Superossido Dismutasi ricombinante (rMnSOD): un nuovo farmaco antitumorale?**

La Manganese Superossido Dismutasi è stata recentemente estratta da colture cellulari di liposarcoma umano (LSA). Tale proteina chiamata LSA-type MnSOD è stata isolata e purificata dal surnatante del terreno delle colture cellulari di LSA mediante tecnica cromatografica ed SDS-PAGE. Oltre all'attività enzimatica, comune a tutte le SOD, diretta a trasformare il radicale superossido in perossido di idrogeno, la LSA-type MnSOD mostra una struttura peculiare e proprietà funzionali che la differenziano dalla forma nativa. Infatti, la LSA-type MnSOD è secreta dalle cellule di LSA (Fig.3), a differenza della MnSOD nativa che è localizzata nella matrice mitocondriale, ha un peso di 30 KDa che è superiore a quello della forma nativa (24 KDa), ha una mutazione al codone 82 con una sostituzione di una treonina con una isoleucina e ha una trasversione silente al nucleotide 222. Inoltre, la forma enzimaticamente attiva della LSA-type MnSOD presenta ancora il peptide leader di 2 KDa (Mancini et al., 2006).

Tale proteina è stata sequenziata e riprodotta in forma ricombinante definita rMnSOD, a partire da uno specifico clone di cDNA derivato da cellule di liposarcoma umano.

Una delle funzioni più straordinarie della rMnSOD è l'efficace e rapida azione antitumorale consistente in una tossicità selettiva nei confronti delle sole cellule tumorali. Fin ad oggi, è stata testata su tumori mammari umani (MCF-7), cellule trasformate ovariche (OVCAR-3), cellule trasformate pancreatiche (MIA PaCa-2), mesotelioma (NCI-28), cellule epiteliali mammarie normali (MCF-10) e fibroblasti normali (MRC-5) (Mancini et al., 2006; Mancini et al., 2008; Borrelli et al., 2009). Tale azione è da attribuire in primis alla ridotta quantità di catalasi presente nelle cellule tumorali, rispetto alle cellule normali nelle quali la rMnSOD svolge un'azione di ossigenazione benefica, ma anche

alla presenza di recettori per gli estrogeni (RE+) (Sandri and Carraro, 1999; Ridnour et al., 2004, Mancini et al., 2006; Battisti et al., 2008; Mancini et al., 2008).



**Fig. 3:** La fluorescenza verde visualizza il contenuto di LSA-type MnSOD secreta dalle cellule di liposarcoma umano in coltura.

*(foto del Dott. Aldo Mancini)*

### **3. MATERIALI E METODI**

#### **3.1 Campioni: linfoblasti di pazienti oncologici in età pediatrica e linee stabilizzate**

Sono stati utilizzati linfoblasti isolati da campione midollare di un soggetto sano in età pediatrica e linfoblasti di 8 pazienti pediatrici affetti da leucemia linfoblastica acuta (LLA), 4 con fenotipo T ad medio/alto rischio, 4 con fenotipo B ad alto rischio e 1 linfoma leucemizzato T, di età compresa tra i 120 e 180 mesi, diagnosticati e trattati presso il Servizio di Oncologia Pediatrica della Seconda Università degli Studi di Napoli.

La percentuale di blasti superiore al 30% a livello midollare ha consentito di fare diagnosi di leucemia acuta, mentre le colorazioni citochimiche mieloperossidasi (MPO),  $\alpha$ -naftil acetato esterasi (ANAE) e acido periodico di Schiff (PAS) hanno consentito la diagnosi differenziale tra leucemia mieloide e linfoide.

Nella seconda fase dello studio, sono state utilizzate linee stabilizzate di leucemia T: le cellule Jurkat.

### **3.2 Estrazione dei linfoblasti dal sangue midollare**

I linfoblasti sono stati isolati dal sangue midollare, reso incoagulabile con EDTA, mediante centrifugazione su gradiente di densità di Ficoll Hystopaque (Sigma Aldrich) per 20 minuti a 1500 rpm a 4°C (Eppendorf Centrifuge 5804R), entro 5 ore dall'aspirato midollare. Dopo centrifugazione le cellule si stratificano nella provetta in base al loro gradiente di densità, dal basso verso l'alto della provetta si osservano: globuli rossi, strato di Ficoll, buffy coat (o disco bianco contenente i linfoblasti) e siero. Dopo l'allontanamento del siero, il buffy coat è stato prelevato ed è stato aggiunto a 10 mL di soluzione fisiologica (NaCl 0,9%) all'interno di una falcon. Poi, sono stati effettuati due lavaggi, centrifugando a 1929 rpm per 5 minuti a 4° C (Eppendorf centrifuge 5804R). Aspirato il surnatante, il pellet di linfoblasti è stato risospeso in altra soluzione fisiologica, fino ad avere un volume finale di 2 mL. La separazione cellulare è stata effettuata in condizioni di sterilità, sotto cappa a flusso laminare. I campioni di linfoblasti sono stati utilizzati subito per allestire colture cellulari oppure crioconservati a -80°C per un tempo massimo di 6 mesi. Per il congelamento, i linfoblasti, dopo essere stati quantizzati mediante contaglobuli automatizzato (Sysmex K-4500), sono stati aliquotati in diverse vials a una concentrazione di  $1 \times 10^6$  cellule/mL, a cui è stato aggiunto siero e DMSO (dimetilsulfossido) al 10% in siero per preservare l'integrità delle membrane dall'azione meccanica dei cristalli di acqua durante lo scongelamento. Ad ogni 100  $\mu$ L di campione sono stati aggiunti 300  $\mu$ L di siero e 150  $\mu$ L di siero più DMSO 10% e poi sono stati conservati a -80°C.

### **3.3 Scongellamento dei linfoblasti**

I campioni (linfoblasti *ex vivo* estratti mediante gradiente di densità e linee stabilizzate congelati a -80°C) sono stati scongelati ponendo le vials a temperatura ambiente e aggiungendovi terreno di coltura RPMI 1640. Il contenuto delle vials è stato trasferito in falcon ed è stato portato a volume a 10 mL con RPMI 1640. Successivamente, i campioni sono stati centrifugati a 1500 rpm per 5 minuti a 4°C (Eppendorf Centrifuge 5804R). Dopo aver eliminato il surnatante, il pellet è stato risospeso in terreno di coltura completo (RPMI 1640 addizionato con Siero Bovino Fetale al 10% e Penstrep-penicillina e streptomycin- all'1%) con volume finale di 1 o 2 mL.

### 3.4 Allestimento delle colture cellulari e tests di vitalità

I linfoblasti *ex vivo* sono stati coltivati in piastre multiwell da 24 pozzetti (Fig. 4). In ciascun pozzetto sono stati aggiunti 1 o 2 mL di terreno RPMI 1640 completo e le cellule a una concentrazione di  $1 \times 10^6$  cellule/mL. Le cellule *ex vivo*, poi, sono state lasciate crescere per 3-7 giorni in incubatore a 37°C, in atmosfera umidificata, con il 5% di CO<sub>2</sub>.

Le cellule stabilizzate, invece, sono state inizialmente utilizzate per allestire una coltura primaria: in ciascun pozzetto di una piastra multiwell da 24 pozzetti sono stati aggiunti 2 mL di terreno di coltura RPMI 1640 completo e cellule alla concentrazione di  $1 \times 10^6$  cellule/mL. Le cellule sono state cresciute per quattro giorni in incubatore a 37°C, in atmosfera umidificata, con il 5% di CO<sub>2</sub>. Al quarto giorno è stata allestita una coltura cellulare secondaria a partire da quella primaria. Per l'allestimento della coltura secondaria, nei pozzetti di una piastra multiwell sono stati aggiunti 1 o 2 mL di terreno RPMI 1640 completo e cellule a una concentrazione di  $1 \times 10^6$  cellule/mL prelevate da uno dei pozzetti della coltura primaria. Le cellule della coltura secondaria sono state cresciute per 5 giorni in incubatore a 37°C, in atmosfera umidificata, con il 5% di CO<sub>2</sub>.



Fig. 4: Allestimento di una coltura cellulare

Durante la crescita cellulare, giornalmente è stata osservata la morfologia al microscopio ottico invertito, è stata effettuata la conta cellulare al conta globuli automatizzato (Sysmex K-4500) e sono stati effettuati i tests di vitalità Trypan Blue e MTT.

Per la conta cellulare sono stati utilizzati 50  $\mu\text{L}$  di campione, prelevati da un pozzetto della piastra, e 150  $\mu\text{L}$  di soluzione fisiologica.

Il saggio Trypan Blue è stato effettuato usando 25  $\mu\text{L}$  di campione, prelevati da uno dei pozzetti, 25  $\mu\text{L}$  di soluzione fisiologica e 50  $\mu\text{L}$  di colorante Trypan Blue. Mediante questo test le cellule vive, che hanno una membrana cellulare intatta, sono refrattarie al colorante Trypan Blue e al microscopio ottico assumono un aspetto traslucido, invece le cellule morte si colorano di blu perché il colorante penetra all'interno della cellula. La vitalità cellulare, espressa in percentuale, è stata valutata effettuando al microscopio ottico una conta in camera di Bürker delle cellule colorate e non colorate.

Il saggio MTT (2,5 difeniltetrazolinbromide) è stato effettuato utilizzando 10  $\mu\text{L}$  di campione, prelevati da uno dei pozzetti, e 4  $\mu\text{L}$  di MTT, questi ultimi sono stati incubati nel bagnetto termostato a 37°C per 3 ore, dopodiché sono stati aggiunti 40  $\mu\text{L}$  di isopropanolo acido e 4  $\mu\text{L}$  di Triton (rapporto 10:1) per bloccare la reazione. In questo caso è stato possibile determinare la vitalità cellulare leggendo l'assorbanza alla lunghezza d'onda di 570 nm allo spettrofotometro (NanoDropspectrophotometer ND1000). L'assorbanza è direttamente proporzionale alla concentrazione delle cellule vitali.

Il saggio di vitalità MTT è un test colorimetrico che permette di stimare la percentuale di cellule aventi ancora attività mitocondriale, quindi vive. A tal scopo viene usato il 2,5 difeniltetrazolinbromide (MTT), un composto aromatico policiclico dotato di un anello tetrazolico che può essere facilmente ridotto dalle deidrogenasi o altri enzimi mitocondriali, formando per apertura dell'anello tetrazolico un composto cromogeno azotato detto formazano che fa virare il composto da un colore giallo a un colore blu-violetto intenso. Il

formazano forma nell'ambiente intracellulare dei cristalli insolubili a cui le membrane risultano impermeabili, quindi per stimare la quantità di formazano prodotta, che è direttamente proporzionale all'attività mitocondriale, il formazano deve essere reso solubile per permetterne la fuoriuscita dalle cellule. Per cui, dopo 3 ore di incubazione con MTT, si utilizza l'isopropanolo acido per solubilizzare i cristalli e il Triton per permeabilizzare le membrane cellulari.

### 3.5 Trattamento dei campioni

Per testare la capacità del peptide leader della rMnSOD di entrare all'interno delle cellule leucemiche, sono stati utilizzati campioni cellulari, appartenenti a soggetti in età pediatrica, sia di leucemia B che T *ex vivo*. Tali cellule sono state coltivate per 7 giorni e poi incubate per 5 ore con 25 µg/mL di peptide leader.

Successivamente, è stata testata l'azione del peptide leader coniugato al cisplatino, un citostatico. Campioni *ex vivo* sia di cellule B che T sono stati trattati per 5 ore con concentrazioni diverse di peptide-cisplatino: 50 µg/mL, 25µg/mL, 5 µg/mL e 2,5µg/mL e con solo cisplatino alla concentrazione di 50 e 5 µg/mL, in modo da evidenziare le eventuali differenze.

In un secondo tempo, su cellule *ex vivo* di linfoma leucemizzato T è stata testata per 5 ore l'azione anche del peptide leader coniugato all'epirubicina, un chemioterapico efficace nel trattamento dei linfomi, alle seguenti concentrazioni: 40 µg/mL, 4 µg/mL, e 0,4 µg/mL.

Infine, è stata testata l'azione della nuova forma ricombinante della manganese superossido dismutasi: rMnSOD. Tale proteina è stata testata prima su cellule *ex vivo* di leucemia T e B, su un linfoma leucemizzato e poi su linee stabilizzate T (Jurkat). Sulle cellule *ex vivo* la rMnSOD è stata testata per 5 ore dapprima alle concentrazioni di 30 µg/mL e 15µg/mL e poi, stabilito che gli effetti della concentrazione di 30 µg/mL si differenziavano di poco da quelli del trattamento con 15µg/mL si è proceduto effettuando concentrazioni scalari. Su campioni *ex vivo* di leucemia T sono state testate le seguenti concentrazioni scalari: 20 µg/mL, 2 µg/mL, 0,2 µg/mL e 10 µg/mL, 1 µg/mL e 0,1 µg/mL. Dato che gli effetti migliori sui campioni *ex vivo* di leucemia T (che è più aggressiva rispetto alla leucemia B) si erano avuti con le concentrazioni scalari di 20 µg/mL di rMnSOD, sui linfoblasti *ex vivo* di leucemia B sono state testate solo le concentrazioni scalari di 20 µg/mL di rMnSOD.

La proteina rMnSOD è stata testata anche su linfoblasti normali alle stesse concentrazioni: 20 µg/mL, 2 µg/mL, 0,2 µg/mL.

Per ultimo, le concentrazioni di rMnSOD pari a 20 µg/mL, 2 µg/mL, 0,2 µg/mL, 1 µg/mL e 0,1 µg/mL sono state testate sulle linee Jurkat.

Dopo il trattamento, su ciascun campione è stata valutata la vitalità cellulare effettuando sia il saggio con Trypan Blue che il saggio MTT.

### **3.6 Visualizzazione della proteina internalizzata mediante tecnica immunocitochimica**

Per poter visualizzare l'internalizzazione della proteina con cui sono state trattate le cellule è stata utilizzata l'immunocitochimica in microscopia ottica. Sono stati prelevati 500  $\mu$ L di campione (cellule e terreno di coltura) da ciascun pozzetto ed è stato effettuato il citocentrifugato su un vetrino, (10 minuti a 800 rpm in ALC Centrifuge 4236). Il citocentrifugato è stato fissato con soluzione di Zamboni (4% paraformaldeide e 15% acido picrico) per 60 minuti e in seguito lavato in PBS (Phosphate buffered saline) 1X e TBS (Tris buffer saline) 0,05 mol/L. Successivamente, è stata effettuata incubazione per 5 minuti con perossido d'idrogeno 3% per bloccare l'azione delle perossidasi endogene e poi per 30 minuti con l'anticorpo I anti-peptide della rMnSOD (prodotto presso il laboratorio del Dott. Mancini), prodotto in coniglio e diluito 1:200 con l'Antibody Diluent (1% BSA (albumina di siero bovino) in TBS 0,05 mol/L). Dopo i lavaggi in PBS 1X e TBS 0,05 mol/L per eliminare l'anticorpo I in eccesso (la quota che non si è legata), è stato aggiunto l'anticorpo II biotinilato (donkey anti-rabbit VECTOR) e lasciato agire per 30 minuti. Dopo ulteriori lavaggi con PBS 1X e TBS 0,05 mol/L è stato aggiunto l'enzima perossidasi di rafano (HPR) legato alla streptavidina, in grado di riconoscere e legarsi all'anticorpo II biotinilato, e si è lasciato agire per 30 minuti. Per completare la reazione è stata utilizzata una soluzione substrato-cromogeno costituita dalla 3,3' diamminobenzidina (DAB) diluita in soluzione tampone (una goccia di DAB/mL di soluzione tampone); dopo aver lasciato agire tale soluzione per 10 minuti, i vetrini sono stati lavati in acqua distillata e osservati al microscopio ottico per controllare che fosse avvenuta la reazione. I vetrini, infine, sono stati contrastati con ematossilina (colora di violetto i nuclei) per circa 7 minuti. Per il viraggio sono stati effettuati lavaggi consecutivi in acqua di fonte e distillata e poi montati. L'acquisizione delle

immagini all'analizzatore di immagini (ZEISS HBO50) è stata realizzata mediante l'ausilio del software Axion Vision Rel. 4.7.

### **3.7 Visualizzazione ultrastrutturale dell'internalizzazione**

Per lo studio immunocitochimico al microscopio elettronico a trasmissione (TEM), i campioni (cellule e terreno di coltura: 1 o 2 mL) sono stati fissati con glutaraldeide 0,1% e paraformaldeide 4% in tampone sodio cacodilato 0,1 M per 60 minuti a temperatura ambiente e poi lavati per due volte nel tampone sodio cacodilato. In seguito, è stata effettuata post-fissazione con tetrossido di osmio ( $\text{OsO}_4$ ) 1% per circa 10 minuti, e successivo lavaggio in tampone sodio cacodilato per eliminare il  $\text{OsO}_4$  in eccesso. La disidratazione dei campioni è stata ottenuta attraverso passaggi in alcol etilico a concentrazioni crescenti (50%, 70%, 90%, 100% I, 100% II e 100% III). L'inclusione in resina necessaria per ottenere sezioni ultra sottili dei campioni è stata ottenuta previo trattamento con ossido di propilene per 15 minuti e successivamente con la miscela ossido di propilene/resina in rapporto 1:1 per 8 ore. Infine, è stata effettuata inclusione in resina pura (EPON 812) e la polimerizzazione è avvenuta in stufa a 60° per 24 ore. Le sezioni ultrafini sono state realizzate all'ultramicrotomo ultracut UCT Leica e raccolte su retini di nickel. Sulle sezioni così ottenute, è stata effettuata la tecnica immunogold. Si tratta di una tecnica immunocitochimica indiretta, la cui rivelazione al microscopio avviene mediante l'utilizzo di particelle di oro colloidale (10 Ø) coniugate con l'anticorpo II. Per aumentare la reattività antigenica, cioè per aumentare l'esposizione degli antigeni, è stato eseguito un trattamento iniziale di smascheramento con buffer citrato (citrato di sodio diidrato e acido citrico in acqua distillata) per due cicli, ciascuno di 5 minuti, in microonde a 240 Watt. In seguito, è stato effettuato un trattamento con perossido di idrogeno 10% per 10 minuti, per rendere specifico il riconoscimento dell'antigene. Infatti, tale trattamento blocca le perossidasi endogene assicurando un riconoscimento specifico dell'anticorpo I. In seguito, sono stati effettuati 3 lavaggi in PBS 0,9%, ciascuno di 5 minuti. Poi, è stata effettuata incubazione per 30 minuti

con la miscela di PBS 0,9% con BSA 1% e glicina 0,15%, e successivamente è stato effettuato un trattamento permeabilizzante con Triton 0,05% in PBS 0,9% per 5 minuti. Dopo un ulteriore lavaggio in PBS 0,9%, è stata effettuata incubazione in camera umida, con l'anticorpo I anti peptide leader della rMnSOD (rabbit anti-human) (prodotto presso il laboratorio del Dott. Mancini), diluito 1:20 in BSA 0,1% per tutta la notte a 4°C. Per allontanare l'anticorpo in eccesso non legato, sono stati eseguiti altri 3 lavaggi in PBS 0,9% per 10 minuti, ed è stata effettuata incubazione per 2 ore con l'anticorpo II DAR (donkey anti-rabbit) coniugato a particelle di oro colloidale di 10 nm, diluito 1:10 in BSA 0,1%. Infine, le sezioni sono state lavate in PBS 0,9%, in acqua distillata e, in seguito, contrastate con acetato di uranile per 15 minuti e citrato di piombo per 45 secondi. L'osservazione e le fotografie sono state realizzate al microscopio elettronico a trasmissione LEO 912AB.

### 3.8 Estrazione delle proteine

I linfoblasti appena separati dal sangue circolante dei pazienti o dopo scongelamento dei campioni conservati, sono stati centrifugati a 1500 rpm (Eppendorf Centrifuge 5804R) per 5 minuti a 4° C. Dopo centrifugazione il surnatante è stato eliminato e i linfoblasti sono stati lisati, per 30 minuti in ghiaccio, in presenza di Buffer di lisi (dai 100µL ai 300µL a seconda della grandezza del pellet ottenuto).

Per preparare 50 mL di Buffer di lisi sono stati necessari:

- 2,5 mL di TRIS HCl 1 M
- 1,5 mL NaCl 5 M
- 10 µL NaF 0,5
- 500 µL NP40 100%
- 45,49 mL di H<sub>2</sub>O

Al buffer di lisi sono stati aggiunti gli inibitori delle proteasi:

- 4 µl/mL di PMSF;
- 2 µl/mL di aprotinina
- 2 µl/mL pepstatina;
- 1µl/mL di sodio ortovanadato.

Le cellule lisate sono state successivamente centrifugate a 4° C a 1400 rpm (Eppendorf Centrifuge 5804R) per 2 minuti e poi è stato estratto il surnatante che conteneva le proteine totali.

La concentrazione proteica è stata determinata mediante lettura allo spettrofotometro a 595 nm con il saggio colorimetrico Bio-Rad, che fa uso del colorante blue di Coomassie. Tale saggio si basa sul metodo Bradford che permette di quantizzare le proteine estratte attraverso il cambiamento di colore del blue di Coomassie proporzionalmente alla concentrazione proteica. La retta

di taratura è stata ottenuta usando come standard di riferimento l'albumina di siero bovino (BSA), in quantità note: 0,2-0,4-0,7-1-2-3,5  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ .

### 3.9 Analisi delle proteine mediante Saggio Western Blotting

L'analisi dell'espressione delle proteine è stata effettuata mediante Western Blotting. Il saggio Western Blotting è una tecnica basata sulla separazione elettroforetica delle proteine e il loro trasferimento su un supporto solido (membrana di PVDF). Le proteine vengono poi riconosciute grazie alla reazione con anticorpi che riconoscono specifici epitopi antigenici.

#### *Preparazione campioni*

A 30 microgrammi di proteine totali è stato aggiunto un egual volume di Laemly 2X, è stato raggiunto un volume finale di 30  $\mu$ L con Laemly 1X ed è stato fatto bollire per due minuti.

#### *Elettroforesi in SDS*

Per l'SDS-Page è stato preparato un gel di poliacrilamide al 12%, stabilito tenendo conto del peso molecolare delle proteine da studiare: Bcl-2 e Bax. Il gel è costituito dal *lower* o *running gel*, in cui si ha la vera separazione delle proteine e l'*upper* o *stacking gel*, che è la porzione del gel in cui si formano i pozzetti in cui si seminano i campioni.

Sono stati preparati 5 mL di lower gel con:

- 1,6 mL di H<sub>2</sub>O
- 2,0 mL di acrilamide al 30%
- 1,3 mL Tris 1,5 M (Ph 8.8)
- 0,05 mL Sodio dodecil solfato al 10% (SDS 10%)
- 0,05 mL Ammonio persolfato (APS)
- 0,002 mL di TEMED

Il tutto è stato versato all'interno della cameretta elettroforetica costituita da un supporto con due sottili lastre di vetro; sul composto è stato versato un sottile strato di acqua per favorire la polimerizzazione ed evitare il contatto con l'aria. Sono stati preparati, poi, 3 mL di upper gel costituito da :

- 2,1 mL di H<sub>2</sub>O
- 0,5 mL di acrilamide al 30%
- 0,38 mL Tris 1,0 M (Ph 6.8)
- 0,03 mL SDS 10%
- 0,03 mL Ammonio persolfato
- 0,003 mL di TEMED

Dopo polimerizzazione del running gel, è stata eliminata l' acqua ed è stato aggiunto l'upper gel, poi è stato inserito il pettine per la formazione dei pozzetti e si è lasciato ulteriormente polimerizzare. Avvenuta la polimerizzazione, il gel è stato inserito nella cameretta di corsa contenente 1L di tampone di corsa. Il tampone di corsa è costituito da 800 mL di H<sub>2</sub>O distillata e da 200 mL di soluzione madre costituita da: Tris 25 mM, Glicina 250 mM (pH 8.3) e SDS 0,1%. Estratto il pettine, nei pozzetti sono stati caricati i campioni e il marker (15µL) (Novex Sharp Pre-Stained Protein Standard, Invitrogen) che ha permesso di individuare le proteine d'interesse. Inizialmente, la migrazione delle proteine nell'upper gel è avvenuta a 130 V, quando tutte le proteine erano arrivate a livello dell'interfaccia con il lower gel si è passato ad un voltaggio di 170 V per circa un' ora e mezza. Poco prima della fine della corsa è stata preparata la membrana di PVDF mettendola in metanolo per almeno 10 minuti. Terminata la corsa è stato effettuato il trasferimento delle proteine dal gel alla membrana.

### *Trasferimento*

Per poter effettuare il trasferimento sulla membrana è stato importante preparare il sandwich. Sul supporto per il trasferimento è stata posta una spugnetta, un cartoncino, il gel, la membrana PVDF, un altro cartoncino e infine un' altra spugnetta (le spugnette e i cartoncini sono stati fatti ambientare, precedentemente, bagnandoli con abbondante tampone di trasferimento). Il tutto è stato chiuso all' interno del supporto e inserito nella camera di

trasferimento dove è stato versato il tampone di trasferimento costituito da: 200 mL di metanolo, 700 mL di H<sub>2</sub>O distillata e 100 mL di soluzione madre costituita da Tris Base 48 mM, Glicina 39 mM, SDS 0.037% e Metanolo 20%. Il trasferimento è stato effettuato a 100 V per un' ora e mezza. Una volta terminata la corsa la membrana è stata prelevata e messa in latte al 6% per una notte a 4° C. Per avere la conferma dell'avvenuto trasferimento delle proteine la membrana è stata colorata con Rosso Ponceau. La membrana è stata lasciata nel colorante, in leggera agitazione, per 15 minuti, dopodiché è stata decolorata con H<sub>2</sub>O distillata, sempre in agitazione.

#### *Incubazione e visualizzazione*

La membrana è stata lavata velocemente per due volte con una soluzione TBS-Tween (per un volume di 500 mL sono stati preparati 25 mL di TBS 20 X e 2,5 mL di Tween 20 0,5%, il tutto è stato portato a volume con H<sub>2</sub>O distillata) e poi sottoposta a tre lavaggi della durata di dieci minuti ognuno con la stessa soluzione in agitazione.

Poi, la membrana è stata incubata con gli anticorpi. L'immunoblotting è stato condotto incubando con un anticorpo monoclonale diretto per 1 ora in agitazione continua con l' Ab 1° diluito 1:500 in 8 mL di soluzione TBS-Tween. Trascorso questo tempo sono stati effettuati due lavaggi veloci con soluzione TBS-Tween seguiti da tre lavaggi della durata di dieci minuti ciascuno con la stessa soluzione in agitazione. Successivamente, la membrana è stata incubata con Ab 2° diluito 1:5000 con latte al 3% per un'altra ora. Sono stati effettuati di nuovo i lavaggi e infine le proteine sono state rilevate utilizzando un substrato chemiluminescente (Chemiluminescent HRP substrate; Millipore Corporation, Billerica, USA). La chemiluminescenza è stata visualizzata mediante lastra fotografica.

## 4. RISULTATI

### 4.1 Trattamento con il peptide leader della rMnSOD

Nella prima fase le cellule leucemiche sono state trattate con il solo peptide leader della rMnSOD per valutare la sua capacità di penetrare all'interno di queste cellule.

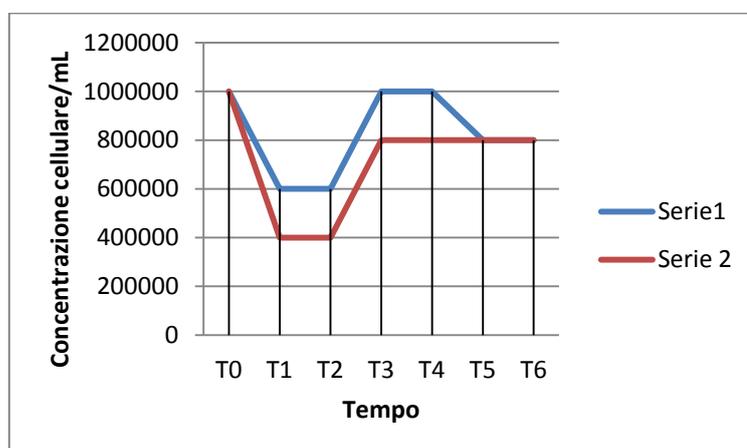
Linfoblasti leucemici *ex vivo*, appartenenti a un bambino affetto da leucemia T indicato come campione 1 e a un bambino affetto da leucemia B ad alto rischio indicato come campione 2 sono stati coltivati per 7 giorni e poi trattati per 5 ore con il peptide leader della rMnSOD. Al *tempo 0* (primo giorno di allestimento della coltura cellulare), *tempo 1* (secondo giorno), *tempo 2* (terzo giorno) ecc. sono stati effettuati la conta cellulare mediante contaglobuli automatizzato e i saggi di vitalità: Trypan Blue e MTT. Inoltre, per monitorare le condizioni cellulari ed eventuali cambiamenti morfologici, ogni giorno le cellule sono state osservate al microscopio ottico invertito.

Campione 1	Conta cellulare	Trypan Blue	MTT	Morfologia
T 0	1000000/mL	80%	90%	MR. DB. Clump assenti
T 1	600000/mL	80%	86%	MR. DB. Clump assenti
T 2	-	-	-	-
T 3	1000000/mL	62%	50%	MR. Presenza di clump
T 4	-	-	-	-
T 5	-	-	-	-
T 6	800000/mL	46%	36%	MAR. Presenza di vari clump
MR. Membrana regolare; DB. Densità buona; MAR. morfologia abbastanza regolare				

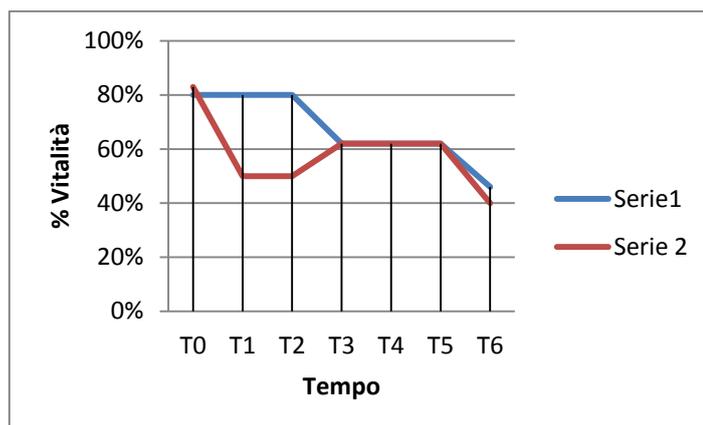
Campione 2	Conta cellulare	Tryp. Blue	MTT	Morfologia
T 0	1000000/mL	83%	89%	MPI. DR. Clump presenti
T 1	400000/mL	50%	45%	MPI. DR. Clump presenti
T 2	-	-	-	-
T 3	800000/mL	62%	45%	MI. Presenza di clump
T 4	-	-	-	-
T 5	-	-	-	-
T 6	800000/mL	40%	30%	MI. Presenza di molti clump

MPI. Membrana parzialmente irregolare; DR. Densità ridotta; MI membrana irregolare

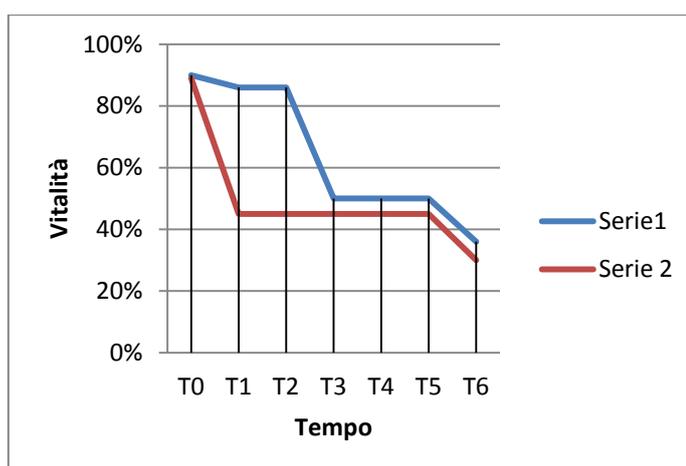
Per studiare l'andamento della crescita nei sette giorni precedenti al trattamento con il peptide leader della rMnSOD, i risultati ottenuti dalla determinazione della concentrazione cellulare e dai saggi di vitalità sono stati riportati in grafici a linee (Grafici 1, 2, 3).



**Grafico 1:** Concentrazione cellulare/mL nel tempo (Serie 1 corrisponde alla leucemia T, Serie 2 corrisponde alla leucemia B). La concentrazione cellulare aumenta dopo tre giorni di coltura per poi diminuire o rimanere costante.



**Grafico 2:** Test Trypan blue: variazione della vitalità cellulare nel tempo (Serie 1 corrisponde alla leucemia T, Serie 2 corrisponde alla leucemia B). La vitalità per entrambi i campioni tende a diminuire nel tempo.



**Grafico 3:** Test MTT: variazione della vitalità cellulare nel tempo (Serie 1 corrisponde alla leucemia T, Serie 2 corrisponde alla leucemia B). La vitalità per entrambi i campioni tende a diminuire nel tempo.

I campioni 1 e 2 sono stati trattati, dopo 7 giorni, per 5 ore con il peptide leader della rMnSOD (25µg/mL) che successivamente è stato rivelato con tecniche immunocitochimiche in microscopia ottica (come riportato a pag. 57). La Fig. 5 dimostra una marcata positività citoplasmatica che lascia presumere che il peptide leader della rMnSOD sia entrato all'interno delle cellule. La conta al

microscopio ottico ha evidenziato il 44% di cellule leucemiche T marcate e il 75% di cellule leucemiche B marcate.



**Fig.5 :** In a-b linfoblasti T e in c linfoblasti B, osservati al microscopio ottico, che mostrano intensa marcatura citoplasmatica (in marrone) (in a-b scale bar= 4  $\mu$ m, in c scale bar= 4  $\mu$ m).

## 4.2 Trattamento con il peptide leader della rMnSOD coniugato a cisplatino

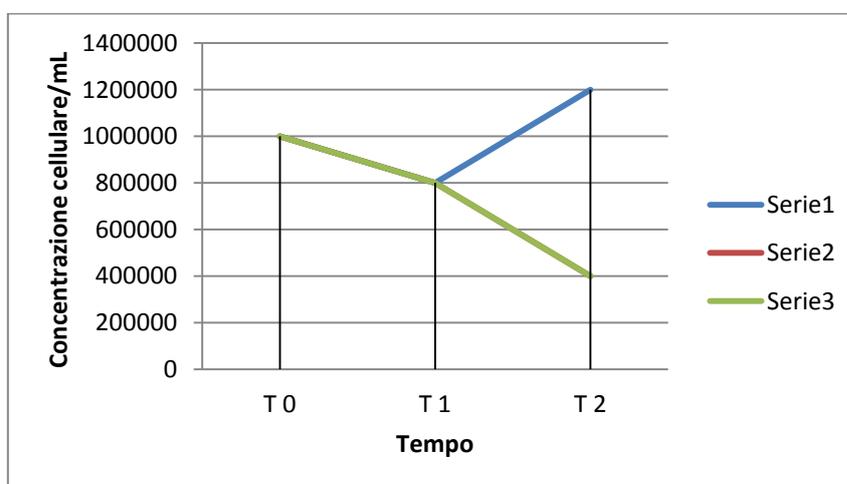
Una volta dimostrata l'internalizzazione del peptide leader della rMnSOD nelle cellule leucemiche, si è pensato di studiare la capacità di tale peptide leader di veicolare un citostatico utilizzato nei protocolli di cura, il cisplatino. Il cisplatino è un agente alchilante usato per il trattamento di una vasta serie di tumori solidi. Il peptide coniugato al cisplatino è stato testato su due campioni di linfoblasti *ex vivo* B, identificati come campione 3 e 4, e un campione di linfoblasti *ex vivo* T, identificato come campione 5, appartenenti a soggetti in età pediatrica. Durante i tre giorni di colture cellulari sono stati effettuati: la conta cellulare mediante contaglobuli automatizzato e i saggi di vitalità Trypan Blue e MTT come descritto in precedenza. Inoltre, per monitorare le condizioni cellulari ed eventuali cambiamenti morfologici, ogni giorno le cellule sono state osservate al microscopio ottico invertito nel contenitore di coltura.

Campione 3	Conta cellulare	Tryp. Blue	MTT	Morfologia
T 0	1000000/mL	100%	76%	MR. DB. Clump assenti
T 1	800000/mL	100%	76%	MR. DB. Clump assenti
T 2	1200000/mL	80%	50%	MR. DA.; Presenza di pochi clump
MR. Morfologia regolare; DB. Densità buona; DA. Densità aumentata				

Campione 4	Conta cellulare	Tryp. Blue	MTT	Morfologia
T 0	1000000/mL	30%	20%	MR. DB. Clump assenti
T 1	800000/mL	69%	49%	MR. DB. Clump assenti
T 2	400000/mL	66%	50%	MR. DA.; Presenza di pochi clump
MR. Morfologia regolare; DB. Densità buona; DA. Densità aumentata				

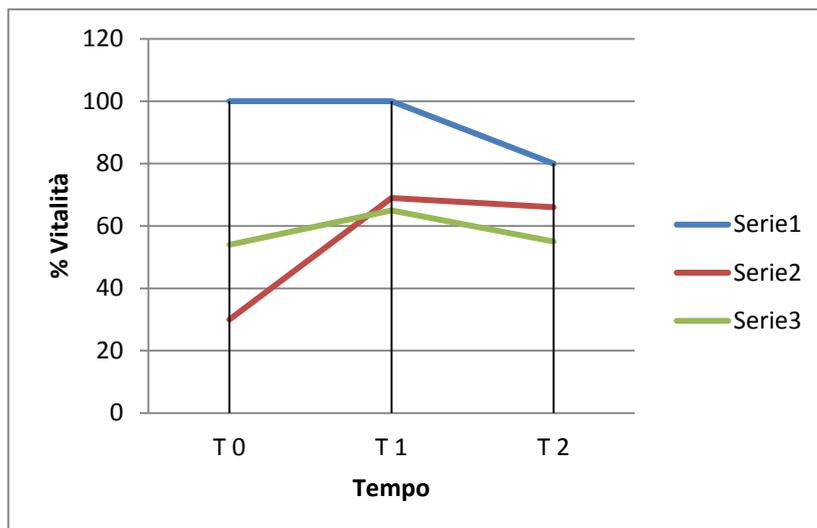
Campione 5	Conta cellulare	Tryp. Blue	MTT	Morfologia
T 0	1000000/mL	54%	69%	MR. DB. Clump assenti
T 1	800000/mL	65%	60%	MR. DB. Clump assenti
T 2	400000/mL	55%	45%	MR. DA.; Presenza di pochi clump
MR. Morfologia regolare; DB. Densità buona; DA. Densità aumentata				

Per studiare l'andamento della crescita nei tre giorni precedenti al trattamento con il peptide-cisplatino, i risultati ottenuti dalla determinazione della concentrazione cellulare e dai saggi di vitalità sono stati riportati in grafici a linee (Grafici 4, 5, 6).

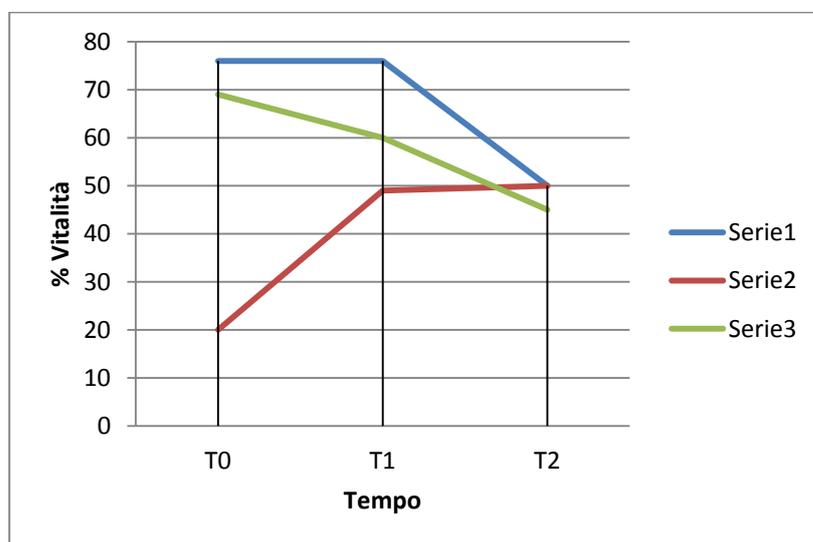


**Grafico 4:** Concentrazione cellulare/mL dei campioni nel tempo (serie 1, 2 e 3 corrispondono rispettivamente ai campioni 3,4: leuc.B e 5: leuc. T).

L'andamento dei campioni nei primi 2 giorni è lo stesso, invece al terzo giorno la concentrazione diminuisce solo per i campioni 4 e 5.



**Grafico 5:** Test Trypan Blue: andamento della vitalità cellulare nel tempo (serie 1, 2 e 3 corrispondono rispettivamente al campione 3, 4: leuc. B e 5: leuc. T). Nei campioni 4 e 5 la vitalità cellulare tende ad aumentare al secondo giorno, per poi lievemente diminuire al terzo giorno. Nel campione 3 la vitalità rimane costante nei primi 2 giorni e poi diminuisce lievemente al terzo giorno.



**Grafico 6:** Test MTT: andamento della vitalità cellulare nel tempo (serie 1, 2 e 3 corrispondono rispettivamente al campione 3, 4: leuc. B e 5: leu T). Nei campioni 3 e 5 la vitalità tende a diminuire rispetto al primo giorno, a differenza del campione 4.

I campioni 3, 4 e 5 sono stati trattati, dopo 3 giorni, per 5 ore con il peptide leader della rMnSOD coniugato al cisplatino. Il campione 3 (leucemia B) è stato trattato con 50 e 5 µg/mL di pep-cisplatino e con solo cisplatino alle stesse concentrazioni (50 e 5 µg/mL). Il campione 4 (leucemia B) è stato trattato con 50 e 5 µg/mL di pep-cisplatino. Il campione 5 (leucemia T) è stato trattato con 25 e 2,5 µg/mL di pep-cisplatino. Come primo approccio sono state testate le suddette concentrazioni che hanno dato risultati in altri studi su cellule tumorali. Dopo il trattamento è stata determinata la percentuale di cellule vitali mediante il test Trypan Blue:

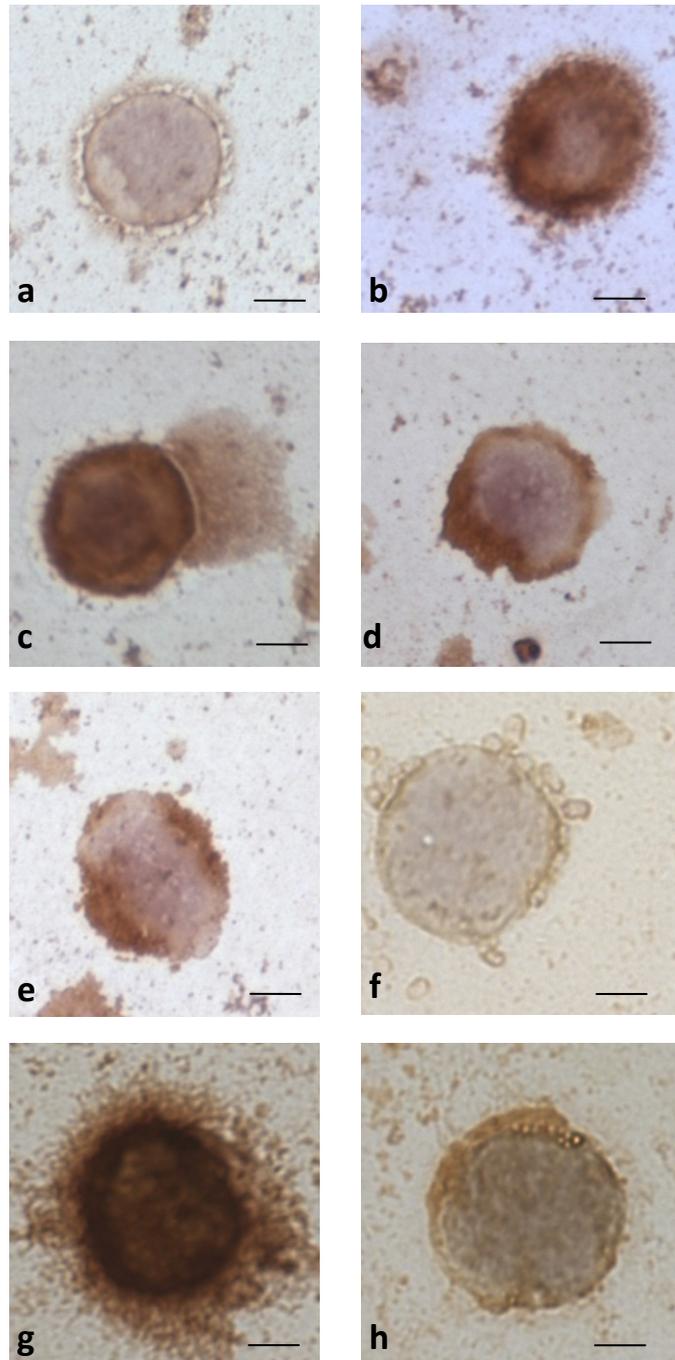
<b>Campione 3</b>	<b>Saggio Trypan Blue</b>
Controllo (non trattato)	100 % vive
cellule + cisplatino 50µg/mL	94 % vive
cellule + cisplatino 5µg/mL	99% vive
cellule + peptide-cisplatino 50µg/mL	87% vive
cellule + peptide-cisplatino 5µg/mL	94 % vive

<b>Campione 4</b>	<b>Saggio Trypan Blue</b>
Controllo (non trattato)	100 % vive
Cellule + peptide-cisplatino 50 µg/mL	91 % vive
Cellule + peptide-cisplatino 25 µg/mL	86 % vive

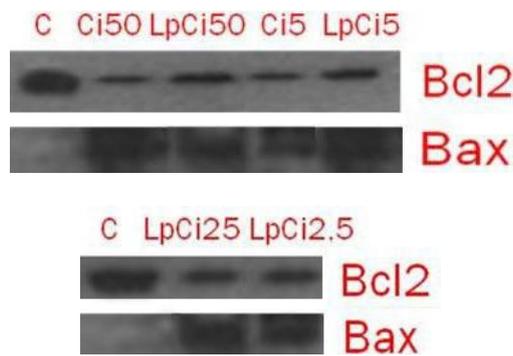
<b>Campione 5</b>	<b>Saggio Trypan Blue</b>
Controllo (non trattato)	100 % vive
Cellule + peptide-cisplatino 25 µg/mL	84 % vive
Cellule + peptide-cisplatino 2,5 µg/mL	91 % vive

I campioni di leucemia B (campioni 3 e 4), in seguito al trattamento con il peptide-cisplatino (a diverse concentrazioni), mostrano una lieve differenza nella percentuale di mortalità rispetto a quando sono trattati con il solo cisplatino. Anche i linfoblasti leucemici T sembrano non risentire in maniera significativa dell'effetto del trattamento con peptide-cisplatino rispetto al controllo. La percentuale molto alta di cellule vitali dopo il trattamento sia con il solo cisplatino che con il peptide-cisplatino ci fa dedurre che il cisplatino non è un citostatico efficace nel trattamento delle leucemie linfoidi in età pediatrica, ma è utilizzabile solo per il trattamento di tumori solidi (Fury et al., 2011). Per la rivelazione immunocitochimica del peptide coniugato al cisplatino sono state utilizzate tecniche di immunocitochimica in microscopia ottica (come descritto a pag. 57). Nella Fig. 6 è evidente la marcatura citoplasmatica all'interno delle cellule leucemiche *ex vivo* B e T; per cui il peptide riesce ad entrare all'interno della maggior parte delle cellule veicolando il cisplatino come dimostrato dalla conta delle cellule marcate al microscopio ottico:

Controllo	0%
Campione 3 (50 µg/mL pep-cisplatino)	64%
Campione 3 (5 µg/mL pep-cisplatino)	50%
Campione 4 (50 µg/mL pep-cisplatino)	77%
Campione 4 (25 µg/mL pep-cisplatino)	64%
Campione 5 (25 µg/mL pep-cisplatino)	78%
Campione 5 (2,5 µg/mL pep-cisplatino)	46%



**Fig.6:** In a controllo di cellule leucemiche B che non presenta marcatura (scale bar= 4  $\mu\text{m}$ ). In b-c linfoblasti di leucemia B trattati con peptide-cisplatino 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  (in b-c scale bar= 3,6  $\mu\text{m}$ ), in d cellule leucemiche B trattate con peptide-cisplatino 25  $\mu\text{g}/\text{mL}$  (scale bar= 4  $\mu\text{m}$ ) e in e cellule leucemiche B trattate con peptide-cisplatino 5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  (scale bar= 3,6  $\mu\text{m}$ ), che presentano marcatura (marrone) citoplasmatica. In f controllo delle cellule leucemiche T: non marcato (scale bar= 4,3  $\mu\text{m}$ ). In g-h linfoblasti leucemici T trattati rispettivamente con peptide-cisplatino 25  $\mu\text{g}/\text{mL}$  (scale bar= 4,3  $\mu\text{m}$ ) e peptide cisplatino 2,5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  (scale bar= 4,3  $\mu\text{m}$ ), che presentano marcatura citoplasmatica (marrone).



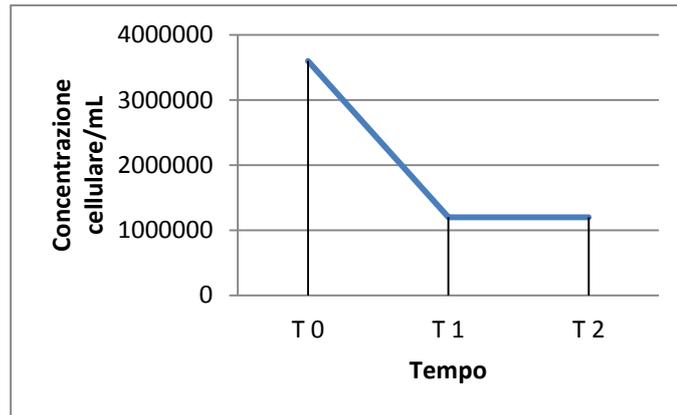
**Fig.7:** Espressione delle proteine pro-apoptotico Bax e antiapoptotico Bcl2 in cellule leucemiche T trattate con peptide-cisplatino (50 e 5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) e solo cisplatino (50 e 5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ), e in cellule leucemiche B trattate con peptide-cisplatino (25 e 2,5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) e solo cisplatino (25 e 2,5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ). C'è un cambiamento nell'espressione delle proteine apoptotiche con diminuzione di Bcl2 (antiapoptotico) ed un aumento di Bax (pro-apoptotico). (C= controllo, Ci50= cisplatino 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , LpCi50= peptide leader-cisplatino 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , Ci5= cisplatino 5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , LpCi5= peptide leader-cisplatino 5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , LpCi25= peptide leader-cisplatino 25  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , LpCi2,5= peptide leader-cisplatino 2,5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ).

### 4.3 Trattamento con il peptide leader della rMnSOD coniugato ad epirubicina

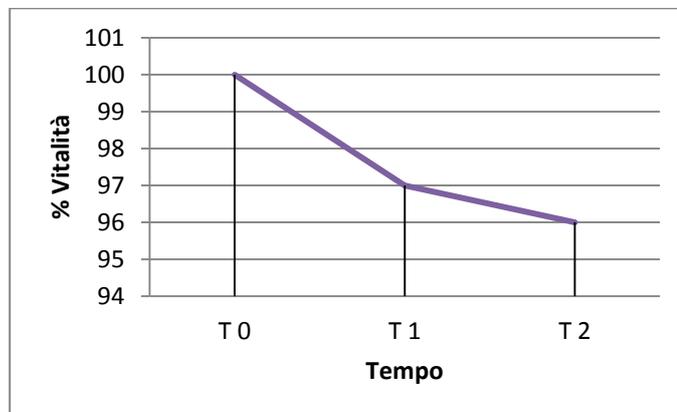
Il peptide leader della rMnSOD coniugato all'epirubicina è stato testato su cellule *ex vivo* appartenenti ad un bambino affetto da linfoma leucemizzato di tipo T, identificato come il campione 6. L'epirubicina è un agente chemioterapico usato per il trattamento di alcune malattie oncologiche. Durante i tre giorni di colture cellulari sono stati effettuati: la conta cellulare mediante contaglobuli automatizzato e i saggi di vitalità Trypan Blue e MTT, come descritto in precedenza. Ogni giorno le cellule sono state osservate al microscopio ottico invertito per monitorare le condizioni cellulari ed eventuali cambiamenti morfologici.

Campione 6	Conta cellulare	Tryp. Blue	MTT	Morfologia
T 0	3600000/mL	100%	97%	MR. DB. Clump assenti
T 1	1200000/mL	97%	96%	MR. DA. Clump assenti
T 2	1200000/mL	96%	94%	MR. DB.
MR. Morfologia regolare; DB. Densità buona; DA. Densità aumentata				

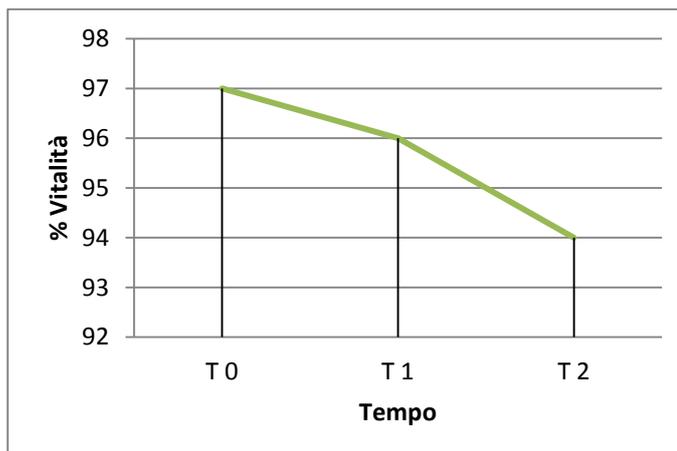
Per studiare l'andamento della crescita nei tre giorni precedenti al trattamento con il peptide-epirubicina, i risultati ottenuti dalla determinazione della concentrazione cellulare e dai saggi di vitalità sono stati riportati in grafici a linee (Grafici 7, 8, 9).



**Grafico 7:** La concentrazione cellulare diminuisce al secondo giorno, e poi rimane costante fino al terzo giorno.



**Grafico 8:** Test Trypan Blue: la vitalità cellulare a partire dal primo al terzo giorno tende lievemente a diminuire.



**Grafico 9:** Test MTT: la vitalità cellulare a partire dal primo al terzo giorno tende lievemente a diminuire.

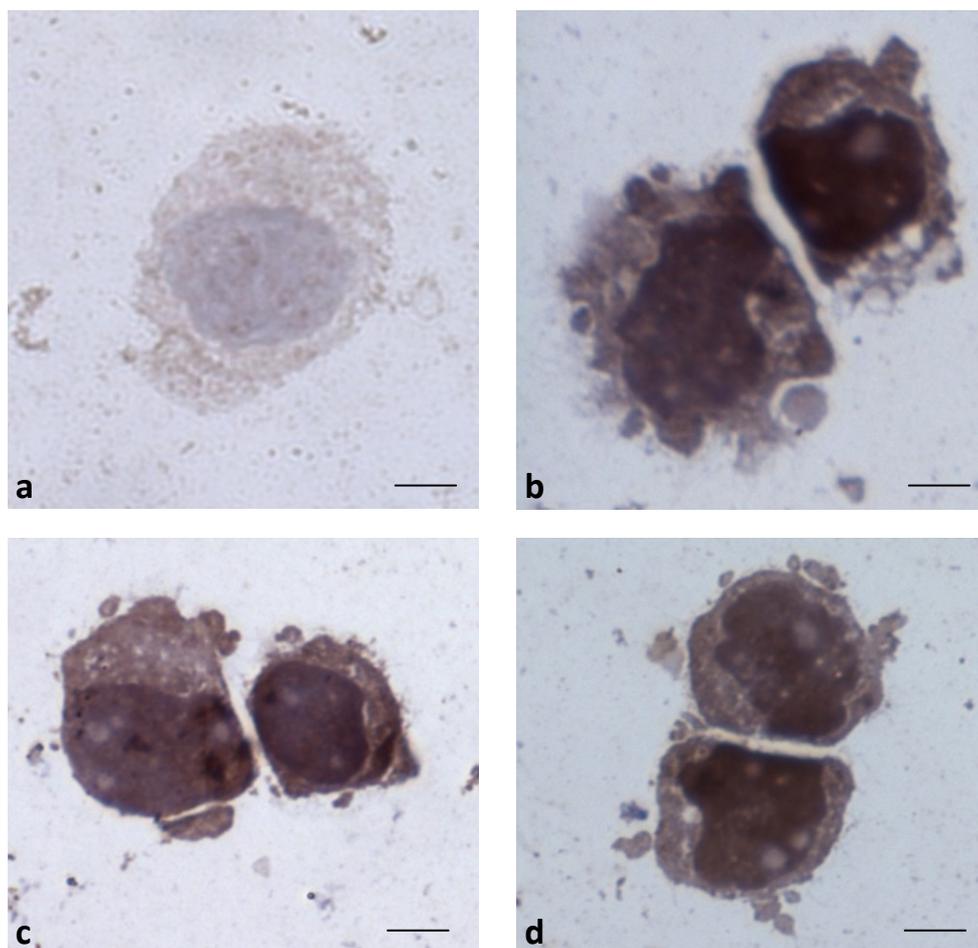
Le cellule di linfoma leucemizzato di tipo T, dopo 3 giorni di coltura, sono state trattate per 5 ore con concentrazioni scalari di peptide-epirubicina (40 µg/mL, 4 µg/mL e 0,4 µg/mL). Dopo il trattamento è stata valutata la vitalità cellulare mediante il test Trypan Blue:

<b>Campione 6</b>	<b>Saggio Trypan blue</b>
Controllo (non trattato) T3	100 % vive
Cellule + pep-epirubicina (40 µg/mL)	70 % vive
cellule + pep-epirubicina (4 µg/mL)	81 % vive
cellule + pep-epirubicina (0,4 µg/mL)	92 % vive

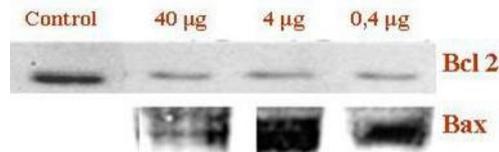
Dopo il trattamento con il peptide leader coniugato all'epirubicina si è osservato in media il 20% di mortalità cellulare, ciò fa dedurre che forse l'epirubicina non è un citostatico ottimale per il trattamento delle leucemie linfoide in età pediatrica. Questo citostatico viene infatti utilizzato soprattutto nella cura del carcinoma della mammella, dello stomaco, del polmone, dell'ovaio, del fegato, del pancreas, del retto, dei linfomi e dei sarcomi delle parti molli. Se somministrata per via intravescicale, l'epirubicina si usa anche nel trattamento del carcinoma della vescica (Lübbe et al., 1996).

Per la rivelazione immunocitochimica del peptide coniugato all'epirubicina è stata utilizzata la tecnica di immunocitochimica in microscopia ottica, precedentemente descritta. Nella Fig. 8 è evidente la marcatura citoplasmatica all'interno delle cellule di linfoma leucemizzato di tipo T *ex vivo*; per cui il peptide riesce ad entrare all'interno della maggior parte delle cellule veicolando l'epirubicina come dimostrato anche dalla conta delle cellule marcate al microscopio ottico:

Controllo	0%
pep-epirubicina 40 µg/mL	77%
pep-epirubicina 4 µg/mL	64%
pep-epirubicina 0,4 µg/mL	55%



**Fig. 8:** In a cellula di linfoma leucemizzato controllo, osservata al microscopio ottico, che non presenta marcatura citoplasmatica (scale bar= 4,5). In b cellule di linfoma leucemizzato trattate con peptide-epirubicina 40  $\mu\text{g}/\text{mL}$  (scale bar= 4), in c cellule di linfoma leucemizzato trattate con peptide-epirubicina 4  $\mu\text{g}/\text{mL}$  (scale bar= 6) e in d cellule di linfoma leucemizzato trattate con peptide-epirubicina 0,4  $\mu\text{g}/\text{mL}$  (scale bar= 7) che presentano un'intensa marcatura (marrone) citoplasmatica.



**Fig.9:** Nelle cellule di linfoma leucemizzato trattate con peptide-epirubicina c'è un cambiamento nell'espressione delle proteine apoptotiche con diminuzione di Bcl2 (antiapoptotico) ed un aumento di Bax (pro-apoptotica) in maniera dipendente dalla concentrazione di farmaco utilizzato.

#### 4.4 Trattamento con la proteina rMnSOD di linfoblasti di LLA T e B *ex vivo*

La proteina rMnSOD è stata testata su cellule di un linfoma leucemizzato di tipo T (campione 7), su due campioni *ex vivo* di leucemia T (campioni 8, 9) e un campione *ex vivo* di leucemia B ad alto rischio (campione 10), appartenenti a soggetti in età pediatrica. Durante i tre giorni di colture cellulari sono stati effettuati: la conta cellulare mediante contaglobuli automatizzato e i saggi di vitalità Trypan Blue e MTT. Ogni giorno le cellule sono state osservate al microscopio ottico invertito per monitorare le condizioni cellulari ed eventuali cambiamenti morfologici.

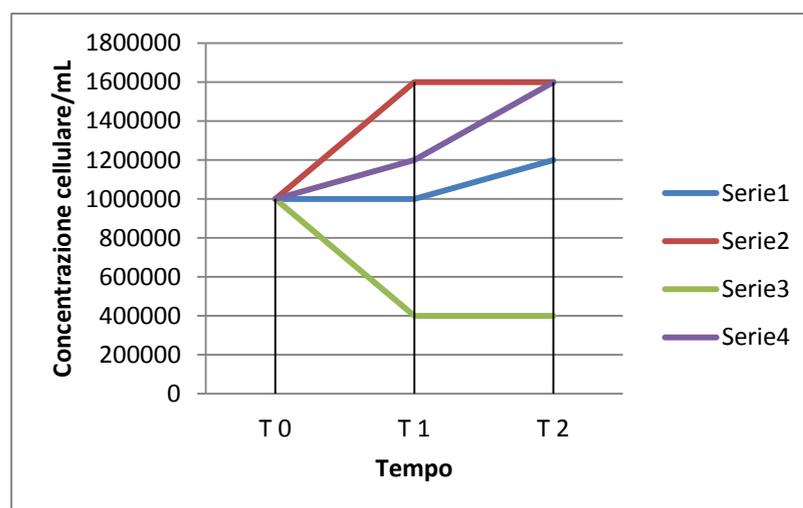
Campione 7	Conta cellulare	Trypan Blue	MTT	Morfologia
T 0	1000000/mL	90%	90%	MR. DB. Clump assenti
T 1	1200000/mL	90%	90%	MR. DA. Clump assenti
T 2	1200000/mL	88%	70%	MR. DB.; Presenza di pochi clump
MR. Morfologia regolare; DB. Densità buona; DA. Densità aumentata				

Campione 8	Conta cellulare	Trypan Blue	MTT	Morfologia
T 0	1000000/mL	98%	75%	MR. DB. Clump assenti
T 1	1600000/mL	94%	90%	MR. DA. Clump assenti
T 2	1600000/mL	97%	98%	MR. DB. Clump presenti
MR: Morfologia regolare; DB: Densità buona; DA: Densità aumentata				

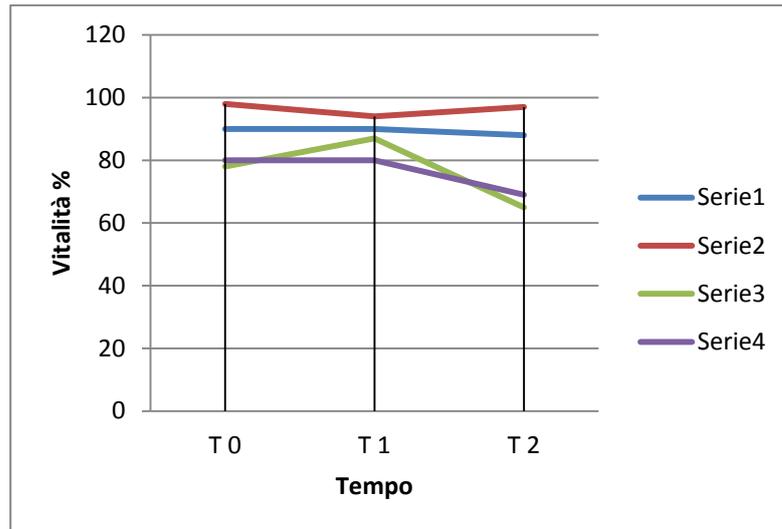
Campione 9	Conta cellulare	Trypan Blue	MTT	Morfologia
T 0	1000000/mL	78%	70%	MR. DM. Clump assenti
T 1	400000/mL	87%	84%	MR. DM. Clump assenti
T 2	400000/mL	65%	90%	MR. DA. Clump presenti
MR: Morfologia regolare; DM: Densità media; DA: Densità aumentata				

Campione 10	Conta cellulare	Trypan Blue	MTT	Morfologia
T 0	1000000/mL	80%	100%	MR. DM. Clump assenti
T 1	1200000/mL	80%	67%	MR. DM. Clump assenti
T 2	1600000/mL	69%	65%	MR. DA. Clump presenti
MR: Morfologia regolare; DM: Densità media; DA: Densità aumentata				

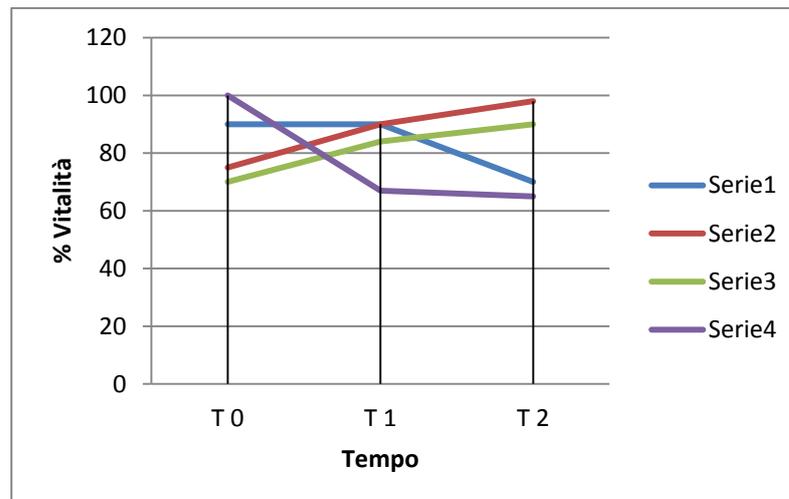
Per studiare l'andamento della crescita nei tre giorni precedenti al trattamento con la rMnSOD, i risultati ottenuti dalla determinazione della concentrazione cellulare e dai saggi di vitalità sono stati riportati in grafici a linee (Grafici 10, 11, 12).



**Grafico 10:** Concentrazione/mL nel tempo delle cellule di linfoma leucemizzato (serie 1), di leucemie T (serie 2 e 3) e di leucemia B ad alto rischio (serie 4). La concentrazione cellulare tende a d aumentare nel tempo per tutti i campioni fatta eccezione per un campione di leucemia T.



**Grafico 11:** Test Trypan Blue: la vitalità cellulare a partire dal primo al terzo giorno tende lievemente a diminuire per tutti i campioni (serie 1, 3 e 4) fatta eccezione per un campione cellulare di leucemia T (serie 2).



**Grafico 12:** Test MTT: la vitalità delle cellule di linfoma leucemizzato (serie 1) e di leucemia B (serie 4) tende a diminuire a partire dal secondo giorno, invece la vitalità cellulare dei campioni di leucemia T tende ad aumentare a partire dal secondo giorno di coltura (serie 2 e 3).

Le cellule di linfoma leucemizzato di tipo T *ex vivo*, dopo 3 giorni di coltura, sono state trattate per 5 ore con 30  $\mu\text{g/mL}$  e 15  $\mu\text{g/mL}$  di proteina rMnSOD. Le cellule di leucemia T *ex vivo* sono state trattate con concentrazioni scalari di rMnSOD: 10, 1, 0,1  $\mu\text{g/mL}$  e con 20, 2 e 0,2  $\mu\text{g/mL}$ . Le cellule di leucemia B

*ex vivo* ad alto rischio sono state trattate con concentrazioni scalari di rMnSOD: 20 µg/mL, 2 µg/mL e 0,2 µg/mL. Dopo il trattamento cellulare è stata valutata la vitalità mediante il test Trypan Blue:

<b>Campione 7</b>	<b>Trypan Blue</b>
Controllo: campione non trattato	100 % vive
Cellule+rMnSOD 30 µg/mL	68 % vive
Cellule+rMnSOD 15 µg/mL	77 % vive

<b>Campione 8</b>	<b>Trypan Blue</b>
Controllo: campione non trattato	100 % vive
Cellule+rMnSOD 10 µg/mL	80 % vive
Cellule+rMnSOD 1 µg/mL	83 % vive
Cellule+rMnSOD 0,1 µg/mL	97 % vive

<b>Campione 9</b>	<b>Trypan Blue</b>
Controllo: campione non trattato	100 % vive
Cellule+rMnSOD 20 µg/mL	58 % vive
Cellule+rMnSOD 2 µg/mL	61 % vive
Cellule+rMnSOD 0,2 µg/mL	92 % vive

<b>Campione 10</b>	<b>Trypan Blue</b>
Controllo: campione non trattato	100 % vive
Cellule+rMnSOD 20 µg/mL	58 % vive
Cellule+rMnSOD 2 µg/mL	67 % vive
Cellule+rMnSOD 0,2 µg/mL	87 % vive

In seguito al trattamento con la rMnSOD, per 5 ore, le cellule leucemiche presentano una diminuita vitalità cellulare rispetto ai controlli.

Le cellule di linfoma leucemizzato di tipo T (campione 7), dopo trattamento con 30 e 15 µg/mL di rMnSOD presentano rispettivamente una mortalità del: 32% e 23%.

Le cellule di leucemia T ad alto rischio (campione 8) dopo trattamento con la concentrazione di 10 µg/mL di rMnSOD presentano una mortalità del 20%. Invece, le cellule trattate con la concentrazione di 1 µg/mL di rMnSOD

presentano una mortalità del 17%. In seguito al trattamento con 0,1 µg/mL di rMnSOD si riscontra una mortalità molto bassa (3%) ciò potrebbe essere associato alla bassa concentrazione della proteina testata.

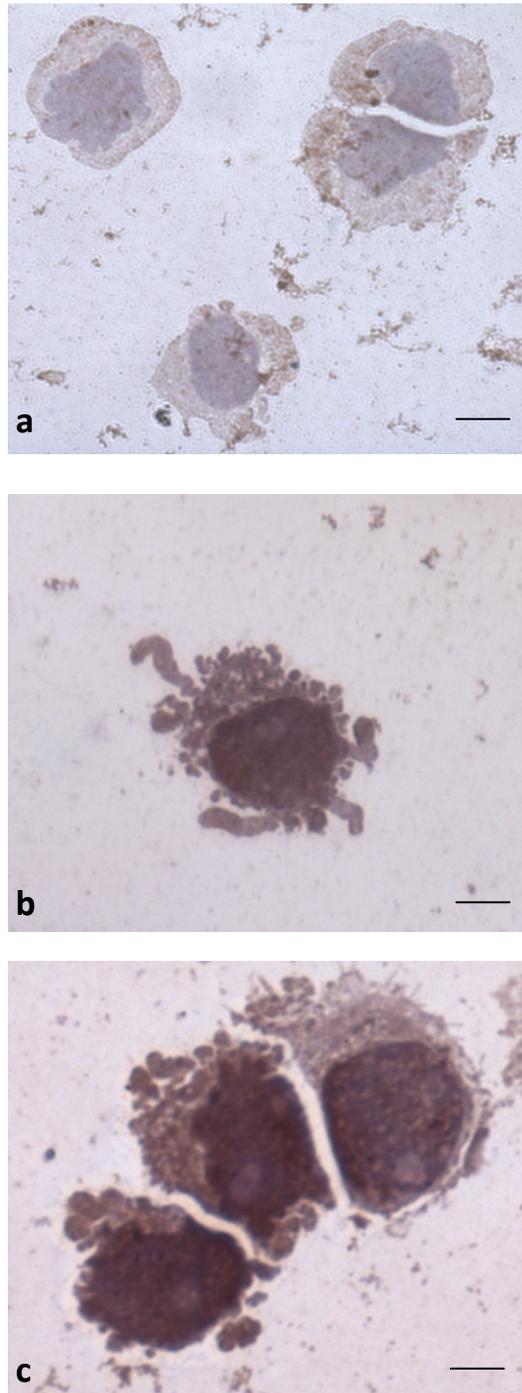
Le cellule di leucemia T ad alto rischio (campione 9) trattate con le concentrazioni di 20 e 2 µg/mL mostrano in seguito al trattamento una mortalità del 42 e 39% rispettivamente, invece il trattamento con 0,2 µg/mL di rMnSOD induce una mortalità molto bassa (8%).

Le cellule di leucemia B ad alto rischio (campione 10) trattate con le concentrazioni di 20 e 2 µg/mL rispettivamente presentano una mortalità del 42 e 33%, mentre il trattamento con 0,2 µg/mL di rMnSOD induce una mortalità del 13%. La concentrazione più bassa in quest'ultimo caso sembra avere una certa efficacia, ciò può essere associato al fatto che le leucemie B se pur ad alto rischio, sono meno resistenti delle leucemie T ad alto rischio.

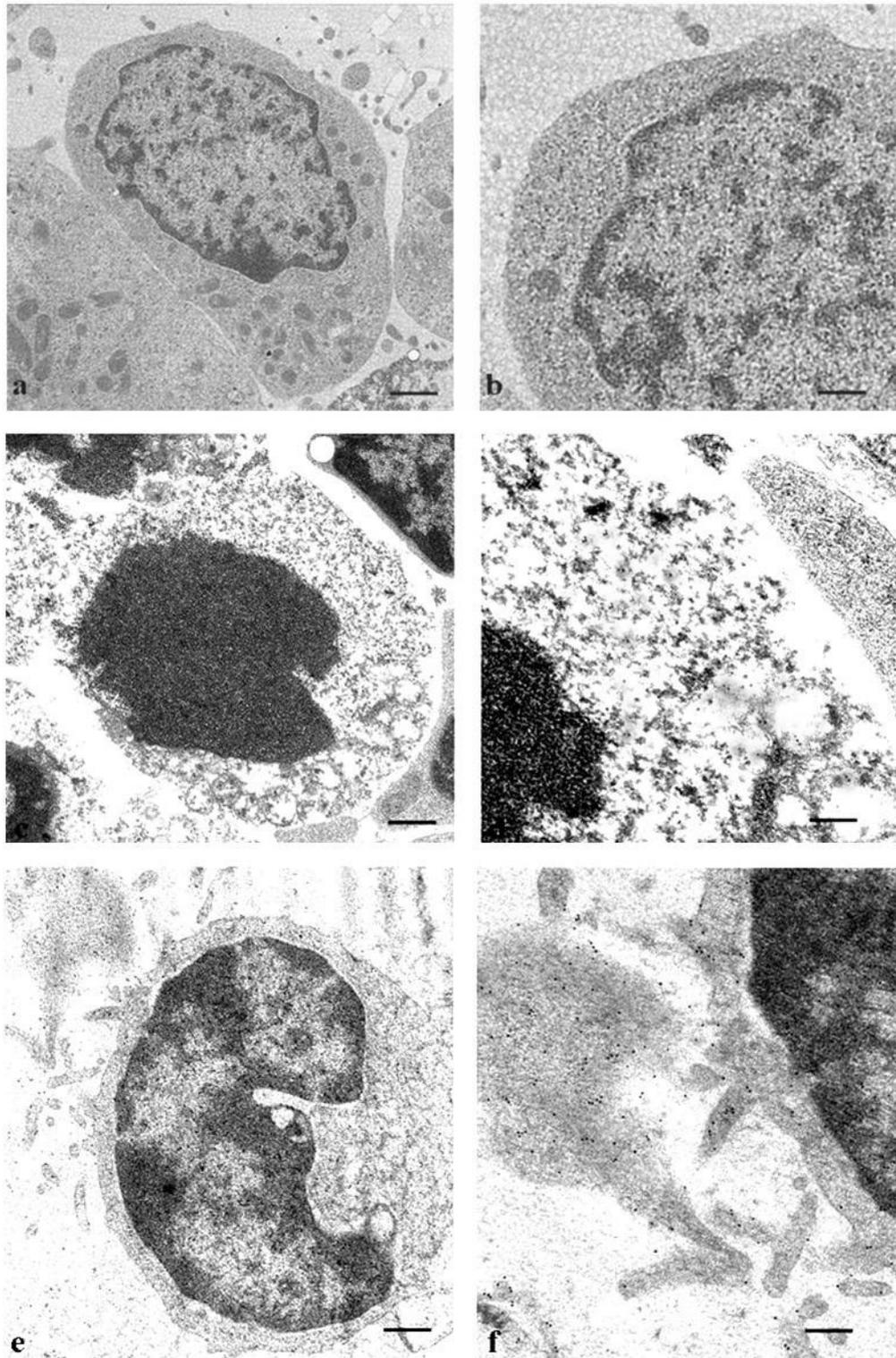
Per la rivelazione immunocitochimica della rMnSOD sono state utilizzate le tecniche di immunocitochimica in microscopia ottica ed elettronica precedentemente descritte.

Nelle Fig. 10-16 è evidente la marcatura citoplasmatica all'interno delle cellule *ex vivo*, che dimostra l'avvenuta internalizzazione della proteina rMnSOD in gran parte delle cellule, e ciò è dimostrato anche dalla conta delle cellule marcate effettuata al microscopio ottico:

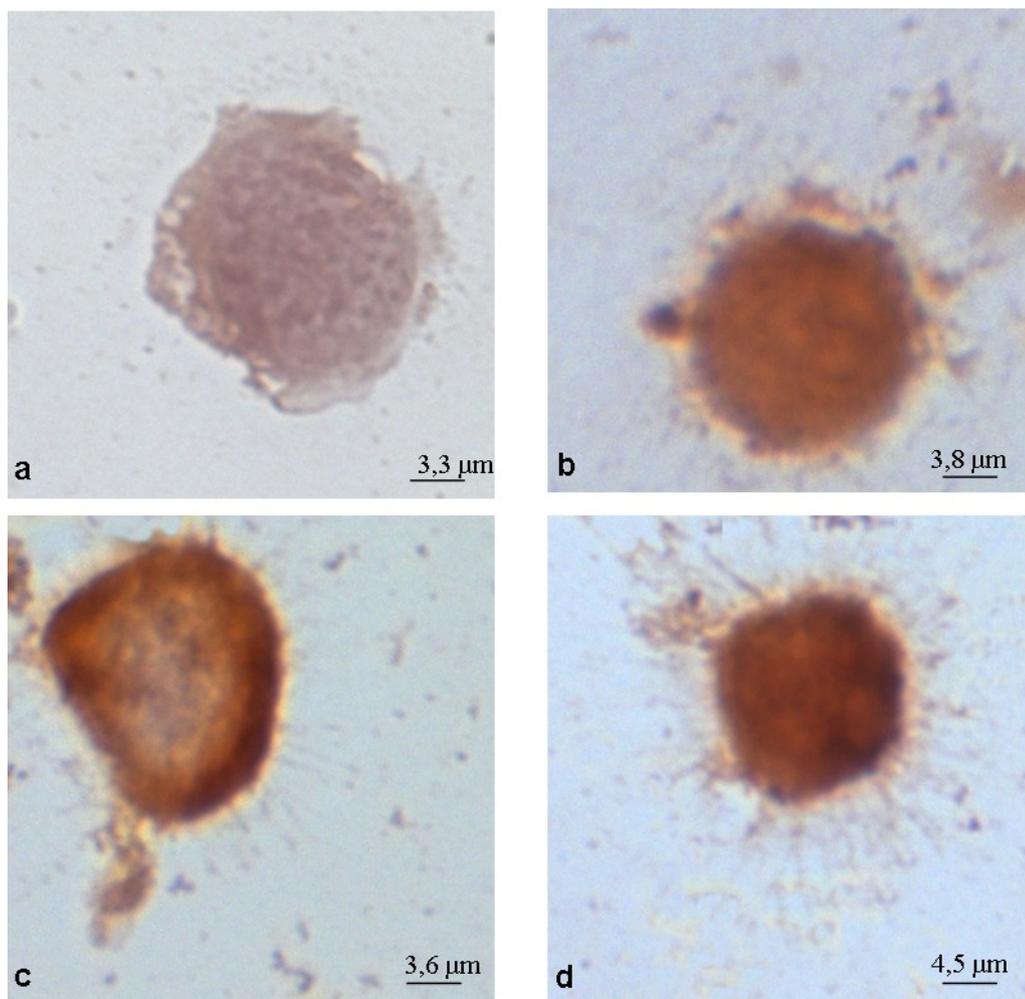
Campione 8 (controllo)	0%
Campione 8 (15 µg/mL)	60%
Campione 8 (30 µg/mL)	95%
Campione 9 (controllo)	0%
Campione 9 (10 µg/mL)	70%
Campione 9 (1 µg/mL)	56%
Campione 9 (0,1 µg/mL)	32%
Campione 10 (controllo)	0%
Campione 10 (20 µg/mL)	76%
Campione 10 (2 µg/mL)	60%
Campione 10 (0,2 µg/mL)	40%
Campione 11 (controllo)	0%
Campione 11 (20 µg/mL)	79%
Campione 11 (2 µg/mL)	71%
Campione 11 (0,2 µg/mL)	47%



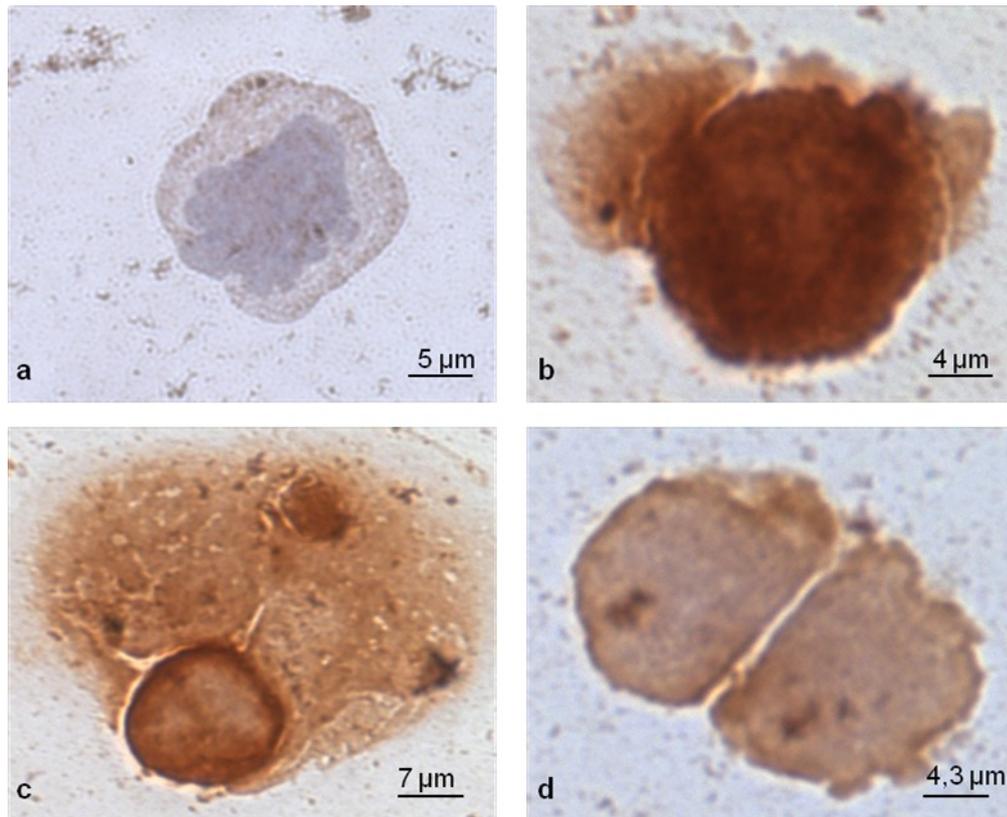
**Fig. 10:** Cellule di linfoma leucemizzato T osservate al microscopio ottico: in a il controllo (scale bar= 8µm), in b cellule trattate con 30 µg di rMnSOD (scale bar= 8 µm), in c cellule trattate con 15 µg di rMnSOD (scale bar= 8 µm). Evidente la marcatura citoplasmatica nei 2 trattati b-c. Le cellule trattate rispetto al controllo sembra che si siano rigonfiate e che le membrane interne e superficiali inizino a rompersi, caratteristiche di necrosi cellulare.



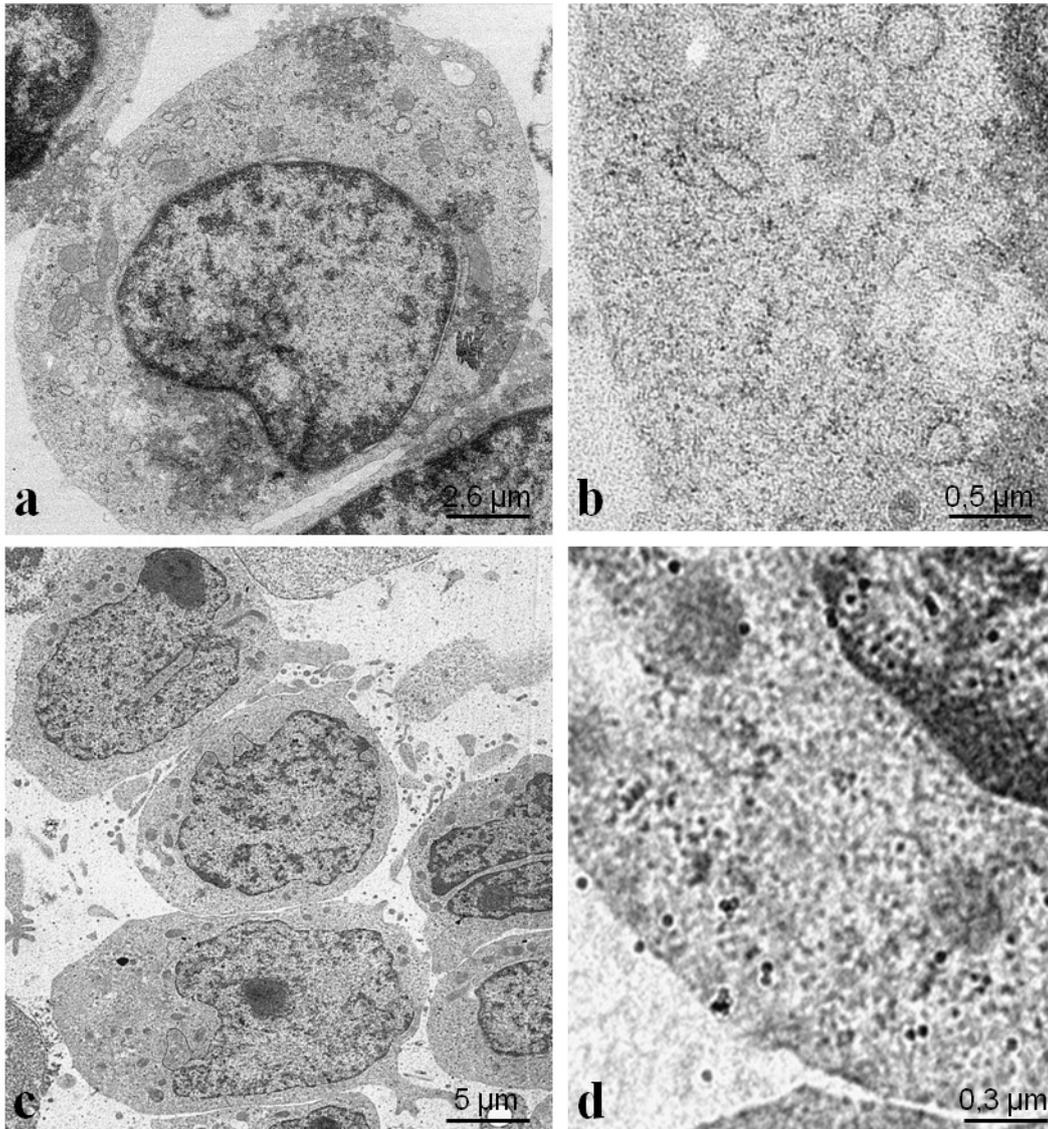
**Fig. 11:** Cellule di linfoma leucemizzato T osservate al TEM: in a-b il controllo (in a scale bar= 3,3  $\mu\text{m}$ , in b scale bar= 0,7  $\mu\text{m}$ ); in c-d cellule trattate con 30  $\mu\text{g}$  di rMnSOD (in c scale bar= 3,5  $\mu\text{m}$ , in d scale bar= 0,8  $\mu\text{m}$ ); in e-f cellule trattate con 15  $\mu\text{g}$  di rMnSOD (in e scale bar= 3,2, in f scale bar= 0,7  $\mu\text{m}$ ). Evidente nel citoplasma dei trattati le particelle di oro colloidale (10  $\text{\AA}$ ) che indicano che la proteina rMnSOD è entrata all'interno della cellula.



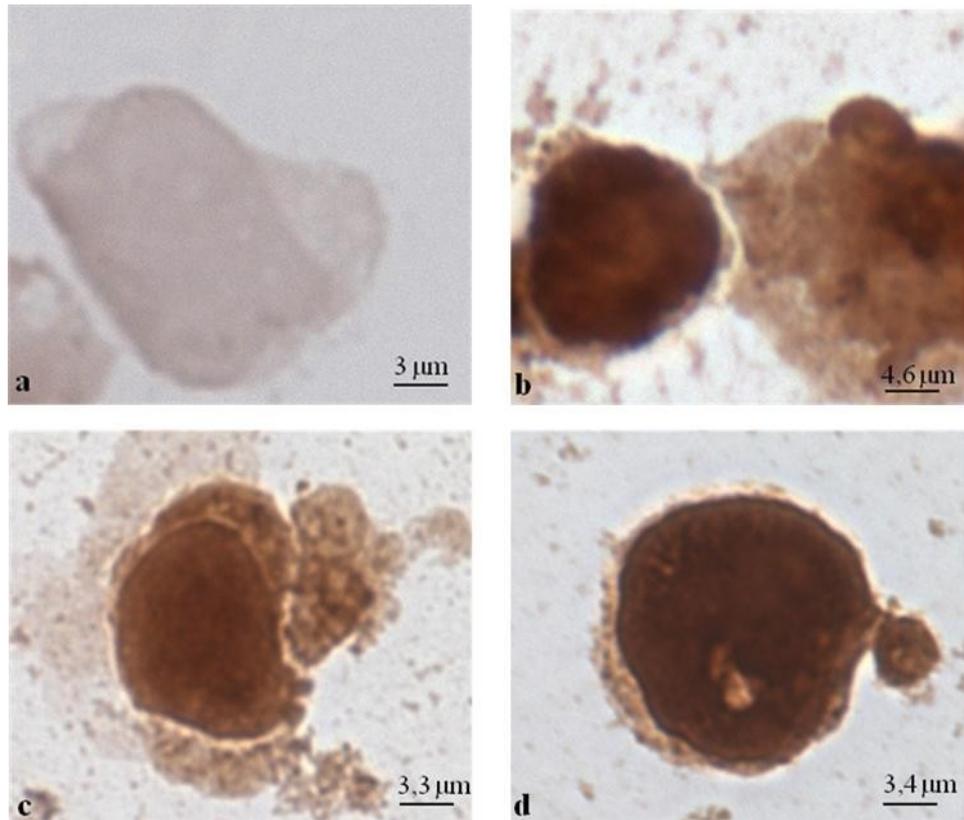
**Fig. 12:** Cellule di Leucemia T osservate al microscopio ottico: in a controllo, in b cellule trattate con 10  $\mu\text{g}$  di rMnSOD, in c cellule trattate con 1  $\mu\text{g}$  di rMnSOD e in d cellule trattate con 0,1  $\mu\text{g}$  di rMnSOD. La marcatura citoplasmatica e in parte anche nucleare è evidente nei trattati.



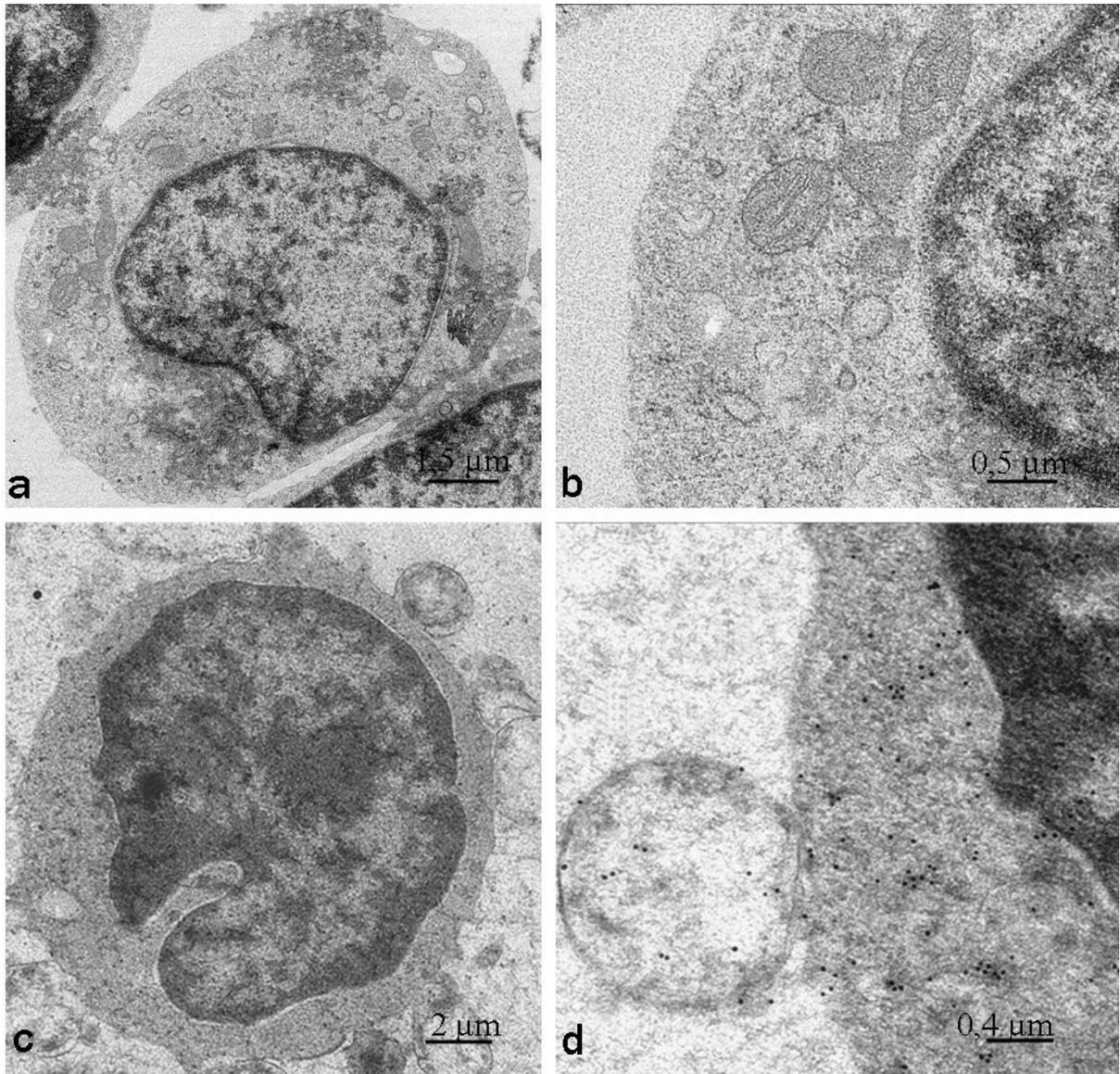
**Fig. 13:** Cellule di Leucemia T osservate al microscopio ottico: in a controllo, in b cellule trattate con 20  $\mu\text{g}$  di rMnSOD, in c cellule trattate con 2  $\mu\text{g}$  di rMnSOD e in d cellule trattate con 0,2  $\mu\text{g}$  di rMnSOD. Le cellule trattate mostrano positività citoplasmatica dovuta all'internalizzazione della rMnSOD. In b cellula con caratteristiche di necrosi cellulare: la cellula si rigonfia e la membrana superficiale inizia a rompersi. In c iniziale frammentazione nucleare e citoplasmatica, segni di apoptosi. In d iniziale frammentazione citoplasmatica, segno di apoptosi.



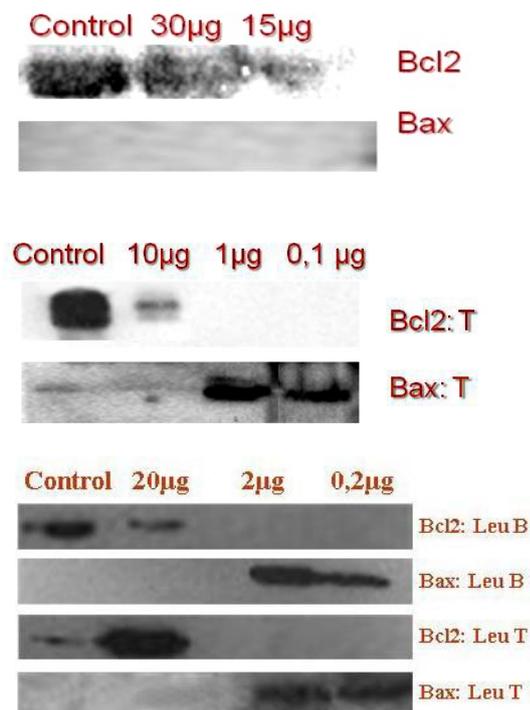
**Fig. 14:** Cellule di Leucemia T osservate al TEM: in a-b controllo, in c-d cellule trattate con 2  $\mu\text{g}$  di rMnSOD. In c è possibile osservare l'iniziale frammentazione nucleare e citoplasmatica, segni di apoptosi. In d marcatura citoplasmatica (particelle di oro colloidale 10  $\text{\AA}$ ).



**Fig. 15:** Cellule di Leucemia B osservate al microscopio ottico: in a controllo, in b cellule trattate con 20 µg di rMnSOD, in c cellule trattate con 2 µg di rMnSOD e in d cellule trattate con 0,2 µg di rMnSOD. Le cellule trattate mostrano positività citoplasmatica dovuta all'internalizzazione della rMnSOD. In b cellula che mostra rottura della membrana superficiale, caratteristica di necrosi cellulare. In c-d iniziale frammentazione nucleare e citoplasmatica, tipici segni di apoptosi.



**Fig. 16:** Cellule di Leucemia B osservate al TEM: in a-b il controllo, in c-d cellule trattate con 2  $\mu\text{g}$  di rMnSOD. In c-d iniziale frammentazione nucleare e citoplasmatica, segni di iniziale apoptosi. In d intensa marcatura citoplasmatica (particelle di oro colloidale 10  $\text{\AA}$ ).



**Fig. 17:** Espressione delle proteine pro-apoptotico Bax e antiapoptotico Bcl2 in linfoma leucemizzato trattato con rMnSOD [30-15µg], in cellule di leucemia T trattate con rMnSOD [10, 1 e 0,1 µg] e in cellule di leucemia sia B che T trattate con rMnSOD [20, 2 e 0,2 µg].

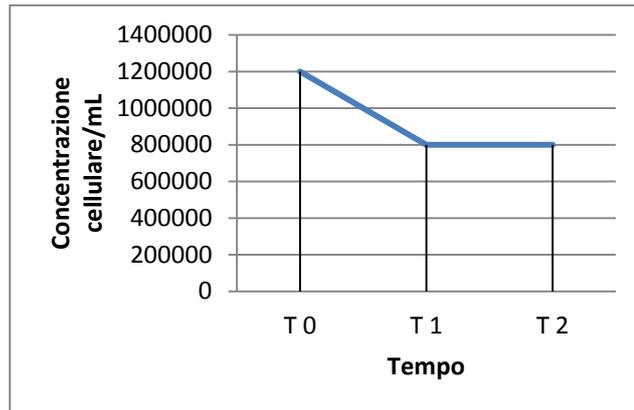
Quindi, gli studi di immunocitochimica in microscopia ottica ed elettronica rivelano un'intensa immunomarcatura dopo il trattamento con concentrazioni di rMnSOD pari a 30, 20, 15 e 10 µg/mL, che diminuisce al diminuire delle concentrazioni di rMnSOD testata. I trattamenti con 30, 20, 15 e 10 µg/mL inducono necrosi; invece i trattamenti con 2, 1, 0,2 e 0,1 µg/mL di rMnSOD inducono l'apoptosi. I segni dell'apoptosi sono rivelabili grazie all'iniziale frammentazione nucleare e citoplasmatica ma anche grazie alla modulazione maggiore dell'apoptotico Bax e dalla modulazione negativa dell'anti-apoptotico Bcl2. La rivelazione molecolare delle proteine apoptotiche, in particolare, mostra che 2 µg/mL di rMnSOD è la dose ottimale per attivare l'apoptosi all'interno delle cellule leucemiche.

#### 4.5 Trattamento con la proteina rMnSOD dei linfoblasti da soggetto sano

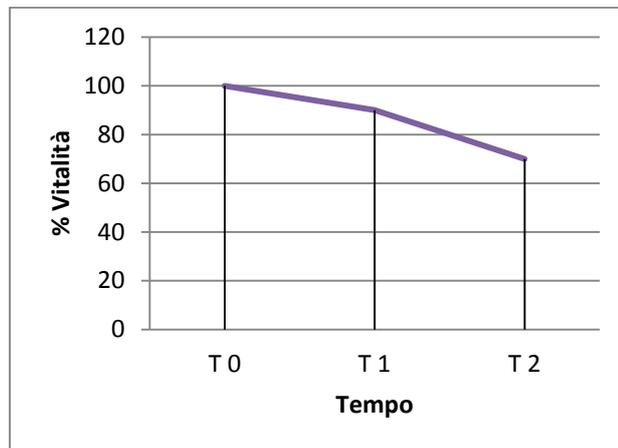
La proteina rMnSOD è stata testata anche su linfoblasti appartenenti ad un soggetto sano in età pediatrica (campione 11), in modo da dimostrare che non ha alcun effetto tossico. Durante i tre giorni di colture cellulari sono stati effettuati: la conta cellulare mediante contaglobuli automatizzato e i saggi di vitalità Trypan Blue e MTT. Ogni giorno le cellule sono state osservate al microscopio ottico invertito per monitorare le condizioni cellulari ed eventuali cambiamenti morfologici.

Campione 11	Conta cellulare	Trypan Blue	MTT	Morfologia
T 0	1200000/mL	100%	90%	MR. DB. Clump assenti
T 1	800000/mL	90%	90%	MR. DA. Clump assenti
T 2	800000/mL	70%	55%	MR. DB.; Presenza di pochi clump
MR. Morfologia regolare; DB. Densità buona; DA. Densità aumentata				

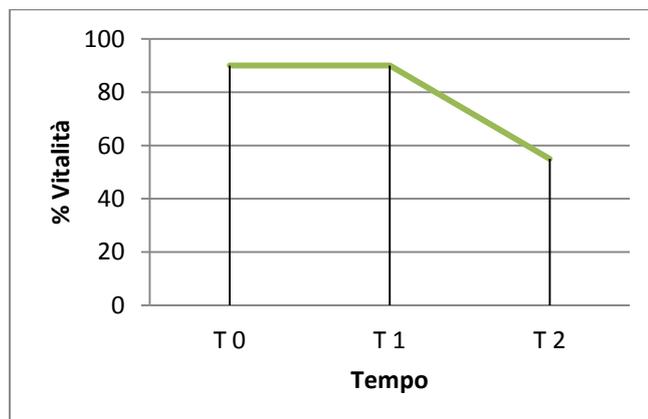
Per studiare l'andamento della crescita nei tre giorni precedenti al trattamento con la rMnSOD, i risultati ottenuti dalla determinazione della concentrazione cellulare e dai saggi di vitalità sono stati riportati in grafici a linee (Grafici 13, 14, 15).



**Grafico 13:** Concentrazione/mL nel tempo delle cellule appartenenti ad un soggetto sano. La concentrazione cellulare tende a diminuire al secondo giorno per poi rimanere costante.



**Grafico 14:** Test Trypan Blue: variazione della vitalità cellulare nel tempo. La vitalità tende leggermente a diminuire con il passare del tempo.



**Grafico 15:** Test MTT: variazione della vitalità cellulare nel tempo. La vitalità tende leggermente a diminuire con il passare del tempo.

I linfoblasti di un soggetto sano, dopo 3 giorni di coltura, sono stati trattati con concentrazioni scalari di rMnSOD: 20, 2 e 0,2 µg/mL. Dopo il trattamento cellulare è stata valutata la vitalità mediante il test Trypan Blue:

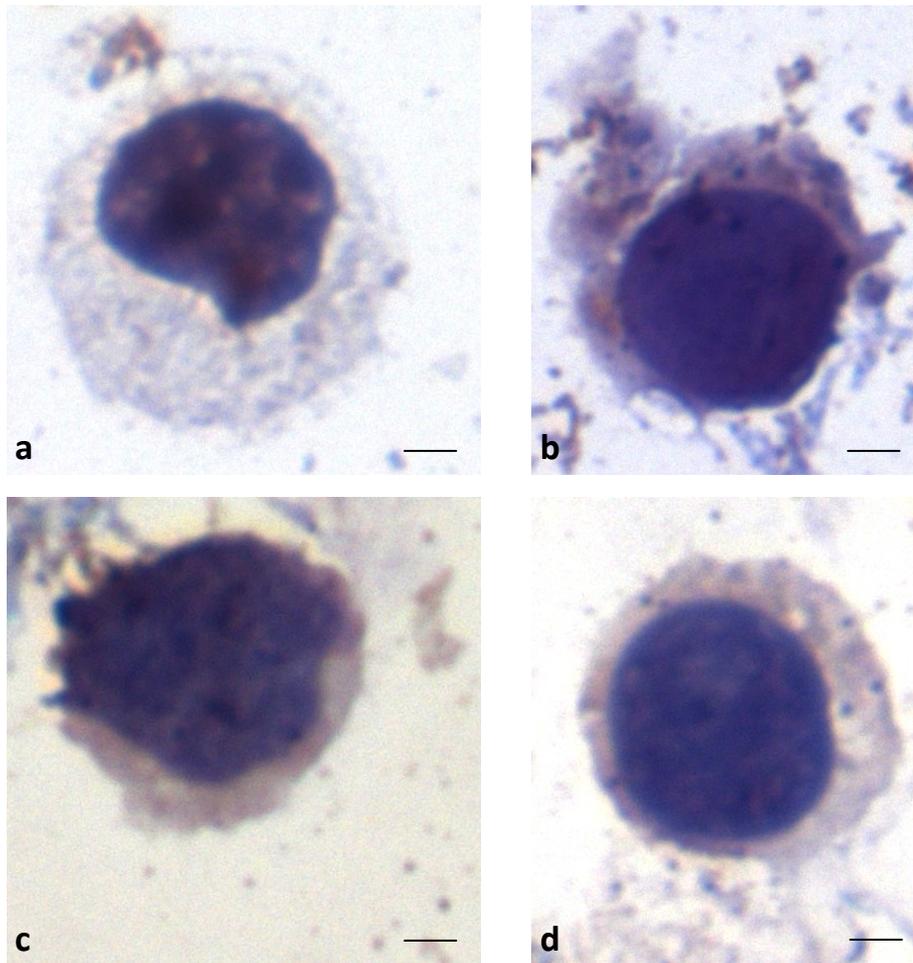
<b>Campione 11</b>	<b>Trypan Blue</b>
Controllo: campione non trattato	100 % vive
Cellule+rMnSOD 20 µg/mL	57 % vive
Cellule+rMnSOD 2 µg/mL	99 % vive
Cellule+rMnSOD 0,2 µg/mL	99 % vive

Dai risultati del test Trypan Blue dopo trattamento, si evince che la rMnSOD non ha effetto tossico sui linfoblasti appartenenti al soggetto sano, fatta eccezione per la concentrazione più alta pari a 20µg/mL. Infatti, è stato ipotizzato che ad alte concentrazioni la rMnSOD diventi tossica per le cellule, inducendo la necrosi cellulare.

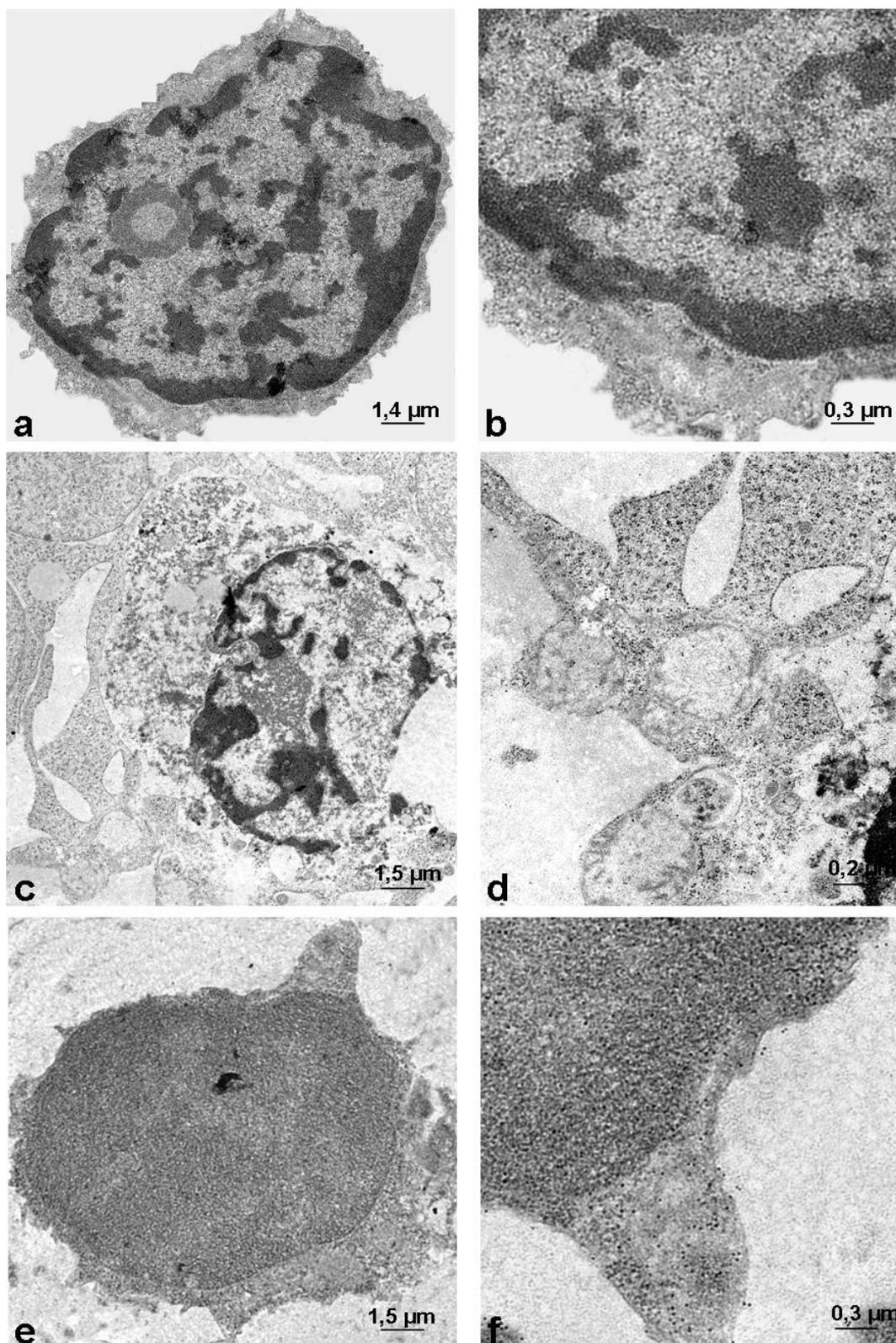
Per la rivelazione immunocitochimica della rMnSOD sono state utilizzate tecniche di immunocitochimica in microscopia ottica ed elettronica.

Dalle Fig. 18-19 è evidente la marcatura citoplasmatica all'interno delle cellule *ex vivo*, per cui la proteina rMnSOD riesce ad entrare in gran parte delle cellule, e ciò è dimostrato anche dalla conta delle cellule marcate al microscopio ottico:

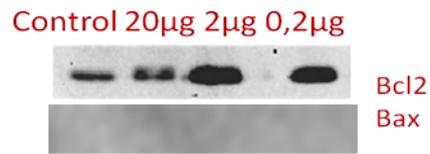
Campione 12 (controllo)	0%
Campione 12 (20 µg/mL)	75%
Campione 12 (2 µg/mL)	70%
Campione 12 (0,2 µg/mL)	60%



**Fig.18:** Linfoblasti appartenenti ad un soggetto sano osservati al microscopio ottico. In a controllo (scale bar= 2  $\mu\text{m}$ ); in b linfoblasto trattato con 20  $\mu\text{g}/\text{mL}$  di rMnSOD che mostra rottura della membrana superficiale, segno di necrosi (scale bar= 1,8  $\mu\text{m}$ ). In c linfoblasto trattato con 2  $\mu\text{g}/\text{mL}$  di rMnSOD (scale bar= 2  $\mu\text{m}$ ) e in d linfoblasto trattato con 0,2  $\mu\text{g}/\text{mL}$  di rMnSOD (scale bar= 1,8  $\mu\text{m}$ ) che non mostrano alcuna alterazione morfologica.



**Fig.19:** Linfoblasti di un soggetto sano osservati al TEM. In a-b controllo; in c-d linfoblasto trattato con 20  $\mu\text{g}/\text{mL}$  di rMnSOD che mostra rottura delle membrane interne e superficiali, segni di necrosi; in e-f linfoblasto trattato con 2  $\mu\text{g}/\text{mL}$  di rMnSOD con marcatura citoplasmatica.



**Fig.20:** Espressione delle proteine Bcl2 e Bax dei linfoblasti non trattati e dei linfoblasti trattati con concentrazioni scarsi di rMnSOD appartenenti ad un soggetto sano. I linfoblasti in seguito al trattamento esprimono solo l'antiapoptotico Bcl2.

Dunque, dai dati ottenuti si può dedurre che la rMnSOD a basse concentrazioni (2 e 0,2 µg) entra nei linfoblasti dove non esercita un effetto tossico.

#### 4.6 Trattamento con la proteina rMnSOD delle linee stabilizzate di LLA T (Jurkat)

La proteina rMnSOD è stata testata anche su linee stabilizzate di LLA T (Jurkat), in modo da confermare le ipotesi fatte su cellule *ex vivo* circa l'effetto della rMnSOD. Prima di effettuare il trattamento con la rMnSOD sono stati effettuati: la conta cellulare mediante contaglobuli automatizzato e i saggi di vitalità Trypan Blue e MTT. Inoltre, per monitorare le condizioni cellulari ed eventuali cambiamenti morfologici, le cellule sono state osservate al microscopio ottico invertito.

	<b>Conta cellulare</b>	<b>Trypan Blue</b>	<b>MTT</b>	<b>Morfologia</b>
<b>Cellule Jurkat</b>	800000/mL	100%	96%	MR. DA. Clump presenti
MR: Morfologia regolare; DA: Densità alta				

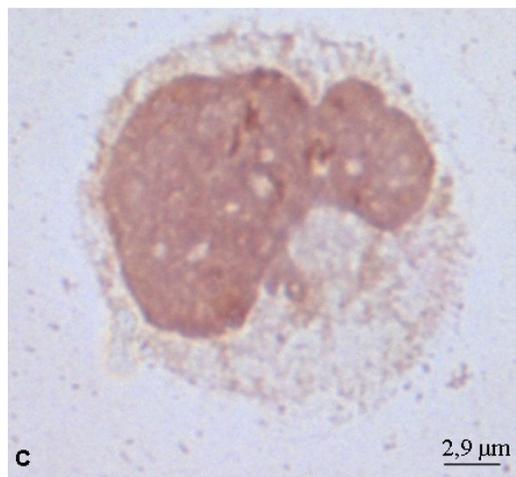
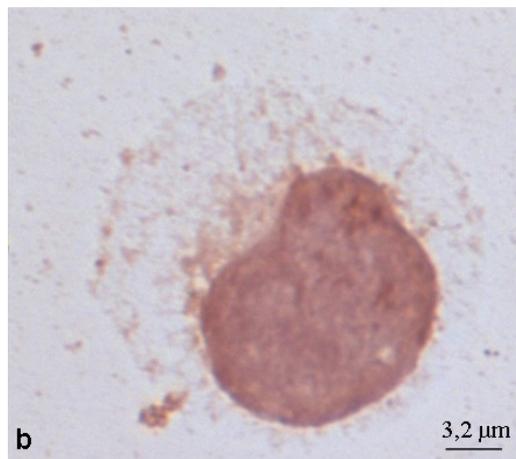
Le cellule Jurkat sono state trattate per 5 ore con concentrazioni scalari di rMnSOD: 20, 2, 0,2 e 1, 0,1  $\mu\text{g/mL}$ . Dopo il trattamento cellulare è stata valutata la vitalità mediante il test Trypan Blue:

<b>Campione</b>	<b>Trypan Blue</b>
Controllo: campione non trattato	100% vive
Cellule Jurkat + rMnSOD 20 $\mu\text{g/mL}$	3% vive
Cellule Jurkat + rMnSOD 2 $\mu\text{g/mL}$	43% vive
Cellule Jurkat + rMnSOD 1 $\mu\text{g/mL}$	73% vive
Cellule Jurkat + rMnSOD 0,2 $\mu\text{g/mL}$	60% vive
Cellule Jurkat + rMnSOD 0,1 $\mu\text{g/mL}$	80% vive

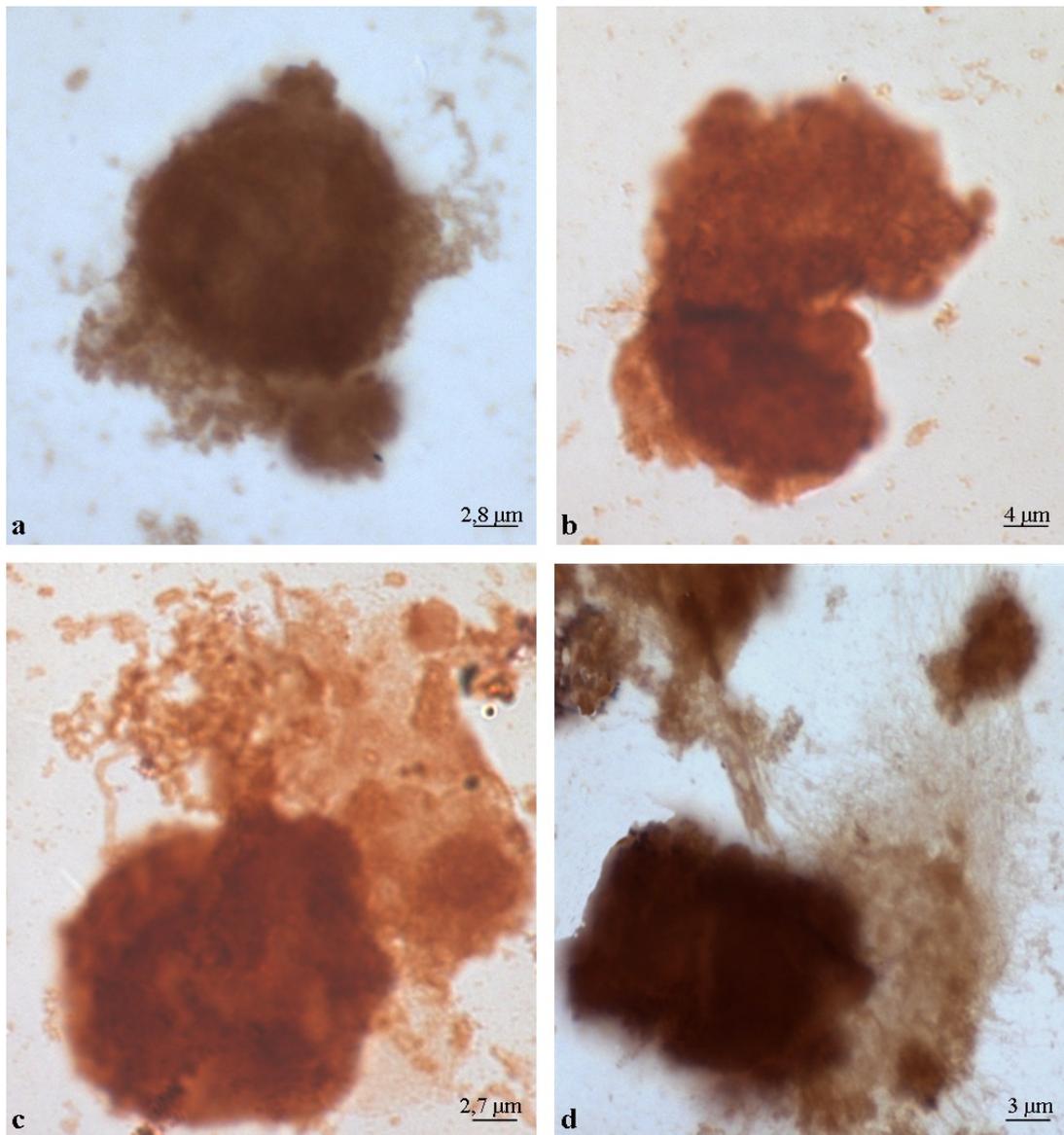
Dai risultati del test Trypan Blue è evidente che più sono alte le concentrazioni della rMnSOD più è alta la mortalità, confermando i risultati ottenuti sulle cellule *ex vivo*.

Dalle Fig. 21-31 è evidente la marcatura citoplasmatica all'interno delle cellule Jurkat, per cui la proteina rMnSOD riesce ad entrare in gran parte delle cellule, e ciò è dimostrato anche dalla conta delle cellule marcate al microscopio ottico:

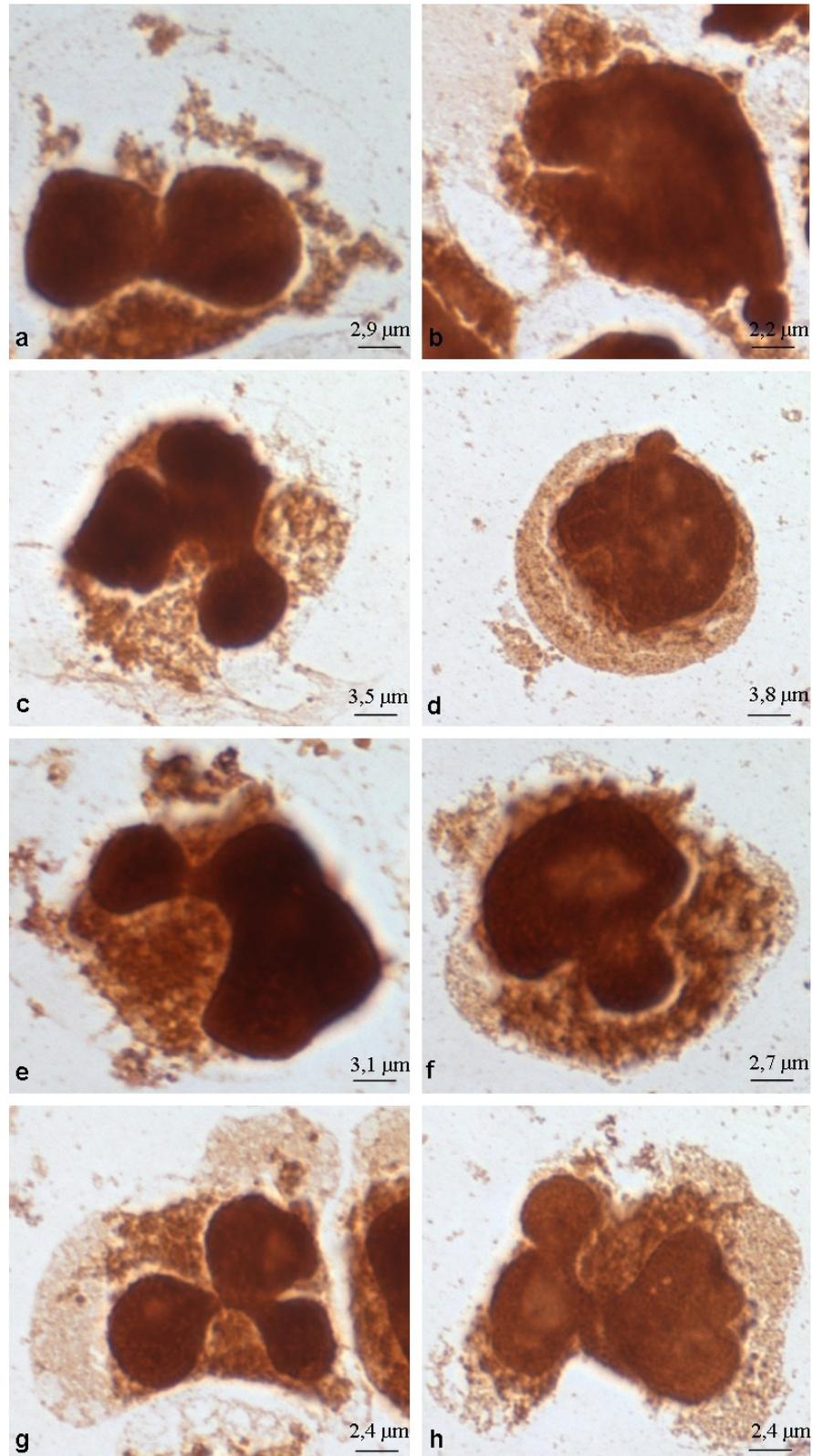
Jurkat (controllo)	0%
Jurkat (20 µg/mL)	100%
Jurkat (2 µg/mL)	73%
Jurkat (1 µg/mL)	70%
Jurkat (0,2 µg /mL)	60%
Jurkat (0,1 µg/mL)	40%



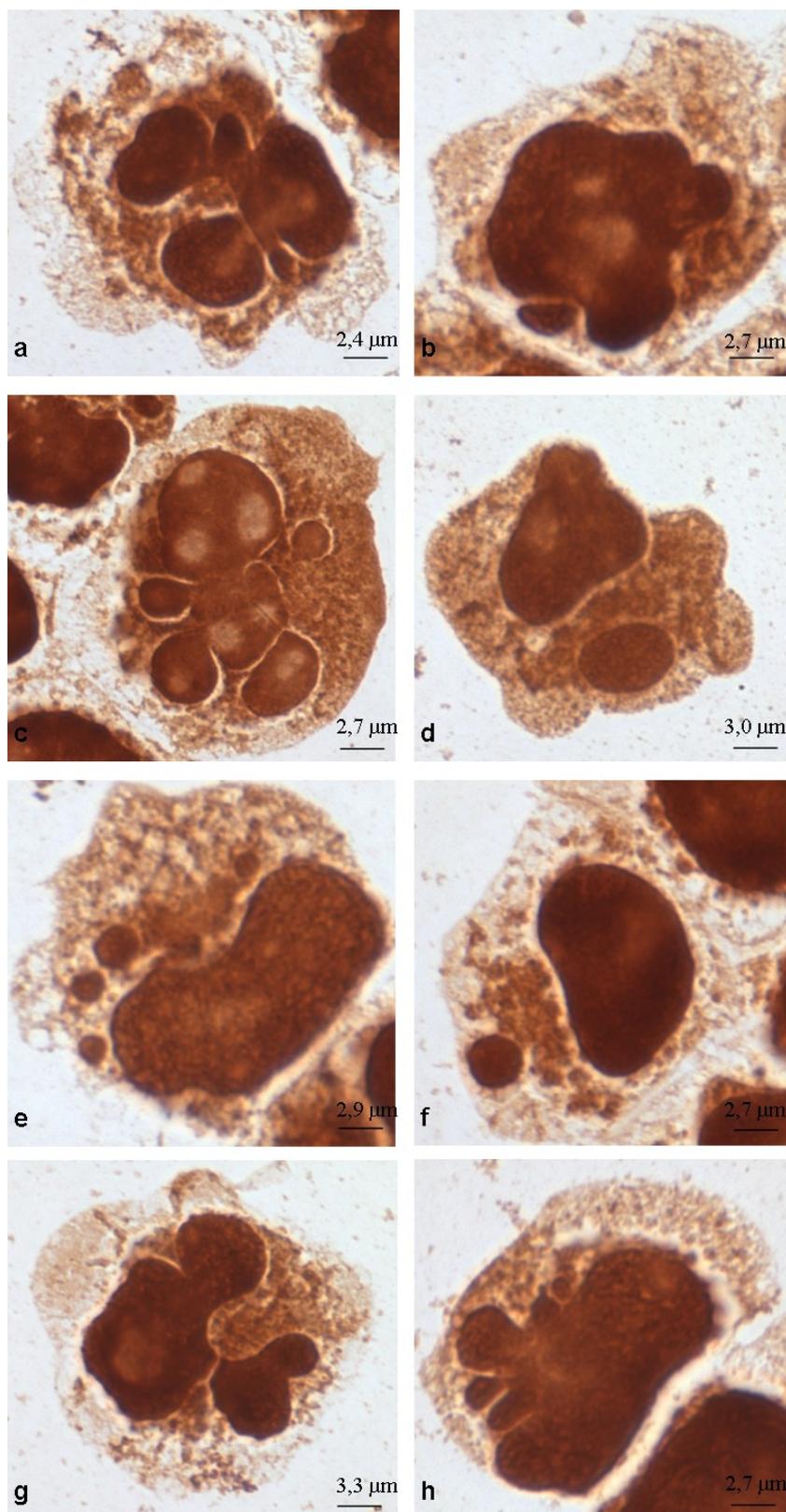
**Fig.21:** In a-b-c cellule Jurkat non trattate con rMnSOD osservate al microscopio ottico. Non si osserva marcatura citoplasmatica.



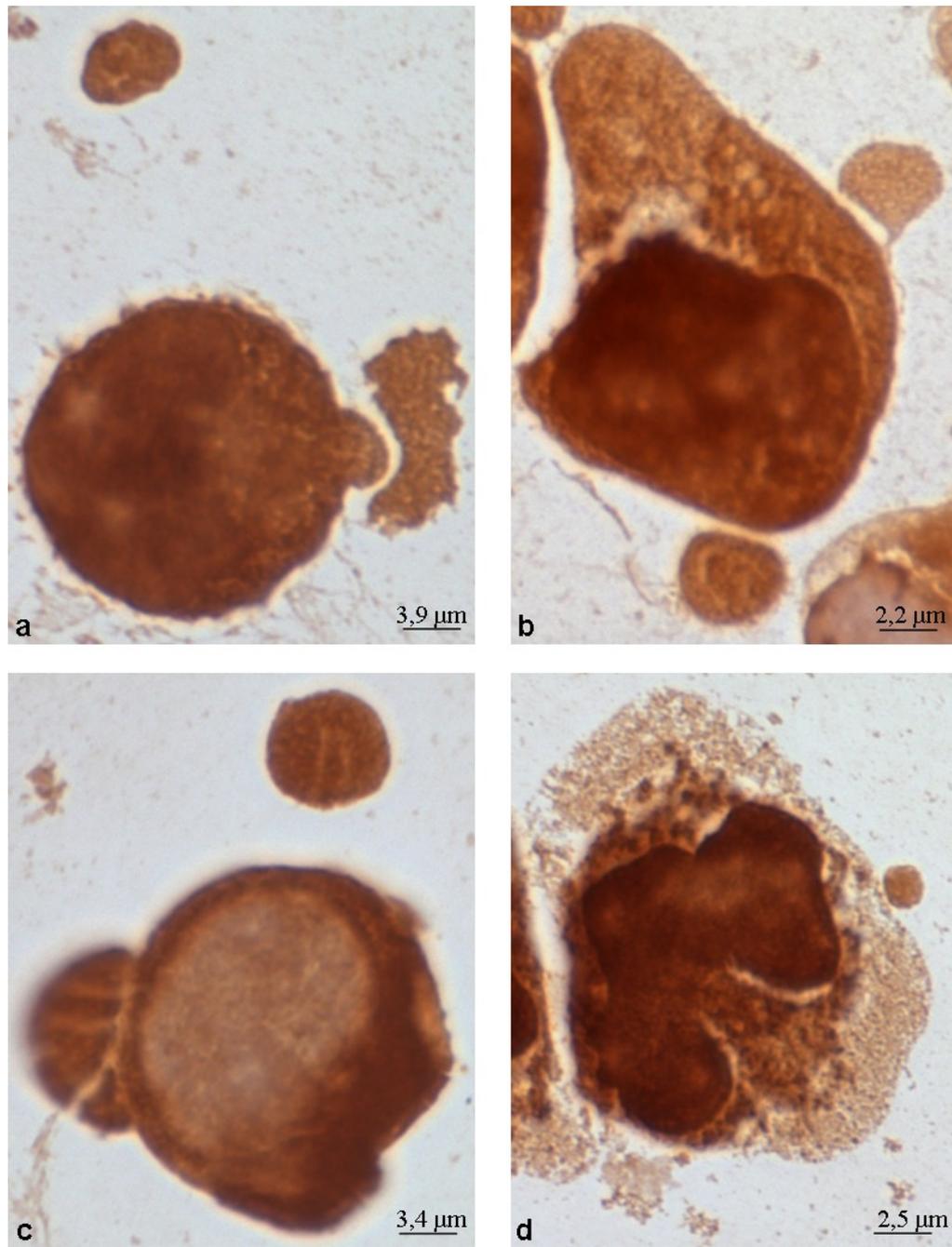
**Fig. 22:** In a-b-c-d cellule Jurkat trattate con 20 µg/mL di rMnSOD osservate al microscopio ottico. Si osserva un'intensa marcatura citoplasmatica e lisi cellulare a vari stadi, caratteristiche di necrosi.



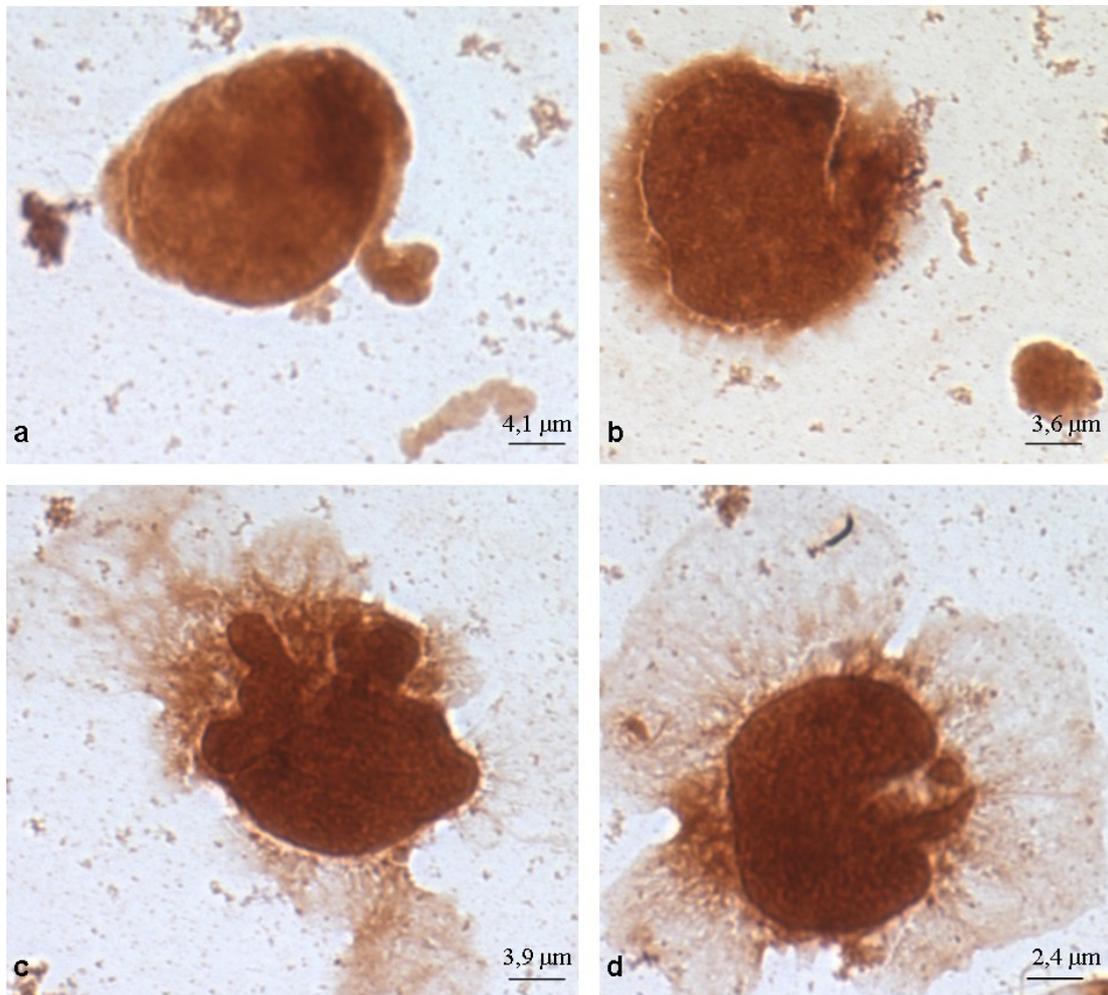
**Fig. 23:** In a-b-c-d-e-f-g-h cellule Jurkat trattate con 2µg/mL di rMnSOD osservate al microscopio ottico. Le cellule mostrano evidente marcatura e diversi stadi di frammentazione nucleare, segno di apoptosi.



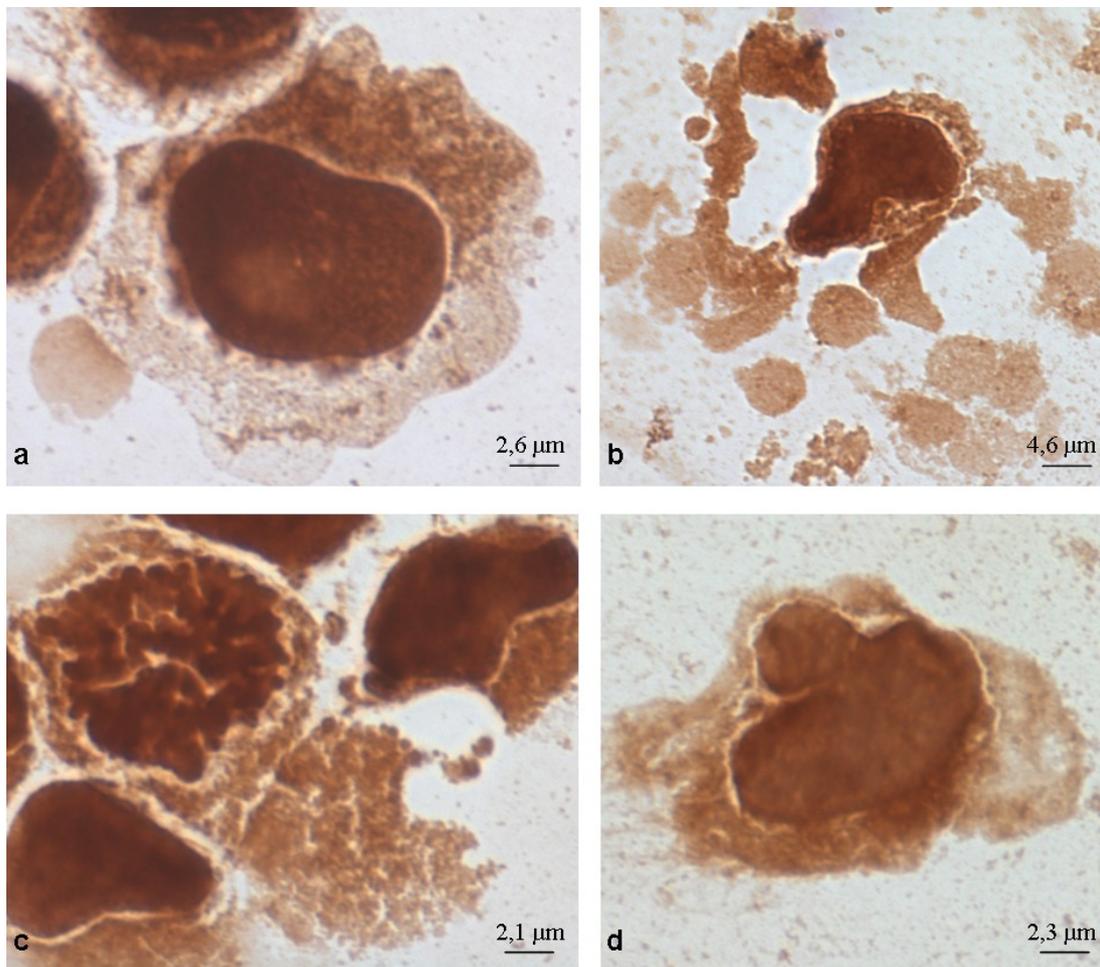
**Fig. 24:** In a-b-c-d-e-f-g-h cellule Jurkat trattate con 2µg/mL di rMnSOD osservate al microscopio ottico. Le cellule mostrano evidente marcatura e frammentazione nucleare completa, segno di apoptosi.



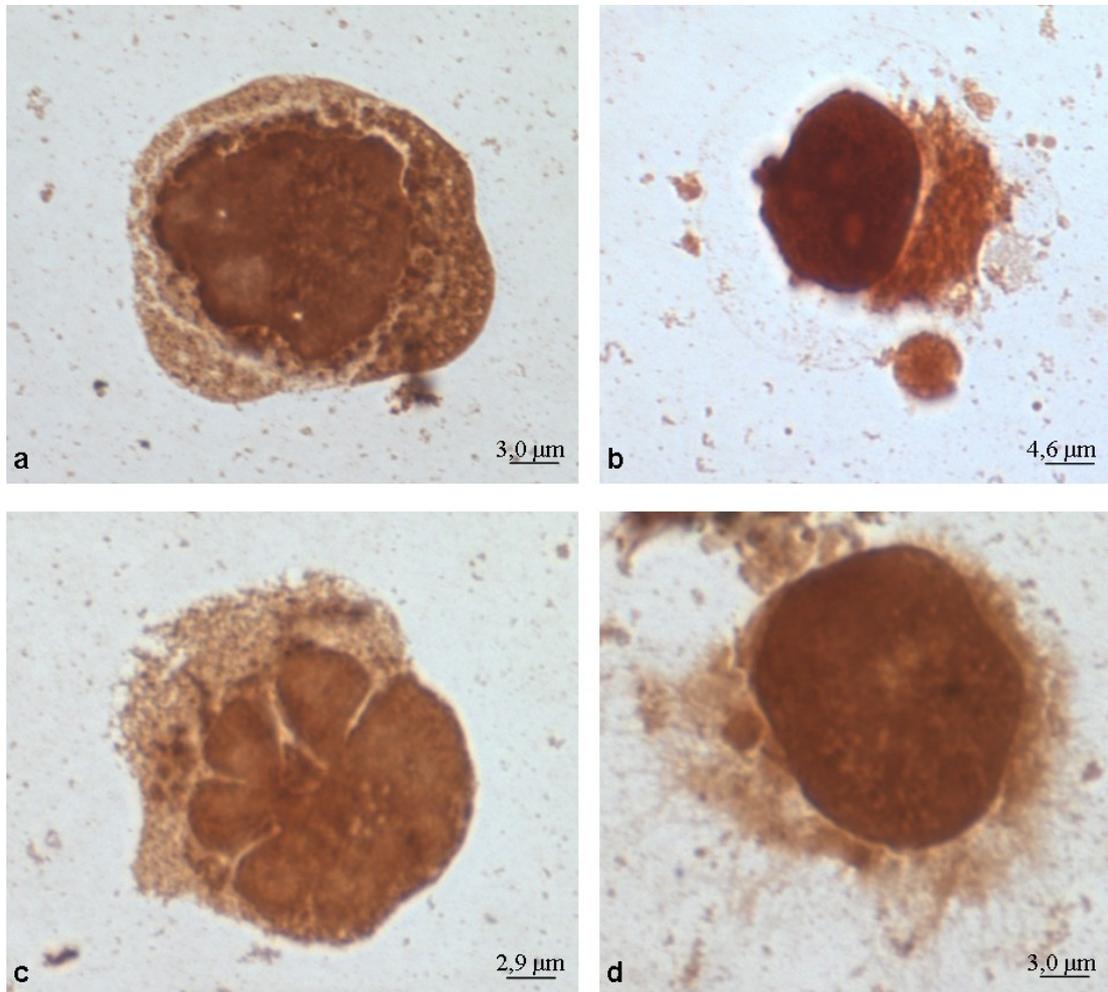
**Fig. 25:** In a-b-c-d cellule Jurkat trattate con  $2\mu\text{g}/\text{mL}$  di rMnSOD osservate al microscopio ottico. Le cellule mostrano evidente marcatura e frammentazione citoplasmatica, segno di apoptosi.



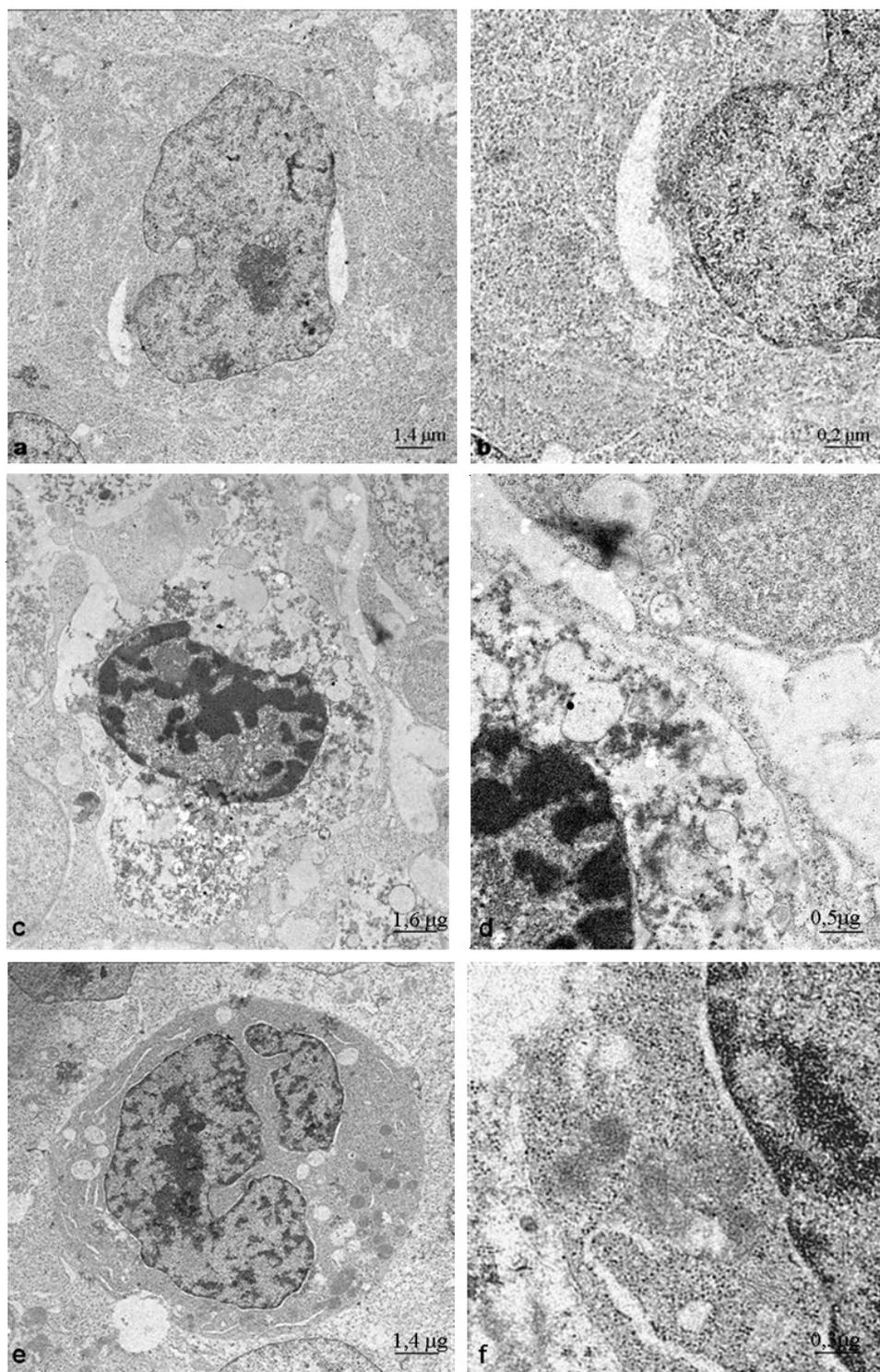
**Fig.26:** In a-b-c-d cellule Jurkat trattate con 1 µg/mL di rMnSOD osservate al microscopio ottico. Le cellule mostrano evidente marcatura, frammentazione citoplasmatica (a, b) e iniziale frammentazione nucleare (c, d), segni di apoptosi.



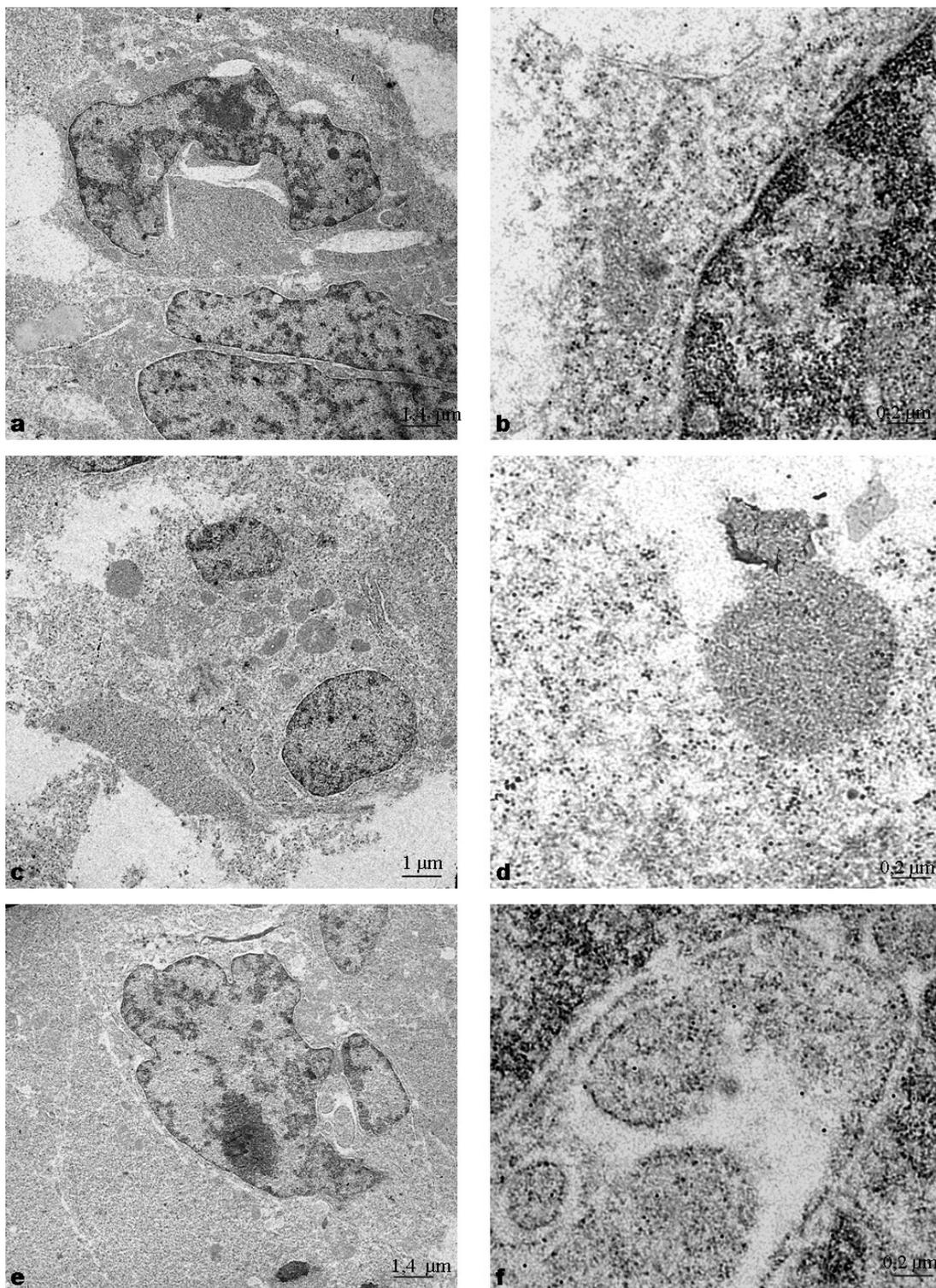
**Fig.27:** In a-b-c-d cellule Jurkat trattate con 0,2µg/mL di rMnSOD osservate al microscopio ottico. Le cellule mostrano frammentazione citoplasmatica e nucleare, segni di apoptosi.



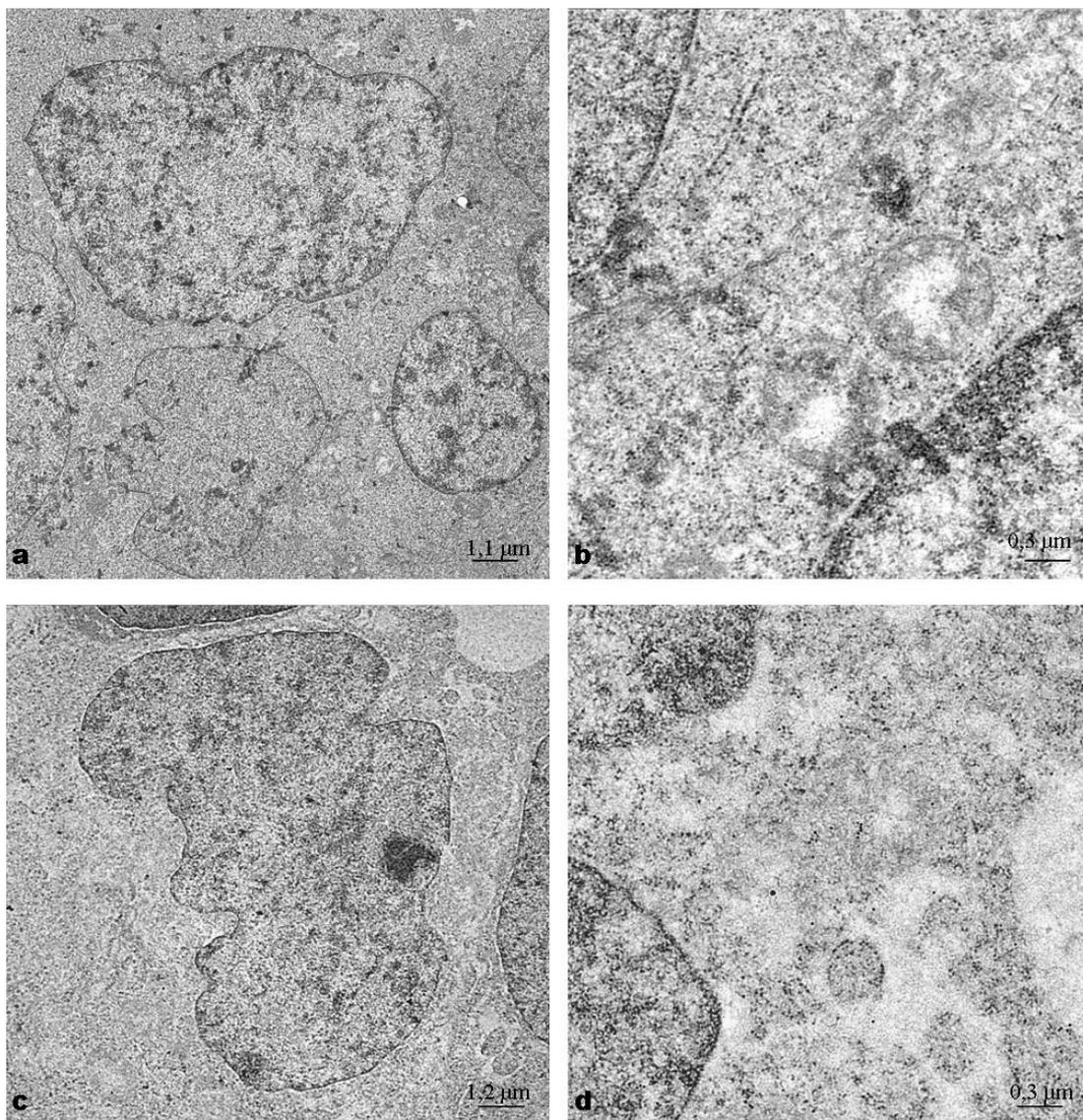
**Fig.28:** In a-b-c-d cellule Jurkat trattate con 0,1µg/mL di rMnSOD osservate al microscopio ottico. Le cellule mostrano frammentazione citoplasmatica e nucleare, segni di apoptosi.



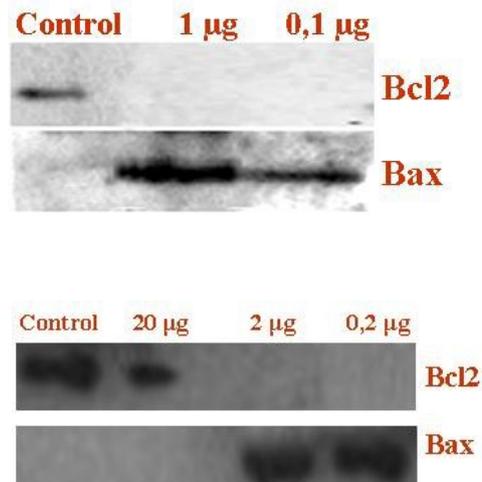
**Fig.29:** Cellule Jurkat osservate al TEM. In a-b controllo. In c-d cellule Jurkat trattate con 20 $\mu$ g/mL che mostrano rottura delle membrane superficiali, segno di necrosi e marcatura citoplasmatica. In e-f cellule Jurkat trattate con 1 $\mu$ g/mL di rMnSOD mostrano frammentazione nucleare (caratteristica di apoptosi) e marcatura citoplasmatica (particelle di oro colloidale di 10 nm  $\varnothing$ ).



**Fig.30:** In a-b-c-d-e-f cellule Jurkat trattate con 2 µg/mL di rMnSOD, osservate al TEM. È evidente la marcatura con particelle di oro colloidale di 10 nm Ø sia a livello citoplasmatico (b, d, f) che mitocondriale (f). È evidente l'iniziale (a) e completa (c, e) frammentazione nucleare e citoplasmatica (c), segni di apoptosi.



**Fig. 31:** In a-b cellule Jurkat trattate con 0,1 µg/mL di rMnSOD osservate al TEM, è evidente la marcatura citoplasmatica e nucleare con particelle di oro colloidale di 10 nm Ø. In c-d cellule Jurkat trattate con 0,2 µg/mL di rMnSOD osservate al TEM, è evidente la marcatura citoplasmatica e nucleare con particelle di oro colloidale di 10 nm Ø.



**Fig. 32:** Espressione delle proteine pro-apoptotico Bax e antiapoptotico Bcl2 in cellule Jurkat trattate con rMnSOD a diverse concentrazioni (20, 2, 1, 0,2 e 0,1 µg/mL).

I dati ottenuti sulle linee stabilizzate (Jurkat) confermano i risultati ottenuti sulle cellule di LLA T *ex vivo*. In particolare sia i risultati di immunocitochimica in microscopia ottica che elettronica (frammentazione nucleare e citoplasmatica) che i risultati di biologia molecolare (maggiore espressione dell'apoptotico Bax e modulazione negativa dell'anti-apoptotico Bcl2) mostrano che 2 µg/mL di rMnSOD è la dose ottimale per attivare l'apoptosi all'interno delle linee stabilizzate di LLA T (Jurkat).

## 5. CONCLUSIONI

Nella cura dei malati oncologici in età pediatrica deve essere prestata la massima attenzione ai problemi psico-emozionali che l'evoluzione della malattia comporta oltre alla sofferenza per la sintomatologia fisica.

Attenzione va posta anche agli effetti collaterali spesso legati alla tipologia di terapia a cui è sottoposto il paziente e di come questi effetti indesiderati influenzino la sua percezione della Qualità di Vita. La terapia più utilizzata oggi per il trattamento delle leucemie linfoblastiche acute in età pediatrica prevede l'utilizzo di protocolli complessi comprendenti "cocktails" di chemioterapici con diversi cicli di consolidamento dopo l'ottenimento della remissione completa (Graux et al., 2011). I pazienti con una mancata risposta a questi trattamenti vengono considerati ad alto rischio di recidiva e quindi trattati con protocolli internazionali ancora più complessi o candidati al trapianto come ultima possibilità (Foster et al., 2011, Hunger et al., 2011). Tuttavia, l'eventuale non disponibilità di donatori compatibili e la valutazione delle possibili complicanze (infezioni secondarie, graft versus host disease) fanno sì che non si possa sempre ricorrere al trapianto di midollo osseo, con il risultato di una prognosi infausta.

La chemioterapia, se da un lato consente la remissione/guarigione in alcune forme di leucemie pediatriche (per esempio la LLA B common), dall'altro pur determinando la riduzione/scomparsa delle masse tumorali, distrugge completamente il midollo osseo emopoietico e le difese immunitarie dell'organismo, con il risultato che quest'ultimo rimane debilitato ed esposto a ricadute e/o a infezioni opportunistiche, talora fatali. Per di più, lo smaltimento della tossicità dei chemioterapici richiede molto tempo (mesi e mesi), molto più della durata di ogni ciclo, per cui quando ci si sottopone alla chemio successiva in genere non si è potuto ancora smaltire l'effetto tossico della

precedente. Come viene riportato nella stessa documentazione dei farmaci da chemioterapia, dosi poco superiori a quelle consigliate, risultano, infatti, pericolose o mortali nel 100% dei casi, tanto che una persona sanissima potrebbe non sopravvivere ad una chemioterapia ad alte dosi. La valutazione etica di tali trattamenti deve tenere conto, inoltre, della potenziale cancerogenicità dei chemioterapici, che possono indurre essi stessi altri tumori nell'organismo debilitato ed anche degli effetti collaterali del trattamento chemioterapico (vomito, caduta dei capelli, depressione ecc.) che alterano la qualità di vita del malato oncologico e che contribuiscono ad accentuare il suo stato di dolore e *fatigue*.

Pertanto, è un imperativo etico per la ricerca oncologica rivolgere l'attenzione allo studio di terapie alternative, per esempio a base di farmaci biotecnologici, detti anche farmaci "intelligenti", ovvero sostanze dirette contro un preciso bersaglio molecolare all'interno della cellula cancerosa o qualsiasi altra molecola efficace nella riduzione del tumore e capace di limitare gli effetti collaterali provocati dalle attuali terapie. È da tenere presente che le aziende farmaceutiche hanno poco interesse ad investire nello sviluppo di nuovi farmaci per la popolazione oncologica pediatrica, per motivi di natura economica, essendo ristretto il numero di pazienti utilizzatori di tali farmaci.

Una molecola di recente scoperta, buona candidata per una terapia alternativa, è la rMnSOD, un agente biologico non tossico per le cellule sane, capace di indurre selettivamente morte cellulare e inibizione della crescita in numerose linee cellulari tumorali (MCF-7, OVCAR-3, MIA PaCa 2, A375, NCI-28) (Mancini et al., 2006; Mancini et al., 2008). Il sorprendente effetto della rMnSOD è dovuto alla sua abilità di entrare, grazie al suo peptide leader, in tutte le cellule e di esplicare un'azione tossica sulle sole cellule tumorali.

I dati presentati in questo lavoro hanno dimostrato come il peptide leader della rMnSOD sia in grado di entrare all'interno delle cellule leucemiche. I risultati ottenuti su cellule *ex vivo* in seguito al trattamento con il peptide leader

coniugato a cisplatino ed epirubicina non sono stati molto soddisfacenti, probabilmente perché i due citostatici utilizzati non sono efficaci nel trattamento delle leucemie linfoblastiche acute in età pediatrica. In seguito al trattamento con la proteina rMnSOD, delle cellule *ex vivo* di LLA B e T e delle linee cellulari stabilizzate (cellule Jurkat), è stata ottenuta, invece, una marcata diminuzione della vitalità cellulare, dimostrando così l'efficacia della rMnSOD nei confronti delle cellule neoplastiche trattate. Le osservazioni morfologiche hanno consentito, inoltre, di supporre che le cellule trattate con rMnSOD alle concentrazioni di 2 µg/mL, 1 µg/mL, 0,2 µg/mL e 0,1 µg/mL siano state indotte all'apoptosi (morte cellulare programmata), come dimostrato dalla condensazione della cromatina, dalla frammentazione nucleare e dalla vescicolazione citoplasmatica osservate.

L'induzione dell'apoptosi in seguito al trattamento con rMnSOD, va essenzialmente ricondotta alla produzione ed accumulo di perossido d'idrogeno nelle cellule leucemiche a causa del ridotto livello di catalasi presente nelle cellule neoplastiche (Battisti et al., 2008).

L'entità delle alterazioni morfologiche osservate nelle cellule trattate con rMnSOD alla concentrazione di 2 µg/mL ha suggerito che questa concentrazione sia la più efficace, tra quelle sperimentate. Tale dato è stato confermato dai risultati di biologia molecolare, infatti la massima espressione dei geni proapoptotici (Bax) e la minima espressione dei geni antiapoptotici (Bcl-2) è stata osservata proprio nelle cellule trattate con 2 µg/mL. Al contrario, nelle cellule trattate con rMnSOD a concentrazioni superiori (30, 20, 15, 10 µg/mL), le analisi molecolari non hanno mostrato attivazione dei geni proapoptotici; le cellule leucemiche sono quindi morte per necrosi (morte per cause non naturali). La rMnSOD, infatti, ad alte concentrazioni diventa citotossica e induce la lisi, di conseguenza la morte, sia delle cellule neoplastiche che delle cellule sane.

Quindi, la rMnSOD entra nelle cellule leucemiche per effetto della sua porzione leader e, grazie alla sua capacità di indurre, a basse concentrazioni (2  $\mu\text{g/mL}$ ), la produzione di elevate quantità di perossido d'idrogeno, ne inibisce la proliferazione, uccidendole; nello stesso tempo svolge un effetto benefico sulle cellule sane nelle quali le elevate quantità di  $\text{H}_2\text{O}_2$  prodotte, vengono convertite dalle catalasi in ossigeno ed acqua, determinando così una benefica ossigenazione delle stesse. Pertanto, la rMnSOD potrebbe rivelarsi un efficace farmaco antitumorale, non tossico come i chemioterapici, per il trattamento delle leucemie ad alto rischio; rispettando così i canoni etici che prevedono l'utilizzo di farmaci efficaci che non inducano effetti collaterali. Il suo peptide leader che si è dimostrato capace di penetrare all'interno delle cellule leucemiche potrebbe alternativamente, essere utilizzato quale carrier di citostatici a dosi ridottissime limitando notevolmente gli effetti collaterali. Occorrerà effettuare altri esperimenti per definire il tipo di chemioterapico efficace a dosi micro molar per la cura della leucemia linfoide ad alto rischio nei pazienti pediatrici, a prognosi infausta.

## 6. BIBLIOGRAFIA

Abuja PM, Alberini R (2001) Methods for monitoring oxidative stress, lipid peroxidation and oxidation resistance of lipoproteins. *Clin Chim Acta*; 306: 1-17.

Anderson RA, Wallace WHB, Baird DT (2008) Ovarian cryopreservation for fertility preservation: indications and outcomes. *Reproduction*; 136: 681-689.

art. 32 (Costituzione Italiana): La Repubblica tutela la salute come fondamentale diritto dell'individuo e interesse della collettività, e garantisce cure gratuite agli indigenti. Nessuno può essere obbligato a un determinato trattamento sanitario se non per disposizione di legge. La legge non può in nessun caso violare i limiti imposti dal rispetto della persona umana.

Avery SV (2011) Molecular targets of oxidative stress. *Biochem J*; 434: 201-210.

Barber DA, Harris SR (1994) Oxygen free radicals and antioxidants: a review. *Am. Pharm. NS34*: 26-35.

Bassan R, Hoelzer D (2011) Modern Therapy of Acute Lymphoblastic Leukemia. *J Clin Oncol*; 29: 532-543.

Battisti V, Maders LD, Bagatini MD, Santos KF, Spanevello RM, Maldonado PA, Brulé AO, Araújo Mdo C, Schetinger MR, Morsch VM (2008) Measurement of oxidative stress and antioxidant status in acute lymphoblastic leukemia patients. *Clin Biochem.*; 41 (7-8): 511-8.

Benini F (2000) Presentazione delle Linee Guida dell'Organizzazione Mondiale della Sanità per il controllo del cancro e cure palliative. Il dolore del bambino: si può e si deve combattere. Giornata di aggiornamento professionale 27 Maggio 2000 A cura di A. Pozzella, I. Pierucci e G. Di Vita Presidio Ospedaliero dell' "Immacolata" di Sapri (SA) – A.S.L. SA/3.

Bennett JM, Catovsky D, Daniel MT, Flandrin G., Galton DAG, Gralnick HR, Sultan C (1976) Proposals for the classification of the acute leukaemias. French-American-British (FAB) co-operative group. *Br J Haematol.*; 33: 451-458.

Bensaad K, Vousden KH (2005) Savior and slayer: the two faces of p53. *Nat Med*;11 (12): 1278-9.

Betteridge DJ (2000) What is oxidative stress? *Metabolism*; 49 (2 Suppl 1): 3-8.

Blumenthal D (1992) Academic-Industry Relationship in the Life Sciences. Extent, Consequences and Management. *J.A.M.A.* 268: 3344-3349.

Borrelli A, Schiattarella A, Mancini R, Morrica B, Cerciello V, Mormile M, D'Alesio V, Bottalico L, Morelli F, D'Armiento M, D'Armiento FP, Mancini A (2009) A recombinant MnSOD is radioprotective for normal cells and radiosensitizing for tumor cells. *Free Radical Biology & Medicine*; 46: 110–116.

Borrelli A, Schiattarella A, Mancini R, Morelli F, Capasso C, De Luca V, Gori E, Mancini A (2011) The leader peptide of a human rec. MnSOD as molecular

carrier which delivers high amounts of Cisplatin into tumor cells inducing a fast apoptosis in vitro. *Int J Cancer*; 128 (2): 453-9.

Boyd KM, Higgs R, Pinching AJ (1997) *The New Dictionary of Medical Ethics*. B.M.J. Publishing group. London; 53.

Brandon M, Baldi P, Wallace DC (2006) Mitochondrial mutations in cancer. *Oncogene*; 25 (34): 4647-4662.

Braverman A (1991) "Medical Oncology in the 90s". *Lancet*, vol. 337, p. 901.

Brodie SJ, Biley FC (1999) An exploration of the potential benefits of pet-facilitated therapy. *J Clin Nurs*; 8 (4): 329-37.

Campana D (2004) Minimal Residual Disease Studies in Acute Leukemia. *Am J Clin Pathol*; 122 (Suppl 1): S47-S57.

Campioni S, Mannini B, Zampagni M, Pensalfini A, Parrini C, Evangelisti E, Relini A, Stefani M, Dobson CM, Cecchi C, Chti F (2010) A causative link between the structure of aberrant protein oligomers and their toxicity. *Nat Chem Biol*; 6 (2): 140-147.

Casavola FP (2009) problemi bioetici nella sperimentazione clinica con disegno di non-inferiorità. Presidenza del Consiglio dei Ministri, Atti Comitato Nazionale per la Bioetica.

Casavola FP (2011) La sperimentazione farmacologica nei paesi in via di sviluppo. Presidenza del Consiglio dei Ministri. Atti Comitato Nazionale per la Bioetica.

Cervato G, Viani P, Gatti P, Cazzola R, Cestaro B (1993) Further studies on the antioxidant role of pyrophosphate in model membranes. *Chem Phys Lipids*. 1993; 66 (1-2): 87-92.

Chaturvedi S, Hamilton AJ, Hobby P, Zhu G, Lowry CV, Chaturvedi V (2001) Molecular cloning, phylogenetic analysis and three-dimensional modeling of Cu,Zn superoxide dismutase (CnSOD1) from three varieties of *Cryptococcus neoformans*. *Gene*; 268 (1-2): 41-51.

Chomczynski P, Sacchi N (1987) Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem*; 162 (1): 156-9.

Clarkson PM, Thompson HS (2000) Antioxidants: what role do they play in physical activity and health? *Am J Clin Nutr*; 72 (2 Suppl): 637S-46S.

Della Corte F, D'Ippolito S (1999) *Fondamenti di Ematologia Umana e Comparata*. Liguori Editore, Napoli pag. 217-219.

European Parliament, The Council European Union, Regulation (EC) No 726/2004 of 31 March 2004 laying down Community procedures for the authorisation and supervision of medicinal products for human and veterinary use and establishing a European Medicine Agency.

[http://eceuropa.eu/enterprise/pharmaceuticals/review/doc/final\\_publ/reg\\_2004\\_726\\_0040430\\_enpdf](http://eceuropa.eu/enterprise/pharmaceuticals/review/doc/final_publ/reg_2004_726_0040430_enpdf). 2004; last access 4 June 2007.

Ferlay J, Bray F, Sankila R, Parkin DM (1999) Cancer incidence, mortality and prevalence in the European Union. Lyon: IARC Cancer Base No. 4 version 5.0.

Ferlay J, Bray F, Pisani P, Parkin DM (2001) Cancer incidence, mortality and prevalence worldwide, version 1.0. Lyon: IARC Press. IARC Cancer Base No. 5.

Fielding A (2008) The treatment of adults with acute lymphoblastic leukemia. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*; 381-9.

Foster JH, Hawkins DR, Loken MR, Wells DA, Thomson B (2011) Minimal residual disease detected prior to hematopoietic cell transplantation. *Pediatr Blood Cancer*; 57 (1): 163-165.

Freeman TA, Parvizi J, Della Valle CJ, Steinbeck MJ (2009) Reactive oxygen and nitrogen species induce protein and DNA modifications driving arthrofibrosis following total knee arthroplasty. *Fibrogenesis Tissue Repair*; 2 (1): 1-11.

Fury MG, Sherman E, Haque S, Korte S, Lisa D, Shen R, Wu N, Pfister D (2011) A phase I study of daily everolimus plus low-dose weekly cisplatin for patients with advanced solid tumors. *Cancer Chemother Pharmacol*. [Epub ahead of print].

Gao F, Nordin P, Krantz I, Chia K, Machin D (2005) Variation in the seasonal diagnosis of acute lymphoblastic leukemia: evidence from Singapore, the United States, and Sweden. *Am J Epidemiol*; 162: 753-763.

Graux C (2011) Biology of acute lymphoblastic leukemia (ALL): Clinical and therapeutic relevance. *Transfusion and Apheresis Sciences*; 44 (2): 183-189.

Greaves M (2006) Infection, immune responses and aetiology of childhood leukaemia. *Nat Rev Cancer*; 6: 193-203.

Halliwell B (2007) Oxidative stress and cancer: have we moved forward? *Biochem J*. 1; 401 (1): 1-11.

Hanahan D, Weinberg RA (2000) The hallmarks of cancer. *Cell* 100 (1): 57-70.

Hofseth LJ, Saito S, Hussain SP, Espey MG, Miranda KM, Araki Y, Jhappan C, Higashimoto Y, He P, Linke SP, Quezado MM, Zurer I, Rotter V, Wink DA, Appella E, Harris CC (2003) Nitric oxide-induced cellular stress and p53 activation in chronic inflammation. *Proc Natl Acad Sci USA*. 7; 100 (1): 143-8.

Hofseth LJ, Hussain SP, Harris CC (2004) p53: 25 years after its discovery. *Trends Pharmacol Sci*; 25 (4): 177-81.

Hunger SP, Raetz EA, Loh ML, Mullighan CG (2011) Improving outcomes for high-risk ALL: translating new discoveries into clinical care. *Pediatr Blood Cancer*; 56 (6): 984-993.

Inoue M, Sato EF, Nishikawa M, Park A, Kira Y, Imada I, Utsumi K (2003) Mitochondrial generation of reactive oxygen species and its role in aerobic life. *Curr. Med. Chem*; 10: 2495-2505.

Jeruss JS, Woodruff TK (2009) Preservation of fertility in patients with cancer. *N Engl J Med*; 360: 902-11.

Klaunig JE, Kamendulis LM (2004) The role of oxidative stress in carcinogenesis. *Ann Rev Pharmacol Toxicol*, 44: 239-267.

Klaunig JE, Wang Z, Pu X, Zhou S (2011) Oxidative stress and oxidative damage in chemical carcinogenesis. *Toxicol Appl Pharmacol*; 15; 254 (2): 86-99.

Kubler-Ross E (Traduttore: Di Zoppola C.) (2005) *La morte e il morire* Psicoguide Ed. Cittadella, Assisi, n°13.

Levine J, Canada A, Stern CJ (2010) Fertility preservation in adolescent and young adults with cancer. *J Clin Oncol*. 28: 4831-4841.

Lu AL, Li X, Gu Y, Wright PM, Chang DY (2001) Repair of oxidative DNA damage : mechanism and functions. *Cell Biochem Biophys*; 35 (2): 141-170.

Lübbe AS, Bergemann C, Riess H, Schriever F, Reichardt P, Possinger K, Matthias M, Dörken B, Herrmann F, Gürtler R, Hohenberger P, Haas N, Sohr R, Sander B, Lemke AJ, Ohlendorf D, Huhnt W, Huhn D (1996) Clinical experiences with magnetic drug targeting: a phase I study with 4'-epidoxorubicin in 14 patients with advanced solid tumors. *Cancer Res*. 15; 56 (20): 4686-93.

Luo C, Wu XG (2011) Lycopene Enhances Antioxidant Enzyme Activities and Immunity Function in N-Methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine-Induced Gastric Cancer Rats. *Int J Mol Sci.*; 12 (5): 3340-51.

Mancini A, Borrelli A, Schiattarella A, Fasano S, Sehr P, Occhiello A, Pica A, Tommasino M, Nuesch JPF, Rommelaere J (2006) Tumor suppressive activity of a novel isoform of Mn-Superoxide-dismutase released by a human liposarcoma cell line. *Int. J. Cancer*; 119: 932-943.

Mancini A, Borrelli A, Schiattarella A, Aloj L, Aurilio M, Morelli F, Pica A, Occhiello A, Lorizio R, Mancini R, Sica A, Mazzarella L, Sica F, Grieco P, Novellino E, Pagnozzi D, Pucci P, Rommelaere J (2008) Biophysical and biochemical characterization of a liposarcoma-derived recombinant MnSOD protein acting as an anticancer agent. *Int. J. Cancer*; 123: 2684-2695.

Matès JM, Pérez-Gómez C, Núñez de Castro I (1999) Antioxidant enzymes and human diseases. *Clin Biochem*; 32 (8): 595-603.

McCord JM, Fridovich I (1969) Superoxide dismutase. An enzymic function for erythrocyte hemocuprein (hemocuprein). *J Biol Chem.*; 244 (22): 6049-55.

Mehta K, Siddik ZH (2009) *Drug Resistance in Cancer Cells*. Springer; 140-144.

Oberley LW (2005) Mechanism of the tumor suppressive effect of MnSOD overexpression. *Biomed Pharmacother*; 59 (4): 143-8.

Ookawara T, Kizaki T, Takayama E, Imazeki N, Matsubara O, Ikeda Y, Suzuki K, Li Ji L, Tadakuma T, Taniguchi N, Ohno H (2002) Nuclear translocation of extracellular superoxide dismutase. *Biochem Biophys Res Commun.* 9; 296 (1): 54-61.

Pamio M (2008) Cancro Spa. Leggere attentamente le avvertenze e le modalità d'uso. Ed. Il Nuovo Mondo, Rimini.

Pitt M, Gostin LL (1994) Conflict of Interest in Biomedical Research. *J.A.M.A.* 271: 547-551.

Pui CH, Williams WE (2006) Treatment of acute lymphoblastic leukemia. *N Engl J Med.*; 354: 166-178.

Pui CH (2010) Recent research advances in childhood acute lymphoblastic leukemia. *J Formos Med Assoc*; 109 (11): 777-787.

Pullen J, Shuster JJ, Link M, Borowitz M, Amylon M, Carroll AJ, Land V, Look AT, McIntyre B, Camitta B (1999) Significance of commonly used prognostic factors differs for children with T-cell acute lymphoblastic leukemia (ALL) compared with those with B-precursor ALL: a Pediatric Oncology Group Study. *Leukemia*;13: 1696–1707.

Ransom S (2002) Great News on Cancer in the 21st Century. Credence Publications, UK.

Ricciuti A (2006) La terapia di supporto di medicina generale in chemioterapia oncologica. Ed. F. Angelini, Milano.

Ridnour LA, Oberley TD, Oberley LW (2004) Tumor suppressive effects of MnSOD overexpression may involve imbalance in peroxide generation versus peroxide removal. *Antioxid Redox Signal*; 6 (3): 501-12.

Russel WMS, Burch RL (1959) The principle of human experimental technique. London: Meuthen (University Federation for Animal Welfare, Special Edition, 1992).

Rustøen T RN, Wiklund I, Hanestad, BRRN, Moum T (1998) Nursing intervention to increase hope and quality of life in newly diagnosed cancer patients. *Cancer Nursing*. Vol 21 - Issue 4 - pp 235-245.

Rustøen TRN, Moum T, Padilla G, Paul S, Miaskowski CRN (2005) Predictors of Quality of Life in Oncology Outpatients with Pain from Bone Metastasis. *Journal of Pain and Symptom Management* Vol. 30 No. 3: 234-242.

Sagar J, Chaib B, Sales K, Winslet1 M, Seifalian A (2007) Role of stem cells in cancer therapy and cancer stem cells: a review. *Cancer Cell International*, 7: 9: 1-11.

Sallan SE (2006) Myths and lessons from the adult/pediatric interface in acute lymphoblastic leukemia. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*; 128–132.

Sandri M, Carraro U (1999) Apoptosis of skeletal muscles during development and disease. *Int J Biochem Cell Biol*; 31 (12): 1373-90.

Serebrovska Z, Serebrovsckaya T, Di Pietro ML, Pyle R (2006) Fertility restoration by cryopreservation of oocytes and ovarian tissue from the position of biomedical ethics: a review. *Fisiol Zh.*; 52 (6): 101-108.

Seril DN, Liao J, Yang GY, Yang CS (2003) Oxidative stress and ulcerative colitis-associated carcinogenesis: studies in humans and animal models. *Carcinogenesis*, 24 (3): 353-362.

Shenton D, Smirnova JB, Selley JN, Carroll K, Hubbard SJ, Pavitt GD, Ashe MP, Grant CM (2006) Global translational responses to oxidative stress impact upon multiple levels of protein synthesis. *J Biol Chem*; 281 (39): 29011-29021.

Toyokuni S (2006) Novel aspects of oxidative stress-associated carcinogenesis. *Antioxid redox Signal*; 8 (7-8): 1373-1377.

Tura S, Baccarani M (2007) *Malattie del sangue e degli organi emolinfopoietici*. Società editrice Esculapio, Trento pag. 266-269.

Valko M., Morris H, Cronin MT (2005) Metals, toxicity and oxidative stress. *Curr Med Chem*; 12 (10): 1161-1208.

Valko M, Rhodes CJ, Moncol J, Izakovic M, Mazur M (2006) Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chem Biol Interact*; 160 (1): 1-40.

Willemsse MJ, Seriu T, Hettinger K, d'Aniello E, Hop WC, Panzer-Grümayer ER, Biondi A, Schrappe M, Kamps WA, Masera G, Gadner H, Riehm H, Bartram CR, van Dongen JJ (2002) Detection of minimal residual disease identifies differences in treatment response between T-ALL and precursor B-ALL. *Blood*; 99: 4386–4393.

Wispé JR, Clark JC, Burhans MS, Kropp KE, Korfhagen TR, Whitsett JA (1989) Synthesis and processing of the precursor for human manganosuperoxide dismutase. *Biochim Biophys Acta*; 994 (1): 30-6.

Yoon DH, Kwon OY, Mang JY, Jung MJ, Kim DY, Park YK, Heo TH, Kim SJ (2011) Protective potential of resveratrol against oxidative stress and apoptosis in Batten disease lymphoblast cells. *Biochem Biophys Res Commun*. [Epub ahead of print].

*"L'unico modo di fare un ottimo lavoro è amare quello che fai. Se non hai ancora trovato ciò che fa per te, continua a cercare, non fermarti, come capita per le faccende di cuore, saprai di averlo trovato non appena ce l'avrai davanti. E, come le grandi storie d'amore, diventerà sempre meglio col passare degli anni.*

*Quindi continua a cercare finché non lo troverai.*

***Non accontentarti. Sii affamato. Sii folle."***

*(Steve Jobs)*