

UNIVERSITÁ DEGLI STUDI DI NAPOLI

“FEDERICO II”



SCUOLA DI DOTTORATO IN SCIENZE FILOSOFICHE

DOTTORATO DI RICERCA IN BIOETICA

XXVIII CICLO

**Valutazioni etiche relative alla correlazione tra inquinamento ambientale e
neoplasie: implicazioni sulla qualità della vita del paziente oncologico pediatrico e
sperimentazione di cura alternativa**

TUTOR

Ch. ma Prof.ssa Alessandra Pica

CANDIDATA

Dott.ssa Maria Laura Pollio

COORDINATORE

Ch.ma Prof.ssa Emilia D'Antuono

ANNO ACCADEMICO 2013/2016

INDICE

Premessa	pag.5
-----------------	-------

CAPITOLO 1

1 INTRODUZIONE	pag.6
1.1 Chi è il “Cancro”?	pag.6
1.2 Inquinamento Ambientale e Salute Umana	pag.11
1.3 Inquinamento e tutela della salute nei bambini	pag.18
1.4 Alimentazione e Cancro	pag.21
1.5 Tumori pediatrici	pag.25
1.6 Gestione del paziente oncologico	pag.30
1.7 L’impatto della malattia oncologica sull’assetto psicologico del bambino	pag. 36
1.8 I diritti del paziente oncologico	pag.41
1.9 La qualità della vita	pag.48
1.9.1 Definizione di Qualità di Vita (QoL)	pag.49
1.9.2 La misura della qualità della vita e suo utilizzo negli studi clinici	pag. 52
1.9.3 Come e quando misurare la Qualità di Vita	pag.53
1.9.4 Qualità della vita e religione	pag.56
1.9.5 La qualità della vita nel paziente oncologico	pag.58
1.10 Leucemia mieloide acuta (LMA)	pag.61

1.10.1	Generalità	pag.61
1.10.2	Clinica e diagnosi	pag.62
1.10.3	La classificazione	pag.63
1.10.4	La classificazione FAB	pag.64
1.10.5	La classificazione (WHO) dell'Organizzazione mondiale della sanità	pag.67
1.10.6	Incidenza	pag.69
1.11	Dal percorso diagnostico al percorso terapeutico: La terapia del non dolore del “Santobono-Pausilipon”	pag.71
1.12	L’onestà della cura in oncologia: il fallimento della chemioterapia	pag.73

CAPITOLO 2

Introduzione alla Parte Sperimentale

2.1	Scopo della ricerca	pag.75
2.2	Lo stress ossidativo: Definizione e generalità	pag.77
2.3	I radicali liberi	pag.78
2.4	La generazione dei ROS	pag.80
2.5	I ruoli dei ROS	pag.82
2.6	Le difese antiossidanti della cellula	pag.84
2.7	I ROS e la carcinogenesi	pag.85
2.8	Le proteine superossido dismutasi	pag.87

2.9 La manganese superossido dismutasi ricombinante: rMnSOD	pag.94
2.10 Apoptosi: la morte cellulare programmata	pag.97
2.11 Aspetti morfologici dell'apoptosi	pag.98
2.12 Le vie di attivazione dell'apoptosi	pag.101
2.13 La regolazione dell'apoptosi	pag.103

CAPITOLO 3

Materiali e Metodi

3.1 Allestimento delle colture cellulari	pag.105
3.1.1 Campioni	pag.105
3.1.2 Scongelo della linea cellulare	pag.105
3.2 Real Time-PCR	pag.106
3.2.1 Estrazione dell'RNA dai campioni	pag.106
3.2.2 Retrotrascrizione dell'RNA in cDNA e quantificazione	pag.108
3.2.3 Protocollo Real Time-PCR	pag.110
3.3 Trattamento dei campioni	pag.113
3.4 Test di vitalità	pag.114
3.4.1 Test di vitalità al Trypan blue	pag.114
3.4.2 Test di vitalità al citofluorimetro	pag.115
3.4.3 Valutazione dell'apoptosi tramite Annexina V	pag.115
3.5 Metodi di rivelazione	pag.118
3.5.1 L'immunocitochimica	pag.118

3.5.2	Rivelazione della proteina internalizzata mediante tecnica di immunocitochimica	pag.119
3.5.3	Rivelazione della proteina internalizzata mediante tecnica di immunofluorescenza	pag.121
3.5.4	Microscopia confocale	pag.122
3.5.5	Localizzazione dei mitocondri mediante sonda Mitotracker® Red CMXRos	pag.123

CAPITOLO 4

Risultati

4.1	Real Time-PCR	pag.125
4.2	Test di vitalità	pag.126
4.3	Valutazione dell'apoptosi tramite Annessina V	pag.128
4.4	Rivelazione della proteina internalizzata mediante tecnica immunocitochimica in microscopia ottica e in fluorescenza	pag.131
4.5	Rivelazione della colocalizzazione mitocondriale della rMnSOD tramite microscopia confocale	pag.134

CAPITOLO 5

5.1	Conclusioni Sperimentali	pag.135
5.2	Riflessioni finali	pag.137

CAPITOLO 6

Bibliografia		pag.144
---------------------	--	---------

PREMESSA

L'obbligo primario dell'approccio terapeutico è volto a tutelare gli interessi e il benessere del paziente. Questo include non solo l'impulso per promuovere la salute del paziente, ma anche il dovere di valutare il suo stato psico-fisico in corso di trattamento. La valutazione dell'efficacia delle terapie somministrate non può prescindere dalla risposta clinica e dall'intervallo libero da malattia, o dall'aumento della sopravvivenza, è necessario soffermare l'attenzione anche su quelle variabili soggettive legate all'emotività del paziente, alla sua reazione contro la malattia e all'alterazione della qualità della vita durante il trattamento, variabili che andrebbero sempre considerate in un profilo di cura che abbia come scopo non solo la salute fisica del malato, ma anche il suo benessere psichico e la sua dignità di essere umano.

L'obiettivo di questo studio è stato, pertanto, la valutazione etica delle principali problematiche relative alla qualità di vita dei pazienti oncologici pediatrici, dei loro diritti e della possibilità di utilizzare cure, non tossiche, il più possibile esenti da effetti collaterali, per ridurre la sofferenza, con l'attenzione rivolta anche alle probabili cause di insorgenza delle patologie neoplastiche.

1 INTRODUZIONE

1.1 Chi è il “Cancro”?

Il cancro rappresenta la “Spada di Damocle” della società odierna e figura come la seconda causa di morte in tutto il mondo. Sommariamente, sono un milione e mezzo le persone affette da questa malattia, includendo i nuovi casi, i pazienti guariti o in trattamento. Come un lenzuolo che progressivamente si stende sul mondo, i tumori interessano sempre più paesi, con incidenze in grande crescita. In un comunicato dell’Organizzazione Mondiale della Sanità tenutosi nel 2012, le previsioni mostrano un quadro in cui in meno di vent’anni i casi passeranno dai 14 milioni del 2012 ai 22 milioni nel 2030.

Per quanto riguarda l’Italia, secondo il rapporto elaborato da Aiom e Airtum, nel 2012 sono stati registrati 364mila nuovi casi. Se, da un lato, la mortalità appare in diminuzione, avendo l’Italia il record europeo di sopravvivenza a 5 anni dei pazienti oncologici, dall’altro si riscontra una tendenza all’aumento dei casi. Questo si verifica soprattutto al Sud, dove probabilmente potrebbe esserci una maggiore percentuale di inquinamento e dove c’è una maggiore prevalenza di obesità e sedentarietà, e paradossalmente un minor consumo di frutta e verdura, nonostante l’elevata produzione in questo settore (Aiom, 2012).

Sembrerebbe quindi, che il cancro sia una malattia dell’età moderna, in realtà cronologicamente si può dire che il tumore ha una storia più antica dell’uomo, se si dà credito alla descrizione di un tumore osseo di un dinosauro (Fondazione Carichieti-Rapporto Annuale 2009). Certo è che fa parte della storia dell’uomo: nei papiri egizi di

Ebers e di Leyden, nei testi di medicina indiana e persiana se ne ritrovano descrizioni alquanto particolareggiate. Sir Grafton Elliot Smith e Warren Royal Dawson (Cairo, 2012) riferiscono di un osteosarcoma del femore di una mummia egiziana dell'epoca della quinta dinastia (3160-2920 a.C.).

In base ai racconti di Erodoto (425 a.C.-485 a.C.), il medico greco Demochede della corte del re persiano Dario, avrebbe guarito da tumore mammario la sua sposa Atossa, figlia di Ciro.

Il termine moderno di carcinoma si deve a Ippocrate, 2500 anni fa: la parola in greco (càrcinos) significa granchio e sta a indicare la caratteristica infiltrativa del tumore e la sua straordinaria capacità di aggressione nei confronti delle strutture circostanti. Secondo Ippocrate il tumore derivava da accumulo di bile nera. Furono da lui molto ben descritti i tumori del naso, della gola e della mammella. Nel I secolo d.C. Aulo Cornelio Celso nel suo trattato *“De Medicina”*, descrive come gli organi interni possono essere colpiti dal cancro, rilevato durante la dissezione dei cadaveri.

Per quanto riguarda la cura, per i tumori esterni veniva consigliata la distruzione col ferro e i cauteri o con pomate a base di zolfo, mirra e incenso. Per la cura dei tumori interni si aggiungerà l'uso di piante medicinali e di erbe a diversa azione: purgativa, astringente, revulsiva, cicatrizzante. Per Celso come poi per Galeno il cancro era una malattia prima generale e poi locale. Avicenna, noto medico arabo (980-1037) riteneva che l'infiltrazione del tumore nei tessuti circostanti fosse causata dai cosiddetti “umori corrotti” e pertanto ne consigliava la cura a base di salassi, che avevano lo scopo di eliminare questi stati d'animo. Questa idea del tumore come derivato umorale si protrae fino al rinascimento, durante in quale tutto viene messo in discussione,

compreso la scienza. S'interessò molto di tumori Gabriele Falloppio (1561), che per primo individuò alcuni fattori favorevoli al loro sviluppo nella ingestione di sostanze molto calde o molto fredde. Il salasso era sempre considerato una terapia importante, mentre da un punto di vista locale era consigliata l'escissione chirurgica o l'uso di composti chimici ad azione caustica o corrosiva a base di sublimato di argento o di arsenico. Nel '600 si perfezionano l'anatomia e la fisiologia, nasce l'anatomia microscopica e la biologia comincia a decollare. Bisogna però arrivare a G. B. Morgagni (1761) e ai suoi studi di anatomia patologica per ribaltare la concezione di Celso e Galeno: il tumore è ora visto come una malattia locale e quindi chirurgica, che evolve a generale e quindi medica. Comincia a farsi strada il concetto della necessità di una asportazione tempestiva. Già nel 1320, il chirurgo Henri de Mondeville intuiva ciò propugnando "l'estirpazione intera" anticipando così il concetto di radicalità. Nel 1775 fu scoperta la prima causa di cancro attribuibile a fattori professionali o ambientali (cancro dello scroto negli spazzacamini). Bisogna attendere i primi dell'Ottocento, anni in cui Virchow enuncia i principi della patologia cellulare, secondo cui tutti i tumori nascono da cellule dell'organismo. A lui si deve la prima differenziazione tra sarcomi e carcinomi. L'Ottocento segna anche l'inizio della chirurgia oncologica moderna: nel 1809 viene asportato un tumore ovarico di circa 6 chili, in America, da parte del chirurgo Ephraim Mac Dowell. La chirurgia è certamente il trattamento dei tumori più antico: il suo ruolo nella moderna oncologia rimane quello di trattamento di elezione per la quasi totalità dei tumori maligni ad eccezione delle forme linfo-emopoietiche.

Lo sviluppo delle conoscenze della storia naturale dei tumori, il miglioramento delle tecniche operatorie e i progressi in anesthesiologia hanno fatto sì che la chirurgia ampliasse, in questi ultimi anni, il proprio campo di applicazione, con il recupero alla curabilità di certe forme di neoplasia che in tempi non molto lontani erano considerate appannaggio esclusivo della terapia palliativa o sintomatica. Nel 1882, Fleming pubblica i suoi studi sulla divisione cellulare, nel 1902 Theodor Boveri sostiene l'ipotesi che i tumori derivino da un'asimmetrica divisione del nucleo cellulare. Per quanto riguarda le prime osservazioni epidemiologiche, a parte l'osservazione di Bernardino Ramazzini, che nel 1713 aveva notato che il cancro della mammella era più frequente tra le suore, bisogna arrivare al 1849, quando Bennet suggerisce una relazione tra supernutrizione e carcinogenesi. Nel 1908 Williams nota minore frequenza di tumori tra i vegetariani mentre, nel 1913, Stevenson nota che la mortalità per cancro della mammella è più alta nelle nubili che nelle sposate oltre i 45 anni.

La chemioterapia antitumorale nasce in un'epoca più recente. I primi farmaci chemioterapici sono stati, probabilmente, quelli per curare la malaria. Ehrlich, Premio Nobel per la medicina nel 1908, può essere considerato il padre della chemioterapia, sintetizzando, nel 1910, il primo composto organico dell'arsenico: il *Salvarsan*, avente efficacia sull'uomo. Egli, per primo, utilizzò modelli sperimentali per testare l'efficacia di alcuni farmaci, dopo aver attentamente osservato che alcuni tumori possono essere trapiantati da un animale all'altro. Gilman, Goodman e Dougherty, nel 1942 presso l'Università di Yale, nell'ambito di un programma segreto per una eventuale guerra chimica, compirono le prime osservazioni sulla efficacia terapeutica e sulla azione citotossica della mecloretamina (mostarda azotata) sui linfomi indotti

sperimentalmente negli animali da laboratorio. Gilman e Phillis pubblicarono, però, solo nel 1946 le loro osservazioni sugli effetti delle mostarde azotate sui tumori. Nel dopoguerra, gli studi chemioterapici s'intensificano e vengono osservati i primi risultati, soprattutto sui linfomi. Alle mostarde azotate seguirono gli antimetaboliti, gli alcaloidi e gli alchilanti. Negli anni '60 iniziarono a essere studiati anche gli antibiotici tumorali, tra cui l'adriblastina, il cui effetto sul cancro della mammella fu confermato solo più tardi da Gianni Bonadonna e colleghi, presso l'Istituto Nazionale dei Tumori di Milano (Redazione Scientifica EDRA, 2015).

La chemioterapia, nata con lo scopo primario di curare le metastasi, ha avuto successivamente un enorme sviluppo applicativo, in particolare sulle malattie neoplastiche linfo-emopoietiche. L'utilizzo di tale pratica ha modificato radicalmente la prognosi delle leucemie e dei linfomi in modo particolare, ma anche quella di molti tumori infantili. Il progressivo e continuo successo della terapia oncologica in campo pediatrico, si deve per lo più allo sviluppo di protocolli chemioterapici antineoplastici. Questo successo, tuttavia, ha avuto ed ha tuttora un prezzo elevato, se si considerano le conseguenze tardive delle chemioterapie osservabili nei lungo-sopravvissuti, cioè nei bambini che hanno raggiunto la guarigione. Queste conseguenze comprendono danni di organi, come alterazioni della funzionalità respiratoria e cardiaca, danni neurologici e intellettivi, alterazioni della funzionalità endocrina e gonadica, o alterazioni dell'accrescimento somatico, oltre al rischio di sviluppare un secondo tumore in età adulta. Da ciò la necessità e l'importanza di seguire, negli anni, questa popolazione di malati, sia per verificare lo stato di malattia (persistenza o remissione), sia per affrontare in tempo i possibili danni iatrogeni. Ovviamente questa necessità di

controllo protratto ha un impatto fortemente negativo soprattutto sulla psiche del malato pediatrico, che sarà soggetto a controlli sistematici durante tutta la sua vita, sotto la continua preoccupazione di una diagnosi infausta.

Gli obiettivi dell'oncologia pediatrica, oggi, sono quindi rivolti a: continuare a ridurre la mortalità ed a identificare le terapie ottimali, che meno gravemente interferiscano sullo sviluppo somatico e psicologico del bambino, riducendo il più possibile gli effetti collaterali.

1.2 Inquinamento Ambientale e Salute Umana

«Laudato si' mi Signore per sora nostra madre terra», cantava San Francesco D'Assisi. Terra, *«casa comune»*, ricorda papa Bergoglio, che *«è anche come una sorella con la quale condividiamo l'esistenza, e come una madre bella che ci accoglie tra le sue braccia»*. Questo è l'appello di Papa Francesco, racchiuso nella sua enciclica *“Laudato si’”* del 2015, nella quale risalta l'urgenza dell'intervento dell'uomo per limitare l'inquinamento dell'ambiente. Il Papa denuncia il comportamento sconsiderato dell'uomo, che ha danneggiato la “madre Terra”, che l'ha resa da “giardino del mondo” a “scarto, usa e getta”. Ed è proprio quest'abuso, incondizionato, della Natura che ha prodotto i danni, causa di allarme della società odierna. Inoltre, si fa sempre più evidente la correlazione fra inquinamento ambientale e patologie tumorali/degenerative. Una denuncia e un monito fu lanciato già nel 1979 dal filosofo H. Jonas (*Il principio responsabilità*) ponendosi il problema di un'etica aggiornata e aderente alle profonde trasformazioni prodotte nella civiltà tecnologica. Jonas rilevava come “Il divario tra la forza del sapere predittivo e il potere dell'azione

genera un nuovo problema etico.[...]Nessun'etica del passato doveva tener conto della condizione globale della vita umana e del futuro lontano, anzi della sopravvivenza, della specie. Proprio il fatto che essi siano in gioco esige, a dirla in breve, una nuova concezione dei diritti e dei doveri, per la quale né l'etica né la metafisica tradizionali offrono i principi e, men che mai, una dottrina compiuta" (op.cit., tr. it. p. 12).

Nel campo dei tumori, salvo rare eccezioni, non è stata identificata la specifica causa di insorgenza della malattia, per cui è difficile attuare una vera e propria prevenzione. Sono noti, tuttavia, molti dei fattori di rischio che giocano sicuramente un ruolo molto importante nella genesi dei tumori. La stragrande maggioranza di questi fattori di rischio si trova nell'ambiente in cui viviamo e, come tali, sono definiti ambientali. La connessione fra gli squilibri generati dall'azione dell'umanità sull'ecosistema, è un tema che si perde nella notte dei tempi. Dopo quasi vent'anni dalla pubblicazione del suo primo testo, lo stesso Van Potter riaffermò la sua intuizione originaria in un'altra pubblicazione (*Global Bioethics: Building on the Leopold Legacy, 1988*), in cui il concetto di globalità è inteso come coordinamento tra la bioetica della vita fisica e la bioetica della vita ambientale. Può essere interessante osservare, inoltre, come Potter si sia spinto in questa direzione proprio perché oncologo: probabilmente è stata la sua attività a suggerirgli i profondi collegamenti tra la ricerca sul cancro, la terapia, la prevenzione e le cause ambientali del cancro (come ad es. le condizioni igieniche dei luoghi di lavoro, di vita, le politiche agricole, ecc.). Senza dubbio sono sempre più in aumento le evidenze su come l'ambiente possa incidere sulla salute umana e, viceversa, la cura della salute umana possa influenzare l'ambiente. Pertanto, la tradizionale distanza tra clinica e medicina e tutela dell'ambiente sta svanendo,

creando sempre maggiore spazio alla riflessione bioetica a tutti i livelli d'interazione tra salute e ambiente (Resnik & Portier, 2008). Il Comitato Nazionale di Bioetica, nel suo documento *"Bioetica e ambiente"*, rileva che da una prima reazione al degrado ambientale, basata sulla convinzione del diritto di ciascuno a proteggersi contro i danni che un ambiente ostile può procurargli (diritto alla vita), ci si è evoluti verso la consapevolezza del dovere di non danneggiare l'ambiente per non subire danni alla salute (diritto alla salute), quindi verso la consapevolezza che l'uomo come specie - e quindi anche le generazioni future - deve poter godere di un ambiente migliore (diritto all'ambiente), e infine verso la concezione dell'ambiente come un bene in se stesso, un'entità autonoma che ha diritto alla propria esistenza (diritto dell'ambiente) (CNB, 1995). Lo stretto rapporto esistente tra ambiente e salute, è sottolineato negli obiettivi della Comunità Europea in materia ambientale, che consistono nel salvaguardare, tutelare e rendere migliore la qualità dell'ambiente, nonché proteggere la salute umana, utilizzare in modo razionale e accorto le risorse naturali e infine promuovere, sul piano internazionale, le misure destinate a risolvere i problemi dell'ambiente a livello regionale o mondiale (*art. 130 R, paragrafo 1*). I gruppi tematici relativi alle questioni d'impatto ambientale, oggetto della riflessione bioetica sull'ambiente, sono principalmente tre: inquinamento, consumo delle risorse e riduzione della biodiversità. Nel mese di Luglio del 2013 la rivista *"Lancet Oncology"* ha pubblicato uno studio molto ampio, condotto in 36 diversi centri europei, che ha analizzato le abitudini di vita di circa 300.000 persone ponendo in relazione l'eventuale comparsa di un tumore polmonare con il grado d'inquinamento delle aree in cui hanno abitato. Lo studio si è rivelato molto convincente, tanto che l'Agenzia internazionale per la ricerca sul cancro

(IARC) di Lione ha dichiarato, il 17 Ottobre 2013, di avere incluso l'inquinamento atmosferico e le polveri sottili fra i carcinogeni umani di tipo 1 (IARC, 2013). Il rapido aumento di tumori registrato a livello mondiale nel corso del XX secolo ha riguardato anche i bambini (0-14). I dati emersi dallo studio ACCIS (Automated Childhood Cancer Information System) , realizzato in collaborazione con IARC, descrivono un grande incremento di tumori infantili. In Italia un milione di bambini vive a brevissima distanza dalle aree inquinate e undici milioni risiedono in aree coperte dai Registri dei Tumori, strutture che raccolgono le informazioni sui nuovi casi di malati di cancro.

Dal 1994 a oggi, in Campania, è stato dichiarato lo Stato d'emergenza a causa della saturazione del sistema dello smaltimento dei rifiuti. Un numero crescente di analisi, tra cui uno studio regionale dell'OMS (l'Organizzazione Mondiale della Sanità), dimostrano come l'accumulo dei rifiuti, legali e illegali, urbani e industriali, abbia causato contaminazione del suolo, dell'acqua e dell'aria, attraverso l'esposizione e la diffusione di una serie di agenti tossici tra cui la diossina. È stata riscontrata, inoltre, un'alta correlazione tra l'incidenza di cancro, malattie respiratorie e malformazioni genetiche e la presenza di discariche di rifiuti industriali e tossici. Difatti, dopo settimane di lavoro di vaglio della copiosa letteratura prodotta in tema d'inquinamento ambientale, gli esperti IARC, convenuti a Lione in ottobre 2013, da decine di Paesi Europei, sono giunti alla conclusione che: esistono prove sufficienti che l'inquinamento atmosferico sia cancerogeno per gli esseri umani. Dalla valutazione dei molti componenti della miscela che concorrono all'inquinamento atmosferico, è emerso come il particolato atmosferico (PM 2,5 e PM10) sia il principale componente

cancerogeno per tutti gli esseri viventi (Lancet Oncology, volume 109, monografie IARC, 2013).

Il nostro tempo, così fortemente caratterizzato dall'intervento umano sulla natura, è stato definito con un'espressione efficace e accattivante dal premio Nobel (1995) per la chimica Paul Crutzen, "l'era dell'antropocene". Infatti, a differenza di tutte le epoche precedenti, quella attuale è segnata, anzitutto, dall'impatto dell'uomo sull'ambiente, che ha alterato il ciclo dell'acqua, dell'azoto, del carbonio, spingendosi oltre i limiti ecologici. I dati e le conoscenze fin qui elaborati e messi a disposizione dalla ricerca scientifica denunciano il crescente inquinamento e degrado delle risorse naturali. Un campanello d'allarme per la qualità della nostra vita. Quest'uso dissennato e insostenibile dei "commons" ambientali (aria, acqua, energia, biodiversità, terra) rappresenta un pericoloso campanello d'allarme per la qualità della vita dell'uomo, e un pericolo per i delicati equilibri degli ecosistemi su scala globale e locale. Bisogna aggiungere, a tutto ciò, gli effetti indiretti e cumulativi derivanti dall'inquinamento delle acque, del suolo, dell'aria e dell'ambiente in generale come conseguenza delle attività umane: dall'agricoltura all'industria, dalla produzione di rifiuti ai trasporti (si pensi, fra i tanti, ai casi Ilva di Taranto, Eternit di Casale Monferrato ecc.). È del tutto evidente come la questione ambientale si intersechi fortemente con la ricerca di una rinnovata etica civile.

Nell'era dell'antropocene si ritiene che le nostre società siano chiamate a una profonda trasformazione dei codici culturali che riguardano una profonda modifica base dell'atteggiamento umano verso l'ambiente e le sue forme di vita risignificando, in chiave ecologica, principi e valori che sono parte del bagaglio culturale e della

tradizione delle nostre società. Ultimamente, ampio spazio di discussione è dato al concetto di “eco sostenibilità”, e si afferma, con sempre maggiore convinzione, che in questo nostro tempo, una società per essere civile, deve essere sostenibile o almeno deve ricercare di raggiungere il maggior grado di sostenibilità in una prospettiva di lungo periodo. Per essere civile, è necessaria un’etica comportamentale alle persone, alle famiglie, alle associazioni, alle imprese, agli enti locali, ai centri di ricerca, alle comunità religiose, al mondo delle professioni, – a tutti – che incentri l’attenzione a ridurre il “consumo di natura”: dall’eco-efficienza, che prevede una riduzione dei consumi materiali naturali, sia nel processo produttivo sia nel consumo finale, all’ecosufficienza, in altre parole alla condivisione di beni e servizi, dal consumo di suolo alla custodia del paesaggio, dalla mobilità individuale a quella collettiva, dalle scelte che valorizzino le produzioni e il consumo locale al consumo secondo criteri di giustizia sociale e ambientale, dal cohousing alla bioedilizia, dai percorsi educativi all’attivazione di processi partecipativi, dal sostegno al commercio equo, alla finanza etica ecc. (Etica e Ambiente Ecoscienza, Numero 2, Anno 2013, 37). Per fortuna, molti sono i contesti nei quali si sono sviluppate strategie organizzative e modelli culturali innovativi finalizzati alla ricerca di percorsi di sostenibilità: tra essi vi è la promozione della coesione sociale e delle pratiche di reciprocità e di condivisione. Appare chiaro come l’attenzione primaria ricada sulle città e sulle comunità locali perché sono, e saranno sempre di più in futuro, il luogo di vita delle persone e dunque avranno un ruolo sempre più importante nelle società. Basti pensare come nella sola Unione Europea la popolazione urbana rappresenti l’80% del totale, consumi l’80% di energia e produca l’86% del Pil continentale. È proprio per tale motivazione che è nelle città

che si stanno concretizzando le pratiche più innovative di sostenibilità nella gestione dei beni comuni ambientali, tra le più attuate c'è la nuova forma di “*governance*” secondo la quale i cittadini, i veri e propri portatori d'interesse, sono i protagonisti attivi del cambiamento e attori responsabili del processo di trasformazione che le società sono chiamate a compiere. Parallelamente anche il sistema produttivo è chiamato a radicali cambiamenti soprattutto nelle scelte operative, gestionali, organizzative e tecnologiche, in maniera da accrescere il valore economico dell'impresa nel rispetto dell'ambiente e delle norme etico-sociali. S'intuisce, pertanto, che la transizione verso una società sostenibile richiede una drastica trasformazione dei modelli di produzione e consumo, dove è autentico imperativo etico considerare il consumo di risorse naturali come indicatori di efficienza e di valore della stessa attività economica. All'impresa è chiesto, quindi, di perseguire il fine nobile di salvaguardare la società e l'ambiente, piuttosto che il conseguimento del massimo profitto per remunerare il capitale investito. L'impresa stessa, diverrà così un bene pubblico da cui scaturiscono benefici collettivi per la società e l'ambiente. In ultimo ambito, ma non per importanza, vi sono le comunità: tutte le persone sono chiamate a modificare gli stili di vita e i comportamenti individuali e collettivi, al fine di ricercare nuovi modi comportamentali e partecipare attivamente e direttamente alla vita politica ed economica, al fine di promuovere la transizione verso una società realmente sostenibile. Tutti questi buoni comportamenti, sono, in parte già in atto, a livello individuale/familiare e associativo; secondo i dati Arpa (Report regionali, 2014), sembra sempre più evidente un atteggiamento di corresponsabilità sociale e di collaborazione all'interno della comunità. Basta citare i gruppi di acquisto solidale,

così come i percorsi volti alla sostituzione dei beni con i servizi (car sharing, car pooling ecc.), il co-housing. In ognuno di questi ambiti si sono sviluppate risposte concrete, anche se parziali e incomplete. Nelle città, nelle imprese, nelle comunità, si sono avviate politiche, azioni, pratiche che dimostrano che vi è una parte attiva della società che ricerca con coraggio, intelligenza, creatività e perseveranza un modo fattibile per intervenire innovativamente sul sistema, una modalità, però, non fine a se stessa ma guidata dal desiderio di creare un nuovo percorso economico, una rinnovata coesione sociale, una riduzione del “consumo di natura” e dell’inquinamento. Questo presupposto indifferibile è necessario e indispensabile per la costruzione e per lo sviluppo.

1.3 Inquinamento e tutela della salute nei bambini

Due pubblicazioni dell’Organizzazione Mondiale della Sanità (2006; 2016) sui rischi per la salute dei bambini, associati alla esposizione a sostanze chimiche, riportano che: “L’esposizione a cancerogeni nel periodo pre-concepimento, durante la vita intrauterina, o nella prima infanzia, può causare lo sviluppo di tumori durante l’infanzia o durante la vita adulta” e che: “C’è un’evidenza diretta che i bambini sono più suscettibili degli adulti ad alcuni cancerogeni, incluse alcune sostanze chimiche e varie forme di radiazioni”. Alla luce della dimostrata correlazione tra livello d’inquinamento e i problemi che ne derivano alla salute, il CNB sottolinea come i soggetti maggiormente esposti a rischio o, per la loro condizione biologica maggiormente vulnerabili, sono le donne in gravidanza, i bambini e gli anziani. Il Comitato sottolinea, inoltre, la necessità di rivedere i parametri di quantificazione e di determinazione dei “valori limite” di tossicità, alla luce delle specifiche vulnerabilità

dei bambini, in ogni fase del loro sviluppo e verso ogni agente inquinante. E' possibile utilizzare, a tal fine, i dati attualmente disponibili che permettono già ora una precisa individuazione del rischio per la salute dei minori. La tutela della salute dei minori comprende, altresì, la tutela dall'inquinamento acustico, soprattutto nelle aree urbane, e presuppone un'attenzione particolare da dedicare alla pianificazione urbanistica e all'organizzazione di servizi a favore della fruibilità e del godimento estetico dell'ambiente da parte dei minori. Il CNB ritiene che questa ridefinizione sia strumento essenziale per una concreta promozione del "diritto di cittadinanza dei bambini". (CNB, *Dichiarazione per il diritto del bambino a un ambiente non inquinato, 1999*). La protezione dei bambini dall'esposizione involontaria a inquinanti ambientali rappresenta un'importante priorità per la sanità pubblica. Nella Dichiarazione finale della quinta Conferenza Ministeriale su ambiente e salute, i ministri dei 53 Stati della Regione Europea dell'OMS hanno sottolineato la necessità di attuare gli impegni stabiliti nel Children's Environment and Health Action Plan for Europe (CEHAPE) del 2004. Sono diverse le istituzioni che affrontano le questioni emergenti di salute ambientale ponendo un'attenzione specifica sui bambini, quali l'Organizzazione Mondiale della Sanità (OMS), il National Institute of Environmental Health Sciences (NIEHS) e l'Environmental Protection Agency (EPA) statunitensi. Nonostante le leggi che regolano l'uso delle sostanze pericolose, la gestione di rifiuti pericolosi continua a sollevare questioni etiche che non sono ancora state adeguatamente risolte dalle normative esistenti. Tali questioni vertono sull'equità della distribuzione dei rischi e sulla valutazione e gestione dei rischi per la società. Le questioni di equità comprendono la scelta dei luoghi, i diritti delle generazioni future, i

diritti dei lavoratori, i risarcimenti e il compenso dovuto. Le questioni di valutazione e gestione dei rischi comprendono il comportamento etico da adottare in condizioni d'incertezza, a chi attribuire l'onere della prova in caso di danni causati da sostanze pericolose e il diritto d'informazione dei lavoratori e del pubblico. Secondo il prof. Giustiniani, membro della Commissione Giustizia e salvaguardia del creato della Conferenza episcopale campana e docente di Bioetica alla facoltà di giurisprudenza della seconda Università di Napoli, l'emergenza dei rifiuti in Campania rappresenta un evidente paradosso.

“Il termine “emergenza”, che dovrebbe indicare stato da superare il più presto possibile, anche con mezzi straordinari, quali ad esempio un commissariamento e relativa 'militarizzazione' di certi luoghi della Campania e, in particolare, di Napoli e del suo hinterland, diviene, invece, uno stato infinito. Non si riesce né a progettare né a realizzare una serie di provvedimenti 'mirati' e risolutivi, che dovrebbero andare nella direzione del cambiamento di 'cultura', invece di inseguire primariamente la tecnica (e la politica) di piccoli interventi riparatori, simili a chi, nell'approssimarsi della visita di un ospite, mette la polvere sotto il tappeto, ma non spazza mai davvero bene e sistematicamente. Rifiuti e relativo scarico (e discarica) evidenziano, simbolicamente, un modo di stare al mondo: una parte di noi, benché prodotta da noi, è rifiutata e scaricata su imprecisati altri, i quali non vogliono i nostri scarti, mal sopportando anche i loro”.

1.4 Alimentazione e Cancro

In quanto essere vivente, l'Uomo, è portato a ricercare il cibo come fonte di sostentamento, ma a differenza degli altri esseri viventi, egli ha imparato a cucinare, inventando le pietanze. L'alimentazione è diventata parte integrante del nostro stile di vita e non è più legata al solo bisogno di nutrirsi. Oggi però, nel mondo occidentale le conseguenze di una alimentazione errata si sono rovesciate rispetto al passato, infatti, le malattie da eccesso alimentare hanno sostituito quelle da carenza. Il mantenimento di un buono stato di salute correlato alla dieta, per la prevenzione delle malattie è noto dall'inizio della storia dell'uomo (La Sacra Bibbia, Daniele, Libro 1°); le norme religiose contenevano regole di buona alimentazione, come ad esempio il divieto di consumo di carne di maiale, nel Corano, per i musulmani, per ragioni igieniche, e successivamente le antiche scuole mediche hanno riconosciuto e tramandato regole igieniche di buona alimentazione. La *Scuola salernitana* ad esempio, si basava sulla tradizione greco-latina fusa a informazioni originate dalle culture araba ed ebraica. Tale scuola costituisce un pietra miliare nella storia della medicina per le innovazioni nel metodo e nella introduzione della cultura della prevenzione.

Tuttavia la piena comprensione del ruolo che la dieta riveste nella prevenzione e nello sviluppo del cancro appartiene all'era moderna, e la conferma dell'esistenza di una relazione causa-effetto, è di scoperta recente (Berrino, *et al.*, 2003). Studi condotti negli ultimi anni mettono in evidenza che gli alimenti e la nutrizione in generale, sono considerati fra i principali fattori ambientali in grado di influenzare l'induzione di malattie croniche non trasmissibili, in particolare l'insorgere del cancro, delle malattie cardiovascolari e degli ictus (WHO and FAO, 2003). Le alterazioni bio-tecnologiche,

come le radiazioni e le modificazioni genetiche legate alla nutrizione, sono state considerate potenzialmente pericolose per la salute umana, anche se al momento esistono scarse prove a supporto di queste ipotesi. Da tempo è noto che il cancro non è una malattia singola, piuttosto è un processo multifattoriale che si manifesta con alterazioni a carico di specifiche classi di geni deputati al controllo della crescita e del comportamento cellulare, e in parte da interazioni tra tali modificazioni genetiche e lo *stress* cellulare derivato da determinati fattori, ambientali e di stile di vita, tra i quali la dieta (Greenwald *et al.*, 1997).

Il primo studio epidemiologico sulla relazione tra dieta e cancro fu realizzato nella prima metà del secolo scorso, dall'epidemiologo inglese *Percy Stocks*; il lavoro suggerì l'esistenza di un ruolo protettivo da parte dei vegetali (Cohen, 1987). Nello stesso periodo, ulteriori esperimenti condotti *in vivo* dimostrarono che una dieta ipocalorica riduceva l'incidenza del cancro in animali in esperimento. Al più, una dieta ricca di grassi favoriva la formazione di un'alta percentuale di tumori mammari rispetto a una dieta a basso tenore di grassi (Tannenbaum, 1996), invitando a evitare l'eccesso di cibi ipercalorici. I potenziali meccanismi di protezione, che derivano da un ridotto apporto calorico, sono stati chiariti di recente e comprendono: la riduzione di ormoni della crescita, quali l'insulina, il fattore di crescita insulino-simile e gli ormoni sessuali, la riduzione del danno ossidativo nei confronti del DNA (Vainio & Stayner, 2002). Anche la componente qualitativa dei cibi ha un ruolo importante nel favorire o prevenire tali eventi. Ritorna così attuale il detto di Ippocrate "*fai che il cibo sia la tua medicina e che la tua medicina sia il tuo cibo*". Occorre quindi trattare il cibo proprio come se fosse una medicina. Lo stile di vita e la dieta possono indurre

modificazioni funzionali metaboliche, ridurre i fenomeni infiammatori, del sistema endocrino e modulare la trascrizione genetica. Ciò risulta importante tenendo conto che il cancro è una affezione dovuta alla induzione di mutazioni genetiche, instauratesi come conseguenza di un danno del DNA cellulare. Secondo l'American Institute for Cancer Research ed il World Cancer Research Fund, il 30-40% di tutti i tipi di cancro si possono prevenire adottando idonee norme dietetiche, la regolare attività fisica quotidiana e mantenendo il peso forma. Numerose evidenze emerse dagli studi di biologia molecolare hanno permesso di spiegare gli stretti rapporti fra nutrizione e cancro ed hanno, in parte, chiarito la dinamica degli eventi. È questo un motivo in più per affrontare un'area di studio molto complessa che riguarda il ruolo della nutrizione nella patologia oncologica. Il progressivo invecchiamento della popolazione si accompagna ad un incremento delle diagnosi di nuovi casi di cancro. Gli studi più recenti dimostrano come il 60% dei tumori siano attribuibili a fattori alimentari e al tabagismo. Il 25% sono il risultato dell'azione di obesità, fattori professionali, infezioni, alcol, esposizione ai raggi UV, droghe, inquinamento. Solo il 15% sono da riferire a fattori primariamente genetici. Ne consegue che le cause più frequenti di cancro sono riconducibili a fattori ambientali e a mutazioni genetiche conseguenti a danni del DNA. Regime alimentare, stile di vita, flogosi cronica sono quindi da considerare elementi di grande importanza per la trasformazione di un carcinoma latente in una forma clinicamente manifesta. Studi epidemiologici e clinici hanno messo in evidenza significative correlazioni tra regime alimentare e incidenza del carcinoma della prostata, ma anche la possibile interferenza dello stile di vita sull'evoluzione della neoplasia quando questa è accertata o trattata con chirurgia

radicale, radioterapia e/o terapia medica (ormoni e chemioterapia). Dal momento che i cambiamenti delle abitudini alimentari hanno un impatto sul rischio di numerose neoplasie è anche possibile che siano responsabili di tumori primitivi maligni multipli (TPMM). Tali tumori che si osservano più frequentemente con l'avanzare dell'età potrebbero probabilmente essere contrastati modificando il regime alimentare. Nel 2011 è stato pubblicato un lavoro da T. Colin Campbell e suo figlio, Thomas M. Campbell, *“The China Study”*, risultato di uno studio epidemiologico finalizzato a indagare la relazione tra alimentazione e genesi delle malattie. Si tratta di una ricerca che conferma alcune delle tesi fondamentali sopracitate. *È uno studio durato ventisette anni, realizzato in collaborazione con le università di Cornell e di Oxford e la Chinese Academy of Preventive Medicine e finanziato dai National Institutes of Health, dall’American Cancer Society e dall’American Institute for Cancer Research. Sono stati messi a confronto dati epidemiologici di pazienti americani, nippo-americani e cinesi.* Sulla base delle osservazioni epidemiologiche e delle conclusioni sperimentali, gli autori hanno dimostrato come un regime dietetico, che abusa di proteine animali, influisce in modo determinante sulla genesi di molte patologie, anche degenerative e gravi come il cancro, il diabete e le malattie cardiovascolari. Anzi, lo studio (e altre ricerche prese in considerazione, e a supporto, nel libro) arriva a consigliare un consumo minimo di proteine animali o addirittura la loro completa eliminazione. È uno studio di grande ampiezza e complessità, che sta sollevando un vero polverone intorno alla medicina convenzionale in tutto il mondo. Il lavoro giunge alle seguenti conclusioni: *“la genetica non è il fattore predominante nella genesi delle malattie; solo con la dieta e lo stile di vita si può guarire dalle malattie cardiache; il*

cancro al seno è correlato a una situazione ormonale alterata che è determinata dal cibo che mangiamo; il consumo di latticini aumenta il rischio di cancro alla prostata; gli antiossidanti contenuti in frutta e vegetali sono correlati a una migliore performance mentale nella terza età; i calcoli ai reni possono essere prevenuti con una dieta salutare; il diabete di tipo 1, quello che insorge nei bambini ed è una delle più devastanti malattie che ci siano, è correlato allo stile di vita e alimentazione dei bambini stessi e non ad altro; vari tipi di cancro sono correlati al consumo eccessivo di proteine animali”. Tali risultati vengono spiegati con rigore scientifico e dimostrazioni pratiche (Campbell TC & Campbell TM, 2011). Sulla base di tali studi, l’attenzione si è focalizzata sulla composizione degli alimenti ed si indaga sui rapporti fra regime alimentare e cancro (Sapienza & Issa, 2016). Una alimentazione varia, ricca di frutta e verdura, come nella dieta mediterranea, il controllo dell’apporto calorico e l’acquisizione di caratteristiche culinarie proprie delle culture asiatiche (uso di spezie antiossidanti, quali la curcuma, il curry e lo zenzero) rappresentano l’obiettivo da raggiungere in una strategia preventiva per ridurre l’incidenza de tumori nelle popolazioni occidentali, in preoccupante aumento.

1.5 Tumori pediatrici

Si definiscono pediatrici, i tumori che insorgono prima dei 14 anni di età. I vari tipi di tumore che si riscontrano in età pediatrica sono molto diversi da quelli dell’ età adulta per sede d’insorgenza, velocità di accrescimento e caratteristiche istopatologiche. I più frequenti sono:

- **Leucemia:** Rappresenta circa un terzo dei tumori pediatrici in Europa, America e Asia. Il tipo predominante è la leucemia linfoblastica acuta che colpisce la filiera linfoide.
- **Linfomi:** I linfomi sono tumori dei gangli linfatici e rappresentano il terzo tipo di cancro più diffuso nei bambini dei paesi sviluppati. Il linfoma di Hodgkin (un tempo denominato malattia di Hodgkin o morbo di Hodgkin) è il più diffuso, mentre il linfoma di Burkitt rappresenta la metà di tutti i linfomi riscontrabili in Africa.
- **Tumori del sistema nervoso centrale:** Colpiscono il cervello e il midollo spinale e rappresentano la seconda forma di cancro più frequente nei paesi sviluppati.
- **Neuroblastoma:** Tumore maligno che si sviluppa a livello del sistema nervoso simpatico. Nei paesi sviluppati, questa forma tumorale colpisce i neonati e i bambini in tenera età.
- **Retinoblastoma:** Tumore maligno della retina e del tessuto nervoso dell'occhio. Si presenta in tenera età e per la metà dei casi è di carattere ereditario. In Europa, Nord America e in Australia questo cancro rappresenta circa il 4% di tutte le forme tumorali del bambino. Nelle popolazioni africane, questa proporzione può variare dal 10 al 15%.
- **Cancro del rene:** Il tumore maggiormente diffuso è quello di Wilms (nel 95% dei casi), che colpisce prevalentemente i bambini di età inferiore ai cinque anni. In gran parte delle popolazioni occidentali di razza caucasica, il tumore di Wilms rappresenta fino al 6% di tutti i tumori diagnosticati nel bambino. Nelle popolazioni nere dell'America del Nord e dell'Africa, raggiunge anche il 10%.

- Tumori delle ossa: I tumori delle ossa comprendono l'osteosarcoma (50%), il condrosarcoma, il sarcoma di Ewing (35%). Queste forme di cancro rappresentano dal 3 al 5% circa dei tumori pediatrici in Europa.
- Sarcomi dei tessuti molli: Il rabdomiosarcoma (RMS) è un tumore maligno a carico dei muscoli striati che collegano le ossa e che permettono il movimento. È un sarcoma dei tessuti molli tipico dei bambini, riscontrabile nei due terzi dei casi che sopraggiungono prima dei dieci anni di età. Altro cancro, il sarcoma di Kaposi causato dal virus dell'Herpes è caratterizzato da lesioni multiple, soprattutto a carico della pelle.

(RAPPORTO AIRTUM-AIEOP; *I tumori Infantili*; 2012.)

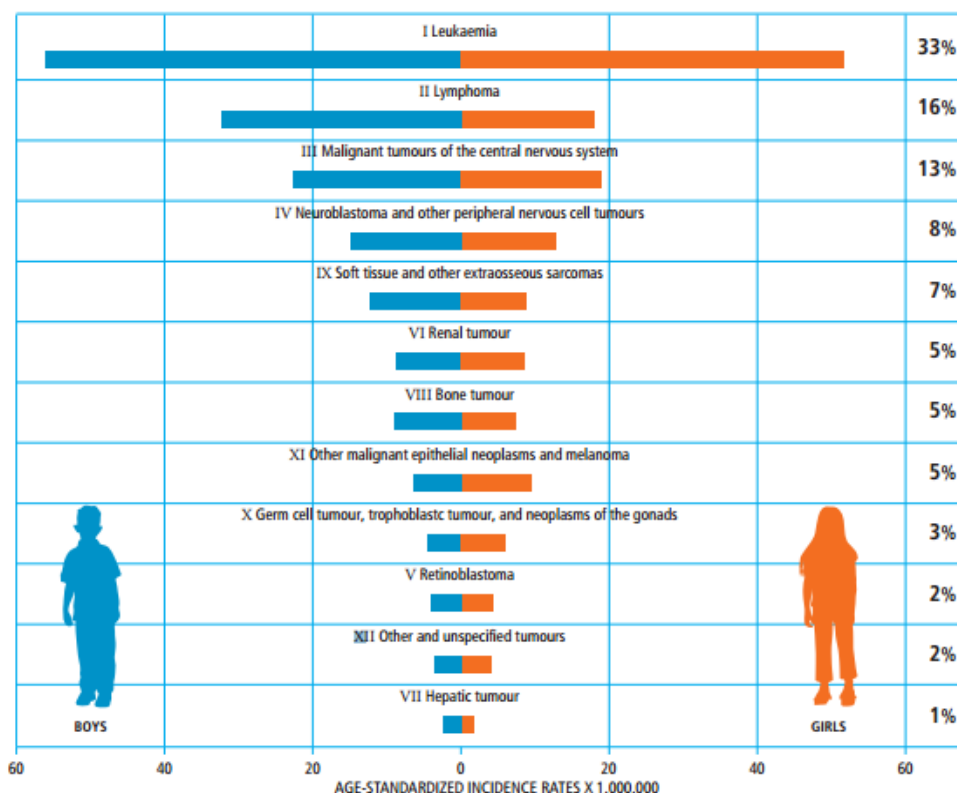


Figura1. Tassi standardizzati per età (popolazione europea) per i principali gruppi di neoplasie maligne. Fascia d'età 0-14 anni. Airtum 2003-2008

Nei paesi sviluppati, tre bambini malati su quattro sopravvivono cinque anni dopo la diagnosi iniziale. Si stima che l'80% dei bambini colpiti da un cancro sopravvive.

Negli ultimi anni, nell'Italia meridionale è stato registrato un incremento del numero di casi di tumore insieme ad un incremento del tasso di mortalità che è salito al 4%. È ipotizzato che il maggior tempo trascorso all'aria aperta a giocare e correre, e la conseguente accelerazione del metabolismo li esponga più degli adulti ai rischi legati all'inquinamento ambientale, inclusi i tumori. Tanto che, quelli che crescono vicino alle aree contaminate, già nel primo anno di vita, hanno un più alto rischio di mortalità da insorgenza di tumore. Priorità etica, pertanto, dovrebbe essere data ai progetti di risanamento ambientale nelle aree geografiche del Sud, oggetto di sversamento e deposito di rifiuti tossici, che stanno concorrendo all'incremento delle patologie tumorali infantili e adulte. Attualmente, il primo progetto di studio epidemiologico dell'Istituto superiore di Sanità dedicato ai bambini che vivono nelle aree compromesse dalle discariche e dai fumi delle industrie disseminate lungo lo Stivale, è ancora privo di finanziamenti. E' stato calcolato che una bonifica delle aree maggiormente interessate (Napoli e Provincia- Taranto e Provincia) costerebbe circa 350mila euro. Lo si legge nel nuovo rapporto "Sentieri", lo studio epidemiologico sui siti inquinati di interesse nazionale (Sin) finanziato dal Ministero della Salute e coordinato dall'Istituto superiore di Sanità..

period 2016-2020			
North-West	1 838 (1 771-1 906)	1 025 (975-1 074)	2 863 (2 779-2 947)
North-East	1 362 (1 312-1 412)	762 (725-799)	2 124 (2 062-2 186)
Centre	1 348 (1 299-1 398)	750 (713-786)	2 098 (2 037-2 159)
South and Islands	2 342 (2 256-2 428)	1 451 (1 380-1 521)	3 793 (3 681-3 904)
Italy	6 890 (6 638-7 143)	3 987 (3 793-4 181)	10 877 (10 559-11 196)

Figura 2. Casi di tumori attesi in Italia per i periodi 2016-2020, per area geografica e per fascia d'età. Numeri (NO) e intervalli di confidenza al 95% (IC95%). Stime basate sui tassi d'incidenza osservati nel periodo 2003-2008.

Le cause che determinano un tumore in un bambino sono a tutt'oggi, purtroppo, sconosciute, né sono noti sicuri fattori ambientali (come il fumo nell'adulto) implicati nello sviluppo di un tumore infantile. Sono, tuttavia, note rarissime e particolari condizioni (quali alcune malformazioni congenite e sindromi ereditarie) spesso associate a certe forme di neoplasia: per esempio, il tumore di Wilms è osservabile in portatori di emi-ipertrofia somatica (cioè il maggior sviluppo di una parte del corpo) e di aniridia (mancanza dell'iride); le neoplasie cerebrali in portatori di neurofibromatosi; le leucemie in bambini affetti da sindrome di Down. Da queste osservazioni, oltre che da altre emergenti, si può affermare che alcuni fattori genetici svolgano un ruolo importante, seppur non ancora chiarito, nel favorire lo sviluppo di un tumore in un bambino. Ma considerare fattori genetici come predisposizioni all'insorgenza di un tumore in un bambino non significa che tali neoplasie siano ereditarie. Solo per il retinoblastoma bilaterale (neoplasia che colpisce la retina nei primi due anni di vita) è stata accertata l'ereditarietà. Da quanto esposto, appare chiara la difficoltà di adottare misure di prevenzione. Come per tutte le forme neoplastiche, la

diagnosi precoce è invece la premessa fondamentale per attuare terapie tempestive ed efficaci, allo scopo di raggiungere una sicura e definitiva guarigione. L'identificazione di una sospetta neoplasia nel bambino è, comunque, momento diagnostico assai difficile. Proprio perché rari e perché danno segno di sé con una sintomatologia spesso vaga e non specifica, i tumori del bambino sono talora difficili da diagnosticare in tempi brevi, specie quando - come avviene frequentemente - le condizioni generali del bambino e dell'adolescente non ne risultano compromesse.

Negli ultimi 25 anni, da quando cioè pediatri, chirurghi, radioterapisti dei tumori hanno affrontato con tenacia e senza fatalismo i problemi apparentemente disperati dei tumori dell'infanzia, l'oncologia pediatrica ha avuto sviluppo autonomo. L'oncologia e la pediatria, due discipline così lontane fra loro, si sono in tal modo alleate nella lotta per la vita. I miglioramenti nella sopravvivenza e nelle percentuali di guarigione oggi, ottenibili nelle varie neoplasie del bambino con quello che è definito l'approccio multidisciplinare al problema cancro - iniziato proprio nei tumori dell'infanzia e poi applicato anche all'oncologia dell'adulto - sono il risultato di questo appassionato e faticoso lavoro, affrontato con sistematicità e metodo in istituzioni oncologiche e pediatriche.

1.6 Gestione del paziente oncologico

“I Bambini Imparano ciò che vivono”. È sulla base di questa riflessione della scrittrice, pedagogista Dorothy Law Nolte, che il paziente oncologico pediatrico andrebbe sostenuto e aiutato. I bambini non sono solo dei piccoli adulti da curare, ma individui

la cui preoccupazione principale è quella del gioco, del divertimento, tutto ciò che è estraneo al dolore e alla malattia (Arbuckle & Abetz-Webb, 2013).

Nel corso dei secoli, il ruolo del bambino nella società ha subito grandi e alternanti mutamenti (Burgio, 1996). In Francia, nei trattati della Costituzione francese del 1793, già si evincono i primi segni di attenzione alla condizione infantile, la quale proclamava che “il bambino non possiede che dei diritti”. Solo nel Ventesimo Secolo, grazie al progresso delle scienze psicologiche e umane, l’attenzione dello Stato verso la famiglia e la trasformazione della potestà genitoriale in responsabilità parentale, iniziò a svilupparsi concretamente una nuova concezione dell’infanzia. Soltanto in questo secolo, almeno in Occidente, il bambino è divenuto un soggetto di diritti e non più una proprietà della famiglia, acquisendo il riconoscimento dello status che meritava. Ciò sfocia nella proclamazione dei Diritti del bambino da parte dell’O.N.U (1959). Grandi energie sono state dedicate ai problemi dell’educazione e della cura dell’infanzia, proprio grazie a questo cambiamento culturale: sono state avviate iniziative per garantire che le cure ospedaliere del bambino rispettino le sue esigenze specifiche. Il primo obiettivo è stato l’umanizzazione dei reparti di pediatria. In Inghilterra, nel 1959, fu riconosciuta la necessità di garantire la presenza della madre e di spazi di gioco all’interno dei reparti pediatrici di degenza. Solo poco dopo, anche in Italia si diffuse questa attenzione ai bisogni dei bambini ricoverati in ospedale; tra le prime testimonianze ricordiamo quella della psicoanalista Renata Gaddini, che nel 1955, al 2° Congresso Nazionale d’Igiene Mentale, segnalò i “rischi della separazione dei bambini dall’ambiente familiare e la necessità di salvaguardarli da separazioni e perdite in caso di una loro malattia”. Gli studi sugli aspetti psicologici dei bambini

affetti da malattie organiche, da quegli anni, sono stati ampiamente approfonditi; gradualmente sono stati realizzati piani di cura, all'interno di ambiti ospedalieri, adattati alle esigenze specifiche del bambino e dotati di risorse adeguate come spazi di gioco, servizi scolastici, letti per la permanenza notturna dei genitori e altro ancora. Le cure dei bambini malati di neoplasie sono così diventate sempre di più multidisciplinari, con un'integrazione fra interventi medici, infermieristici e attività di assistenza psicosociale, scolastica e di gioco.

La valutazione e l'adattamento delle difese nei pazienti e nei loro genitori, è stata in seguito considerata una parte estremamente rilevante del lavoro clinico, e, più la patologia è grave, più è ampia la quantità dei suoi bisogni che richiedono assistenza. Ovviamente, il personale dell'équipe o le famiglie dei pazienti stesse, possono richiedere un intervento specialistico. Oggetto dell'intervento psicologico non è il bambino soltanto, ma la triade che si forma tra lui e i genitori. Ciò si basa sulla considerazione del fatto che i genitori costituiscono gli elementi essenziali nei primi anni di vita del bambino, e per tale motivazione egli non può essere considerato isolato dai suoi genitori. Numerosi autori, fra questi ricordiamo R. Spitz (1968), J. Bowlby (1978), D. Winnicott (1975), R. Gaddini (1955) hanno evidenziato il disagio e le sofferenze indotte dall'ospedalizzazione nei bambini. Nel 1951, l'Organizzazione Mondiale della Sanità aveva raccolto dati evidenti degli effetti dannosi della carenza di cure materne e quindi dei rischi di degenze prolungate senza la presenza della madre; nel 1959, l'Assemblea Generale delle Nazioni Unite stesero la Carta dei Diritti del Fanciullo che tutelava la necessità di salvaguardare la salute fisica e intellettuale, affettiva e relazionale dei bambini.

Fortunatamente, nell'ultimo secolo, si è andata sempre di più rafforzando l'idea del "bambino ospedalizzato" come un individuo che necessita di avere attenzioni e trattamenti particolari. L'ospedalizzazione costituisce nel bambino un trauma psichico che si manifesta con depressione, apatia, sfiducia verso i genitori e verso la realtà che lo circonda, fino a problemi nello sviluppo della personalità (Robertson, 1958). Lo stesso Robertson nel saggio "Bambini in Ospedale"-(1958)- dimostra, sulla base di verifiche sperimentali, che l'ospedalizzazione e l'allontanamento dai genitori costituiscono una grande sofferenza per i pazienti pediatrici.

Queste affermazioni, che possono sembrare ovvie al giorno d'oggi, erano molto all'avanguardia negli anni 50', considerando che anche l'Organizzazione Mondiale della Sanità nel 1960, definiva la pediatria come "un'applicazione della medicina generale ai bambini", tralasciando quindi ogni differenza fra malati pediatrici e adulti. Gli studi di Robertson segnarono un punto di svolta su questo tema, tale che nel 1959, fu pubblicato un rapporto (The Platt Report) da parte di un gruppo di medici e psicologi sotto la guida del chirurgo Henry Platt. Da questa collaborazione nacque "The welfare of Children in hospital", un documento che ricalcava i principi di Robertson. L'opinione pubblica internazionale si andò sempre più sensibilizzando all'argomento e tra le varie assemblee le conclusioni sfociarono nei seguenti Documenti: "La dichiarazione sui diritti del Bambino"- 1959- da parte dell'Assemblea Generale delle Nazioni Unite, dove si riconobbe al bambino un diritto a ricevere cure mediche adeguate e un'attenzione particolare, a causa della sua mancanza di maturità fisica e intellettuale. Nel 1988 fu redatta la "Carta di Leida", nata dalla riflessione di 12 associazioni di volontariato ospedaliero europee, nella quale, in 10 punti venivano

riassunti gli interventi prioritari per il benessere del bambino, prima e durante il ricovero. La svolta principale si ebbe, però, nel 1993 quando la carta di Leida fu trasformata nella “Carta di EACH” con l’aggiunta di altri elementi importanti quali la presenza dei genitori, il gioco e l’ambiente. Tale documento è d’importanza notevole, tant’è che il Parlamento Europeo ha già proposto di trasformarla in una vera e propria “Carta dei diritti dei Bambini Ospedalizzati”.

CARTA DI EACH

1. Un bambino o una bambina saranno ricoverati in ospedale solo se le cure di cui hanno bisogno non possono essere assicurate, con la stessa efficacia, a casa o in regime di day hospital.
2. Un bambino o una bambina ricoverati in ospedale avranno diritto alla vicinanza dei propri genitori o di altre persone amiche in ogni momento della giornata.
3. I genitori verranno accolti all'interno del reparto e saranno aiutati e incoraggiati a rimanervi. Essi saranno messi in condizione di non dover affrontare spese aggiuntive o subire perdite economiche. Per partecipare alla cura del proprio figlio, i genitori saranno informati riguardo i tempi e i ritmi della vita del reparto e la loro collaborazione attiva sarà incoraggiata.
4. Bambini e genitori hanno diritto a ricevere informazioni in modo adeguato alle proprie conoscenze e capacità di comprensione. Il personale cercherà di minimizzare lo stress fisico e emotivo conseguente al ricovero e alla lunga ospedalizzazione.
5. Bambini e genitori hanno diritto a partecipare consapevolmente alle decisioni sanitarie che li riguardano. Ad ogni bambino o bambina saranno evitate cure mediche ed esami superflui.
6. Un bambino o una bambina ricoverati saranno curati assieme ad altri bambini che hanno le stesse esigenze di crescita e sviluppo e non saranno inseriti in reparti per adulti. Non viene posto nessun limite all'età dei visitatori dei bambini ricoverati.
7. Un bambino o una bambina ricoverati avranno la possibilità di giocare, divertirsi e lavorare in maniera adeguata alla loro età e condizione medica. Avranno la possibilità di vivere in un ambiente pensato e attrezzato per le loro esigenze in questo senso.
8. Bambini o bambine saranno seguiti da uno staff adeguatamente preparato in grado di affrontare i bisogni fisici, emotivi, e di crescita dell'intero nucleo familiare.
9. Continuità e costanza nelle cure sarà assicurata dall'equipe del reparto.
10. Bambini e bambine ricoverati saranno trattati con tatto e comprensione; la loro privacy sarà rispettata in ogni momento

Figura 3. Decalogo della Carta di EACH

Le linee guida, indicate da tale documento, sono a oggi utilizzate in gran parte degli ospedali pediatrici dell'Unione Europea, e sono ritenute di applicazione obbligatoria per tutelare il benessere psichico del paziente oncologico pediatrico.

1.7 L'impatto della malattia oncologica sull'assetto psicologico del bambino

Il tumore rappresenta per i bambini una situazione di crisi. I pazienti oncologici collegano la malattia con emozioni quali delusione, tristezza e stanchezza (Canevaro, 1976). Il bambino si trova a dover affrontare il dolore, la rabbia, la paura, l'impotenza e l'ansia vissuta dai familiari. Gli elementi che maggiormente creano stress in un bambino sono:

- L'allontanamento dai genitori
- L'alterazione delle sue abitudini
- La scarsa conoscenza dell'ambiente a lui estraneo

A tutto questo il bambino risponde a suo modo, e sviluppa meccanismi di difesa soggettivi atti a superare il momento di crisi. Spesso la reazione è talmente eccessiva che porta il bambino a dubitare di tutto ciò che lo circonda, anche dei cari. Le osservazioni cliniche sui pazienti guariti dopo una neoplasia pediatrica mostrano come a volte, ma non sempre, l'esperienza potenzialmente traumatica di una malattia organica grave possa provocare un trauma psichico (Clerici, 2003). Sono descritti come fattori potenzialmente traumatici, l'esordio improvviso, il dolore, l'angoscia di morte e altri elementi ancora. La psicologia dinamica indica che l'aspetto traumatico principale è la comprensione della malattia, per l'insufficienza delle difese individuali e del contesto familiare, diventa per il paziente un evento impossibile da comprendere,

controllare e perfino pensare. Il ruolo dei meccanismi di difesa è fondamentale nell'adattamento alla malattia, anche a lungo termine, e fra quelli messi in atto più spesso va ricordata la regressione. Negli adulti la regressione comporta un efficace adattamento alla condizione di malattia, purché sia mantenuto un sufficiente grado di autonomia personale e individuale per riprendere una vita attiva una volta guariti (Costa *et al.*, 1996). Nell'età evolutiva il problema della regressione si pone in maniera differente. La patologia grave, con il suo carico di angoscia di morte e la particolarità delle cure, può condizionare una regressione drammaticamente maggiore, differente a seconda delle diverse fasi dello sviluppo. In particolare alcune tappe importanti del processo di crescita (la seconda infanzia e il passaggio dalla pre-adolescenza all'adolescenza vera e propria) implicano difficoltà nel gestire l'equilibrio tra le esigenze di autonomia e il bisogno di essere accuditi. Una regressione eccessiva in queste fasi dello sviluppo può quindi ostacolare la ripresa del cammino successivo. L'utilizzazione massiccia di altri meccanismi di difesa (quali ad esempio la razionalizzazione e l'intellettualizzazione) durante le varie fasi della malattia possono predire possibili problemi psichici in un momento successivo. Dalle osservazioni della letteratura di area psicodinamica emerge come i bambini debbano poter mantenere una sorta di doppio binario nella comprensione della propria malattia: da una parte è necessario che organizzino le loro difese reprimendo, e quindi allontanando intenzionalmente le paure e il dolore, per investire sulla speranza e dall'altra hanno bisogno di non "trovarsi emotivamente soli" a gestire le loro angosce, di sentire che l'altro (soprattutto i genitori) può comprendere i loro stati d'animo senza essere travolto dalla paura e perdere contatto con la realtà.

Le modalità di reagire dipendono dalla maturità e dall'età del bambino, dalla gravità della malattia e dalla brutalità delle terapie. Secondo Elizabeth Kübler-Ross (1926 – 2004), medico psichiatra e docente di medicina comportamentale, il paziente oncologico ha individuato cinque atteggiamenti nel cammino verso la malattia:

- Rifiuto e isolamento
- Collera
- Patteggiamento
- Depressione
- Accettazione

Queste fasi s'intrecciano tra di loro e non seguono un ordine cronologico. Possono durare da poche ore a parecchi mesi, dal momento della diagnosi-sentenza a quello della morte. Sono responsabili, quindi, della determinazione del percorso del lento morire psicologico, strettamente legato al morire sociale, morale e fisico che accompagna le ultime evoluzioni della malattia. La prima fase è caratterizzata dalla negazione, dal rifiuto di voler affrontare la malattia e di prendere consapevolezza di che ciò che si sta vivendo. Nella seconda fase emerge la rabbia. La collera è rivolta verso il destino (“perché proprio a me?”) e verso tutto ciò che è messaggio di vita che continua, ma solo per gli altri.

L'ostilità è rivolta soprattutto ai cari, a chi si rende più disponibile, a chi si ama di più, perché si pensa che questo affetto verrà tradito. La fase del patteggiamento è ancora una fase progettuale. Una fase in cui entra in gioco la speranza. Si tenta il compromesso con chiunque si abbia dei “conti in sospeso”. Generalmente sono respinti i sentimenti di “hopelessness” (non c'è più speranza) e di “helplessness” (nulla

mi può aiutare) e si assiste a quei crolli particolarmente veloci delle difese biologiche e, quindi, all'avvento della morte prematura. La depressione colma quando i sintomi progrediscono. Si possono distinguere due tipi di depressione: una reattiva e una preparatoria. La depressione reattiva è intesa come una sconfitta su tutti i fronti, per tutto ciò che si è perso, per il sopravvento che una malattia e il suo strascico sintomatologico. Ciò si riflette, spesso, sulla perdita dei rapporti sociali, perdita della vita relazionale, perdita di autonomia sia fisica che decisionale, perdita della propria immagine corporea. La depressione preparatoria è, invece, funzione delle perdite che si stanno per subire: dagli oggetti affettivi alla propria vita. Paura dell'ignoto e dell'abbandono emotivo e assistenziale. Consapevolezza del proprio avvicinarsi alla morte e delle difficoltà di relazione che questo provoca nel proprio ambiente, non solo familiare, ma anche sanitario.

L'ultima fase è quella dell'accettazione. In questo stadio, il paziente, raggiunge l'accettazione del suo destino. Ora, chi sente che in qualche modo la propria esistenza continuerà in un'altra forma di vita (dimensione ultraterrena o reincarnazione) o attraverso altre persone (nel ricordo di chi resta) è più favorito nell'ottenere un'accettazione della propria morte. Di converso, chi sente di non avere più il tempo per realizzare qualcosa di molto importante o chi sente di non essere riuscito a raggiungere un obiettivo che si prefiggeva ha grande difficoltà ad accettare la propria morte.

La paura di morire con sofferenza è quasi sempre presente nel malato, paura che, in alcuni casi, lo porta a richiedere anticipatamente di morire. Il controllo del dolore e degli altri sintomi e l'attenzione alla dimensione psicologica possono permettere una

considerevole riduzione della richiesta di porre fine alla vita. In questo caso, le Cure Palliative possono essere considerate una importante alternativa all'eutanasia. L'infermiera Cecily Saunders, fondatrice a Sydenham, nel 1967, del Saint Christopher's Hospice, notava come un malato senza dolore, senza altri sintomi e con una persona accanto, molto raramente rivolgeva questa richiesta.

Un valido aiuto per il superamento di queste fasi è la “terapia umana”, soprattutto per un paziente pediatrico, incapace di comprendere appieno la sua situazione. Il compito degli operatori, dei dottori e dei familiari è di assistere il bambino durante tutte le fasi. Questo si traduce in una questione principalmente d'amore. Comunicare vuol dire: mettere in comune qualcosa ed è necessario essere trasparenti e convinti per ottenere fiducia. Dall'altra parte, anche i genitori, condividono le stesse fasi del figlio malato, ecco la necessità di essere accompagnati a loro volta, per alleviare loro le sofferenze psicologiche dettate dalla malattia del figlio.

Il bambino reagisce, come già accennato, in maniera diversa in dipendenza dell'età. Nei primi anni di vita, i bambini si sentono perseguitati dall'aggressività delle manovre mediche e infermieristiche e dal dolore provocato dagli effetti collaterali delle cure. Potrebbero, pertanto, avere un alterato rapporto e con se stessi e con gli altri, una perdita della sicurezza del nucleo familiare, un'improvvisa destabilizzazione dell'io. In età scolare, la malattia tumorale, è vissuta principalmente come una grande frattura della normalità della propria vita: “Non sono come gli altri, non posso andare a scuola ...”, e si può così riscontrare scarsissima motivazione all'apprendimento e gravi insuccessi scolastici. Da ciò scaturisce la necessità di preservare il più possibile la normalità della vita del bambino ospedalizzato. In tal senso è di fondamentale

importanza la presenza in ospedale della scuola, che rappresenta la possibilità di continuare un percorso che costituisce uno dei maggiori riferimenti per la crescita (Moretto, 2003).

1.8 I diritti del paziente oncologico

Secondo il nuovo Codice deontologico del medico italiano, il paziente ha il diritto di ricevere informazioni - fornite con attenzione e sensibilità – circa la sua malattia. Il medico, invece, ha il dovere di ottenere un consenso informato da parte del malato su eventuali procedure diagnostiche e terapeutiche. In Italia è da molti anni che i medici, e soprattutto gli oncologi, applicano sul malato il principio di autodeterminazione, secondo cui il paziente è visto come parte attiva nel processo della decisione circa cure e trattamenti (dottrina del consenso informato), e si è via via abbandonata la posizione paternalistica, derivata dall'antica medicina Ippocratica, dove solo il medico conosce e decide con la sua autorità.

Il paziente, quindi, ha il diritto di essere informato e pertanto di scegliere se, e a quale trattamento sottoporsi, conoscendo gli eventuali rischi, derivanti da procedure diagnostiche o interventi chirurgici, per la sua integrità; pertanto, in generale, è giusto ed etico informare il paziente, rispettando sempre la sua sensibilità e i corretti tempi e modi dell'informazione. Questo nuovo modo di procedere pone però alcune problematiche, tra cui quella di capire se, effettivamente, il paziente vuole conoscere la propria diagnosi e la relativa prognosi. Numerose indagini svolte nell'Europa del Nord, negli Stati Uniti e in Giappone intorno agli anni '60-80, evidenziano che la volontà del malato di conoscere la propria diagnosi, anche se relativa a una malattia

grave, è valutata in una percentuale oscillante tra il 70% e il 90%. Per quanto riguarda la volontà di conoscere la prognosi, anche se infausta, i dati sono più contrastanti, variando dal 30% all'80%.

Un cambio radicale di questa visione si è avuto negli anni '90. Come sottolinea uno studio pubblicato nel 1998, la maggior parte dei malati di cancro desidera conoscere esattamente la diagnosi e la prognosi della propria malattia, le possibilità di cura e i più rilevanti effetti collaterali, esigendo di essere direttamente coinvolto nelle scelte e nelle decisioni che riguardano la strategia terapeutica, segno di un'evoluzione culturale del paziente. Il desiderio di non conoscere tali informazioni è espresso solo da una minoranza dei casi, soprattutto da parte di soggetti anziani, di soggetti in fase avanzata di malattia o provenienti da aree socio-culturali meno evolute.

1.8 a - Il diritto di sapere: la Carta dei diritti di Parigi -

La carta di Parigi è un documento redatto dal World Summit Against Cancer, il summit mondiale contro il cancro ed è stato predisposto e sottoscritto in occasione del Vertice Mondiale contro il Cancro per il nuovo Millennio, svoltosi a Parigi il 4 febbraio 2000. Tale scritto ha lo scopo di accentuare l'esigenza di focalizzare gli obiettivi di ricerca contro la malattia, al fine di ottenere successi sempre più frequenti, ma anche di rafforzare la cura e l'assistenza dei malati. E', in pratica, un documento che sancisce i diritti dei pazienti oncologici. Il diritto, per esempio a ricevere cure di qualità in maniera omogenea in tutte le strutture ospedaliere e avere accesso, in ogni caso, alla miglior cura disponibile. Ma anche il diritto a migliorare la qualità della

propria vita, cercando di alleviare i disagi fisici e sociali causati dalla malattia e dalle cure a cui il paziente si deve necessariamente sottoporre.

I presupposti che hanno portato alla stesura della suddetta Carta sono molteplici:

- la convinzione che un'assistenza sanitaria di buona qualità costituisca un diritto umano fondamentale;
- il costante impegno nella cura umanitaria e in un'eguale partnership di persone affette da cancro, nello sforzo di combattere questa malattia;
- la forte preoccupazione per l'impatto profondo e universale che il cancro sta avendo sulla vita e sulla sofferenza degli uomini, e sulla produttività delle nazioni;
- in previsione della crescente incidenza del cancro in tutto il mondo, tanto nei paesi industrializzati quanto in quelli in via di sviluppo;
- il riconoscere la necessità di intensificare l'innovazione in tutti i campi della ricerca, della prevenzione e dell'erogazione di assistenza sanitaria;
- la certezza che delle vite possano essere e saranno salvate grazie ad un maggiore accesso alle tecnologie esistenti;
- il constatare che i miglioramenti attualmente raggiungibili in termini di sopravvivenza restano lontani a causa di un'insufficiente enfasi sulla prevenzione, di finanziamenti inadeguati e di un ineguale accesso a cura di buona qualità;
- prevenire e curare il cancro e mantenere ai più alti livelli la qualità della vita di coloro che convivono e che muoiono a causa di questa malattia.

- il ritenere fondamentale un'alleanza tra ricercatori, professionisti del settore della sanità, pazienti, Governi, industrie e media per combattere il cancro e i suoi maggiori alleati, ossia paura, ignoranza e compiacenza;

Secondo gli articoli il paziente:

1. ha diritto alla qualità della vita, all'integrità fisica e mentale, alla dignità, al rispetto della privacy, al rispetto dei propri valori e idee morali, culturali, filosofiche, ideologiche e religiose, e a non essere discriminato.
2. ha diritto all'eguaglianza di accesso al trattamento. Gli aspetti medici e psicosociali sono egualmente importanti per il malato di cancro. Quest'ultimo, i suoi familiari e amici hanno bisogno di counselling, sostegno e assistenza specifica durante e dopo il trattamento. Ha diritto a cure qualitativamente adeguate, caratterizzate da elevati standard tecnici compatibili con le risorse e le competenze cliniche disponibili, e da un rapporto umano con gli operatori sanitari. Il malato di cancro ha diritto a ricevere sempre l'assistenza sanitaria necessaria per la cura, riabilitazione e prevenzione dal rischio di recidive. Ha diritto di scegliere liberamente i medici e i centri di cura cui rivolgersi e di cambiarli se è insoddisfatto.
3. Il paziente ha diritto a chiedere, in qualunque momento, la consulenza di altri medici. Egli deve sempre essere curato avendo per scopo il suo massimo bene in conformità con i principi deontologici della pratica medica e sulla base delle tecnologie disponibili. Il malato di cancro ha diritto alla continuità di cura

all'interno di un ospedale, tra più ospedali e anche tra ospedale e assistenza domiciliare.

4. Ha diritto a ricevere un trattamento che assicuri la terapia del dolore secondo l'attuale stato delle conoscenze e un'assistenza terminale compassionevole, e a morte con dignità.
5. ha diritto di essere compiutamente informato sulle proprie condizioni di vita incluse le implicazioni mediche; sulle procedure mediche consigliate, con riferimento anche ai potenziali rischi e benefici di ognuna; sulle eventuali alternative alle prescrizioni proposte, inclusi gli effetti dell'assenza di trattamento, e su diagnosi, prognosi e decorso del trattamento. Tali informazioni devono rendere possibile il consenso informato come presupposto di ogni atto medico o della partecipazione a ricerca e didattica medica. Il diritto all'informazione vale pure per qualsiasi partecipazione a ricerca scientifica o insegnamento di medicina. Le informazioni devono essere fornite al malato di cancro in maniera appropriata, in modo comprensibile, anche attraverso l'utilizzo di idonei strumenti informativi, e gli operatori sanitari devono assicurare che il dialogo si svolga in buona fede. Il malato di cancro ha diritto a non essere informato su sua esplicita richiesta. Ha diritto a indicare la persona che, eventualmente, deve essere informata per suo conto. Ha diritto a conoscere l'identità e la qualifica degli operatori sanitari, soprattutto al momento dell'ospedalizzazione. In tal caso, il malato di cancro ha diritto a essere informato sulle norme che regolano l'ammissione e la permanenza nel centro di cura. I familiari del malato hanno diritto a ricevere informazioni chiare, in

forma per loro comprensibile, riguardo alle opzioni terapeutiche e ai risultati, dalla diagnosi in poi. Le informazioni e il sostegno psicologico devono essere a loro disposizione in ogni fase del trattamento.

6. ha diritto all'autodeterminazione sugli atti medici e sulla partecipazione a studi scientifici o alla didattica medica. Se il malato di cancro è legalmente incapace, è necessario il consenso di un rappresentante legale, assicurando che il malato stesso debba sempre ugualmente partecipare al processo decisionale nella misura più ampia possibile consentita dalle sue condizioni. Se il rappresentante legale si rifiuta di dare il consenso e il medico è dell'opinione che l'atto medico sia nell'interesse del malato, la decisione finale dovrà essere presa in conformità con la procedura di legge. Quando un malato legalmente capace non è in grado di esprimere il consenso informato e in mancanza di un rappresentante legale o di un rappresentante da lui designato, il processo decisionale deve tenere conto, nella massima misura possibile, della volontà nota o presumibile del malato.
7. Tutte le informazioni in merito allo stato di salute e alle condizioni mediche di un malato di cancro, alla diagnosi, prognosi e trattamento e tutte le altre informazioni di tipo personale sono riservate e devono essere trattate come tali. Il malato di cancro ha diritto di accesso alle cartelle cliniche e ai referti tecnici e a qualunque altro documento o registro che riguardi diagnosi, prognosi. Trattamento e cura, nonché a ottenere copia di tutti i documenti o registri o parte di questi. Le informazioni riservate possono essere rivelate solo se il malato di cancro ha acconsentito esplicitamente o se ciò è espressamente

previsto per legge, senza esclusione per i progetti di ricerca. Se le informazioni devono essere trasmesse ad altri operatori sanitari che intervengono nel trattamento del malato di cancro o lo seguono nel periodo in cui è sotto controllo (follow-up), il consenso può ritenersi implicito solo nella misura in cui ciò sia “strettamente” necessario. Tutti i dati che consentano di risalire all’identità del paziente devono essere adeguatamente protetti. Il malato di cancro ha diritto a ottenere che i dati personali e medici che lo riguardano e che sono imprecisi, incompleti, ambigui o non aggiornati, o che non siano pertinenti agli scopi della diagnosi, prognosi, trattamento e cura, siano corretti, completati, cancellati, chiariti e/o aggiornati.

8. Il malato di cancro, durante e dopo il trattamento, non di rado deve affrontare problemi di ordine finanziario ed economico. Egli ha diritto a ottenere sostegno e servizi economici, finanziari e sociali, e adeguato accesso all’istruzione. Al malato di cancro, spesso esposto a dequalificanti discriminazioni sul lavoro, se idoneo, deve essere garantito l’assolvimento delle mansioni precedentemente svolte. Deve essere, altresì, assicurato il mantenimento del posto di lavoro anche nel caso di ripetute e prolungate assenze conseguenti a trattamenti terapeutici.
9. Il malato di cancro deve partecipare attivamente alla diagnosi, alla prognosi e al trattamento terapeutico, fornendo agli operatori sanitari e ai centri di cura le informazioni richieste. Il paziente deve garantire la buona fede nel rapporto con gli operatori sanitari e i centri di cura.

10. Il paziente deve avere accesso alle informazioni e a quelle consulenze che gli consentano di esercitare i diritti enunciati nel presente Documento. Laddove tali diritti non siano stati rispettati, egli deve essere messo in grado di presentare reclamo. In questo contesto dovrebbero essere assicurati strumenti indipendenti e procedure per affermare i diritti in giudizio o mediante forme alternative extra-giudiziali.
11. L'esercizio di tali diritti sanciti nella presente Dichiarazione presuppone che siano istituiti mezzi adeguati allo scopo. L'esercizio di tali diritti deve essere garantito senza discriminazioni nel rispetto delle restrizioni previste dalle norme per la tutela dei diritti dell'uomo e delle procedure previste dalla legge. Se il malato di cancro non può far valere personalmente i diritti sanciti da tale Documento, tali diritti dovranno essere esercitati dal suo rappresentante legale o da una persona da lui stesso designata a tale scopo; anche in mancanza di un rappresentante legale o suo sostituto, si dovranno prevedere misure di rappresentanza del malato di cancro.

1.9 La qualità della vita

“Qualità di vita” è uno dei termini più difficili da definire; concetti come qualità di vita, stato di salute, stato funzionale e impatto soggettivo della malattia e delle terapie sono ancora utilizzati in modo intercambiabile. Poiché ci sono più definizioni di qualità di vita, ci sono anche molti modi per valutarla. C'è oggi un sempre maggiore consenso nel considerare operativamente la qualità di vita come costituita da una struttura multidimensionale. Gli studi realizzati hanno mostrato l'esistenza di quattro

fondamentali dimensioni: fisica, funzionale, psicologica e sociale. Sono state identificate anche altre aree di valutazione non facilmente riconducibili alle quattro dimensioni. Queste includono l'immagine corporea, la sessualità, le funzioni cognitive e gli aspetti spirituali. La valutazione standardizzata delle dimensioni della qualità di vita è orientata a identificare gli effetti, più che le cause. La valutazione di un soggetto o di un gruppo di soggetti potrebbe mettere in evidenza, ad esempio, la presenza di difficoltà nello svolgere le abituali attività, dolore, nausea, ansia, depressione e senso d'isolamento. La corretta identificazione di uno stato di salute percepito con disagio dal soggetto, non dice però nulla su ciò che l'ha determinato, ma può essere un'importante condizione di partenza, un "campanello di allarme", come lo stato febbrile oppure il dolore, utile per andare a ricercarne le cause. Nella ricerca clinica, il passaggio dalle osservazioni rilevate dall'operatore alla valutazione standardizzata delle percezioni soggettive descritte dal malato rappresenta il più rilevante cambiamento nella valutazione della qualità di vita.

1.9.1 Definizione di Qualità di Vita (QoL)

Il concetto di "qualità di vita" è molto antico. Epicuro, nel IV secolo avanti Cristo, nella lettera, a Meneceo, scrisse: "Una salda conoscenza dei bisogni inclina a ricondurre ogni assenso o diniego al benessere del corpo e alla piena serenità dell'animo, poiché questo è il fine della vita felice. A questo fine noi rivolgiamo ogni nostra azione, per allontanarci dalla sofferenza e dall'apprensione". Nonostante ciò, il concetto di qualità di vita intesa come entità misurabile, in altre parole come strumento utilizzabile in sociologia, in medicina e in altri campi è relativamente recente. Una

definizione dell'OMS del 1948 dice: "Qualità di vita è la percezione soggettiva che un individuo ha della propria posizione nella vita, nel contesto di una cultura e di un insieme di valori nei quali egli vive, anche in relazione ai propri obiettivi, aspettative e preoccupazioni". Praticamente e operativamente, la qualità di vita può essere rappresentata da una serie di dimensioni o aree dell'esperienza umana. Queste riguardano, non solo i sintomi del paziente e le sue condizioni fisiche, ma anche la possibilità di un individuo di essere attivo, dal punto di vista fisico, sociale, psicologico e di trarre soddisfazione da quanto fa, in rapporto sia alle proprie aspettative, sia ai propri desideri.

In gergo medico, si parla di "qualità di vita correlata alla salute", definita come "L'insieme degli aspetti qualitativi della vita dell'individuo correlabili ai domini della malattia e della salute, e pertanto modificabili dalla medicina". A sua volta, la definizione di Salute data dalla stessa OMS è: "Completo benessere fisico, psicologico e sociale e non solamente assenza di malattia".

La misura di un concetto così soggettivo e che racchiude un pò tutto come la QoL, è divenuta possibile grazie anche ai contributi su vasta scala provenienti dai ricercatori comportamentali, psicosociali e di assistenza sanitaria. Il QoL è stato definito "la valutazione soggettiva della vita nel complesso", o "QoL si riferisce alla valutazione dei pazienti e alla soddisfazione del loro corrente livello di funzionalità in relazione a quello che percepiscono essere possibile o ideale". Entrambe le definizioni enfatizzano la natura soggettiva e valutativa del concetto. C'è un consenso generale tra i ricercatori che il QoL sia una costruzione pluridimensionale che include svariate dimensioni chiave. A tal proposito, gli strumenti QoL dovrebbero includere: funzionalità fisica

(abilità nell'eseguire attività di cura personale, mobilità, attività fisiche e attività di ruolo come il lavoro o le faccende domestiche); malattia e sintomi riferiti alla cura (come dolore, dispnea e perdita dei capelli); funzionalità psicologica (sofferenza psicologica, ansia, depressione); e funzionalità sociale (interazione con la famiglia, tempo con gli amici, attività ricreative). Più recentemente è stata data maggiore attenzione ai rapporti spirituali ed esistenziali, attività sessuale, immagine del corpo, soddisfazione per l'assistenza sanitaria e per il rapporto dottore-paziente. In generale il termine QoL racchiude tutti gli aspetti del benessere dei pazienti e può includere l'impatto dei modelli di vita, fattori ambientali, ecc... Il termine qualità della vita riferito alla salute (HRQOL), è quindi più appropriato alla ricerca clinica e pratica, poiché si occupa solo degli aspetti della vita influenzati dagli interventi dell'assistenza sanitaria. Quindi, il HRQOL può essere considerato sinonimo di calcolo dello stato soggettivo di salute. Nonostante ciò, il termine qualità della vita (QoL) risulta essere più frequentemente usato negli scritti di oncologia, più del HRQOL o stato soggettivo di salute. Ciò probabilmente è dato dal fatto che sembra intuitivamente inappropriato discutere di "salute" in pazienti che soffrono di malattie potenzialmente mortali. L'interesse accentuato verso la QoL dipende dalla constatazione che, ovviamente, lo stato di malattia influisce in molti aspetti sulla vita del paziente. Ciascun dominio di misurazione tiene conto dello stato oggettivo della salute e della percezione soggettiva della salute stessa, che è influenzata dalla personalità di ciascuno. Esistono, infatti, altri fattori che possono influenzare la QoL, ma che non si avvicinano al concetto di salute, come il loro stato familiare, il livello di reddito e il livello di sviluppo.

1.9.2 La misura della qualità della vita e suo utilizzo negli studi clinici

A livello pratico, la misura della qualità di vita è necessaria nei momenti in cui si deve valutare l'impatto di una malattia cronica sulla vita del paziente. È di grande interesse clinico la misura dei parametri fisiologici, che possono essere correlati o no allo stato fisico e a una condizione di benessere. Di fatto, pazienti con stessi criteri clinici possono reagire diversamente, per quanto riguarda la loro condizione di benessere funzionale ed emotivo. Ad esempio, pazienti con QoL di stesso valore possono reagire diversamente nella decisione di continuare a lavorare oppure meno; alcuni, infatti sono costretti ad abbandonare il lavoro, altri continuano a farlo. Per tale motivo, è più interessante per i clinici la percezione soggettiva del proprio stato di salute e l'effetto che il trattamento può avere sulla QoL.

Il potenziale delle misure del QoL è di essere usato per studiare le popolazioni negli esperimenti clinici, di aiutare le interazioni tra medico-paziente e le decisioni cliniche relative alla malattia. L'oncologia è stata il primo campo dove questa misurazione si è applicata. Da numerose ricerche si è evinto che i punteggi del QoL possono avere importanza prognostica nel cancro avanzato. Questo è stato mostrato separatamente in svariati tipi di cancro e con una gamma di diversi strumenti del QoL pluridimensionali convalidati.

Il QoL è stato inizialmente utilizzato come una misura secondaria alle misure tradizionali, quali il responso oggettivo alla cura e alla sopravvivenza. Solo pochi esperimenti clinici hanno fornito risultati interessanti. Ad esempio, si è potuto descrivere come una terapia più aggressiva contro il cancro era collegata con un QoL

migliore rispetto a una cura meno intensiva, malgrado la tossicità. Questo studio ha costituito la base per condurre sperimentazioni cliniche in ambito palliativo. Uno dei risultati più importanti del “movimento QoL” a livello d’interazione individuale medico-paziente è stato quello di considerare maggiormente i sentimenti e gli stati d’animo del paziente nel momento in cui si devono prendere le decisioni cliniche. Questo ha portato ad avere una maggior attenzione alla comunicazione con il paziente al fine di giungere a delle decisioni condivise.

1.9.3 Come e quando misurare la Qualità di Vita

La qualità di vita è, quindi, un insieme di percezioni mentali, di figure e forme immaginarie che, in quanto tali, non possono essere rilevate direttamente. Inoltre, per definizione, essa è soggettiva, e quindi la sua valutazione richiede domande dirette al paziente.

La maniera migliore per interrogare un paziente è, teoricamente, l’intervista. Tuttavia questa non è praticamente realizzabile, per una serie di variabili che non possono poi essere correlate fra tutti i pazienti in tempi diversi. Perciò si ricorre a questionari sviluppati appositamente. Questi questionari possono essere sintetici o analitici. Quelli sintetici sono costituiti da una sola domanda, e mirano a ottenere una valutazione generale molto semplice della qualità di vita del paziente. I questionari analitici valutano diversi domini ovvero dimensioni o aree dell’esperienza umana che si diramano in altrettante aree, generalmente connesse allo stato funzionale del soggetto, esaminato sotto diversi profili (fisico, di ruolo, cognitivo, emozionale, sociale).

I questionari analitici sono di due tipi, generici o specifici per malattia. I primi tendono a valutare lo stato generale del paziente, i secondi fanno riferimento più specificamente ai disturbi o alle limitazioni che il paziente può subire a causa di una particolare malattia.

L'elaborazione dei questionari è un processo lungo, complicato e costoso. Questo si deve al fatto che essi debbano essere poi correlabili fra loro e tra i vari pazienti, e per questo devono rispondere a una serie di caratteristiche: devono essere di facile comprensione (problemi connessi al grado d'istruzione, educazione, età e lucidità dei pazienti), devono essere anche semplici e brevi (problema del declino dell'attenzione), e infine debbono essere riproducibili, specifici e sensibili. Un altro problema nello sviluppo dei questionari è quello della specificità culturale: infatti, la scala dei valori è influenzata dalle differenze culturali, che ovviamente devono essere tenute presenti nell'adattare un questionario a una popolazione differente da quella in cui è stato originariamente sviluppato (traslazione e non traduzione). Ed è per tale motivazione che non sono tradotti questionari sviluppati in altri Paesi e ogni Paese ha il proprio.

Tranne qualche piccola variazione, il questionario tipicamente è composto di 25-35 domande. Le risposte alle domande possono essere di tipo sì/no oppure prevedere una serie di risposte "a scala", ad esempio: per niente, un poco, abbastanza, parecchio, molto.

Nella pratica ospedaliera, i questionari sono consegnati ai pazienti al momento del loro arrivo all'ambulatorio, nell'attesa di essere visitati, al primo incontro, quindi prima di eseguire accertamenti diagnostici o terapie. I questionari devono essere compilati dal paziente personalmente e senza influenze esterne quali possono essere gli interventi da

parte del personale sanitario o del familiare. La somministrazione è ripetuta ogni volta che si siano verificati eventi legati alla malattia che abbiano determinato modificazioni delle condizioni cliniche del paziente, e dopo interventi di terapia.

Il National Institute di Bethesda ha effettuato uno studio sulla qualità di vita di centinaia di pazienti oncologici e loro familiari: dalla ricerca è emerso che più della metà è costretto ad abbandonare il lavoro, mentre il 35% deve ridurre le proprie responsabilità per lo stress emotivo e la mancanza di energie dovute alla patologia. Anche i familiari o la persona che li assiste sono a volte costrette a lasciare il proprio lavoro per dedicarsi al malato o, nel 20% dei casi, sono obbligati a prendere dei giorni di permesso e a ridurre il proprio impegno lavorativo. Per la valutazione della qualità di vita correlata alla malattia oncologica un primo inquadramento generale può basarsi sulle risposte a una delle molte scale di valutazione proposte, tra cui la FACT (Functional Assessment of cancer Therapy) che, attraverso una serie di semplici domande, indirizza il medico agli approfondimenti clinici e di laboratorio necessari. Ma il paziente può, ancora più semplicemente indicare, attraverso una scala cosiddetta “analogo visiva”, il suo livello di energia rapportato alle attività quotidiane e alla qualità di vita globale. In questo caso la domanda è: “Come valuta il suo livello di energia nel corso dell’ultima settimana?”. Il paziente lo indica su una scala graduata che va da 10 a 100. La correlazione di questa semplice indicazione con i risultati ottenibili con il FACT è soddisfacente e completa l’affidabilità delle risposte ottenute, indicando il livello di qualità di vita su una scala che va da 0 a 1.

1.9.4 *Qualità della vita e religione*

Il concetto di “qualità di vita” proviene dalle scienze della vita. In bioetica, fin dall’inizio, è stato considerato come una nozione centrale e rappresenta, infatti, lo studio non solo nell’ambito delle scienze della salute (health sciences), ma anche nell’area delle scienze della vita interdisciplinare. In altre parole, rappresenta lo studio della *qualità della vita* dell’uomo e degli ecosistemi, che, in quanto tale, risulta essere di notevole importanza in campo etico. Questo studio si concretizza nell’osservazione dell’area delle “scienze della vita” e delle “scienze della salute” e come visione globale e comprensiva di tutti i problemi etici nel campo della vita e della salute. Ovviamente, quest’area di analisi è molto più ampia del campo normale bioetico, poiché si lavora in ambito sia “biomedico” sia “ambientale” per *promuovere la qualità della vita*. Si è, per tale motivazione, scelto di coniare un nuovo termine che concettualmente potesse contribuire ad abbracciare tutti i vari campi interessati. Si parla, a questo punto, di “bioetica globale”, vale a dire una bioetica dove la qualità della vita fisica (medical bioethics) sia coordinata alla qualità della vita ambientale ed ecologica (ecological bioethics). In questo modo, i dilemmi della bioetica ecologica sono in sintesi con i dilemmi della bioetica medica.

Molto spesso il concetto della qualità della vita è visto in contrapposizione a quello di sacralità della vita. Di per sé, questi due concetti non dovrebbero essere letti in forma antagonista, perché il modello “sacralità della vita” non esclude quello di “qualità della vita”, e viceversa.

In effetti, questi due concetti si presentano come due paradigmi alternativi perché, probabilmente, le prospettive ideologiche innalzate da alcuni sistemi di pensiero hanno

reso questa visione tale. Secondo la bioetica religiosa, la dignità dell'uomo è talmente "sacra" da stabilire una gerarchia di valori *a priori*, che dipendono dall'intangibilità-sacralità della natura umana. Nella bioetica laica, invece, non c'è più spazio per il principio della "sacralità della vita", c'è piuttosto il principio della "qualità della vita" intesa come il "vivere bene" nella ricerca della massimizzazione del principio (principio utilitarista) e nel rispetto dell'autonomia dell'individuo, dove non esistono doveri che possono vincolare per se stessi, ma solo libertà che termina quando inizia quella altrui. In caso, di conflitto di doveri è moralmente ragionevole ricorrere alla soluzione che prospetta la scelta "peggiore".

La visione biblica e cristiana della vita dell'uomo e della creazione lascia trapelare il concetto per cui le *religioni* possano contribuire a una positiva evoluzione della vita. Infatti, secondo tali visioni la vita e la creazione sono realtà buone, positive, che hanno delle qualità intrinseche. La stessa vita, intesa come uscita dalle mani di Dio, ha dimensioni di alta qualità, secondo l'esegesi biblica. Il male e il peccato sono propri dell'uomo malvagio o indifferente che rende la propria vita o quella di chi gli sta accanto di scarsa qualità. Da questa immagine si comprende come una vita vissuta con la compassione degli altri, con la solidarietà, con la presenza amichevole, merita sempre di essere vissuta. In questo contesto di fede, la religione aiuta a non interpretare la qualità della vita in modo prevalente o esclusivo come efficienza economica, consumismo disordinato, bellezza e godibilità della vita fisica, dimenticando la dimensione più profonde – relazionali, spirituali e religiose – dell'esistenza. In un simile contesto la sofferenza, inevitabile peso dell'esistenza

umana ma anche fattore di possibile crescita personale, viene “censurata”, respinta come inutile, anzi combattuta come male da evitare sempre e comunque.

Quando la prospettiva di un benessere almeno futuro scompare allora pare che la vita abbia perso ogni significato. In questa prospettiva, la fede può indicare gli itinerari adeguati verso la qualità della vita attraverso la *ricerca del senso della vita* quando la vita sembra non avere più alcun senso.

In fondo, la “ricerca di un senso” è stata ed è alla base della storia dei metodi e dei paradigmi della bioetica della cultura contemporanea, una ricerca di senso non del valore “vita”, ma del “senso stesso della vita”. È innegabile che la ricerca del senso della vita, cui l’uomo di ogni cultura è protagonista, è all’origine dell’interesse della bioetica. Il pensiero postmoderno ha orientato la sua filosofia non verso entità astratte o dimensioni speculative, ma verso una cultura della storia, intesa come *cultura della “qualità” della vita*. L’interesse per la bioetica è un interesse di pensiero, di cultura, di ricerca di senso della storia. La “domanda bioetica” è senz’altro una domanda di senso. Il significato più profondo della bioetica consiste dunque nell’aver dato una nuova e originale consistenza alla perenne ricerca del senso della vita e della storia (Russo, 2009).

1.9.5 La qualità della vita nel paziente oncologico

L’oncologia è stato il primo campo dove il QdV è stato utilizzato. Nel 1949 Karnofsky proponeva il suo indicatore di malattia che valutava l’attività autonoma del paziente e le necessità assistenziali in una scala graduata da 100 (normale attività) a 0 (paziente deceduto). Inoltre, la Food and Drug Administration ha stabilito che i nuovi

farmaci antitumorali, per essere immessi sul mercato, dovessero dimostrare un effetto vantaggio in termini di sopravvivenza oppure di miglioramento della Qualità di Vita dei pazienti (Johnson & Temple, 1985). Da qui si evince l'importanza della misurazione della qualità della vita del paziente e la sua influenza nella decisione clinica del medico e nella sua prassi quotidiana.

Negli ultimi anni, la vita di molti pazienti oncologici è stata di molto prolungata grazie ai progressi della medicina. Questo "tempo guadagnato" però significa ben poco se l'esistenza di queste persone è fortemente condizionata da sofferenza cronica, dall'affaticamento, dall'ansia, da problemi legati alla sfera dell'affettività e della sessualità.

La crescente importanza riconosciuta alla qualità sta assumendo un ruolo fondamentale nell'approccio al malato di cancro: le valutazioni di questi elementi stanno sempre più diventando una prassi standard anche negli studi clinici poiché il controllo del dolore e della *fatigue* da cancro ha un notevole impatto sull'esistenza del paziente e sul suo stato psichico e della sua famiglia, soprattutto se il malato è un bambino. Secondo dati abbastanza recenti, i bambini sono costretti a rinunciare alla frequenza della scuola, a praticare l'attività sportiva (RustØen *et al.*, 2005). È d'imperativo etico, interessarsi allo stato d'animo del paziente e cercare in tutti i modi di alleviare la sua sofferenza, soprattutto se il paziente è un bambino. In ambito ospedaliero si cerca per lo più di sostenere il piccolo paziente ad adattarsi alla sua nuova realtà per migliorare la sua qualità di vita, in modo tale che egli stesso affronti meglio la terapia e la sua permanenza in ospedale. È sempre più diffuso che gruppi di beneficenza si occupino sistematicamente di aiutare i bambini attraverso l'uso della

"Clown-terapia", ovvero attraverso l'uso delle tecniche del clown e del circo a favore di chi soffre un disagio fisico, psichico o sociale in corsia d'ospedale. Questa iniziativa parte dal presupposto che ridere, specialmente nelle situazioni critiche e disperate, libera tutta una serie di mediatori e neurotrasmettitori endorfinici che possono capovolgere emozionalmente la più drammatica delle situazioni, come quella dei bambini ospedalizzati. Un'iniziativa nobile, che vede come maggiori protagonisti i bambini giacché i pazienti adulti purtroppo, perdono la naturale inclinazione al divertimento che è spesso sostituita dall'ansia, dalla depressione e dalla paura. Oggi la "Clown-terapia" è considerata una vera e propria terapia coadiuvante della medicina tradizionale ed è considerata, anche dalla medicina tradizionale, un metodo di "sollevio" che trova le sue basi nella Gelotologia (dal greco "gelos", che vuol dire "riso"), ma anche nella medicina psicosomatica e nell'immunologia neuro-psichica. Gli effetti psicologici e biologici del riso e del buon umore sono tutti positivi. Il riso riduce la secrezione di ormoni da stress, come il cortisolo, e stimola la produzione di betaendorfine, analgesici prodotti dall'organismo (come sostiene William Frye, neurologo dell'Università di Stanford). Nell'ambito delle terapie coadiuvanti, anche la "Pet-Therapy" è considerata un ottimo adiuvante per il bambino affinché rielabori l'esperienza della malattia attraverso nuovi canali di comunicazione, che si creano spontaneamente nell'interazione bambino-animale (Brodie *et al.*, 1999).

1.10 Leucemia mieloide acuta (LMA)

1.10.1 Generalità

La leucemia mieloide acuta (LMA) è il tumore dei progenitori emopoietici causato da mutazioni oncogeniche acquisite, che bloccano la differenziazione portando all'accumulo di blasti mieloidi immaturi nel midollo. L'arresto dello sviluppo mieloide causa insufficienza midollare e varie complicanze legate ad anemia, trombocitopenia e neutropenia (Robbins & Cotran, 2010). La LMA può verificarsi a qualsiasi età ma l'incidenza risulta maggiore durante l'adolescenza. La leucemia congenita che si verifica durante i primi 4 anni d'età è per lo più LMA (Rachna & Amitabh, 2015). Diversi fattori, sia di natura genetica sia ambientale, determinano lo sviluppo di tale patologia, ma a tutt'oggi le cause che determinano l'insorgenza della LMA non sono del tutto note. I fattori che possono favorire una trasformazione leucemica sono: radiazioni ionizzanti, sostanze chimiche (benzene, pesticidi), precedenti chemio o radioterapia, virus, coloranti, fumo. Rare sindromi ereditarie, quali la Sindrome di Down, Sindrome di Bloom, Sindrome di Klinefelter, anemia di Fanconi, neurofibromatosi congenita ecc, sono associate ad un'alta incidenza di LMA (Castoldi & Liso, 2013).

1.10.2 Clinica e diagnosi

Il quadro clinico della leucemia mieloide acuta può essere molto variabile, e dipende da:

- alterata e insufficiente produzione di cellule ematiche mature: piastrinopenia (emorragie), eritrocitopenia e deficit di emoglobina (anemia) e neutropenia (infezioni);
- liberazione di citochine, rilasciate in parte sia dalle stesse cellule leucemiche sia dalle cellule del sistema linfatico e monocito-macrofagico;
- infiltrazione di tessuti e di organi non emopoietici da parte di cellule leucemiche (Tura *et al.*, 2011).

La maggioranza dei pazienti con LMA, presenta pallore, stanchezza, sanguinamento o febbre come conseguenza dell'anemia; l'insufficiente produzione di piastrine comporta manifestazioni emorragiche mentre l'insufficiente produzione di neutrofili determina suscettibilità a infezioni (Tura *et al.*, 2011). Per contro, pazienti con un'elevata conta leucocitaria possono manifestare difficoltà respiratorie dovute alla presenza d'infiltrati polmonari (Seth & Singh, 2015). La diagnosi della LMA richiede esami del sangue periferico del midollo osseo, sia per ricercare, sia quantificare i blasti. Ciò che necessita per la diagnosi è l'esecuzione della formula leucocitaria, per identificare il tipo di leucociti circolanti. In un soggetto normale i leucociti circolanti sono:

- Neutrofili 50-70%
- Eosinofili 1-3%
- Basofili 0-2%

- Linfociti 20-40%
- Monociti 3-8%

Invece nella LAM una parte dei linfociti circolanti sono blasti mieloidi, a volte rari (meno del 10%), altre volte predominanti (dal 50 al 100%) (Tura *et al.*, 2011). Sono necessarie, inoltre altre indagini per definire meglio il grado d'immatùrità delle cellule leucemiche, quali reazioni citochimiche, indagine citofluorimetrica e immunocitochimica, indagine citogenetica, indagini molecolari (Pontieri *et al.*, 2005).

1.9.2 La classificazione

Le leucemie acute mieloidi si possono distinguere in tre categorie sul piano biologico, clinico e prognostico:

- *Primarie o de novo*; esse compaiono acutamente nei soggetti in cui non è dimostrabile una significativa esposizione ad agenti leucemogeni. Hanno, inoltre, una prognosi migliore rispetto le secondarie.
- *Secondarie* a esposizione nota ad agenti leucemogeni; tra queste hanno particolare importanza quelle che seguono una terapia radiante e/o antitumorale di una precedente neoplasia.
- *Secondarie* a una precedente sindrome mielodisplastica (Tura & Bacarani, 2011).

Inoltre vi sono due importanti sistemi usati per classificare la LMA in diversi sottotipi:

- FAB (French-American-British)
- WHO (World Health Organization)

1.10.3 La classificazione FAB

Lo scopo delle differenti classificazioni di neoplasie ematologiche è quello di fornire criteri affidabili per la loro diagnosi e la loro classificazione in entità di malattia clinicamente rilevanti. Nel 1982, gli ematologi francesi, americani e britannici (gruppo FAB Franco-Americana-Britannica) hanno introdotto una specifica classificazione per le sindromi mielodisplastiche (SMD), un gruppo eterogeneo di malattie che prima della FAB è stato spesso indicato solo come "preleukemia". Nel corso dei successivi due decenni, la classificazione FAB ha agevolato numerosi studi morfologici, clinici, e genetici che hanno contribuito a chiarire il processo della malattia e la sua gestione (Vardiman, 2012).

Tale classificazione suddivide la LAM in otto sottotipi da M0 a M7, in base alla linea differenziativa della popolazione leucemica e alla completa e parziale soppressione della capacità maturativa del clone neoplastico (Tura & Bacarani, 2011).

- La LMA M0 (mieloblastica senza maturazione) è caratterizzata da blasti con morfologia indifferenziata, di piccole o medie dimensioni, con un nucleo di piccole dimensioni e circondato da scarso citoplasma. Tra le possibili anomalie genetiche si ricordano: inv (3q26), traslocazioni quali t(3;3) e possibile la t (9;22), monosomia 5, monosomia 7, delezione del braccio lungo del cromosoma 5 (5q-), delezione del braccio lungo del cromosoma 7 (7q-) (Gambella, 2003).
- La LMA M1 (mieloblastica a cellule indifferenziate). Presenta blasti con un grosso nucleo più o meno rotondo, circondato da uno scarso citoplasma basofilo con pochi granuli azzurofilari e corpi di Auer.

- La LMA M2, (mieloblastica). È presente nel 10-12% dei pazienti con LMA. I blasti presentano granuli azzurri. Tra le anomalie cromosomiche presenti sono principalmente le traslocazioni T (8;21) e la t (6;9) (Tura & Bacarani, 2011).
- La LMA M3 (promielocitica). È caratterizzata dalla presenza di blasti simili a pro-mielociti con granuli spesso ammassati (Della Corte & D'Ippolito, 1999). Nel 100% dei casi la M3 è caratterizzata da una sindrome da coagulazione intravasale disseminata causata da materiale tromboplastinico liberato da cellule leucemiche. La principale alterazione cromosomica è la traslocazione t (15;17) (Tura & Bacarani, 2011).
- La LMA M4, (mielomonocitica), presenta, sia nel sangue periferico sia nel midollo, blasti mieloidi e blasti monocitoidi. Le alterazioni cromosomiali presenti sono traslocazioni, quali t (6;9) e t (9;11) e la monosomia 7 (Della Corte & D'Ippolito, 1999).
- La LMA M5, (monoblastica), presenta blasti monocitoidi sia per forma sia per grandezza. Le alterazioni cromosomiche presenti sono un riarrangiamento 11q23 nel 35% dei casi e la traslocazione t (8;16) (Tura & Bacarani, 2011).
- La LMA M6, (eritroblastica). È una patologia molto rara caratterizzata dal fatto che più del 50% dei blasti hanno caratteristiche morfologiche e immunofenotipiche eritroidi. Non presenta alterazioni cromosomiali proprie. (Tura & Bacarani, 2011).

- La LMA M7 (megacarioblastica). Presenta blasti di dimensioni molto variabili, dotati di un nucleo con due o tre nucleoli, ed estroflessioni citoplasmatiche, dovute alla presenza delle piastrine (Gambella, 2003).

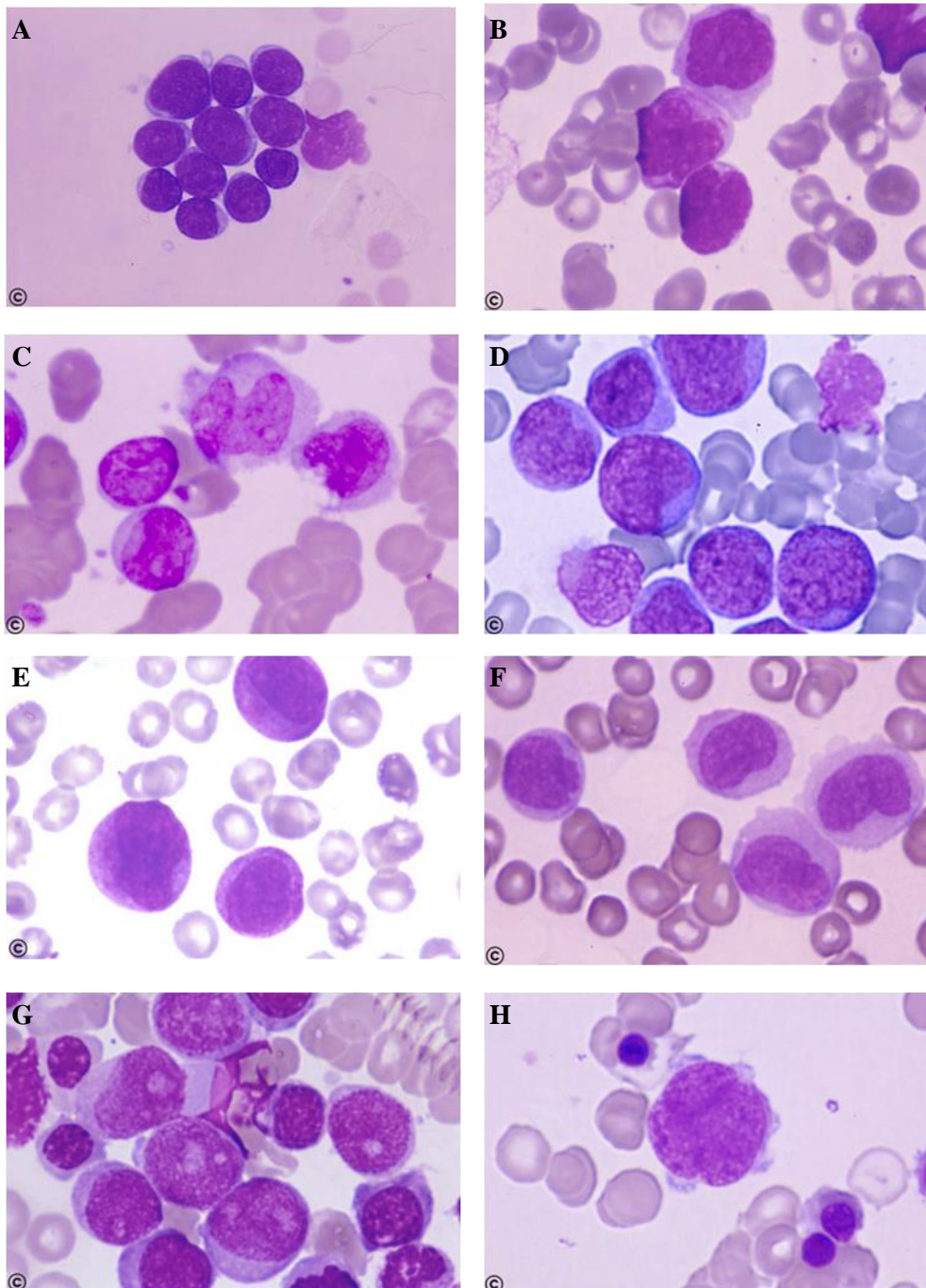


Figura 4. Vari Sottotipi della LMA: A: M0; B:M1; C:M2; D:M3; E:M4; F:M5; G:M6; H:M7

Inoltre, la caratterizzazione della LMA può essere effettuata anche attraverso un'analisi immunofenotipica che consente di individuare mediante anticorpi monoclonali alcune specifiche proteine espresse sulla superficie delle cellule leucemiche (gli antigeni più comuni nelle LAM sono CD13, CD33, HLA-DR, CD34, CD14, CD15). Quest'analisi è effettuata attraverso un'indagine citofluorimetrica. In particolar modo, i vari antigeni presenti sulle cellule leucemiche sono:

- per la M1, M2 e M3: CD34, CD33, CD13
- per la M4 e M5: CD11, CD13, CD14, CD33
- per la M6: gli antigeni ABH e la glicoforina
- per la M7: CD41, CD42a, CD42b (Della Corte & D'Ippolito, 1999).

1.10.4 La classificazione (WHO) dell'Organizzazione mondiale della sanità

Nel 2001, l'Organizzazione Mondiale della Sanità (WHO, World Health Organization) ha introdotto una classificazione delle leucemie mieloidi acute più accurata. La classificazione è stata utilizzata negli studi clinici e negli studi patologici ed epidemiologici e ha fornito le basi per nuove indagini genetiche e molecolari. Il criterio principale della classificazione è il riconoscimento delle malattie distinte in base alla morfologia, alle caratteristiche immunofenotipiche, genetiche, molecolari e cliniche. Tale classificazione, aggiornata nel 2008, racchiude le linee guida per la diagnosi di questi tumori e consente il riconoscimento delle diverse forme leucemiche, tramite un approccio multidisciplinare (Campo *et al.*, 2011). Le modifiche apportate alla classificazione WHO hanno permesso di introdurre sottotipi morfologici e di creare

categorie definite da alterazioni sia citogenetiche sia molecolari (Vardiman *et al.*, 2009). Riconosce quattro principali categorie:

- LMA con aberrazioni genetiche,
- LMA secondarie a sindromi mielodisplastiche,
- LMA secondarie a chemioterapia/radioterapia
- LMA non altrimenti specificata (Robbins & Cotran, 2010).

LAM con anomalie genetiche ricorrenti	LAM con t(8;21)(q22;q22); (AML1 [CBFA]/ETO)	
	LAM con anomalie eosinofile midollari con	inv(16)(p13q22)
		t(16;16)(p13;q22) (CBFB/MYH11)
	LAP = LAM t(15;17)(q22;q12) (PML/RARA) e relative varianti	
LAM con anomalie 11q23 (MLL)		
LAM con displasia multipla (de novo o secondarie a MDS specie AREB o AREBt)		
LAM, correlate alla terapia	da agenti alchilanti.	
	da inibitori della topoisomerasi II	
LAM di derivazione ambigua	LAM indifferenziata	
	LA bilineare (presenza contemporanea di più cloni trasformati)	
	LA bifenotipica (singola popolazione di cellule leucemiche con simultanea espressione di differenti origine emopoietica)	
LAM non altrimenti caratterizzata	LAM con minima differenziazione (FAB M0)	
	LAM senza maturazione (FAB M1)	
	LAM con maturazione (FAB M2)	
	AMML (FAB M4)	
	FAB M5a and M5b	
	LAM eritrocitaria (FAB M6)	Eritroleucemia (FAB M6a)
		Leucemia Eritroide Pura (FAB M6b)
	Leucemia Acuta Megacariocitica (FAB M7)	
	Leucemia Acuta Basofila	
	Panmielosi acuta con mielofibrosi	
Sarcoma mieloide (granulocitico)		

Figura 5. Classificazione WHO (www.iss.it)

1.10.5 Incidenza

Le neoplasie ematologiche sono più frequenti nell'età infantile rispetto a quella adulta. Le leucemie acute rappresentano oltre il 25% di tutti i tumori dei bambini. In particolare, la leucemia linfoblastica acuta rappresenta l'80% di tutte le leucemie

diagnosticate nei bambini fino a 14 anni, mentre quella mieloide acuta rappresenta il 13%. Le leucemie croniche sono invece più diffuse in età adulta e rare in età pediatrica. In base ai dati raccolti dall'AIRTUM (Associazione Italiana Registri Tumori), nel nostro Paese, le forme più frequenti di leucemia sono: la linfatica cronica (33,5% del totale delle leucemie), la mieloide acuta (26,4%), la mieloide cronica (14,1%) e la linfatica acuta (9,5%) (www.airc.it).

I tumori costituiscono la seconda causa di morte tra i bambini di età compresa tra 0-15 anni e, il 35% circa è rappresentato dalla leucemia. L'incidenza delle leucemie infantili è molto elevata, circa 47 casi su milione per anno. In Italia, infatti, si ammalano circa 400-500 bambini l'anno.

La causa principale della LMA è sconosciuta e nei bambini si verifica in genere *de novo* mentre negli adulti e negli anziani e, la LMA è spesso preceduta da sindrome mielodisplastica (MDS) (Jasmijn *et al.*, 2015). Il trattamento dei tumori pediatrici, nel corso degli anni, è notevolmente migliorato grazie allo sviluppo di protocolli di cura migliori, nuovi farmaci e maggiori misure di sostegno. Il tasso di sopravvivenza a 5 anni dalla manifestazione del tumore, infatti, è aumentato fino all'85% (Hee Young Ju *et al.*, 2014).

Ogni anno, in Europa sono diagnosticati circa 18.300 casi di leucemia mieloide acuta, che rappresentano circa lo 0,6% di tutti i tumori. Il rischio di avere una diagnosi di LMA nel corso della vita (fra 0 e 74 anni) è di 2,5‰ per i maschi (1 caso ogni 398 uomini) e di 1,7‰ per le femmine (1 caso ogni 578 donne), con un'incidenza in crescita nel sesso maschile. La mortalità, complessivamente, è stimata, in circa 4-6 casi/100.000/anno (Fey & Dreyling, 2009).

1.11 Dal percorso diagnostico al percorso terapeutico: La terapia del non dolore del “Santobono-Pausilipon”

Il dolore, si sa, è il sintomo più angosciante del paziente pediatrico, ma è anche un segnale importante per la diagnosi iniziale e per l'indice di evoluzione della malattia. E, ovviamente, è il fattore più sensibile alle procedure diagnostiche e/o terapeutiche (Ivani, 2000). Nonostante ciò, il dolore del bambino malato, è stato, per molto tempo, considerato in maniera superficiale. Solo negli ultimi anni, dove è stato dimostrato che il paziente pediatrico sperimenta il dolore e lo stress nella stessa maniera di un adulto, e che questo può influenzare la prognosi. Sono stati effettuati, infatti, studi algometrici, e sono attualmente a disposizione scale logaritmiche per valutare lo stato di sofferenza del bambino.

Non è per nulla semplice individuare l'approccio migliore al dolore in un bambino oncologico, anche se le metodiche a disposizione sono molteplici. A oggi, sono state specificate delle linee guida che permettono di seguire al meglio il bambino sofferente, e di riflesso, di migliorarne la qualità della vita. Generalmente, oltre alle terapie eziologiche (chemioterapia, radioterapia, chirurgia), sono attualmente in commercio farmaci indicati nella gestione del dolore del bambino oncologico. Si utilizzano farmaci non narcotici ed euforizzanti che aiutano a rendere meno dolorosa la pratica medica (Suresch, 2005). Presso l'azienda Ospedaliera di rilievo del “Santobono-Pausilipon”, l'equipe medica è molto attenta alla gestione del dolore. Da anni si pratica, in questo ospedale, una terapia farmacologica atta a ridurre il dolore acuto procedurale. Per dolore procedurale si intende il dolore che i neonati e i bambini avvertono a causa di procedure diagnostiche e/o terapeutiche. Spesso i bambini sono

sottoposti a procedure di breve durata, ma molto dolorose, senza un adeguata analgesia. Il trattamento del dolore è importante sia per migliorare la qualità di cura, sia per semplificare il lavoro dell'equipe medica. Per molti bambini con patologie, il semplice prelievo venoso e altre procedure più invasive, come il prelievo midollare, sono pratiche che vengono ripetute con frequenza e che sono temute sia dai piccoli pazienti che dai loro familiari. Al fine di migliorare le pratiche invasive e multiple vengono effettuate, sul paziente, procedure di sedazione. La sedazione procedurale è l'insieme degli interventi farmacologici, fisici e psicologici utilizzati per prevenire, ridurre o eliminare nei bambini le sensazioni dolore derivanti dalle pratiche mediche. Farmaco di elezione di tali protocolli è il Protossido d'azoto; i vantaggi di tale molecola sono molteplici: viene ben accettato dai bambini, dal momento che è una sostanza gassosa, ha una velocità d'azione molto alta (2-3 minuti), poiché diffonde nel corpo molto rapidamente e una precoce dimissibilità, tant'è che il bimbo si sveglia dopo poco. L'inalazione del protossido di azoto viene effettuata pochi minuti prima dell'inizio della procedura e perdura fino alla fine della procedura stessa. Inoltre, tale molecola, stimolando la produzione di oppioidi endogeni, riduce notevolmente lo stato di ansia del bambino, portandolo ad uno stato di euforia, e quindi ricordando la procedura non come momento di sofferenza, ma di eccitazione (Babl *et al.*, 2008).

1.12 L'onestà della cura in oncologia: il fallimento della chemioterapia

L'obiettivo primario, da quanto detto fin'ora, è quello di preservare la qualità della vita del paziente, di lenire i sintomi e di non peggiorare una situazione clinica resa già precaria dalla malattia. Da qui si evince che è eticamente giusto basarsi non sull'antico concetto del paternalismo, ma sul rispetto della persona e sulla conoscenza delle sue necessità. L'onestà deve essere alla base di questo, come di qualsiasi rapporto interconfidenziale. La situazione attuale, però, non sembra essere molto confortante: i medici molto spesso utilizzano dosaggi estremamente alti di chemioterapici, a volte anche ingiustificati. Come riscontro comune di tale pensiero, si hanno i postumi delle chemioterapie, che sono spesso invalidanti. Spesso la tossicità iatrogena del farmaco è più invalidante dello stesso tumore. Sapere che si può praticare una certa terapia non basta più; bisogna anche decidere se sia opportuno, se è lecito farlo, poiché vi è il grande rischio di praticare terapie eccessive, che allungano il processo del morire, arrecando un danno al paziente, invece che essergli di aiuto. Nel documento di Cattorini *et al.*, (1996) si spiega perché una scelta morale dipende da una regola di comportamento, il cui fondamento è un principio morale. Ciò si concretizza nella consapevolezza che la tutela della vita, pur rimanendo un obiettivo fondamentale della medicina, deve essere temperata da limiti etici. In particolare non devono essere praticate terapie sproporzionate per eccesso che prolungano il morire. Gli elementi rilevanti per decidere la limitazione dei trattamenti sono i Principi Etici e i Fattori Clinici correlati al singolo paziente. La definizione di trattamenti inappropriati per eccesso fa riferimento al criterio di proporzionalità, in base al quale un trattamento è definito proporzionato o sproporzionato in base ai seguenti elementi: probabilità di

successo, aumento della durata di vita, aumento della qualità di vita, oneri (fisici, psichici, economici del soggetto). Il trattamento in eccesso è eticamente riprovevole perché provoca danni fisici e psichici al paziente, non ne rispetta la dignità del morire, aumenta la sofferenza dei familiari e genera un'iniqua distribuzione di risorse.

La chemioterapia è una cura tossica e invasiva che riduce le cellule cancerose e danneggia quelle sane, non essendo terapia selettiva. La sua azione si manifesta, infatti su tutti i tipi cellulari a metabolismo veloce, quindi sia sul pool di cellule tumorali che sulle cellule dei tessuti circostanti sani. Le ripetute somministrazioni di chemioterapici, distruggono gradualmente il sistema immunitario, insieme alle cellule tumorali, ma non hanno effetto sulle cellule staminali tumorali, in stato latente, in quanto cellule metabolicamente inattive, e che quindi sfuggono al trattamento.

2 INTRODUZIONE ALLA SEZIONE SPERIMENTALE

2.1 Scopo della ricerca

I tumori sono, dopo gli incidenti, la più frequente causa di morte dei bambini. Nonostante siano meno diffusi che nell'età adulta, circa 1400 nuovi casi di malattia neoplastica all'anno vengono segnalati sul territorio nazionale. Le principali forme tumorali in età pediatrica sono le leucemie (38%), i tumori al sistema nervoso centrale (25%) e i linfomi (14%). La maggior parte delle terapie si basano su protocolli standardizzati di chemioterapia, che, però, non rappresentano un trattamento selettivo per le cellule tumorali. L'utilizzo prolungato della chemioterapia, pur avendo efficacia nel trattamento delle leucemie ed in particolare nelle leucemie mieloidi acute (LMA), tanto è che il 70% dei bambini malati guarisce, presenta effetti collaterali che peggiorano la qualità della vita dei pazienti oncologici pediatrici. Inoltre, tali effetti si esplicano anche a lunga distanza con la insorgenza di neoplasie o tumori solidi secondari in età adulta. Oggi la ricerca verte sull'individuazione di farmaci, sempre più specifici, diretti solamente contro le cellule neoplastiche, in modo da non danneggiare i tessuti sani e migliorare le condizioni di cura dei malati. In particolare nei bambini, oggetto di inquietanti problematiche etiche connesse ai suddetti "side effects", ossia gli effetti indesiderati che possono presentarsi anche, come sopra descritto, a lunga scadenza. È proprio in questo contesto che si inserisce l'obiettivo primario della presente sperimentazione di ricerca, che è stato lo studio di una molecola di recente scoperta, non tossica, che ha mostrato effetti oncotossici su linee cellulari di tumori solidi di adulti (Mancini *et al.*, 2006; 2008), nonché su cellule linfoblastiche

pediatriche (Pica *et al.*, 2015). Tale molecola, una manganese superossido dismutasi ricombinante, viene internalizzata dalle cellule, attraverso i recettori degli estrogeni, con cui interagisce nella sua porzione di peptide leader e veicolata all'interno di esse. Una volta dentro, essa converte i Radicali Liberi dell'Ossigeno (ROS) in H_2O_2 . A questo punto, le cellule tumorali che sono caratterizzate da basse o assenti concentrazioni di catalasi, (enzimi deputati alla conversione del perossido di idrogeno in ossigeno ed acqua) si suicidano attivando un programma di morte cellulare, dal momento che non riescono a contrastare l'alta concentrazione di H_2O_2 . Per contro, le cellule sane, che contengono quantità superiori di catalasi, risultano ossigenate dal trattamento con la MnSOD. Sulla base della funzione svolta dalla MnSOD e la sua facile somministrazione, essa rappresenta una buona candidata per lo sviluppo di una terapia priva di effetti collaterali rispetto alle chemioterapie oggi utilizzate, migliorando notevolmente la qualità di vita dei pazienti oncologici e non compromettendo il loro futuro stato di salute.

Pertanto, come prima fase di sperimentazione, si è proceduto con la dimostrazione della capacità di internalizzazione di tale proteina nelle cellule di leucemia mieloide acuta pediatrica (LMA) utilizzando una linea cellulare stabilizzata di LMA-M2 pediatrica per poi studiare i campioni di cellule midollari dei pazienti pediatrici affetti da LMA, ricoverati presso l'ospedale Pausilipon.

2.2 Lo stress ossidativo: Definizione e generalità

Il termine “stress ossidativo” fu definito da Sies nel 1985 come uno squilibrio tra specie ossidanti e antiossidanti a favore delle prime (Sies H., 1985), a cui consegue un incremento nei livelli cellulari di specie reattive dell’ossigeno (ROS). In realtà questa definizione contiene alcune ambiguità, dovute al fatto di non essere utilizzata con un significato univoco (Pontieri *et al.*, 2005). Con questo termine si indica l’insieme dei danni ai tessuti derivanti da uno squilibrio tra eccessiva generazione di composti ossidanti e insufficienza dei meccanismi di difesa antiossidanti (Ammad *et al.*, 2015), perché le specie reattive dell'ossigeno, possono danneggiare proteine, lipidi, DNA, e carboidrati , cambiando la struttura e le funzioni dell'organismo (Czerska *et al.*, 2015) (Fig.6). Molte proteine coinvolte nelle catene di trasduzione del segnale (fattori di trascrizione, chinasi e fosfatasi, recettori) sono, infatti, sensibili ad alterazioni di questo equilibrio, che, se è spostato a favore dei ROS, induce disfunzioni, danno cellulare, apoptosi o necrosi (Corti *et al.*, 2009). Tutte le forme di vita, all’interno delle proprie cellule, creano un ambiente riducente grazie alla presenza di enzimi; questi garantiscono il mantenimento di uno stato ridotto attraverso un costante apporto di energia metabolica. Potenziali squilibri dello stato redox possono arrecare effetti tossici, infatti il danno tissutale è dovuto a una serie di reazioni biochimiche mediate e non da enzimi, che producono composti intermedi estremamente reattivi: i radicali liberi (Czerska *et al.*, 2015).

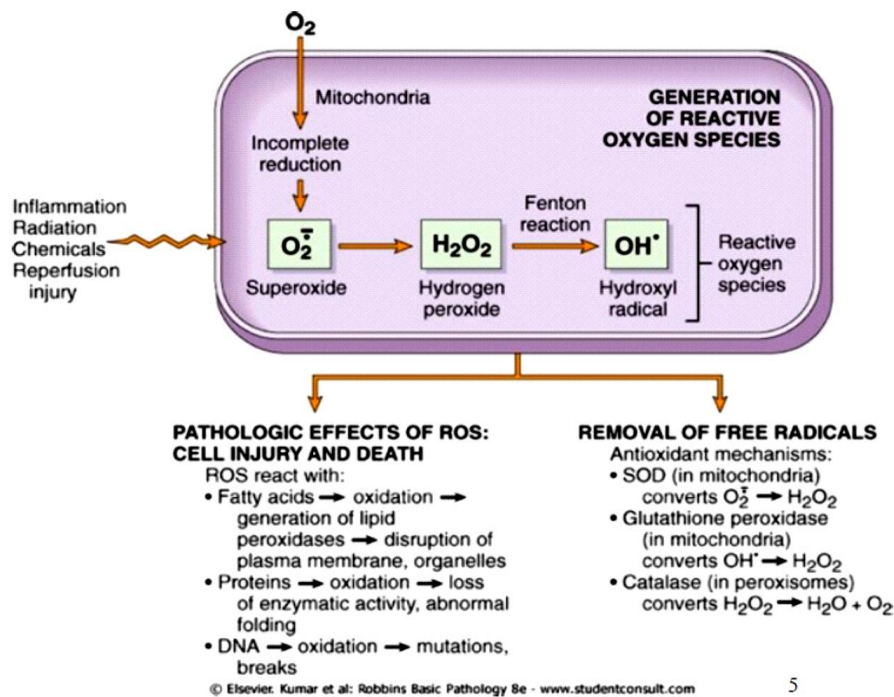


Figura 6. Generazione ed effetti dei ROS (Robbins & Cotran, 2010).

2.3 I radicali liberi

I radicali liberi sono definiti come molecole o frammenti di molecole contenenti uno o più elettroni spaiati nei loro orbitali atomici o molecolari (John *et al.*, 2007). La presenza di elettroni spaiati aumenta il grado di reattività di tali specie che diventano altamente instabili. Esse, infatti, ripristinano il loro equilibrio strappando l'elettrone mancante dalle molecole con le quali entrano in contatto, che, a loro volta, ossidandosi diventano radicali liberi. Questi ultimi possono essere classificati in base all'origine in:

- endogeni, derivanti da processi quali la fosforilazione ossidativa, le reazioni immunitarie cellulo-mediate, le reazioni di detossificazione epatica (ossidazione dei substrati esogeni ed endogeni catalizzati dalla famiglia del citocromo P-450) o le fasi di riperfusione dei tessuti

dell'organismo interessati da fenomeni ischemici (Klaunig & Kamendulis, 2004);

- esogeni, derivanti dall'esposizione a tossici ambientali e radiazioni.

Inoltre i radicali liberi possono essere anche distinti in base alla composizione chimica nelle seguenti categorie:

- ROS, specie reattive dell'ossigeno
- RNS, specie reattive dell'azoto
- RCS, specie reattive del carbonio

I radicali dell'ossigeno sono la classe di radicali più importante prodotta negli organismi viventi (Miller *et al.*, 1990; Valko *et al.*, 2007).

Tra le specie più importanti si annoverano l'anione superossido ($O_2^{\cdot-}$), prodotto in seguito all'aggiunta di un elettrone all'ossigeno, il radicale idrossilico ($\cdot OH$) e il perossido d'idrogeno (H_2O_2) (Fig.7). Quest'ultimo, a differenza dei primi due citati, è una specie reattiva dell'ossigeno non radicalica, poiché non possiede orbitali con elettroni spaiati, tuttavia, esso può rompere i suoi legami in presenza di ioni metallici, producendo un radicale idrossilico altamente reattivo (OH^{\cdot}) considerato il responsabile della maggior parte del danno ossidativo che porta alla necrosi non fisiologica (Valko *et al.*, 2006; Halliwell, 2007) (Fig.7).

TABLE 1 Reactive oxygen and nitrogen species generation and removal in the cell

Cellular oxidants	Source	Oxidative species
Endogenous	Mitochondria	$O_2^{\bullet -}$, H_2O_2 , $\bullet OH$
	Cytochrome P450	$O_2^{\bullet -}$, H_2O_2
	Macrophage/inflammatory cells	$O_2^{\bullet -}$, $\bullet NO$, H_2O_2 , OCl^-
	Peroxisomes	H_2O_2
Exogenous	Redox cycling compounds	$O_2^{\bullet -}$
	Metals (Fenton reaction)	$\bullet OH$
	Radiation	$\bullet OH$
Cellular antioxidants		
Enzymatic		Nonenzymatic
Superoxide dismutase		Vitamin E
Catalase		Glutathione
Glutathione peroxidase		Vitamin C
Glutaredoxin		Catechins
Thioredoxin		
Oxidants > Antioxidants → Oxidative damage (DNA, RNA, lipid, protein)		

Figura 7. I ROS e le difese antiossidanti (Klauning & Kamendulis, 2004).

2.4 La generazione dei ROS

I radicali liberi si formano continuamente all'interno dell'organismo. La loro produzione può essere innescata nelle cellule da numerosi processi come, ad esempio, l'assorbimento di luce ultravioletta o raggi X, l'introduzione nell'organismo di pesticidi, elementi del fumo della sigaretta, idrocarburi aromatici e altre sostanze. I radicali liberi, però, si formano anche come sottoprodotto di normali processi metabolici (Fig.8).

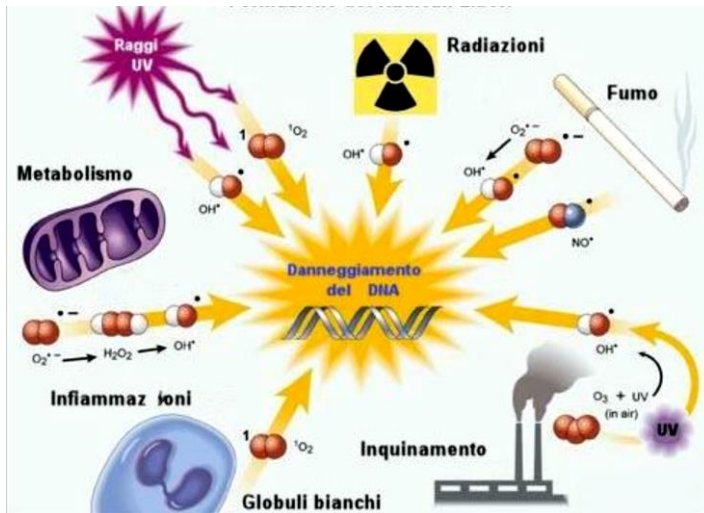


Figura 8. Formazione dei radicali liberi (www.anagen.net).

I mitocondri sono un importante sito di produzione di ROS, secondo un processo fisiologico endogeno e continuo in condizioni aerobiche (Fleury *et al.*, 2001) (Fig.9). Tuttavia, anche il reticolo endoplasmatico e la membrana nucleare contengono catene di trasporto di elettroni (e-) che possono perdere elettroni e generare radicali superossido (Ivanova *et al.*, 2013). L'attività fisiologica della catena respiratoria porta alla produzione di semi chinoni, una potenziale fonte di ROS. In effetti, la catena respiratoria produce ROS al complesso I (NADH / ubiquinone ossidoreduttasi) e al complesso III (ubichinolo / citocromo c ossido-reduttasi). Il sito ubiquinone nel complesso III appare come il principale sito di produzione mitocondriale dei ROS: questo sito catalizza la conversione di ossigeno molecolare in anione radicale superossido (O_2^-) attraverso il trasferimento di un singolo elettrone all'ossigeno molecolare (Fleury *et al.*, 2001). Inoltre, l'inibizione della catena respiratoria, per mancanza di ossigeno o di un inibitore quale cianuro o antimicina A, aumenta il livello di radicali liberi nel normale meccanismo catalitico del complesso III.

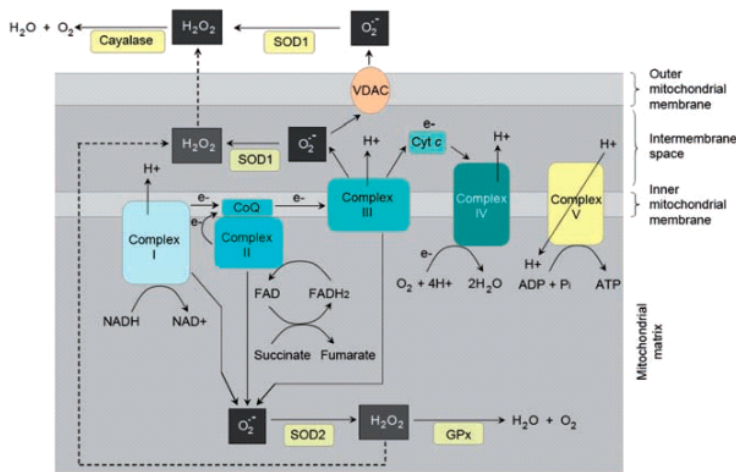


Figura 9. Produzione dei ROS a livello mitocondriale (Ivanova *et al.*, 2013).

Oltre alla catena del trasporto degli elettroni, anche l'acetil-CoA generato dall'enzima piruvato deidrogenasi (PDH) e l'enzima del ciclo di Krebs α -chetoglutarato deidrogenasi (KGDH) possono essere fonte di O₂^{•-}.

2.5 I ruoli dei ROS

Le specie reattive dell'ossigeno, a causa della loro notevole reattività chimica, sono molecole molto instabili e capaci di ossidare i residui amminoacidici delle proteine, i carboidrati, le catene idrocarburiche degli acidi grassi insaturi e le basi azotate degli acidi nucleici. Inoltre, in casi estremi, il danno ossidativo indotto dai ROS può portare all'alterazione delle funzioni e delle strutture di diverse macromolecole, fino ad arrivare alla morte cellulare.

Per quanto riguarda le proteine, le reazioni ossidative indotte dai radicali liberi causano la proteolisi o la loro aggregazione aberrante. Alcuni esperimenti, eseguiti su proteine purificate, hanno dimostrato che le proprietà chimico-fisiche sono alterate in seguito all'azione dei radicali dell'O₂ (Davies *et al.*, 1987).

Le specie reattive dell'ossigeno, oltre ad essere molecole dannose, hanno anche un ruolo in diversi processi fisiologici. Esse sono implicate in differenti processi fisiologici. Esse fungono da mediatori in diversi pathways di segnalazione, attivando proteine come le tirosina-chinasi, il sistema MAP-chinasi o la proteina Ras. Dati indicano che differenti stimoli utilizzano le specie reattive dell'ossigeno come trasduttori del segnale per attivare fattori trascrizionali (AP-1 e NF-kB) e indurre l'espressione genica (Pinkus *et al.*, 1996).

I ROS svolgono numerosi ruoli anche in base al tipo cellulare, agendo come stimolatori della mitosi, inducendo la senescenza cellulare, attivando o inibendo l'apoptosi (Burdon, 1995). In particolare, sono stati condotti numerosi studi sul coinvolgimento delle specie reattive dell'ossigeno nell'apoptosi. Tra questi, lo studio condotto da Carmody e i suoi collaboratori, ha dimostrato come la deplezione di enzimi antiossidanti endogeni o l'aumento di ROS possa innescare l'apoptosi (Carmody *et al.*, 1999).

In realtà, i ROS, così come i RNS, hanno ruoli opposti al variare delle concentrazioni, infatti quando queste specie sono presenti ad alte concentrazioni inducono danno cellulare, mentre è stato visto che, a moderate o basse concentrazioni possono essere vantaggiose, in quanto lavorano in sincronia con i meccanismi di difesa antiossidanti cellulari che rilevano, rispondono, e trasmettono i segnali necessari al mantenimento dell'omeostasi redox (Ammad *et al.*, 2015). Generalmente infatti la cellula mantiene un bilanciamento tra specie ossidanti e specie antiossidanti, quello che viene definito equilibrio ossido-riduttivo o equilibrio redox. Questo perché esistono molte proteine

nella cellula sensibili ad alterazioni di tal equilibrio come recettori chinasi e fosfatasi e fattori di trascrizione.

2.6 Le difese antiossidanti della cellula

La cellula ha evoluto un sistema per modulare gli squilibri redox attraverso varie strategie e, nel caso in cui tali disequilibri non sono raggirabili, generalmente la cellula attiva i meccanismi di morte cellulare, quali apoptosi e necrosi, poiché gli squilibri ossido-riduttivi mettono in moto nella cellula una grande varietà di reazioni che sono alla base di molte patologie umane (Corti *et al.*, 2009).

Per prevenire il danno ossidativo, le cellule di mammifero hanno sviluppato un complesso sistema di difesa antiossidante che comprende gli antiossidanti non enzimatici (come glutatione, tioredoxina), e antiossidanti ad attività enzimatica, tra i quali i più importanti sono la superossido dismutasi (SOD), la glutatione perossidasi, e la catalasi.

Le SOD sono localizzate nel citosol e nei mitocondri e riducono l'anione superossido a perossido d'idrogeno e H₂O.

Reazione SOD: $2 O^{-2} + 2H^{+} \rightarrow H_2O_2 + O_2$

Il perossido d'idrogeno formato (H₂O₂) è successivamente trasformato in O₂ e acqua dalle catalasi (CAT), localizzate nei perossisomi, o in acqua dalle glutatione perossidasi (GSH-Px) (Birben *et al.*, 2012).

Reazione CAT: $2\text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow 2\text{H}_2\text{O} + \text{O}_2$

Reazione GSH-Px: $\text{H}_2\text{O}_2 + 2\text{GSH} \rightarrow 2\text{H}_2\text{O} + \text{GSSG}$

La rimozione del perossido d'idrogeno da parte di GSH-Px consuma GSH (forma ridotta), generando GSSG (forma ossidata); il GSSG può essere in seguito ridotto dalla glutatione reduttasi (GR), ripristinando la riserva di GSH.

2.7 I ROS e la carcinogenesi

Il danno ossidativo causato dai ROS è anche coinvolto nella carcinogenesi, un processo complesso caratterizzato da diversi steps, che conduce le cellule sane a uno stato, dapprima precanceroso e infine neoplastico. In queste cellule troviamo un forte squilibrio tra i fattori che controllano la crescita cellulare e quelli che regolano l'apoptosi, e quindi un costante stress ossidativo, data la loro attività metabolica. La trasformazione neoplastica è caratterizzata da una serie di eventi multipli che possono essere descritti in tre fasi:

- iniziazione
- promozione
- progressione (Valko *et al.*, 2006).

I ROS possono intervenire in tutte e tre le fasi, determinando un aumento del tasso di mutazione e favorendo la trasformazione oncogenica (Klauning & Kamendulis, 2004).

La prima fase, l'iniziazione, è caratterizzata da mutazioni del DNA, non letale per la cellula, ma che produce un'alterazione della stessa. Tale cellula modificata ha bisogno almeno di una duplicazione, per fissare la mutazione nella generazione successiva, diventando una cellula iniziata. Il radicale ossidrilico, per esempio, in questa fase, potrebbe danneggiare il DNA, formando 8-OH-Guanina, presente in molti tumori benigni (Loft & Poulsen, 1996).

La seconda fase, la promozione, prevede l'espansione clonale della cellula iniziata, in seguito a induzione della proliferazione e/o inibizione dell'apoptosi. Molti tumori derivano da bassi livelli di enzimi antiossidanti come SOD, CAT, GSx, che favoriscono l'accumulo di radicali liberi. Il loro effetto nell'induzione della proliferazione, infatti, è basato sull'attivazione di MEK e/o ERK, principali mediatori della proliferazione cellulare con attività chinasi ROS-dipendente (Behrend *et al.*, 2003).

La terza e ultima fase, la progressione, è una fase irreversibile, caratterizzata da una forte instabilità genetica e dalla distruzione dell'integrità cromosomica della cellula (Valko *et al.*, 2006) (Fig.10).

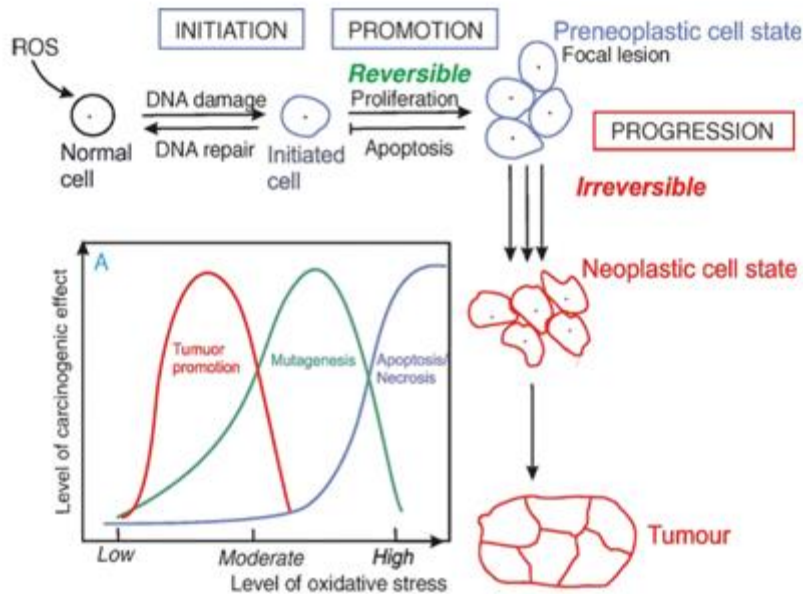


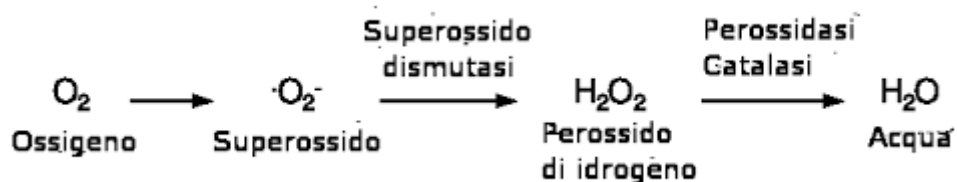
Figura 10. L'azione dei ROS nella trasformazione neoplastica (Valko *et al.*, 2006).

Il peso della relazione tra stress ossidativo ed evoluzione maligna non è attualmente chiaro; tuttavia, ci sono evidenze che le neoplasie causate dai danni dovuti all'accumulo di ROS possono promuovere la proliferazione cellulare, la formazione di metastasi, e anche la farmaco-resistenza, a seconda della provenienza del cancro (Reuter *et al.*, 2010).

2.8 Le proteine superossido dismutasi

Le superossido dismutasi (SOD) sono enzimi ubiquitari di notevole interesse farmacologico per la loro azione antiossidante, che le rende utili nella prevenzione di tutte le patologie causate dallo stress ossidativo (Borrelli *et al.*, 2009). Questi enzimi sono stati scoperti da Pauling nel 1930 (Borrelli *et al.*, 2014), isolati per la prima volta nel 1939 ma solo nel 1969 McCord e Fridovich hanno dimostrato la loro attività antiossidante (McCord & Fridovich, 1969).

Le superossido dismutasi sono delle metallo-proteine che appartengono alla classe delle ossido reduttasi, utilizzate da quasi tutti gli organismi come principale meccanismo di difesa contro le specie reattive dell'ossigeno; infatti catalizzano la dismutazione del radicale libero anione superossido (O_2^-) in perossido d'idrogeno (H_2O_2), impedendo così l'accumulo di questi ROS nelle cellule. H_2O_2 può essere ulteriormente convertito in acqua (H_2O) e ossigeno molecolare (O_2) grazie alle catalasi e alla glutazione perossidasi (Borrelli *et al.*, 2016).



Sono enzimi altamente efficienti, e la loro inattivazione genica porta alla manifestazione di fenotipi deleteri in organismi dai batteri ai topi, causandone la morte precoce dopo la nascita (Epperly *et al.*, 2003).

Nei tessuti umani sono presenti tre isoforme di superossido dismutasi, distinte in base agli ioni metallici presenti nel sito attivo che fungono da cofattori ossidabili (rame, ferro o manganese), alla struttura molecolare e alla distribuzione all'interno dell'organismo (Oberley, 2005):

- La SOD 1 (Cu/Zn-SOD) , localizzata nel citosol, è un omodimero formato da 2 subunità identiche, con un peso molecolare di circa 32 kDa, che contiene nel suo sito attivo ioni zinco e ioni rame (Mates *et al.*, 1999), (Oberley, 2005). E

'stato inoltre riportato che SOD1 è anche localizzata nei nuclei, nei lisosomi e nei perossisomi (Fukai & Ushio-Fukai, 2011).

- La SOD 2 (MnSOD), localizzata nei mitocondri, è un omotetramero formato da quattro subunità omologhe, contenente un atomo di manganese ciascuna nel sito attivo.
- La SOD 3 (ecSOD), localizzata nello spazio extracellulare, è una glicoproteina secretoria omotetramerica che contiene zinco e rame. Possiede alta affinità per determinati glicosaminoglicani come eparina e sulfato eparina (Mates *et al.*, 1999) (Fig.11).

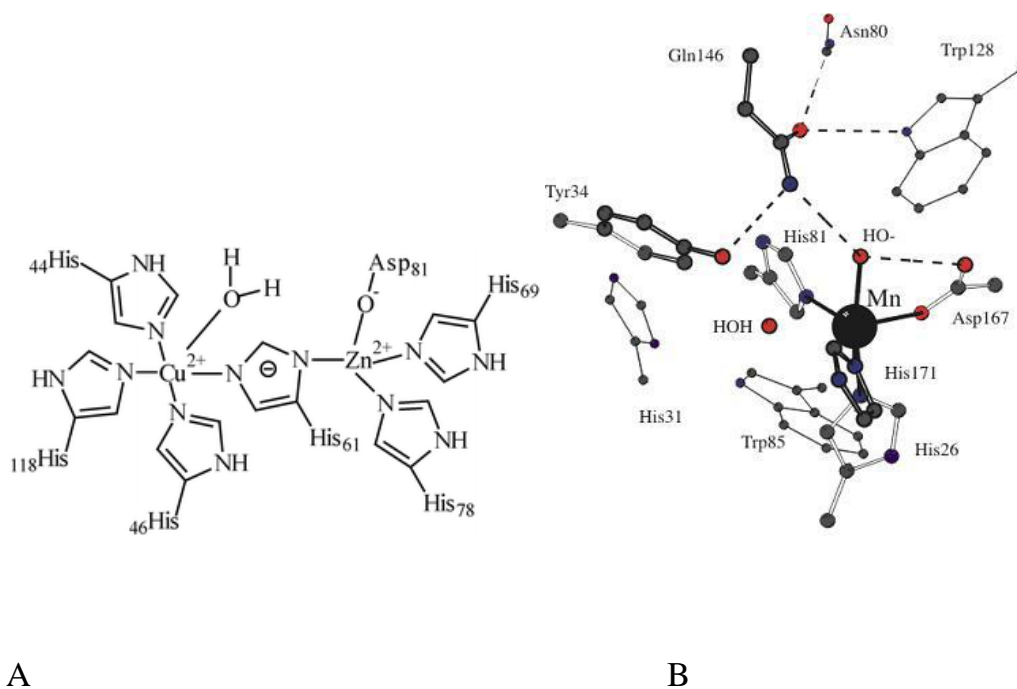


Figura 11. A: I residui conservati e le interazioni con gli atomi metallici della Cu/ZnSOD; B: I residui conservati e le interazioni con gli atomi metallici della MnSOD (www.chem.uky.edu; pubs.rsc.org).

Quindi queste tre isoforme differiscono per la natura degli ioni metallici a esse associati, per la costituzione amminoacidica, come anche per il loro numero di subunità, cofattori e altre caratteristiche (Landis & Tower, 2005) (Fig.12).

Isoform	Characteristics	Metal cofactor	Metal delivery-related protein	Location
SOD1 (Cu/ZnSOD)	32 kDa, homodimer	Cu ²⁺ (catalytic)	CCS, GSH	Cytoplasm, mitochondrial IMS, and others (nucleus, lysosomes, peroxisomes)
		Zn ²⁺ (stability)	Unknown	
SOD2 (MnSOD)	96 kDa, homotetramer	Mn ³⁺ (catalytic)	Unknown ^a	Mitochondria matrix
SOD3 (ecSOD)	135 kDa, homotetrameric secretory	Cu ²⁺ (catalytic)	Atox1, ATP7A (MNK,	Extracellular matrix, cell surface, extracellular fluids

Figura 12. Le varie isoforme della superossido dismutasi (Fukai & Ushio-Fukai, 2011).

La SOD 1, la SOD 2 e la SOD 3 sono codificate da geni diversi, i quali si trovano rispettivamente sui cromosomi 21, 6 e 4 e si ritiene inoltre che, la SOD 1 e la SOD 3 derivino da un unico gene ancestrale, giacché presentano evidenti omologie nella sequenza amminoacidica. Invece, la SOD 2 non presenta significative similarità con le altre due (Zelko *et al.*, 2002) (Fig.13).

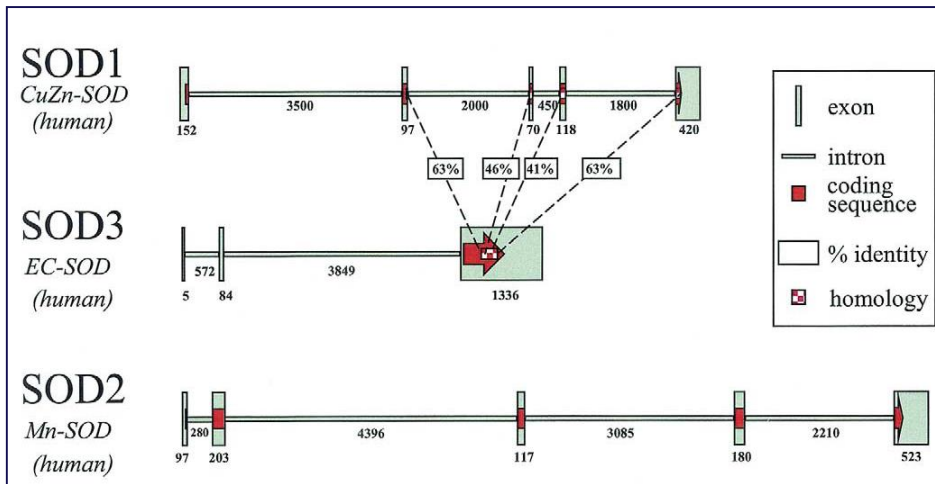


Figura 13. Organizzazione genomica delle tre isoforme di superossido dismutasi nell'uomo (Zelko *et al.*, 2002)

La SOD 2, nota come manganese superossido dismutasi (MnSOD), riveste un ruolo molto importante negli organismi aerobi, infatti, è l'enzima principale in grado di rimuovere il radicale superossido ($O_2^{\cdot-}$) nei mitocondri, rappresentando una delle principali linee difensive contro questo radicale (Wang *et al.*, 2001).

La MnSOD è costituita da quattro subunità omologhe con un peso molecolare di 24 kDa. Ogni sub unità contiene nel centro di reazione un atomo di manganese (Mn^{2+} se ridotto, Mn^{3+} quando è ossidato), circondato da tre istidine, un residuo di acido aspartico e una molecola di solvente, che insieme formano il sito attivo di questo enzima. La MnSOD passa dalla forma Mn^{3+} a quella Mn^{2+} e poi di nuovo alla forma Mn^{3+} durante i due passaggi di dismutazione del superossido (Chockalingam *et al.*, 2006) (Fig.14).

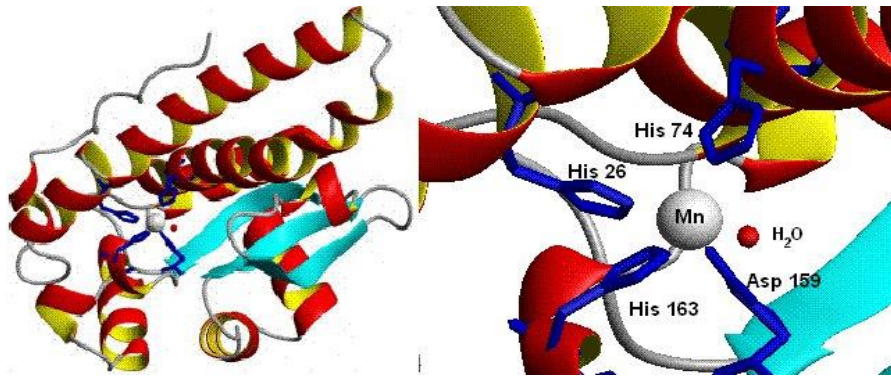


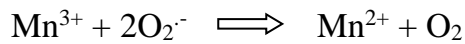
Figura 14. Sito attivo della MnSOD (it.wikipedia.org/wiki/Superossido_dosmutasi).

Il gene che codifica per la MnSOD umana si trova sul cromosoma 6q25 e comprende 5 esoni e 4 introni, più la regione del promotore che, peculiarmente, non ha né la sequenza TATA, né CAAT, ma solamente una regione ricca in GC (78%), presente immediatamente a monte della regione d'inizio della trascrizione. Essa rappresenta un enhancer intronico responsabile dell'induzione del gene. Il promotore, inoltre, contiene siti di legame altamente specifici per i fattori di trascrizione SP1 e AP2: il primo promuove la trascrizione del gene, il secondo la inibisce (St. Clair, 2004).

La MnSOD è sintetizzata a livello citoplasmatico e poi veicolata nella matrice mitocondriale grazie alla sua sequenza leader di 2 kDa, composta da 24 aminoacidi e collocata nella regione N-terminale. Questo peptide leader viene successivamente scisso, tagliato, portando così alla formazione della proteina matura ed enzimaticamente attiva che può svolgere il suo ruolo all'interno della cellula (Borrelli *et al.*, 2016). Mentre, è stato dimostrato che la MnSOD matura protegge le cellule da vari tipi d'insulti e sopprime l'apoptosi (Scott, 1989), la stessa proteina non idrolizzata può anche essere deleteria e impedire la proliferazione cellulare in determinate condizioni (Wheeler, 2003). Per questo, le SOD sembrano controllare più

reazioni essenziali per la determinazione del destino cellulare, in particolare per le cellule cancerose (; Sun, 2001).

La dismutazione dello ione superossido, a carico della MnSOD, procede attraverso due semireazioni:



La prima è una reazione ossidativa in cui lo ione superossido è convertito in ossigeno molecolare a spese del manganese che si riduce; la seconda è una reazione riduttiva in cui il radicale superossido è trasformato in perossido d'idrogeno ripristinando il sito attivo dell'enzima con il manganese nello stato ossidato.

E' stato osservato che la Mn-SOD, quando sovraespressa, inibisce molte delle proprietà tipiche delle cellule neoplastiche (aumento del tasso di crescita, invasività, ecc.) (Borrelli *et al.*, 2014), che, diventando più vulnerabili agli agenti che generano ROS, muoiono sia *in vitro* che *in vivo* (Li *et al.*, 1998). La MnSOD, svolge quindi il ruolo di proteina antitumorale, inibendo la proliferazione delle cellule e intensificando l'apoptosi (Oberley, 2005). Essa influenza l'attività di alcuni fattori di trascrizione, come la proteina attivatrice-1 (AP1), il fattore NF-kB e p53, e protegge i tessuti normali dall'instabilità cromosomiale.

Diversi studi mostrano, inoltre, che il ripristino dell'attività della MnSOD in cellule o tessuti trasformati comporta un rallentamento della crescita tumorale e l'alterazione del fenotipo maligno delle cellule tumorali (Wang *et al.*, 2001;). Come detto in precedenza, l'eccesso di produzione di specie reattive dell'ossigeno causa danno cellulare, invecchiamento e un gran numero di malattie, processi che possono essere

contrastati dalla MnSOD, in quanto questo enzima modula la concentrazione dei ROS nelle cellule tumorali. Tuttavia, nessuna delle SOD disponibili in commercio è somministrabile e in grado di entrare nelle cellule. Inoltre, queste SOD sono inattivate o escrete per via renale (Domann, 2013).

Oltre a queste tre SOD, esiste anche un'altra classe di superossido dismutasi contenenti nichel (Ni-SOD), individuata negli Streptomiceti e Cianobatteri. L'enzima Ni-SOD è una proteina formata da circa 117 aa che non presenta alcuna omologia di sequenza con le altre superossido dismutasi (Jiang, 2002).

2.9 La manganese superossido dismutasi ricombinante: rMnSOD

Recentemente, una nuova isoforma della MnSOD umana è stata isolata da una coltura cellulare di liposarcoma umano (LSA) e ottenuta in forma sintetica ricombinante, detta LSA-rMnSOD (Mancini *et al.*, 2006). Questa manganese superossido dismutasi ricombinante, presenta delle differenze rispetto alla sua forma nativa: la prima importante differenza è che la forma LSA-rMnSOD enzimaticamente attiva mantiene il peptide leader di 24 amminoacidi, il quale non viene clivato durante la maturazione, questo influenza anche il peso molecolare che è di 30 kDa, superiore a quello della MnSOD (di 24 kDa) (Pica *et al.*, 2015); la forma ricombinante presenta poi una variazione amminoacidica in posizione 82, dove è presente una isoleucina al posto di una treonina e una trasversione silente al nucleotide 222. Inoltre questa isoforma differisce dalle altre per la sua capacità di penetrare nelle cellule, per la sua intensa attività antiossidante e antitumorale e per la sua facile somministrabilità per iniezione (Mancini *et al.*, 1999; Mancini *et al.*, 2006).

L'identificazione e la purificazione di questa proteina, è stata effettuata tramite l'utilizzo di tecniche cromatografiche e SDS-page. A partire da un clone specifico di cDNA, proveniente sempre da cellule di liposarcoma umano, questa proteina è stata, poi sequenziata e riprodotta in forma ricombinante (Mancini *et al.*, 2006).

La LSA-rMnSOD così creata è stata testata su una vasta gamma di linee cellulari umane: cellule epiteliali mammarie normali (MCF-10) e tumorali (MCF-7), cellule trasformate ovariche (OVCAR-3), cellule trasformate pancreatiche (MIA PaCa-2), cellule di melanoma (A-375) e mesotelioma (NCI-28), e su fibroblasti normali (MRC-5).

L'attività oncotossica della LSA-rMnSOD è stata valutata mediante due indagini: l'incorporazione di timidina triziata (^3H -timidina) che ha consentito di valutare l'effetto sulla proliferazione cellulare, e la misurazione dei livelli di lattato deidrogenasi (LDH) rilasciata nel terreno di coltura in seguito alla lisi delle cellule incubate con LSA-rMnSOD. I risultati hanno dimostrato che la proteina ricombinante induce l'apoptosi delle cellule trattate e inibisce la crescita delle cellule tumorali, lasciando intatte quelle normali. L'azione della LSA-rMnSOD è dovuta a un aumento del livello di ossidanti nelle cellule tumorali che contengono bassi livelli di catalasi (Pica *et al.*, 2010), (inferiore dal 10% al 50% rispetto alle cellule normali) (Borrelli *et al.*, 2014).

La rMnSOD, quando viene internalizzata dalle cellule, è in grado di trasformare il radicale superossido, prodotto dalle cellule stesse, in perossido di idrogeno. Quest'ultimo, a causa delle bassi o assenti quantità di catalasi nelle cellule tumorali, non viene ridotto a ossigeno e acqua, non viene smaltito e ciò porta all'attivazione dei

meccanismi di morte cellulare (Mancini *et al.*, 2006). La rMnSOD mostra anche una buona biodistribuzione in vivo, in particolare nel fegato (Guillaume, 2013), suggerendo che è adatta per contrastare lo stress ossidativo epatico, ed è inoltre radioprotettiva per le cellule sane e radiosensibile per le cellule tumorali (Borrelli *et al.*, 2009). Nelle cellule tumorali trattate con rMnSOD, è stata dimostrata una up-regulation del gene proapoptotico Bax e una down-regulation del gene antiapoptotico Bcl-2, suggerendo che la proteina ricombinante può essere coinvolta nell'attivazione dell'apoptosi (Mancini *et al.*, 2008). Inoltre, visto che il mancato taglio del peptide leader della proteina LSA-rMnSOD porta alla formazione di una forma anomala, è stata investigata la funzione di tale sequenza tramite studi paralleli sia in vivo che in vitro.

Le analisi in vitro sono state condotte mediante studi di microscopia confocale su colture cellulari MCF-7 (cellule tumorali mammarie), marcando il peptide leader della LSA-rMnSOD con fluoresceina isotiocianato (FITC). Si è partiti dall'ipotesi che il peptide leader rappresentasse il vettore molecolare capace di penetrare all'interno delle cellule attraverso il recettore degli estrogeni, grazie alla sua somiglianza con il carrier degli estrogeni stesso. Nelle cellule incubate con la sola proteina LSA-rMnSOD è stata rilevata un'intensa fluorescenza, invece nelle cellule pretrattate con estradiolo e poi incubate con la proteina, la fluorescenza si poteva osservare esclusivamente a livello periferico, indicando che la captazione della proteina è inibita in presenza di estrogeni e compete con quest'ultimi. Ciò ha confermato l'ipotesi che il sito d'ingresso nelle cellule tumorali sia rappresentato proprio dai recettori per gli estrogeni e che di

conseguenza la proteina risulti efficace solo nelle forme tumorali estrogeno positive (Mancini *et al.*, 2008).

Gli studi in vivo sono stati condotti legando ^{68}Ga al peptide leader e inoculandolo per via ematica in un cane con tumore mammario spontaneo. Dopo circa 30 minuti, mediante tomografia a emissione di positroni (PET), è stato osservato che il peptide leader può essere captato selettivamente dalle cellule tumorali mammarie, mettendo in luce la notevole specificità di tale molecola nel concentrarsi esclusivamente nel tessuto neoplastico lasciando inalterati gli altri tessuti (Mancini *et al.*, 2008).

2.10 Apoptosi: la morte cellulare programmata

Il termine apoptosi o morte cellulare programmata deriva dal greco “apoptosis” che significa cadere, come “le foglie da un albero”. L’apoptosi svolge un ruolo importantissimo nello sviluppo animale e vegetale (Alberts *et al.*, 2009), e si verifica normalmente durante lo sviluppo e per tutta l’età adulta, con lo scopo di garantire l’eliminazione delle cellule potenzialmente dannose, vecchie o indesiderate (Robbins & Cotran, 2010). La quantità di apoptosi che si verifica nei tessuti animali è elevatissima e potrebbe sembrare uno spreco di energia eliminare così tante cellule, considerando anche che la maggior parte sono sane nel momento in cui è attivata la morte programmata, ma lo scopo di tale processo è l’eliminazione di strutture non più utili, la degradazione di strutture danneggiate o dannose, oppure la regolazione del numero di cellule andando a bilanciare il processo di replicazione (impedendo un eccessivo accrescimento o restringimento dei tessuti) (Alberts *et al.*, 2009).

Quindi l'apoptosi è un processo elementare della vita che, insieme alla proliferazione e al differenziamento, favorisce l'omeostasi dei tessuti e degli organi (Leist & Jaattela, 2001). Alterazioni a carico del processo apoptotico portano allo spostamento dell'equilibrio cellulare verso un'instabilità, la quale può essere dannosa per l'organismo, a volte manifestandosi come forme tumorali o malattie degenerative (Bohm & Schild, 2003).

L'apoptosi è un meccanismo cellulare geneticamente controllato, infatti le cellule destinate a morire attivano enzimi in grado di degradare il DNA nucleare, le proteine nucleari e citoplasmatiche della cellula stessa. In generale, la morte cellulare programmata, è mediata da agenti fisiologici, come alcuni ormoni steroidei e citochine. Raramente può essere causata anche da agenti patogeni esterni, e in particolari condizioni, anche radiazioni e agenti chimici possono costituire fattori di innesco, in quanto questi ultimi sono genotossici, danneggiano il DNA, e una volta superate le capacità di riparazione delle cellule, attivano il meccanismo apoptotico (Ahemed *et al.*, 2000).

2.11 Aspetti morfologici dell'apoptosi

L'apoptosi è un processo che avviene rapidamente (2-4 ore) e che colpisce singole cellule e non zone più o meno estese di tessuto, quindi non danneggia le cellule vicine; non causa infiammazione e presenta aspetti morfologici e biochimici diversi dalla morte accidentale che ha come conseguenza la necrosi (Pontieri *et al.*, 2008).

Talvolta l'apoptosi può progredire o coesistere con la necrosi, la quale è un processo passivo caratterizzato da rigonfiamento cellulare, lisi degli organelli intracellulari e del

nucleo, digestione enzimatica delle cellule e rottura rapida della membrana plasmatica, con conseguente riversamento all'esterno del citoplasma che danneggia le pareti delle cellule circostanti (Robbins & Cotran, 2010), determinando una reazione immunitaria dell'organismo e una possibile risposta infiammatoria (Troyano *et al.*, 2001).

Le cellule apoptotiche presentano i seguenti aspetti morfologici:

- acquisizione di una forma tondeggiante
- riduzione delle dimensioni e relativa perdita delle giunzioni cellulari; perdita di zone specializzate della membrana plasmatica, come i microvilli;
- collasso del citoscheletro;
- frammentazione nucleare e degradazione della cromatina (il nucleo al microscopio risulta eterocromatico);
- dilatazione del reticolo endoplasmatico, a differenza degli organuli cellulari che rimangono intatti;
- formazione di invaginazioni e protrusioni del plasmalemma con conseguente frammentazione cellulare con formazione dei corpi apoptotici;
- fagocitosi dei corpi apoptotici, che espongono in superficie marcatori glucidici, da parte delle cellule vicine e dei macrofagi. Questi corpi apoptotici vengono degradati completamente nei loro fagosomi. In questo modo, le cellule apoptotiche vengono eliminate rapidamente, senza provocare una risposta infiammatoria dannosa (Van Cruchten & Van Den Broeck, 2002) (Fig.15).

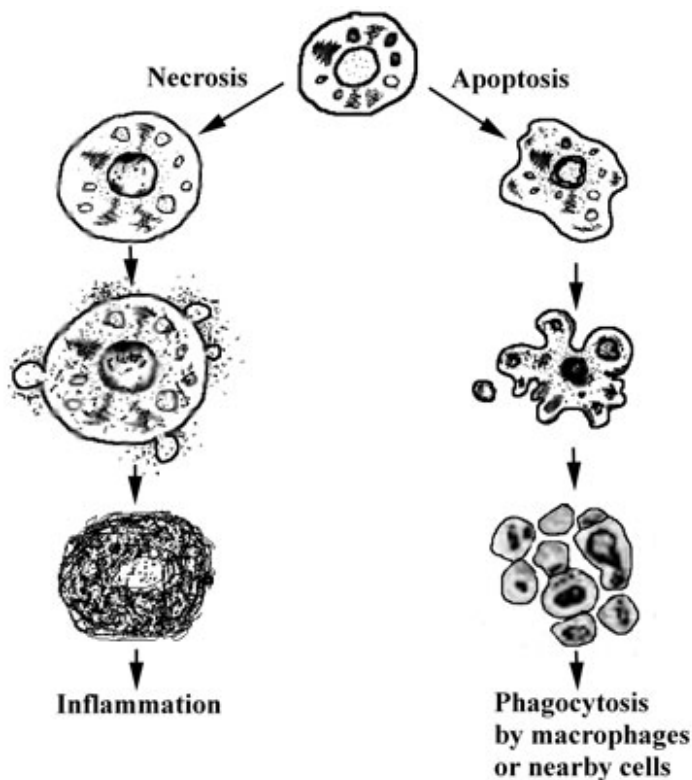


Figura 15. Differenze morfologiche tra apoptosi e necrosi (Vaskivuo, 2002).

Le cellule in apoptosi, non solo acquisiscono un aspetto caratterizzato dalla frammentazione, ma mostrano anche tipici cambiamenti biochimici: un'endonucleasi taglia il DNA in frammenti.

Inoltre, il doppio strato fosfolipidico viene a essere danneggiato, ed esiste un marker per questo tipo di danno rappresentato dalla fosfatidilserina. Questo fosfolipide, normalmente collocato nel foglietto interno, passa nel foglietto esterno della membrana plasmatica. Utilizzando una forma marcata della proteina Annessina V, che si lega specificamente a questo fosfolipide, è possibile visualizzare la fosfatidilserina sulla superficie delle cellule apoptotiche; L'apoptosi innesca anche un cambiamento nel potenziale elettrico della membrana interna dei mitocondri, che viene perso completamente. Questo potenziale di membrana può essere misurato utilizzando

coloranti fluorescenti carichi positivamente che, guidati dalla carica negativa, si accumulano nei mitocondri. Una diminuzione della marcatura dei mitocondri con queste colorazioni aiuta a identificare le cellule che stanno entrando in apoptosi (Alberts *et al.*, 2009).

2.12 Le vie di attivazione dell'apoptosi

L'attivazione del processo apoptotico dipende dalle caspasi, proteine appartenenti alla famiglia delle proteasi, che possiedono una cisteina nel loro sito attivo ed effettuano dei tagli a livello di specifici residui di acido aspartico presenti nelle proteine bersaglio. Generalmente vi è una gerarchia di attivazione per cui alcune caspasi, definite iniziatrici, tagliano e attivano caspasi effettrici, che a loro volta attivano specifiche proteine bersaglio nella cellula.

L'attivazione delle caspasi può avvenire attraverso due vie separate ma comunicanti: la via intrinseca, dipendente dai mitocondri, e la via estrinseca, attivata dai recettori di morte sulla superficie cellulare (Peter, 2011).

- La via intrinseca rappresenta la principale via di innesco dell'apoptosi in tutte le cellule dei mammiferi, e prevede il rilascio di fattori apoptotici, tra cui il più importante è il citocromo c, che normalmente è presente nei mitocondri; il suo riversamento nel citosol, determina l'attivazione di una procaspasi detta Apaf 1 (fattore 1 che attiva la proteasi apoptotica), e la formazione del complesso citocromo c-Apaf-1. Questo complesso oligomerizza in un eptamero detto apoptosoma, il quale recluta e attiva le procaspasi 9, che a loro volta attivano le caspasi 3, ed entrambe tagliano I-CAD, determinando il rilascio di CAD

(deossiribonucleasi caspasi dipendente) che entra nel nucleo e taglia il DNA (Murphy *et al.*, 2010) (Fig.16).

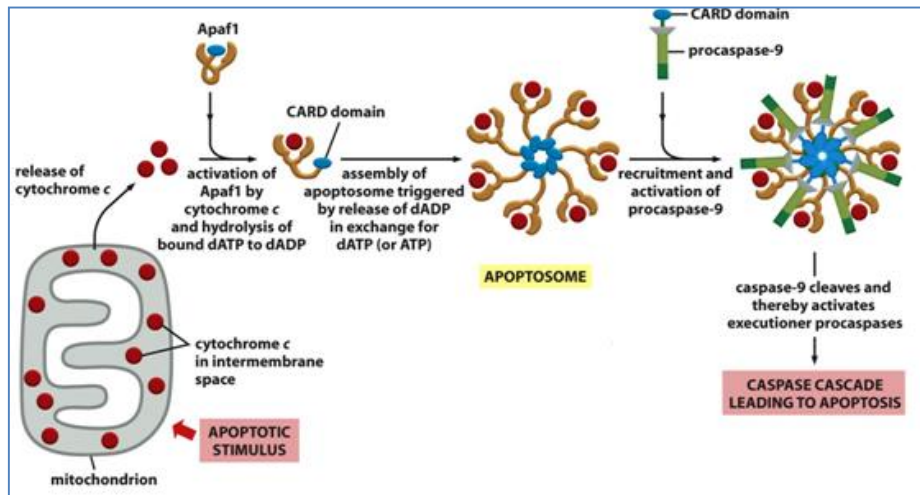


Figura 16. La via intrinseca dell'apoptosi (Alberts *et al.*, 2009).

- La via estrinseca, dipende da fattori esterni, che agiscono attraverso recettori posti sulla membrana plasmatica (recettori di morte cellulare) (Pontieri *et al.*, 2008). I recettori di morte, Fas, sono posti sulla superficie della cellula e sono attivati da particolari ligandi, detti ligandi di morte, FasL, che possono essere sia solubili sia legati alla membrana. I recettori di morte presentano un dominio di morte (DD), che in seguito al legame del ligando con il recettore, recluta la proteina FADD, la quale oltre al dominio di morte (DD), presenta anche un dominio effettore di morte (DED), che recluta e attiva la caspasi 8, che agisce attivando altre caspasi (Murphy *et al.*, 2010).

2.13 La regolazione dell'apoptosi: il ruolo del mitocondrio nel processo apoptotico

Il mitocondrio è interessato dai fenomeni dell'apoptosi, anche se il segnale parte dai recettori di membrana, in quanto la caspasi iniziatrice attiva un modulatore pro-apoptotico, *bid*, che si localizza sul mitocondrio. Sembra, tuttavia, che il coinvolgimento del mitocondrio non sia indispensabile nella via di attivazione recettoriale. Il citocromo C, indispensabile per la formazione dell'apoptosoma, si trova nello spazio intermembrana, debolmente associato alla superficie della membrana esterna, e fuoriesce, insieme alle altre molecole sopra elencate, da canali alla cui formazione partecipano i modulatori pro-apoptici.

Sulle membrane mitocondriale vi sono molecole anti-apoptotiche come Bcl-XL, Bcl-W, Bcl-2 che proteggono l'integrità della membrana mitocondriale e molecole pro-apoptotiche come Bax, Bak o Bid appartenenti sempre alla famiglia BCL-2, che inducono l'apertura dei megacanalii. I fenomeni di rigonfiamento dei mitocondri, a volte osservabili, potrebbero essere dovuti alla formazione di pori che coinvolgono entrambe le membrane mitocondriali, in punti di vicinanza tra membrana esterna ed interna. Un'altra proteina specifica della membrana mitocondriale è APO 2.7, di recente scoperta; la sua espressione è indice di apertura dei canali mitocondriali, quindi fornisce ulteriori informazioni circa lo stato di avanzamento dell'apoptosi, nel caso in cui la via recettoriale coinvolga anche quella mitocondriale. Nel caso, invece, sia attivata esclusivamente la via mitocondriale, l'espressione di Apo indica che è avvenuta la fuoriuscita del citocromo c e che è in corso l'induzione della caspasi 9.

Quest'ultima, a sua volta, attiva la caspasi 3 effettrice ed inizia il processo di proteolisi.

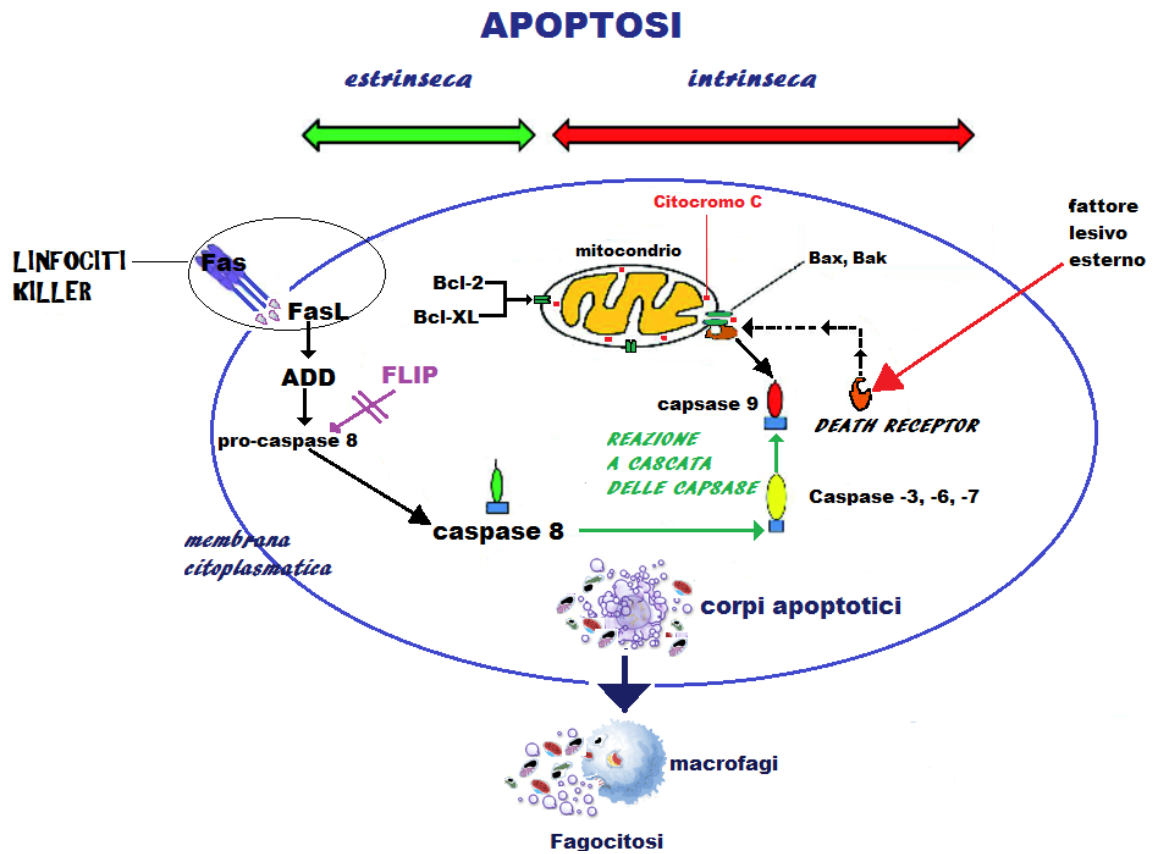


Figura 17. Regolazione dell'apoptosi

CAPITOLO 3

Materiali e Metodi

3.6 Allestimento delle colture cellulari

3.6.1 Campioni

Per tale studio è stata utilizzata una linea cellulare di leucemia mieloide pediatrica M2 secondo classificazione FAB, Kasumi-1, acquistata presso l'American Type Culture Collection (ATCC).

3.6.2 Scongellamento della linea cellulare

I campioni sono stati scongelati ponendo la cryovial a 37°C, il suo contenuto è stato poi trasferito in una Falcon da 15mL addizionato con 10mL di terreno di coltura RPMI 1640 (Life Technologies, Italia). Successivamente la Falcon è stata centrifugata a 1500 rpm per 5 minuti a 4°C. Dopo la centrifugazione, è stato eliminato il surnatante e il pellet è stato risospeso in terreno di coltura completo, ottenuto addizionando RPMI 1640 ATCC modified (Life Technologies, Italia) a siero Bovino Fetale al 20% (Pan Biotec, Italia) e Pen Strep 1% (Life Technologies, Italia). Le cellule sono state coltivate in fiasche per coltura da 75cm², alla concentrazione di 1x10⁶ cellule/mL. In ciascuna fiasca è stato aggiunto terreno RPMI completo. Le cellule stabilizzate, ogni giorno, sono state osservate al microscopio ottico invertito per poterne esaminare la morfologia. Inoltre, quotidianamente, durante la crescita cellulare è stata effettuata la conta cellulare in Camera di Bürker e il test di vitalità al Trypan Blue (cfr. 3.1). La conta in Camera di Bürker è stata eseguita utilizzando 10µL di campione cellulare. La conta cellulare è stata effettuata contando quattro quadrati grandi, è stata poi calcolata

la media ed il valore ottenuto è stato moltiplicato per il volume del quadrato della camera e per il fattore di diluizione, in modo da ottenere il numero totale di cellule per μL di campione.

3.2 Real Time-PCR

La presenza o meno dei recettori degli estrogeni ESR1 e ESR2, su cellule di leucemie mieloide acuta (Kasumi-1), è stata investigata tramite Real Time-PCR (qPCR), andando a valutare l'espressione dei geni ESR1 e ESR2, codificanti i recettori 1 e 2 degli estrogeni.

3.2.1 Estrazione dell'RNA dai campioni

Per estrarre l'RNA totale dalle cellule trattate è stato utilizzato l'RNeasy Plus Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germania). Prima di iniziare il protocollo, è stata preparata la soluzione Buffer RLT Plus, aggiungendo 10 μL di β -mercaptoetanololo (β -ME) in 1 mL di Buffer RLT Plus (operazione effettuata sotto cappa aspirante). Inoltre, poichè il Buffer RPE è presente come concentrato, prima di usarlo per la prima volta, a esso sono stati aggiunti 4 volumi di etanolo 96-100%, per ottenere la soluzione da utilizzare negli steps successivi. Tutti i passaggi di seguito riportati, sono stati svolti velocemente, e a temperatura ambiente (20-25°C). Le cellule dei diversi campioni sono state prima centrifugate: è stato aspirato il mezzo di coltura, sono stati effettuati dei lavaggi con il PBS ed, infine, le cellule sono state contate, in modo tale che, la quantità di cellule necessaria (2.000.000 di cellule), è stata trasferita in un tubo sterile (privo di RNasi), e centrifugata a 300 x g, per 5 minuti. Il surnatante è stato poi completamente aspirato, in quanto un'incompleta rimozione del mezzo di coltura può

inibire la lisi e diluire il lisato cellulare, influenzando la purificazione dell'RNA. A questo punto, per lisare le cellule, al pellet sono stati aggiunti 350 μ l di Buffer RLT Plus, ed il tutto è stato vortexato per risospendere il pellet (infatti, un'incompleta risospensione del pellet può interferire con la lisi cellulare). Per omogeneizzare il lisato cellulare, quest'ultimo è stato fatto passare, almeno 5 volte, attraverso l'ago di una siringa da 20-gauge (0,9 mm di diametro) sterile. All'eluato è stato aggiunto 1 volume di etanolo al 70%, ed il tutto è stato mescolato spipettando, senza centrifugare. Sono poi stati trasferiti 700 μ L di campione, in una RNeasy spin column, situata all'interno di un collection tube di 2 mL e presentante un coperchio, che è stato chiuso prima di eseguire una centrifuga per 15 secondi, a 8000 x g. Alla RNeasy spin column sono stati aggiunti 700 μ L di Buffer RW1, ed è stata effettuata una centrifuga per 15 secondi, a 8000 x g, per lavare la membrana della colonna. La colonna è stata poi staccata, l'eluato è stato scartato, e la colonna è stata reintrodotta nello stesso collection tube. Alla RNeasy spin column sono stati aggiunti 500 μ l di Buffer RPE, per 2 volte, ed è stata effettuata una centrifuga prima per 15 secondi e poi per 2 minuti, a 8000 x g, per lavare la membrana della colonna. Questa lunga ultima centrifugazione, permette di asciugare la membrana della colonna di rotazione, assicurando che nessuna traccia di etanolo venga riportata durante l'eluizione dell'RNA. E' stata poi posta la RNeasy spin column in un nuovo collection tube di 2 mL, ed è stata eseguita una centrifuga alla massima velocità, per 1 minuto, per eliminare ogni eventuale traccia di Buffer RPE. E' stata posta la RNeasy spin column in un nuovo collection tube di 1,5 mL, a cui sono stati aggiunti 30 μ L di RNase-free water, direttamente sulla membrana della RNeasy spin column, ed è stata eseguita una centrifuga per 1 minuto, a 8000 x g, per

eluire l'RNA. Dopo l'estrazione, la concentrazione dell'RNA isolato è stata determinata mediante l'ausilio dell'apparecchio chiamato NanoDrop 1000 Spectrophotometer (Thermo Scientific), il quale permette di determinare la concentrazione dei vari campioni ottenuti dall'esperimento. Il NanoDrop è uno spettrofotometro UV-Visibile, in grado di analizzare microvolumi di campione (fino ad un 1 μ L), il quale misura la densità ottica del campione, e permette di ottenere una quantificazione precisa. E' possibile effettuare, automaticamente, la lettura dell'assorbanza del campione a 260-230 nm di lunghezza d'onda. L'integrità è stata, invece, determinata mediante elettroforesi su gel d'agarosio in condizioni denaturanti. Il rapporto 260/230 nm dell'RNA isolato è stato di circa 1.7, e poichè solitamente una ratio compresa tra 1.7 e 2 è associata ad un campione puro, l'RNA estratto è stato considerato tale.

3.2.2 Retrotrascrizione dell'RNA in cDNA e quantificazione

L'RNA totale isolato dai campioni, viene retrotrascritto in cDNA, grazie all'azione dell'enzima trascrittasi inversa. Il cDNA così ottenuto, sarà poi amplificato con la Real Time-PCR. La trascrittasi inversa è una DNA polimerasi RNA-dipendente che, utilizzando l'informazione contenuta nello stampo di mRNA, è in grado di sintetizzare un filamento di cDNA. Il prodotto dalla reazione è una molecola ibrida, che consiste nel filamento di RNA stampo appaiato col filamento di DNA neosintetizzato. La sintesi di cDNA viene effettuata in un volume finale di 20 μ L, a partire da una quantità di RNA totale (2 μ L), calcolata a partire dalla sua concentrazione, utilizzando la seguente proporzione:

concentrazione dell'RNA totale (ng/ μ L) : $1 \mu\text{L} =$ concentrazione di RNA necessaria per Real Time-PCR (ng/ μ L) : x

Per prima cosa è stata preparata la mix 1, con volume finale di 13 μ L, contenente:

- oligo dT (5 ng/ μ L)(1 μ L x numero dei campioni + 10%)
- dNTP (1 mM) (1 μ L x numero dei campioni + 10%)
- RNA (2 μ L)
- H₂O RNasi free (9 μ L) necessaria per arrivare al volume finale.

Questa è stata posta per 5 minuti a 65°C in termobloc, per permettere la denaturazione dell'RNA, e poi per 1 minuto in ghiaccio. Poi è stata preparata la mix 2, con un volume finale di 7 μ L, contenente:

- buffer 5x (4 μ L x numero dei campioni + 10%)
- DTT (ditiotreitolo) (20 mM) (1 μ L x numero dei campioni + 10%)
- Trascrittasi inversa (Superscript III, Invitrogen) (20 U/ μ L) (1 μ L x numero dei campioni + 10%)
- H₂O RNasi free necessaria per arrivare al volume finale.

La mix 2 è stata aggiunta alla mix 1, ed il tutto è stato spinnato e posto per 50 minuti a 50°C in bagnetto termico, per permettere l'annealing dei primers. Infine, per inattivare l'enzima, la reazione è stata incubata a 72°C per 15 minuti.

3.2.3 Protocollo Real Time-PCR

La *Real Time PCR* è una tecnica di amplificazione e quantificazione in tempo reale del DNA, che sfrutta l'utilizzo di fluorocromi. Come nella PCR, la reazione avviene attraverso una serie di cicli, effettuati a temperature diverse, che permettono la denaturazione dello stampo, l'annealing dei primers specifici, e l'attivazione dell'enzima Taq-polimerasi che copia lo stampo a partire dai primer, permettendo l'amplificazione del prodotto iniziale. La Real Time-PCR differisce dalla PCR convenzionale perché la quantificazione è svolta nella fase esponenziale della cinetica di amplificazione, e non nella fase di plateau come nel caso della PCR normale; in questo modo, la quantità di prodotto amplificato è proporzionale alla quantità di stampo iniziale. Inoltre, ad ogni ciclo, viene osservato l'andamento della PCR tramite un sistema di monitoraggio, e la Real Time-PCR è molto più sensibile della PCR classica. Per la reazione di amplificazione è usato un termociclatore, uno strumento che permette il passaggio da una temperatura all'altra durante i vari momenti della reazione. Nel coperchio dell'apparecchio si trova un modulo ottico presentante una sorgente laser che serve ad eccitare i fluorocromi; è poi presente un detector, che registra la fluorescenza emessa da ciascun campione, la quale è trasmessa ad un computer, che analizza e rielabora tali dati, per permettere di visualizzare la cinetica di formazione dell'amplificato in funzione della fluorescenza emessa. Viene poi costruito un grafico (utilizzando un software), nel quale sull'asse delle ascisse sono riportati i cicli di reazione e su quello delle ordinate l'incremento di fluorescenza. Inoltre, al tempo zero, vi è comunque una fluorescenza di background, cioè aspecifica, propria dei fluorocromi: per questo motivo, nella curva di cinetica di reazione è presente una

“linea soglia”, che separa la fluorescenza specifica da quella aspecifica. Tutto ciò che si registra al di sotto di questa soglia è il background (rumore di fondo). È inoltre opportuno anche definire il “valore soglia”, che rappresenta il valore di fluorescenza pari a 10 volte la deviazione standard della fluorescenza registrata nei primi cicli dell’amplificazione (e quindi nel background): il ciclo al quale la curva del campione interseca la linea soglia viene definito “Ciclo Soglia” (Ct), e rappresenta il numero di cicli dal quale si ha produzione di fluorescenza specifica. Il “Ciclo Soglia” è quindi un indicatore del numero di copie iniziale di DNA target ed, in particolare, più basso è il valore di ciclo soglia maggiore sarà la quantità iniziale di DNA. Le amplificazioni mediante Real Time-PCR sono state effettuate con l’apparecchiatura ABI PRISM 7000 Sequence Detection System della Applied Biosystem (Foster City, CA, USA), utilizzando il software in dotazione con lo strumento, ed usando il Power SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems), seguendo le condizioni di termociclazione consigliate dal produttore.

La miscela di reazione per la Real Time PCR è costituita da (concentrazioni finali):

- 50 ng di cDNA
- SYBR GREEN PCR Master mix 2X (che contiene: buffer, taq-polimerasi, MgCl₂, e dNTP)
- 2,5 µL di 10X QuantiTect Primer (Qiagen)
- Acqua deionizzata sterile per portare la soluzione al volume finale di 25µl.

Le reazioni sono state eseguite in triplicato su tre serie indipendenti di RNA.

I QuantiTect Primers sono stati bioinformaticamente validati per rilevare solo l'RNA, a condizione che non esistano pseudogeni a elevata somiglianza con il cDNA e la trascrizione non derivi da un singolo gene-esone. I controlli negativi sono stati preparati omettendo il cDNA nelle soluzioni di reazione, e sono stati trattati nelle stesse condizioni dei campioni sperimentali. La β -Actina umana (β -Act) è stata utilizzata come controllo endogeno, per normalizzare l'espressione del gene bersaglio (Δ Ct), e per correggere variazioni sperimentali.

La reazione di Real Time-PCR è stata eseguita effettuando i seguenti steps:

- Stage 1: 95°C per 10 minuti ripetuto una volta
- Stage 2: 95°C per 15 secondi e 60°C per 1 minuto ripetuto 40 volte

La quantificazione del DNA target, effettuata mediante Real Time-PCR, può essere di tipo assoluto o relativo. Per il nostro scopo è stata utilizzata la quantificazione relativa, che ci serve per analizzare i cambiamenti nell'espressione dei geni PT53, BAX, Bcl-2 in diversi campioni trattati, in relazione al campione di riferimento detto calibratore. Oltre al calibratore, per svolgere una quantificazione relativa, bisogna usare un gene controllo come normalizzatore, i cui livelli di trascritto non variano nelle diverse condizioni. Il normalizzatore, solitamente, è un gene housekeeping che funge da controllo endogeno. Nel nostro caso abbiamo utilizzato come gene normalizzatore la gliceraldeide 3-fosfato deidrogenasi umana (GAPDH). L'espressione genica relativa è stata calcolata utilizzando il metodo descritto da Livak e Schmittgen. La quantificazione relativa è stata effettuata utilizzando il metodo del $\Delta\Delta$ Ct. Questo è un

metodo che sfrutta delle formule aritmetiche per ottenere i risultati finali della Real Time quantitativa, e si basa sui seguenti calcoli:

- è stata calcolata la media e la deviazione standard del gene target e del relativo normalizzatore;
- è stato calcolato il valore del ΔCt con la seguente formula:

$\Delta Ct = \text{media dei Ct del gene target} - \text{la media dei Ct del relativo normalizzatore}$

- è stata calcolata la deviazione standard del ΔCt con la seguente formula:

deviazione standard del $\Delta Ct = [(\text{dev.st.gene})^2 + (\text{dev.st normalizzatore})^2]^{0.5}$

- è stato calcolato il valore del $\Delta\Delta Ct$ con la seguente formula:

$\Delta\Delta Ct = \Delta Ct (\text{trattato}) - \Delta Ct (\text{non trattato})$

- infine, è stato calcolato il $2^{-\Delta\Delta Ct}$ che è il valore messo in grafico.

Per quanto riguarda l'analisi statistica, tutti i dati relativi alla Real Time-PCR sono mostrati come media \pm S.D.

3.3 Trattamento dei campioni

Per studiare l'effetto della rMnSOD, tale proteina è stata testata su cellule di Kasumi-1. Inizialmente, sono state prese in considerazione delle concentrazioni crescenti di rMnSOD, sulla base di lavori già pubblicati (Mancini *et al.*, 2008; Borrelli *et al.*, 2012; Pica *et al.*, 2015). Tale esperimento è stato effettuato per scegliere le concentrazioni di rMnSOD appropriate per ottenere l'IC50 (concentrazione inibente), ovvero almeno il 50% di morte cellulare dopo il trattamento. Le cellule sono state coltivate e lasciate

crescere per sette giorni in incubatore a 37 °C con 5% di CO₂. Successivamente è stata allestita una piastra multiwell da 24 pozzetti con 2x10⁵ cellule/mL per ogni pozzetto, al quale è stato addizionato terreno completo RPMI per un volume finale di 200µL. Dopo 24h di crescita, la proteina rMnSOD è stata incubata alle seguenti concentrazioni: 0.5µM, 1µM, 1.1µM, 1.25µM, 1.4µM, 1.5µM, 1.8µM, 2µM e 3µM.

L'azione della proteina rMnSOD è stata testata a 24h. Trascorsi i tempi di incubazione, su ciascun campione è stata valutata la vitalità cellulare.

3.4 Test di vitalità

La vitalità cellulare è stata valutata sia con il test al Trypan blue sia al citofluorimetro tramite test con PI (Ioduro di Propidio).

3.4.1 Test di vitalità al Trypan blue

Il Trypan blue è un cromoforo carico negativamente, non è in grado di attraversare la membrana di cellule intatte, ma attraversa quella delle cellule morte, colorandole di blu. Ciò permette di discriminare facilmente le cellule vive, con membrana intatta, refrattarie al colorante e appaiono con un aspetto traslucido al microscopio ottico, dalle cellule morte, colorate in blu. Per poter effettuare la conta al Trypan blue, da ciascuna fiasca, sono stati prelevati 10µL di campione e sono stati mescolati con 10µL di Trypan blue. La vitalità cellulare, espressa in %, è stata valutata effettuando una conta in Camera di Bürker, al microscopio ottico, delle cellule vive e morte.

3.4.2 Test di vitalità al citofluorimetro

La vitalità delle cellule è stata valutata, oltre che utilizzando il test al Trypan blue, anche grazie all'utilizzo della citometria a flusso. Il saggio è stato eseguito utilizzando lo Ioduro di Propidio (PI), che è un colorante fluorescente in grado di intercalarsi tra le coppie di basi del DNA delle cellule. Esso è una molecola che presenta il picco di eccitazione a 535nm e il picco di emissione a 617nm. Lo Ioduro di Propidio è un colorante selettivo, dal momento che può penetrare solo le cellule con membrana destabilizzata e, quindi, morte. Per questa ragione, il protocollo per il trattamento delle cellule con PI prevede la fissazione delle cellule e la permeabilizzazione delle membrane. Per eseguire tale saggio di vitalità, le sospensioni cellulari sono state prelevate dai pozzetti, centrifugate a 1500rpm per 5 minuti per allontanare il terreno. Lavate in PBS 1X e successivamente, ad ogni sospensione cellulare è stato aggiunto 1µL di PI (20mg/mL) ed effettuata la lettura della vitalità cellulare al FACS (fluorescent-activated cell sorter- BD FACSAria II) utilizzando il software BD FACSDiva.

3.4.3 Valutazione dell'apoptosi tramite Annessina V

L'annexina V appartiene alla superfamiglia di proteine chiamate annessine, così denominate per la loro principale capacità legarsi ("annex") alla membrana cellulare in maniera Ca^{2+} -dipendente. Un dominio "core" conservato, contenente da quattro a otto unità ripetute di 70 amminoacidi ognuna, rappresenta la caratteristica strutturale delle annessine. Grazie a tali unità le annessine sono in grado di legare i diversi fosfolipidi,

mentre la specificità di legame di ogni annessina è probabilmente legata alla regione N-terminale che differisce nelle varie proteine. Durante la morte cellulare si verificano alterazioni della membrana plasmatica che comportano la perdita della sua integrità. Nei primi stadi del processo apoptotico si osservano delle modificazioni del doppio strato lipidico. Mano a mano che il processo apoptotico avanza, aumenta la permeabilità della membrana cellulare; ciò induce ad un cambiamento conformazionale della membrana plasmatica e precisamente della sua composizione asimmetrica in fosfolipidi. Il mantenimento di tale asimmetria coinvolge enzimi chiamati flippasi, la cui attività nelle cellule apoptotiche è però bloccata da un altro enzima, detto floppasi che fa passare le molecole di fosfatidilserina (PS) dallo strato interno della membrana a quello esterno, determinando così l'esternalizzazione della PS. Ciò avviene nelle prime fasi dell'apoptosi. L'annexina V è una proteina con elevata affinità per la PS; poiché l'esposizione della PS sulla membrana esterna è stata associata all'inizio del processo apoptotico, il saggio con annexina V è considerato un metodo di rilevazione delle fasi precoci dell'apoptosi. La PS viene rilevata per colorazione con un coniugato fluorescente dell'Annexina V. La traslocazione di PS sulla superficie cellulare esterna non avviene unicamente nell'apoptosi, ma anche durante la necrosi. Però mentre nelle fasi iniziali dell'apoptosi la membrana cellulare rimane intatta, durante la necrosi la membrana cellulare perde la sua integrità.

Per poter distinguere le cellule vive da quelle apoptotiche e necrotiche, l'annexina V viene spesso utilizzata in doppia marcatura con il PI a bassa concentrazione (1-5 $\mu\text{g/mL}$). In questo caso la bassa concentrazione di PI colorerà solo le cellule necrotiche e

consente di distinguere le cellule necrotiche da quelle apoptotiche (entrambe positive per l'annexina V) (Lucchetti *et al.*, 2009) (Fig.18).

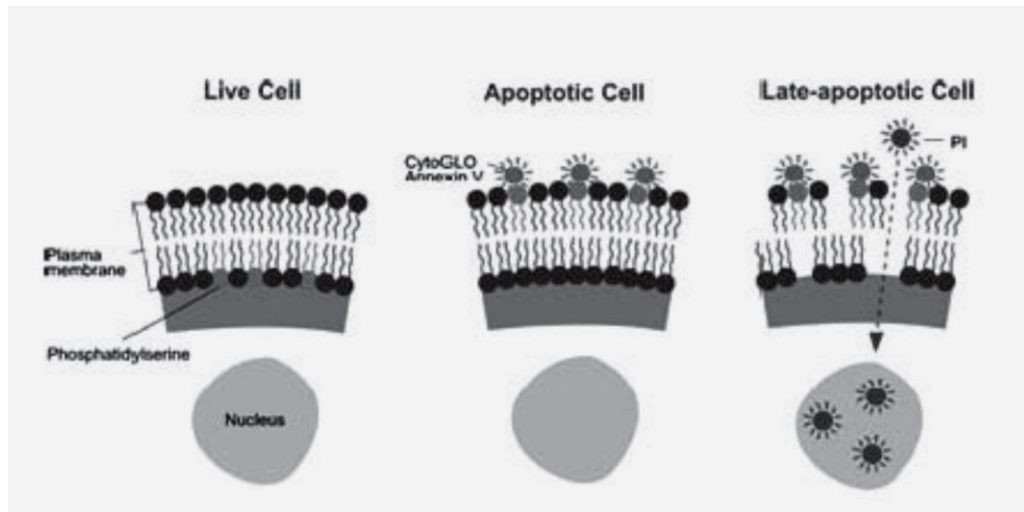


Figura 18. Rappresentazione della colorazione con Annexina V e PI (Lucchetti *et al.*, 2009)

Lo ioduro di propidio (intercalante del DNA), si intercala stechiometricamente quando la membrana cellulare non è integra. In questo saggio è possibile così distinguere tre popolazioni:

- Le cellule negative all'annexina e allo ioduro di propidio sono cellule vive.
- Le cellule positive solo all'annexina sono cellule in fase precoce di apoptosi poiché presentano la traslocazione del fosfolipide.
- Le cellule positive all'annexina e allo ioduro di propidio sono invece cellule o in fase avanzata di apoptosi o cellule necrotiche.

Le cellule prelevate da ogni pozzetto vengono diluite in PBS1X, centrifugate per 5 minuti a 1500 rpm e poi risospese in 200 μ L di “binding buffer”. Successivamente vengono aggiunti 5 μ L di annessina e incubate per 10 minuti al buio. Dopodiché le cellule vengono lavate con 500 μ L di PBS1X e ricentrifugate a 1500 rpm per 5 minuti, il pellet poi è risospeso con 190 μ L di binding buffer. Successivamente vengono aggiunti 10 μ L di PI alla concentrazione di 1 mg/mL e si effettua la lettura al FACS.

3.5 Metodi di rivelazione

3.5.1 L'immunocitochimica

L'immunocitochimica è una tecnica che permette la visualizzazione di componenti cellulari su sezioni di tessuto, strisci, citocentrifugati. Questa tecnica si basa sulla formazione del complesso antigene-anticorpo e la successiva rivelazione attraverso metodi enzimatici o fluorescenti che permettono la visualizzazione al microscopio, in seguito alla reazione. Ci sono due metodiche, quelle dirette e quelle indirette. Nelle metodiche dirette l'anticorpo primario, in grado di riconoscere il target biologico, è legato ad un cromogeno (o un fluorocromo) che consente la sua rivelazione. Nelle metodiche indirette, invece, sono utilizzati due anticorpi, il primario, specifico per la molecola d'interesse e il secondario (al quale è legato la sostanza cromogena o il fluorocromo), che riconosce e lega l'anticorpo primario. L'anticorpo contro la molecola d'interesse è prodotto immunizzando una specie animale verso l'antigene. Nell'immunocitochimica distinguiamo due tipi di tecniche: tecniche di immunofluorescenza e tecniche immunoenzimatiche.

Le tecniche d'immunofluorescenza sfruttano fluorocromi come marcatori della reazione antigene-anticorpo, mentre, le tecniche immunoenzimatiche, utilizzano enzimi per evidenziare la reazione Ab-Ag. Le sostanze fluorescenti utilizzate frequentemente sono: la fluoresceina, la rodamina, la resorufina, la ficoeritrina. Gli enzimi utilizzati nelle tecniche immunoenzimatiche catalizzano la formazione di un precipitato colorato e insolubile visibile al microscopio, dove è avvenuta la reazione Ag-Ab. Gli enzimi più utilizzati sono: la perossidasi di rafano, la fosfatasi alcalina, la β -galattosidasi (Muzi & Bologna, 1999) (Fig.19).

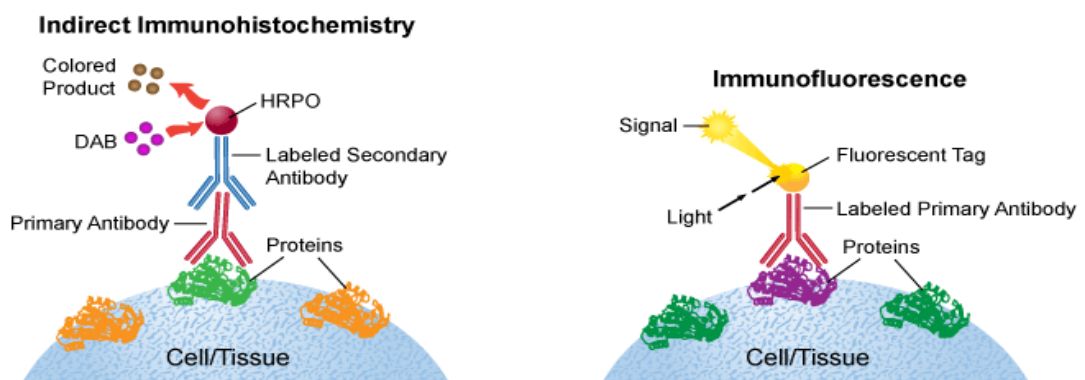


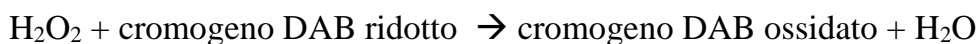
Figura 19. Immunocitochimica e immunofluorescenza (www.leinco.com).

3.5.2 Rivelazione della proteina internalizzata mediante tecnica immunocitochimica

Sono stati prelevati 100 μ L di campione (contenente cellule e terreno di coltura) da ciascun pozzetto ed è stato aggiunto a ciascun campione 400 μ L di PBS 1X (Phosphate Buffered Saline-Life Technologies), così da ottenere 500 μ L di soluzione finale. Di ciascun campione è stato effettuato un citospin, centrifugando per 10 minuti a 800 rpm (Tharmac Cellspin I). Il citocentrifugato è stato fissato con soluzione di Zamboni (4%

paraformaldeide, 15% acido picrico) per 1h e poi lavato in PBS 1X (Phosphate Buffered Saline) e TBS 0,05 mol/L (Tris Buffer Saline) per allontanare il fissativo. È stata, poi, effettuata la reazione immunocitochimica. Successivamente, si è proceduto con un'incubazione per 15 minuti con perossido d'idrogeno 3%, per bloccare l'azione delle perossidasi endogene, e due lavaggi, prima in PBS 1X e poi in TBS 0,05 mol/L. È stata, poi, effettuata l'incubazione per 30 minuti con l'anticorpo I anti-peptide della rMnSOD, prodotto presso il laboratorio del Dott. Mancini (Istituto Nazionale Tumori "Fondazione Pascale", Napoli) e diluito 1:200 con Buffer (TBS 0.05 mol/L con 1% di albumina di siero bovino, BSA). Dopo lavaggi in PBS 1X e TBS 0,05 mol/L, per eliminare l'anticorpo I in eccesso, è stato aggiunto l'anticorpo II biotilinato (horse anti-mouse anti-rabbit anti-goat, diluito 1:200 in PBS 1X contenente 1,5% di NHS, VECTOR) per 30 minuti. Per visualizzare la reazione è stata utilizzata una soluzione substrato-cromogeno che sfrutta la DAB (3,3' diamminobenzidina, SANTACRUZ) diluita in soluzione TRIS-HCl (una goccia di DAB/mL di TRIS-HCl). Dopo 10 minuti, i vetrini sono stati lavati in acqua distillata ed osservati al microscopio ottico.

Schema di reazione della Perossidasi di Rafano



Successivamente i vetrini sono stati contrastati, per circa 5 minuti, con ematossilina per la colorazione dei nuclei (colorati in violetto). Per ottenere il viraggio, sono stati fatti lavaggi consecutivi in H₂O distillata, di fonte e di nuovo H₂O distillata per allontanare i sali dell'acqua. Infine, i preparati sono stati montanti con balsamo (EUKITT) ed osservati. L'acquisizione delle immagini è stata effettuata al

microscopio ottico ZEISS HBO50 mediante l'utilizzo del software Axion Vision Rel.4.8.

3.5.3 Rivelazione della proteina internalizzata mediante tecnica di immunofluorescenza

Per poter visualizzare l'internalizzazione della rMnSOD con cui sono state trattate le cellule, è stata utilizzata una tecnica immunocitochimica in microscopia ottica in fluorescenza.

I campioni di cellule sono stati prelevati dalla piastra e citocentrifugati su un vetrino (10 minuti a 800 rpm- Tharmac Cellspin I). Il citocentrifugato ottenuto è stato fissato con paraformaldeide 4% in PBS 1X per 10 minuti. Le cellule, poi, hanno subito dei lavaggi in PBS 1X + 0,1% Triton X-100 su piastra agitante, per 3 volte, ciascuno di 5 minuti. Successivamente, è stato effettuato il lavaggio con glicina 0,1 M in PBS 1X per 5 minuti, per eliminare l'autofluorescenza della formalina, e si è proceduto con la permeabilizzazione delle cellule con 0,4% Triton X-100 in PBS 1X per 10 minuti, a cui sono seguiti 3 lavaggi in PBS 1X e 0,1% Triton X-100 per 5 minuti. È stata, in seguito, aggiunta la soluzione Blocking con 5% di NHS (Normal Horse Serum, VECTOR) in PBS 1X + 0,1% Triton X-100 per 30 minuti a T ambiente. Le cellule sono state poi incubate con l'Ab I anti-peptide della rMnSOD, prodotto presso il laboratorio del Dott. Mancini (Istituto Nazionale Tumori “ Fondazione Pascale”, Napoli) e diluito 1:200 in soluzione blocking, overnight a 4°C. Il giorno seguente, dopo 3 lavaggi su piastra agitante con PBS 1X e 0,1% Triton X-100 per 10 minuti, è stato incubato l'Ab II (ALEXA FLUOR 488A, THERMO FISCHER, USA) in PBS 1X e 0,1% Triton X-100 diluito 1:400 per 2h. Sono stati, poi, eseguiti 3 lavaggi su

piastra agitante con PBS 1X, per allontanare l'anticorpo in eccesso. Per contrastare i nuclei è stato aggiunto il DAPI (1%) (GIBCO). I vetrini sono stati montati mediante una soluzione di PBS-Glicerolo 1:1 e l'acquisizione delle immagini è stata effettuata al microscopio a fluorescenza ZEISS HBO50 mediante l'utilizzo del software Axion Vision Rel.4.8.

3.5.4 Microscopia confocale

La microscopia confocale è una tecnica di imaging ottico utile per ricostruire immagini tridimensionali. Tale tecnica sfrutta un foro stenopeico (pinhole) per eliminare la luce fuori dal fuoco in campioni che hanno spessore maggiore del piano focale. In un microscopio a fluorescenza convenzionale, l'intero campione è colpito dalla luce emessa dalla sorgente e tutte le parti del campione si troveranno eccitate dalla radiazione ed emetteranno una fluorescenza che viene raccolta da un foto detector.

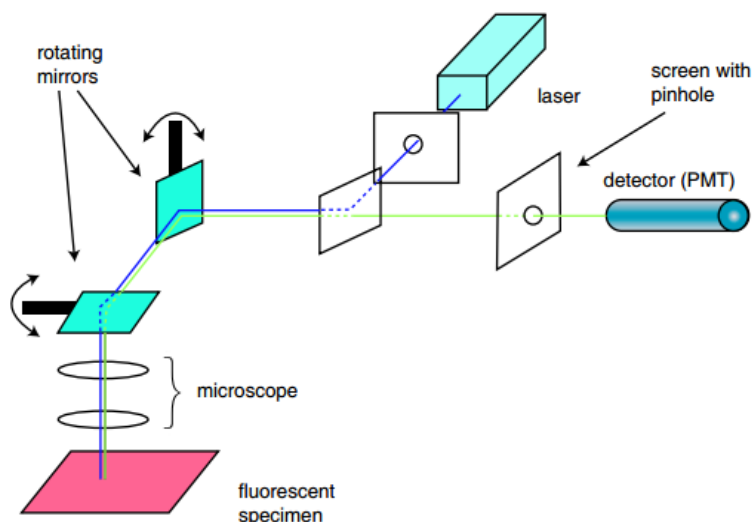


Figura 20. Rappresentazione del microscopio a confocale (Semwogerere, 2005).

Invece, un microscopio confocale utilizza l'illuminazione puntuale e una fessura in un piano otticamente coniugato posto davanti al detector, in modo da eliminare le informazioni fuori fuoco. Solo la luce all'interno del piano focale raggiunge il detector. In questo modo si ottiene un'immagine di qualità molto più elevata rispetto alla microscopia tradizionale. Inoltre, siccome solo un punto alla volta del campione viene illuminato, per ottenere immagini 2D o 3D è necessario compiere una serie di scansioni con fuoco diverso. Con utilizzo della microscopia confocale il campione non viene mai rilevato in un'immagine intera perché in ogni istante esso viene analizzato in un singolo punto. Per cui è necessario collegare al detector un computer in modo da elaborare l'immagine analizzando un pixel alla volta ed ottenere una corretta visualizzazione. La luce che si trova fuori dal fuoco viene esclusa dal foro permettendo così di ottenere un'immagine nitida. In tal modo si ottengono immagini bidimensionali su diversi piani, è possibile poi sovrapporre i piani in modo da formare un'immagine tridimensionale, oppure visualizzare singoli piani per poter per esempio discriminare se una determinata sostanza fluorescente sia presente sulla sola superficie cellulare o anche al suo interno (Semwogerere, 2005) (Fig.20).

3.5.5 Localizzazione dei mitocondri mediante sonda Mitotracker® Red CMXRos

Per identificare i mitocondri, le cellule sono state incubate con sonde MitoTracker® Red CMXRos, che passivamente diffondono attraverso la membrana plasmatica e si accumulano nei mitocondri attivi. Una volta che i loro mitocondri sono marcati, le cellule possono essere trattate con un fissativo a base di aldeidi e consentire un ulteriore trattamento del campione. Sono state piastrate in una multiwell da 24 pozzetti 200.000 cellule per un volume finale di 200µL, e incubate con rMnSOD

1.5 μ M, coniugata al fluorocromo ALEXA FLUOR 488A (Life Technologies, USA), per 6h sulla base di esperimenti già effettuati. Le cellule sono state centrifugate a 1500 rpm per 10 minuti, e il pellet di cellule è stato risospeso delicatamente in una soluzione preriscaldata (37°C) contenente la sonda MitoTracker® Red CMXRos (250nm). Dopo un'incubazione di 45 minuti, le cellule sono state ricentrifugate e risospese in RPMI senza rosso fenolo. È stato effettuato un citospin, con 250 μ L di soluzione cellulare finale. Il citocentrifugato è stato fissato con formaldeide 3.7% in PBS 1X, per 10 minuti a T ambiente. Dopo ripetuti lavaggi in PBS 1X, i vetrini sono stati montati mediante una soluzione di PBS-Glicerolo 1:1 e sono stati immediatamente osservati al microscopio confocale (LSM 510 META, Zeiss).

CAPITOLO 4

RISULTATI

4.1 Real-Time PCR

La presenza dei recettori degli estrogeni ESR1 e ESR2, necessari per il passaggio della rMnSOD in cellule di leucemie mieloide acuta (Kasumi-1), è stata investigata tramite Real Time-PCR (qPCR). E' stata valutata l'espressione dei geni ESR1 e ESR2, codificanti i recettori 1 e 2 degli estrogeni. Dai risultati ottenuti si evince che le cellule di kasumi-1 presentano una quantità molto elevata sia di ER1 sia di ER2, come riportato nel grafico 1. Appurato, quindi, che la rMnSOD sia in grado di penetrare la membrana cellulare di cellule di LMA, Kasumi-1, si è proceduti con i trattamenti sopra citati (cfr 3.2).

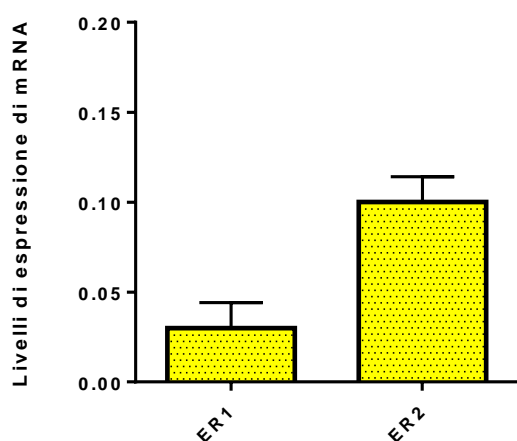


Figura 21. Rappresentazione grafica dei livelli di espressione di ER1 e ER2 nei campioni di cellule di leucemia mieloide acuta (LMA-M2).

4.2 Test di Vitalità

Dall'analisi del test al Trypan Blue risulta che il trattamento con rMnSOD inizia ad agire a partire dalla concentrazione di $1\mu\text{M}$. Nonostante ciò, la vitalità cellulare dopo incubazione con rMnSOD $1\mu\text{M}$ rimane ancora alta, mostrando una percentuale di vitalità del 60% a 24h. Invece, nel trattamento con rMnSOD $1.5\mu\text{M}$, la vitalità si riduce sensibilmente. La concentrazione di rMnSOD $0.5\mu\text{M}$, non ha sortito alcun effetto sulle cellule, mostrando una percentuale di vitalità del 70% a 24h. Questi dati sono confermati dall'analisi citofluorimetrica con test al PI, infatti, risulta che il trattamento con la proteina rMnSOD ha esercitato un effetto quasi nullo alla concentrazione di $0.5\mu\text{M}$, mostrando una vitalità cellulare superiore del 60%. Le cellule trattate con rMnSOD alla concentrazione di $1\mu\text{M}$, sono per lo più vive, mostrando un alto valore di FSC e quindi di dimensione, e un basso valore di SSC, ovvero di complessità cellulare. Invece le cellule, in seguito al trattamento con rMnSOD alla concentrazione di $1.5\mu\text{M}$, mostrano una diminuzione delle dimensioni ed un aumento della complessità cellulare, mostrando così un'alta percentuale di mortalità, circa dell'80% mediamente fra i due tempi di trattamento (Tabella 1, Grafico 1).

Concentrazione rMnSOD	Controllo Trypan B.	Trypan Blue	Controllo PI	PI
3 μ M	75%	0%	76.5%	9.5%
2 μ M	75%	1%	76.5%	13.5 %
1.8 μ M	70%	10%	95%	12%
1.5 μ M	71%	1.5%	91%	24%
1.4 μ M	70%	44%	95%	55%
1.25 μ M	70%	42%	70%	60%
1.1 μ M	71%	54%	70%	70%
1 μ M	71%	61.5%	91%	60%
0.5 μ M	71%	63%	90%	70%

Tabella 1. Conta della vitalità su cellule di Kasumi-1, incubate con rMnSOD a varie concentrazioni, per 24h, tramite test al Trypan blue e PI.

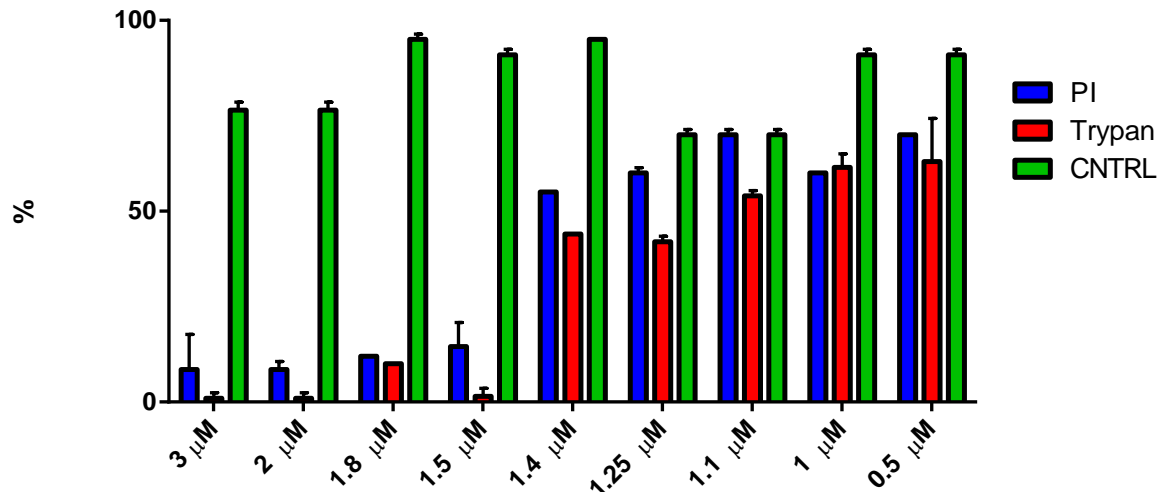


Grafico 1. % di sopravvivenza di cellule di Kasumi-1, trattate per 24h, con rMnSOD, tramite test al Trypan blue e Test al PI.

4.3 Valutazione dell'apoptosi tramite Annessina V

Per l'analisi al citofluorimetro dell'Annessina V, le cellule sono state incubate con sole 3 concentrazioni di rMnSOD: 1μM, 1.5μM e 2μM, sulla base dei risultati ottenuti tramite i tests di vitalità. Dalla valutazione dell'apoptosi appare che la concentrazione di 2μM abbia sortito più effetto apoptotico rispetto alle altre due, ottenendo circa il 50% di cellule in morte programmata dopo 24h di trattamento (Grafico 2, Figura 22).

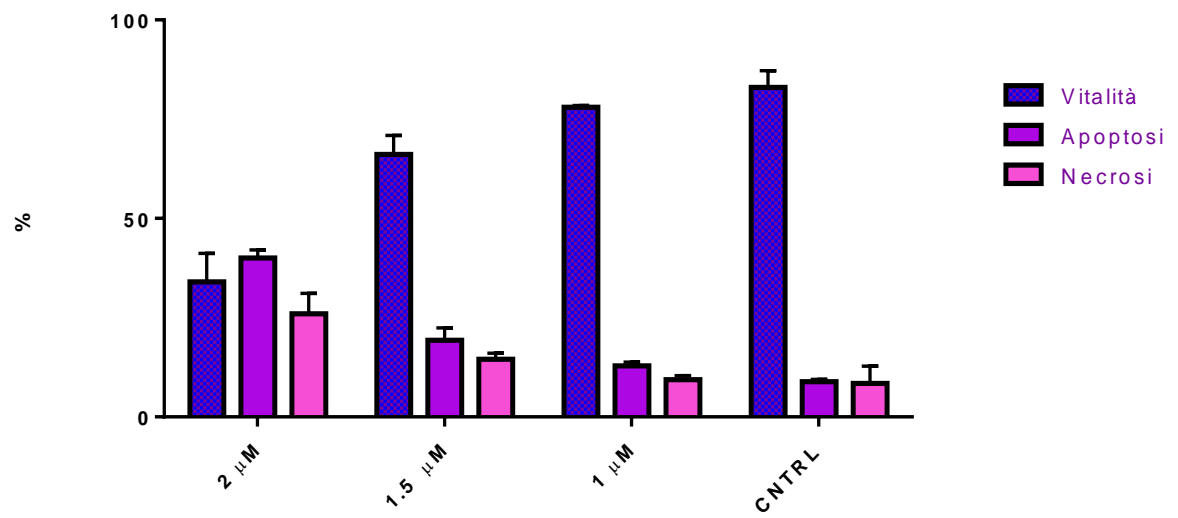


Grafico 2. Percentuali di sopravvivenza di cellule di Kasumi-1, trattate per 24h, con rMnSOD, tramite test all'Annexina V.

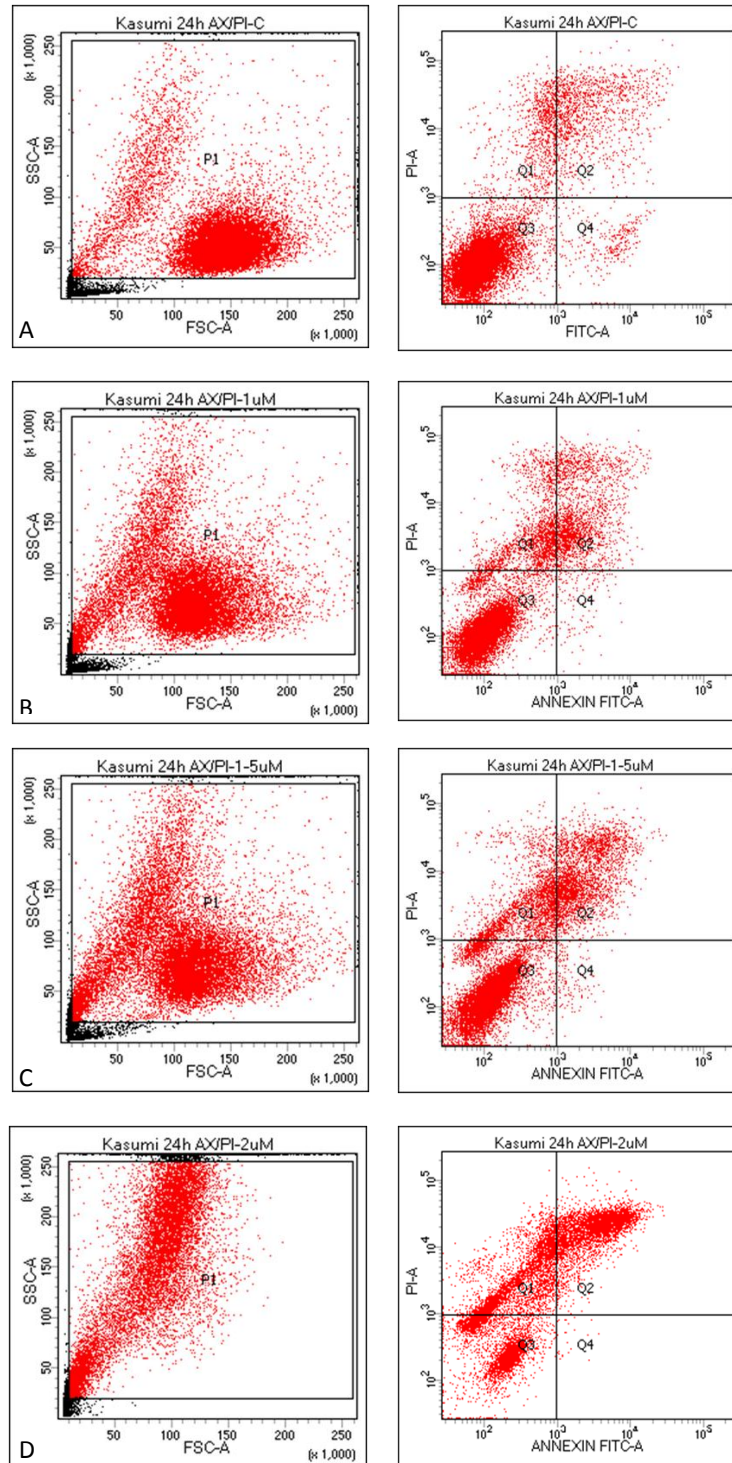


Figura 22. Analisi citofluorimetrica, tramite test all'Annessina V, di cellule di Kasumi-1, trattate con varie concentrazioni di proteina rMnSOD. P1: quota significativa di cellule vive. Nei grafici a sinistra sulle ascisse è rappresentato il Forward Scatter (FSC), proporzionale alla dimensione e forma delle cellule; sulle ordinate è rappresentato il Side Scatter (SSC), proporzionale alla granulosità e complessità cellulare. Nei grafici a destra sulle ascisse sono rappresentati i vari quadrati relativi alle vitalità: Q1: necrosi, Q2: apoptosi tardiva, Q3: cellule vitali e Q4: apoptosi precoce; Esperimento a 24h per A: controllo, B: 1 μ M rMnSOD, C: 1,5 μ M rMnSOD, D: 2 μ M rMnSOD.

4.4 Rivelazione della proteina internalizzata mediante tecnica di immunocitochimica in microscopia ottica e in fluorescenza

Sono state utilizzate tecniche di immunocitochimica in microscopia ottica e in fluorescenza, come in precedenza descritto (cfr. 4.4-4.5). I preparati di immunocitochimica, esposti nelle immagini riportate in basso, sono stati ottenuti utilizzando le concentrazioni di rMnSOD prossime al raggiungimento dell'IC50. Tali concentrazioni sono state determinate tramite i tests di vitalità.

Le immagini in microscopia ottica ottenute (Fig.23) evidenziano come nelle cellule trattate, per 24h, alle concentrazioni di rMnSOD 1.5 μ M e 2 μ M (in particolar modo) siano evidenti alterazioni caratteristiche dell'apoptosi, quali frammentazione nucleare e corpi apoptotici (Fig.23 D). Alla concentrazione di rMnSOD 1 μ M, le cellule risultano marcate, e non mostrano caratteristiche apoptotiche, né risultano fortemente danneggiate.

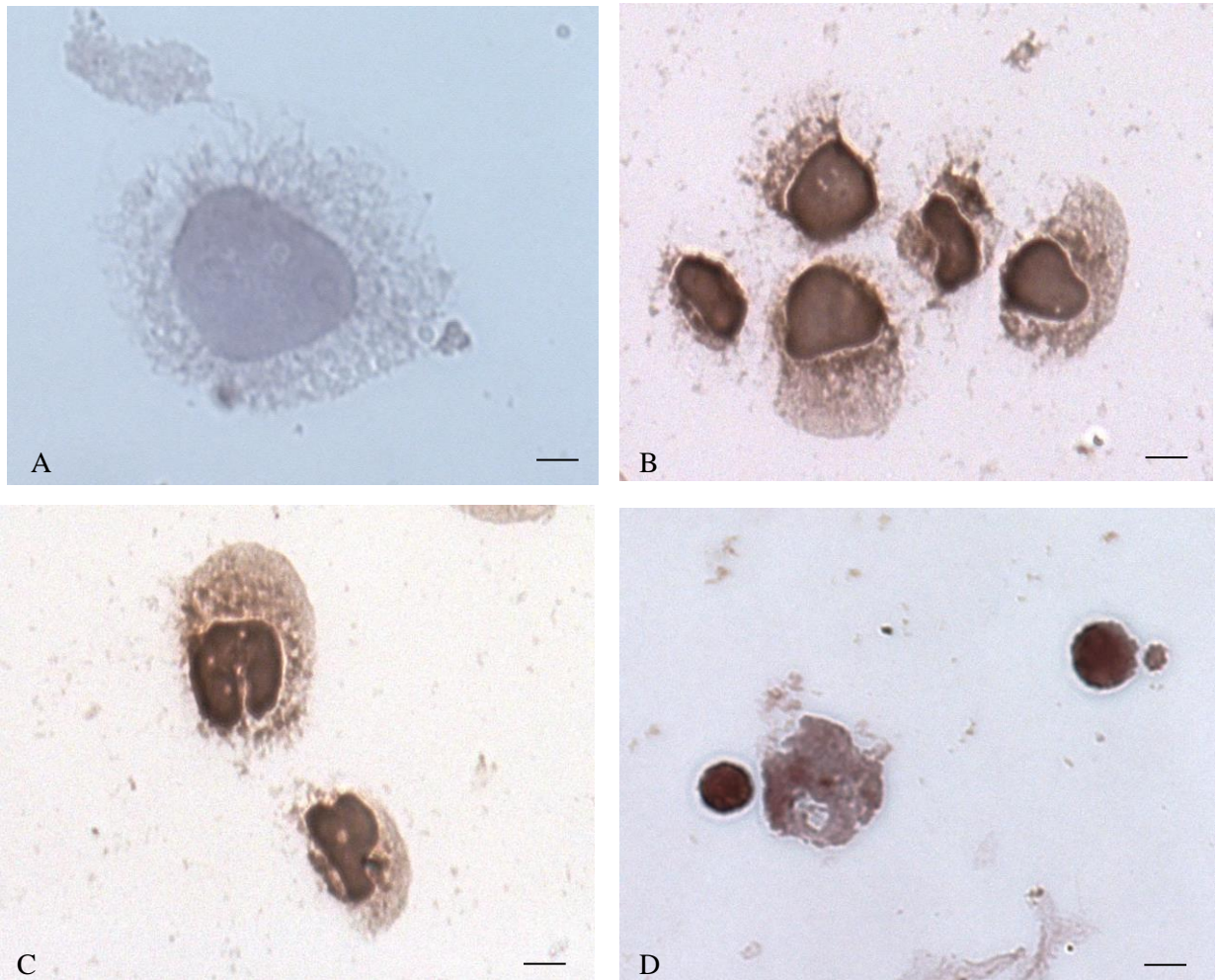


Figura 23. Cellule di Kasumi-1, trattate per 24h con la proteina rMnSOD alle concentrazioni di: $1\mu\text{M}$, $1.5\mu\text{M}$, $2\mu\text{M}$ e osservate al microscopio ottico.

A: cellule non trattate, B: cellule trattate con rMnSOD $1\mu\text{M}$, C: cellule trattate con rMnSOD $1.5\mu\text{M}$, D: cellule trattate con rMnSOD $2\mu\text{M}$ (Scale Bar: $6\mu\text{m}$).

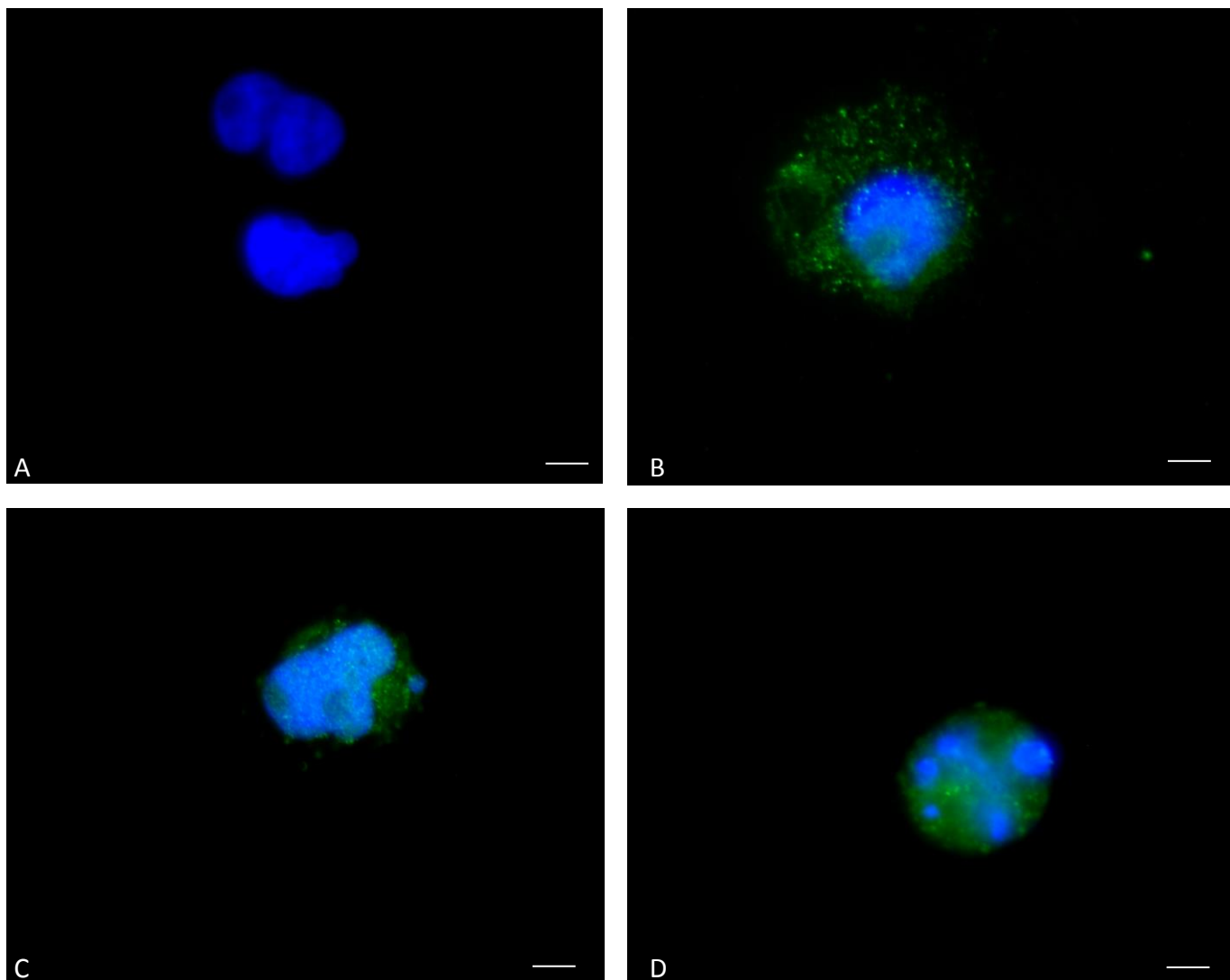


Figura 24. Cellule di Kasumi-1, trattate per 24h, con rMnSOD alle concentrazioni di: 1 μ M, 1.5 μ M, 2 μ M, sottoposte a immunocitochimica indiretta fluorescente. A: cellule non trattate, B: cellule trattate con rMnSOD 1 μ M, C: cellule trattate con rMnSOD 1.5 μ M, D: cellule trattate con rMnSOD 2 μ M (Scale Bar: 7 μ m).

I risultati ottenuti in microscopia a fluorescenza (Fig.24) concordano e suffragano quelli rilevati in microscopia ottica. Infatti solo alle concentrazioni di 1.5 μ M e 2 μ M, dopo 24h d'incubazione, risultano evidenti segni di frammentazione nucleare.

4.5 Rivelazione della colocalizzazione mitocondriale della rMnSOD tramite microscopia confocale

Al microscopio confocale (LSM 510 META, Zeiss), si osserva che la proteina rMnSOD, dopo incubazione a 6h, appare diffusa in tutto il citoplasma della cellula, e nel nucleo e nei mitocondri dove è presente colocalizzazione con Mitotracker® RedCMXRos, indice che la rMnSOD si localizza anche all'interno di tali strutture cellulari (Fig.25).

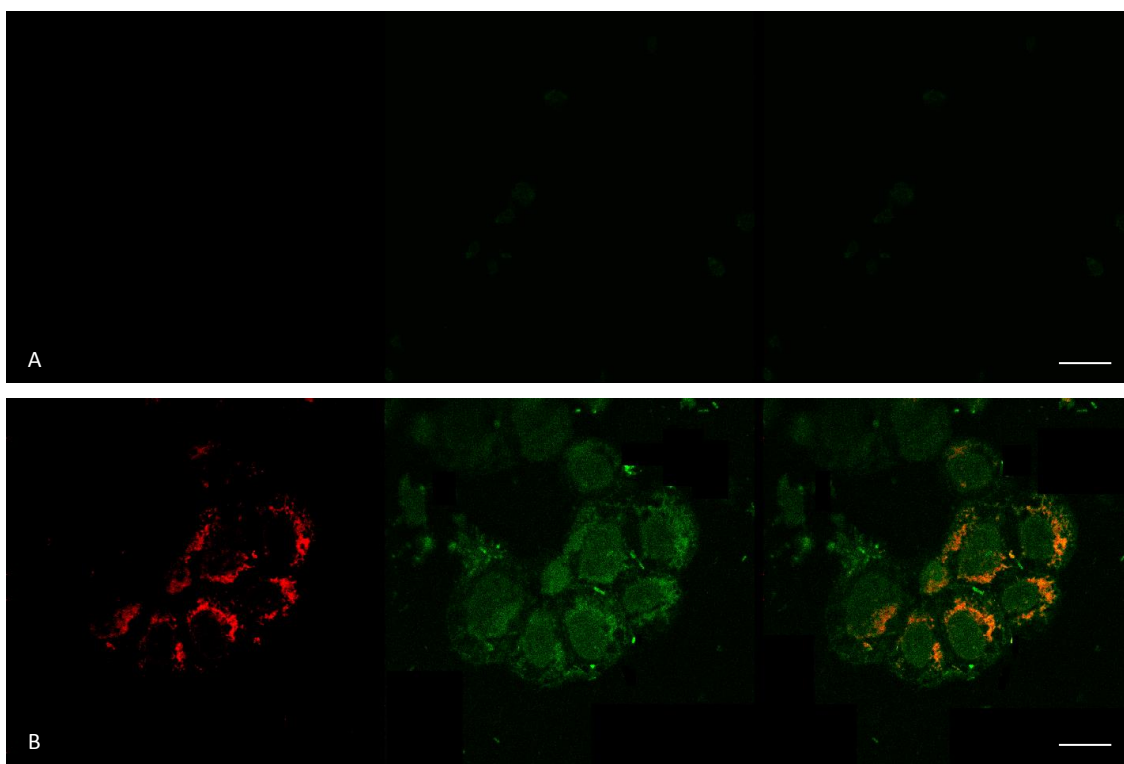


Figura 25. Cellule di Kasumi-1 trattate per 6h con rMnSOD, coniugata al fluorocromo Alexa Fluor 488A e per 45 minuti con MitoTracker® Red CMXRos. A: cellule non trattate, B: cellule trattate con rMnSOD 1.5 μ M e MitoTracker® Red CMXRos (250nm) (Scale Bar: 8.2 μ m). Da notare la colocalizzazione della proteina rMnSOD e dei mitocondri, mostrata nel merge (ultima immagine). Nelle prime due immagini si osservano rispettivamente la marcatura dei mitocondri e della proteina singolarmente.

CAPITOLO 5

5.1 Conclusioni sperimentali

Oggi la terapia maggiormente utilizzata per il trattamento della leucemia mieloide in età pediatrica, si basa sull'utilizzo di protocolli che prevedono l'impiego di chemioterapici con diversi cicli di consolidamento. I pazienti che rispondono alla terapia, sono considerati a basso rischio di recidiva, quelli, invece, che non rispondono alla terapia sono considerati ad alto rischio di recidiva, pertanto, sono trattati con protocolli più complessi e candidati, come ultima possibilità, al trapianto (Foster *et al.*, 2011). Tuttavia, la difficoltà, sempre maggiore, nel trovare donatori compatibili e l'insorgenza di possibili complicanze secondarie, fa sì che il trapianto non sia molto utilizzato. Per tale motivo la ricerca sta ponendo l'attenzione sullo studio di farmaci alternativi, detti spesso farmaci "intelligenti", cioè sostanze dirette contro specifiche molecole presenti nelle cellule cancerose. Tale approccio consentirebbe di ridurre gli effetti collaterali delle attuali terapie. Una molecola, che può essere considerata una buona candidata per questa terapia alternativa, è la proteina rMnSOD, grazie alla sua azione oncotossica diretta selettivamente verso le cellule cancerose (già dimostrata in MCF-7, OVCAR-3, MIA PaCa 2, A375, NCI-28) e alla sua facile somministrabilità. Una delle principali caratteristiche della rMnSOD, è la sua capacità di entrare nelle cellule, attraverso una piccola sequenza molecolare, detta peptide leader, e agire solo sulle cellule tumorali, nelle quali la ridotta quantità di catalasi (antiossidanti), non consente la completa trasformazione del perossido d'idrogeno (H₂O₂), prodotto dall'azione della proteina, in acqua ed ossigeno, determinando, così, uno squilibrio

ossidativo con conseguente accumulo di radicali liberi, che possono portare all'attivazione dell'apoptosi nelle sole cellule leucemiche.

Con i metodi utilizzati è stato dimostrato che la rMnSOD è in grado di indurre apoptosi nelle cellule leucemiche a concentrazioni comprese fra 1.5 μ M e 2 μ M.

L'internalizzazione della proteina è stata dimostrata dalla marcatura citoplasmatica e nucleare, rivelata attraverso la microscopia ottica e in fluorescenza. I risultati ottenuti in microscopia ottica, infatti, evidenziano come le cellule trattate alle concentrazioni di 1.5 μ M e 2 μ M presentano alterazioni caratteristiche dell'apoptosi (quali blebs e corpi apoptotici).

Tali risultati sono stati confermati dalle osservazioni in microscopia a fluorescenza, attraverso la quale, si evidenziano frammentazioni nucleari. Inoltre dall'osservazione al microscopio confocale è stato osservato che la proteina rMnSOD appare diffusa in tutto il citoplasma della cellula, e nel nucleo e nei mitocondri dove è presente colocalizzazione con Mitotracker RED Fluo, indice che la rMnSOD si localizza anche all'interno di tali strutture cellulari.

L'analisi al citofluorimetro, con l'utilizzo dell'annessina V, ha confermato che la concentrazione di rMnSOD 2 μ M risulta essere quella più opportuna per valutare l'effetto oncotossico della proteina su cellule di LMA in coltura.

Sono ancora in corso esperimenti di biologia molecolare per valutare l'attivazione della via delle caspasi 3 e la presenza delle proteine pro apoptotiche nelle cellule trattate, segno evidente dell'attivazione del pathway apoptotico.

5.2 Riflessioni Finali

La “bioetica dell’infanzia” è una questione etica di fondamentale importanza che non può essere ridotta alla semplice correlazione analogica della “bioetica dell’adulto”, dal momento che per casistica e per materiale sono fortemente diverse. Si parla spesso, di cultura dell’infanzia, termine coniato recentemente, per esprimere il concetto per cui il momento dell’infanzia ha un carattere tutto proprio, che va argomentato in maniera indipendente. Secondo una argomentazione filosofica, la cultura dell’infanzia viene inserita nella filosofia dell’uomo; secondo una argomentazione scientifica essa rappresenta il concetto per cui un bambino ha innate capacità relazionali e cognitive che gli permettono una vita sociale. Recentemente il concetto da diffondere è il seguente: parlare di cultura anche per i bambini che sviluppano e maturano capacità, non solo fare cultura su di essi, ma pensarli presenti, attori nella relazionalità che con essi si instaura. Secondo Taylor, antropologo, la cultura è un insieme multifattoriale di concetti comprendenti l’arte, la morale e qualsiasi capacità acquisita dall’uomo come membro della società. Nel bambino, questo concetto raggiunge l’apice cognitivo, dal momento che egli entra nel mondo, lo percepisce e lo vive emotivamente, conquistandolo cognitivamente. Se il bambino è stimolato a cogliere qualsiasi tratto anche ben nascosto, affrontando la vita con curiosità e stupore, allora, secondo Morin, avrà una esistenza adulta ben arricchita. Per tale motivo, è anche di impegno sociale e delle istituzioni il creare situazioni ambientali per favorire, quindi, la cultura dell’infanzia. Ed è proprio in questo contesto che si inseriscono le ultime riflessioni del Comitato Etico (CNB), ovvero tra la relazione tra uomo e natura, interrogandosi sui valori etico-giuridico-filosofici della cosiddetta “crisi ecologica”. La base etica di

questo pensiero prende spunto dal principio per cui ogni essere umano ha diritto alla vita, alla salute, all'ambiente e al suo godimento nelle condizioni migliori. I riflessi negativi del degrado ambientale ricadono, però, principalmente sui soggetti più deboli: bambini e anziani. Il Comitato Etico, nel trattato "Bioetica con l'Infanzia" del 1994, ha analizzato le componenti psicologiche e biologiche che hanno i fattori ambientali sui bambini. Allo scopo di avere una visione sempre più universale, si è deciso di intendere l'infanzia come viaggio della vita di un bambino, a partire dal suo concepimento. Questo perché, ci si è interrogati sul ruolo svolto dall'ambiente nella modulazione dei caratteri ereditari. Scoperte recenti dimostrano che le variazioni indotte da fattori ambientali, o somazioni, sono ereditarie. La genetica mendeliana è stata, infatti, oggetto di forte discussione, e sulla base delle nuove scoperte di biologia molecolare, sembra essere più accettabile che le mutazioni, indotte dall'ambiente, possono stabilizzarsi dopo una o due generazioni. Ciò per concludere che è indubbio che l'ambiente contribuisca alla variabilità, che è la base della sopravvivenza. Quindi, riprendendo il concetto dell'inizio della vita, il rischio biologico può essere presente molto precocemente nello sviluppo. Per lungo tempo, si è ritenuto, che il feto e il bambino fossero protetti dalle modificazioni fisiologiche e chimiche della madre. Ciò è stato ampiamente confutato, dal momento che il feto non riesce a metabolizzare e a neutralizzare numerose sostanze, responsabili di mutazioni. Tra l'altro, modificazioni dell'ambiente interno della madre, si riflettono sul feto, come quelle indotte da fumo, alcol, e l'assunzione di alcune medicine compromettendone lo sviluppo. Da ciò pare necessario e doveroso, non solo da parte della madre, ma anche da parte delle istituzioni, garantire un ambiente adatto allo sviluppo embrionale/fetale, alla nascita e

alla vita del bambino. I fattori ambientali risultati più pericolosi sono i fattori “aereo-contaminanti” e quelli alimentari. Il bambino è, infatti, vittima dei danni che gli adulti, con le loro attività, le loro produzioni e i loro comportamenti nel microsociale, hanno arrecato all’ambiente in cui il bambino medesimo nasce, gioca, cresce e si sviluppa. L’abuso delle risorse operato dagli adulti ha, pertanto, sottratto al bambino un ambiente salubre e relazionalmente sano. A oggi, siamo alquanto lontani dal garantire ai bambini una adeguata accoglienza in questo mondo. Basti pensare, ad esempio, ai bambini vittime di separazioni, di maltrattamenti, di ingiurie. Il bambino, ha un innato sintomo di sopravvivenza, ma se l’ambiente di vita non gli garantisce né sopravvivenza fisica né vitalità e fertilità fisica e psicologica, allora ogni sforzo va diretto al miglioramento dell’ambiente, dove il bambino cresce. Secondo Winnicot, un bambino non può esistere se non in relazione con gli altri e con l’ambiente che lo circonda. Ambiente che risulta sempre più a rischio per tutti gli esseri viventi. La difficoltà dei genitori, o degli educatori in generale, è proprio quella di individuare i comportamenti più idonei da assumere, per contrastare i problemi creati dal cattivo uso delle risorse ambientali. Negli ultimi decenni, la consapevolezza della necessità della salvaguardia della maternità e quindi del bambino nascente è andata sempre più aumentando, basti pensare alla Direttiva 92/85 della donna lavoratrice che ha previsto l’attuazione di norme volte a promuovere il miglioramento della sicurezza e della salute sul lavoro delle lavoratrici gestanti e puerpere. Le numerose evidenze sulle alterazioni patologiche operate da particolari agenti inquinanti quali, ad esempio: i composti organici del mercurio che tendono ad accumularsi negli alimenti, essendo liposolubili, e soprattutto nel pesce. Una esposizione alimentare elevata a tali composti

può portare a lesioni del sistema nervoso centrale del feto e a ritardi nello sviluppo neurologico nei bambini. In Giappone, negli anni '60, sono state descritte intossicazioni alimentari da mercurio, di una comunità di pescatori. L'esposizione al mercurio non è l'unica preoccupante, vi è un altro metallo pesante, il piombo, derivato da emissioni industriali, vernici e scarichi di veicoli a motore. Tale esposizione può causare aborti e/o danni al sistema nervoso centrale del feto con conseguente ritardo psicologico. L'UE ha stabilito una dose massima settimanale di assunzione di piombo, al di sotto della quale non si dovrebbero presentare conseguenze. Numerosi dati epidemiologici, indicano come l'esposizione a sostanze organiche quali il benzene, rappresenti un fattore di rischio per aborti spontanei, e anche i prodotti fitosanitari, usati in agricoltura, quali pesticidi, erbicidi, etc, sono da considerarsi ad alto rischio. Oltre alle esposizioni di carattere alimentare e/o lavorativo, negli ultimi anni la ricerca si è andata sempre più concentrando sullo studio degli inquinanti atmosferici e dell'ambiente. Nell'ultimo decennio è stato segnalato, in molti paesi, un aumento della frequenza di asma nel bambino, correlato ad aumento di altre patologie di origine allergica. Recentemente è stata condotta in Italia, dall'istituto DOXA, una indagine epidemiologica sulle malattie allergiche in età evolutiva, che ha evidenziato un notevole incremento rispetto ai decenni passati. Anche la cosiddetta "sindrome della iperattività", che comporta disturbi nell'apprendimento e nel comportamento, sembra essere attribuibile ad inquinanti alimentari. Nello studio dell'inquinamento atmosferico, di particolare importanza è la valutazione effettuata da Legambiente nei grandi centri urbani italiani (Napoli, Milano, Roma e Torino). Secondo questi risultati,

le concentrazioni degli inquinanti inalati hanno effetti dannosi sulla salute del bambino (Forastiere “Progetto Salute”, 2011).

L'alimentazione con le sue problematiche esaminate, quali l'aggiunta di additivi, talora cancerogeni, agli alimenti industriali, l'uso di pesticidi in agricoltura o ancora la variazione della dieta nei paesi ricchi, che ha portato all'abuso di proteine, in particolare quelle animali, sono ormai considerate concause di insorgenza di malattie degenerative, tra le quali il cancro. Tutto ciò si è concretizzato in aumento di casi di cancro soprattutto pediatrici. Secondo il Rapporto “Sentieri”, i casi di tumori pediatrici sono in forte crescita, e questo soprattutto nelle regioni italiane colpite da un inquinamento ambientale di forte entità.

Altra problematica di ordine etico nei pazienti oncologici pediatrici è l'eliminazione del dolore, sia psichico che fisico, connesso alla malattia e derivato dalle pratiche clinico-terapeutiche, allo scopo di migliorarne la qualità di vita e la sopravvivenza. L'attenzione più forte, attualmente, è rivolta allo studio di terapie alternative, più specifiche e selettive, efficaci nella riduzione del tumore e in grado di limitare gli effetti collaterali delle chemioterapie. Parallelamente alla necessità di migliorare la qualità della vita dei bambini oncologici occorre anche attuare programmi di prevenzione sulla base delle conoscenze disponibili sia per quanto riguarda l'inquinamento ambientale sia per quanto riguarda la nutraceutica, disciplina in sviluppo da alcuni anni, che nasce come “studio degli alimenti funzionali” ovvero degli alimenti in grado di migliorare la qualità della vita, favorendo benefici per la salute dell'uomo e riducendo il rischio di malattie: “un alimento può essere considerato ‘funzionale’, se è sufficientemente dimostrata la sua influenza benefica su

una o più funzioni del corpo, oltre ad effetti nutrizionali adeguati, tanto da risultare rilevante per uno stato di benessere e di salute o per la riduzione del rischio di malattia. Gli effetti benefici potrebbero consistere sia nel mantenere che nel promuovere uno stato di benessere o salute e/o in una riduzione del rischio di un processo patologico o di una malattia” (Diploch *et al.*, 1999). Il ruolo protettivo degli “Alimenti Funzionali” non è ascrivibile ad una singola componente, piuttosto ad un insieme di nutrienti, contenuti in uno o più cibi, in grado di agire sinergicamente tra loro. Tali alimenti risultano necessari per l’essere umano, dal momento che gli alimenti industriali sono sempre più adulterati (aggiunta di conservanti, coloranti, irradiazione e lunga filiera di distribuzione con perdita di freschezza) presentano pertanto, carenze vitaminiche e di altri nutrienti. L’aspettativa di vita dell’uomo, oggi, è quindi sicuramente aumentata, ma la qualità è sempre più compromessa. Per tale motivazione, l’organismo soffre di questo continuo decadimento nutrizionale e si deteriora pian piano. Da qui si evince l’importanza di una corretta e sana alimentazione perché, secondo la teoria degli alimenti di Feuerbach *“I cibi si trasformano in sangue, il sangue in cuore e cervello, in materia di pensieri e sentimenti. L’alimento umano è il fondamento della cultura e del sentimento. Se volete far migliorare il popolo, in luogo di declamazioni contro il peccato, dategli un’alimentazione migliore. L’uomo è ciò che mangia”* (Feuerbach L.,1862).

Alla luce delle nuove esigenze poste da un mondo sempre più interdipendente nelle sue parti costituenti, che appare agli occhi “infantili” sempre più affollato di individui, di immagini difficili da comprendere ed analizzare, è necessario rendersi più partecipi e sensibilizzarsi a quelli che sono i problemi concreti della nostra società, non da

spettatori passivi della catastrofe ambientale entro cui viviamo, ma protagonisti attivi del miglioramento della “Nostra Amata Terra”.

CAPITOLO 6

BIBLIOGRAFIA

- Alberts B., Johnson A., Lewis J., Raff M., Roberts K., Walter P. 2009. *Biologia molecolare della cellula*. Zanichelli. Bologna. 5a edizione.
- Alnaim L. 2007. Therapeutic drug monitoring of cancer chemotherapy. *J Oncol Pharm Pract* 13, 207–221, doi: 10.1177/1078155207081133.
- Arbuckle R, Abetz-Webb L. “Not just little adults: qualitative methods to support the development of pediatric patient-reported outcomes”. *Patient*. 2013;6(3):143-59. doi: 10.1007/s40271-013-0022-3.
- Babl FE, Oakley E, Seaman C, Barnett P, Sharwood LN. High-concentration nitrous oxide for procedural sedation in children: adverse events and depth of sedation. *Pediatrics*. 2008 Mar;121(3):e528-32. doi: 10.1542/peds.2007-1044.
- Beherend L., Henderson G., Zwacka R.M., 2003. Reactive oxygen species in oncogenic transformation. *Biochem Soc Trans* 31(Pt 6):1441-4.
- Berrino F, Krogh V, Riboli E. Epidemiology studies on diet and cancer. *Tumori*. 2003 Nov-Dec;89(6):581-5.
- BIOETICA CON L’INFANZIA (1994) CNB
- BIOETICA E AMBIENTE (22 settembre 1995) CNB
- Böhm I. & Schild H. 2003. Apoptosis: the complex scenario for a silent cell death. *Mol. Imag. Biol.*; 5 (1): 2–14.
- Borrelli A., Schiattarella A., Mancini R., Morrica B., Cerciello V., Mormile M., d'Alesio V., Bottalico L., Morelli F., D'Armiento M., D'Armiento F.P., Mancini A. 2009. A recombinant MnSOD is radioprotective for normal cells and radiosensitizing for tumor cells. *Free Radic Biol Med* 46, 110–116, doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2008.10.030.
- Borrelli A., Schiattarella A., Bonelli P., Tuccillo F.M., Buonaguro F.M., Mancini A. 2014. The Functional Role of MnSOD as a Biomarker of Human

Diseases and Therapeutic Potential of a New Isoform of a Human Recombinant MnSOD. *BioMed Research International*. Vol.2014, Article ID 476789, 11.

- 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, 453–459, doi: 10.1002/ijc.25334.
- Borrelli A., Schiattarella A., Musella A., Mancini R., Capasso C., De Luca V., Carginale V., Sanseverino M., Tornesello A.L., Gori E., Pica A., Di Santi A., Basile F., Iacobellis F., Colacurci N., Cobellis L., Mancini A. 2012. A molecular carrier to transport and deliver cisplatin into endometrial cancer cells. *Chem Biol Drug Des* 80, 9–16, doi: 10.1111/j.1747-0285.2012.01337.
- Brandon M., Baldi P., Wallace D.C. 2006. Mitochondrial mutations in cancer. *Oncogene* Aug 7;25(34):4647-62.
- Brodie MJ1, Overstall PW, Giorgi L.”Multicentre, double-blind, randomised comparison between lamotrigine and carbamazepine in elderly patients with newly diagnosed epilepsy. The UK Lamotrigine Elderly Study Group”. *Epilepsy Res.* 1999 Oct;37(1):81-7.
- BURNING OPPORTUNITY: CLEAN HOUSEHOLD ANERGY FOR HEALTH. OMS,2015
- Campbell TC & Campbell TM, *The China Study*, I Ed, MacroEdizioni (CE), 2011
- Campo E., Swerdlow S.H., Harris N.L., Pileri S., Stein H., Jaffe E.S. 2011. The 2008 WHO classification of lymphoid neoplasms and beyond: evolving concepts and practical applications. *Blood.* 12; 117(19): 5019–5032.
- Canevaro A. “I bambini che si perdono nel bosco”, *La Nuova Italia*, Firenze, 1976.
- Castoldi G. & Liso V. 2013. *Malattie del sangue e degli organi ematopoietici*. Mc Graw Hill editore, Milano. 6a edizione.
- *Catalogue of the Royal Mummies in the Museum of Cairo* (2012)
- Cohen LA. Diet and cancer. *Sci Am.* 1987 Nov;257(5):42-8.

- Corti A., De Tata V., Pompella A. 2009. Agents and mechanisms of oxidative stress in human pathology. *Ligand Assay*; 14(1):8-15.
- Costa, P. T., Somerfield, M. R., & McCrae, R. R. (1996). Personality and Coping: A Reconceptualization. In M. Zeidner, & N. S. Endler (Eds.), *Handbook of Coping: Theory, Research, Applications* (pp. 44-61). New York: Wiley.
- Czerska M., Mikołajewska K., Zieliński M., Gromadzińska J., Wąsowicz W. 2015. Today's oxidative stress markers, *Med Pr.* 66(3):393-405. doi: 10.13075/mp.5893.00137.
- Davies K.J.A., Lin S.W., Pacifici R.E. Protein damage and degradation by oxygen radicals. IV. Degradation of denatured protein. *J. Biol. Chem.*; 1987. 262: 9914-9920.
- Della Corte F. & D'Ippolito S. *Fondamenti di Ematologia Umana e Comparata*. Liguori Editore, Napoli. 1999. 1a edizione.
- Dichiarazione per il diritto del bambino, 1999, ONU
- Diplock AT, Charleux J-L, Crozier-Willi G, Kok FJ, Rice-Evans C, Roberfroid M, Stahl W, Viña-Ribes J. Functional food science and defence against reactive oxidative species. *Br J Nutr.*1998;80:77S–112S
- Domann F. E. 2013. Aberrant free radical biology is a unifying theme in the etiology and pathogenesis of major human diseases. *Int J Mol Sci* 14, 8491–8495, doi: 10.3390/ijms14048491.
- Dominik Péus, Nicolas Newcomb, Silvia Hofer “Appraisal of the Karnofsky Performance Status and proposal of a simple algorithmic system for its evaluation” Published online 2013 Jul 19. doi: 10.1186/1472-6947-13-72
- Epperly M.W., Gretton J. E., Sikora C.A., Jefferson M., Bernarding M., Nie S. and Greenberger J.S. 2003. Mitochondrial localization of superoxide dismutase is required for decreasing radiation-induced cellular damage. *Radiat. Res.* 160 (5): 568-578.
- ESPOSIZIONE AMBIENTALE E MALATTIE, OMS, 2006
- Etica e Ambiente, *Ecoscienze*, n°2, 2013, 37

- Fey M.F. & Dreyling M. 2010. Acute myeloblastic leukaemias and myelodysplastic syndromes in adult patients: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol.*;21 Suppl 5:v158-61.
- Feuerbach L., Il mistero del sacrificio o l'uomo è ciò che mangia,1862
- Fleury C., Mignotte B., Vayssière J., 2001. Mitochondrial reactive oxygen species in cell death signaling. *Biochimie*; 84:131-141.
- Flouriot G., Brand H., Denger S., Metivier R., Kos M., Reid G., Sonntag-Buck V., Gannon F. 2000. Identification of a new isoform of the human estrogen receptor-alpha (hER-alpha) that is encoded by distinct transcripts and that is able to repress hER-alpha activation function 1. *EMBO J* 19, 4688-4700.
- Fondazione Chiarichieti- Rapporto Annuale 2009
- Forastiere F., Faustini A., Stafoggia M., Badaloni C., Zanini G., Briganti G., Cappelletti A., Gandini M., Berti G., Cadum E. Inquinamento atmosferico/Air pollution, *Epidemiol Prev* 2011; 35 (5-6)
- Gambella O. 2003. Il laboratorio di ematologia. Edizione Minerva Medica, Torino.
- Gianni Buonadonna: il padre dell'oncologia italiana-Redazione Scientifica EDRA. Milano,2015
- Giorgio Ivani Terapia del dolore nel bambino, SEE Editrice Firenze, 2000
- Greenwald P, McDonald SS. Cancer Prevention: The Roles of Diet and Chemoprevention. *Cancer Control*. 1997 Mar;4(2):118-127.
- Greyl L., Vegni S., Natalicchio M., Cure S., Ferretti J. *La crisi dei rifiuti in Campania, Italia Per A Sud*, 2009, Centro Documentazioni Conflitti Ambientali.
- Halliwell B. 2007. Oxidative stress and cancer: have we moved forward?. *Biochem. J.*; 401 (1): 1-11.
- Hee Young J., Che Ry H., Hee Young S. 2014. Advancements in the treatment of pediatric acute leukemia and brain tumor-continuous efforts for 100% cure. *Korean J Pediatr*; 57(10): 434-439.

- Ivanova D., Bakalova R., Lazarova D., Gadjeva V., Zhelev Z., 2013. The Impact of Reactive Oxygen Species on Anticancer Therapeutic Strategies. *Adv Clin Exp Med*; 22 (6): 899–908.
- Jiang Y.F., 2002. Complex roles of tissue inhibitors of metalloproteinases in cancer. *Oncogene*; 21:2245-2252.
- Johnson JR, Temple R. “Food and Drug Administration requirements for approval of new anticancer drugs” *Cancer Treat Rep*. 1985 Oct;69(10):1155-9.
- Jonas H. Il principio responsabilità. *Un'etica per la civiltà tecnologica* (a cura di Pier Paolo Portinaro), Einaudi, Torino 20023.
- Klaunig J.E. & Kamendulis L.M., 2004. The role of oxidative stress in carcinogenesis. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol*; 44:239-67.
- Kubler-Ross E (traduttore: Di Zoppola C.) “La morte e il morire, Psicoguide” Ed. Cittadella, Assisi, n°13.
- LA SACRA BIBBIA , DANIELE, LIBRO1
- La Torre M.A. *Antropocentrismo e biocentrismo. Due paradigmi a confronto*, Alberto Perdisa Editore 2004
- Landis G.N. & Tower J. 2005. Superoxide dismutase evolution and life span regulation. *Mech. Ageing Dev.*; 126: 365–379.
- Leist M. & Jaattela M. 2001. Four deaths and a funeral: from caspasis to alternative mechanisms. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*; 2 (8): 589-598.
- Leslie E.M., Deeley R.G., Cole S.P.C. 2005. Multidrug resistance proteins: role of P-glycoprotein, MRP1, MRP2, and BCRP (ABCG2) in tissue defense. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 204: 216–237.
- Levin E.R. Plasma membrane estrogen receptors. *Trends Endocrinol Metab.* 2009.
- Li L., Haynes M.P. & Bender J.R. 2003. Plasma membrane localization and function of the estrogen receptor alpha variant (ER46) in human endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 4807-4812.

- Li N., Oberley T.D., Oberley L.W., Zhong W. 1998. Overexpression of manganese superoxide dismutase in DU145 human prostate carcinoma cells has multiple effects on cell phenotype. *Prostate*; 35, 3, 221–233.
- Mancini A, Borrelli A, Masucci MT, Schiattarella A, Filice S, Rahan J, Maggino T. 2000. A conditioned medium from a human liposarcoma-derived cell line induces p53-dependent apoptosis in several tumor cell lines. *Oncol Rep* 7, 629–637.
- Mancini A, Borrelli A, Schiattarella A, Fasano S, Occhiello A, Pica A, Sehr P, Tommasino M, Nüesch JP, Rommelaere J. 2006. Tumor suppressive activity of a variant isoform of manganese superoxide dismutase released by a human liposarcoma cell line. *Int J Cancer* 119, 932–943, doi: 10.1002/ijc.21904.
- Mancini A., Borrelli A., Formisano S., Masucci M.T., Maffeo A., Perla G., De Martino L., Bevilacqua N., Botti G., Maggino T. Establishment and growth regulation of a novel ovarian cancer cell line from a poorly-differentiated adenocarcinoma: proposal for a new treatment. 1999. *Eur J Gynaecol Oncol* 20, 45–52.
- 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, doi: 10.1002/ijc.23791.
- Marino M. & Ascenzi P. 2008. Membrane association of estrogen receptor alpha and beta influences 17beta-estradiol-mediated cancer cell proliferation. *Steroids* 73, 853-858.
- Mashiba H. & Matsunaga K. 1988. Device for intracellular increase of oxygen free radicals and inhibition of MethA tumour cell proliferation: in vitro and in vivo studies. *Int J Tissue React* 10, 273–280.
- Moretto C. “ L’assistenza di base in pediatria. L’infermiere e la salute del bambino”, Carocci Faber, Roma, 2003.

- Murphy K., Travers P., Walport M. 2010. Janeway's Immunobiologia. Editore Piccin. Padova. 7a edizione
- Nilsson S., Mäkelä S., Treuter E., Tujague M., Thomsen J., Andersson G., Enmark E., Pettersson K., Warner M., Gustafsson J.A. 2001. Mechanisms of estrogen action. *Physiol Rev* 81, 1535-1565.
- Oberley. Mechanism of the tumor suppressive effect of MnSOD overexpression. *Biomed HYPERLINK "Pharmacother; 59(4):143-8.*
- OMS: Burning Opportunity: clean household energy for health, sustainable development and the wellbeing of women and children;2016
- P. Cattorini, R. Mordacci, M. Reichlin, (Introduzione allo studio della Bioetica, Europa Scienze Umane Ed. Milano 1996; 117-155)
- Papa Francesco, Enciclica "*Laudato Si'*", 2015
- Patch A. M., Christie E. L., Etemadmoghadam D., Garsed D. W., George J., Fereday S., 2015, Whole-genome characterization of chemoresistant ovarian cancer. *Nature* 521, 489–494. doi: 10.1038/nature14410
- Peter M.E. 2011. Programmed cell death: apoptosis meets necrosis. *Nature*. 417 (7338): 310-312
- Pica A., Di Santi A., Basile F., Iacobellis F., Borrelli A., Schiattarella A., Mancini R., Mancini A. 2010. Anti-Cancer, anti-necrotic and imaging tumor marker role of a novel form of manganese superoxide dismutase and its leader peptide. *Int J Biol Biomed Eng; 4: 53–60.*
- Pica A., Di Santi A., D'angelo V., Iannotta A., Ramaglia M., Di Martino M., Pollio ML, Schiattarella A., Borrelli A., Mancini A., Indolfi P., Casale F. 2015. Effect of rMnSOD on Survival Signaling in Pediatric High Risk T-Cell Acute Lymphoblastic Leukaemia. *J Cell Physiol; 230(5): 1086-93.*
- Pinkus R., Weiner L.M., Daniel V. 1996. Role of oxidants and antioxidants in the induction of AP-1, NF-kB, and glutathione S-transferase geneexpression. *J. Biol. Chem.; 271: 13422–13429.*
- Pontieri G.M., Russo M.A., Frati L. 2005. *Patologia generale*. Piccin Nuova Libreria, Padova. 3a edizione.

- Pontieri G.M., Russo M.A., Frati L. 2008. *Patologia generale*. Piccin Nuova Libreria, Padova.
- Potter Van Rensselaer “Global Bioethics: Building on the Leopold Legacy “ , 1988, Michigan State (USA).
- Rachna S. & Amitabh S. 2015. Leukemias in Children. *The Indian Journal of Pediatrics*; 82(9): 817-824.
- RAPPORTO AIRTUM-AIEOP; *I tumori Infantili*; 2012.
- Rapporto IARC, 2013
- Resnik D.B. and Portier J.C. “*Environment and Health*,” in *From Birth to Death and Bench to Clinic: The Hastings Center Bioethics Briefing Book for Journalists, Policymakers, and Campaigns*, ed. Mary Crowley (Garrison, NY: the Hastings center, 2008), 59-62.
- Robbins & Cotran *Pathologic Basis of Disease*, 9th Edition, 2010, USA
- Robertson J. “Hospital an Children”, New York, 1958 Traduzione italiana “Bambini in Ospedale”, Feltrinelli, 1973.
- Russo G. *Bioetica e questione ambientale*, Coop. S.Tom. – Elle Di Ci, Messina Leumann (TO) 2010.
- Rustøen, RN, PhD, Torbjørn Moum, PhD, Geraldine Padilla, PhD, Steven Paul, PhD, and Christine Miaskowski, RN, PhD “Predictors of Quality of Life in Oncology Outpatients with Pain from Bone Metastasis Tone” *Journal of Pain and Symptom Management* Vol. 30, 2005
- Suresh S. Chronic and cancer pain management. *Curr Opin Anaesthesiol*. 2004 Jun;17(3):253-9.
- Sapienza C & Issa JP. Diet, Nutrition, and Cancer Epigenetics. *Annu Rev Nutr*. 2016 Mar 23.
- Scott M.D., Meshnick S. R. & Eaton J.W. 1989. Superoxide dismutase amplifies organismal sensitivity to ionizing radiation. *J Biol Chem* 264, 2498–2501.
- Seth R. & Singh A. 2015. Leukemias in Children. *Indian J Pediatr.*; 10.1007/s12098-015-1695-5.

- Sies H. 1985. Oxidative stress. Harcourt Brace Jovanovich, Publishers. Londra.
- St. Clair D. 2004. Manganese Superoxide Dismutase: genetic variation and regulation. *J Nutr.* 134 (11): 3190S-3191S.
- Stratton M.R., Campbell P.J., Futreal P.A. 2009. The cancer genome. *Nature.* 458(7239):719-24.
- Sun J. & Hemler M. E. 2001. Regulation of MMP-1 and MMP-2 production through CD147/extracellular matrix metalloproteinase inducer interactions. *Cancer Res* 61, 2276–2281.
- Tannenbaum A. The dependence of tumor formation on the composition of the calorie-restricted diet as well as on the degree of restriction. 1945. *Nutrition.* 1996 Sep;12(9):653-4.
- Thingholm L.B., Andersen L., Makalic E., Southey M.C., Thomassen M. Hansen L.L., 2016. Strategies for Integrated Analysis of Genetic, Epigenetic, and Gene Expression Variation in Cancer: Addressing the Challenges. Department of Pathology, The University of Melbourne, Melbourne, VIC, Australia, Department of Biomedicine, The University of Aarhus, Aarhus, Denmark, Department of Clinical Genetics, Odense University Hospital, Odense, Denmark, Centre for Epidemiology and Biostatistics, The University of Melbourne, Melbourne, VIC, Australia.
- Tura S. & Bacarani M. 2011. Corso di malattie del sangue e degli organi emopoietici. Esculapio, Bologna. 5a edizione.
- Vainio H & Stayner L. Can health promotion at the workplace help prevent cancer?. *Scand J Work Environ Health.* 2002 Jun;28(3):137-9.
- Valko M., Leibfritz D., Moncol J., Cronin M.T., Mazur M., Telser J. 2007. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *International J of Biochem Cell Biol.* 39 (1): 44-84.
- Valko M., Rhodes C.J., Moncol J., Izakovic M., Mazura M. 2006. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chemio-Biological Interactions.* 160; 1-40.

- Van Cruchten S., Van Den Broeck W. 2002. Morphological and biochemical aspects of apoptosis, oncosis and necrosis. *Anat Histol Embryol.* 2002; 31 (4): 214-223.
- Vardiman J. 2012. The classification of MDS: from FAB to WHO and beyond. *Leuk Res.*; 36(12): 1453-8.
- Wang L.I., Miller D.P., Manganese superoxide dismutase alanine-to-valine polymorphism at codon 16 and lung cancer risk. *J HYPERLINK " Cancer Inst.*; 93(23):1818-21.
- Wheate N.J., Walker S., Craig G.E., Oun R. 2010. The status of platinum anticancer drugs in the clinic and in clinical trials. *Dalton Trans.* 39: 8113–8127.
- Wheeler M.D., Smutney O.M. & Samulski R.J. 2003. Secretion of extracellular superoxide dismutase from muscle transduced with recombinant adenovirus inhibits the growth of B16 melanomas in mice. *Mol Cancer Res* 1, 871–881.
- WHO 2007. *Environmental Health Criteria 237. Principles for evaluating health risks in children associated with exposure to chemicals.* World Health Organization, 2007.
- WHO 2011 *Summary of Principles for Evaluating Health Risks in Children Associated with Exposure to Chemicals.* World Health Organization, 2011.
- Wispe J.R., Clark J.C., Burhans M.S., Kropp K.E., Korfhagen T.R., Whitsett J.A. 1989. Synthesis and processing of the precursor for human manganese-superoxide dismutase. *Biochim Biophys Acta* 994, 30–36.
- Yorifuji T. Kashima S. *Air pollution: another cause of lung cancer.* *The Lancet Oncology*, 14:9; 788-789, 2013
- Zelko I., Mariani T.J. and Folz R.J. 2002. Superoxide dismutase multigene family: a comparison of the CuZn-SOD (SOD1), Mn-SOD (SOD2), and EC-SOD (SOD3) gene structures, evolution and expression. *Free Radic Biol Med.* 33 (3): 337-349.
- Zhao L., O'Neill K. & Diaz Brinton R. 2005. Selective estrogen receptor modulators (SERMs) for the brain: current status and remaining challenges for developing NeuroSERMs. *Brain Res Brain Res Rev* 49, 472-493.

SITOGRAFIA

- www.euro.who.int/parma2010).
- <http://accis.iarc.fr/>
- www.hematologyatlas.com)
- www.anagen.net).
- www.chem.uky.edu; pubs.rsc.org).
- it.wikipedia.org/wiki/Superossido_dismutasi).