

**ALMA MATER STUDIORUM
UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI BOLOGNA**

**Dottorato di Ricerca in
Farmacologia e Tossicologia**

XX ciclo

Coordinatore: Prof. Giorgio Cantelli-Forti

**ISOTIOCIANATI COME POTENZIALI FARMACI
ANTILEUCEMICI: IDENTIFICAZIONE *IN VITRO*
ED *EX VIVO* DEL PROFILO MOLECOLARE E
CELLULARE**

Tesi di Dottorato

SSD: BIO/14

Presentata da:

Dott. Monia Lenzi

Relatore:

Chiar.mo Prof. Giorgio Cantelli-Forti

Anno dell'esame finale: 2008

INDICE

INTRODUZIONE	<i>p. 1</i>
<i>Leucemia Mieloide Cronica</i>	<i>p. 5</i>
<i>Leucemia Mieloide Acuta</i>	<i>p. 12</i>
<i>Leucemia Linfatica Cronica</i>	<i>p. 19</i>
<i>Leucemia Linfatica Acuta</i>	<i>p. 25</i>
<i>Leucemie Acute Ibride o Miste</i>	<i>p. 29</i>
<i>Leucemie Acute Trilineari</i>	<i>p. 30</i>
<i>Leucemie Acute Indifferenziate</i>	<i>p. 30</i>
 <i>Meccanismi alla base dell'attività dei chemioterapici antitumorali: modulazione dell'apoptosi e del ciclo cellulare</i>	 <i>p. 31</i>
 <i>Limiti dell'attuale chemioterapia antitumorale</i>	 <i>p. 35</i>
 <i>Sulforafane</i>	 <i>p. 38</i>
<i>Modulazione degli enzimi di biotrasformazione</i>	<i>p. 38</i>
<i>Protezione del DNA dagli insulti genotossici</i>	<i>p. 41</i>
<i>Effetti citostatici e citotossici</i>	<i>p. 42</i>
<i>Inibizione dell'angiogenesi</i>	<i>p. 44</i>
<i>Inibizione della progressione dei tumori benigni e tumori maligni</i>	<i>p. 44</i>
<i>Inibizione del processo metastatico</i>	<i>p. 45</i>

SCOPO DELLA RICERCA	<i>p. 47</i>
MATERIALI E METODI	<i>p. 50</i>
RISULTATI	<i>p. 60</i>
DISCUSSIONE	<i>p. 79</i>
BIBLIOGRAFIA	<i>p. 87</i>

INTRODUZIONE

La leucemia è un cancro del sangue dovuto ad una proliferazione incontrollata delle cellule del midollo osseo e caratterizzato dall'eccessiva produzione di cellule ematiche, che rimangono in stato immaturo e, quindi, non raggiungono né l'aspetto né le funzioni delle cellule normali. In base alle caratteristiche cliniche e al tipo di cellule coinvolte nel processo tumorale, le leucemie vengono classificate in acute, croniche, mieloidi e linfoide.

Le leucemie acute sono malattie rapidamente progressive, caratterizzate da un decorso rapido e spesso infausto, nelle quali si ha un accumulo di cellule immature a livello del midollo osseo e del sangue periferico. Il midollo osseo infatti, non riesce più a produrre le normali cellule del sangue (eritrociti, leucociti e piastrine) per cui si verifica stato di anemia, piastrinopenia, che può portare al verificarsi di ematomi cutanei e facili sanguinamenti, carenza di leucociti normali, che riduce le capacità dell'organismo di combattere le infezioni.

Le leucemie croniche hanno un decorso più lento e stabile nel tempo, e sono caratterizzate dal progressivo accumularsi nel midollo osseo e nel sangue di cellule relativamente mature, in parte ancora funzionanti.

In linea generale si parla quindi di leucemia mieloide cronica e leucemia mieloide acuta, se la linea cellulare interessata è la mieloide; leucemia linfatica cronica e leucemia linfatica acuta, se la linea cellulare interessata è la linfoide (Guillem e Tormo, 2008).

Le leucemie sono malattie relativamente rare, leggermente più frequenti negli uomini rispetto alle donne. La leucemia linfoide è più frequente nei bambini e nei giovani adulti, le forme mieloidi sono più tipiche dell'età adulta.

Non è noto un agente causale specifico, anche se appare ormai evidente che la malattia leucemica, così come gli altri tumori, costituisce il risultato finale di una complessa serie di eventi, che coinvolgono da un lato l'assetto genetico di un individuo, dall'altro le interazioni di questo con l'ambiente. Numerose sostanze chimiche, quali solventi e coloranti, e le radiazioni ionizzanti, rappresentano fattori di rischio accertati per lo sviluppo di leucemie. Recentemente è stato preso in considerazione l'effetto dell'esposizione ai campi elettromagnetici come altra possibile causa, sebbene non ancora accertata. Al contrario, per quanto alcuni tipi di leucemia spontanea degli animali siano correlati a infezioni di particolari tipi di virus, allo stato attuale delle conoscenze, non esistono indizi che tale modalità di insorgenza si presenti anche nelle leucemie umane. Non essendo nota una causa specifica, non è possibile attuare un piano di prevenzione di questa patologia e non ci sono indagini di screening da poter effettuare come nel caso di alcuni tumori solidi; è importante quindi saperne riconoscere i sintomi.

La diagnosi è sempre preceduta da una corretta rilevazione dei dati clinici del paziente (anamnesi) e da una corretta visita medica, attraverso cui rilevare l'eventuale presenza di linfonodi ingrossati o di un aumento del volume del fegato e della milza. L'esame emocromocitometrico e la valutazione dello striscio del sangue venoso periferico permettono di sospettare la diagnosi di leucemia. L'aspirato midollare e la caratterizzazione immunologica permettono di identificare il tipo di leucemia e anche il tipo di strategia terapeutica da adottare (Guillem e Tormo, 2008).

Emopoiesi

Le cellule ematiche hanno una durata di vita limitata nel sangue circolante e vengono continuamente rinnovate, mediante il processo

dell'emopoiesi nel midollo osseo. Lungo l'intero arco di vita di un individuo il midollo osseo mantiene la capacità di sostituire giornalmente l'enorme numero di cellule ematiche senescenti. Questo processo si fonda sulla presenza di un compartimento di cellule staminali dotate di due caratteristiche fondamentali: automantenimento e capacità di differenziarsi. Queste cellule, funzionalmente eterogenee, sono morfologicamente indifferenziate e rappresentano la cellula staminale pluripotente, capace di generare tutte le cellule mature circolanti nel sangue periferico (Metcalf, 1998). I meccanismi molecolari alla base di questo processo non sono ancora chiari. Tuttavia, è stata identificata una proteina, codificata dal gene SCL (Stem Cell Leukaemia), che, espressa nelle cellule staminali più indifferenziate, agisce come un fattore di trascrizione e gioca un ruolo fondamentale nella differenziazione di tutti i progenitori emopoietici. Il progenitore pluripotente dà origine a cellule dotate di caratteristiche differenti: una si manterrà in stato quiescente impedendo l'esaurimento della quota di progenitori indifferenziati; la seconda andrà incontro a un processo di differenziazione, originando la cellula staminale emopoietica da cui deriveranno un progenitore multipotente e un progenitore linfoide, capostipiti delle diverse filiere ematiche. Questi progenitori sono dotati di minore potenzialità evolutiva e non sono in grado di automantenersi.

Il progenitore multipotente evolve in un precursore comune mieloide, denominato CFU-GEMM (cellula formante colonie miste granulocitarie, eritroidi, mielomonocitarie e megacariocitarie) che, attraverso processi di differenziazione e proliferazione, darà origine a quattro linee cellulari ben definite: la linea granulocitica, la linea eritrocitaria, quella monocitica e quella megacariocitica.

Il progenitore linfoide, a seconda degli stimoli microambientali, può evolvere verso il precursore pre-T, capostipite di tutti i linfociti T e dei linfociti Natural Killer (NK), o verso il precursore pre-B, capostipite di tutti i linfociti B.

I primi stadi dell'emopoiesi risentono del controllo da parte di una serie di fattori di crescita, le cosiddette citochine, sintetizzate e secrete da svariate cellule midollari, stromali e del sistema immunitario, che regolano, in un complesso sistema di cooperazione, la differenziazione e la proliferazione delle cellule progenitrici. Nell'ambito delle citochine, un gruppo di sostanze che svolge un ruolo importante in diversi stadi differenziativi emopoietici è rappresentato dal sistema delle interleuchine. Questo sistema comprende molecole sintetizzate e secrete principalmente da cellule del sistema immunitario (Lord e Dexter, 2000; Oguro e Iwama, 2007).

Mielopoiesi:

Filiera Monocitica-Macrofagica E Granulocitica

Dalla CFU-GEMM si formano le cellule staminali CFU-GM (cellula formante colonie granulomonocitarie), CFU-E (cellula formante colonie eritroidi), CFU-Meg (cellula formante colonie megacariocitarie). Dalle CFU-GM derivano la CFU-M (progenitore di colonie monocitarie) e la CFU-G (progenitore di colonie granulocitarie).

Successivamente, da CFU-M, attraverso varie fasi differenziative e maturative, derivano il monoblasto, il promonocito e il monocito che, passando dal sangue periferico ai tessuti, matura poi a macrofago.

Il primo precursore granulocitario invece, derivato da CFU-G, è il mieloblasto, una cellula non più dotata di staminalità. Dal mieloblasto originano cellule (promielocito e mielocito) che possono dividersi, ma ogni divisione cellulare si accompagna a maturazione, con differenziazione finale a metamielocito senza possibilità di rinnovamento. Il metamielocito, infatti, perde la capacità di dividersi e la sua ulteriore maturazione lo porta a diventare granulocito. Il

granulocita poi, passando dal midollo osseo al sangue periferico, matura a sua volta in granulocita neutrofilo. I granulociti neutrofili proteggono l'organismo da agenti estranei, soprattutto infettivi, esplicando funzioni diverse, concatenate e perfettamente integrate con quelle del sistema monocito-macrofagico e dei linfociti (Oguro e Iwama, 2007).

Un'errata mielopoiesi può causare numerose patologie, che vengono classificate in due grandi gruppi: le sindromi mielodisplastiche e le sindromi mieloproliferative. Le prime sono disordini clonali acquisiti dalla cellula staminale pluripotente, caratterizzati da emopoiesi difettiva e "inefficace" e quindi da un lato cellularità aumentata e dall'altro ridotta produzione di elementi maturi, con conseguenti anemia, neutropenia o piastrinopenia (citopenia periferica); le seconde sono malattie che originano dalla trasformazione neoplastica della cellula staminale pluripotente e sono caratterizzate dalla proliferazione clonale di uno o più progenitori emopoietici nel midollo osseo e in sedi extramidollari. A questo gruppo appartengono la leucemia mieloide cronica e la leucemia mieloide acuta (Parker e Mufti, 1998).

LEUCEMIA MIELOIDE CRONICA (LMC)

La LMC è un disordine dell'emopoiesi, caratterizzato da proliferazione e progressivo accumulo di cellule mature granulocitarie a livello midollare. Essa deriva dalla trasformazione neoplastica della cellula staminale pluripotente, che mantiene però la capacità iniziale di differenziarsi verso la linea dei leucociti.

La LMC è una malattia che ha la massima incidenza tra i 50 e i 60 anni, colpisce prevalentemente il soggetto maschile ed è molto rara nei bambini.

Eziopatogenesi

Non vi sono fattori sicuri in grado di determinare da un punto di vista eziologico tale patologia; l'unico fattore predisponente si pensa possa essere l'esposizione alle radiazioni ionizzanti. Infatti, sebbene non sia noto il meccanismo responsabile della trasformazione neoplastica della cellula staminale nella LMC, numerosi studi dimostrano che, sia nell'uomo sia nell'animale, l'esposizione a radiazioni ionizzanti induce con maggiore incidenza leucemie mielogene (Pane et al., 1996).

Numerose evidenze sperimentali dimostrano che le alterazioni citogenetiche, che si riscontrano nelle cellule trasformate, rivestono un ruolo importante nella patogenesi del processo leucemico. In particolare, nelle sedi di rottura cromosomica (breakpoint) sono stati identificati alcuni specifici protooncogeni. Nel 95% dei casi di LMC è stata dimostrata la presenza del cromosoma Philadelphia (Ph), derivato dalla traslocazione reciproca delle braccia lunghe del cromosoma 9 e di una parte delle braccia lunghe del cromosoma 22. Questa traslocazione porta sia alla formazione di un cromosoma 22 di dimensioni ridotte, denominato Philadelphia, sia alla formazione di un nuovo gene (Pane et al., 1996). Tale gene deriva dalla fusione di un protooncogene cellulare, denominato Abelson (ABL), sito nel cromosoma 9, con le sequenze geniche situate in un ristretto segmento delle braccia lunghe del cromosoma 22, denominato appunto Breakpoint Cluster Region (BCR), poiché in tale punto avvengono con maggiore incidenza rotture cromosomiche. Il segmento BCR è sito a livello della porzione mediana di un gene di 130 Kb, designato come "gene BCR". Per effetto della rottura del segmento BCR, la porzione 5 del gene BCR viene a giustapporsi in corrispondenza delle sequenze di DNA traslocate dell'oncogene ABL, creando alla fine un gene chimerico BCR-ABL a livello del cromosoma 22 (Pane et al., 1996). Questo gene di fusione ibrido

codifica per la formazione di un mRNA che produce una fosfoproteina di 210 KD (p210) con una notevole attività tirosinchinasica. Ciò si traduce in un'iperattività enzimatica della tirosinchinasi e quindi deregolazione della proliferazione cellulare. Piccole differenze nella localizzazione dei punti di rottura nella regione BCR possono causare modificazioni nella sequenza di aminoacidi della proteina di fusione codificata. In particolare, la p210 sembra essere correlata ad un difetto della differenziazione granulocitaria (mielociti-metamielociti), la p230 porterebbe ad un'esuberante produzione di granulociti neutrofili, la p190 si associa più facilmente a monocitosi e basofilia (Melo, 1996).

In base alle conoscenze attuali non è possibile stabilire se la traslocazione Ph sia il primo evento trasformante nella LMC direttamente responsabile dell'incontrollata proliferazione della cellula staminale Ph+. È probabile che un evento *random* conferisca alla cellula staminale Ph+ un vantaggio proliferativo. Il meccanismo con cui si verifica la traslocazione Ph non è comunque noto. Le ricombinazioni tra ABL e BCR sono chiaramente favorite dalla grandezza di questi geni, ma soltanto alcune configurazioni sono in grado di produrre la proteina p210, capace di indurre un vantaggio selettivo di crescita nel clone neoplastico (Melo, 1996).

Aspetti diagnostici e prognostici

Il decorso naturale della malattia è formato da quattro fasi più o meno distinte tra loro:

- una fase iniziale asintomatica, preclinica, in cui la leucocitosi è modesta e non è evidente splenomegalia;
- una fase cronica, caratterizzata da specifiche anomalie cromosomiche e molecolari, durante la quale gli elementi mieloidi incrementano in numero assoluto e percentualmente, si nota un'elevata granulocitosi periferica e un'espansione del

compartimento mieloide, con un midollo ipercellulare ricco di elementi differenziati (i blasti presenti nel midollo sono meno del 5%), la leucocitosi è spiccata e la splenomegalia evidente. Questa fase è sintomatica e solitamente responsiva a vari trattamenti;

-una fase accelerata, caratterizzata da febbre, anemia e piastrinopenia e refrattarietà ai trattamenti standard (i blasti presenti nel midollo sono più del 5% ma meno del 30%, e meno del 5% nel sangue periferico). In circa il 70% dei casi la fase accelerata evolve naturalmente nella crisi blastica (Syed et al., 2006).

Questa è definita anche fase terminale o fase aggressiva. Il progressivo arresto della maturazione e/o differenziazione porta ad un incremento dei blasti periferici e midollari, con manifestazioni simili a quelle delle leucemie acute (la percentuale di blasti è superiore al 30% nel midollo e al 5% nel sangue periferico). La durata della crisi blastica è breve, in genere mesi, e si conclude nel 90% dei casi con la morte del paziente. La riconversione a seguito della terapia della crisi blastica nella fase cronica di malattia è osservabile in alcuni casi e in particolare nelle crisi blastiche di tipo linfoide.

Ci sono poi varie condizioni che possono influenzare il decorso della malattia, quali l'età >60 anni, le dimensioni della milza, il livello dei blasti midollari e periferici, etc. Diversi sono stati i gruppi che hanno studiato l'importanza di fattori prognostici nella LMC, ma uno dei più noti e ancora in uso è quello di Sokal (Sokal et al., 1984), che considera 4 parametri: l'età, le dimensioni della milza, il livello di piastrine e la percentuale di blasti nel sangue periferico. Si riescono a distinguere così 3 categorie di pazienti (a basso, intermedio ed alto rischio), caratterizzati da sopravvivenza diversa (Syed et al., 2006).

Trattamento farmacologico

Molti farmaci antiblastici tradizionali sono in grado di controllare la splenomegalia e la leucocitosi, eliminando o riducendo i segni clinici soggettivi e contribuendo a migliorare la qualità di vita del paziente.

Tra gli antiblastici utilizzati il busulfano possiede una tossicità accettabile e soprattutto in passato era molto utilizzato. In caso di trattamento prolungato il busulfano può causare mielodepressione, fibrosi polmonare, cataratta e displasia dell'epitelio vescicolare; inoltre il farmaco, pur migliorando lo *status* del paziente, non ritarda la crisi blastica (Fausel, 2007).

Altri agenti chemioterapici ciclo- e fase cellulare-specifici (idrossiurea, 6-mercaptopurina, 6-tioguanina) sono utilizzati perché in grado di ridurre la massa neoplastica in modo abbastanza rapido. Tra questi l'idrossiurea, inibitore specifico della sintesi del DNA, è il farmaco più comunemente utilizzato, anche se è necessaria una terapia di mantenimento più o meno ciclica per consentire la stabilizzazione della risposta ematologica, che si valuta esaminando se nel sangue i valori delle piastrine e dei globuli bianchi sono normali, se sono assenti granulociti immaturi e se i basofili sono inferiori al 5%.

Gli effetti collaterali più frequenti sono costituiti dalla alopecia, dalla pigmentazione cutanea e dalla comparsa di atrofia e secchezza cutanea e mucosa (Fausel, 2007).

Protocolli chemioterapici intensivi, analoghi a quelli utilizzati per le leucemie acute (associazione di un antraciclinico con citarabina o tioguanina) sono stati proposti nel tentativo di eradicare il clone neoplastico Ph+. La risposta citogenetica, si valuta determinando la quantità di cellule positive per il cromosoma Ph e può variare da completa (assenza di cellule positive) ad assente (95% di cellule positive). Con la terapia intensiva si è riusciti a ottenere una remissione citogenetica completa o parziale nel 30% dei casi, ma di

durata transitoria e con rischio di decesso per tossicità nel 10% dei casi trattati.

L'introduzione da circa 15 anni degli interferoni (IFN) nel trattamento delle sindromi mieloproliferative croniche e in particolare della LMC, ha permesso di osservare una riduzione della quota granulocitaria. È possibile quindi che gli IFN consentano un allungamento della fase cronica in alcuni pazienti. Gli effetti tossici collaterali quali ipertermia, mialgia, astenia, alopecia sembrano accettabili ed alcuni di questi riducibili con l'uso del paracetamolo. Altri effetti quali la marcata piastrinopenia, la leucopenia e la neurotossicità spesso impongono la sospensione del trattamento (Hasford et al., 1998).

L'associazione dell'IFN alla citarabina ha prodotto risultati soddisfacenti. Sembra infatti che tale associazione induca una risposta maggiore. Tuttavia anche gli effetti tossici della combinazione sono superiori rispetto alla sola somministrazione di IFN. Altre associazioni, quali IFN e acido all-transretinoico, sono state utilizzate nel tentativo di indurre una costante maturazione delle linee granulocitarie e contemporaneamente inibire la proliferazione dei blasti Ph+ (Hasford et al., 1998).

Recentemente, l'introduzione nella terapia della LMC di inibitori dell'attività tirosinchinasica ha rivoluzionato le strategie terapeutiche di tale patologia. In particolare, un derivato fenilaminopirimidinico, denominato STI-571 (Signal Transduction Inhibitor), agisce inibendo l'attività tirosinchinasica di BCR-ABL, mediante un meccanismo di blocco dell'ATP. L'STI-571 lega l'ATP disponibile nel dominio specifico della chinasi BCR-ABL, impedendo la fosforilazione di altri substrati e bloccando la cascata di reazioni che sarebbero responsabili del processo di leucemogenesi. La tossicità di questa molecola è soprattutto a livello epatico, dell'apparato gastroenterico e del sistema nervoso (Marley et al., 2000).

L'STI-571, denominato imatinib mesilato, ha avuto l'approvazione del FDA nel 2001. Novartis lo ha commercializzato con il nome di

Gleevec, impegnandosi a monitorarne l'efficacia anche dopo l'immissione in commercio, per definire la durata della risposta al trattamento e la sopravvivenza dei pazienti (Cohen et al., 2005). L'imatinib, ormai farmaco di prima scelta nella LMC, ha dimostrato piena efficacia con risposte ematologiche che arrivano ad oltre il 95% dei pazienti. Le risposte citogenetiche sono dell'ordine del 80% nei casi di nuova diagnosi. Questa terapia è correlata a scarsa tossicità ed è generalmente tollerata anche dai pazienti anziani. Gli effetti collaterali più evidenti sono dolori muscolari a tipo crampi, ritenzione di liquidi con aumento del peso, edemi periorbitali, congiuntiviti e rash cutanei, risolvibili con la sospensione momentanea del farmaco o la riduzione del dosaggio. Non sono ancora disponibili risultati a lungo termine che consentano di stabilire la durata della terapia; risultati contrastanti sono stati osservati sospendendo il farmaco, ma generalmente viene riportata una perdita della risposta citogenetica e un ritorno alla risposta quando si riprende il farmaco. Mancano dati sulla possibilità di utilizzare con vantaggio terapie di salvataggio con interferone o con il trapianto di midollo osseo, nei pazienti che recidivano dopo sospensione del farmaco o che non rispondono più al farmaco (Moen et al., 2007).

Sono stati, infatti, riportati fenomeni di resistenza all'imatinib, più frequenti in fase avanzata di malattia, e tale fenomeno è associato a mutazioni puntiformi nel sito di legame della molecola o a evoluzioni clonali con presenza di alterazioni citogenetiche aggiuntive. Sono note più di 30 mutazioni, riconoscibili con metodiche che utilizzano apparecchiature cromatografiche e diversi sono gli approcci terapeutici per superare tali meccanismi di resistenza, come aumentare il dosaggio del farmaco, combinare il Gleevec con altri farmaci, o utilizzare altri inibitori.

Nuove molecole sono in fase sperimentale per superare la resistenza verso il Gleevec di alcuni pazienti, che sfruttano sempre il razionale di interagire con il sito di legame dell'imatinib, che sono trenta volte

più potenti (AMN107) o si legano anche ad altre molecole (SRC) (Moen et al., 2007).

LEUCEMIA MIELOIDE ACUTA (LMA)

La LMA è una sindrome neoplastica, che origina dal coinvolgimento della cellula staminale emopoietica ed è caratterizzata da un'alterata proliferazione e differenziazione della stessa e delle linee cellulari derivanti mieloide (granulocitaria e monocitaria) e/o eritroide e megacariocitaria. Le cellule leucemiche si accumulano abnormemente nel midollo osseo determinando un'alterazione o una soppressione della differenziazione e proliferazione delle normali cellule emopoietiche. Ne deriva una compromessa produzione di eritrociti (anemia), granulociti (neutropenia) e piastrine (trombocitopenia) normali. Successivamente i blasti invadono il sangue periferico, infiltrando in diversi organi. La LAM si può presentare in qualsiasi età, ma la sua frequenza aumenta con l'aumentare dell'età stessa. Le LAM infatti, costituiscono la quasi totalità delle leucemie acute dell'anziano (Owen et al., 2008)

Eziopatogenesi

Le cause della LAM non sono note. È probabile che per lo sviluppo di una leucemia acuta sia necessario il concorso di vari fattori. Gli studi di biologia molecolare hanno consentito di definire alcune alterazioni molecolari rilevabili nelle cellule emopoietiche. Varie alterazioni, interferendo nelle funzioni di alcuni oncogeni, consentono di trasformare alcune cellule in elementi neoplastici. Questi geni codificano per alcune proteine direttamente connesse ai normali processi di proliferazione e differenziazione. Molti oncogeni, ad esempio, codificano per una proteinchinasi, il cui compito principale è

quello di fosforilare alcune proteine cellulari, responsabili della trasmissione cellulare all'interno della cellula stessa di segnali proliferativi e differenziativi.

Diverse osservazioni fanno ipotizzare l'esistenza di una predisposizione genetica alla leucemia acuta: l'associazione di LA con ben determinate sindromi ereditarie come quella di Down, la sindrome di Bloom, l'anemia di Fanconi; l'elevata frequenza con cui gemelli omozigoti si ammalano entrambi di leucemia acuta e l'aumentata incidenza di leucemia in alcune famiglie cosiddette ad alto rischio (Owen et al., 2008).

Aspetti diagnostici e prognostici

Le LAM sono etichettate come leucemie *de novo* quando insorgono come prima malattia in pazienti senza importanti precedenti anamnestici, e leucemie acute *secondarie* quando insorgono in pazienti con pregressa esposizione a sostanze chimiche (pesticidi), farmaci o radiazioni. Alcune LAM possono svilupparsi in pazienti con pregresse malattie ematologiche, in particolare sindromi mieloproliferative croniche o mielodisplasie, in pazienti con malattia di Hodgkin o con linfomi maligni non-Hodgkin trattati con chemioterapia o radioterapia. Da molto tempo sono note anche le LAM secondarie all'esposizione a radiazioni e alcune sostanze chimiche: il benzene e il suo analogo toluene, sono considerate sostanze causali per lo sviluppo di leucemie acute; tra i farmaci impiegati nelle polichemioterapie antitumorali, quelli alchilanti sembrano poter indurre più facilmente LAM secondarie.

Parte rilevante di questa distinzione tra leucemie *de novo* e leucemie secondarie sono le alterazioni citogenetiche, che rappresentano un preciso riferimento classificativo. Numerose anomalie cromosomiche sono state e continuano a essere identificate; i geni coinvolti in molte

alterazioni sono stati clonati e tutto ciò contribuisce sia alla comprensione dei meccanismi coinvolti nella leucemogenesi, sia all'identificazione di target per nuove strategie terapeutiche. La caratterizzazione molecolare delle anomalie cariotipiche ha consentito di identificare marker specifici di diversi citotipi, con implicazioni diagnostiche e prognostiche. Le caratteristiche del cariotipo alla diagnosi rappresentano un importante fattore prognostico.

I seguenti criteri sono attualmente impiegati per classificare le LAM:

Criteri morfologici: colorazioni panottiche di strisci di sangue periferico e di midollo osseo.

Criteri citochimici: evidenza di attività enzimatiche e presenza di particolari sostanze ritenute specifiche per alcuni tipi cellulari.

Criteri immunofenotipici: evidenza di marker di superficie e citoplasmatici più o meno specifici per alcuni stadi di differenziazione cellulare, mediante impiego di anticorpi monoclonali.

Criteri citogenetica: presenza di specifiche anomalie cromosomiche.

Abitualmente la LAM è classificata in otto varianti secondo lo schema FAB (French-American-British) che utilizza principalmente i criteri morfologici, citochimici e immunofenotipici:

LAM M0: i blasti sono morfologicamente molto indifferenziati e la diagnosi si effettua sull'espressione di antigeni mieloidi, l'assenza di marcatori linfoidei e la negatività delle reazioni citochimiche.

LAM M1: forma senza maturazione, non si associa a caratteristiche peculiari citochimiche e fenotipiche. E' stata riportata una associazione con la trisomia del cromosoma 8.

LAM M2: rappresenta il 20-30% delle LAM; è una forma mieloide con segni di maturazione e tipicamente riconoscibile all'osservazione microscopica per la presenza di numerose granulazioni citoplasmatiche. Si associa tipicamente all'alterazione cromosomica t(8;21) (traslocazione tra i cromosomi 8 e 21), che molecularmente determina un marker molecolare chiamato AML1/ETO.

LAM M3: rappresenta il 3-10% delle LAM. E' definita come leucemia acuta promielocitica. I blasti possono produrre molecole in grado di determinare ed attivare un meccanismo di coagulazione intravasale disseminata (CID) ed una imponente sindrome emorragica. E' la forma più caratterizzata molecularmente e per la quale notevoli progressi nel campo della terapia sono stati fatti: è associata ad una tipica traslocazione cromosomica t(15;17) e ad una mutazione molecolare detta PML/RAR alfa, e risponde ad un terapia con acido all-trans-retinoico, che porta a maturazione i promielociti leucemici.

LAM M4: rappresenta il 10-15% delle LAM; si osservano 2 tipi di blasti leucemici, uno dei quali ha le caratteristiche della cellula monocitaria. Ha la particolare tendenza ad infiltrare organi extramidollari, quali milza e gengive.

LAM M5: si distingue dalla precedente perchè la quasi totalità delle cellule ha aspetto monoblastico. E' caratterizzata sul piano biologico da una elevata attività proliferativa, con possibile interessamento extramidollare. Si associa ad alcune alterazioni citogenetiche quali quelle che coinvolgono la banda cromosomica 11q23.

LAM M6: eritroleucemia, meno frequente come leucemia *de novo* e molto più frequente come evoluzione da sindrome mielodisplastica. I blasti sono altamente anomali e possono essere distinti fenotipicamente dall'espressione del CD42. Si possono associare alterazioni citogenetiche complesse.

LAM M7: rappresenta il 3% delle leucemie acute. E' definita come megacarioblastica per la derivazione dei blasti dai megacariociti. Esprime sulla membrana l'antigene CD41, tipico delle glicoproteine di membrana delle piastrine. Citogeneticamente possono essere presenti alterazioni del cromosoma 3. Spesso richiede come elemento diagnostico la biopsia ossea, per la fibrosi midollare spesso intensa che impedisce la normale esecuzione dell'aspirato midollare (Bene et al., 1995; Liso, 1992)

La prognosi della leucemia mieloide acuta dipende dall'età, dalle patologie associate che complicano la terapia e da alcune caratteristiche biologiche sfavorevoli (precedente sindrome mielodisplastica, alcune alterazioni citogenetiche etc.). Tra i fattori prognostici si riconoscono: 1) l'età (prognosi sfavorevole con età superiore ai 60 anni); 2) le alterazioni citogenetiche che consentono di definire gruppi a prognosi favorevole [es. t(8;21)] e gruppi a prognosi sfavorevole [es. t(6;9), 11q23 (gene MLL)]; 3) un alto numero di leucociti all'esordio, associato a riduzione della percentuale di risposte complete alla terapia di induzione e ad alta frequenza di recidive; 4) alcuni sottotipi FAB, come M0, M6 o M7, sono associati a prognosi peggiore; 5) la presenza della proteina MDR-1 (multidrug resistance), associata a resistenza al trattamento con alcuni farmaci chemioterapico (Mrozek et al., 2000).

Trattamento farmacologico

La terapia della LAM si basa principalmente sull'impiego di chemioterapia citotossica e sul possibile trapianto di midollo osseo dopo chemioterapia.

La chemioterapia ha la finalità di eradicare la malattia, per consentire alle cellule staminali di ripopolare il midollo. Si parla di remissione completa, quando la quota di blasti scende sotto il 5% della

popolazione midollare totale valutabile. A differenza delle leucemie acute linfoide, in cui vengono utilizzati dei protocolli terapeutici differenziati per i pazienti in età pediatrica o più o meno intensificati a seconda dei fattori di rischio, per le leucemie acute mieloidi i protocolli sono uguali sia per gli adulti che per i bambini (Cassileth et al., 1998). Quindi nonostante l'eterogeneità delle forme, ad eccezione della leucemia acuta promielocitica che ha un protocollo di terapia differente, per gli altri tipi si usano dei protocolli standardizzati per i giovani e per gli anziani. La prima chemioterapia si chiama di induzione ed è generalmente basata sull'impiego di due farmaci (citarabina ed un agente intercalante) che, usati ad alte dosi, permettono una rapida distruzione dei cloni leucemici resistenti ed impediscono l'emergenza di recidive precoci, così da ottenere una migliore qualità della remissione completa. Una volta ottenuta la remissione completa, il paziente viene candidato ad una terapia post-remissionale detta di consolidamento.

Nuovi approcci farmacologici sono possibili e attualmente in uso sperimentale, come gli agenti che promuovono la differenziazione (azacitidina), o gli inibitori del segnale di traduzione, come anti-FLT3, che si sono dimostrati utili, se usati singolarmente, nel ridurre la percentuale di blasti periferici, ma non nell'indurre remissioni complete (Ravandi et al., 2007).

Anche l'immunoterapia, che prevede ad esempio l'utilizzo di anti-CD33, è risultata efficace soprattutto nei pazienti anziani (Rao e Schmader, 2007).

Il paziente, dove possibile, viene candidato ad una procedura trapiantologica (età <60 anni) o ad una terapia di mantenimento (età >60 anni). La procedura trapiantologica in prima remissione può essere legata ad un trapianto di midollo allogenico da donatore compatibile o ad un autotrapianto di midollo (Cassileth et al., 1998).

Linfopoiesi

I linfociti T e B derivano da una cellula staminale comune, commissionata in senso linfoide e situata nel tessuto emopoietico midollare. Le fasi successive di maturazione tuttavia si delineano in maniera differente: inizialmente nel midollo osseo, poi a livello timico per i linfociti T e ancora midollare per i B, e infine a livello degli organi linfoidi periferici, dove i linfociti T e B colonizzano aree specifiche ma ben diversificate, che vengono raggiunte attraverso il circolo ematico o linfatico (Oguro e Iwama, 2007).

In particolare, il processo differenziativo del linfocito B può essere suddiviso in due tappe successive: la prima di differenziazione centrale o midollare, (denominata antigene-indipendente), la seconda di differenziazione secondaria o periferica (chiamata antigene-dipendente) che si svolge negli organi linfoidi periferici (milza, linfonodi ecc.) . Durante la prima fase si passa dallo stadio pro-B, al common B e al pre-b, fino a formare il cosiddetto linfocita immaturo o vergine, così chiamato in quanto ancora tollerante nei confronti degli stimoli antigenici; durante la seconda fase si ha lo sviluppo a linfocita B maturo, passando attraverso lo stadio di linfocita intermedio non più tollerante nei confronti degli stimoli antigenici. L'ontogenesi del linfocita B si conclude con la trasformazione immunoblastica che prelude alla formazione della plasmacellula matura (Uckun, 1990).

L'iter differenziativo del linfocita T, invece, si compie in tre fasi: una fase midollare o pro-T, una fase timica o pre-T in cui il timocito immaturo evolve a timocito corticale, e infine una fase periferica durante la quale i linfociti T timici acquisiscono sia dal punto di vista funzionale sia dal punto di vista fenotipico le caratteristiche del linfocito T maturo circolante (Terstappen et al., 1992).

Un incremento del numero assoluto dei linfociti del sangue periferico al di sopra dei valori di normalità può osservarsi in numerose

patologie infettive, soprattutto di natura virale. In questi casi la funzionalità dei linfociti non risulta alterata e gli studi immunofenotipici e genotipici documentano la natura policlonale della proliferazione. Si parla in questi casi di linfadenopatie reattive, diversamente dalle forme linfoproliferative (croniche o acute), caratterizzate dall'espansione di un clone linfocitario relativamente differenziato (Oguro e Iwama, 2007).

LEUCEMIA LINFATICA CRONICA (LLC)

La LLC è una sindrome linfoproliferativa cronica acquisita, di natura monoclonale, caratterizzata dall'espansione di piccoli linfociti apparentemente maturi, ma immunologicamente non funzionanti, che si accumulano nel sangue periferico, nel midollo osseo e negli organi linfatici e più raramente in sedi extralinfatiche.

La LLC è la forma di più frequente osservazione nei Paesi occidentali a sviluppo industriale e rappresenta il 25-35% di tutte le leucemie umane, con un'incidenza annua di 5-15 casi ogni 100,000 abitanti; essa colpisce con maggiore frequenza il sesso maschile e predilige soggetti anziani di età superiore ai 50 anni (Chen e McMillan, 2007).

Eziopatogenesi

L'eziologia è sconosciuta. Esiste una predisposizione genetica, per cui la prevalenza di LLC o di altre sindromi linfoproliferative croniche risulta nettamente aumentata nell'ambito di alcune famiglie.

I principali fattori leucemogeni non sembrano influire sulla insorgenza di LLC.

Dati recenti hanno contribuito a chiarire la natura della popolazione linfoide responsabile della LLC: le cellule patologiche della LLC sono costituite da piccoli linfociti che presentano gli stessi marcatori delle

cellule B mature presenti nella zona mantellare dei follicoli secondari. I linfociti della LLC sono inoltre caratterizzati dall'assenza o da difettosa apoptosi (correlata ad espressione di bcl-2), per cui tendono ad accumularsi in vari distretti dell'organismo per effetto di una prolungata sopravvivenza (Chen e McMillan, 2007).

In accordo con gli studi di biologia molecolare che hanno dimostrato come soltanto una metà circa dei pazienti con LLC presentino mutazioni somatiche dei geni per le immunoglobuline (Ig), sono state prospettate due possibili forme di LLC: una derivante da cellule pregerminali o *naive*, che non mostrano mutazioni dei geni Vh delle Ig, e l'altra derivante da una cellula B-memoria che mostra mutazioni nella regione dei geni Vh delle Ig. Vi sarebbero anche differenze morfologiche fra queste due forme, con espressione di elementi linfoidei atipici nelle forme con Vh mutato, e cliniche, in particolare con decorso più aggressivo nelle forme con regione Vh non mutata (Chen e McMillan, 2007).

Nel 95% dei casi la proliferazione leucemica interessa un singolo clone linfocitario B (B-LLC); solamente nel 5% dei casi la LLC risulta di natura T-linfocitaria (T-LLC).

Nella B-LLC la natura monoclonale della proliferazione è dimostrata dal carattere omogeneo delle immunoglobuline di superficie sintetizzate dai linfociti leucemici.

Anomalie cromosomiche clonali sono dimostrabili, mediante indagine citogenetica convenzionale, nel 40-50% dei pazienti affetti da LLC. La trisomia 12 è rinvenibile nel 25% dei casi e si ignora a quale difetto genico possa associarsi. Delezioni del braccio lungo del cromosoma 13, coinvolgenti quasi invariabilmente la banda q14, risultano visualizzabili nel 10-15% dei pazienti. Altre anomalie di rilievo sono la delezione del braccio lungo dei cromosomi 6 e 11 e la delezione del braccio corto del cromosoma 17. È importante sottolineare come la regione comune più frequentemente deleta a livello delle braccia lunghe del cromosoma 11 consista in un segmento di DNA di 2-3

megabasi dove è mappato il gene mutato ATM. La proteina codificata dal gene ATM è coinvolta verosimilmente nei segnali di apoptosi in risposta a danneggiamenti del DNA e non è sorprendente che i pazienti affetti dimostrino un'instabilità cromosomica e una notevole predisposizione a sviluppare neoplasie linfoidi (Chen e McMillan, 2007).

Aspetti diagnostici e prognostici

In un'elevata percentuale dei casi la malattia viene diagnosticata fortuitamente.

La diagnosi di LLC è di facile esecuzione e si basa sulla presenza nel sangue periferico di un numero elevato di linfociti. Secondo i criteri codificati dal gruppo FAB, una condizione prioritaria per porre diagnosi di LLC è rappresentata dalla presenza di elementi linfocitari atipici (prolinfociti, immunoblasti e linfoblasti) inferiore al 10% nella formula leucocitaria.

L'analisi dell'agoaspirato midollare pone in evidenza un'infiltrazione linfocitaria variabile tra il 40% e il 95% della cellularità totale.

I linfociti leucemici possono infiltrare tutti gli organi e i tessuti; più frequentemente però sono coinvolti i cosiddetti organi linfatici. L'esame istologico midollare dimostra un infiltrato costituito prevalentemente da piccoli linfociti, che assume quattro configurazioni principali: nodulare, diffuso, interstiziale e misto. La forma diffusa è associata agli stadi clinici avanzati e rappresenta un fattore prognostico negativo in corso di LLC. I linfonodi sono infiltrati diffusamente da piccoli linfociti, la milza è di volume aumentato come il fegato. Tra gli organi più frequentemente coinvolti dalla malattia ci sono la cute, il sistema linfatico dell'apparato respiratorio, il tratto gastroenterico, le ghiandole salivari e lacrimali, il SNC (Hallek et al., 2008).

La determinazione dell'immunofenotipo permette la caratterizzazione dei linfociti; infatti la LLC esprime come antigeni di superficie il CD19, il CD20, il CD23, il CD52 ecc. Le cellule B della LLC esprimono inoltre bassi livelli di immunoglobuline di membrana (se comparati ai normali linfociti B) (Hallek et al., 2008).

Il decorso clinico e la sopravvivenza dei pazienti affetti da LLC sono assai variabili e spesso imprevedibili: alcuni soggetti rimangono asintomatici e non richiedono alcun trattamento per diversi anni, mentre altri presentano linfadenomegalia, epatosplenomegalia, anemia e trombocitopenia con un andamento clinico aggressivo e difficilmente controllabile con la terapia.

Sulla base dei dati ematologici e di alcuni parametri clinici Rai e coll. hanno proposto nel 1975 una classificazione della LLC in 5 stadi, a ognuno dei quali corrisponde una prognosi differente:

Stadio 0: linfocitosi assoluta senza evidenza di epatosplenomegalia, di linfadenopatia o di anemia e piastrinopenia

Stadio I: linfocitosi assoluta e linfadenopatie

Stadio II: linfocitosi assoluta con epato-splenomegalia con o senza adenopatie. Stadio III: linfocitosi assoluta con anemia

Stadio IV: linfocitosi assoluta e piastrinopenia

Binet e coll. hanno elaborato successivamente nel 1980 un sistema classificativo in tre stadi clinici, in cui gli stadi I e II, e III e IV di Rai vengono raggruppati in due soli stadi.

Queste due classificazioni, pur essendo le stadiazioni di maggior utilizzo nella pratica clinica, hanno dei limiti, come quello di non individuare nei pazienti a stadio iniziale quelli con possibile rapida evoluzione. Per tale motivo sono stati esplorati numerosi fattori prognostici clinici e biologici. Con metodiche di citogenetica avanzate, sono così stati identificati alcuni fattori: i pazienti con

cariotipo normale o delezione del cromosoma 13 hanno una prognosi favorevole, mentre i pazienti con delezione dei cromosomi 17 e 11 hanno una prognosi sfavorevole. Tra i fattori biologici sono stati identificati: l'espressione mutata o non dei geni che regolano la produzione delle immunoglobuline, l'espressione di una proteina chiamata ZAP-70, generalmente espressa dalle cellule linfoidi T normali, l'espressione di alcuni antigeni di superficie come il CD38, l'espressione dell'oncogene p53 (Dighiero e Binet, 2000; Doehner et al., 2000).

Trattamento farmacologico

Il trattamento della LLC deve tener conto dei fattori di rischio presenti al momento della diagnosi. La terapia citostatica è per esempio indicata solamente nei pazienti a rischio intermedio e in stadio clinico 0 ma con segni di progressione clinica. I pazienti a basso rischio generalmente non devono essere trattati con farmaci citostatici, ad eccezione di coloro che rientrano nelle seguenti categorie: leucocitosi marcata, tempo di raddoppiamento linfocitario inferiore a un anno, presenza di sintomi sistemici quali febbre, calo ponderale, ecc.. In questi casi, dopo un periodo di follow-up di qualche mese, se intervengono segni clinici di progressione, si instaura un trattamento con fludarabina (Dighiero e Binet, 2000). I pazienti a rischio intermedio, qualora non presentino segni clinici di una certa entità, devono essere tenuti in osservazione per 4-6 mesi o più. Se la malattia manifesta segni di progressione (aumento delle adenopatie e splenomegalia), si deve instaurare una terapia, che varia a seconda del quadro clinico. La terapia di scelta è rappresentata dalla somministrazione di fludarabina per pazienti di età inferiore ai 65 anni e dalla combinazione clorambucile-steroidi nei pazienti con età superiore ai 65 anni.

I pazienti ad alto rischio devono essere trattati con combinazioni polichemioterapiche. In alternativa si può impiegare la fludarabina.

Il fine della terapia comunque non è mai quello di eradicare la malattia ma solo di contenere la leucocitosi e il coinvolgimento degli organi linfatici. La radioterapia total body delle stazioni linfoghiandolari è indicata in meno del 5% dei pazienti; il trapianto allogenico è proponibile nei soggetti di giovane età con malattia disseminata (Dighiero e Binet, 2000).

Recentemente sono state utilizzate con discreto successo altre modalità di trattamento come l'infusione endovenosa di anticorpi monoclonali murini (ATM Mo), ma questi trattamenti devono essere considerati in fase sperimentale. I principali fattori limitanti sono rappresentati dalle reazioni allergiche, dallo sviluppo di anticorpi neutralizzanti da parte dell'ospite, dalla difficoltà da parte degli anticorpi di raggiungere tutti i tessuti infiltrati e di eliminare la totalità delle cellule leucemiche, qualora vi sia un'eterogeneità fenotipica. Parte di questi effetti sembrano essere evitati impiegando anticorpi monoclonali umanizzati, ottenuti da animali transgenici (es. il CAMPATH-1H anti-CD52). Anche l'uso di un anticorpo anti-CD20 (Rituximab) appare essere utile nella riduzione delle masse linfadenopatiche e nel controllo della malattia in pazienti le cui cellule esprimano questo marcatore (Hallek et al., 2008).

LEUCEMIA LINFOBLASTICA ACUTA (LLA)

La LLA rappresenta un disordine clonale neoplastico originato da progenitori linfoidei nel midollo, nel timo e nei linfonodi. Circa l'80% delle LLA costituiscono proliferazioni maligne della filiera B, mentre il

20% comprende quadri derivanti dal coinvolgimento di precursori della filiera T.

La LLA rappresenta l'80% delle leucemie nei bambini e nei giovani sotto i 15 anni mentre rappresenta il 20% delle forme leucemiche dell'adulto.

Eziopatogenesi

L'eziologia è sconosciuta. Vi sono tuttavia alcune condizioni morbose, come la sindrome di Fanconi e la sindrome di Bloom, strettamente associate e tali da incrementare il rischio di sviluppo di questa malattia. Il rischio è anche aumentato in soggetti esposti a sostanze chimiche, quali il benzolo, o che abbiano avuto precedenti trattamenti citostatici (Pui e Evans, 1998).

La classificazione FAB ha distinto tre principali forme di LLA in base alle caratteristiche nucleocitoplasmatiche degli elementi leucemici:

-L1: è costituita da blasti uniformemente piccoli, con scarso citoplasma e costituisce la forma prevalente nei giovani sotto i 15 anni di età.

-L2: risulta invece contrassegnata da elementi blastici più grandi, di dimensioni variabili, con contorno irregolare dei nuclei contenenti evidenti nucleoli.

-L3: variante in cui i blasti sono generalmente di grandi dimensioni, relativamente omogenei, con citoplasma intensamente basofilo vacuolizzato.

L'analisi citogenetica delle LLA ha rivelato la presenza di aberrazioni cromosomiche clonali nel 90% dei pazienti, con alcune differenze di frequenza nelle forme infantili rispetto a quelle dell'adulto. Dal punto di vista numerico, il 30-50% delle forme di LLA presenta un cariotipo pseudodiploide, il 30% iperdiploide, il 20% normale. Non vi è stretta correlazione fra queste aberrazioni e il fenotipo ad eccezione di alcune anomalie strutturali che ricorrono nelle rare forme di L3.

Tuttavia la t(1;19) è frequentemente associata alle LLA di tipo pre-B con morfologia L1 e la t(4;11) è particolarmente comune nei casi di LLA congenita. Infine la t(9;22) (Ph) è comune a molte forme di LLA di derivazione B precoce. Particolare importanza riveste questa traslocazione, che dà luogo a una rottura nella regione bcr del gene BCR del tutto simile a quella della classica LMC nel 50% dei casi. Nel rimanente 50% dei casi il punto di rottura sul gene BCR è situato più prossimamente rispetto a quanto avviene nella LMC. Il gene di fusione così costituito dà luogo alla formazione di una proteina di 190 kD diversa da quella classica della LMC di 210 kD, consentendo una differenziazione su base molecolare delle LLA Ph+ dalle crisi blastiche linfoidi della LMC (Cuneo et al., 1998; Benè et al., 1999).

Aspetti diagnostici e prognostici

La maggior parte dei pazienti manifesta astenia, pallore, tachicardia conseguente all'anemia, infezioni ricorrenti prolungate per effetto della neutropenia, comparsa di petecchie e manifestazioni emorragiche per la pistrinopenia. Il midollo osseo si presenta generalmente infiltrato in maniera cospicua da parte dei blasti.

Nell'ambito delle LLA il coinvolgimento del SNC si osserva alla diagnosi nel 5% degli adulti e in meno del 10% dei bambini.

L'infiltrazione a livello del sistema nervoso centrale in corso di leucemia acuta può manifestarsi con un interessamento a carico delle meningi o con la formazione di lesioni nodulari o diffuse a carico del tessuto cerebrale. Anche i nervi cranici possono essere direttamente coinvolti dalla proliferazione leucemica. Nel loro percorso infatti essi passano attraverso le leptomeningi e quindi essi stessi e la loro struttura vascolare possono essere compressi e danneggiati dagli infiltrati leucemici, dando luogo a neuropatie clinicamente evidenti, come per esempio la neurite leucemica del nervo ottico con conseguente atrofia ottica (Digiuseppe, 2007).

A differenza delle forme di LMA, dove la diagnostica morfocitochimica è sufficientemente indicativa nella discriminazione dei sottotipi, nella caratterizzazione delle forme di LLA è necessario ricorrere all'applicazione di tecniche immunologiche per una completa definizione diagnostica (Digiuseppe, 2007).

Vari fattori acquistano importanza nella prognosi di LLA: 1) l'età ha un notevole impatto sulla durata della remissione e della sopravvivenza: le remissioni complete passano dal 95% nei bambini a meno del 60% nelle persone di 50-60 anni; 2) la leucocitosi: la durata della remissione è negativamente influenzata da un elevato numero di leucociti all'esordio; 3) il sesso: i soggetti maschi hanno una minore tendenza alla remissione rispetto alle femmine e la differenza è significativa anche nei riguardi dell'esito a lunga scadenza; 4) la morfologia dei blasti: non vi è alcuna differenza tra le percentuali di remissione dei pazienti affetti da L1 vs L2, mentre è significativamente bassa la percentuale di remissione e la sua durata nei soggetti con LLA di tipo L3 (Matutes, 2007).

La prognosi viene poi notevolmente influenzata dall'immunofenotipo: mentre le forme LLA-B manifestano una prognosi peggiore (40% di remissione completa) le LLA di derivazione T sembrano migliorare significativamente la prognosi (remissione completa dell' 80%) soprattutto in rapporto ai regimi chemioterapici applicati in induzione. Da ultimo va considerato il fattore genetico. La presenza di un cariotipo anomalo rappresenta, infatti, un fattore di rischio indipendente da altri parametri: mentre l'80% degli adulti con cariotipo normale va incontro a remissione, quei soggetti che sono portatori di aberrazioni genetiche hanno una prognosi peggiore (Matutes, 2007).

Trattamento farmacologico

La LLA è una delle emopatie maligne per le quali è stato raggiunto un significativo miglioramento terapeutico negli ultimi anni con l'uso della sola chemioterapia. Nei bambini è possibile acquisire una completa remissione nel 90-95% dei casi e probabilmente una guarigione in circa due terzi di questi. Negli adulti i risultati sono relativamente inferiori malgrado i progressi raggiunti (70% di remissioni complete e 30% di remissioni a lunga durata) (Pieters e Carrol, 2008).

In linea generale per quanto riguarda il controllo specifico della proliferazione leucemica, i pazienti vengono trattati secondo le fasi della cosiddetta terapia d'induzione, consolidamento/intensificazione, mantenimento (Gokbuget e Hoelzer, 2006).

Induzione: è condotta con una combinazione di farmaci che include vincristina, prednisone e antracicline e che consente di ottenere una remissione del 70-90%. È comune associare a questa triade di farmaci la L-asparaginasi.

Consolidamento: rappresenta una serie di misure finalizzate al controllo della malattia minima residua, alla prevenzione delle ricadute e all'emergenza di cellule resistenti ai farmaci citostatici utilizzati in precedenza. Questo trattamento viene effettuato con dosi elevate di farmaci quali ARA-C e metotrexato, che avrebbero anche il vantaggio di controllare, per effetto del passaggio attraverso la barriera ematoencefalica, le localizzazioni a livello dell'SNC. L'uso di alte dosi di etoposide viene riservato come parte di un trattamento che preveda successivamente il trapianto.

Mantenimento: il trattamento con 6-mercaptopurina e con metotrexato per 2-3 anni ha rappresentato uno schema di successo terapeutico trasferito dall'esperienza pediatrica a quella delle LLA dell'adulto.

L'approccio terapeutico nella prevenzione e nel trattamento delle leucemie meningee è ancora oggetto di controversie per quanto riguarda le indicazioni, l'efficacia e il rapporto rischi/benefici. La più recente strategia prevede la somministrazione per via endovenosa di antimetaboliti ad alti dosaggi (metotrexato e 6-mercaptopurina) (Gokbuget e Hoelzer, 2006).

LEUCEMIE ACUTE IBRIDE O MISTE

Le leucemie acute sia di natura mieloide sia linfoide esprimono con frequenza variabile (5-20%) marcatori immunofenotipici estranei alla filiera di origine delle cellule blastiche. Dal punto di vista classificativo, le forme ibride o miste di LA vengono suddivise in Bifenotipiche, caratterizzate dalla simultanea presenza nelle medesime cellule di marcatori di origine differente (per esempio mieloide e linfoide o linfoide T e B); Bilineari o Biclionali, contrassegnate dalla presenza di due o più popolazioni cellulari esprimenti marcatori immunologici riconducibili a filiere proliferative differenti.

Morfologicamente i blasti delle leucemie ibride hanno un aspetto simil-linfoblastico. Queste forme possono presentare la traslocazione Ph, anomalie del cromosoma 11 o alterazioni cromosomiche complesse. Le alterazioni citogenetiche possono essere varie, ma quella più frequentemente osservabile sembra essere la t(4;11) (Han e Bueso-Ramos, 2007; Weir et al., 2007).

LEUCEMIE ACUTE TRILINEARI

Sono anche dette leucemie acute mieloidi con mielodisplasia. Si tratta di leucemie acute mieloidi *de novo* in cui sono osservabili alterazioni della maturazione della popolazione non blastica residua. Alcuni criteri per la diagnosi di queste forme di leucemia prevedono il riscontro del 25% o più di cellule eritroidi anormali, o più del 50% di cellule granulocitarie e megacariocitarie anormali. Frequentemente in realtà, questo tipo di leucemia è classificata come LMA di tipo M2. Le leucemie ibride hanno generalmente una prognosi sfavorevole (Lima et al., 1997).

LEUCEMIE ACUTE INDIFFERENZIATE

Costituiscono un ristretto numero di leucemie in cui i blasti hanno una morfologia indefinita, in genere con scarso citoplasma privo di granuli e nuclei voluminosi. Si riscontra una negatività per le comuni reazioni per la perossidasi e il fenotipo è caratterizzato dalla positività per l'antigene leucocitario comune (CD45) e dall'assenza di marker mieloidi e linfoidei (Krivtsov e Armstrong, 2007).

MECCANISMI ALLA BASE DELL'ATTIVITÀ DEI CHEMIOTERAPICI ANTITUMORALI: MODULAZIONE DELL'APOPTOSI E DEL CICLO CELLULARE

I chemioterapici antitumorali colpiscono diversi bersagli nella cellula (nucleo, membrana plasmatica, organuli cellulari, ecc.), possono agire in tutte le fasi del ciclo cellulare e sfruttano differenti meccanismi d'azione. La maggior parte dei chemioterapici antitumorali oggi impiegati agiscono essenzialmente mediante due meccanismi, tra loro correlati: l'induzione di apoptosi e/o il blocco della progressione del ciclo cellulare delle cellule tumorali.

Il ciclo cellulare si articola in quattro fasi e l'inizio si fa coincidere con la fase G₁, durante la quale avviene la sintesi del corredo enzimatico necessario alla duplicazione del DNA, che avviene in fase S. Quest'ultima è seguita dalla fase G₂ durante la quale la cellula si prepara al corretto svolgimento della mitosi, cioè alla fase M.

La progressione di una cellula attraverso le diverse fasi del ciclo cellulare è un processo complesso che coinvolge numerose proteine e processi molecolari interconnessi e finemente regolati, quali le cicline e le chinasi ciclino-dipendenti (CDKs). Le cicline formano un complesso con le CDK, che attiva la funzione chinasi dell'enzima. La loro produzione e degradazione è necessaria per dirigere la progressione dei differenti stadi del ciclo. Quando la concentrazione di ciclina è bassa essa si stacca da CDK facendo sì che la conformazione della proteina renda non funzionale il sito attivo. (Shapiro, 2006). Esistono anche dei fattori che inibiscono la progressione del ciclo cellulare e questi sembrano essere di fondamentale importanza nella prevenzione dello sviluppo tumorale. In molti casi, infatti, l'arresto della proliferazione cellulare si verifica in circostanze in cui l'integrità del genoma è gravemente compromessa

ed in cui un eventuale fallimento dell'arresto del ciclo cellulare concorrerebbe alla formazione di cellule con un corredo genetico altamente instabile, che potrebbero evolvere in cellule tumorali. I segnali di progressione o di arresto del ciclo cellulare vengono integrati e processati a livello dei cosiddetti check-point. I più importanti sono quelli delle transizioni G_1/S e G_2/M . Il primo checkpoint, che controlla l'entrata in fase S, previene la cellula da repliche errate del DNA. La cellula incrementa rapidamente i livelli della proteina p53 provocando così l'arresto in fase G_1 o l'induzione di apoptosi. La perdita del checkpoint G_1/S conduce ad un'instabilità del genoma.

Il checkpoint a livello della transizione G_2/M previene la segregazione cromosomica. Se il cromosoma non è intatto, infatti, viene attivato questo checkpoint che impedisce la mitosi (Shapiro, 2006).

In ogni popolazione cellulare neoplastica è possibile individuare diversi gruppi cellulari distinti in base alla capacità proliferativa. In sintesi, a seconda dello stadio tumorale, è possibile identificare una frazione più o meno ampia di cellule proliferanti e una quota in G_0 . Di questi due gruppi di cellule il più suscettibile ai farmaci citotossici è sicuramente il primo, mentre il secondo è un ostacolo alla completa eradicazione del tumore perché è più resistente alla chemioterapia e può rientrare in ciclo dopo che la massa tumorale iniziale è stata ridotta per via chirurgica o chemioterapica.

Durante l'espansione tumorale la quasi totalità delle cellule è in fase G_1 , (la frazione di crescita è vicina al 100%) per cui, in teoria, sarebbe questo lo stadio di una neoplasia più semplice da trattare in chemioterapia. Tuttavia, l'espressione clinica del tumore avviene di solito in una fase molto più avanzata, quando la massa tumorale ha notevolmente ridotto il proprio potenziale di crescita.

Esiste oggi un'ampia gamma di strategie terapeutiche non citotossiche ma basate sull'impiego di agenti citostatici ad azione specifica, quali inibitori delle protein tirosin chinasi (Gleevec), inibitori

delle metalloproteinasi della matrice extracellulare (anticorpi monoclonali). Essi agiscono attraverso una protratta inibizione della crescita tumorale (Thaimattam et al., 2007). Al ciclo cellulare può essere correlata o addirittura accoppiata l'apoptosi, tanto che gli stessi geni sono spesso implicati in entrambi gli eventi. L'apoptosi, che viene anche chiamata morte cellulare programmata, è un processo regolato, che occupa un ruolo fondamentale nello sviluppo embrionale e fetale dell'organismo e nel mantenimento dell'omeostasi tissutale dell'adulto. La maggior parte delle cellule hanno la capacità di auto-distruggersi, mediante l'attivazione di questo programma di suicidio al quale sembrano fare eccezione solo cellule particolarmente specializzate, come quelle del muscolo cardiaco e del tessuto nervoso.

A livello citologico l'apoptosi si manifesta con una condensazione del nucleo e del citoplasma, degradazione della cromatina in granuli compatti, che si spostano verso la periferia del nucleo, formando spesso una caratteristica figura a mezzaluna. Successivamente, frammenti di materiale nucleare vengono circondati dalla membrana plasmatica, con formazione dei corpi apoptotici che sono rapidamente fagocitati e digeriti dai macrofagi o dalle cellule vicine.

A differenza della cellula necrotica, quella apoptotica perde rapidamente volume condensandosi, si stacca dalle cellule vicine perdendo le specializzazioni di membrana ed esponendo componenti, normalmente nascosti o poco espressi, della membrana plasmatica. Questi vengono riconosciuti dalle cellule vicine, che poi fagocitano la cellula morente (Golstein, 1991; Majno et al., 1995).

Il processo apoptotico può essere innescato da una serie di stimoli molto diversi fra loro: rimozione di fattori di crescita essenziali, trattamento con glucocorticoidi, raggi gamma, metalli pesanti, diossina, composti genotossici, ecc. Attualmente si ritiene sia il prodotto di una cascata biochimica precisa, che produce vari cambiamenti cellulari che precedono la morte. Questi cambiamenti

vengono provocati da un agente di natura chimica o fisica, ma anche da vie biochimiche attivate da recettori di membrana, le stesse che agiscono anche in condizioni fisiologiche, come la stimolazione da parte di citochine, ormoni e ligandi di vario tipo.

L'apoptosi è dunque un processo attivo, ad alto consumo energetico, che dipende dalla sintesi di RNA e di proteine da parte della cellula coinvolta, e quindi da una fine regolazione dell'espressione di numerosi geni, tra cui alcuni oncogeni come bax, bcl-2, c-myc, p53 coinvolti a vari livelli (Ghobrial et al., 2005).

Si può avere attivazione delle caspasi, una famiglia di cistein-proteasi, responsabili dell'iniziazione e dell'esecuzione dell'apoptosi stessa. Questi enzimi sono utilizzati comunemente sia per valutare se l'apoptosi è indotta in differenti sistemi sperimentali, sia per stabilire marcatori precoci o tardivi di apoptosi, a seconda di quale caspasi è esaminata. L'azione delle caspasi, sintetizzate come proenzimi inattivi e attivate per eliminazione di specifici residui di aspartato, ha come risultato finale la scissione e l'inibizione di proteine cellulari chiave, come la poli(-ADP-ribosio) polimerasi (PARP), enzima riparatore del DNA (Degterev e Boyce, 2003). L'apoptosi può essere anche indotta attraverso una via caspasi-indipendente, mediante il rilascio di fattori proteici inducenti apoptosi (AIF) nel citosol o con l'attivazione delle proteasi citosoliche calcio-dipendenti (Broker et al., 2005).

L'induzione dell'apoptosi delle cellule neoplastiche è l'obiettivo primario dell'azione di molti farmaci da tempo utilizzati nella chemioterapia antitumorale, quali gli antimetaboliti (es. metotrexato) e gli alchilanti (es. ciclofosfamide).

Al contrario, di recente introduzione sono, ad esempio, l'ATRA (acido trans-retinoico), una preparazione lisosomiale di tretinoina e il triossido d'arsenico nel trattamento della leucemia promielocitica acuta.

Inoltre, l'importanza della proteina bcl-2 nell'inibizione dell'apoptosi, ma anche nella progressione e nel controllo dei tumori, ha stimolato l'interesse all'uso degli oligonucleotidi antisenso per modulare la sua espressione (Ghobrial et al.,2005).

LIMITI DELL'ATTUALE CHEMIOTERAPIA ANTITUMORALE

Al fianco dei chemioterapici tradizionali, tra il 1995 e il 2000 si è assistito all'immissione in commercio di una nuova generazione di farmaci antitumorali. Tuttavia, osservazioni recenti evidenziano che essi offrono pochi o nessun vantaggio sostanziale rispetto alle preparazioni precedenti in termini di efficacia e sicurezza e che non soddisfano certamente le aspettative generate dai progressi nella conoscenza sul cancro (Garattini et al., 2002).

Per arricchire velocemente il mercato di nuovi prodotti, molti di questi composti sono stati candidati per la seconda o terza linea di trattamento di tumori rari e sono stati approvati più che altro sulla base di piccoli trial clinici di fase II che ne stimano la "non inferiorità", ma non la superiorità, rispetto ai farmaci di riferimento. Questi studi hanno impiegato spesso un numero ristretto di pazienti per periodi di osservazione relativamente brevi e hanno compiuto stime basandosi prevalentemente su variabili di tipo soggettivo, quali il tempo di progressione della patologia, e non ad esempio la percentuale di sopravvivenza o la qualità di vita dei pazienti trattati (Garattini et al., 2002). Un esempio di queste nuove molecole è rappresentato dal topotecan, un inibitore della topoisomerasi-1. Esso è stato immesso sul mercato europeo nel 1996 come seconda linea di trattamento del cancro ovarico metastatico al posto del cisplatino. Uno studio non comparativo di fase II su 280 pazienti trattati in precedenza con cisplatino ± paclitaxel ha evidenziato una scarsa risposta al

trattamento col topotecan. Si è osservato, infatti, una percentuale del 16% di pazienti che hanno avuto una risposta completa e del 10% di pazienti che hanno subito una ricaduta entro 3 mesi. Uno studio aperto di fase III su 226 pazienti trattati ha confermato la modesta efficacia del nuovo composto in confronto a quelli di riferimento. (Garattini et al., 2002).

La temozolomide, invece, è un agente alchilante approvato nel 1998 per la cura del glioblastoma e dell'astrocitoma, fino ad allora trattati con la procarbazine. Essa ha portato, in uno studio su 225 pazienti affetti da glioblastoma multiforme, ad un modesto aumento del tempo medio di sopravvivenza senza progressione del tumore (da 1.9 mesi nei pazienti trattati col farmaco di riferimento a 2.9 mesi) e del tempo medio di sopravvivenza complessivo (da 5.7 a 7.3 mesi). La temozolomide è peraltro risultata positiva a test di mutagenesi e cancerogenesi (Garattini et al., 2002).

Un altro caso esemplificativo è costituito dal rituximab, introdotto nel mercato europeo nel 1998 per la terapia del linfoma follicolare al terzo e quarto stadio resistente ad altri chemioterapici. Due trial clinici di fase II su 203 pazienti totali hanno evidenziato una risposta al trattamento con rituximab nel 48% dei pazienti, e precisamente una risposta completa solamente nel 6% dei casi e parziale nel restante 42%. Gli effetti osservati erano comunque simili a quelli ottenuti attraverso il trattamento con fludarabina, farmaco di riferimento per la stessa patologia. Il nuovo farmaco ha però dimostrato di causare, su un campione di 12000-14000 pazienti trattati, una sindrome da rilascio di citochine in una percentuale di pazienti superiore al 50% e reazioni avverse all'uso del farmaco, che si sono rivelate di seria entità in 66 casi e addirittura fatali in 39 casi (Garattini et al., 2002). Inoltre, nonostante non mostrino miglioramenti nella percentuale di sopravvivenza, nella qualità di vita dei pazienti o nel profilo tossicologico, i farmaci di nuova generazione

presentano costi considerevolmente più alti rispetto ai farmaci standard e ciò è difficilmente giustificabile (Garattini et al., 2002).

Ad esempio, la temozolamide ha un costo per ciclo di trattamento ben 350 volte superiore a quello del farmaco di riferimento per la stessa patologia, la procarbazina, nonostante vi siano seri dubbi sulla reale efficacia del trattamento (Batchelor, 2000); analogamente, un ciclo di terapia con rituximab costa all'incirca 7 volte un ciclo con fludarabina, malgrado i seri effetti collaterali ad esso associati. In conclusione, l'odierna chemioterapia presenta ancora forti limiti, causati dalla carenza di strumenti farmacologici efficaci e sicuri. Per questo motivo è necessario che la ricerca farmacologica prosegua nell'attività di studio di nuovi potenziali agenti antitumorali, prendendo in esame anche le numerose sostanze bioattive di origine naturale.

SULFORAFANE

Gli isotiocianati (ITC) sono composti abbondantemente presenti nei vegetali appartenenti alla famiglia delle Crucifereae. Numerosi studi epidemiologici e su modelli animali evidenziano l'attività chemiopreventiva nei confronti del processo cancerogenetico degli ITC (Keck et al. 2004). Tra gli ITC il Sulforafane [(SFN), (-)-1-isotiocianato-(4R)-(metilsulfinil)butano] è stato oggetto di particolare attenzione grazie alla sua capacità di interagire e modulare diversi target cellulari critici dello sviluppo cancerogenetico. Esso è, infatti, in grado di:

- modulare gli enzimi coinvolti nei processi di attivazione/detossificazione dei cancerogeni (enzimi di fase I ed enzimi di fase II),
- proteggere il DNA dagli insulti di composti mutageni,
- esibire effetti citostatici e citotossici, ritardando o bloccando così l'espansione clonale delle cellule iniziate, trasformate o neoplastiche,
- inibire la neoangiogenesi, la progressione dei tumori da benigni a maligni e il processo di metastatizzazione.

Modulazione degli enzimi di biotrasformazione

Le reazioni di biotrasformazione sono classificate in due tipi: reazioni di fase I e reazioni di fase II. Le prime comprendono ossidazioni, riduzioni ed idrolisi e sono dette "di funzionalizzazione" in quanto il loro scopo è inserire, a livello del substrato, gruppi funzionali (-COOH, -SH, -OH) che permettano poi le reazioni di fase II. Le reazioni di fase I sono catalizzate dal sistema ossidasico a funzione mista localizzato a livello del reticolo endoplasmatico delle cellule epatiche. Questo sistema è costituito principalmente da enzimi

appartenenti alla famiglia del citocromo P450 (CYP). Gli enzimi di fase I possono essere responsabili della formazione di composti cancerogeni, in quanto permettono la trasformazione di molecole precancerogene inattive in intermedi altamente reattivi, che possono poi legare macromolecole critiche come DNA, RNA e proteine.

Diversamente, le reazioni di fase II sono reazioni di coniugazione che generalmente aumentano la idrosolubilità di un composto, favorendone così, la escrezione per via renale. Gli enzimi che catalizzano queste reazioni, quali glutazione S-transferasi (GST), NADPH chinone ossidoreduttasi (NQOR), aldo-chetoreduttasi, gamma glutamilcisteinsintetasi, sono anche chiamati enzimi detossificanti, in quanto coinvolti nella detossificazione di numerosi cancerogeni.

Inibizione degli enzimi di fase I

Il SFN inibisce l'attività di diverse isoforme del CYP. Ad esempio, negli epatociti di ratto esso riduce l'attività enzimatica di CYP1A1 e 2B1/2 con un meccanismo dose-dipendente (Maheo et al., 1997). Nei microsomi epatici di ratti trattati con acetone inibisce in modo competitivo CYP2E1, enzima coinvolto nell'attivazione metabolica della N-nitrosodimetilamina (Barcelo et al., 1996). Negli epatociti umani induce sia down-regulation che inibizione dell'attività enzimatica del CYP3A4 (Maheo et al., 1997).

Ai livelli di dose assunti con la dieta, il SFN riduce i livelli di apoproteina CYP2B, mentre a dosi più elevate anche quelli di apoproteina CYP3A2 (Yoxall et al., 2005).

Induzione degli enzimi di fase II

Il SFN è uno dei più potenti induttori monofunzionali di enzimi di fase II come epossido idrolasi, ferritina, glutazione perossidasi, glutazione

reduttasi (Hu et al., 2006), glutammato cisteina sintetasi (Zhang et al., 2002), GST (Zhang et al., 1992), emeossigenasi-1 (Cornblatt et al., 2007), tioredoxina e tioredoxina reduttasi (Bacon et al., 2007), UDP-glucuronosiltransferasi (UGT) 1A (Basten et al., 2002).

È stato dimostrato che il SFN e gli ITC in generale aumentano l'attività di questi enzimi attraverso l'induzione della trascrizione dei loro geni, che contengono una specifica sequenza di DNA, chiamata Antioxidant Responsive Element (ARE) (Dinkova-Kostova et al., 2002). I geni che contengono questa sequenza enhancer sono regolati dal fattore di trascrizione Nrf2, che si trova nel citoplasma legato alla proteina citoscheletrica Kelch-like ECH-Associated Protein 1 (Keap 1). In seguito ad alterazione dello stato redox citosolico, si rompe il legame tra Keap 1 e Nrf2, quest'ultimo viene così attivato e, libero dal legame con la proteina, può essere traslocato al nucleo dove induce la trascrizione dei geni che presentano la sequenza ARE. Nel caso in cui Nrf2 sia mancante o inattivo, non si osserva alcun tipo di induzione genica e di attività da parte del SFN (Fahey et al., 2002; Xu et al., 2006).

Molti studi dimostrano che questa via metabolica è implicata nella protezione cellulare dallo stress ossidativo e può costituire un efficace bersaglio terapeutico nei disordini cronici quali cancro e patologie neurodegenerative (Lee, 2004). Il SFN e gli ITC in generale sono, quindi, considerati antiossidanti indiretti, in quanto sono in grado di proteggere le cellule dalla eccessiva produzione di radicali liberi, non agendo da donatori o accettori di elettroni, ma andando a modulare l'espressione degli enzimi di fase II e modificando i livelli intracellulari di glutatione (GSH). Il SFN, infatti, si è dimostrato anche capace di aumentare la sintesi della catena leggera, ma non della catena pesante, della glutamilmcisteina sintetasi, enzima che catalizza una tappa limitante della sintesi del GSH (Zhang et al., 2002).

Protezione del DNA dagli insulti genotossici

Il SFN è in grado di contrastare efficacemente la genotossicità di numerosi composti cancerogeni, grazie a diversi meccanismi d'azione. Ad esempio, l'esposizione alle ammine eterocicliche (HCA) è associata allo sviluppo di alcuni tumori, come quello al seno, al colon ed alla prostata. Studi *in vitro* hanno dimostrato che il SFN è un potente inibitore della mutagenesi indotta dalle HCA (Shishu e Kaur, 2003).

In cellule tumorali epatiche ed epatociti umani, il co-trattamento con SFN e 2-ammino-1-metil-6-fenilimidazo[4,5-b]piridina (PhIP) ha significativamente ridotto il livello di addotti PhIP-DNA. Tuttavia, quando il trattamento con SFN è successivo a quello con PhIP, non si osserva alcun decremento nei livelli di addotti PhIP-DNA, il che fa ipotizzare che il SFN sia dotato di un'azione preventiva più che di induzione degli enzimi di riparazione del DNA (Jiang et al., 2003).

In cellule mammarie umane, il SFN ha inibito la formazione di addotti al DNA successivi all'esposizione a Benzo(a)pirene e a 1,6-dinitropirene (Singletary e MacDonald, 2000); in linee cellulari umane di colon il SFN, a concentrazioni inferiori alla 5 μ M, ha protetto il DNA dalle rotture a singolo filamento indotte da Benzo(a)pirene, mentre, in cellule umane epatiche, che esprimono CYP2E1 e CYP1A2, il SFN contrasta le rotture a doppio filamento indotte da N-nitrosodimetilamina e 2-amino-3-metilimidazo[4,5-f] chinolina (Barcelo et al., 1998).

Uno studio condotto su linfociti umani ha evidenziato come il SFN contrasti la genotossicità di quattro differenti composti: l'alchilante etilmetansulfonato, l'aneuploidogeno vincristina, l'ossidante perossido di idrogeno e la mitomicina c, un composto ad azione mista, cioè in grado sia di alchilare che di ossidare il DNA. Nel caso dell'etilmetansulfonato e della mitomicina c, l'attività antigenotossica del SFN è dovuta all'induzione di apoptosi; l'aggiunta di SFN alle

colture trattate con vincristina e perossido di idrogeno, al contrario, non ha provocato alcun incremento nella frazione di cellule apoptotiche, facendo ipotizzare un diverso meccanismo alla base dell'azione protettiva del SFN, come l'inibizione della proliferazione cellulare o l'induzione di specifici enzimi (Fimognari et al., 2005).

Effetti citostatici e citotossici

Induzione di apoptosi

Gli effetti proapoptotici del SFN sono stati descritti in diversi modelli cellulari.

La prima evidenza è stata riportata in colture di cellule tumorali di colon umano (Gamet-Payraastre et al., 2000), successivamente, in cellule tumorali prostatiche (Singh et al., 2004), in cellule di medulloblastoma (Gingras et al., 2004) e mammarie (Jackson e Singletary, 2004). Su tali modelli cellulari è stata evidenziata la capacità del SFN di indurre gli eventi caratteristici dell'apoptosi, quali condensazione cromatinica, la traslocazione della fosfatidilserina attraverso la membrana plasmatica e frammentazione del DNA. È interessante notare che cellule di glioblastoma, uno dei tumori cerebrali più frequenti ed ancora difficilmente trattabile, rispondono al trattamento con SFN mediante apoptosi mediata da meccanismi caspasi-dipendenti e caspasi-indipendenti (Karmarkar et al., 2006).

Sono stati proposti numerosi meccanismi alla base dell'azione proapoptotica del SFN: mantenimento della chinasi Cdc2 in forma attiva (Parnaud et al., 2004), attivazione di geni proapoptotici quali caspasi (Pham et al., 2004) e p53 (Fimognari et al., 2002; Fimognari et al., 2004), blocco della polimerizzazione della tubulina (Jackson et al., 2004), incremento dello stress ossidativo (Singh et al., 2005) e diminuzione dei livelli intracellulari di antiossidanti (Pham et al.,

2004). Altri studi condotti su cellule leucemiche (Fimognari et al., 2002; Fimognari et al. 2004) e su cellule prostatiche (Singh et al., 2004) associano l'apoptosi indotta da SFN ad un aumento dei livelli di bax. Infine, studi recenti identificano anche la capacità del SFN di inibire l'attività della deacetilasi istonica (HDAC) come un nuovo meccanismo alla base del suo effetto proapoptotico (Myzak et al., 2004).

Inibizione del ciclo cellulare

Il SFN è in grado di alterare la progressione del ciclo cellulare in diversi modelli cellulari. Ad esempio, su cellule umane tumorali di colon esso riduce la percentuale di cellule in fase G₁ e incrementa quelle in fase G₂/M (Gamet-Payrastre et al., 2000).

Inoltre, il SFN induce blocco del ciclo cellulare in fase G₂/M in cellule murine di carcinoma mammario (Jackson et al., 2004), in cellule umane di carcinoma mammario (Jackson et al., 2004), in cellule leucemiche umane (Fimognari et al., 2004) e in cellule umane di carcinoma pancreatico.

La capacità del SFN di indurre blocco del ciclo cellulare è imputabile a diversi meccanismi. In cellule tumorali prostatiche, ad esempio, si osserva, in seguito a trattamento con SFN, un'inibizione dell'attività di Cdk4, un aumento dell'espressione di p21 e un decremento dell'espressione della ciclina D1, attività che contribuiscono complessivamente all'arresto in fase G₁ (Liu et al., 2004). Inoltre, l'arresto irreversibile in fase G₂/M, evidenziato in altre linee cellulari, è stato associato ad una significativa riduzione dei livelli proteici di ciclina B1, Cdc25B e Cdc25C (Singh et al., 2004). Infine, in cellule di carcinoma mammario è stato dimostrato un blocco in fase mitotica, dovuto ad inibizione della polimerizzazione della tubulina (Jackson et al., 2004).

Inibizione dell'angiogenesi

L'angiogenesi è il processo fisiologico di formazione di nuovi vasi sanguigni, fondamentale per la normale crescita dei tessuti, ma anche il sistema attraverso cui la massa tumorale si assicura il nutrimento per espandersi e formare metastasi (Carmeliet et al., 2000). Senza questa nuova formazione di vasi in grado di creare e sviluppare una rete di capillari intratumorali tale da permettere l'apporto di ossigeno e nutrienti, la crescita della massa è limitata e non raggiunge la dimensione critica di 1-2 mm².

La progressione dell'angiogenesi neoplastica richiede la presenza di alcune molecole proangiogeniche rilasciate dalle cellule tumorali, come il fattore di crescita vascolare endoteliale (VEGF).

Il SFN si è dimostrato capace di inibire l'espressione del recettore KDR/flk-1 di VEGF a livello trascrizionale (Bertl et al., 2006). Utilizzando cellule endoteliali di vena ombelicale umana (HUVEC) come modello di angiogenesi, si è potuto dimostrare che il SFN inibisce anche la formazione dei vasi e induce un decremento dose-dipendente della proliferazione delle cellule endoteliali (Asakage et al., 2006).

Complessivamente questi risultati evidenziano che il SFN modula tutti gli stadi essenziali della neovascolarizzazione, dal segnale di proangiogenesi, alla proliferazione e migrazione delle cellule endoteliali, nonché alla formazione dei vasi sanguigni.

Inibizione della progressione dei tumori benigni a tumori maligni

Diversi modelli animali sono stati utilizzati per valutare *in vivo* gli effetti antitumorali del SFN. Il SFN ha mostrato la capacità di inibire in modo significativo lo sviluppo di tumori, indotti da numerosi

composti cancerogeni in vari organi, incluso polmoni (Conaway et al., 2005), pancreas (Kuroiwa et al., 2006), cute (Xu et al., 2006; Gills et al., 2006) e stomaco (Fahey et al., 2002), attraverso soprattutto la modulazione delle fasi precoci dello sviluppo tumorale.

Altri studi però dimostrano la capacità del SFN di inibire la progressione maligna dell'adenoma polmonare indotto dai cancerogeni del tabacco. Infatti, nei topi A/J trattati con 4-(metilnitrosoamino)-1-(3-piridil)-1-butanone e benzo(a)pirene l'esame istopatologico ha evidenziato una significativa riduzione nella progressione maligna del tumore polmonare (Conaway et al., 2005). Gli effetti inibitori del SFN sono stati associati all'aumento della frazione di cellule apoptotiche e alla riduzione della proliferazione cellulare, probabilmente attraverso la via della caspasi 3 (Conaway et al., 2005).

Inibizione del processo metastatico

La capacità di dare metastasi costituisce una delle caratteristiche peculiari dei tumori maligni. Il processo metastatico consiste di una serie di eventi sequenziali che portano le cellule tumorali a disseminare, attraverso il circolo sanguigno e il sistema linfatico, dalla sede di sviluppo ad un altro organo.

Si tratta di un evento biologico complesso legato a caratteristiche proprie dell'individuo (condizioni generali, capacità di risposta immunitaria) e caratteristiche specifiche delle cellule tumorali (sede, dimensioni, caratteristiche istologiche) (Liotta et al., 1986).

La diffusione delle cellule tumorali inizia localmente attraverso il rilascio di enzimi in grado di digerire i tessuti circostanti, quali tessuto adiposo, cartilagine, capsula degli organi ecc. Quando le cellule tumorali incontrano un vaso sanguigno o linfatico possono

distruggerne la parete e penetrare così all'interno della corrente sanguigna o linfatica e diffondere in tutto l'organismo (Liotta, 1986). Gli effetti inibitori del SFN sulla comparsa di metastasi polmonari indotte da cellule di melanoma B16F-10 è stata studiata in un modello murino (Thejass et al., 2006). Negli animali trattati con SFN si nota una significativa riduzione dei marker di fibrosi polmonare (Thejass et al., 2006) e dei marker di proliferazione cellulare (Obrador et al., 2002), oltre ad un aumento della sopravvivenza degli animali portatori di metastasi (Thejass et al., 2006). I meccanismi alla base di tali effetti sono da ricondurre all'inibizione dell'attivazione delle metalloproteinasi 2 e 9, famiglia di endoproteinasi capaci di distruggere la maggior parte dei componenti della matrice extracellulare, permettendo l'invasione cellulare e la formazione di metastasi (Thejass et al., 2006).

SCOPO DELLA RICERCA

La ricerca svolta nell'ambito del periodo di dottorato si è posta come obiettivo lo sviluppo di composti di origine naturale come potenziali farmaci antitumorali, attraverso la definizione dei loro specifici target cellulari e molecolari su diversi modelli cellulari ad alta predittività.

In particolare, la ricerca si è focalizzata sull' isotiocianato SFN, al fine di verificarne la capacità di modulare specifici eventi cellulari e molecolari coinvolti nel processo di leucemogenesi.

La ricerca si è svolta in modo sequenziale. Nella prima fase è stato indagato il potenziale citostatico e citotossico del SFN su una linea cellulare T linfoblastoide (cellule Jurkat), con particolare attenzione agli effetti sulla proliferazione cellulare e all'induzione di apoptosi/necrosi. È stata inoltre operata una diversificazione dei tempi di trattamento per stabilire se l'induzione di apoptosi fosse un evento direttamente indotto dal SFN o secondario all'arresto della proliferazione.

Si è poi proceduto con l'analisi di alcuni dei meccanismi molecolari coinvolti negli effetti citostatici e citotossici dell'isotiocianato. In particolare, sono stati valutati i livelli proteici di p53, bax e bcl-2 in cellule trattate con SFN ed i risultati confrontati con quelli ottenuti in colture non trattate.

Requisiti fondamentali di un antitumorale sono selettività d'azione e scarsa tossicità. Il naturale passo successivo è stato, quindi, indagare il potenziale citostatico e citotossico dell'isotiocianato SFN sulla controparte non trasformata delle cellule leucemiche T linfoblastoidi e verificarne così l'eventuale specificità d'azione nei confronti delle cellule tumorali. Lo studio è stato condotto su linfociti T umani non trasformati e stimolati con fitoemoagglutinina, su cui sono stati analizzati gli stessi eventi studiati su cellule tumorali,

operando, anche in questo caso, una diversificazione dei tempi di trattamento.

I suddetti effetti sono stati ulteriormente indagati a livello molecolare, mediante l'analisi di alcune proteine coinvolte nella regolazione del ciclo cellulare, quali ciclina D2, ciclina D3, chinasi ciclina dipendente (CDK) 4 e CDK6, e dell'apoptosi, quali p53, bax e bcl-2.

Terminata questa prima fase lo studio è proseguito analizzando gli effetti del SFN su cellule da pazienti leucemici.

Una tappa importante nello sviluppo di un farmaco antitumorale è, infatti, la definizione, laddove possibile, dei suoi effetti in un modello *ex vivo*. Gli studi *ex vivo* rappresentano un ottimo surrogato per la determinazione della risposta cellulare del paziente al trattamento ed un modello di altissima rilevanza nel predirne la risposta clinica (Bromidge et al., 1998; Morabito et al., 1998; Bosanquet et al., 2002; Bosanquet e Bell, 2004). I risultati di tali studi correlano molto bene con la successiva risposta e sopravvivenza del paziente per un'ampia varietà di patologie e di regimi terapeutici (Bosanquet et al., 1999; Bosanquet e Bell, 2004).

Ciò non può essere realizzato mediante studi su linee cellulari che, sebbene importanti, differiscono in modo rilevante dalla situazione che si evidenzia *in vivo*. La popolazione leucemica ottenuta dal paziente differisce, infatti, drammaticamente dalle linee cellulari in termini di cinetica di crescita e di determinanti farmacologici. Lo stesso processo di creazione di una linea cellulare a partire da cellule tumorali prelevate da paziente comporta la selezione di particolari tipi cellulari che prenderanno il sopravvento sugli altri, diventando gli unici costituenti della linea cellulare. Essa sarà, quindi, caratterizzata da una completa perdita dell'eterogeneità che caratterizza le colture leucemiche fresche. È stato, ad esempio, dimostrato che la creazione di una linea cellulare da pazienti affetti da leucemia linfoblastica acuta seleziona solo quelle cellule caratterizzate da traslocazioni cromosomiche, che diventano, quindi,

l'unico tipo cellulare presente in coltura (O'Connor et al., 1991). Il processo di creazione di una linea cellulare prevede inoltre lunghi tempi di mantenimento delle cellule in coltura. Ciò può provocare una più alta frequenza di delezione a carico di particolari geni e l'espressione di una varietà di molecole di adesione e di antigeni di differenziazione, che non vengono riscontrate nelle cellule fresche (Jagasia et al., 1996; Pasternak e Pasternak, 1994;). Tutto ciò può far sì che gli effetti di un composto saggiato su una linea cellulare differiscano in maniera più o meno marcata da quelli osservabili su campioni *ex vivo*.

Poiché i vari tipi di leucemia (linfoblastica e mieloblastica) sono caratterizzati da specifiche alterazioni citogenetiche e molecolari e da un decorso clinico peculiare, che determinano l'utilizzo di protocolli terapeutici specifici, il SFN è stato testato su blasti ottenuti da pazienti affetti da diversi tipi di leucemia. Ciò consente di evidenziarne un'eventuale attività solo su particolari tipi di leucemia. I tempi di trattamento con SFN sono stati diversificati, al fine di comprendere se il suo potenziale antileucemico richiedesse trattamenti di tipo acuto (alcune ore) o cronico (diversi giorni).

MATERIALI E METODI

COMPOSTI CHIMICI

Il SFN è stato acquistato dalla Vinci Biochem, purezza 99.37%. Il SFN è stato disciolto in acqua bidistillata sterile, ottenendo una soluzione stock 1410 mM, che viene conservata al riparo dalla luce ad una temperatura di -20°C. Le concentrazioni saggiate sono comprese nell'intervallo 0-30 μ M.

SOLUZIONI E REAGENTI

- Trypan-blue (Sigma): disciolto in acqua bidistillata allo 0.5%;
- Tampone fosfato (PBS) pH 7.4 (Fluka);
- Dimetilsolfossido (DMSO) (Sigma);
- RPMI 1640 (Sigma);
- Siero Fetale Bovino (FCS) (Sigma), disattivato mediante riscaldamento a 57°C per 30 min;
- Soluzione di Penicillina 5000 UI – Streptomicina 5mg/mL (Sigma);
- L-glutamina (Sigma) 200mM

- Histopaque 1077 (Sigma);
- Fitoemoaglutinina (PHA-M) (Sigma): disciolta in acqua bidistillata, concentrazione finale 5 µg/mL;
- Ribonucleasi A (RNAsi) (Sigma);
- Soluzione I: 584mg/L NaCl (Sigma), 1000mg/L Na-citrato (Sigma), 10mg/L RNAsi e 0.3mL/L Nonidet P40 (Fluka);
- Soluzione II: 1.5% acido citrico (Sigma), 0.25 M saccarosio (Sigma);
- To-Pro-3 (Molecular Probes): disciolto in DMSO, concentrazione finale 0.3 µM;
- Annexin-V-biotin detection kit (Oncogene);
- Calceina AM (Molecular Probes) disciolta in DMSO, concentrazione finale 0.5 µM;
- Streptavidina marcata con Cyanina 5 (Cy-5[®]) (Amersham Biosciences) disciolta in acqua bidistillata, concentrazione finale 2µg/mL;
- Agilent Cell Reagents (Agilent Technologies);
- SYTO 16[®] (Molecular Probes);
- Soluzione di permeabilizzazione (Perm 2) (BD)

- Staining buffer: PBS + 2% albumina bovina (Sigma) + 0.05% sodio azide (Sigma);
- Anti-human ciclin D2 (Santa Cruz);
- Anti-human ciclin D3 (Santa Cruz);
- Anti-human CDK4 (Santa Cruz);
- Anti-human CDK6 (Santa Cruz);
- Anti-human p53 (Santa Cruz);
- Anti-human bax (Santa Cruz);
- Anti-human bcl-2 (Santa Cruz);
- Anticorpo secondario marcato con Cy-5 (Jackson Immuno);
- Agilent Protein Reagents (Agilent Technologies);

ALLESTIMENTO DELLE COLTURE CELLULARI

Cellule T linfoblastoidi (Jurkat)

La linea cellulare Jurkat è stata acquistata dall'Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia-Romagna (Brescia). Le cellule sono state coltivate a 37°C e 5% CO₂ in terreno RPMI 1640, supplementato al 10% con FCS, 1% con penicillina e streptomina e

1% con L-glutamina. Per mantenerle in fase esponenziale di crescita, le colture sono state diluite ogni 3 giorni in terreno fresco.

Le cellule sono state trattate a diversi tempi (8-24-48 h) e diverse concentrazioni (0-30 μ M) di SFN e gli effetti del SFN sulla modulazione del ciclo cellulare, sull'induzione di apoptosi e sull'espressione delle proteine p53, bax, e bcl-2 sono stati analizzati in modo automatizzato tramite il Bioanalyzer 2100 (Agilent Technologies).

Linfociti T non trasformati

I linfociti sono stati isolati dal sangue intero di donatori AVIS (Associazione Volontari Italiani Sangue) mediante centrifugazione in gradiente di densità utilizzando Histopaque 1077. I linfociti T sono stati coltivati a 37°C e 5% CO₂ in terreno RPMI 1640, supplementato al 15% con FCS, 1% con penicillina e streptomina, 1% con L-glutamina e 0.5% con PHA-M.

Le cellule sono state trattate a diversi tempi (24-30-48-72 h) e diverse concentrazioni (0-30 μ M) di SFN e gli effetti del SFN sulla modulazione del ciclo cellulare, sull'induzione di apoptosi e sull'espressione proteica di ciclina D2, D3, CDK4, CDK6, p53, bax e bcl-2 sono stati analizzati in modo automatizzato tramite il Bioanalyzer 2100.

Blasti da pazienti leucemici

La ricerca è stata condotta in collaborazione con la Divisione di Ematologia del Dipartimento di Oncologia, dei Trapianti e delle Nuove Tecnologie in Medicina dell'Università di Pisa, coordinata dal Prof. Mario Petrini, che ha provveduto al reclutamento ed alla caratterizzazione dei pazienti leucemici, così come alla preparazione e alla firma da parte dei pazienti del consenso informato. Sono stati

ad oggi reclutati 14 pazienti: 10 di questi non erano, al momento del prelievo, sottoposti ad alcun trattamento chemioterapico citoreducente; 4, invece, erano stati sottoposti a terapia di induzione terminata almeno 3 mesi prima, e si presentavano al momento del prelievo in progressione di malattia. La diagnosi è avvenuta mediante caratterizzazione su base morfologica, immunologica e citogenetica. L'età della popolazione in studio è compresa fra i 19 ed i 76 anni. I pazienti si presentavano clinicamente stabili al momento del prelievo. I blasti sono stati isolati dal sangue intero di pazienti affetti da diversi tipi di leucemia mediante centrifugazione in gradiente di densità utilizzando Histopaque 1077. I blasti sono stati coltivati a 37°C e 5% CO₂ in terreno RPMI 1640, supplementato al 15% con FCS e all'1% con penicillina e streptomina. Le cellule sono state trattate a diversi tempi (6-24-48-72 h) e diverse concentrazioni (0-30 µM) di SFN. Lo schema sperimentale è stato di volta in volta adattato allo specifico campione in esame. Per non tutti i campioni infatti, è stato possibile saggiare tutte le concentrazioni a tutti i tempi di trattamento, poiché talvolta il numero di blasti non era sufficiente a causa sia della scarsità nel numero di cellule sia della mortalità spontanea. Gli effetti sull'induzione di apoptosi sono stati analizzati in modo automatizzato tramite il Bioanalyzer 2100.

SAGGI CELLULARI E MOLECOLARI

1) Test di citotossicità

La vitalità cellulare è stata valutata mediante colorazione con Trypan-blue, che rimane escluso dalle cellule vive (che appariranno non colorate) e penetra nelle cellule morte (che appariranno blu). A tale scopo, 50 µL di sospensione cellulare sono stati miscelati con 50 µL

di Trypan-blue 0.5%. Alcuni μL di tale sospensione sono stati messi in camera di Bürker e si è proceduto al conteggio della vitalità cellulare utilizzando la seguente formula:

$$\text{cellule vive/ml} = \frac{\text{n}^\circ \text{ cellule non colorate} \times 10 \times 10^4}{\text{n}^\circ \text{ di quadranti letti}}$$

10 = fattore di diluizione 10^4 = costante relativa alla camera di Bürker

2) Analisi del ciclo cellulare

Uno dei principali metodi utilizzati per discriminare le cellule nelle diverse fasi del ciclo cellulare prevede l'utilizzo di un intercalante del DNA (nel nostro caso To-Pro-3, un colorante appartenente alla famiglia delle cianidine monomeriche). Infatti durante le diverse fasi del ciclo cellulare il contenuto di DNA varia a seconda della fase del ciclo in cui si trova la cellula.

Terminato il periodo di incubazione con il SFN, le cellule sono state centrifugate e, previa lettura con camera di Bürker, risospese in 1mL di soluzione I. Dopo 30 min di incubazione a temperatura ambiente e al buio, si è addizionato 1mL di soluzione II e si è incubato per 30 min a temperatura ambiente. Al termine del periodo di incubazione, le colture sono state centrifugate ed il pellet è stato risospeso in un volume di cell buffer tale da ottenere una concentrazione di 2×10^6 nuclei/mL.

Si è proceduto poi al trattamento con To-Pro-3. Poiché il To-Pro-3 è instabile, la lettura deve essere eseguita entro 1h dall'aggiunta.

La preparazione del chip per l'analisi al Bioanalyzer 2100, è avvenuta secondo il protocollo sperimentale fornito dalla casa produttrice.

3) Analisi dell'apoptosi mediante il test dell'Annexina V

È stato dimostrato che la perdita di simmetria dei fosfolipidi di membrana è un evento caratteristico del fenomeno apoptotico. Nelle cellule apoptotiche, infatti, la fosfatidilserina viene esposta sul lato esterno della membrana plasmatica. L'Annexina V lega i fosfolipidi carichi negativamente, come la fosfatidilserina. Durante l'apoptosi, le cellule reagiscono con l'Annexina V non appena la cromatina condensa, ma prima che la membrana plasmatica venga alterata.

Il riconoscimento delle cellule metabolicamente attive da quelle non attive si può effettuare sulla base della disponibilità di ATP. L'apoptosi è un processo metabolico che richiede energia, quindi ATP. La calceina è una sostanza metabolicamente attivata a fluoroforo in presenza di ATP, perciò solo le cellule vitali e apoptotiche daranno fluorescenza. Da qui, attraverso la duplice colorazione Annexina V/Calceina è possibile distinguere fra cellule vive non apoptotiche (Calceina^{positive} – Annexina V^{negative}), cellule apoptotiche (Calceina^{positive} - Annexina V^{positive}) e cellule necrotiche (Calceina^{negative} – Annexina V^{positive}).

Alla fine del trattamento con SFN, aliquote di 1×10^6 cellule totali sono state centrifugate per 10 min e risospese in 500 μL di RPMI, a cui vengono aggiunti 10 μL di media binding reagent, 1.25 μL di Annexina V-biotina, ed incubate a temperatura ambiente per 15 min. Dopo lavaggio, le cellule vengono risospese in 500 μL di binding buffer, addizionate di 1 μL di streptavidina marcata con Cy-5 e 0.5 μL di calceina ed incubate per 30 min a temperatura ambiente ed al riparo dalla luce. Alla fine del periodo di incubazione le cellule vengono lavate e risospese in una quantità di cell buffer tale da ottenere una concentrazione cellulare di 2×10^6 cell/mL. La preparazione del chip per l'analisi al Bioanalyzer 2100, è avvenuta secondo il protocollo sperimentale fornito dalla casa produttrice. In figura 1 vengono riportati a titolo di esempio i citogrammi ottenuti

dopo doppia colorazione. In particolare, le cellule caratterizzate da alta fluorescenza per la calceina sono vive o apoptotiche; le cellule caratterizzate da alta fluorescenza per la calceina ed alta fluorescenza per l'annexina-Cy-5 sono apoptotiche; le cellule caratterizzate da bassa fluorescenza per la calceina sono necrotiche.

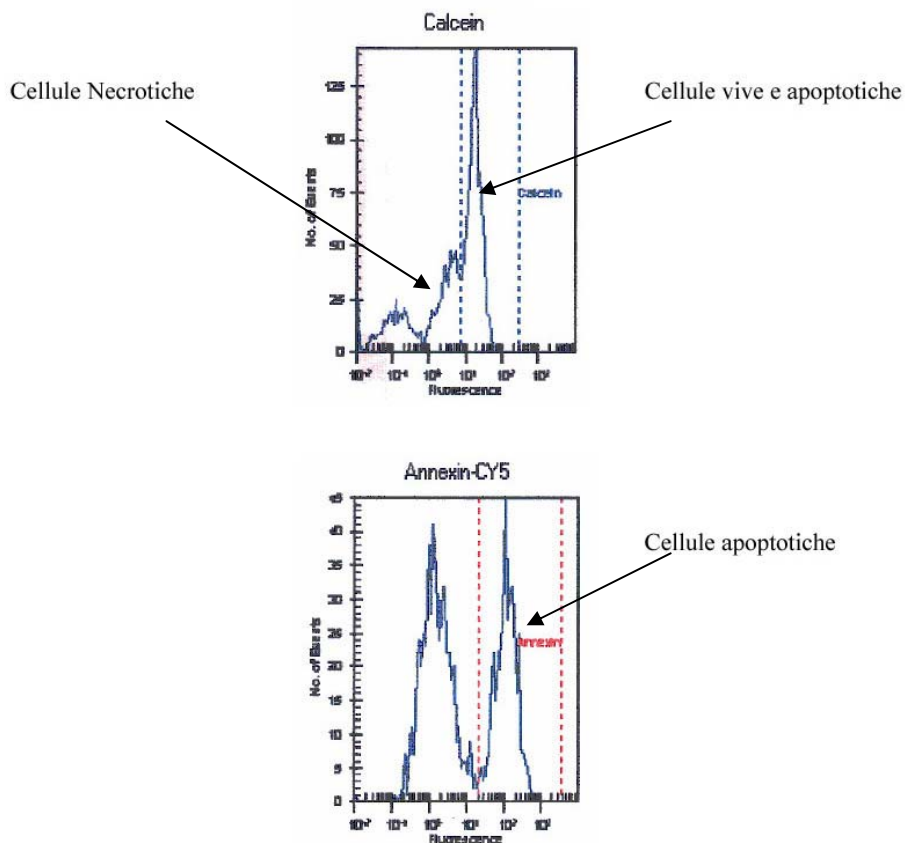


Figura 1 : Citogrammi ottenuti dopo doppia colorazione con calceina e Annexina/Cy5

4) Analisi dei livelli proteici di ciclina D2 e D3, CDK4 e CDK 6, p53, bax e bcl-2

Al fine di indagare i meccanismi molecolari che sottendono gli effetti citostatici e citotossici del SFN sono stati analizzati i livelli di alcune delle proteine più comunemente coinvolte in tali processi. Al termine del periodo di trattamento con SFN, le cellule sono state centrifugate, risospese in PBS ad una concentrazione di 1×10^6 cell/mL e trattate con SYTO 16[®] a 37°C al riparo dalla luce per 10 min. Al termine dell'incubazione, le cellule sono state lavate con 2 mL di staining buffer e trattate con 500 μ L di soluzione di permeabilizzazione per 10 min a temperatura ambiente. Le cellule sono state successivamente lavate con 2 mL di staining buffer ed incubate per 30 min a temperatura ambiente in presenza dell'anticorpo primario (Anti-human ciclina D2, Anti-human ciclina D3, Anti-human CDK4, Anti-human CDK6, Anti-human p53, Anti-human bax, Anti-human bcl-2) ad una concentrazione di 20 μ g/mL in un totale di 100 μ L di staining buffer. Trascorso il periodo di incubazione, sono stati effettuati due lavaggi, ciascuno con 2 mL di staining buffer, e quindi è stato aggiunto l'anticorpo secondario marcato con Cy-5 ad una concentrazione di 50 μ g/mL e per un tempo di 30 min in ghiaccio. Al termine, le colture sono state lavate con 2 mL di staining buffer per eliminare la presenza di segnali aspecifici e risospese in una quantità di cell buffer tale da ottenere una concentrazione di 2×10^6 cellule/mL. La preparazione del chip per l'analisi al Bioanalyzer 2100, è avvenuta secondo il protocollo sperimentale fornito dalla casa produttrice.

ANALISI STATISTICA

I risultati sono espressi come media \pm deviazione standard (DS) di due esperimenti. Per l'analisi statistica dei dati è stata effettuata l'analisi della varianza (ANOVA) ed il Dunnet o il Bonferroni come post test.

RISULTATI

STUDI IN VITRO

Cellule T linfoblastoidi (Jurkat)

Il trattamento delle cellule T-linfoblastoidi con SFN ha indotto una significativa alterazione del loro profilo proliferativo e fornito un marcato stimolo proapoptotico. Entrambi gli effetti sono risultati essere dose- e tempo- dipendenti. In particolare, in figura 1A sono riportati gli effetti del SFN sul ciclo cellulare. Per brevi tempi di trattamento (8 h), si osserva un aumento nella frazione di cellule in fase G₂/M (dal 17% al 24% alla concentrazione 30 µM) accompagnato da un lieve calo di quelle in fase G₁. Una più lunga esposizione (24 h) provoca un ulteriore calo delle cellule in fase G₁, mentre la percentuale di cellule in fase G₂/M registrata alla concentrazione 30 µM cresce dal 18% al 30% (Fig. 1B). Un'ancor più prolungata esposizione (48 h) porta ad una significativa diminuzione delle cellule in fase G₁ (dal 44% al 33% alla concentrazione più alta saggiata), ad un calo della percentuale di cellule in fase S (dal 44% al 38% alla concentrazione 30 µM) e in proporzione ad un marcato aumento delle cellule in fase G₂/M (dal 12% al 25% alla concentrazione 30 µM) (Fig. 1C). Tali effetti sono particolarmente evidenti in seguito a trattamento con le concentrazioni 15 e 30 µM di SFN.

La caratteristica perdita di simmetria dei fosfolipidi di membrana indica che il SFN è anche in grado di indurre morte cellulare correlata ad un meccanismo di tipo apoptotico. Gli effetti proapoptotici del SFN, così come quelli citostatici, sono particolarmente marcati alla concentrazione più alta saggiata (30 µM). Brevi tempi di trattamento (8h) causano solo un lieve incremento della frazione di cellule

apoptotiche (5% alla concentrazione 30 μ M vs 1% nel controllo). Tale frazione raggiunge il 16% dopo 24 h di esposizione e il 32% dopo 48h di esposizione al SFN (Fig. 2 A-C). Mediante la doppia colorazione Annexina accoppiata a Calceina è emerso inoltre che il SFN, alle massime concentrazioni e ai maggiori tempi di esposizione testati, causa morte cellulare mediante un meccanismo di tipo necrotico. Il fenomeno necrotico risulta essere caratterizzato dalla stessa cinetica di quello apoptotico. Infatti, dopo 8 h di trattamento alla concentrazione 30 μ M si osserva un 3% di cellule necrotiche (Annexina V^{pos} – Calceina^{neg}) e questa percentuale aumenta fino al 14% e al 30% dopo 24 e 48 h rispettivamente (Fig. 2 A-C).

Per analizzare l'effetto del SFN sui livelli di p53, bax e bcl-2 le cellule sono state trattate per 48 h con la concentrazione 30 μ M, condizione in cui si osserva il massimo effetto proapoptotico del SFN.

La figura 3 mostra gli istogrammi relativi ai livelli di proteine dopo trattamento con SFN rispetto al controllo. L'espressione di p53 e di bax risulta incrementata di 7 e 3 volte rispettivamente, mentre il livello di bcl-2 risulta solo lievemente modulato dal SFN.

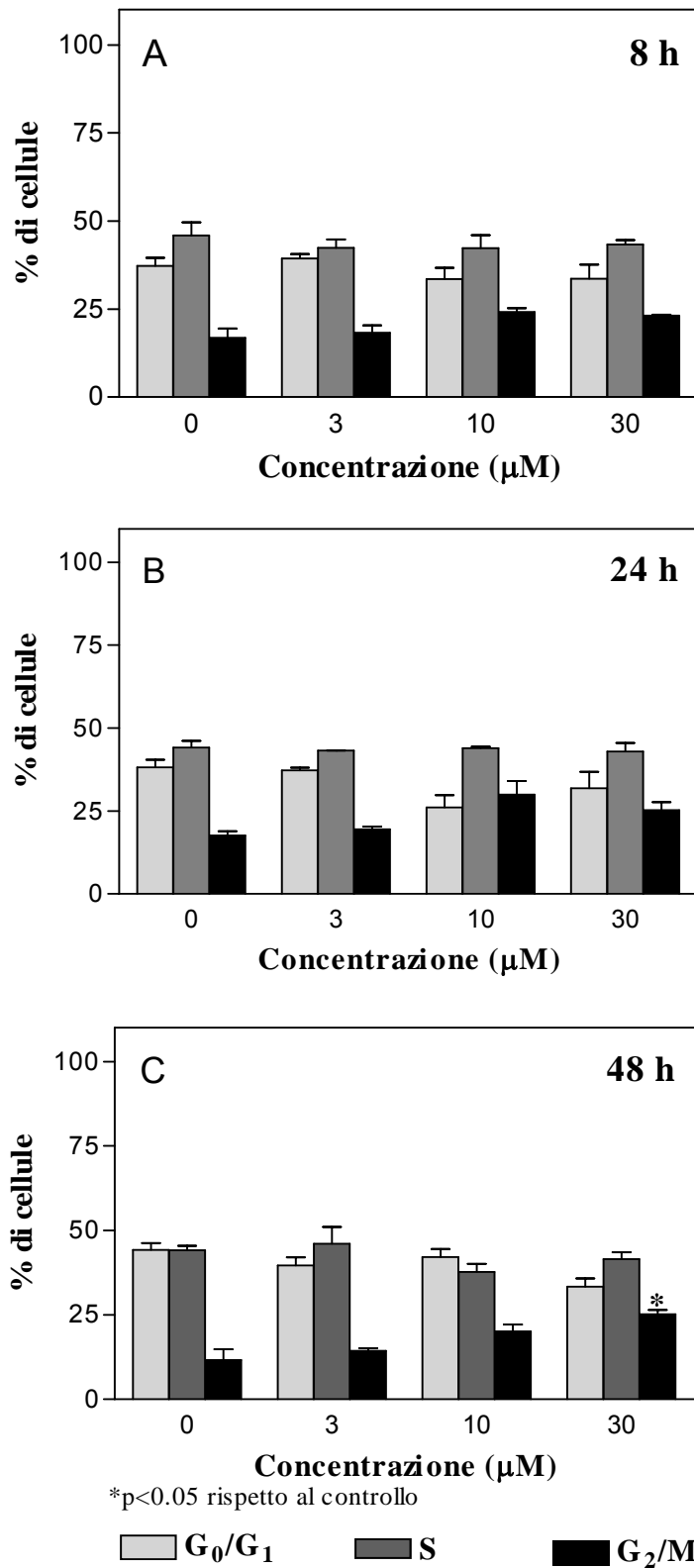


Fig. 1 (A, B, C): Effetti del SFN sul ciclo cellulare delle cellule Jurkat

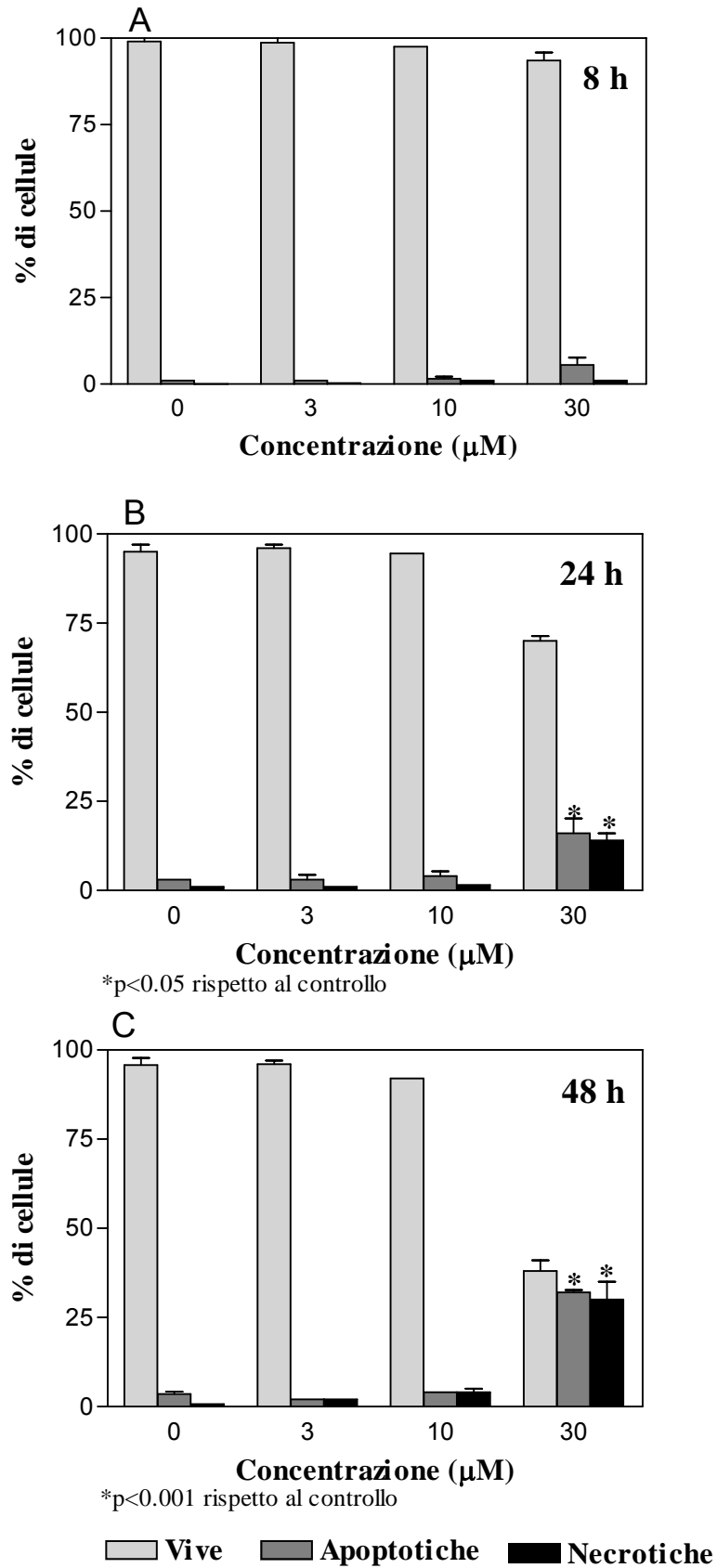


Fig. 2 (A, B, C): Effetti del SFN sull'induzione di apoptosi nelle cellule Jurkat

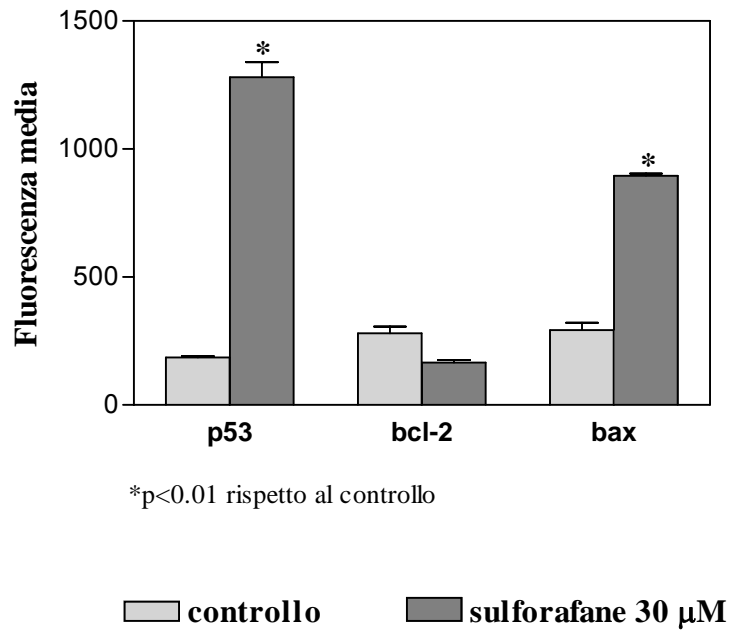


Fig. 3: Effetti del SFN sui livelli di espressione delle proteine p53, bcl-2 e bax delle cellule Jurkat dopo 48 h di trattamento

Linfociti T non trasformati

In seguito a stimolazione con PHA, i linfociti T entrano in fase G_1 dopo 2-4 h, in fase S dopo circa 18-24 h e in fase G_2/M dopo 36-48 h. Al tempo 0 tutte le cellule, sia nelle colture di controllo che in quelle trattate, si trovano in fase G_0/G_1 (Fig. 4A).

Gli effetti del SFN sui linfociti T non trasformati sono simili a quelli osservati sulle cellule Jurkat.

L'analisi del ciclo cellulare ha dimostrato che il SFN provoca un incremento dose-correlato di cellule in fase G_0/G_1 rispetto al controllo. In particolare, dopo 24 h di trattamento, la frazione di cellule in fase G_0/G_1 è pari al 79% alla concentrazione 3 μ M, al 92%

alla concentrazione 10 μM e al 95% alla concentrazione 30 μM . Inoltre, alle concentrazioni 10 μM e 30 μM si nota anche un decremento della frazione di cellule in fase S rispetto al controllo (Fig 4B). È interessante sottolineare che, dopo 48 e 72 h di trattamento, solo le concentrazioni più alte modulano la frazione di cellule in fase G_0/G_1 e in fase S (Fig. 4C e 4D). Ad esempio, dopo 72 h di trattamento con la concentrazione 30 μM , la frazione di cellule in fase G_0/G_1 è pari al 94%, mentre la frazione di quelle in fase S è pari al 4%. Contrariamente a quanto osservato nelle cellule Jurkat, la frazione di cellule in fase G_2/M non è alterata dal SFN a nessuno dei tempi e a nessuna delle dosi testati (Fig. 4 A-D).

L'analisi dei livelli di proteine coinvolte nella regolazione del ciclo cellulare è stata condotta alla concentrazione di SFN che ha causato il massimo effetto antiproliferativo (30 μM). Poiché il SFN ha indotto un blocco in fase G_1 , l'analisi dei livelli proteici si è indirizzata a quelle cicline e CDK coinvolte nella regolazione di questa fase del ciclo cellulare. Il SFN provoca una marcata riduzione dell'espressione della ciclina D3 (Fig. 5), mentre l'espressione della ciclina D2, di CDK4 e CDK6 è ridotta in modo non significativo (dati non mostrati). In particolare, l'espressione della ciclina D3 è ridotta a tutti i tempi di esposizione e il massimo effetto è stato registrato a 24 h, dove il decremento è pari al 60% rispetto al controllo (Fig. 5).

Per quanto riguarda l'apoptosi, l'analisi citofluorimetrica ha rivelato che, dopo 24 e 30 h, solo una piccola frazione di cellule, sia nel controllo che nei trattati (a tutte le concentrazioni), presenta caratteristiche apoptotiche (Annexina V^{pos} - Calceina $^{\text{pos}}$) o necrotiche (Annexina V^{pos} - Calceina $^{\text{neg}}$). A 48 e 72 h, invece, la differenza fra controllo e trattato diventa significativa già alla concentrazione 10 μM per l'apoptosi e alla 30 μM anche per la necrosi. Ad esempio, dopo 72 h di trattamento con SFN 30 μM , solo il 16% di cellule sono vitali, mentre il 50% sono apoptotiche e il 34% sono necrotiche (Fig. 6 A-D).

Poiché gli effetti proapoptotici del SFN risultano particolarmente marcati dopo 72 h di trattamento alla concentrazione 30 μ M, i livelli di p53, bcl-2 e bax sono stati analizzati in queste condizioni sperimentali. L'analisi ha evidenziato un significativo incremento dei livelli di p53, mentre i livelli di bcl-2 e bax risultano invariati rispetto alle colture di controllo (Fig. 7).

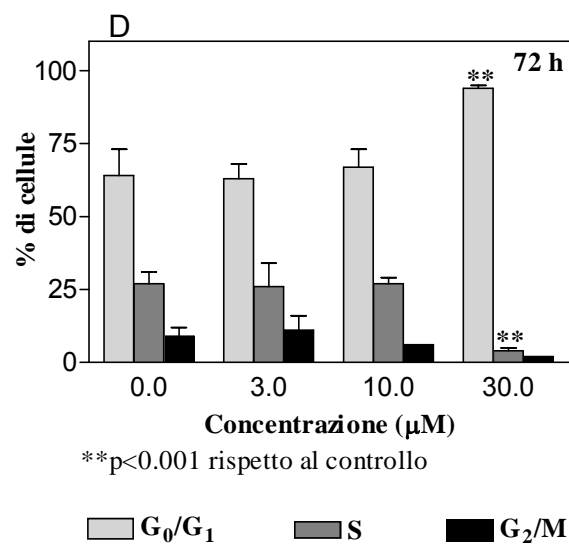
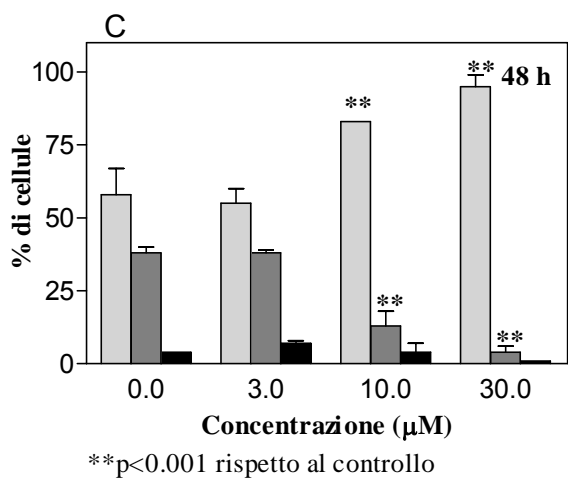
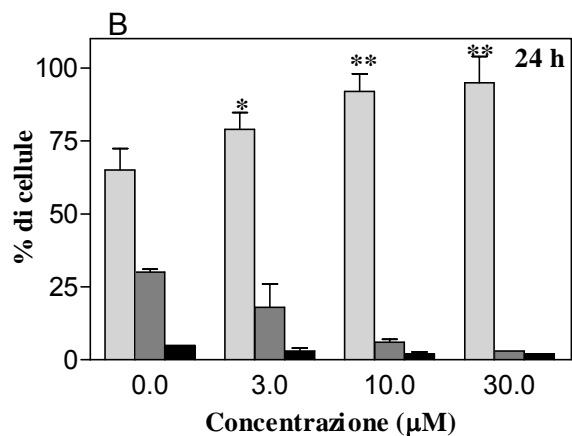
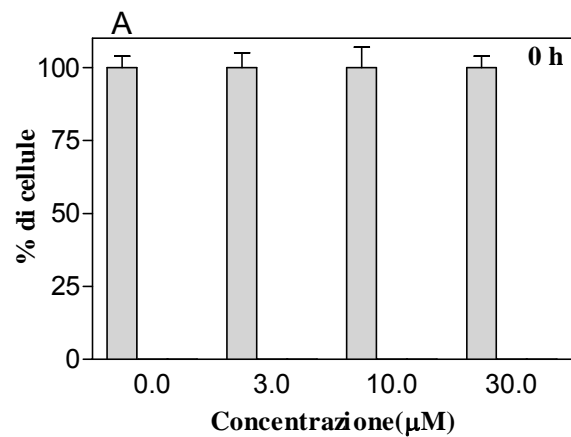


Fig. 4 (A, B, C, D): Effetti del SFN sul ciclo cellulare di linfociti T non trasformati

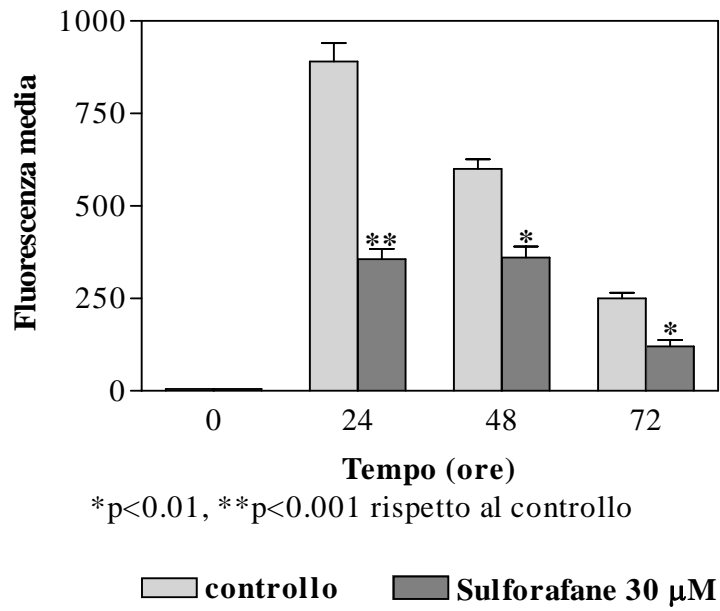


Fig. 5: Effetti del SFN sui livelli di espressione di ciclina D3 di linfociti T non trasformati

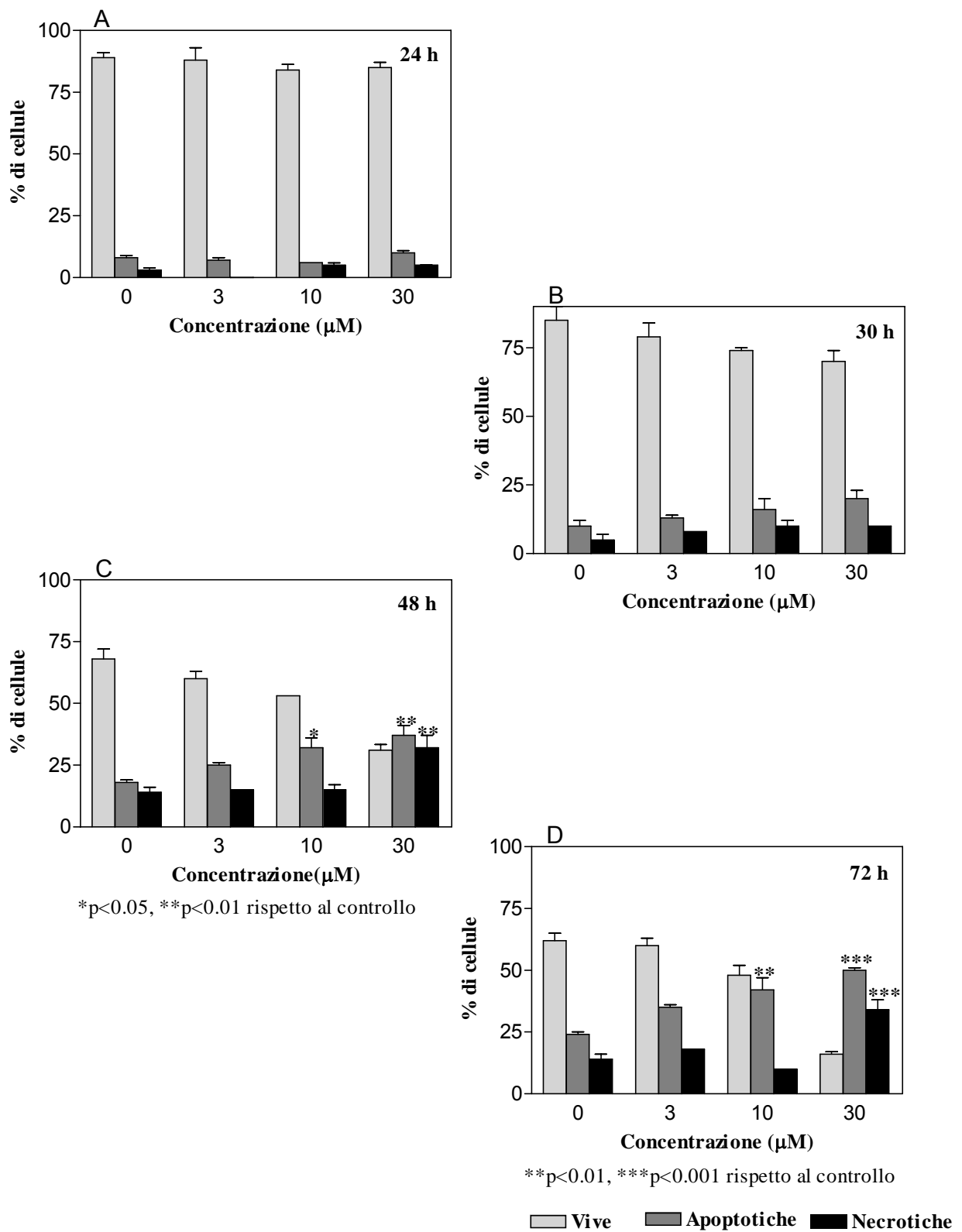


Fig. 6 (A, B, C, D): Effetti del SFN sull'induzione di apoptosi in linfociti T non trasformati

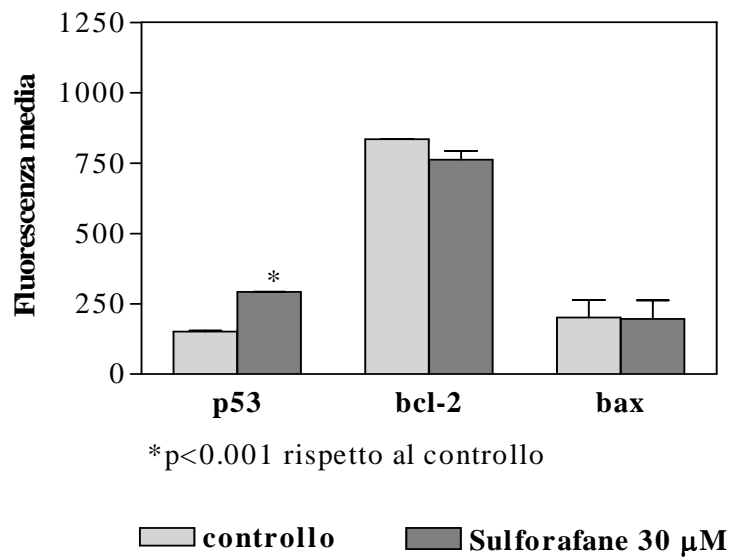


Fig. 7: Effetti del SFN sui livelli di espressione delle proteine p53, bcl-2 e bax in linfociti T non trasformati dopo 72 h di trattamento

STUDIO EX VIVO

I pazienti arruolati comprendono 2 casi di LLC, 7 casi di LMA, 3 casi di LLA, 1 caso di Leucemia Acuta Bifenotipica, 1 caso di Linfoma Nasal Type. Le caratteristiche di pazienti e la relativa diagnosi sono riportate in tabella 1.

N°	Sesso	Età	N° leucociti (cellule/ml) [infiltrazione midollare]	Diagnosi (classifica FAB)	Precedenti terapie
#1	F	67	20 000-37 000 [80%]	LLC	Trattamento con clorambucil, interrotto dopo meno di un ciclo per tossicità ematologica, terminato 3 anni prima del prelievo.
#2	F	76	16 000-25 000 [35-40%]	LLC	Nessuna
#3	M	38	[70-80%]	LMA (M0)	Nessuna
#4	M	39	[70%]	LMA (M0)	Terapia di induzione ad alte dosi secondo protocollo gimema, terminata 2 mesi prima del prelievo, a cui il paziente non ha risposto. Al momento del prelievo si presentava in progressione di malattia.
#5	F	31	250 000 [totale]	LMA (M2)	Resistente a I e II induzione, resistente alla terapia di salvataggio, sottoposta a terapia di condizionamento in malattia, a cui non ha risposto, sottoposta a trapianto compassionevole.
#6	F	19	13 600	LMA (M2)	Nessuna
#7	F	30	79 000	LMA (M1)	Blanda terapia di debulky con idrossiurea
#8	F	60	79 010	LMA (M2)	Attualmente fuori

					terapia da 6 mesi, in ennesima recidiva pluritrattata con diversi cicli chemioterapici ed allotrapianto da donatore familiare compatibile.
#9	F	47	159 000	LMA (M2)	Nessuna
#10	M	24	50 000 [50%]	LLA a cellule T	Nessuna terapia citostatica
#11	F	24	27 700 [subtotale]	LLA a cellule T	Nessuna terapia citostatica
#12	M	48	96 000 [massiva]	LLA a cellule B mature	Nessuna terapia citostatica
#13	F	55	60 000 globuli bianchi e 20 000 piastrine, 97% di blasti in periferia [subtotale]	Leucemia Acuta Bifenotipica (mieloide-linfoide)	Nessuna
#14	F	31	30 000 globuli bianchi, 90% di blasti nel sangue periferico, infiltrazione midollare subtotale	Linfoblasti che esprimono tutti i markers delle cellule natural killer e massa solida di tessuto linfatico nasale. La diagnosi è stata di linfoma nasal type ad imponente leucemizzazione.	Nessuna (prognosi pessima).

Tab. 1: Caratteristiche dei pazienti in studio

Tre campioni sono stati esclusi dallo studio perché caratterizzati da una mortalità spontanea superiore al 90%.

Il SFN non sembra possedere alcuna attività su campioni da pazienti affetti da LLC. Infatti, nel campione 1 anche trattamenti con SFN ad alte concentrazioni (30 μ M) e per lunghi tempi (48 h) incrementano solo lievemente la percentuale di cellule apoptotiche rispetto al controllo (42.3% vs 32.4%) (Fig.8A). Nel campione 2 la frazione di

cellule apoptotiche massima, registrata dopo 48 h di trattamento con la concentrazione 30 μM , è pari al 38.9% rispetto al 30% registrato nelle colture di controllo (Fig. 8B).

L'effetto proapoptotico del SFN si registra, invece, in tutti i campioni da pazienti affetti da LMA. In particolare, nel campione 3 si ha un marcato incremento della percentuale di cellule apoptotiche già dopo 24 h di trattamento con entrambe le concentrazioni saggate (15 e 30 μM) e questa percentuale aumenta ancora dopo 48 h di trattamento fino al 78% e al 82.5% rispettivamente (Fig.9A). È importante sottolineare l'attività del SFN sui campioni 4 e 5, provenienti da pazienti caratterizzati da resistenza al trattamento polichemioterapico. La frazione di cellule apoptotiche evidenziata nel campione 4 dopo 48 h di trattamento con la concentrazione più alta testata (30 μM) risulta aumentata di oltre 3 volte rispetto al controllo (41.3% vs 13%) (Fig. 9B).

L'effetto proapoptotico più marcato si evidenzia nel campione 5 dove la percentuale di cellule apoptotiche ha raggiunto il 49% dopo 48 h di trattamento con SFN 30 μM . La frazione di cellule apoptotiche registrata è quindi 5 volte più alta rispetto a quella osservata nelle colture non trattate (9.1%) (Fig. 9C). Infine, il SFN induce apoptosi anche nel campione 9, aumentando la percentuale di cellule apoptotiche a tutti i tempi di esposizione (6, 24, 48, 72 h) e ad entrambe le concentrazioni saggate (15 e 30 μM) (Fig. 9D).

L'attività del SFN sui campioni da pazienti affetti da LLA differisce a seconda che la leucemia sia a cellule T o B. L'effetto più marcato si osserva senz'altro sul campione da paziente affetto da LLA a cellule B, dove la % di cellule apoptotiche aumenta dal 27% presente nelle colture di controllo al 55% delle colture trattate con SFN 15 μM (Fig. 10C). L'effetto sui campioni di LLA a cellule T è evidenziabile, ma nettamente più lieve. In entrambi i campioni analizzati l'attività più marcata si registra dopo 48 h di trattamento con la concentrazione 15 μM . In particolare, nel campione 10 la frazione di cellule

apoptotiche raggiunge l'85% e nel campione 11 il 49% (nelle colture di controllo la % di apoptosi è del 51.5% e 31.4% rispettivamente) (Fig 10A e 10B).

L'attività del SFN sul campione di Leucemia Acuta Bifenotipica è molto diversa rispetto a quella osservata sulle altre forme di leucemia. È, infatti, evidenziabile una marcata attività soprattutto dopo tempi di trattamento brevi piuttosto che dopo tempi più lunghi. La percentuale di cellule apoptotiche registrata nelle colture trattate con SFN 30 μ M raggiunge il 50% a 6 h e il 73.6% a 24 h (vs il 30.5% e il 46% rispettivamente nei controlli), ma l'effetto cala drasticamente dopo 48 e 72 h di trattamento (46.9% vs 46% nel controllo e 50.6% vs 37.7% nel controllo) (Fig. 11).

Infine, il SFN non si è dimostrato possedere alcuna attività sul campione di Linfoma Nasal Type ad imponente leucemizzazione, dove 24 h di trattamento con la concentrazione 15 μ M incrementano solo lievemente la percentuale di cellule apoptotiche rispetto al controllo (29.1% vs 21.7%) (Fig. 12).

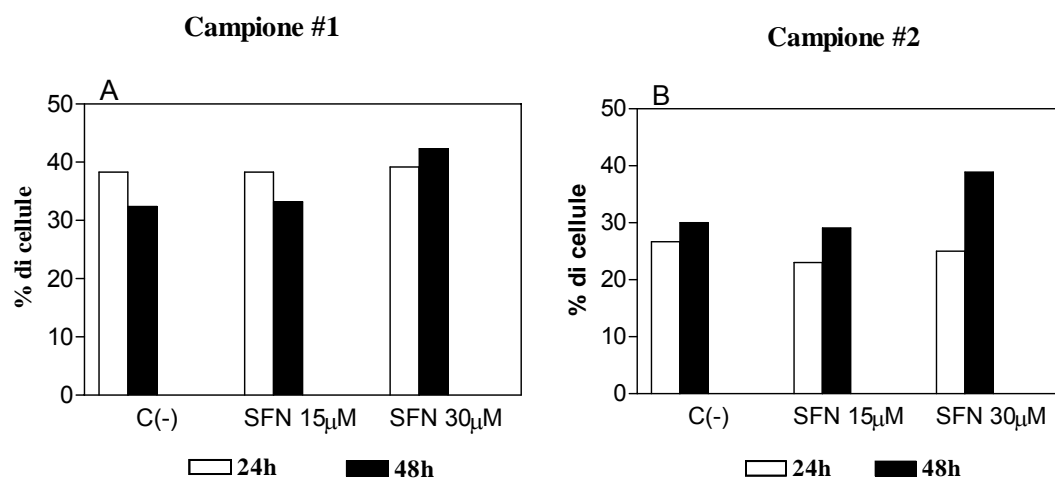


Fig. 8 (A, B): Effetti del SFN sull'induzione di apoptosi nei campioni da pazienti affetti da LLC

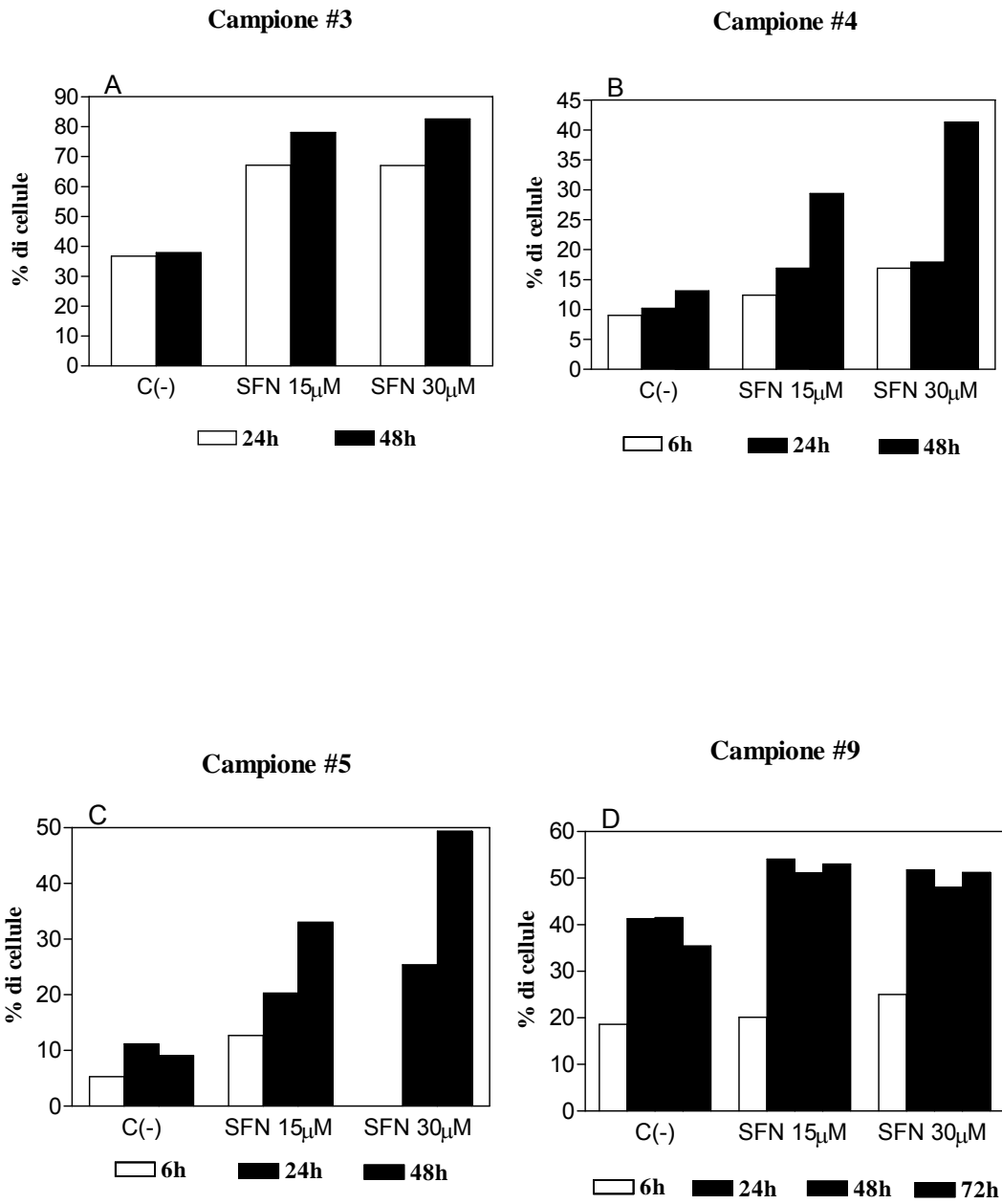
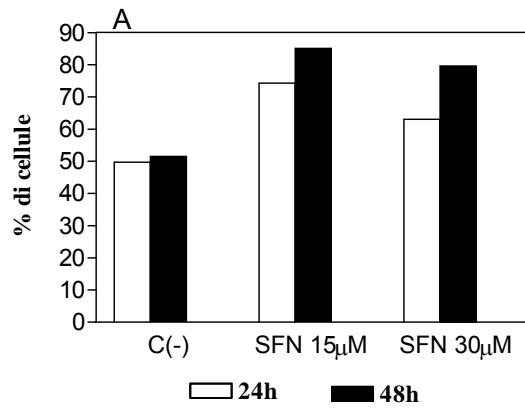
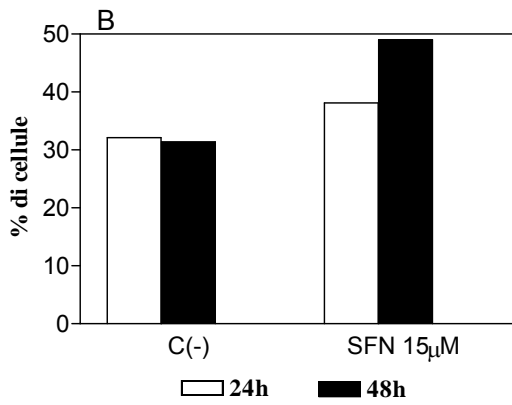


Fig. 9 (A, B, C, D): Effetti del SFN sull'induzione di apoptosi nei campioni da pazienti affetti da LMA

Campione #10



Campione #11



Campione #12

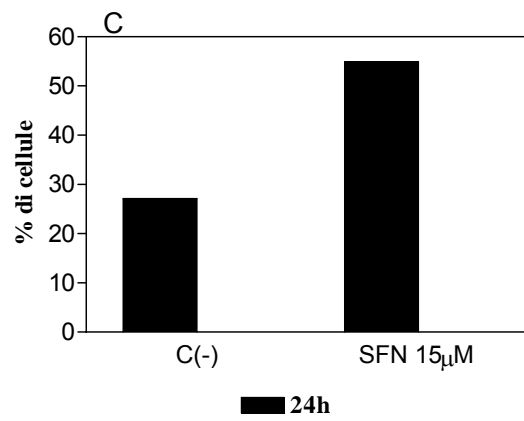


Fig. 10 (A, B, C): Effetti del SFN sull'induzione di apoptosi nei campioni da pazienti affetti da LLA

Campione #13

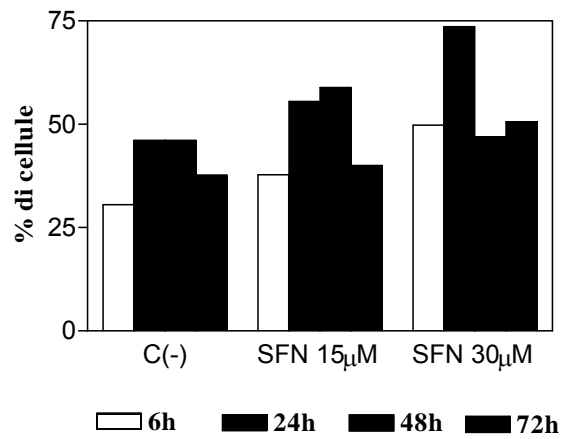


Fig. 11: Effetti del SFN sull'induzione di apoptosi nel campione da paziente affetto da Leucemia Bifenotipica Acuta

Campione #14

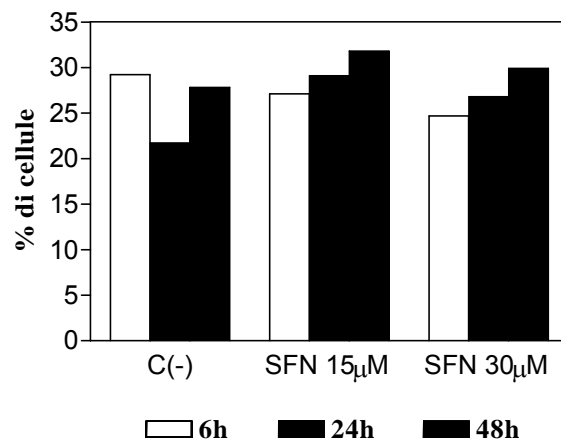


Fig. 12: Effetti del SFN sull'induzione di apoptosi nel campione da paziente affetto da Linfoma Nasal Type

DISCUSSIONE

Nonostante le approfondite ricerche sulla biologia delle leucemie ed i significativi progressi conseguiti in questo contesto, il trattamento delle leucemie, ed in particolare delle acute, è cambiato poco negli ultimi 20 anni e la maggior parte dei pazienti con leucemia acuta non sopravvive alla patologia.

Negli ultimi decenni, il caposaldo nella terapia della leucemia è stato quello di indurre una completa remissione della malattia e successivamente consolidare tale stato con cicli successivi di chemioterapia. Nonostante lo sviluppo di numerosi nuovi agenti efficaci nel ridurre la massa tumorale in pazienti leucemici, le ricadute continuano ad essere la principale causa di morte, in particolare in pazienti con AML. Solo ~70% degli adulti con una diagnosi di AML ottiene una completa remissione dopo chemioterapia d'induzione citotossica. In alcuni sottogruppi, inclusi gli anziani (Goldstone et al., 2001; Grimwade et al., 2001) e i pazienti con AML legata a esposizioni ambientali o occupazionali (incluse le AML indotte dalla terapia), si registra un tasso di remissione completa del 40%, una durata della remissione completa di 12 mesi ed una percentuale di guarigione del 10-15% (Goldstone et al., 2001; Grimwade et al., 2001). La prospettiva complessiva per i pazienti affetti da ALL è simile (Kantarjian et al., 2000; Petersdorf et al., 2001). Le leucemie continuano, quindi, a rappresentare una formidabile sfida terapeutica, che stimola al miglioramento dell'approccio farmacologico attraverso la ricerca e lo sviluppo di nuovi agenti dotati di una migliore efficacia.

L'efficacia non è comunque l'unico requisito da perseguire nello sviluppo di nuove molecole. La maggior parte dei farmaci antitumorali oggi impiegati sono caratterizzati da un marcato profilo

di tossicità, ed anche farmaci antileucemici di recente impiego e particolarmente innovativi, quali l'imatinib, sono genotossici e possono, quindi, favorire l'evoluzione clonale di cellule normali verso la trasformazione neoplastica (Fabarius et al., 2005). Lo sviluppo di nuovi agenti antileucemici resta dunque un obiettivo primario della ricerca attuale.

Il SFN è stato identificato come potenziale agente chemiopreventivo grazie alla sua capacità di attivare percorsi cellulari diversi attraverso molteplici meccanismi d'azione, che includono l'induzione di enzimi responsabili della detossificazione dei cancerogeni, l'induzione di apoptosi ed il blocco della progressione del ciclo di cellule tumorali, l'inibizione della HDAC (Fimognari e Hrelia, 2007).

Sulla base di queste osservazioni obiettivo della presente tesi è stato valutare il potenziale antileucemico del SFN, con particolare attenzione agli effetti antiproliferativi e proapoptotici.

Il SFN si è dimostrato in grado di provocare una potente inibizione della proliferazione delle cellule T linfoblastoidi, mediante blocco del ciclo cellulare e induzione di apoptosi. L'analisi del DNA delle colture trattate con SFN ha infatti rivelato una completa deregolazione del ciclo cellulare di questa linea leucemica, che culmina in un significativo blocco della progressione del ciclo cellulare in fase G₂/M.

Il SFN è anche dotato di un precoce effetto proapoptotico, che si osserva dopo tempi di trattamento piuttosto brevi e comunque antecedenti alla comparsa del blocco in fase G₂/M. Ciò suggerisce che l'effetto proapoptotico sia un evento indotto dal SFN in modo diretto e non rappresenti invece l'esito finale del suo effetto antiproliferativo.

Tuttavia, una prolungata esposizione (48 h) a dosi elevate di SFN induce morte cellulare attraverso un meccanismo di tipo necrotico, risultato che evidenzia un suo potenziale tossico.

L'induzione di apoptosi da parte del SFN appare sostenuta da un intervento del p53, come dimostrato dall'incrementata espressione di tale molecola a livello proteico. Ciò potrebbe essere riconducibile alla capacità del SFN di coniugare, una volta entrato nelle cellule, il GSH e depletarne drammaticamente i livelli (Zhang e Callaway, 2002). Il conseguente sbilanciamento delle difese antiossidanti renderebbe la cellula più suscettibile al danno ossidativo e, quindi, all'attivazione della c-Jun chinasi N-terminale, di cui p53 è substrato.

Il trattamento con SFN incrementa anche i livelli proteici di bax. Ciò non sorprende, in considerazione del fatto che p53 è un attivatore trascrizionale diretto di bax. L'induzione di apoptosi evidenziata in questa prima parte della ricerca sembra dunque dipendere dal gene p53. È tuttavia importante sottolineare che le cellule T linfoblastoidi usate in questo studio (cellule Jurkat) sono caratterizzate dalla presenza di un p53 mutato, evidenza che consente di ipotizzare che il SFN non necessiti per svolgere la sua attività di un p53 pienamente funzionale.

La capacità del SFN di indurre apoptosi in questo modello sperimentale è di conseguenza ancor più rilevante, dato che generalmente l'attività di numerosi agenti chemiopreventivi è p53-dipendente e non si verifica su cellule prive di p53 intatto.

Selettività d'azione e bassa tossicità nei confronti dei tessuti sani sono tra i requisiti fondamentali di un potenziale agente antitumorale. In cellule neoplastiche o preneoplastiche, l'inibizione della proliferazione e l'induzione di apoptosi possono essere sfruttati come meccanismi rivolti ad eliminare le cellule tumorali, ma, nel caso in cui si verificano su cellule sane, questi stessi effetti potrebbero essere correlati ad un danno del DNA. Se, infatti, la massa neoplastica non costituisce il target esclusivo o almeno preferenziale dell'agente antitumorale, questo può comportare la comparsa di effetti tossici.

Gli effetti del SFN sul ciclo cellulare e sull'induzione di apoptosi sono stati, quindi, indagati anche su linfociti T sani, come controparte non

trasformata delle cellule Jurkat. I risultati ottenuti dimostrano che il SFN è attivo e, quindi, citotossico anche nei confronti dei linfociti non trasformati.

Il SFN, infatti, induce un rallentamento del ciclo cellulare attraverso un blocco in fase G_1 . L'analisi di alcune delle molecole che operano in questa fase ha evidenziato che il trattamento con SFN provoca un marcato decremento della ciclina D3, mentre l'espressione della ciclina D2, di CDK4 e di CDK6 risultano solo lievemente attenuate. Questa diversa attività del SFN su molecole che regolano, attraverso una complessa interazione, la progressione del ciclo cellulare nella fase G_1 fornisce alcune importanti indicazioni. La ciclina D2 e la ciclina D3 agiscono, infatti, in tempi diversi e giocano ruoli diversi e non ridondanti nella regolazione della proliferazione linfocitaria. La ciclina D2 è attivata molte ore prima della ciclina D3. Ciò evidenzia il coinvolgimento della ciclina D2 nelle prima parte della fase G_1 (transizione G_0/G_1) e della ciclina D3 nella parte più tardiva della fase G_1 (transizione G_1/S).

CDK4 e CDK6 sono coinvolte soprattutto nel blocco piuttosto che nel rallentamento della fase G_1 . L'azione antiproliferativa del SFN su linfociti non trasformati è caratterizzata, quindi, da un rallentamento piuttosto che da un blocco del ciclo cellulare in una fase tardiva (transizione G_1/S) della fase G_1 .

Anche sui linfociti T non trasformati è stato infine osservato un progressivo aumento della frazione di cellule apoptotiche tempo- e dose-dipendente e un incremento nella frazione di cellule necrotiche in seguito a una prolungata esposizione alla più alta concentrazione testata.

L'analisi di alcune delle proteine che regolano l'apoptosi ha evidenziato un aumento dell'espressione di p53, mentre bcl-2 e bax sono risultati solo moderatamente influenzati. L'azione proapoptotica del SFN sembra, quindi, essere chiaramente mediata dal p53 in linfociti sani.

È interessante a questo punto confrontare questi dati con quelli ottenuti su cellule T linfoblastoidi. L'attività del SFN sui due modelli cellulari è qualitativamente differente: nelle cellule Jurkat, si osserva un blocco in fase G₂/M; nei linfociti non trasformati la modulazione del ciclo cellulare avviene in fase G₁, mentre la frazione di cellule in fase G₂/M rimane pressoché invariata. Inoltre, nelle cellule Jurkat è stato evidenziato un incremento nella frazione di cellule apoptotiche di circa 7 volte rispetto al controllo, mentre alla stessa concentrazione nei linfociti non trasformati si è osservato un aumento pari solo al doppio. L'effetto del SFN appare, quindi, certamente più pronunciato nelle cellule Jurkat e soprattutto mediato da percorsi molecolari differenti (blocco in fase G₂/M nelle cellule Jurkat vs blocco in G₁ nei linfociti sani).

Nel loro insieme, questi risultati sottolineano la necessità di un'accurata valutazione del profilo di tossicità del SFN e consentono di ipotizzare la possibilità di identificare un range di concentrazioni efficaci nei confronti delle cellule tumorali, ma scarsamente attive su cellule non trasformate.

Sulla base di questi incoraggianti risultati, gli effetti del SFN sono stati successivamente analizzati in uno studio *ex vivo*. Nel contesto dello sviluppo di un farmaco antitumorale, lo studio *ex vivo* rappresenta un modello di altissima rilevanza nel predire la risposta farmacologica del paziente *in vivo*. Nell'ambito delle leucemie, in particolare, la popolazione leucemica di un paziente è formata da cellule variamente differenziate ed indifferenziate, che potrebbero rispondere in maniera molto diversa da una linea cellulare leucemica, caratterizzata da una unica popolazione cellulare estremamente omogenea. Lo stesso processo di creazione di una linea cellulare può comportare l'espressione di una varietà di molecole di adesione e di antigeni di differenziazione, non osservabili nei blasti prelevati da paziente (Bosanquet e Bell, 2004).

Allo scopo, sono stati reclutati alcuni pazienti affetti da diversi tipi di leucemia (acuta, cronica; mieloide, linfoide), su cui è stato testato il SFN.

Il SFN possiede una significativa attività antileucemica anche sul modello *ex vivo*, sebbene siano emerse alcune importanti differenze rispetto alle evidenze degli studi *in vitro*. Ad esempio, nei campioni *ex vivo* l'effetto proapoptotico del SFN è molto precoce e si osserva già dopo 6 h di trattamento, mentre *in vitro* l'effetto si registra solo dopo 24 o addirittura 48 h di trattamento. Nei campioni *ex vivo*, inoltre, gli effetti del SFN si osservano a concentrazioni nettamente più basse (3 volte circa) rispetto a quelle necessarie per indurre una risposta nelle linee cellulari.

Queste osservazioni potrebbero avere un impatto clinico non trascurabile. La somministrazione di un farmaco attraverso infusione continua è tecnicamente e clinicamente realizzabile, tuttavia, tempi di trattamento brevi risultano certamente più pratici. Inoltre, la possibilità di impiego di dosi contenute di SFN permetterebbe di limitare o addirittura annullare gli effetti tossici a carico delle cellule sane.

Per quanto riguarda gli effetti osservati sui vari tipi di leucemia, il SFN si è rivelato scarsamente attivo quando saggiato su cellule provenienti da pazienti affetti da LLC, benché questa sia caratterizzata dall'incapacità delle cellule di andare incontro ad apoptosi. Infatti, in entrambi i campioni analizzati, anche trattamenti con SFN ad alte concentrazioni (30 μ M) e per lunghi tempi (48h) incrementano solo lievemente la percentuale di cellule apoptotiche.

Un marcato effetto proapoptotico del SFN si registra, invece, nei campioni da pazienti affetti da LMA e, dato particolarmente rilevante, anche nei campioni da pazienti multiresistenti. Ad esempio, nel campione 5, proveniente da un paziente resistente sia alla prima che alla seconda terapia di induzione, la frazione di cellule apoptotiche

registrata dopo 48 h di trattamento con SFN 30 μ M è 5 volte più alta rispetto a quella osservata nelle colture non trattate.

L'attività del SFN sui campioni da pazienti affetti da LLA differisce a seconda che la leucemia sia a cellule T o B. L'effetto più marcato si osserva senz'altro sul campione da paziente affetto da LLA a cellule B. L'effetto sui campioni di LLA a cellule T è nettamente più lieve, contrariamente a quanto si potesse prevedere sulla base del potenziale proapoptotico del SFN evidenziato sulle cellule Jurkat, che sono cellule di derivazione T linfoblastoide.

Interessanti sono anche i risultati relativi all'attività del SFN sul campione di Leucemia Acuta Bifenotipica, se si tiene in considerazione la difficoltà legata all'identificazione di una terapia efficace che caratterizza le forme di leucemia ibride miste. In questo caso, gli effetti del SFN sono molto diversi rispetto a quelli osservati sulle altre forme di leucemia. È, infatti, evidenziabile una marcata attività proapoptotica solo dopo tempi brevi di trattamento (6 h), mentre l'effetto cala fino quasi a scomparire dopo tempi di trattamento più lunghi.

Infine, il SFN non si è dimostrato possedere alcuna attività sul campione di Linfoma Nasal Type ad imponente leucemizzazione.

Il SFN si configura, quindi, come un promettente composto ad attività antileucemica dotato però di una certa specificità per alcuni tipi di leucemia, in particolare le acute.

La diversa attività evidenziata dal SFN sul modello di leucemia acuta piuttosto che su sul modello di cronica è probabilmente imputabile alla differente popolazione cellulare che identifica le diverse forme di leucemia. Le leucemie acute, infatti, sono caratterizzate da un accumulo di blasti altamente indifferenziati, incapaci di maturare in cellule adulte e che conservano un alto stato proliferativo. Le croniche, al contrario, sono caratterizzate dalla presenza di cellule relativamente mature e quindi maggiormente differenziate. Il SFN in precedenti studi si è dimostrato in grado di stimolare la

differenziazione cellulare, generando cellule con potenzialità replicativa nulla o comunque limitata, che vanno poi incontro ad apoptosi (Fimognari et al., 2008). Questa capacità del SFN potrebbe quindi giustificare la sua spiccata attività sul modello di leucemia acuta piuttosto che di leucemia cronica.

Il potenziale impatto clinico di tale specificità d'azione è comunque spiccato. Le leucemie acute sono patologie caratterizzate da prognosi severa e sovente infausta e dalla comparsa di resistenza al trattamento chemioterapico. L'incapacità del SFN di indurre un effetto proapoptotico anche sul modello di leucemia cronica va considerato, anche se non ha un forte impatto dal punto di vista clinico. Le leucemie croniche sono spesso patologie indolenti o con bassa attività proliferativa, tanto che in alcune forme i soggetti rimangono asintomatici e non richiedono alcun trattamento per diversi anni, mentre in altre i soggetti sono trattati con successo mediante l'impiego di farmaci rivolti in modo specifico verso particolari alterazioni molecolari che caratterizzano la patologia (gene di fusione BCR-ABL).

Nel complesso i risultati ottenuti sostengono la capacità del SFN di contrastare il processo di leucemogenesi ed incoraggiano ad approfondire le ricerche ampliando la popolazione di pazienti in studio ed eventualmente, sulla base dei risultati ottenuti su un maggior numero di pazienti arruolati, a procedere alla pianificazione di uno studio clinico pilota.

BIBLIOGRAFIA

1. Asakage M., N.H. Tsuno, J. Kitayama, T. Tsuchiya, S. Yoneyama, J. Yamada, Y. Okaji, S. Kaisaki, T. Osada, K. Takahashi, H. Nagawa, Sulforaphane induces inhibition of human umbilical vein endothelial cells proliferation by apoptosis, *Angiogenesis* (2006) 9: 83-91.
2. Bacon J.R., Plumb G.W., Howie A.F., Beckett G.J., Wang W., Bao Y., Dual action of sulforaphane in the regulation of thioredoxin reductase and thioredoxin in human HepG2 and Caco-2 cells, *J Agric Food Chem.* (2007) 55(4): 1170-6.
3. Barcelo S., J.M. Gardiner, A. Gescher, J.K. Chipman, CYP2E1-mediated mechanism of anti-genotoxicity of the broccoli constituent sulforaphane, *Carcinogenesis* (1996) 17: 277-282.
4. Barcelo S., K. Mace, A.M. Pfeifer, J.K. Chipman, Production of DNA strand breaks by N-nitrosodimethylamine and 2-amino-3-methylimidazo[4,5-f]quinoline in THLE cells expressing human CYP isoenzymes and inhibition by sulforaphane, *Mutat. Res.* (1998) 402: 111-120.

5. Basten G.P., Y. Bao, G. Williamson, Sulforaphane and its glutathione conjugate but not sulforaphane nitrile induce UDP-glucuronosyl transferase (UGT1A1) and glutathione transferase (GSTA1) in cultured cells, *Carcinogenesis* (2002) 23: 1399-1404.
6. Batchelor T. Temozolomide for malignant brain tumours, *Lancet*. (2000) 355(9210): 1115-6
7. Bene M.C., Castaldi G., Knapp W., Ludwig W.D., Matutes E., Proposal for the immunological classification of the acute leukaemias, *Leukemia* (1995) 9: 1783-1786.
8. Béné M.C., Bernier M., Castoldi G., Faure G.C., Knapp W., Ludwig W.D., Matutes E., Orfao A., van't Veer M., Impact of immunophenotyping on management of acute leukemias, *Haematologica*. (1999) 84(11): 1024-34.
9. Bertl E., Bartsch H., Gerhäuser C., Inhibition of angiogenesis and endothelial cell functions are novel sulforaphane-mediated mechanisms in chemoprevention, *Mol Cancer Ther.* (2006) 5(3): 575-85.
10. Bosanquet A.G., Bell P.B., Ex vivo therapeutic index by drug sensitivity assay using fresh human normal and tumor cells, (2004) 4(2): 145-54.

11. Bosanquet A.G., Burlton A.R., Bell P.B., Parameters affecting the ex vivo cytotoxic drug sensitivity of human hematopoietic cells, *J Exp Ther Oncol.* (2002) 2(1): 53-63.
12. Bosanquet A.G., Coppelstone J.A., Johnson S.A., Smith A.G., Povey S.J., Orchard J.A., Oscier D.G., Response to cladribine in previously treated patients with chronic lymphocytic leukaemia identified by ex vivo assessment of drug sensitivity by DiSC assay, *Br J Haematol.* (1999) 106(2): 474-6.
13. Bröker L.E., Kruyt F.A., Giaccone G., Cell death independent of caspases: a review, *Clin Cancer Res.* (2005) 11(9): 3155-62.
14. Bromidge T.J., Turner D.L., Howe D.J., Johnson S.A., Rule SA., In vitro chemosensitivity of chronic lymphocytic leukaemia to purine analogues--correlation with clinical course, *Leukemia.* (1998) 12(8): 1230-5.
15. Carmeliet P., R.K. Jain, Angiogenesis in cancer and other diseases, *Nature* (2000) 407: 249-257.

16. Cassileth P.A., Harrington D.P., Appelbaum F.R., Lazarus H.M., Rowe J.M., Paietta E., Willman C., Hurd D.D., Bennett J.M., Blume K.G., Head D.R., Wiernik P.H., Chemotherapy compared with autologous or allogeneic bone marrow transplantation in the management of acute myeloid leukemia in first remission, *N Engl J Med.* (1998) 339(23): 1649-56.
17. Chen J., McMillan N.A., Molecular basis of pathogenesis, prognosis and therapy in chronic lymphocytic leukaemia, *Cancer Biol Ther.* (2007) 7(2):
18. Cohen M.H., Johnson J.R., Pazdur R., U.S. Food and Drug Administration Drug Approval Summary: conversion of imatinib mesylate (STI571; Gleevec) tablets from accelerated approval to full approval. *Clin Cancer Res.* (2005) 11(1):12-9.
19. Conaway C.C., C.X. Wang, B. Pittman, Y.M. Yang, J.E. Schwartz, D. Tian, E.J. McIntee, S.S. Hecht, F.L. Chung, Phenethyl isothiocyanate and sulforaphane and their N-acetylcysteine conjugates inhibit malignant progression of lung adenomas induced by tobacco carcinogens in A/J mice, *Cancer Res.* (2005) 65: 8548-8557.
20. Cornblatt BS, Ye L, Dinkova-Kostova AT, Erb M, Fahey JW, Singh NK, Chen MS, Stierer T, Garrett-Mayer E, Argani P, Davidson NE, Talalay P, Kensler TW, Visvanathan K.

Preclinical and clinical evaluation of sulforaphane for chemoprevention in the breast, *Carcinogenesis*. (2007) 28(7): 1485-90.

21. Cuneo A., Bigoni R., Roberti m.g., Castoldi G.L. Lineage involvement and prognosis in Ph chromosome positive acute lymphoblastic leukaemia, *Brit. J. Hematol.* (1998) 101: 388-396.
22. Degtarev A, Boyce M, Yuan J. A decade of caspases, *Oncogene*. (2003) 22(53): 8543-67.
23. Dighiero G., Binet J.L. When and how to treat chronic lymphocytic leukaemia, *N. Engl. J. Med.* (2000) 343: 1799-1801.
24. Digiuseppe JA. Acute lymphoblastic leukemia: diagnosis and detection of minimal residual disease following therapy, *Clin Lab Med.* (2007) 27(3): 533-49.
25. Dinkova-Kostova AT, Holtzclaw WD, Cole RN, Itoh K, Wakabayashi N, Katoh Y, Yamamoto M, Talalay P. Direct evidence that sulfhydryl groups of Keap1 are the sensors regulating induction of phase 2 enzymes that protect against carcinogens and oxidants, *Proc Natl Acad Sci U S A.* (2002) 99(18): 11908-13.

26. Doehner H., Stilgenbauer S. Benner A., Leupolt E., Kroeber A., Bullinger L. Genomic aberrations and survival in chronic lymphocytic leukaemia, *N. Engl. J. Med* (2000) 343. 1910-1916.
27. Fabarius A., M. Giehl, O. Frank, P. Duesberg, A. Hochhaus, R. Hehlmann, W. Seifarth, Induction of centrosome and chromosome aberrations by imatinib in vitro, *Leukemia* (2005) 19: 1573-1578.
28. Fahey JW, Haristoy X, Dolan PM, Kensler TW, Scholtus Sulforaphane inhibits extracellular, intracellular, and antibiotic-resistant strains of *Helicobacter pylori* and prevents benzo[a]pyrene-induced stomach tumors, *Proc Natl Acad Sci U S A.* (2002) 99(11): 7610-5.
29. Fausel C. Targeted chronic myeloid leukemia therapy: seeking a cure, *J Manag Care Pharm.* (2007) 8 (Suppl A): 8-12.
30. Fimognari C, Hrelia P. Sulforaphane as a promising molecule for fighting cancer. *Mutat Res.* (2007) 635(2-3): 90-104.

31. Fimognari C., F. Berti, G. Cantelli-Forti, P. Hrelia, Effect of sulforaphane on micronucleus induction in cultured human lymphocytes by four different mutagens, *Environ. Mol. Mutagen.* (2005) 46: 260-267.
32. Fimognari C., Lenzi M., Cantelli-Forti G., Hrelia P. Induction of Differentiation in Human Promyelocytic Cells by the Isothiocyanate Sulforaphane, *In Vivo* (2008) (in stampa).
33. Fimognari C., M. Nüsse, F. Berti, R. Iori, G. Cantelli-Forti, P. Hrelia, Isothiocyanates as novel cytotoxic and cytostatic agents: molecular pathway on human transformed and non-transformed cells, *Biochem. Pharmacol.* (2004) 68: 1133-1138.
34. Fimognari C., M. Nüsse, R. Cesari, R. Iori, G. Cantelli-Forti, P. Hrelia, Growth inhibition, cell-cycle arrest and apoptosis in human T-cell leukemia by the isothiocyanate sulforaphane, *Carcinogenesis* (2002) 23: 581-586.
35. Gamet-Payrastre, P. Li, S. Lumeau, G. Cassar, M.A. Dupont, S. Chevolleau, N. Gasc, J. Tulliez, F. Terce, Sulforaphane, a naturally occurring isothiocyanate, induces cell cycle arrest and apoptosis in HT29 human colon cancer cells, *Cancer Res.* (2000) 60: 1426-1433.

36. Garattini S, Bertele V. Efficacy, safety, and cost of new anticancer drugs, *BMJ*. (2002) 325(7358): 269-71.
37. Ghobrial IM, Witzig TE, Adjei AA. Targeting apoptosis pathways in cancer therapy. *CA Cancer J Clin*. (2005) 55(3): 178-94.
38. Gills J.J., E.H. Jeffery, N.V. Matusheski, R.C. Moon, D.D. Lantvit, J.M. Pezzuto, Sulforaphane prevents mouse skin tumorigenesis during the stage of promotion, *Cancer Lett*. (2006) 236: 72-79.
39. Gingras D., M. Gendron, D. Boivin, A. Moghrabi, Y. Theoret, R. Beliveau, Induction of medulloblastoma cell apoptosis by sulforaphane, a dietary anticarcinogen from Brassica vegetables, *Cancer Lett*. (2004) 236: 35-43.
40. Gokbuget N., Hoelzer D. Treatment of adult acute lymphoblastic leukemia, *Hematol: Am Soc Hematol Educ Program* (2006):133–141.
41. Goldstone AH, Burnett AK, Wheatley K, Smith AG, Hutchinson RM, Clark RE; Medical Research Council Adult Leukemia Working Party. Attempts to improve treatment outcomes in acute myeloid leukemia (AML) in older patients:

the results of the United Kingdom Medical Research Council AML11 trial, *Blood*. (2001) 98(5):1302-11.

42. Golstein P, Ojcius DM, Young JD. Cell death mechanisms and the immune system, *Immunol Rev*. (1991) 121:29-65.

43. Grimwade D, Walker H, Harrison G, Oliver F, Chatters S, Harrison CJ, Wheatley K, Burnett AK, Goldstone AH; Medical Research Council Adult Leukemia Working Party. The predictive value of hierarchical cytogenetic classification in older adults with acute myeloid leukemia (AML): analysis of 1065 patients entered into the United Kingdom Medical Research Council AML11 trial, *Blood*. (2001) 98(5): 1312-

44. Guillem V, Tormo M. Influence of DNA damage and repair upon the risk of treatment related leukaemia, *Leuk Lymphoma*. (2008) 49(2): 204-17.

45. Hallek M, Cheson BD, Catovsky D, Caligaris-Cappio F, Dighiero G, Dohner H, Hillmen P, Keating MJ, Montserrat E, Rai KR, Kipps TJ. Guidelines for the diagnosis and treatment of chronic lymphocytic leukemia: a report from the International Workshop on Chronic Lymphocytic Leukemia (IWCLL) updating the National Cancer Institute-Working Group (NCI-WG) 1996 guidelines, *Blood*. (2008)

46. Han X, Bueso-Ramos CE. Precursor T-cell acute lymphoblastic leukemia/lymphoblastic lymphoma and acute biphenotypic leukemias, *Am J Clin Pathol.* (2007) 127(4): 528-44.
47. Hasford J, Pfirmann m., Hehlmann R., Allan N.C., Baccarani M., Kluin-Nelemans J.C. A new prognostic score for survival of patients with chronic myeloid leukaemia treated with Interferon Alfa, *J. National Cancer Institute* (1998) 90: 850-858.
48. Hu R., V. Hebbar, B.R. Kim, C. Chen, B. Winnik, B. Buckley, P. Soteropoulos, P. Toliás, R.P. Hart, A.N. Kong, *In vivo* pharmacokinetics and regulation of gene expression profiles by isothiocyanate sulforaphane in the rat, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* (2004) 310: 263-271.
49. Jackson J.J., K.W. Singletary, Sulforaphane inhibits human MCF-7 mammary cancer cell mitotic progression and tubulin polymerization, *J. Nutr.* (2004) 134: 2229-2236.
50. Jackson J.J., K.W. Singletary, Sulforaphane: a naturally occurring mammary carcinoma mitotic inhibitor, which disrupts tubulin polymerization, *Carcinogenesis* (2004) 25: 219-227.

51. Jagasia AA, Sher DA, Le Moine PJ, Kim DH, Moldwin RL, Smith SD, Diaz MO. Deletion or lack of expression of CDKN2 (CDK4I/MTS1/INK4A) and MTS2 (INK4B) in acute lymphoblastic leukemia cell lines reflects the phenotype of the uncultured primary leukemia cells, *Leukemia*. (1996) 10(4):624-8.
52. Jiang, C. Chen, B. Yang, V. Hebbar, A.N. Kong, Differential responses from seven mammalian cell lines to the treatments of detoxifying enzyme inducers, *Life Sci*. (2003) 72: 2243-2253.
53. Kantarjian H.M., Adult acute lymphocytic leukemia. Introduction and questions related to current programs, *Hematol Oncol Clin North Am*. (2000) 14(6): 1205-8.
54. Karmakar S., M.S. Weinberg, N.L. Banik, S.J. Patel, S.K. Ray, Activation of multiple molecular mechanisms for apoptosis in human malignant glioblastoma t98g and u87mg cells treated with sulforaphane, *Neuroscience* (2006) 141: 1265-1280.
55. Krivtsov AV, Armstrong SA. MLL translocations, histone modifications and leukaemia stem-cell development. *Nat Rev Cancer*. (2007) 7(11): 823-33.

56. Kuroiwa Y, A. Nishikawa, Y. Kitamura, K. Kanki, Y. Ishii, T. Umemura, M. Hirose, Protective effects of benzyl isothiocyanate and sulforaphane but not resveratrol against initiation of pancreatic carcinogenesis in hamsters, *Cancer Lett.* (2006) 241: 275-280.
57. Lee JM, Johnson JA. An important role of Nrf2-ARE pathway in the cellular defense mechanism, *J Biochem Mol Biol.* (2004) 37(2):139-43.
58. Lima CS, Vassalo J, Lorand-Metze I, Bechelli AP, Souza CA. The significance of trilineage myelodysplasia in de novo acute myeloblastic leukemia: clinical and laboratory features. *Haematologia.* (1997) 28(2): 85-95.
59. Liotta L.A., Tumor invasion and metastasis: role of extracellular matrix, *Cancer Res.* (1986) 46: 1-7.
60. Liso V. Diagnosis of acute leukaemia: contributory cytochemistry, *Leukemia* (1992) 6: 10-12.
61. Liu P., T. Ahmed, F.L. Chung, C.C. Conaway, J.W. Chiao, Targeting cell cycle machinery as a molecular mechanism of sulforaphane in prostate cancer prevention, *Int. J. Oncol.* (2004) 24: 187-192.

62. Lord B.I., Dexter T.M. Which are the hematopoietic stem cells?, *Exp. Hematol.* (2000) 23: 1237-1240.
63. Maheo K., F. Morel, S. Langouet, H. Kramer, E. Le Ferrec, B. Ketterer, A. Guillouzo, Inhibition of cytochromes P-450 and induction of glutathione S-transferases by sulforaphane in primary human and rat hepatocytes, *Cancer Res.* (1997) 57: 3649-3652.
64. Marley S.B., Deininger M.W.N., Davidson r.J, Goldman J.M., Gordon M.Y. The tyrosine Kinase inhibitor STI571, like interferon-alfa, preferentially reduces the capacity for amplification of granulocyte-macrophage progenitors from patients with chronic myeloid leukaemia, *Experimental Hematol.* (2000) 28: 551-557.
65. Matutes E. Adult T-cell leukaemia/lymphoma, *J Clin Pathol.* (2007) 60(12): 1373-7.
66. Mayno G., Joris I. Apoptosis, oncosis and necrosis: an overview of cell death, *Am J Pathol* (1995)146: 3-15.

67. Melo J.V. The diversity of BCR-ABL fusion and their relationship to leukaemia phenotype, *Blood* (1996) 88(7): 2375-2384.
68. Metcalf D., Regulatory mechanisms controlling hemapoiesis: principles and problems, *Stem cells* (1998) 16: 3-11.
69. Moen MD, McKeage K, Plosker GL, Siddiqui MA. Imatinib: a review of its use in chronic myeloid leukaemia, *Drugs*. (2007) 67(2): 299-320.
70. Morabito F, Filangeri M, Sculli G, Oliva B. In vitro modulation of bcl-2 protein expression, drug-induced apoptosis and cytotoxicity by interleukin-10 in chronic lymphocytic leukemia. *Haematologica*. (1998) 83(11): 1046-8.
71. Mrozek K., Heinonen K., Bloomfield C.D. Prognostic value of cytogenetic findings in adults with acute myeloid leukemia, *Int. T. Hematol.* (2000) 72: 261-271.
72. Myzak M.C., P.A. Karplus, F.L. Chung, R.H. Dashwood, A novel mechanism of chemoprotection by sulforaphane: inhibition of histone deacetylase, *Cancer Res.* 64 (2004) 5767-5774.

73. Obrador E., J. Carretero, A. Ortega, I. Medina, V. Rodilla, J.A. Pellicer, J.M. Estrema, Gamma glutamyl transpeptidase over expression increases metastatic growth of B16 melanoma cells in the mouse liver, *Hepatology* (2002) 35: 74-81.
74. O'Connor R, Cesano A, Lange B, Finan J, Nowell PC, Clark SC, Raimondi SC, Rovera G, Santoli D. Growth factor requirements of childhood acute T-lymphoblastic leukemia: correlation between presence of chromosomal abnormalities and ability to grow permanently in vitro, *Blood*. (1991) 77(7): 1534-45.
75. Oguro H, Iwama A. Life and death in hematopoietic stem cells, *Curr Opin Immunol*. (2007) 19(5): 503-9.
76. Owen C, Barnett M, Fitzgibbon J. Familial myelodysplasia and acute myeloid leukaemia--a review, *Br J Haematol*. (2008) 140(2):123-32.
77. Pane F., Friggeri F., Sindonna M., Luciano L., Ferrara F., Cimino R., Meloni G. Neutrophilic-chronic myelogenous leukaemia. A distinct disease with a specific molecular marker, *Blood* (1996) 88: 2410.

78. Parker J.E., Mufti G.J.: Ineffective haemopoiesis and apoptosis in myelodysplastic syndromes, *Brit. J. Haematol.* (1998) 101: 220-230.
79. Parnaud G., P. Li, G. Cassar, P. Rouimi, J. Tulliez, L. Combaret, L. Gamet-Payrastre, Mechanism of sulforaphane-induced cell cycle arrest and apoptosis in human colon cancer cells, *Nutr. Cancer* (2004) 48: 198-206.
80. Pasternak G, Pasternak L. Persistence of bcr-abl mRNA-expressing cells in long-term cultures established from chronic myeloid leukemic bone marrow or blood, *Ann Hematol.* (1994) 68(1): 9-14.
81. Petersdorf SH, Kopecky KJ, Head DR, Boldt DH, Balcerzak SP, Wun T, Roy V, Veith RW, Appelbaum FR. Comparison of the L10M consolidation regimen to an alternative regimen including escalating methotrexate/L-asparaginase for adult acute lymphoblastic leukemia: a Southwest Oncology Group Study, *Leukemia.* (2001) 15(2): 208-16.
82. Pham N.A., J.W. Jacobberger, A.D. Schimmer, P. Cao, M. Gronda, D.W. Hedley, The dietary isothiocyanate sulforaphane targets pathways of apoptosis, cell cycle arrest, and oxidative stress in human pancreatic cancer cells and inhibits tumor growth in severe combined immunodeficient mice, *Mol. Cancer Ther.* (2004) 3: 1239-1248.

83. Pieters R, Carroll WL. Biology and treatment of acute lymphoblastic leukaemia, *Pediatr. Clin. North Am.* (2008) 55(1): 1-20.
84. Pui C.H., Evans W.E. Acute lymphoblastic leukaemia, *N. Engl. J. Med.* (1998) 339: 605-614.
85. Rao AV, Schmader K. Monoclonal antibodies as targeted therapy in hematologic malignancies in older adults, *Am. J Geriatr. Pharmacother.* (2007) 5(3): 247-62.
86. Ravandi F, Burnett AK, Agura ED, Kantarjian HM. Progress in the treatment of acute myeloid leukemia. *Cancer.* (2007) 110(9): 1900-10.
87. Shapiro T.A., J.W. Fahey, A.T. Dinkova-Kostova, W.D. Holtzclaw, K.K. Stephenson, K.L. Wade, L. Ye, P. Talalay, Safety, tolerance, and metabolism of broccoli sprout glucosinolates and isothiocyanates: a clinical phase I study, *Nutr. Cancer* (2006) 55: 53-62.
88. Shishu D., Kaur IP. Inhibition of mutagenicity of food-derived heterocyclic amines by sulforaphane--a constituent of broccoli, *Indian J. Exp. Biol.* (2003) 41(3): 216-9.

89. Singh S.V., A. Herman-Antosiewicz, A.V. Singh, K.L. Lew, S.K. Srivastava, R. Kamath, K.D. Brown, L. Zhang, R. Baskaran, Sulforaphane-induced G2/M phase cell cycle arrest involves checkpoint kinase 2-mediated phosphorylation of cell division cycle 25C, *J. Biol. Chem.* (2004) 279: 25813-25822.
90. Singh A.V., D. Xiao, K.L. Lew, R. Dhir, S.V. Singh SV, Sulforaphane induces caspase-mediated apoptosis in cultured PC-3 human prostate cancer cells and retards growth of PC-3 xenografts in vivo, *Carcinogenesis* (2004) 25: 83-90.
91. Singh S.V., S.K. Srivastava, S. Choi, K.L. Lew, J. Antosiewicz, D. Xiao, Y. Zeng, S.C. Watkins, C.S. Johnson, D.L. Trump, YJ Lee, H. Xiao, A. Herman-Antosiewicz, Sulforaphane-induced cell death in human prostate cancer cells is initiated by reactive oxygen species, *J. Biol. Chem.* (2005) 280: 19911-19924.
92. Singletary K., C. MacDonald, Inhibition of benzo[a]pyrene- and 1,6-dinitropyrene-DNA adduct formation in human mammary epithelial cells by dibenzoylmethane and sulforaphane, *Cancer Lett.* (2000) 155: 47-54.

93. Sokal J.E., Cox E.B., Baccarani M. Prognostic discrimination in "good risk" chronic granulocytic leukaemia, *Blood* (1984) 63: 789-799.
94. Syed NN, Usman M, Khaliq G, Adil SN, Khurshid M. Clinico-pathologic features of chronic myeloid leukemia and risk stratification according to Sokal score, *J. Coll. Physicians Surg. Pak.* (2006) 16(5): 336-9.
95. Terstappen I., Huang S., Piccker L. Flow cytometric assessment of human T-cell differentiation in thymus and bone marrow, *Blood* (1992) 79. 666-667.
96. Thaimattam R, Banerjee R, Miglani R, Iqbal J. Protein kinase inhibitors: structural insights into selectivity. *Curr. Pharm. Des.* (2007) 13(27): 2751-65.
97. Thejass P., G. Kuttan, Antimetastatic activity of sulforaphane, *Life Sci.* (2006) 78: 3043-3050.
98. Uckun F. Regulation of human B-cell ontogeny, *Blood* (1990) 76: 1908-1923.

99. Weir EG, Ali Ansari-Lari M, Batista DA, Griffin CA, Fuller S, Smith BD, Borowitz MJ. Acute bilineal leukemia: a rare disease with poor outcome, *Leukemia*. (2007) 21(11): 2264-70.
100. Xu C., G. Shen, X. Yuan, J.H. Kim, A. Gopalkrishnan, Y.S. Keum, S. Nair, A.N. Kong, ERK and JNK signaling pathways are involved in the regulation of activator protein 1 and cell death elicited by three isothiocyanates in human prostate cancer PC-3 cells, *Carcinogenesis* (2006) 27: 437-445.
101. Ye L., A.T. Dinkova-Kostova, K.L. Wade, Y. Zhang, T.A. Shapiro, P. Talalay, Quantitative determination of dithiocarbamates in human plasma, serum, erythrocytes and urine: pharmacokinetics of broccoli sprout isothiocyanates in humans, *Clin. Chim. Acta* (2002) 316: 43-53.
102. Yoxall V, Kentish P, Coldham N, Kuhnert N, Sauer MJ, Ioannides C. Modulation of hepatic cytochromes P450 and phase II enzymes by dietary doses of sulforaphane in rats: Implications for its chemopreventive activity. *Int. J. Cancer*. (2005) 117(3): 356-62.
103. Zhang Y., Callaway EC., High cellular accumulation of sulphoraphane, a dietary anticarcinogen, is followed by rapid transporter-mediated export as a glutathione conjugate, *Biochem. J.* (2002) 364: 301-7.

104. Zhang V., P. Talalay, G.C. Cho, G.H. Posner, A major inducer of anticarcinogenic protective enzymes from broccoli: isolation and elucidation of structure, *Proc. Natl. Acad. Sci.* (1992) 89: 2399-2403.

A) PUBBLICAZIONI PRODOTTE NEL PERIODO DI DOTTORATO E INERENTI LA RICERCA

1. FIMOIGNARI C., NÜSSE M., LENZI M., SCIUSCIO D., CANTELLI-FORTI G., HRELIA P. (2006). Sulforaphane increases the efficacy of doxorubicin in mouse fibroblasts characterized by p53 mutations. *Mutat Res*, 601(1-2): 92-101.
2. FIMOIGNARI C., LENZI M., CANTELLI-FORTI G., HRELIA P. (2006). Isothiocyanates as promising chemopreventive and antioxidant agents. In: *New developments in antioxidants research*, NOVA Publishers, New York.
3. FIMOIGNARI C., LENZI M., SCIUSCIO D., CANTELLI-FORTI G., HRELIA P. (2007). Combination of doxorubicin and sulforaphane for reversing doxorubicin-resistant phenotype in mice fibroblasts with p53^{Ser220} mutation. *Ann NY Acad Sci*, 1095: 62-69.
4. FIMOIGNARI C., LENZI M., SCIUSCIO D., CANTELLI-FORTI G., HRELIA P. (2007). Cell-cycle specificity of sulforaphane-mediated apoptosis in Jurkat T-leukemia cells. *In Vivo*, 21(2): 377-380.
5. FIMOIGNARI C., LENZI M., HRELIA P. (2008). Chemoprevention of Cancer by Isothiocyanates and Anthocyanins: Mechanisms of Action and Structure-Activity Relationship. *Current Medicinal Chemistry*, 15: 440-447.

6. FIMOIGNARI C., LENZI M., CANTELLI-FORTI G., HRELIA P. (2008). Induction of Differentiation in Human Promyelocytic Cells by the Isothiocyanate Sulforaphane. *In Vivo* (in stampa).
7. FIMOIGNARI C., LENZI M., CANTELLI FORTI G., HRELIA P. (2008). Apoptosis and modulation of cell cycle control by bile acids in human leukemia T cells. *Ann N Y Acad Sci* (in stampa).

B) PRESENTAZIONI A CONGRESSI

1. LENZI M. The isothiocyanate sulforafane affects cell-cycle progression and apoptosis induction of human leukemia cells, IX SEMINARIO NAZIONALE DOTTORANDI IN FARMACOLOGIA E SCIENZE AFFINI (Siena, Certosa di Pontignano, 20-23 Settembre 2005).
2. LENZI M., FIMOIGNARI C., CANTELLI-FORTI G., HRELIA P. Effetti su ciclo cellulare ed induzione di apoptosi dell'isotiocianato sulforafane su colture di cellule T-linfoblastoidi, XIV CONGRESSO NAZIONALE SOCIETÀ ITALIANA DI TOSSICOLOGIA (Roma, 6-9 Febbraio 2006). p. 234
3. LENZI M. The isothiocyanate sulforaphane induces cyclin D3 and P53 mediated cell-cycle arrest and apoptosis of non-transformed human T lymphocytes, X SEMINARIO NAZIONALE DOTTORANDI IN FARMACOLOGIA E

SCIENZE AFFINI (Siena, Certosa di Pontignano, 25-28 Settembre 2006).

4. FIMOIGNARI C., LENZI M., SCIUSCIO D., CANTELLI-FORTI G., HRELIA P. Sulforaphane can restore sensitivity to doxorubicin in mouse fibroblasts characterized by p53Ser220 mutation-related chemoresistance, SIXTH ESH - UT MD ANDERSON CANCER CENTER INTERNATIONAL EUROCONFERENCE ON MECHANISMS OF CELL DEATH AND DISEASE: ADVANCES IN THERAPEUTIC INTERVENTION AND DRUG DEVELOPMENT (Cascais, Portugal, 13-16 Ottobre 2006). p. 18
5. FIMOIGNARI C., LENZI M., CANTELLI-FORTI G., HRELIA P. Percorsi molecolari alla base dell'attività antileucemica del sulforafane, 33° CONGRESSO NAZIONALE DELLA SOCIETÀ ITALIANA DI FARMACOLOGIA (Cagliari, 6-9 giugno 2007). p. 58
6. FIMOIGNARI C., LENZI M., CANTELLI-FORTI G., HRELIA P. (2007) Identification of new anticancer agents from natural sources. INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON ADVANCES IN SYNTHETIC AND MEDICINAL CHEMISTRY, (S. Petersburg, August 27-31), p. 58.
7. LENZI M. Studio del potenziale proapoptotico del Sulforafane su un modello ex vivo di leucemia, XI SEMINARIO NAZIONALE DOTTORANDI IN FARMACOLOGIA E SCIENZE AFFINI (Siena, Certosa di Pontignano, 24-27 Settembre 2007).